

**Uso de probióticos en el cultivo de *Brachionus calyciflorus* (Rotifera).**

**Tesis**

**Que para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN ECOLOGÍA APLICADA**

**P R E S E N T A**

**RUBÉN ALONSO CONTRERAS TAPIA**

**2142800460**

**Comité Tutorial:**

**Directora:**

Dra. María Elena Castellanos Páez

**Asesores:**

Dr. Javier Aldeco Ramírez

Dra. Nandini Sarma

## **Agradecimientos**

A la Dra. María Elena Castellanos Páez por su apoyo incondicional durante la planeación, desarrollo y conclusión de este proyecto.

Al Dr. Javier Aldeco Ramírez y la Dra. Nandini Sarma por sus comentarios y aportes valiosos al proyecto.

A la Dra. Marcela I. Benítez Díaz Mirón por su apoyo para los análisis estadísticos y recomendaciones para la realización de esta tesis.

A la Dra. Gabriela Garza Mouriño por su apoyo y enseñanzas.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por la beca otorgada durante la Maestría.

A Altacrusta por facilitar los probióticos empleados en esta investigación.

A los revisores de la ICR por sus comentarios.

## **Dedicatoria**

El presente trabajo se lo dedico con mucho cariño a mis padres quienes me han brindado la oportunidad de acceder a una educación de calidad desde niño. Por todo el esfuerzo y sacrificio que han hecho durante todos estos años y el apoyo incondicional. Es un orgullo ser su hijo.

A mis hermanos y familia por apoyarme, una sincera disculpa por las ausencias en ciertos momentos. A Talia por ser mi ejemplo y por su apoyo absoluto.

A mi compañera de vida Magy, por su apoyo y por animarme en cada momento.

A Male, Gaby y Marce por ser un ejemplo a seguir en muchos campos y su apoyo en el ambito personal, educativo y profesional. Y lo más valioso, por presentarme a estos extraordinarios bichos llamados rotíferos.

## Índice

<b>Capítulo 1. Determinación de la ración óptima de <i>Chlorella vulgaris</i> como alimento de <i>Brachionus calyciflorus</i>.....</b>	<b>1</b>
Resumen .....	1
Abstract .....	1
Introducción .....	1
Revisión bibliográfica .....	4
Fitoplancton .....	4
Género <i>Chlorella</i> .....	6
<i>Chlorella vulgaris</i> .....	6
Rotíferos .....	8
Alimentación.....	10
Reproducción .....	11
Objetivo.....	13
Material y Métodos .....	13
Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	13
Cultivo de rotíferos .....	14
Diseño experimental .....	14
Conteo de rotíferos .....	15
Tasa de crecimiento poblacional .....	15
Análisis de datos .....	15
Resultados .....	16
Discusión.....	20
Conclusiones .....	21
Literatura citada.....	23
<b>Capítulo 2: Efecto de diferentes concentraciones de probióticos en el cultivo de <i>Brachionus calyciflorus</i>.....</b>	<b>35</b>
Resumen .....	35
Abstract .....	35
Introducción .....	36
Revisión bibliográfica .....	39

Probióticos.....	39
Cepas de probióticos empleadas en acuicultura.....	41
Rotíferos como alimento vivo en Acuicultura.....	42
Probióticos en el cultivo de rotíferos.....	47
Objetivo.....	49
Objetivos particulares.....	49
Material y Métodos.....	49
Diseño experimental.....	49
Conteo de rotíferos.....	50
Tasa de crecimiento poblacional.....	50
Proporción de huevos.....	50
Análisis de datos.....	51
Resultados.....	51
Discusión.....	58
Conclusiones.....	61
Literatura citada.....	62
<b>Capítulo 3: Determinación de la dosis óptima de probióticos en el cultivo de <i>B. calyciflorus</i>.....</b>	<b>77</b>
Resumen.....	77
Abstract.....	77
Introducción.....	78
Revisión bibliográfica.....	80
Género <i>Brachionus</i> .....	80
Objetivo.....	84
Material y Métodos.....	84
Diseño experimental.....	84
Conteo de rotíferos.....	84
Tasa de crecimiento poblacional.....	85
Análisis de datos.....	85
Resultados.....	85
Discusión.....	93
Conclusiones.....	97

Literatura citada.....	98
<b>Capítulo 4: Tasas de alimentación de crías de <i>Amatitlania nigrofasciata</i> alimentadas con <i>B. calyciflorus</i> cultivado con probióticos y sin probióticos. ....</b>	<b>105</b>
Resumen .....	105
Abstract .....	105
Introducción .....	106
Revisión bibliográfica .....	107
<i>B. calyciflorus</i> como alimento en acuicultura .....	107
<i>Amatitlania nigrofasciata</i> .....	108
<i>A. nigrofasciata</i> en la acuariofilia .....	109
Objetivos .....	110
Material y Métodos .....	110
Tasa de ingestión .....	111
Resultados .....	111
Discusión.....	113
Conclusiones .....	114
Literatura citada.....	115
<b>Capítulo 5: Transferencia Tecnológica – Paquete tecnológico LR-50.....</b>	<b>119</b>
Resumen .....	119
Abstract .....	119
Definición y delimitación del paquete tecnológico.....	120
Modelo LR-50 .....	121
Manual de usuario.....	122
Capacitación .....	123

## **Capítulo 1. Determinación de la ración óptima de *Chlorella vulgaris* como alimento de *Brachionus calyciflorus*.**

### **Resumen**

Se comparó el crecimiento poblacional de *Brachionus calyciflorus* alimentado con seis densidades diferentes de *Chlorella vulgaris*. Las densidades utilizadas variaron de 1.0 a  $9.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>. El aumento en la concentración de *C. vulgaris* resultó en un incremento en la densidad máxima y tasa de crecimiento poblacional de *B. calyciflorus*. La densidad máxima de *B. calyciflorus* se presentó entre los días 7 y 9 del cultivo y fue desde 56.0 hasta 151.33 ind ml<sup>-1</sup>, mientras que la tasa de crecimiento fue de 0.19 a 0.39. El valor más alto de densidad máxima y tasa de crecimiento de *B. calyciflorus* se presentó al suministrar  $9.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> de *C. vulgaris*. La densidad máxima y la tasa de crecimiento presentaron diferencias significativas entre tratamientos.

### **Abstract**

The population growth of *Brachionus calyciflorus* was compared using *Chlorella vulgaris* as food in six concentrations. The densities used varied from 1.0 to  $9.0 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>. The increase in the concentration of *C. vulgaris* resulted in an increase in the maximum population density and population growth rate of the *B. calyciflorus*. The maximum density of *B. calyciflorus* occurred between days 7 and 9 of cultivation, and varied from 56.0 to 151.33 ind ml<sup>-1</sup>, while the population growth rate was from 0.19 to 0.39. The highest maximum density and population growth rate of *B. calyciflorus* were reached when  $9.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> of *C. vulgaris* were supplied. Significant differences in the maximum densities and population growth rates between treatments were found.

### **Introducción**

Los rotíferos constituyen un filo de 2,030 especies de animales zooplanctónicos considerados como ubicuos, ya que se encuentran en casi todos los hábitats acuáticos, desde grandes lagos permanentes hasta charcas temporales, aguas intersticiales y capilares, desde lagos ácidos de

explotaciones mineras hasta lagos salados y océanos, desde lagos alpinos hiperoligotróficos hasta aguas residuales (Wallace y Snell, 2001; Wallace *et al.*, 2006; Segers, 2008).

Los rotíferos son de importancia debido a que juegan un papel crucial en el flujo de energía a través de las redes tróficas de ecosistemas de agua dulce (Doohan, 1973; Walz, 1995). Tienen las mayores tasas intrínsecas de crecimiento poblacional entre los principales grupos de zooplancton, y muestran altas tasas de renovación poblacional en medios naturales (Gannon y Stemberger, 1978).

Algunas especies de rotíferos se alimentan de microalgas (*e.g. Brachionus angularis*; Garza-Mouriño *et al.*, 2014), otros son carnívoros (*e.g. Asplanchna brighwelli*; Sarma, 1993), mientras que otros son carroñeros (*e.g. Lecane* sp. Wallace *et al.*, 2006). Muchas de las especies aparentan ser omnívoros, alimentándose de partículas de un tamaño correcto. La elección de alimento parece estar determinada, en el caso de los rotíferos filtradores, por el tamaño de las partículas de alimento. La mayoría de los rotíferos son herbívoros que se alimentan de algas menores de 20  $\mu\text{m}$ , por lo que son muy importantes en la cadena trófica ya que representan la conexión entre el nanoplancton y el zooplancton carnívoro (Ruttner-Kolisko, 1974). Las crías de muchos peces dependen en algún estadio de presas del tamaño de los rotíferos (200-500  $\mu\text{m}$ ; Ruttner-Kolisko, 1974; Herzig, 1987). Así, los rotíferos son un enlace entre las redes alimenticias microbianas y clásicas (Herzig, 1987; Arndt, 1993).

Los factores que influyen en la alimentación de los rotíferos son: concentración del alimento, tamaño del alimento, edad del alimento, tipo de alimento, temperatura, intensidad de luz, calidad de agua, tamaño, sexo, estado nutricional, estado reproductivo, ritmos circadianos y comportamiento del depredador, la densidad de depredadores y el periodo de aclimatación (Galkovskaya, 1963; Pilarska, 1977; Leidy y Ploskey, 1980).

Las primeras investigaciones que reportaron el uso de *C. vulgaris* como alimento de rotíferos mostraron un crecimiento inestable de los rotíferos debido a la deficiencia de esta microalga en su contenido de vitamina B<sub>12</sub>, nutriente esencial para el crecimiento de rotíferos. Esta deficiencia fue complementada con la adición de vitamina B<sub>12</sub> a los medios de cultivo de *C. vulgaris* (Hirayama *et al.*, 1989; Maruyama *et al.*, 1997). *C. vulgaris* se ha empleado exitosamente como alimento de especies del género *Brachionus* (Sarma *et al.*, 2001).



En el presente estudio se evaluó el crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* con *C. vulgaris* como alimento en concentraciones de entre 1.0 a 9.0 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup>. El incremento en la densidad de *C. vulgaris* resultó en un aumento en la densidad máxima y mayor tasa de crecimiento poblacional de *B. calyciflorus*. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó la densidad 1.0 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup> de *C. vulgaris* como testigo para evaluar el efecto de suministrar *C. vulgaris* + probióticos como alimento de *B. calyciflorus*. Los resultados permiten comparar el crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* con diferentes densidades de *C. vulgaris* con el crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* alimentado con una densidad baja de *C. vulgaris* más probióticos en diferentes densidades.

## Revisión bibliográfica

### Fitoplancton

Las comunidades planctónicas de los cuerpos de agua dulce se clasifican en fitoplancton y zooplancton. El fitoplancton comprende un amplio grupo de organismos autótrofos que representan la base de la trama trófica de los cuerpos dulceacuícolas (Bellinger y Sigee, 2010). El fitoplancton dulceacuícola es una asociación diversa de procariontes verdes azules, desmidos, diatomeas, dinoflagelados, crisófitas y criptomonadas (Brown *et al.*, 1999; Bellinger y Sigee, 2010). El fitoplancton (de 1 a 250  $\mu\text{m}$  de tamaño), se encuentra flotando libremente en la columna de agua. En términos fisiológicos, son fundamentalmente organismos autótrofos y fotosintéticos, aunque existen especies que son heterótrofas (Porter, 1977; Brown *et al.*, 1999; Hemaiswarya *et al.*, 2011).

El término microalga se refiere a aquellos organismos que utilizan como pigmento fotosintético principal a la *clorofila a* y que realizan fotosíntesis como proceso energético para producir compuestos complejos al fijar  $\text{CO}_2$  y que no tienen raíces, tallos ni hojas diferenciadas (Lee, 1989; Tomaselli, 2004; Brennan y Owende, 2010; Bark, 2012; Taelman *et al.*, 2013). El término microalga, sin valor taxonómico, es usado para referirse a organismos de diferentes filos que se ajustan a las características antes mencionadas, distinguiéndose dos tipos celulares (Bellinger y Sigee, 2010). Por un lado, se encuentran las cianobacterias, que son células procariotas (células que no poseen un núcleo celular definido), y por el otro se encuentran las células eucariotas (células con un núcleo; Gómez-Luna, 2007; Bellinger y Sigee, 2010).

Las microalgas son consumidas por diferentes productores secundarios (rotíferos, copépodos, cladóceros y pequeños crustáceos, entre otros), que a su vez son el alimento de alevines de peces y larvas de crustáceos (Bellinger y Sigee, 2010; Seyfabadi *et al.*, 2011).

El interés en este grupo de organismos fotoautótrofos radica en su utilización para producir biomasa como alimento y producción de compuestos químicos (Tomaselli, 2004). Las microalgas son cultivadas para diferentes usos como: nutrición humana, alimentación animal, acuicultura, biofertilización y aplicaciones ambientales (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Lorenz y Cysewski, 2000; Pulz y Gross, 2004; Raja *et al.*, 2008; Raja *et al.*, 2014)

Las microalgas han sido estudiadas en laboratorio y producidas en cultivos masivos desde hace más de un siglo (Grobbelaar, 2013). En acuicultura, las microalgas son una fuente indispensable de alimento para moluscos, gasterópodos, crustáceos y peces. Además, sirven de alimento para el zooplancton utilizado como alimento vivo para las larvas y juveniles de algunas especies de peces y crustáceos (Brown *et al.*, 1999; Guedes y Malcata, 2012; Roy y Pal, 2014). De esta manera los nutrimentos de las microalgas son transferidos a niveles tróficos superiores que utilizan al zooplancton como intermediario (Watanabe *et al.*, 1983; Gladue y Maxey, 1994; Borowitzka, 1997; Muller-Feuga, 2000). Aunque existen varias alternativas de alimento para el zooplancton, tales como las levaduras, bacterias y micro encapsulados, las microalgas siguen siendo la mejor opción alimenticia (Borowitzka, 1997). El valor nutricional de las microalgas se ve influido por su tamaño, forma, digestibilidad y composición bioquímica (Webb y Chu, 1983; Brown *et al.*, 1999; Hemaiswarya *et al.*, 2011).

Las microalgas más utilizadas para cultivos en acuicultura pertenecen principalmente a los géneros enlistados en la Tabla 1.

**Tabla 1. Ejemplos de especies de microalgas empleadas como alimento en acuicultura**

<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Especie objetivo</b>	<b>Referencia</b>
<i>Chlamydomonas</i>	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Penaeus monodon</i>	Sivakumar <i>et al.</i> , 2011
<i>Chaetoceros</i>	<i>C. gracilis</i>	<i>Ostrea edulis</i>	Enright <i>et al.</i> , 1986
<i>Chlorella</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>Sparus aurata</i>	Gouveia <i>et al.</i> , 2002
<i>Dunaliella</i>	<i>D. salina</i>	<i>Penaeus monodon</i>	Supamattaya <i>et al.</i> , 2005
<i>Haematococcus</i>	<i>H. pluvialis</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	White <i>et al.</i> , 2002
<i>Isochrysis</i>	<i>I. galbana</i>	<i>Meretrix lusoria</i>	Chen, 2003
<i>Nannochloropsis</i>	<i>N. oculata</i>	<i>Brachionus plicatilis</i>	Sahandi y Jafaryan, 2001
<i>Nitzschia</i>	<i>N. grossestriata</i>	<i>Haliotis diversicolor</i>	Chen, 2007
<i>Pavlova</i>	<i>P. lutheri</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	Ponis <i>et al.</i> , 2008
<i>Phaeodactylum</i>	<i>P. tricornutum</i>	<i>Mytilus edulis</i>	Reid <i>et al.</i> , 2010
<i>Scenedesmus</i>	<i>S. abundans</i>	<i>Tilapia zillii</i>	Isik <i>et al.</i> , 1999
<i>Skeletonema</i>	<i>S. costatum</i>	<i>P. monodon</i>	Uddin y Zafar, 2006
<i>Spirulina</i>	<i>S. platensis</i>	<i>Litopenaeus schmitti</i>	Jaime-Ceballos <i>et al.</i> , 2006
<i>Tetraselmis</i>	<i>Tetraselmis</i> sp.	<i>Acartia sinjiensis</i>	Knuckey <i>et al.</i> , 2005
<i>Thalassiosira</i>	<i>T. fluviatilis</i>	<i>Strombus gigas</i>	Aldana-Aranda <i>et al.</i> , 1997

## **Género *Chlorella***

El género *Chlorella* comprende especies de microalgas cosmopolitas que se encuentran en aguas dulces y marinas. Son microalgas unicelulares de forma esférica, no mótils, con un tamaño de entre 2 y 10  $\mu\text{m}$ . El nombre *Chlorella* proviene del griego *Chloros* que significa verde y del latín *ella*, que significa pequeña (Krauss y Shihira, 1965; Khoeyi *et al.*, 2012). Su fácil crecimiento en medios líquidos y sólidos hacen a estos organismos útiles en estudios fisiológicos, bioquímicos y de alimentación (Rowley, 2010). El género se compone de 5 especies: *C. vulgaris*, *C. lobophora*, *C. sorokiniana*, *C. heliozoae* y *C. variabilis* (Huss *et al.*, 1999; Krienitz *et al.*, 2004; Pröschold *et al.*, 2011).

### ***Chlorella vulgaris***

*Chlorella vulgaris* es una especie de microalga que habita comúnmente en ecosistemas dulceacuícolas. Es de forma circular, en algunos casos es elipsoidal, de un tamaño de 2 a 10  $\mu\text{m}$  (Maruyama *et al.*, 1997). La clasificación taxonómica de la especie según Huss *et al.* (1999) se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Clasificación Taxonómica de *Chlorella vulgaris***

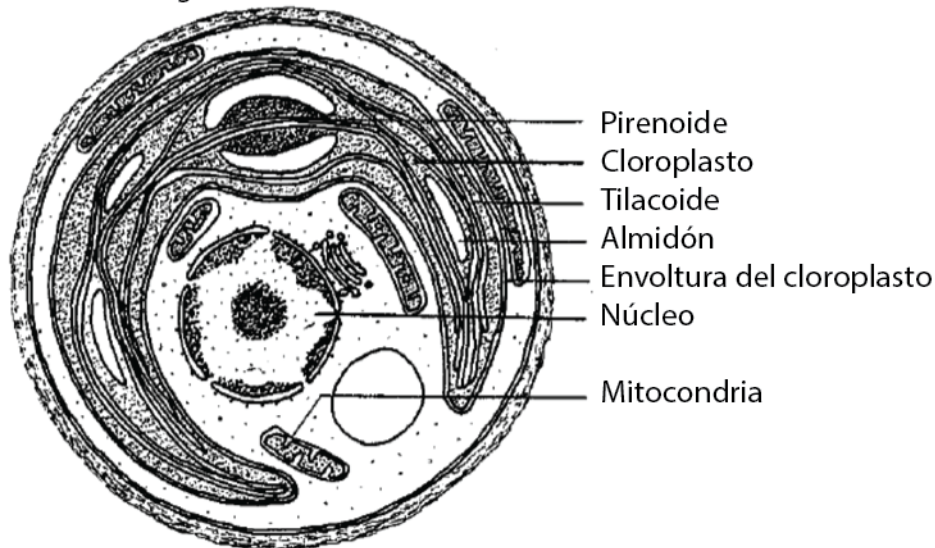
<b>Reino:</b>	<b>Protista</b>
<b>División:</b>	Chlorophyta
<b>Clase:</b>	Trebouxiophyceae
<b>Orden:</b>	Chlorellales
<b>Familia:</b>	Chlorellaceae
<b>Género:</b>	<i>Chlorella</i>
<b>Especie:</b>	<b><i>Chlorella vulgaris</i></b>

En la Tabla 3 se muestran las características de *C. vulgaris*. Ésta especie experimenta una reproducción vegetativa rápida bajo una variedad amplia de condiciones (Rosko y Rachlin, 1977). En la Figura 1 se muestra un esquema de la estructura intra-celular de *C. vulgaris*.

**Tabla 3. Características taxonómicas de *C. vulgaris*. Tomada de Maruyama *et al.*, 1997.**

Característica	<i>C. vulgaris</i>
Tamaño de célula	2 - 10 $\mu\text{m}$
Forma	Circular a elipsoidal
Cloroplasto	Forma de faja o taza
Propagación	2 - 16 autoesporas
Pirenoide	Presente
Arreglo de tilacoides	Abundantes
Pigmentos predominantes	Clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , carotenos y luteína

*Chlorella vulgaris*



**Figura 1. Esquema de la estructura intra-celular.**

Modificada de Maruyama, 1997.

Ésta microalga se ha empleado con diferentes fines, como son; la producción de biomasa como fuente de nutrientes, tratamiento de aguas y alimento en la acuicultura. Ésta especie provee de la energía esencial y los nutrientes orgánicos para el crecimiento y desarrollo de larvas o pequeños organismos acuáticos (Khoeyi *et al.*, 2012). El papel de *C. vulgaris* en la acuicultura es crucial. La utilización de esta microalga como alimento para rotíferos comenzó en 1982 y se utilizan grandes cantidades de ella en su producción (Maruyama *et al.*, 1997). Las primeras investigaciones sobre el uso de *C. vulgaris* como alimento de rotíferos reportaron un crecimiento inestable de rotíferos debido a la deficiencia de esta microalga en su contenido de Vitamina B<sub>12</sub>,

nutriente esencial para el crecimiento de rotíferos. A causa de esto los medios de cultivo de *C. vulgaris* se enriquecen con vitamina B12 (Hirayama *et al.*, 1989; Maruyama *et al.*, 1997).

### ***Cultivos de C. vulgaris***

El crecimiento y composición de la biomasa de *C. vulgaris* es dependiente de factores como la luz (tipo de luz e intensidad; Ogbonna y Tanaka, 2000), composición del medio (*e.g.* Liang *et al.*, 2009) y las condiciones de crecimiento (*e.g.* pH, temperatura y remoción de oxígeno; Ugwu *et al.*, 2007).

En condiciones naturales de crecimiento, las algas fotoautótrofas absorben la luz del sol, asimilan el dióxido de carbono del aire y los nutrientes del agua. Es por esto que los cultivos deben asemejar esas condiciones para permitir un óptimo crecimiento (Brennan y Owende, 2010). Los parámetros que afectan el crecimiento, división y fotosíntesis de *C. vulgaris* han sido ampliamente estudiados. Esta especie puede ser cultivada en una extensa variedad de intensidades luminosas y temperaturas (Rosko y Rachlin, 1977). Su tiempo de duplicación es corto, de 3 horas, en comparación con otras especies de microalgas como *Nannochloropsis oculata* que tiene un tiempo de duplicación de 16 a 20 horas y necesita luz para crecer. El tiempo de duplicación no cambia, aunque el cultivo se realice con una fuente de carbono orgánico sin iluminación (Hagiwara *et al.*, 2001). Su máxima producción se ve determinada por los niveles de intensidad de luz y por la concentración de CO<sub>2</sub>. En cultivo el crecimiento depende de factores como la luz (duración e intensidad), nutrientes, temperatura, pH y salinidad (Rosenberg *et al.*, 2008; Seyfabadi *et al.*, 2011).

### **Rotíferos**

La comunidad de zooplancton de agua dulce está constituida principalmente por cladóceros, copépodos y rotíferos (Allan, 1976; Porter, 1977; Pace y Orcutt, 1981; Herzig, 1987; Wallace y Snell, 2001). El zooplancton retiene y transfiere parte de la materia y energía que el fitoplancton ha fijado fotosintéticamente (Wallace *et al.*, 2006; Brightdoom, 2007). Los rotíferos son organismos zooplanctónicos considerados como ubicuos, ya que se encuentran en casi todos los hábitats acuáticos, desde grandes lagos permanentes hasta charcas temporales, aguas intersticiales

y capilares, desde lagos ácidos de explotaciones mineras hasta lagos salados y océanos, desde lagos alpinos hiperoligotróficos hasta aguas residuales (Segers, 2008).

Los rotíferos constituyen un filo de 2,030 especies de animales acuáticos microscópicos (50 a 2,000  $\mu\text{m}$ ), no segmentados, de simetría bilateral, eutélicos (con cerca de 1,000 células), pseudocelomados de amplia distribución (Wallace y Snell, 2001; Wallace, 2002; Wallace *et al.*, 2006; Segers, 2007; 2008). Estos invertebrados acuáticos juegan un papel crucial en el flujo de energía a través de las redes tróficas de ecosistemas de agua dulce (Doohan, 1973; Walz, 1995). Los rotíferos son filtradores de microalgas, bacterias y materia orgánica (Starkweather, 1980).

Los rotíferos son organismos que poseen dos características distintivas; la primera es que tienen en el extremo apical (cabeza) una región ciliada llamada corona, que es utilizada para la locomoción y la recolección de su alimento; la segunda es que poseen una faringe muscular, mejor conocida como mástax, que está formada por un complejo conjunto de mandíbulas duras, llamadas *trophi* (Wallace y Snell, 2001; Wallace *et al.*, 2006; Figura 2). Estos organismos han atraído el interés científico por muchos años debido a que son abundantes en los ambientes acuáticos, nadan lentamente y pueden ser cultivados fácilmente (Ricci *et al.*, 2000).

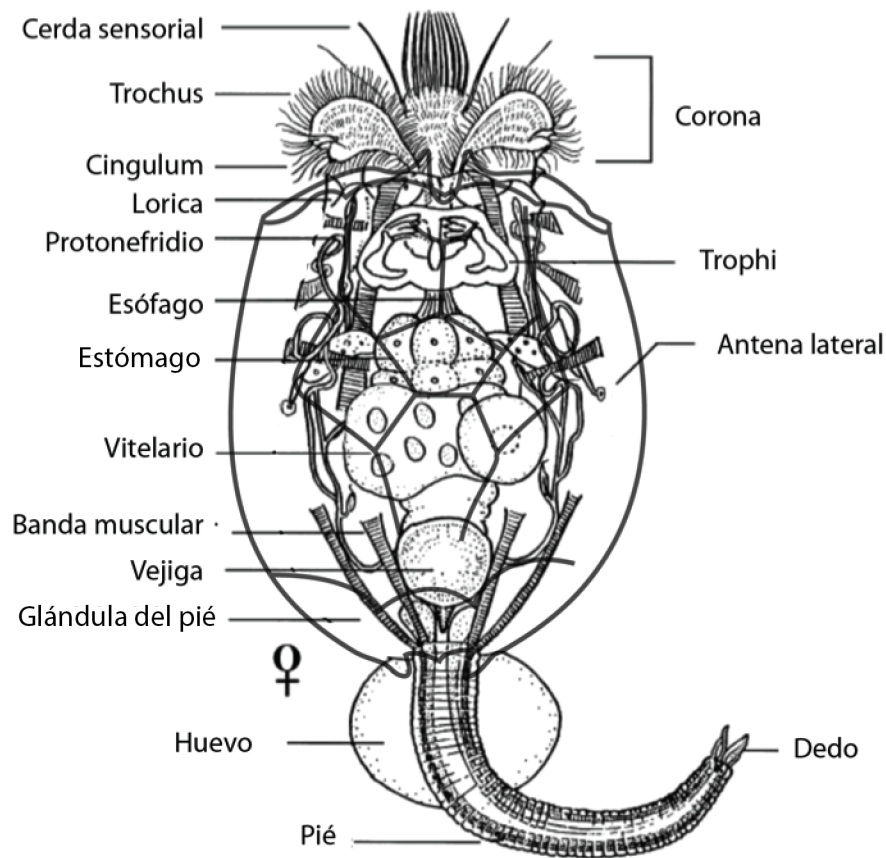


Figura 2. Morfología de un rotífero del género *Brachionus*. Modificada de Wallace *et al.*, 2006.

### Alimentación

Los rotíferos se alimentan mediante pastoreo, suspensión, o depredación (Herzig, 1987). Hay cierto conocimiento acerca de la alimentación de rotíferos y sus dietas, de las cuales se distinguen dos estrategias principales de alimentación:

- Un pastoreo activo, captura, o acción de bombeo de elementos individuales de alimentos que son absorbidos o ingeridos.
- Colección simultánea de distintos alimentos (no más de  $\sim 15\text{-}20\ \mu\text{m}$ ) dependiendo del tamaño de la boca (Obertegger *et al.*, 2011).

Algunas especies de rotíferos se alimentan de microalgas (*e.g. Brachionus angularis*; Garza-Mouriño *et al.*, 2014), otros son carnívoros (*e.g. Asplanchna brighwelli*; Sarma, 1993), mientras que otros son carroñeros (*e.g. Lecane* sp. Wallace *et al.*, 2006). Muchas de las especies aparentan ser omnívoros y se alimentan de partículas de un tamaño determinado. La mayoría de los



rotíferos son herbívoros que se alimentan de algas menores de 20  $\mu\text{m}$ , por lo que son un enlace clave entre las redes alimenticias microbianas y clásicas (Ruttner-Kolisko, 1974; Herzig, 1987; Arndt, 1993).

En ambiente natural el tamaño de la estructura y dominancia de cierto tipo de algas controla la diversidad y densidad de la comunidad del zooplancton. En estudios de laboratorio sobre alimentación y crecimiento poblacional de zooplancton, dos géneros de algas verdes han sido ampliamente utilizadas; *Chlorella* y *Scenedesmus* (Flores-Burgos *et al.*, 2003; 2005).

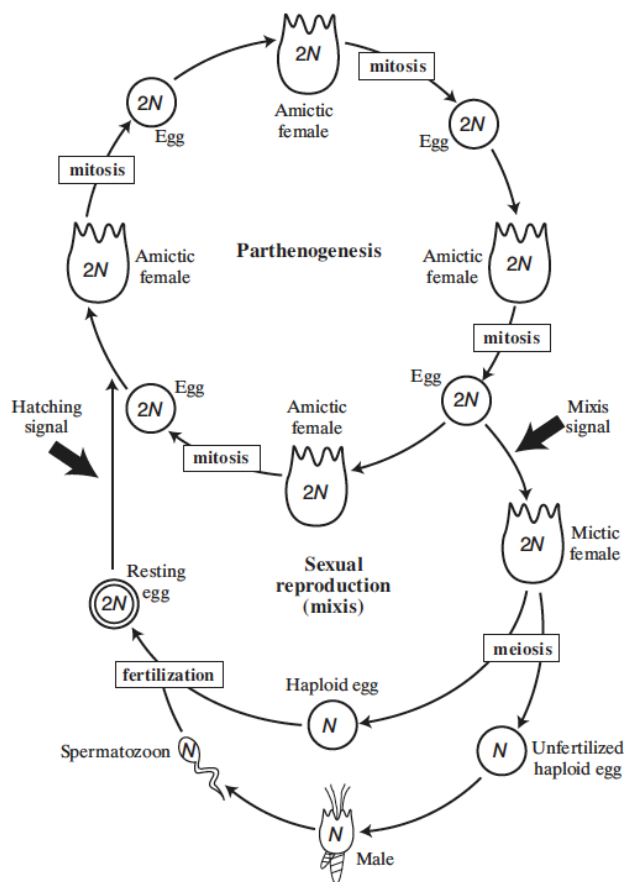
Los factores que influyen en la alimentación de los rotíferos son: concentración del alimento, tamaño del alimento, edad del alimento, tipo de alimento, temperatura, intensidad de luz, calidad de agua, tamaño, sexo, estado nutricional, estado reproductivo, ritmos circadianos, así como el comportamiento del depredador, la densidad de depredadores y el periodo de aclimatación (Galkovskaya, 1963; Pilarska, 1977; Leidy y Ploskey, 1980).

El color de los rotíferos se encuentra relacionado con la alimentación. El estómago y el intestino, que generalmente son transparentes, se tornan de color verde o café dependiendo de los estados de digestión del alimento (Ruttner-Kolisko, 1974).

## **Reproducción**

Los rotíferos se reproducen de tres maneras diferentes: bisexual (Seisonidea, la gametogénesis es por meiosis), asexual partenogénica (Bdelloidea) y sexual-asexual (Monogononta, se reproducen de las dos maneras; Mark Welch *et al.*, 2004). Las poblaciones de rotíferos monogonontas crecen generalmente por partenogénesis (reproducción asexual), durante repetidas generaciones las hembras amícticas producen huevos diploides (Figura 3). De estos huevos eclosionan hijas hembras amícticas idénticas genéticamente a la madre. Debido a ciertos cambios ambientales, como la densidad de población o el fotoperiodo (Carmona *et al.*, 1993; Gilbert, 2004; Snell *et al.*, 2006), las hembras amícticas producen hembras míticas (sexuales). Las hembras míticas producen huevos haploides, que en caso de no ser fertilizados, desarrollan machos haploides. Estos últimos pueden fertilizar los huevos de las hembras míticas, que desarrollarán quistes diploides (huevos de resistencia). Una vez producidos los quistes se asientan y se sumergen en el sedimento. Los quistes son resistentes a las condiciones ambientales adversas

como la sequía o el congelamiento y pueden ser dispersados por el viento, agua o animales migratorios (Gilbert, 1974, Schröder, 2005). Después del periodo de latencia y cuando las condiciones ambientales son favorables, de los quistes emergen hembras amícticas que entran a la fase asexual del ciclo de vida (Ruttner-Kolisko, 1974; Fulks y Main, 1991; Wallace *et al.*, 2006). Una parte de los huevos de resistencia no eclosionan cuando las condiciones son favorables, lo cual resulta en una acumulación de huevos en el sedimento, esto es conocido como el banco de huevos (Marcus *et al.*, 1994; Hairston, 1996). La partenogénesis elimina el problema de la dificultad del encuentro con machos y se tiene un ahorro de energía que se destinaría a la producción de machos, lo que permite una población asexual que crecerá de manera rápida comparada con la sexual (Serra y Snell, 2009; Stelzer, 2011). Las estrategias reproductivas de los rotíferos son aprovechadas en acuicultura. El cultivo de rotíferos que favorece la reproducción asexual permite tener tasas de crecimiento poblacional mayores (Snell, 1987; Stelzer, 2011).



**Figura 3. Representación esquemática de la partenogénesis cíclica de los rotíferos (Kostopoulou *et al.*, 2012).**

## Objetivo

Determinar la ración óptima de *Chlorella vulgaris* como alimento de *Brachionus calyciflorus*.

## Material y Métodos

### Cultivo de *Chlorella vulgaris*

Se realizó un cultivo monoespecífico de *Chlorella vulgaris* en medio Bold Basal (Nichols, 1973), con un volumen final de 18 L, a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , con un fotoperiodo 12:12 L:O, un pH de 8 y aireación constante. El pH fue ajustado a 8 con una solución saturada de bicarbonato y se agregó  $1 \text{ ml L}^{-1}$  de solución de vitamina B<sub>12</sub>. El inóculo de *C. vulgaris* se obtuvo a partir de una cepa del Laboratorio de Rotiferología y Biología Molecular de Plancton de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco. La densidad de inóculo fue de  $1.0 \times 10^6 \text{ cél ml}^{-1}$ .

### Estimación de la densidad celular

Para la estimación de la densidad celular se obtuvo diariamente una muestra fresca de 5 ml y se realizó un conteo en una cámara de Neubauer marca Erma Burkner-Turk (4150) de 1/10 mm de profundidad. Para los conteos se empleó un microscopio óptico Nikon Eclipse E200.

### Conteo

Para el conteo de *C. vulgaris* se empleó el bloque central de la cámara, equivalente a  $6.4 \times 10^{-5}$  ml. Cada conteo se realizó por triplicado. El conteo comenzó en la esquina superior izquierda del bloque central y se contaron las células que se encontraron dentro de cada recuadro. Se contó el número de células totales en los 16 bloques ( $0.04 \text{ mm}^2$ ), en ambos lados de la cámara.

### Cálculo de la densidad

La densidad total de células se calculó con la siguiente fórmula (Castellanos-Páez *et al.*, 1999):

$$d(\text{cél ml}^{-1}) = \frac{\text{prom}}{V}$$

Donde:

*prom*= promedio de los dos conteos  
*V*= Volumen mm<sup>3</sup> de la muestra  
*d*= Densidad (cél ml<sup>-1</sup>).

### ***Cosecha***

Una vez que el cultivo de microalgas alcanzó la fase exponencial se realizó la cosecha. La biomasa obtenida se mantuvo en refrigeración y se eliminó el excedente de medio sin células. Para concentrar la biomasa de *C. vulgaris*, el líquido se centrifugó a 4,000 rpm, se retiró el sobrenadante y se re-suspendió la biomasa en medio EPA (Anónimo, 1985). El centrifugado se realizó al menos tres veces. Por último, *C. vulgaris* fue conservada en frascos estériles previamente etiquetados y se mantuvieron en refrigeración hasta que fueron utilizados como alimento en las experimentaciones posteriores (Castellanos-Páez *et al.*, 1999; Nandini y Sarma, 2005).

### **Cultivo de rotíferos**

#### ***Aislamiento y establecimiento de cepas***

La muestra cruda se obtuvo del Canal Cuemanco, Xochimilco. La toma de muestra se realizó con una red tipo Zepelin de 60 µm de luz de malla. A partir de la muestra cruda obtenida se realizaron observaciones en un microscopio estereoscópico Nikon SMZ2800, para aislar hembras de *Brachionus calyciflorus*. Cada hembra se colocó de forma individual en pozos de una multicaja Corning, cada uno con un mililitro de medio EPA y alimento a una densidad de 1 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup> (Castellanos-Páez *et al.*, 1999). El medio de cultivo EPA se preparó con 96 mg NaHCO<sub>3</sub>, 60 mg CaSO<sub>4</sub>, 60 mg MgSO<sub>4</sub>, y 4 mg KCl por litro de agua destilada. Los cultivos se mantuvieron en crecimiento hasta obtener el número de individuos suficiente para realizar las pruebas de selección de cepa a utilizar en la experimentación. El criterio para seleccionar la cepa fue la tasa de crecimiento y la densidad máxima alcanzada, a partir de la información generada se seleccionó la cepa para emplearse en los siguientes experimentos.

### **Diseño experimental**

Para determinar la ración óptima de *C. vulgaris* se utilizaron seis diferentes densidades enlistadas en la Tabla 4. Los cultivos se realizaron por triplicado en tubos de polipropileno de 30 ml con un

volumen de 30 ml de medio. La densidad inicial de *B. calyciflorus* fue de 10 ind ml<sup>-1</sup>. La temperatura fue de 25 ± 1°C, y la iluminación se estableció con un fotoperiodo 12:12 L:O.

**Tabla 4. Tratamientos experimentales para determinar la ración óptima de *C. vulgaris***

Clave	Tratamiento	Volumen (ml)	Densidad inicial de <i>B. calyciflorus</i> (ind ml <sup>-1</sup> )	# de réplicas	Densidad de <i>C. vulgaris</i> (x 10 <sup>6</sup> cél ml <sup>-1</sup> )
D1	Densidad 1	30	10	3	1.0
D2	Densidad 2	30	10	3	3.0
D3	Densidad 3	30	10	3	4.5
D4	Densidad 4	30	10	3	6.0
D5	Densidad 5	30	10	3	7.5
D6	Densidad 6	30	10	3	9.0

### Conteo de rotíferos

Cada día se contaron alícuotas de 1 ml de cada réplica por triplicado. La muestra se colocó en portaobjetos escavados y se registró el número de individuos y huevos por mililitro. Los conteos de cada tratamiento y sus réplicas se emplearon para elaborar las curvas de crecimiento poblacional.

### Tasa de crecimiento poblacional

A partir de los datos registrados se calculó la tasa de crecimiento poblacional con el uso de la siguiente ecuación (Nandini y Rao, 1998):

$$r = \frac{(\ln N_t - \ln N_0)}{t}$$

Donde:

$r$  = tasa de crecimiento  
 $N_0$  = densidad inicial

$N_t$  = densidad final  
 $t$  = tiempo en días.

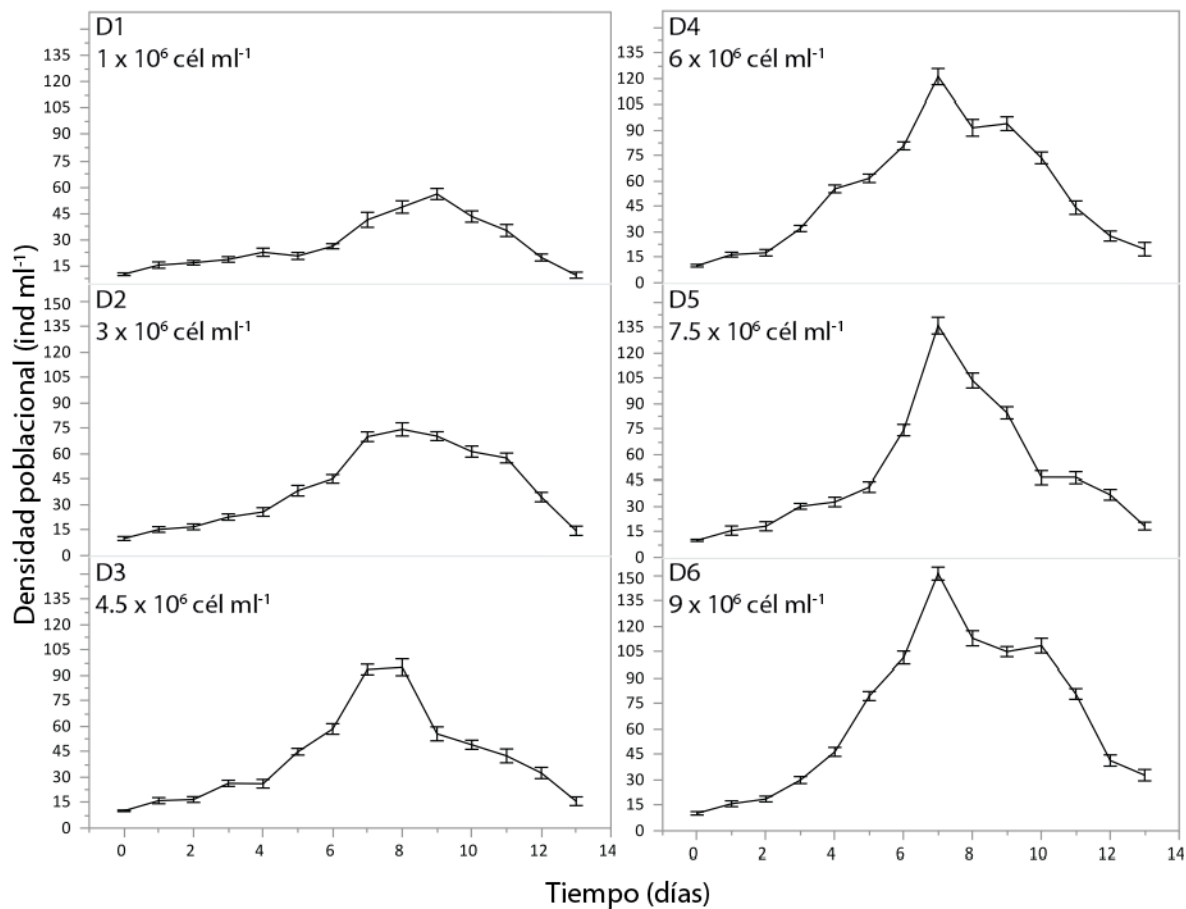
### Análisis de datos

Se utilizó estadística descriptiva para la presentación de los datos. Posteriormente se aplicaron

pruebas de significancia estadística (Zar, 1996). Para determinar la normalidad de los datos de la densidad máxima y la tasa de crecimiento poblacional se efectuó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Una vez comprobada la normalidad de los datos se empleó estadística paramétrica para su análisis. Para determinar si existían diferencias significativas en la densidad máxima y la tasa de crecimiento poblacional de los tratamientos, con diferentes densidades de alimento, se realizó un análisis de varianza (ANOVA  $p < 0.05$ ). Se empleó una prueba de comparación de Tukey para determinar entre cuáles tratamientos se presentaron las diferencias.

## Resultados

El aumento en la densidad de *C. vulgaris* resultó en un incremento en el crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* (Tabla 5). En la Figura 4 se muestran las curvas de crecimiento de *B. calyciflorus* alimentados con las diferentes densidades de *C. vulgaris*.

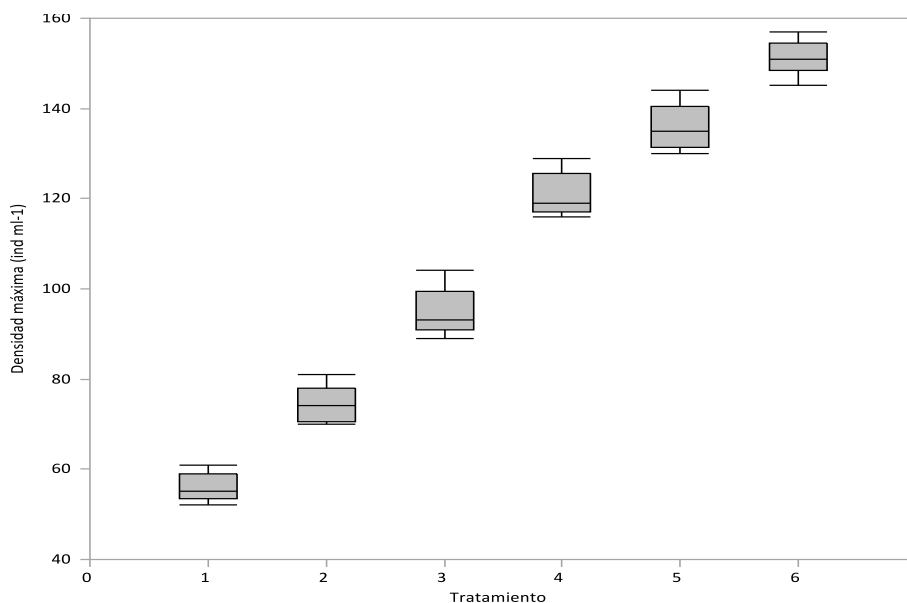


**Figura 4.** Curvas de crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* con las distintas densidades de *C. vulgaris*. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar, basado en las tres réplicas.

**Tabla 5. Resumen del crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* alimentado con diferentes densidades de *C. vulgaris***

Tratamiento	Densidad de <i>C. vulgaris</i> ( $\times 10^6$ cél ml <sup>-1</sup> )	Densidad máxima (ind ml <sup>-1</sup> )	Día de máxima densidad	Tasa de crecimiento poblacional ( <i>r</i> )
D1	1.0	56.00 $\pm$ 3.1	9	0.19
D2	3.0	74.56 $\pm$ 3.9	8	0.25
D3	4.5	95.00 $\pm$ 5.0	8	0.28
D4	6.0	121.22 $\pm$ 4.79	7	0.36
D5	7.5	136.33 $\pm$ 4.95	7	0.37
D6	9.0	151.33 $\pm$ 3.84	7	0.39

La máxima densidad poblacional de los tratamientos se muestra en la Figura 5. En general el aumento en la densidad de *C. vulgaris* resultó en un aumento en la densidad máxima de *B. calyciflorus*. El tratamiento con  $9 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> de *C. vulgaris* presentó el valor más alto de densidad máxima con  $151.33 \pm 3.84$  ind ml<sup>-1</sup>.



**Figura 5. Densidad máxima poblacional (ind ml<sup>-1</sup>) de los tratamientos con diferentes densidades de *C. vulgaris*.**

La densidad máxima poblacional tuvo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos. La mayor variabilidad se debe a los tratamientos más que dentro de cada grupo (Tabla 6). En la

Tabla 7 se enlistan las diferencias entre los tratamientos. Todos los tratamientos fueron diferentes entre sí.

**Tabla 6. Análisis de varianza de la máxima densidad poblacional de los tratamientos experimentales.**

Source Term	DF	Sum of squares	Mean squares	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
<b>A: Tratamiento</b>	5	61346.59	12269.31	651.63	0.000000*	1.000000
S(A)	48	903.77	18.82			
Total (Adjusted)	53	62250.37				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0.05

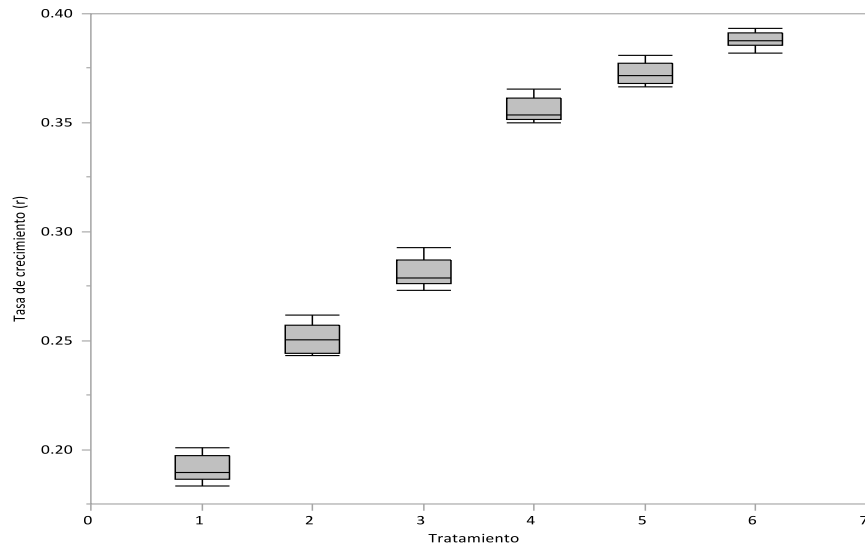
**Tabla 7. Relación de diferencias de densidad máxima entre tratamientos.**

Tratamiento	Diferente al tratamiento
D1	D2, D3, D4, D5, D6
D2	D1, D3, D4, D5, D6
D3	D1, D2, D4, D5, D6
D4	D1, D2, D3, D5, D6
D5	D1, D2, D3, D4, D6
D6	D1, D2, D3, D4, D5

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=48 MSE=18.8287 Critical Value=4.1972

La máxima tasa de crecimiento ( $r$ ) se presentó en el tratamiento D6 con 0.39, mientras que la menor  $r$  fue la del tratamiento D1 con 0.19 (Figura 6). Como se puede observar el aumento en la densidad de *C. vulgaris* resultó en un aumento en la  $r$ .





**Figura 6. Tasa de crecimiento ( $r$ ) en los tratamientos con diferentes densidades de *C. vulgaris*.**

La  $r$  tuvo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre los tratamientos (Tabla 8). La mayor variabilidad se debió a los tratamientos más que dentro de cada tratamiento. Como se observa en la Tabla 9, las diferencias se presentaron entre todos los tratamientos.

**Tabla 8. Análisis de varianza de  $r$  de los tratamientos experimentales**

Source Term	DF	Sum of squares	Mean squares	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
<b>A: Tratamientos</b>	<b>5</b>	<b>0.27</b>	5.50	1687.93	0.000000*	1
S(A)	48	1.56 E-03	3.26 E-05			
Total (Adjusted)	53	0.27				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Tabla 9. Relación de diferencias de  $r$  entre tratamientos.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Diferente al tratamiento</b>
D1	D2, D3, D4, D5, D6
D2	D1, D3, D4, D5, D6
D3	D1, D2, D4, D5, D6
D4	D1, D2, D3, D5, D6
D5	D1, D2, D3, D4, D6
D6	D1, D2, D3, D4, D5

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=48 MSE=3.261047E-05 Critical Value=4.1972

## **Discusión**

Uno de los factores que más influye en el crecimiento poblacional de los rotíferos es el alimento (Rothhaupt, 1990). El tipo y la concentración del alimento tienen efectos en el número de huevos producidos (Xi, 2001a; 2001b) y la reproducción (Flores-Burgos *et al.*, 2005) de *B. calyciflorus*. La densidad máxima y la tasa de crecimiento poblacional (Figura 5 y 6) se incrementaron cuando la cantidad suministrada de *C. vulgaris* aumentó. Se tienen evidencias en la literatura de que un aumento en la concentración de *Chlorella* sp. resulta en un incremento en la densidad máxima poblacional de los rotíferos (Halbach y Halbach-Keup, 1974). Incluso se ha demostrado que la densidad de rotíferos muestra un aumento numérico lineal cuando la cantidad del alimento se incrementa (Dumont *et al.*, 1995). Esto se debe a que un aumento en la disponibilidad de alimento resulta en un incremento en la abundancia, tasas de crecimiento y la relación de huevos (Ooms-Wilms *et al.*, 1999). Los resultados encontrados concuerdan con los reportes de Gama-Flores *et al.* (1999); Sarma *et al.* (2001), Peredo-Álvarez *et al.* (2003) y Fernández-Araiza *et al.* (2005).

Para especies del género *Brachionus* se ha reportado que la  $r$  tiene un rango de entre 0.1 a 2.2, aunque la mayoría presentan una  $r < 0.5$  (Sarma *et al.*, 2001). Los valores de  $r$  oscilaron de entre 0.191 a 0.388 para los diferentes tratamientos. Los valores de  $r$  presentaron diferencias significativas entre sí. El análisis de la tasa de crecimiento en relación con la concentración de alimento provee de información concisa acerca de cómo las especies responden a los niveles de recursos disponibles (Stemberger y Gilbert, 1985). En general, la  $r$  se incrementó con el aumento de la densidad de *C. vulgaris*, el mayor valor de  $r$  se presentó en el tratamiento con  $9.0 \times 10^6$  cél

ml<sup>-1</sup>. La relación que presentó el aumento de la densidad de alimento con el aumento en la *r* coincide con lo reportado por Sarma *et al.* (2001). Esta relación puede explicarse debido a que el alimento determina cambios en la producción de huevos y por lo tanto, cambios en la tasa de crecimiento poblacional de muchas especies de zooplancton (Sarma y Rao, 1990; Weetman y Atkinson, 2002).

La densidad máxima que presentó *B. calyciflorus* al suministrar 1.0, 3.0 y 4.5 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup> de *C. vulgaris* concuerda con lo reportado por Flores-Burgos *et al.* (2005) para las mismas densidades de alimento. Sin embargo, las densidades alcanzadas por *B. calyciflorus* son en ocasiones superiores (Gama-Flores *et al.*, 1999; Lucía-Pavón *et al.*, 2001; Alva-Martínez *et al.*, 2007) y en ocasiones menores (Gama-Flores *et al.*, 2007) a las reportadas en la literatura para densidades comparables de *C. vulgaris*. Es importante enfatizar que las comparaciones directas de la dinámica poblacional entre estudios resulta complicado debido a que se emplean diferentes cepas y se tienen condiciones previas de cultivo diferentes (Snell *et al.*, 1983).

El rango de densidades de *C. vulgaris* empleado brinda información precisa de la respuesta de *B. calyciflorus* a la disponibilidad de alimento. El aumento en la densidad poblacional de *B. calyciflorus* con relación al aumento en la densidad de *C. vulgaris* disponible permite emplear la densidad baja como densidad testigo en experimentaciones que evalúen el efecto de probióticos. Con base en los resultados obtenidos, se seleccionó la densidad de 1.0 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup> para emplearse en las experimentaciones posteriores con probióticos, ya que el efecto de los probióticos puede reflejarse en mayor medida y compararse con las densidades de alimento superiores (3.0 a 9.0 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup>), ya que se ha demostrado que al suministrar un régimen alimenticio óptimo para *B. plicatilis* los efectos de los probióticos son menores que cuando se someten a un régimen subóptimo (Harzevili *et al.*, 1998).

## **Conclusiones**

Tanto la densidad máxima como la *r* tuvieron una relación directa con el aumento en la disposición de alimento para *B. calyciflorus* y presentaron diferencias significativas entre tratamientos.

El incremento en la densidad de *Chlorella vulgaris* resultó en un aumento en la densidad máxima poblacional y la tasa de crecimiento poblacional de *Brachionus calyciflorus*. La densidad de  $1 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> de *C. vulgaris* presentó los menores registros de densidad máxima y *r*. El valor más alto de densidad máxima ( $151.3 \pm 3.84$  ind ml<sup>-1</sup>) y *r* (0.39) se presentó al suministrar  $9.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> de *C. vulgaris*.

## Literatura citada

Aldana-Aranda, D., V. Patiño-Suárez y T. Brulé, 1997. Nutritional potentialities of *Chlamydomonas coccoides* and *Thalassiosira fluviatilis*, as measured by their ingestion and digestion rates by the Queen Conch larvae (*Strombus gigas*). *Aquaculture*, 156: 9-20.

Allan, J.D., 1976. Life history patterns in zooplankton. *The American Naturalist*, 110(971): 165-180.

Alva-Martínez, A.F., S.S.S. Sarma y S. Nandini, 2007. Population dynamics of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* (Rotifera) on mixed diets with *Microcystis aeruginosa* and green algae. *Hidrobiológica*, 17(1): 59-67.

Anónimo, 1985. Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. US Environment Protection Agency EPA/600/4-85/013.

Arndt, H., 1993. Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates) – a review. *Hydrobiologia*, 255/256: 231-246.

Bark, M. 2012. Cultivation of eleven different species of freshwater microalgae using simulated flue gas mimicking effluents from paper mills as carbon source. Master's Thesis in the Master Degree Programme, Biotechnology. Department of Chemical and Biological Engineering. Division of Life Sciences. Industrial Biotechnology Research Group. Chalmers University of Technology. Gothenburg, Sweden, 108 p.

Bellinger, E.G. y D.C. Sigeo, 2010. Freshwater algae. Identification and use as bioindicators. John Wiley & Sons, Ltd, Publication, 271 p.

Borowitzka M.A. y L.J. Borowitzka, 1988. *Dunaliella*. Microalgal biotechnology, Cambridge University Press, New York, USA.

Borowitzka, M.A., 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9: 393-401.

Brennan, L. y P. Owende, 2010. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 557-577.

Brightdoom M., M. Baumar, R.J.R. Díaz, L. Troccoli y P.S. Subero, 2007. Variación estacional y vertical de la biomasa del macrozooplancton en la Bahía de Mochima, Estado Sucre- Venezuela, Durante 1997-1998. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 42(3): 241-252.

Brown, M.R., M. Mular, I. Miller, C. Farmer y C. Trenerry. 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 11: 247-255.

Carmona, M.J., M. Serra y M.R. Miracle, 1993. Relationships between mixis in *Brachionus plicatilis* and preconditioning of culture medium by crowding. *Hydrobiologia*, 256/257: 145-152.

Castellanos-Páez, M.E., G. Garza-Mouriño y S. Marañón-Herrera, 1999. Aislamiento, caracterización, biología y cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* (O. F. Müller). Libros de Texto. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. 119 p.

Chen, Y.C., 2003. Immobilized *Isochrysis galbana* (Haptophyta) for long-term storage and applications for feed and water quality control in clam (*Meretrix lusoria*) cultures. *Journal of Applied Phycology*, 15: 439-444.

Chen, Y.C., 2007. Immobilization of twelve benthic diatom species for long-term storage and as feed for post-larval abalone *Haliotis diversicolor*. *Aquaculture* 263, 97-106.

Doohan, M. 1973. An energy budget of adult *Brachionus plicatilis* Muller (Rotatoria). *Oecologia* (Berlin), 13: 351-362.

Dumont, H.J., S.S.S. Sarma y A.J. Ali, 1995. Laboratory studies on the population dynamics of *Anuraeopsis fissa* (Rotifera) in relation to food density. *Freshwater Biology*, 33: 39-46.

Enright, C.T., G.F. Newkirk, J.S. Craigie y J.D. Castell, 1986. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* Schütt of varied chemical composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96(1): 15-26.

Fernández-Araiza, M., S. Sarma, y S. Nandini, 2005. Combined effects of food concentration and temperature on competition among four species of *Brachionus* (Rotifera). *Developments in Hydrobiology*, 519-534.

Flores-Burgos, J., S.S.S. Sarma, y S. Nandini, 2003. Population growth of zooplankton (rotifers and cladocerans) fed *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* in different proportions. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 31(3): 240-248.

Flores-Burgos, J., S.S.S. Sarma, y S. Nandini, 2005. Effect of single species or mixed algal (*Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*) diets on the life table demography of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 33(6): 614-621.

Fulks, W. y K.L. Main, 1991. Rotifer and microalgae culture systems. *Proceedings of U.S. - Asia workshop*, 364 p.

Galkovskaja, G.A., 1963. Utilisation of food for growth and the conditions for maximum production of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Zoologicheskii zhurnal*, 42, 506-512.

Gama-Flores, J., M. Castellanos-Páez, S.S.S. Sarma, y S. Nandini, 2007. Effect of pulsed exposure to heavy metals (copper and cadmium) on some population variables of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera: Brachionidae: Monogononta). *Hydrobiologia*, 593: 201-208.

Gama-Flores, J., S. Sarma, y M. Fernández-Araiza, 1999. Combined Effects of *Chlorella* Density and Methyl Parathion Concentration on the Population Growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 769-775.

Gannon, J.E. y R.S. Stemberger, 1978. Zooplankton (especially crustaceans and rotifers) as indicators of water quality. *Transactions of the American Microscopical Society*, 97(1): 16-35.

Garza-Mouriño, G., R.A. Contreras-Tapia, M.E. Castellanos-Páez, M.I. Benítez-Díaz y M. Zamora-García, 2014. Optimización del cultivo del rotífero *Brachionus angularis* como alimento vivo de peces, crustáceos y anfibios, con el uso de nutrientes nanoencapsulados (Nano Crusta). *Manejo integral sustentable de la Cuenca de Xochimilco y sus afluentes*, 167-181.

Gilbert, J.J., 1974. Dormancy in rotifers. Transactions of the American Microscopical Society, 93: 490-513.

Gilbert, J.J., 2004. Population density, sexual reproduction and diapause in monogonont rotifers: new data for *Brachionus* and a review. Journal of Limnology, 63: 32-36.

Gladue, R.M. y J.E. Maxey, 1994. Microalgal feeds for aquaculture. Journal of Applied Phycology, 6:131-141.

Gómez-Luna, L.M. 2007. Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. Revista Cubana de Química, 19(2): 3-20.

Gouveia, I., G. Ghoubert, N. Pereira, J. Santinha, Y. Empis y E. Gomes, 2002. Pigmentation of gilthead seabream, *Sparus aurata* (L. 1875) using *Chlorella vulgaris* (Chlorellales, Chlorophyta, Volvocales) microalga. Aquaculture Research, 33: 987-993.

Grobbelaar, J.U., 2013. Chapter 14. Mass Production of Microalgae at Optimal Photosynthetic Rates. En: Dubinsky, Z (Ed.), Photosynthesis. InTech, 357-371.

Guedes, A.C. y F.X. Malcata, 2012. Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture. En: Muchlisin, Z.A. (Ed.) Aquaculture. InTech, Agricultural and Biological Sciences, 59-78.

Hagiwara, A., W.G. Gallardo, M. Assavaaree, T. Kotani y A.B. de Araujo, 2001. Live food production in Japan: recent progress and future aspects. Aquaculture, 200: 111-127.

Hairton, N.G.Jr., 1996. Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. Limnology and Oceanography, 41: 1087-1092.

Halbach, U. y G. Halbach-Keup, 1974. Quantitative beziehungen zwischen phytoplankton und der populationsdynamik des rotators *Brachionus calyciflorus* Pallas. Befunde aus laboratoriumsexperimenten und freilanduntersuchungen. Arch. Hydrobiol. 73: 273-309.



Harzevili, A.R.S., H. Van Duffel, P. Dhert, J. Swings, P. Sorgeloos, 1998. Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *Aquaculture Research*, 29: 411-417.

Hemaiswarya, S., R. Raja, R.R. Kumar, V. Ganesan y C. Anbazhagan, 2011. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 1737-1746.

Herzig, A., 1987. The analysis of planktonic rotifer populations: a plea for long-term investigations. *Hydrobiologia*, 147: 163-180.

Hirayama, K., I. Maruyama y T. Maeda, 1989. Nutritional effect of freshwater *Chlorella* on the growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 186/187: 39-42.

Huss, V.A.R., C. Frank, E.C. Hartmann, M. Hirmer, A. Kloboucek, B.M. Seidel, P. Wenzeler y E. Kessler, 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* Sensu lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 35: 587-598.

Isik, O., E. Sarihan, E. Kusvuran, O. Gul y O. Erbatur, 1999. Comparison of the fatty acid composition of the freshwater fish larvae *Tilapia zillii*, the rotifer *Brachionus calyciflorus*, and the microalgae *Scenedesmus abundans*, *Monoraphidium minutum* and *Chlorella vulgaris* in the algae-rotifer-fish larvae food chains. *Aquaculture*, 174: 299-311.

Jaime-Ceballos, B.J., A. Hernández-Llamas, T. García-Galano y H. Villarreal, 2006. Substitution of *Chaetoceros muelleri* by *Spirulina platensis* meal in diets for *Litopenaeus schmitti* larvae. *Aquaculture*, 260: 215-220.

Khoeyi, Z.A., J. Seyfabadi y Z. Ramezanpour, 2012. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*, 20: 41-49.

Knuckey, R.M. T, Gale, L. Semmens, R.J. Mayer y M.A. Rimmer, 2005. Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: Effect of algal species and feed concentration on copepod development. *Aquaculture*, 249: 339-351.

Kostopoulou, V., M.J. Carmona y P. Divanach, 2012. The rotifer *Brachionus plicatilis*: an emerging bio-tool for numerous applications. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 17: 97-112.

Krauss, R.W. e I. Shihira, 1965. *Chlorella*, physiology and taxonomy of forty-one isolates. University of Maryland, College Park, Maryland, 106 p.

Krienitz, L. E.H. Hegewald, D. Hepperle, V.A.R. Huss, T. Rohr y M. Wolf, 2004. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia*, 43(5): 529-542.

Lee, R.E., 1989. *Phycology*. Segunda Edición, Cambridge University Press, 645 p.

Leidy G.R. y G.R. Ploskey, 1980. Simulation modeling of zooplankton and benthos in reservoirs: documentation and development of model constructs. USDI Fish and Wildlife Service, 313 p.

Liang, Y.N., N. Sarkany, y Y. Cui, 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31(7): 1043-1049.

Lorenz, R.T. y G.R. Cysewski, 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18: 160-167.

Lucía-Pavón, E., S.S.S. Sarma, y S. Nandini, 2001. Effect of different densities of live and dead *Chlorella vulgaris* on the population growth of rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). *Revista de Biología Tropical*, 49(3-4): 895-902.

Marcus, N.H., R. Lutz, W. Burnett y P. Cable, 1994. Age, viability, and vertical distribution of zooplankton resting eggs from an anoxic basin: evidence of an egg bank. *Limnology and Oceanography*, 39: 154-158.

Mark Welch, D.B., M.P. Cummings, D.M. Hillis y M. Meselson, 2004. When did gene copies in the asexual class Bdelloidea diverge? *PNAS*, 101: 1622-1625.

Maruyama, I., T. Nakao, I. Shigeno, Y. Ando y K. Hirayama, 1997. Application of unicelular algae *Chlorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia*, 358: 133-138.

Muller-Feuga, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12: 527-534.

Nandini S. y S.S.S. Sarma, 2005. Life history characteristics of *Asplanchnopus multiceps* (Rotifera) fed rotifer and cladoceran prey. *Hydrobiologia*, 546: 491-501.

Nandini, S. y T.R. Rao, 1998. Somatic and population growth in selected cladoceran and rotifer species offered the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as food. *Aquatic Ecology*, 31: 283-298.

Nichols, W.H. 1973. Growth media – freshwater. En: Stein, J.R. (Ed.), *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods & Growth Measurements*. Cambridge University Press. Londres, 447 p.

Obertegger, U., H.A. Smith, G. Flaim y R.L. Wallace, 2011. Using the guild ratio to characterize pelagic rotifer communities. *Hydrobiologia*, 662: 157-162.

Ogbonna, J.C. y H. Tanaka, 2000. Light requirement and photosynthetic cell cultivation - development of processes for efficient light utilization in photobioreactors, *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5): 207-218.

Ooms-Wilms, A.L., G. Postema y R.D. Gulati, 1999. Population dynamics of planktonic rotifers in Lake Loosdrecht, the Netherlands, in relation to their potential food and predators. *Freshwater*

Peredo-Álvarez, V.M., S.S.S. Sarma y S. Nandini, 2003. Combined effect of concentrations of algal food (*Chlorella vulgaris*) and salt (sodium chloride) on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). *Revista de Biología Tropical*, 51(2): 399-407.

Pilarska J., 1977. Ecophysiological studies on *Bachionus rubens* I. Food selectivity and feeding rate. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 24(3), 319-328.

Ponis, E., G. Parisi, G. Chini Zittelli, F. Lavista, R. Robert y M.R. Tredici, 2008. *Pavlova lutheri*: Production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*, 282(1-4): 97-103.

Porter, K.G., 1977. The plant-animal interface in freshwater ecosystems: microscopic grazers feed differentially on planktonic algae and can influence their community structure and succession in ways that are analogous to the effects of herbivores on terrestrial plant communities. *American Scientist*, 65(2): 159-170.

Pröschold, T., T. Darienko, P.C. Silva, W. Reisser, y L. Krienitz, 2011. The systematics of “*Zoochlorella*” revisited employing an integrative approach. *Environmental Microbiology*, 13: 350-364.

Pulz, O. y W. Gross, 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 635-648.

Raja, R., H. Shanmugam, V. Ganesan e I.S. Carvalho 2014. Biomass from Microalgae: An Overview. *Oceanography*, 2(1): 1-7.

Raja, R., S. Hemaiswarya, N.A. Kumar, S. Sridhar y R. Rengasamy, 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical reviews in microbiology*, 34(2): 77-88.

Reid, G.K., M. Liutkus, A. Bennett, S.M.C. Robinson, B. MacDonald y F. Page, 2010. Absorption efficiency of blue mussels (*Mytilus edulis* and *M. trossulus*) feeding on Atlantic salmon (*Salmo salar*) feed and fecal particulates: Implications for integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture*, 299: 165-169.

Ricci, C., M. Serra, y T.W. Snell, 2000. Small, beautiful and sexy: what rotifers tell us about ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 220-221.

Rosenberg, J.N., G.A. Oyler, L. Wilkinson y M.J. Betenbaugh, 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 19: 430-436.

Rosko, J.J. y J.W. Rachlin, 1977. The effect of cadmium, copper, mercury, zinc and lead on cell division, growth, and chlorophyll a content of the chlorophyte *Chlorella vulgaris*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 104(3): 226-233.

Rothhaupt, K. 1990. Differences in particle size - dependent feeding efficiencies of closely related rotifer species. *Limnology and Oceanography*, 35(1): 16-23.

Rowley, W.M.B.S., 2010. Nitrogen and phosphorus biomass-kinetic model for *Chlorella vulgaris* in a biofuel production scheme. Tesis de Maestria, Air Force Institute of Technology, Ohio, 99 p.

Roy S.S. y R. Pal, 2014. Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *Proceedings of the Zoological Society*, 1-8.

Ruttner-Kolisko, A., 1974. Plankton rotifers: biology and taxonomy. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller) Stuttgart, Alemania, 146 p.

Sahandi, J. y H. Jafaryan, 2011. Rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture in batch system with suspension of algae (*Nannochloropsis oculata*) and bakery yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation. International Journal of the Bioflux Society*, 4(4): 526-529.

Sarma, S.S.S. 1993. Feeding responses of *Asplanchna brightwelli* (Rotifera): laboratory and field studies. *Hydrobiologia*, 255/256: 275-282.

Sarma, S.S.S. y T.R. Rao, 1990. Population dynamics of *Brachionus patulus* Müller (Rotifera) in relation to food and temperature. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences. Animal Sciences*, 99: 335-343.

Sarma, S.S.S., P.S. Larios-Jurado y S. Nandini. 2001. Effect of three food types on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Revista de Biología Tropical*, 77-84.

Schröder, T., 2005. Diapause in monogonont rotifers. *Hydrobiologia*, 546: 291-306.

Segers, H., 2007. Zootaxa: Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. Magnolia Press, Auckland, New Zealand, 104 p.

Segers, H., 2008. Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 49-59.

Serra, M., y T.W. Snell, 2009. Sex loss in monogonont rotifers. En: Schön I., K. Martens y P. Van Dijk (Eds.), *Lost Sex*. Springer, Berlin: 281-294.

Seyfabadi, J., Z. Ramezanpour y Z.A. Khoeyi, 2011. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of Applied Phycology*, 23: 721-726.

Sivakumar, N., M. Sundararaman y G. Selvakumar, 2011. Efficacy of micro algae and cyanobacteria as a live feed for juveniles of shrimp *Penaeus monodon*. *African Journal of Biotechnology*, 10(55): 11594-11599.

Snell, T.W., 1987. Sex, population dynamics and resting egg production in rotifers. *Hydrobiologia*, 144: 105-111.

Snell, T.W., B.E. Burke y S.D. Messur, 1983. Size and distribution of resting eggs in a natural population of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Gulf and Caribbean Research*, 7(3):285-287.

Snell, T.W., J. Kubanek, W. Carter, A.B. Payne, J. Kim, M.K. Hicks y C.P. Stelzer, 2006. A protein signal triggers sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Marine Biology*, 149: 763-773.

Starkweather, P.L., 1980. Aspects of the feeding behavior and trophic ecology of suspension. *Hydrobiologia*, 73: 63-72.

Stelzer, C.P., 2011. The cost of sex and competition between cyclical and obligate parthenogenetic rotifers. *Am. Nat.*, 177: E43-E53.

Stemberger, R.S. y J.J. Gilbert, 1985. Assessment of threshold food levels and population growth in planktonic rotifers. *Archiv für Hydrobiologie–BeiheftErgebnisse der Limnologie*, 21, 269-275.

Supamattaya, K., S. Kiriratnikom, M. Boonyaratpalin y L. Borowitzka, 2005. Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 248: 207-216.wih

Taelman, S.E., S. De Meester, L. Roef, M. Michiels y J. Dewulf, 2013. The environmental sustainability of microalgae as feed for aquaculture: A life cycle perspective. *Bioresource Technology*, 150: 513-522.

Tomaselli, L., 2004. 1. The Microalgal Cell. En: Richmond, A. (Ed.) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company, Oxford, Reino Unido, 3-19.

Uddin, S.A. y M. Zafar, 2006. Live feed production in different nutritive condition as diet for *Penaeus monodon* in shrimp hatchery, Bangladesh. *International Journal Of Agriculture & Biology*, 8(4):493-495.

Ugwu, C.U., H. Aoyagi y H. Uchiyama, 2007. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*, *Photosynthetica*, 45(2): 309-311.

Wallace, R.L, T.W. Snell, C. Ricci y T. Nogrady, 2006. Rotifera. Volume 1: biology, ecology and systematics (2nd Edition). En Segers H. y J. Dumont (Eds.), *Guides to the Identification of the Mircoinvertebrates of the Continental Waters of the World*. Kenobi Productions, Ghent. 299 p.

Wallace, R.L. y T.W. Snell, 2001. Phylum Rotifera. En: Thorp, J.H. y A.P. Covich, (Eds.) *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. Academic Press, 195-254.

Wallace, R.L., 2002. Rotifers: Exquisite metazoans. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 660-667.

Walz, N., 1995. Rotifer populations in plankton communities: Energetics and life history strategies. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 51(5): 437-453.

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

Webb K.L., F.E. Chu, 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. En: Pruder G.D., C.J. Langdon y D.E. Conklin (Eds), *Proc. of the 2nd International Conference of aquaculture nutrition*, World Mariculture Society, Special Publication, No. 2, Louisiana State University, Louisiana, 272-291.

Weetman, D. y D. Atkinson, 2002. Antipredator reaction norms for life history traits in *Daphnia pulex*: dependence on temperature and food. *Oikos*, 98: 299-307.

White, D.A., G.I. Page, J. Swaile, A.J. Moody y S.J. Davies, 2002. Effect of esterification on the absorption of astaxanthin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 33: 343-350.

Zar, J.H. 1996. *Bioestatistical Analysis*. Prentice Hall PTR, 121 p.



## Capítulo 2: Efecto de diferentes concentraciones de probióticos en el cultivo de *Brachionus calyciflorus*.

### Resumen

El presente experimento se llevó a cabo para determinar el efecto de la adición del probiótico comercial (NanoCrusta) en el medio de cultivo del rotífero de agua dulce *Brachionus calyciflorus* y su respuesta en el crecimiento poblacional. Los probióticos se suministraron en cuatro densidades ( $0.0021 - 2.12 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>) en dos formas: sólo probióticos y probióticos + *Chlorella vulgaris* ( $1 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>). Tres de los tratamientos con solo probióticos se suspendieron al quinto día cuando todos los individuos de *B. calyciflorus* murieron. El tratamiento restante, correspondiente a la densidad más alta de probióticos ( $2.12 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>), no presentó un crecimiento poblacional, sin embargo se mantuvo la densidad inicial hasta terminar el experimento (15 días). Los tratamientos con probióticos + *C. vulgaris* tuvieron una densidad máxima poblacional (ind ml<sup>-1</sup>) mayor al tratamiento testigo (sólo *C. vulgaris*), existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos con probióticos y el testigo. El valor más alto de densidad máxima se observó cuando se suministraron probióticos ( $2.12 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>) + *C. vulgaris* ( $1 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>) con  $77.77 \pm 1.56$  ind ml<sup>-1</sup>. El efecto del uso de probióticos resultó en un incremento del 42% en la densidad máxima comparado con el tratamiento testigo. La máxima tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) se produjo en el tratamiento de probióticos ( $2.12 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>) + *C. vulgaris* ( $1 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>) con 0.30, mientras que la menor  $r$  fue la del testigo con 0.19. Los resultados obtenidos evidencian un efecto sinérgico de los probióticos con *C. vulgaris*, ya que al suministrarse a las mismas densidades experimentales sin la microalga, los rotíferos se mantuvieron a una densidad baja sin mostrar un crecimiento poblacional.

### Abstract

The following experiment was conducted to determine the effect of the addition of commercial probiotics (NanoCrusta) in the culture medium of the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* and its impact in the population growth. The probiotics were supplied in four densities ( $0.0021 - 2.12 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>) in two ways: only probiotics and probiotics + *Chlorella vulgaris* ( $1 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>). Three treatments with only probiotics were suspended on the fifth day when no living individuals of *B. calyciflorus* were remained. The remaining treatment, corresponding to the

highest density of probiotics ( $2.12 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>), did not show a population growth, however the initial density remained until the end of the experiment (15 days). When the probiotics were supplied with *C. vulgaris*, the treatments had a higher maximum density (ind ml<sup>-1</sup>) than the control treatment (only *C. vulgaris*), presenting significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ). The highest maximum density was observed when probiotics ( $2.12 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>) + *C. vulgaris* ( $1 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>) were supplied with  $77.77 \pm 1.56$  ind ml<sup>-1</sup>. The effect of using probiotics resulted in a 42% increase in the maximum density compared to the control treatment. The maximum rate of population growth ( $r$ ) was when probiotics ( $2.12 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>) + *C. vulgaris* ( $1 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>) were supplied with 0.30, while the lowest  $r$  was the control treatment with 0.19. The results show a synergistic effect of probiotics with *C. vulgaris* because when probiotics were supplied alone, rotifers remained at low densities without showing a population growth.

## Introducción

En vida libre, a consecuencia de los cambios ambientales y la depredación, la mortalidad de los peces es muy variable, desde un 20% después del nacimiento hasta un 99% durante todo el periodo larvario (Bailey y Houde, 1989; Houde, 1996; Bailey y Duffy-Anderson, 2001). En el caso de los organismos criados en granjas de cultivo donde la depredación por parte de otras especies no existe, la mayoría de las muertes ocurren en los estadios tempranos de desarrollo cuando las crías comienzan a alimentarse (Houde, 1989; Hunt von Herbing y Gallagher, 2000). Después de la absorción del saco vitelino, la cantidad, calidad y tiempo de suministro del alimento exógeno es crítico para la supervivencia y crecimiento de las crías de peces (Gisbert y Williot, 1997; Yúfera *et al.*, 2000; Mercier *et al.*, 2004). Un retraso en el suministro del alimento puede resultar en una baja supervivencia, crecimiento anormal, desarrollo lento y degeneración del tracto digestivo (Heming *et al.*, 1982; Yosedá *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007). El proveer un alimento vivo apropiado para larvas de peces es uno de los factores clave que determinan el éxito o fracaso en esta etapa de producción (Qin y Fast, 1997).

En vida libre la gran mayoría de peces se alimentan de plancton, especialmente durante las primeras etapas de vida, mientras que los peces planctónicos se alimentan durante toda su vida de organismos invertebrados planctónicos (Piasecki *et al.*, 2004). Los organismos zooplanctónicos que han sido utilizados en acuicultura como alimento vivo son: crustáceos (*e.g.* *Artemia salina*;

Sorgeloos, 1980), rotíferos (*e.g. Brachionus plicatilis*; Harzevili *et al.*, 1998), cladóceros (*Moina* spp.; Rottmann *et al.*, 2011), copépodos (*Paracyclops fimbriatus*; Piasecki *et al.*, 2004), y formas larvianas de diferentes organismos acuáticos.

Los rotíferos tienen el contenido nutricional adecuado y una alta tasa de producción diaria, por lo cual, son considerados como una excelente fuente de alimento para las larvas de peces recién nacidas, incluso mejor que los copépodos, en cuanto a contenido calórico (Theilacker y Kimball, 1984; Lubzens, 1987; Hu y Xi, 2008). Además, el tamaño y lenta velocidad de natación de los rotíferos los hace ideales para las larvas de peces que requieren alimentarse de presas pequeñas (Lim *et al.*, 2003). Al comienzo de la alimentación exógena, las larvas de peces tienen habilidades limitadas para la búsqueda, selección, apresamiento e ingestión del alimento (Slembrouk *et al.*, 2009). Por lo anteriormente mencionado, los rotíferos cumplen con los requerimientos para ser utilizados como alimento vivo.

Con el objetivo de mejorar el crecimiento poblacional y la calidad nutricia de los rotíferos se han utilizado diferentes estrategias como el uso de probióticos. Verschuere *et al.* (2000), definen como probiótico al complemento de microorganismos vivos que tienen un efecto benéfico en el hospedero al modificar las comunidades asociadas al hospedero o la comunidad microbiana ambiental, garantizan una mejor utilización del alimento o aumentan su valor nutricional, lo cual resulta en una mejora en la respuesta ante enfermedades o una mejora en la calidad de su medio. Con base en esta definición, los probióticos incluyen conjuntos microbianos que protegen de la proliferación de patógenos en el tracto intestinal, en las estructuras superficiales y en el ambiente de cultivo de las especies; que aseguran el uso óptimo del alimento al contribuir a su digestión y mejoran la calidad del agua o estimulan el sistema inmune del hospedero.

Los medios de acción de los probióticos son: exclusión competitiva, competencia, producción de compuestos inhibidores, modulación y mejora de la respuesta inmune, fuente de nutrientes y contribución a la acción enzimática y mejoramiento de la calidad del agua, entre otros (Gatesoupe, 1999; Balcázar *et al.*, 2006; Mohapatra *et al.*, 2013).

La investigación de probióticos para organismos acuáticos está en constante incremento por la necesidad de una acuicultura amigable con el ambiente (Gatesoupe, 1999). La microbiota asociada a los cultivos de alimento vivo cumple un papel clave en la inestabilidad y variabilidad

de los cultivos (Gatesoupe, 1991; Gatesoupe *et al.*, 1989; Hirayama, 1987; Harzevilli *et al.*, 1998). A causa de esto, existe interés en la manipulación de la composición de la comunidad microbiana para obtener una comunidad más fiable y útil. Los problemas asociados con las repentinas variaciones en la calidad de los cultivos puede ser resuelto con el manejo apropiado de las bacterias (Dhert *et al.*, 2001).

Las bacterias pueden suplir sustancias que son deficientes en ciertas dietas (Coves *et al.*, 1990). Es bien conocido que sintetizan vitaminas del grupo B, particularmente vitamina B<sub>12</sub> que es necesaria para la reproducción de los rotíferos del género *Brachionus* (Hirayama y Funamoto, 1983; Yu *et al.*, 1989; Hagiwara *et al.*, 1994; Castellanos-Páez *et al.*, 1999).

## Revisión bibliográfica

### Probióticos

La palabra probióticos proviene del griego *pro* y *bios* que significa “*por la vida - a favor de la vida*” (Schrezenmeir y de Vrese, 2001). La definición más aceptada actualmente del término probiótico fue establecida por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), que los definen como: “*microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedero*” (FAO/OMS, 2002).

Es importante considerar la diferencia en las interacciones entre los organismos y su medio en ambientes terrestres y acuáticos. Es por esto que la definición de probiótico para organismos acuáticos necesita ser modificada (Gatesoupe, 1999; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008). En este contexto, Verschuere *et al.* (2000), definen como probiótico al “*complemento de microorganismos vivos que tienen un efecto benéfico en el hospedero, modifican las comunidades asociadas al hospedero o la comunidad microbiana ambiental, garantizan una mejor utilización del alimento o aumentan su valor nutricional, mejoran la respuesta ante enfermedades o mejoran la calidad de su medio ambiente*”. Con base en esta definición, los probióticos incluyen conjuntos microbianos que protegen de la proliferación de patógenos en el tracto intestinal, en las estructuras superficiales y en el ambiente de cultivo de las especies; que aseguran el uso óptimo del alimento al contribuir a su digestión; que mejoran la calidad del agua o estimulan el sistema inmune del hospedero.

Los probióticos tienen diferentes modos de acción, dentro de los cuales se destacan:

- **Exclusión competitiva:** la exclusión competitiva es un fenómeno en el cual una microbiota establecida previene o reduce la colonización de bacterias patógenas por la competencia por sitios de adherencia en la mucosa, competencia por nutrientes y la producción de compuestos inhibidores (Gómez *et al.*, 2007).
- **Competencia por sitios de adherencia:** Los probióticos poseen la particularidad de adherirse y proliferar en sitios específicos para ser aprovechados al máximo por los hospederos (Ringø *et al.*, 2007; Mohapatra *et al.*, 2013). Un punto clave en la

colonización por parte de patógenos dañinos es la buena adherencia a la mucosa intestinal y superficie de la pared intestinal (Olsson *et al.*, 1992; Vine *et al.*, 2004).

- **Competencia por químicos o energía disponible:** La base de la existencia de cualquier población microbiana es la capacidad para competir por productos químicos y energía disponible (Verschuere *et al.*, 2000).
- **Competencia por nutrientes:** Los probióticos utilizan los nutrientes que, de otra forma, serían consumidos por los microorganismos patógenos. La competencia por nutrientes es principalmente por la adhesión a la mucosa, tracto gastrointestinal, las células epiteliales y otros tejidos, lo que contribuye a la salud o el bienestar de los hospederos (Gómez *et al.*, 2007; Mohapatra *et al.*, 2013).
- **Producción de compuestos inhibidores:** Los probióticos proveen de ciertos compuestos inhibidores que actúan antagónicamente contra los microorganismos patógenos, previniendo su proliferación en el hospedero (Mohapatra *et al.*, 2013). La actividad anti patógena se debe a la producción de diferentes compuestos, como son: antibióticos (Williams y Vickers, 1986), bacteriocinas (Vandenbergh, 1993; Tinh *et al.*, 2007), sideróforos (Pybus *et al.*, 1994; Gatesoupe, 1997), lisozimas (Panigrahi *et al.*, 2004), proteasas (Liu *et al.*, 2009), peróxido de hidrógeno (Naidu *et al.*, 1999), y cambios en los valores de pH (Shiri-Harzevili *et al.*, 1998).
- **Modulación y mejora de la respuesta inmune:** El sistema inmune puede ser estimulado por probióticos (Balcázar *et al.*, 2006). Los probióticos brindan protección contra los agentes patógenos al superar las consecuencias negativas de los antibióticos y agentes quimioterapéuticos (Mohapatra *et al.*, 2013). El estímulo en la respuesta inmune incrementa la actividad de los anticuerpos y los macrófagos (Marteua y Ramboud, 1993; Sakai *et al.*, 1995).
- **Fuente de nutrientes y contribución enzimática a la digestión:** Las bacterias pueden suplir sustancias que son deficientes en ciertas dietas (Coves *et al.*, 1990). Es bien conocido que sintetizan vitaminas del grupo B, particularmente vitamina B<sub>12</sub> que es necesaria para la reproducción de los rotíferos del género *Brachionus* (Hirayama y Funamoto, 1983; Yu *et al.*, 1989; Hagiwara *et al.*, 1994; Castellanos-Páez *et al.*, 1999).

- **Mejoramiento de la calidad del agua:** La mayor parte de los problemas por calidad de agua son por la toxicidad del amonio y los nitritos, que puede ser rectificado con la aplicación de cultivos nitrificantes en los estanques de cultivo (Lewis y Morris, 1986).
- **Interferencia con la autoinducción:** El término de autoinducción (*quorum sensing* en inglés), se define como el proceso de comunicación bacteriana célula-a-célula. La ruptura de la autoinducción es conocida como una nueva estrategia anti infección en acuicultura (Defoirdt *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2008)
- **Actividad antiviral:** Algunas bacterias usadas como candidatos para probióticos tienen efectos antivirales. A pesar de que el mecanismo exacto no es bien conocido, las pruebas de laboratorio indican que la inactivación de virus puede ser por sustancias químicas o biológicas, como los extractos de algas marinas y agentes extracelulares de bacterias (Balcázar *et al.*, 2006).
- **Actividad antifúngica:** Se ha probado que *Aeromonas* sp. aisladas de agua dulce del cultivo de anguilas (*Anguilla australis*), tienen un efecto antagonista en contra de *Saprolegnia* sp., protegiendo a los peces contra la saprolegnosis (Lategan *et al.*, 2004).

### Cepas de probióticos empleadas en acuicultura

El primer reporte del uso de probióticos en acuicultura es atribuido a Yasuda y Taga (1980), quienes sugirieron que las bacterias pueden ser útiles, no solo como alimento, sino también como controles biológicos de enfermedades en peces y activadores de la regeneración de nutrientes. Después, Nogami y Maeda (1992), aislaron la cepa PM-4 del agua de cultivo de *Penaeus monodon* que resultaba con una mejora en la supervivencia y tasas de muda. Esta cepa fue identificada como *Thalassobacter utilis* (Nogami *et al.*, 1997).

La mayoría de los probióticos propuestos como controles biológicos en acuicultura pertenecen a las bacterias ácido lácticas (*e.g.* *Lactobacillus* y *Carnobacterium*), a géneros *Vibrio* (*e.g.* *V. alginolyticus*), *Bacillus*, o *Pseudomonas* (Gómez-Gil *et al.*, 2000; Verschuere *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006). La Tabla 10 enlista diferentes probióticos utilizados en el cultivo de diversas especies.

**Tabla 10. Probióticos utilizados para diferentes especies en acuicultura**

Cepa de probiótico	Fuente	Usada en	Método de aplicación	Referencia
<b>Peces</b>				
<i>Streptococcus lactis</i> y <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	-	Larvas de rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	Enriquecimiento del alimento vivo	García de la Banda <i>et al.</i> , 1992
<i>Lactobacillus</i> sp. y <i>Carnobacterium</i> sp.	Rotíferos ( <i>Brachionus plicatilis</i> )	Larvas de rodaballo	Enriquecimiento de rotíferos	Gatesoupe, 1994
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Cultivo comercial de camarón	Salmón atlántico ( <i>Salmo salar</i> L.)	Baños en suspensión bacteriana	Austin <i>et al.</i> , 1995
<i>Carnobacterium divergens</i>	Intestino de salmón del atlántico	Crías de bacalao del Atlántico	Adición a la dieta	Gildberg y Mikkelsen, 1998
<i>Bacillus megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. licheniformis</i>	Producto comercial (Biostart)	Bagre de canal	Adición al agua	Queiroz y Boyd, 1998
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Colección de cultivos	Trucha arcoíris	Adición a la dieta	Nikoskelaimen <i>et al.</i> , 2001
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Colección de cultivos	Trucha arcoíris	Adición a la dieta	Panigrahi <i>et al.</i> , 2004
<i>Roseobacter</i> sp.	Larvas de rodaballo, <i>Tetraselmis</i>	Larvas de rodaballo	Adición al agua	Hjelm <i>et al.</i> , 2004
<b>Crustáceos</b>				
<i>Bacillus</i> sp. S11	<i>Penaeus monodon</i>	<i>P. monodon</i>	Adición a la dieta	Rengpipat <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus</i> sp.	Producto comercial (DMS)	<i>P. monodon</i>	Adición al agua	Moriarty, 1998
<i>Lactobacillus</i> spp.	Tracto digestivo de pollos	<i>P. monodon</i>	Adición a la dieta	Phianphak <i>et al.</i> , 1999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. exiguus</i> , <i>Phaffia rhodozyma</i>	Producto comercial	<i>Penaeus vannamei</i>	Adición a la dieta	Scholz <i>et al.</i> , 1999
<i>Vibrio</i> P62, P63, P64	<i>P. vannamei</i>	<i>P. vannamei</i>	Adición al agua	Gullian <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Vibrio fluvialis</i>	<i>P. monodon</i>	<i>P. monodon</i>	Adición al agua	Alavandi <i>et al.</i> , 2004
<b>Moluscos</b>				
<i>Aeromonas media</i> A199	-	<i>Crassostrea gigas</i>	Adición al agua	Gibson <i>et al.</i> , 1998
<i>Roseobacter</i> sp. BS107	Cultivo de bivalvos	<i>Pecten maximus</i>	Adición al agua	Ruíz-Ponte <i>et al.</i> , 1999
<i>Alteromonas haloplanktis</i>	Cultivo de microalgas	<i>Argopecten purpuratus</i>	Adición al agua	Riquelme <i>et al.</i> , 2000
<b>Alimento vivo</b>				
<i>Flavobacterium</i> sp.	Cultivo de <i>Chaetoceros gracilis</i>	<i>C. gracilis</i> , <i>I. galvana</i> , <i>P. lutheri</i>	Adición al medio	Suminto y Hirayama, 1997
<i>Lactococcus lactis</i> AR21	Cultivo de rotíferos	Rotíferos	Adición al medio	Harzevili <i>et al.</i> , 1998
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Producto comercial	<i>Artemia</i>	Adición al medio	Villamil <i>et al.</i> , 2003

### Rotíferos como alimento vivo en Acuicultura

En vida libre, a consecuencia de los cambios ambientales y la depredación, la mortalidad de los peces en estado larvario es muy variable, desde un 20% después del nacimiento hasta un 99% durante todo el periodo larvario (Bailey y Houde, 1989; Houde, 1996; Bailey y Duffy-Anderson, 2001). En el caso de los organismos criados en granjas de cultivo donde la depredación por parte



de otras especies no existe, la mayoría de las muertes ocurren en los estadios tempranos de desarrollo cuando las crías comienzan a alimentarse (Houde, 1989; Hunt von Herbing y Gallager, 2000). Después de la absorción del saco vitelino, la cantidad, calidad y tiempo de suministro del alimento exógeno es crítico para la supervivencia y crecimiento de las crías de peces (Gisbert y Williot, 1997; Yúfera *et al.*, 2000; Mercier *et al.*, 2004). Un retraso en el suministro del alimento puede resultar en una baja supervivencia, crecimiento anormal, desarrollo lento y degeneración del tracto digestivo (Heming *et al.*, 1982; Yoseda *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007).

La gran mayoría de peces se alimentan de plancton, especialmente durante las primeras etapas de vida, mientras que los peces planctónicos se alimentan durante toda su vida de organismos invertebrados planctónicos (Piasecki *et al.*, 2004). Los organismos zooplanctónicos que han sido utilizados en acuicultura como alimento vivo son: crustáceos (*e.g. Artemia salina*; Sorgeloos, 1980), rotíferos (*e.g. Brachionus plicatilis*; Castellanos-Páez *et al.*, 1999), cladóceros (*Moina* spp.; Rottmann *et al.*, 2011), copépodos (*Paracyclops fimbriatus*; Piasecki *et al.*, 2004), y formas larvianas de diferentes organismos acuáticos. En la Tabla 11 se muestra la composición bioquímica de algunas especies de zooplancton utilizadas en acuicultura. Como se puede observar el zooplancton satisface las necesidades alimenticias de los peces, lo que lo convierte en la mejor fuente de alimento en la acuicultura. Los rotíferos tienen el contenido nutricional adecuado y una alta tasa de producción diaria, por lo cual, son considerados como una excelente fuente de alimento para las larvas de peces recién nacidas, incluso mejor que los copépodos, en cuanto a contenido calórico (Theilacker y Kimball, 1984; Lubzens, 1987; Hu y Xi, 2008).

Además, el tamaño y lenta velocidad de natación de los rotíferos los hace ideales para las larvas de peces que requieren alimentarse de presas pequeñas (Lim *et al.*, 2003). Al comienzo de la alimentación, las larvas de peces tienen habilidades limitadas para la búsqueda, selección, apresamiento e ingestión del alimento (Slembrouk *et al.*, 2009). Así, los rotíferos cumplen con los requerimientos para ser utilizados como alimento vivo.

**Tabla 11. Composición bioquímica de algunas especies de zooplancton**

Especie	Humedad (%)	Proteína cruda (%)	Grasa cruda (%)	Carbohidratos (%)	Cenizas (%)	Proteína (%)	Calcio (%)	Autor
<b>Cladóceros</b>								
<i>Daphnia</i> spp.	89.3	70.1	13.1		6.5	1.4	0.2	Creswell, 1993
<i>Daphnia</i> sp.	89.3	70.1	13.1		6.5	1.5	0.2	Watanabe <i>et al.</i> , 1983
<i>D. magna</i>		68.0	13.1	17.9				Blazka, 1966
<i>D. pulex</i>	94.0	49.7	16.3	4.9	19.3			Yurkowski y Tabachek, 1979
<i>D. pulex</i>	89.8	66.8	20.9					Mims <i>et al.</i> , 1991
<i>D. hyalina</i>		69.4	24.3	6.3		2.0		Vijverber y Frank, 1976
<i>D. carinata</i>	92.9	54.3	7.3	27.1	11.3	1.1		Kibria <i>et al.</i> , 1997
<i>Moina</i> spp.	87.2	68.6	22.1			1.4	0.1	Creswell, 1993
<i>M. australiensis</i>	93.7	64.8	7.7	20.7	6.8	1.1		Kibria <i>et al.</i> , 1997
<b>Copépodos</b>								
<i>Cyclops vicinus</i>		69.2	6.0	24.8				Blazka, 1966
<i>C. sphaericus</i>		73.2	18.5	8.4			2.1	Vijverber y Frank, 1976
<i>Diaptomus</i> spp.	92.4	57.9	25.1		5.3			Creswell, 1993
<i>D. gracilis</i>		76.0	9.4	14.6				Blazka, 1966
<i>D. castor</i>		86.0	9.5	5.5				
<i>Tigriopus japonicus</i>	88.6	71.0	22.8	4.4	0.8	0.1		Creswell, 1993
<i>Calanus plumchrus</i>	89.0	58.2	21.8	0.5	9.4			Brett, 1971
<b>Rotíferos</b>								
	90.8	64.3	15.1		10.9	1.1	0.2	
<i>Brachionus plicatilis</i>	87.9	63.7	23.1		6.8	1.4	0.1	Watanabe <i>et al.</i> , 1983
	86.4	58.1	27.4		6.6	1.5	0.2	
		56.9	12.8	16.7	13.6	1.4		Millamena <i>et al.</i> , 1990
<b>Eufáusidos</b>								
Harina de camarón		56.2	9.2		15.9	2.1	4.0	Koops <i>et al.</i> , 1979
<i>Euphausia pacifica</i>	82.0	33.3	27.8		27.8	1.6	2.6	Creswell, 1993
<i>E. superba</i>		56.3	10.7		15.0	2.0	3.6	Lukowicz, 1979
<b>Dieta recomendada para peces</b>								
<b>Peces omnívoros</b>								
Crías (0.05 g)		42.0	8.0			1.0	2.5	
Alevín (0.5-10 g)		39.0	7.0			0.9	2.5	
Juvenil (10-50 g)		37.0	7.0			0.8	2.0	
<b>Peces carnívoros</b>								
								Tacon, 1990
Crías (0.05 g)		52.0	16.0			1.0	2.5	
Alevín (0.5-10 g)		49.0	14.0			0.8	2.5	
Juvenil (10-50 g)		47.0	14.0			0.8	2.0	

Los rotíferos fueron considerados como zooplanctontes nocivos que alcanzaban altas densidades en cultivos de anguilas y que causaban la muerte súbita de ellas, debido al rápido consumo de oxígeno disuelto (Ito, 1960). Sin embargo, posteriormente los rotíferos fueron cultivados y utilizados como alimento de *Plecoglossus altivelis*, y mojarra rojas (Hirata, 1965). Se han reportado beneficios de la utilización de rotíferos como primer alimento durante las primeras etapas, en comparación con los alimentos convencionales, ya que mejoran el crecimiento y la supervivencia de peces (Holt, 2003; Lim *et al.*, 2003).

Las especies más cultivadas para su uso en acuicultura, de agua dulce son: *Brachionus urceolaris*, *B. angularis*, *B. quadridentatus*, *B. rubens*, *B. calyciflorus*, *Keratella quadrata*, *Ephifanes* sp. y *Pterodina patina*; y de ambientes salobres y marinos: *B. plicatilis*, *Colurella colorus* y *K. cruciformis* (Castellanos-Páez *et al.*, 1999). Las especies del género *Brachionus* han sido las especies más utilizadas como alimento para crías de peces (Lubzens, 1987; Castellanos-Páez, 1999; Hagiwara *et al.*, 2001; Chigbu y Suchar, 2006; Moorhead y Zeng, 2010). La especie *B. plicatilis* es el rotífero que más se ha utilizado como alimento primerizo, debido a su tamaño (lorica de 130 a 340  $\mu\text{m}$ ) y a su lenta natación (Chotiyaputta y Hirayama, 1978; Lubzens, 1987; Lubzens *et al.*, 1989; Lim *et al.*, 2003; Hu y Xi, 2008).

### ***Técnicas para el cultivo de rotíferos***

Dentro de los sistemas de cultivo de rotíferos se distinguen las siguientes: cultivo en lote, cultivo continuo o cultivo semicontinuo (Yoshimatsu y Houssain, 2014). En la Tabla 12 se resumen las características de cada sistema de cultivo y las ventajas y desventajas que presentan.

**Tabla 12. Ventajas y desventajas de los principales sistemas de cultivo de rotíferos**

<b>Tipo de cultivo</b>	<b>Características</b>	<b>Ventaja</b>	<b>Desventajas</b>
Cultivo por lote	<b>Tiempo:</b> Periodo corto  <i>Densidad de organismos:</i> 10 – 500 ind ml <sup>-1</sup> (Hirata, 1965; Lubzens, 1987; Gatesoupe <i>et al.</i> , 1989).	Se obtienen organismos en periodos cortos. La cantidad de medio utilizada es menor.	Al no existir recambios se tiene acumulación de desechos que perjudican la calidad del medio y afectan directamente el crecimiento poblacional

Cultivo semicontinuo	<p><b>Tiempo:</b> Se puede mantener un cultivo por varias semanas</p> <p><b>Densidad de organismos:</b> 100 – 2,300 ind·ml<sup>-1</sup> (Morizane, 1991; Suantika <i>et al.</i>, 2003).</p>	<p>Existe un suministro constante de alimento lo que se ve reflejado en una mayor producción de organismos. El cosechar periódicamente el cultivo permite mantener en constante crecimiento al cultivo.</p>	<p>Al tener una mayor producción de organismos requiere especial atención en suministrar nutrientes adicionales para garantizar la calidad nutricia de los organismos</p> <p>Se produce una mayor cantidad de medio utilizado.</p>
Cultivo continuo	<p><b>Tiempo:</b> Se puede mantener un cultivo por varias semanas</p> <p><b>Densidad de organismos:</b> 3,000 – 10,000 ind·ml<sup>-1</sup> (Suantika <i>et al.</i>, 2003).</p>	<p>Puede tenerse un cultivo por periodos largos. Tiene una mayor productividad que los demás sistemas. Se elimina la acumulación de desechos y se tiene un medio de cultivo con pH estable, sin necesidad de fuente extra de oxígeno</p>	<p>Requiere de mayor conocimiento para su operación. Al igual que el semicontinuo, requiere especial atención en suministrar nutrientes adicionales para garantizar la calidad nutricia de los organismos</p>

---

### Cultivo por lote

El cultivo por lote es el método de cultivo más empleado (Dhert *et al.*, 2001). Dentro de este método se reconocen dos formas: a) volumen constante con incremento en la densidad de rotíferos; y b) densidad de rotíferos constante con incremento del volumen (Hirata, 1980; Lubzens, 1987; Dhont *et al.*, 2013). Los rotíferos son alimentados con microalgas, levadura o productos comerciales, a una densidad conocida. Conforme avanza el cultivo, la calidad del medio disminuye, por lo que se tiene un impacto negativo sobre el crecimiento. En general, el cultivo por lote se realiza en un periodo de dos a cuatro días con la posterior cosecha total de organismos (Dhont *et al.*, 2013; Yoshimatsu y Houssain, 2014).

## **Cultivo semicontinuo**

El cultivo semicontinuo permite evitar los problemas derivados de la acumulación de materia en suspensión que se presentan en el cultivo por lotes. En este método un porcentaje del volumen del cultivo es cosechado y reemplazado por la misma cantidad de medio nuevo (Yoshimatsu y Houssain, 2014). Este método permite tener cultivos de mayor volumen (*e.g.* 50-200 m<sup>3</sup>), además que el tiempo de cultivo es mayor, incluso de hasta un año (Morizane, 1991). Este sistema es ampliamente usado en la larvicultura y es complementado con cultivo por lotes (Hirayama y Nakamura, 1976; Suantika *et al.*, 2000; Kostopoulou *et al.*, 2012; Rehberg-Haas *et al.*, 2015).

## **Cultivo continuo**

En este método, una porción del medio es cambiada regularmente para mantener la calidad del medio. Los restos producidos en este sistema pueden reducirse al mínimo y el cultivo puede mantenerse y cosecharse con regularidad (Yoshimatsu y Houssain, 2014). Este método de cultivo tiene mayor productividad que los sistemas por lotes o semicontinuos, al tener cosechas periódicas.

## **Probióticos en el cultivo de rotíferos**

La investigación de probióticos para organismos acuáticos está en constante incremento por la necesidad de una acuicultura amigable con el ambiente (Gatesoupe, 1999). La microbiota asociada a los cultivos de alimento vivo cumple un papel clave en la inestabilidad y variabilidad de los cultivos (Gatesoupe, 1991; Gatesoupe *et al.*, 1989; Hirayama, 1987; Harzevilli *et al.*, 1998). A causa de esto, existe interés en la manipulación de la composición de la comunidad microbiana para obtener una comunidad más fiable y útil. Los problemas asociados con las repentinas variaciones en la calidad de los cultivos puede ser resuelto con el manejo apropiado de las bacterias (Dhert *et al.*, 2001).

Los sistemas de cultivo de alimento vivo convencionales son vulnerables debido a que no se realiza ningún control microbiano después de la desinfección del medio de cultivo. El desarrollo de la microbiota en los sistemas de cultivo ocurre en dos etapas, basado en el concepto de las estrategias r y K (Salvesen *et al.*, 1999). Durante la primera etapa, las estrategias r se desarrollan

(e.g. bacterias de rápido crecimiento), después la comunidad comenzará a alcanzar el estadio maduro. Toma aproximadamente entre 4 y 7 días completar un ciclo, pero debido a que la microbiota es afectada por la adición de alimento y el crecimiento continuo de rotíferos, es difícil que los estrategas K se establezcan. Por lo anterior, es de gran importancia seleccionar bacterias que sobrevivan fácilmente bajo las mismas condiciones que los rotíferos (Dhert *et al.*, 2001).

Las bacterias presentes en los cultivos de los rotíferos pueden servir como alimento y contribuir al crecimiento y reproducción (Ushiro *et al.*, 1980; Nicolas *et al.*, 1989; Hagiwara *et al.*, 1994; Hino *et al.*, 1997; Rombaut *et al.*, 1999), pero también pueden ser dañinas (Hagiwara *et al.*, 1995; Maeda y Hino, 1991). En buenas condiciones de cultivo, las bacterias pueden encontrarse en forma de flóculos o adheridas al detritus hasta que alcanzan un tamaño suficiente para ser comidas por los rotíferos. De esta forma, las bacterias pueden proporcionar algunas sustancias de las que son deficientes ciertas dietas, especialmente cuando son alimentados con levaduras (Coves *et al.*, 1990). También es conocido que sintetizan vitaminas B, particularmente la vitamina B<sub>12</sub> que es necesaria para la reproducción de los organismos del género *Brachionus* (Dhert *et al.*, 2001).

Se han reportado beneficios de usar probióticos en el cultivo de rotíferos, tales como: la optimización de las tasas de crecimiento poblacional (Bogaert *et al.*, 1993; Gatesoupe *et al.*, 1989; Gatesoupe, 1991; Rombaut *et al.*, 1999; Hirata *et al.*, 1998), el mejoramiento de la calidad del agua y el incremento de nutrientes y vitaminas en el medio de cultivo (Gatesoupe, 1991, 1999; Rombaut *et al.*, 1999; Douillet 2000a, 2000b; Planas *et al.*, 2004; Zink *et al.*, 2013), o inhibir el desarrollo de patógenos como *Aeromonas salmonicida* (Gatesoupe, 1991). Sin embargo, las investigaciones sobre probióticos aplicados al cultivo de rotíferos se limitan a la especie *Brachionus plicatilis* y no existen reportes relacionados con rotíferos de agua dulce.

También se ha demostrado que utilizar las bacterias como probióticos estimulan la reproducción asexual (Hagiwara *et al.*, 1994; Rombaut *et al.*, 1999). El modo de acción de estos probiontes en el cultivo de rotíferos no es claro, si embargo puede deberse a: proveen de nutrientes limitantes; competencia contra otras bacterias por nutrientes y sitios de adhesión; antagonismo; inmunoestimulantes; y mejoramiento de la calidad del medio (Dhert *et al.*, 2001).

## **Objetivo**

Evaluar el crecimiento poblacional de *Brachionus calyciflorus* cultivado con diferentes densidades de probióticos.

## **Objetivos particulares**

Evaluar el efecto de los probióticos NanoCrusta más *C. vulgaris* en el crecimiento poblacional del rotífero *Brachionus calyciflorus*.

Evaluar el efecto de los probióticos NanoCrusta suministrados sin *C. vulgaris* en el crecimiento poblacional *Brachionus calyciflorus*.

## **Material y Métodos**

### **Diseño experimental**

La cepa de *B. calyciflorus* fue cultivada hasta obtener el número necesario de hembras ovígeras para la experimentación. Los tratamientos experimentales se enlistan en la Tabla 13. Los cultivos se realizaron en tubos de polipropileno de 30 ml (marca Sarstedt) con 30 ml de medio. Cada tratamiento se realizó por triplicado. La densidad inicial de organismos fue de 5 ind ml<sup>-1</sup>, cada cultivo comenzó con 100% de hembras ovígeras. Diariamente se cambió el medio con la densidad de alimento y probiótico de cada tratamiento. El probiótico empleado para los experimentos fue NanoCrusta® (patrocinado por Altacrusta SAPI), probiótico empleado en el sector agrícola y pecuario.

**Tabla 13. Tratamientos experimentales con diferentes concentraciones de probióticos**

Clave	Tratamiento	Volumen (ml)	Densidad inicial de <i>B. calyciflorus</i> (ind ml <sup>-1</sup> )	# de réplicas	Densidad de <i>C. vulgaris</i> (x 10 <sup>6</sup> cél ml <sup>-1</sup> )	Densidad de probióticos (x10 <sup>6</sup> cél ml <sup>-1</sup> )
P2	Testigo <i>C. vulgaris</i>	30	5	3	1.0	0
P3	Testigo probiótico 1	30	5	3	0	2.12
P4	Testigo probiótico 2	30	5	3	0	0.0021
P5	Testigo probiótico 3	30	5	3	0	0.0106
P6	Testigo probiótico 4	30	5	3	0	0.0212
P7	Tratamiento probiótico 1	30	5	3	1.0	2.12
P8	Tratamiento probiótico 2	30	5	3	1.0	0.0021
P9	Tratamiento probiótico 3	30	5	3	1.0	0.0106
P10	Tratamiento probiótico 4	30	5	3	1.0	0.0212

### Conteo de rotíferos

Diariamente se contaron los organismos de cada cultivo a partir de alícuotas de 1 ml. Cada conteo se realizó por triplicado. La muestra se colocó en portaobjetos excavado y se registró el número de individuos y huevos por ml. El promedio del conteo de individuos se utilizó para elaborar la curva de crecimiento poblacional para cada tratamiento.

### Tasa de crecimiento poblacional

A partir de los datos registrados se calculó la tasa de crecimiento poblacional para lo que se usó la siguiente ecuación (Nandini y Rao, 1998):

$$r = \frac{(\ln N_t - \ln N_0)}{t}$$

Donde:

$N_0$  = densidad inicial

$N_t$  = densidad final

$t$  = tiempo en días

$r$  = tasa de crecimiento poblacional

### Proporción de huevos

La proporción de huevos se expresó como el número de huevos/hembra (Edmonson, 1965). Los datos de la máxima densidad se obtuvieron de cada réplica. El tiempo para alcanzar la máxima



densidad poblacional se consideró como el día en el cuál se tuvo la densidad máxima para cada tratamiento.

### Análisis de datos

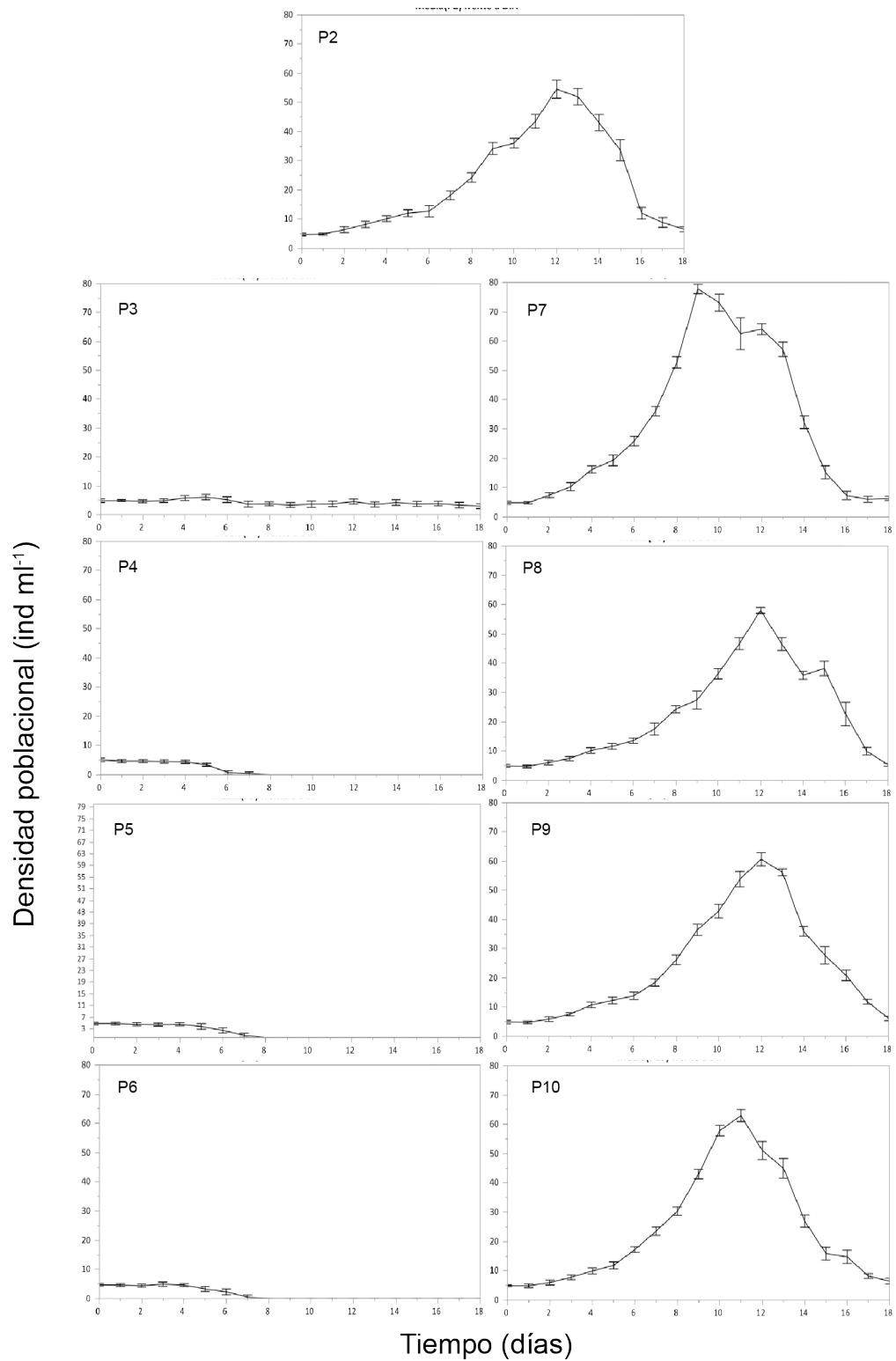
Se utilizó estadística descriptiva para la presentación de los datos. Posteriormente, se aplicaron pruebas de significancia estadística (Zar, 1996). Para determinar la normalidad de los datos de la densidad máxima y la tasa de crecimiento poblacional se empleó el Método de igualdad de varianzas de Levene. Una vez comprobada la normalidad de los datos se utilizó estadística paramétrica para su análisis. Para determinar si existían diferencias significativas en la densidad máxima y la tasa de crecimiento poblacional de los tratamientos se realizó un análisis de varianzas (ANOVA  $p < 0.05$ ). Se realizó una prueba de comparación de Tukey para determinar entre cuáles tratamientos se presentaron las diferencias.

### Resultados

El aumento en la densidad de probióticos resultó en un incremento en el crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* (Tabla 14). En la Figura 7 se muestran las curvas de crecimiento de *B. calyciflorus* con los diferentes tratamientos de probióticos y el tratamiento testigo. Cuando se suministraron los probióticos de manera separada (P3, P4, P5, P6), solo la densidad más alta (P3) permitió que los rotíferos sobrevivieran durante los días de experimentación, los demás tratamientos se suspendieron el día 7 cuando no había organismos vivos.

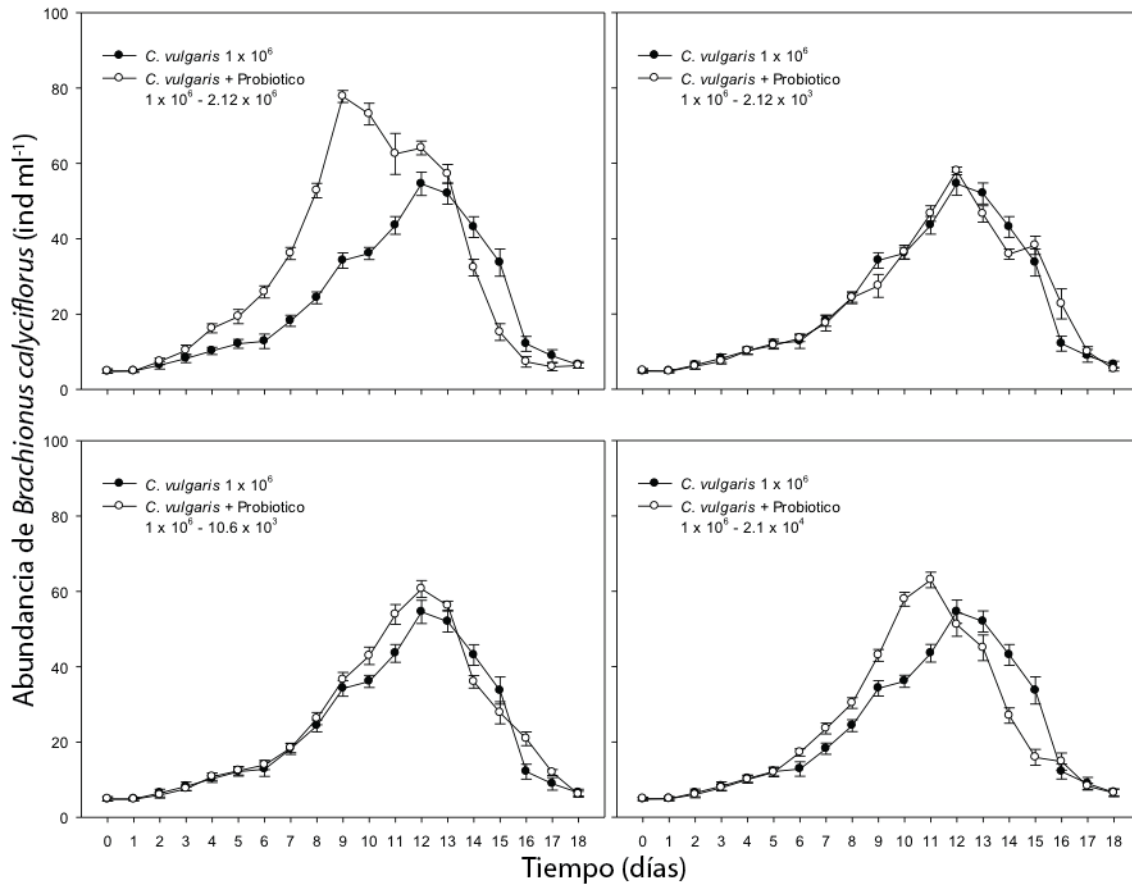
**Tabla 14. Resumen del crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* alimentado con diferentes densidades de probióticos.**

Tratamiento	Densidad de probióticos (x 10 <sup>6</sup> cel ml <sup>-1</sup> )	Densidad máxima (ind ml <sup>-1</sup> )	Día de máxima densidad	Tasa de crecimiento poblacional <i>r</i>
P2	0	54.55 ± 3.08	12	0.19
P7	2.12	77.77 ± 1.56	9	0.30
P8	0.0021	57.88 ± 1.05	12	0.20
P9	0.0106	60.66 ± 2.23	12	0.20
P10	0.212	63.00 ± 2.06	11	0.23



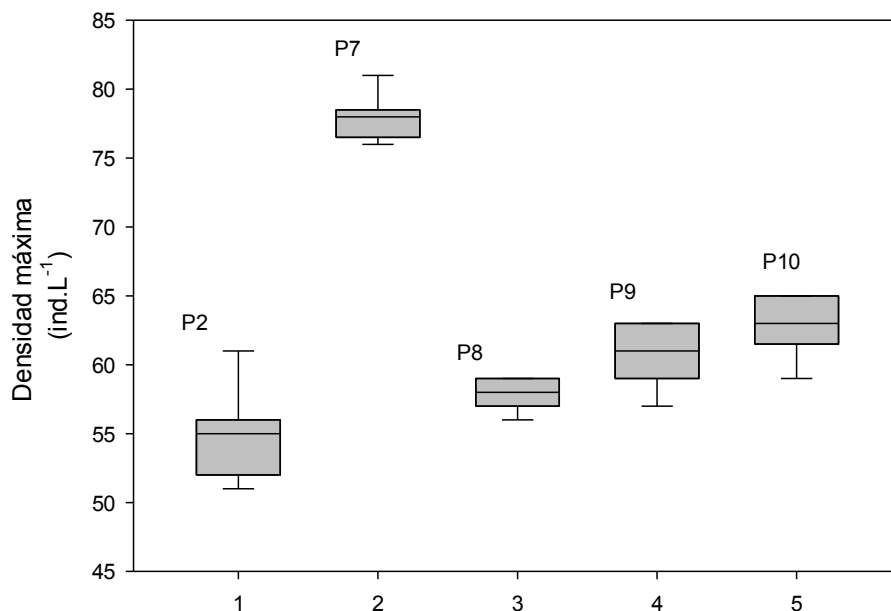
**Figura 7. Curvas de crecimiento poblacional de los tratamientos experimentales con probióticos. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar, basado en las tres réplicas.**

Los tratamientos con *C. vulgaris* más probióticos tuvieron una densidad máxima mayor que el testigo *C. vulgaris* (P2). La diferencia varió entre 3.3 y 22.3 ind ml<sup>-1</sup>, con relación al testigo (Figura 14). En la Figura 14 se comparan las curvas de crecimiento de los tratamientos con *C. vulgaris* + probióticos (P7, P8, P9 y P10) con el testigo *C. vulgaris* (P2).



**Figura 8. Curvas de crecimiento poblacional de *Brachionus calyciflorus* (ind ml<sup>-1</sup>). Cada tratamiento es comparado con el testigo *C. vulgaris*.**

El tratamiento P7 alimentado con *C. vulgaris* y la densidad más alta de probióticos tuvo la mayor densidad comparado con los demás tratamientos ( $77.77 \pm 1.56$  ind ml<sup>-1</sup>), 22.3 ind ml<sup>-1</sup> superior a la media del testigo *C. vulgaris*. Además de tener la mayor densidad, el día de máxima densidad se presentó en el día 9 de cultivo. La máxima densidad del testigo *C. vulgaris* y los tratamientos con probióticos se muestran en la Figura 9.



**Figura 9. Densidad máxima poblacional (ind ml<sup>-1</sup>) de los tratamientos con probióticos y el testigo.**

La densidad máxima poblacional tuvo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos. La mayor variabilidad se debe a los tratamientos más que dentro de cada grupo (Tabla 15).

**Tabla 15. Análisis de varianza de la máxima densidad poblacional de los tratamientos experimentales.**

Source Term	DF	Sum of squares	Mean squares	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
<b>A: tratamiento</b>	<b>4</b>	<b>2889.11</b>	722.28	161.7	0.000000*	1
S(A)	40	178.67	4.47			
Total (Adjusted)	44	3067.78				
Total	45					

\* Term significant at alpha = 0.05

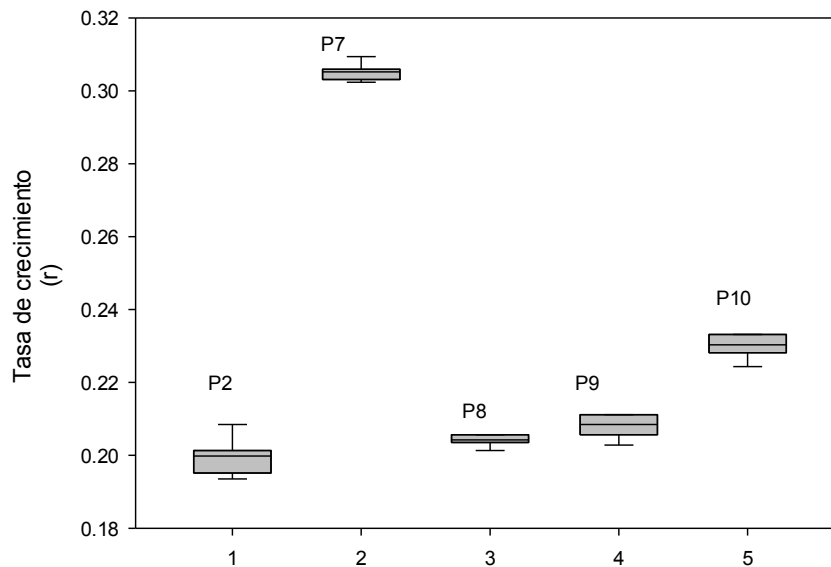
En la Tabla 16 se enlistan las diferencias entre los tratamientos. El tratamiento testigo P2 presentó diferencias significativas con los tratamientos de probióticos (P7, P8, P9 y P10). Por su parte, el tratamiento P7 presentó diferencias significativas con el testigo P2 y con los demás tratamientos con probióticos.

**Tabla 16. Relación de diferencias de densidad máxima entre tratamientos.**

Tratamiento	Diferente al tratamiento
P2	P8, P9, P10, P7
P8	P2, P10, P7
P9	P2, P7
P10	P2, P8, P7
P7	P2, P8, P9, P10

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=40 MSE=4.466667 Critical Value=4.0391

La máxima tasa de crecimiento ( $r$ ) se presentó en el tratamiento P7 con 0.30, mientras que la menor  $r$  fue el testigo P2 con 0.19 (Figura 10).



**Figura 10. Tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) los tratamientos con probióticos y el testigo.**

La  $r$  tuvo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre los tratamientos (Tabla 17). La mayor variabilidad se debió a los tratamientos más que dentro de cada tratamiento. Como se observa en la Tabla 18, el tratamiento control P2 fue diferente significativamente de los tratamientos con probióticos (P7, P8, P9 y P10). Mientras que el tratamiento P7 presentó diferencias significativas con el tratamiento control P2 y con los demás tratamientos de probióticos (P8, P9 y P10).

**Tabla 17. Análisis de varianza de *r* de los tratamientos experimentales**

Source Term	DF	Sum of squares	Mean squares	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
<b>A: tratamiento</b>	<b>4</b>	<b>0.0695</b>	0.0174	1845.34	0.000000*	1
S(A)	40	0.000376	0.00000941			
Total (Adjusted)	44	0.0698				
Total	45					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Tabla 18. Relación de diferencias de *r* entre tratamientos.**

Tratamiento	Diferente al tratamiento
P2	P8, P9, P10, P7
P8	P2, P10, P7
P9	P2, P10, P7
P10	P2, P8, P9, P7
P7	P2, P8, P9, P10

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=40 MSE=4.466667 Critical Value=4.0391

La proporción de huevos varió en respuesta a los tratamientos con probióticos. Los valores de proporción de huevos se muestran graficados contra la densidad poblacional (Figura 11). Como se puede observar, existe una relación inversa entre la proporción de huevos y la densidad poblacional. Los modelos de los tratamientos expresados se muestran graficados en la Figura 12.

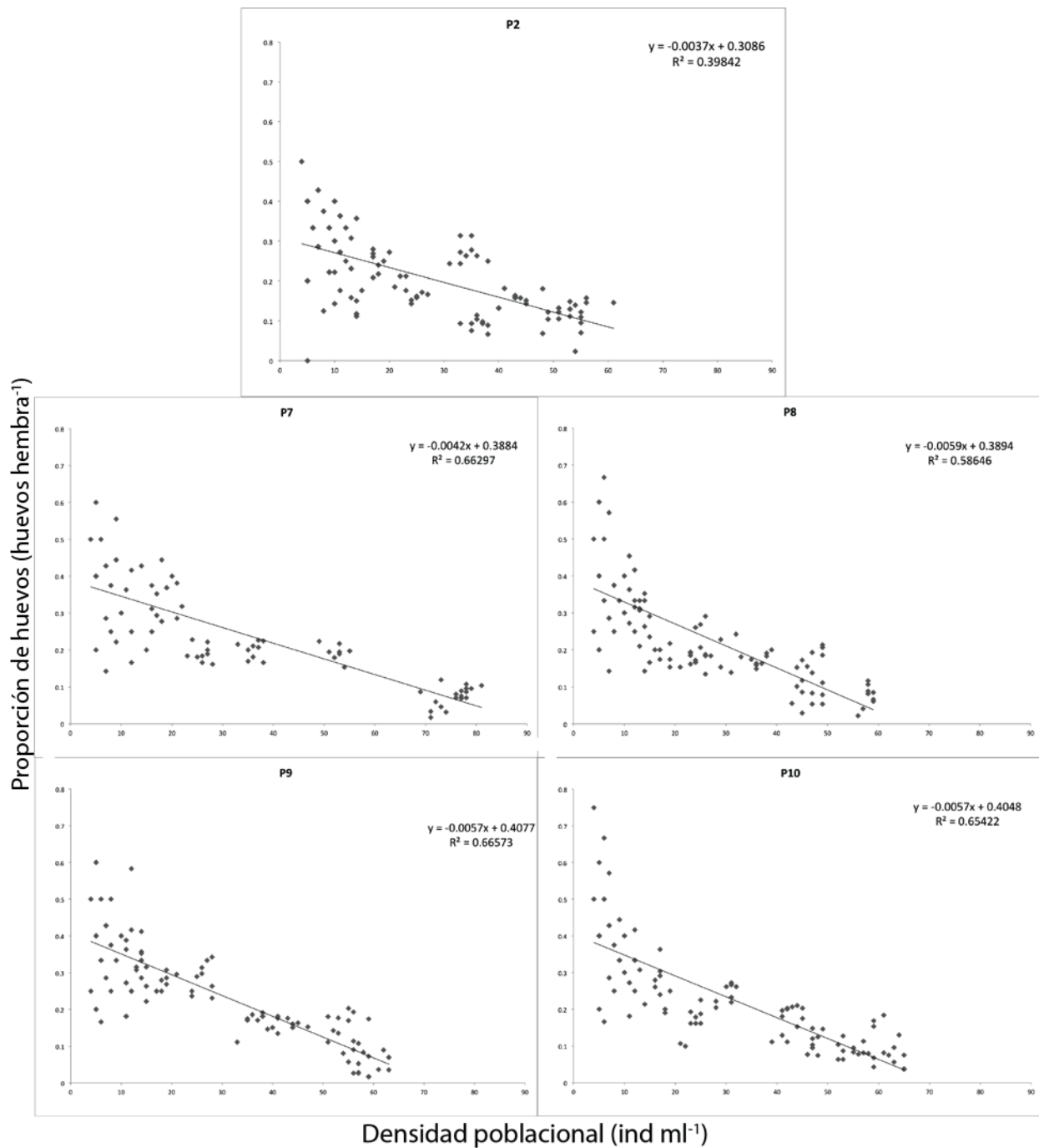
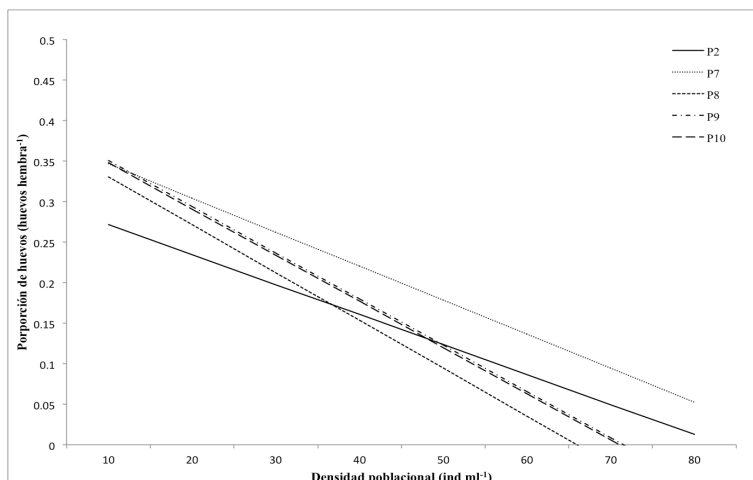


Figura 11. Relación de la proporción de huevos con la densidad poblacional de *B. calyciflorus* con diferentes tratamientos de probióticos.



**Figura 12. Modelos graficados de la relación entre la proporción de huevos y la densidad poblacional**

## Discusión

La densidad utilizada de *C. vulgaris* como alimento de *B. calyciflorus* en el experimento ( $1.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>), coincide con los reportes de otros autores para investigar efectos en la dinámica poblacional (Sarma *et al.*, 1999; 2001; 2006; Flores-Brugos *et al.*, 2005; Gama-Flores *et al.*, 2007).

El crecimiento poblacional de los rotíferos puede expresarse de muchas maneras, por ejemplo: peso seco o peso húmedo y el número de individuos. Expresar el crecimiento en términos de biomasa puede tener errores debido a que una población en crecimiento está compuesta por individuos de diferentes tallas (desde recién nacidas hasta hembras maduras; Sarma, 1993). El remover el número suficiente de individuos de los tubos de experimentación para ser fijados y posteriormente medidos para calcular la biomasa afectaría el patrón de crecimiento poblacional (Sarma *et al.*, 1999). Es por esto que el crecimiento poblacional se expresó en término de número de individuos por mililitro.

Es importante enfatizar que las comparaciones directas de la dinámica poblacional entre estudios resulta complicado debido a que se emplean diferentes cepas y se tienen condiciones previas de cultivo diferentes (Snell *et al.*, 1983). El tratamiento P7 tuvo una densidad máxima poblacional de  $77.7 \pm 1.56$  (Tabla 14), densidad comparable con reportes de *B. calyciflorus* alimentado con densidades mayores de *C. vulgaris* e.g.  $2.0$  cél ml<sup>-1</sup> ( $77$  ind ml<sup>-1</sup> - Arévalo-Stevenson *et al.*,



1998), 3.0 (72 ind ml<sup>-1</sup> - Fernández-Araiza *et al.*, 2005), y 4.5 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup> de *C. vulgaris* (75 ind ml<sup>-1</sup> - Peredo-Álvarez *et al.*, 2003). Es importante resaltar que dos tratamientos con probióticos (P7 y P10), alcanzaron la densidad máxima más rápido que el tratamiento testigo (P2), con una diferencia de 4 días. El efecto del uso de probióticos resultó en un incremento del 42% en la densidad máxima comparado con el tratamiento testigo (Figura 8).

La tasa de crecimiento poblacional es empleada para comparar el crecimiento de dos tratamientos distintos (*e.g.* Sarma *et al.*, 2001). Los cuatro tratamientos con probióticos tuvieron una tasa de crecimiento mayor que el tratamiento testigo. Se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento y la densidad máxima entre los tratamientos con probióticos y el testigo. Estos resultados coinciden con los reportes de Gatesoupe (1991), Rombaut *et al.* (1999) y Douillet (2000a), quienes encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento de cultivos de *B. plicatilis* inoculados con bacterias. Es importante mencionar que este es el primer reporte sobre la implementación de probióticos en cultivos de rotíferos de agua dulce como *B. calyciflorus*.

En los cultivos comerciales de rotíferos debido a las concentraciones de individuos que se logran están acompañadas de sus desechos que aportan un alto contenido de material orgánico que permite la rápida colonización del medio de cultivo por bacterias (Tanasomwang y Muroga, 1989; Skjermo y Vadstein, 1993). El cultivo intensivo permite una dominancia de bacterias de rápido crecimiento (Vadstein *et al.*, 1993). Se ha demostrado que la composición de la comunidad bacteriana en un cultivo de rotíferos influye en la estabilidad del cultivo y el crecimiento poblacional (Gatesoupe *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 1989; Skjermo y Vadstein, 1993; Hagiwara *et al.*, 1994; Rombaut *et al.*, 1999; Douillet, 2000a, 2000b; Tinh *et al.*, 2006; Zink *et al.*, 2013). Dependiendo de la cantidad de alimento, los rotíferos pueden alimentarse en mayor medida de bacterias. Nicolas *et al.* (1989), y Hino *et al.* (1997), demostraron que los rotíferos alimentados con una cantidad baja de alimento, se alimentan en mayor medida de bacterias con el objetivo de complementar la deficiencia de nutrientes. Esta ingestión puede ser de manera directa o, cuando las condiciones lo permiten, las bacterias forman flóculos y alcanzan un tamaño suficientemente grande para ser comido por los rotíferos (Hino *et al.*, 1997). De esta manera las bacterias pueden compensar un déficit de nutrientes (Yasuda y Taga, 1980). Incluso, al alimentarse de estas bacterias se obtienen beneficios en el crecimiento y la reproducción (Ushiro

*et al.*, 1980; Hirayama y Fumamoto, 1983; Hagiwara *et al.*, 1994; Rombaut *et al.*, 1999). Las bacterias pueden suplir sustancias que son deficientes en ciertas dietas (Coves *et al.*, 1990). Es bien conocido que sintetizan vitaminas del grupo B, particularmente vitamina B<sub>12</sub> que es necesaria para la reproducción de los rotíferos del género *Brachionus* (Hirayama y Funamoto, 1983; Yu *et al.*, 1989; Hirayama y Maruyama 1991; Hagiwara *et al.*, 1994; Castellanos-Páez *et al.*, 1999).

La aplicación de ciertas cepas de bacterias usadas como alimento para *B. plicatilis* mejora la tasa de crecimiento poblacional (Gatesoupe *et al.*, 1989; Gatesoupe, 1991; Bogaert *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997; Hirata *et al.*, 1998; Planas *et al.*, 2004). Además de esto se obtiene un control de la microbiota y una reducción de la variabilidad en la producción de rotíferos (Yasuda y Taga, 1980; Yu *et al.*, 1989; Maeda y Hino, 1991; Hagiwara *et al.*, 1994; Hino *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997; Rombaut *et al.*, 1999). En el presente estudio la tasa de crecimiento poblacional fue mayor cuando se suministraron los probióticos. Estos resultados son comparables con lo descrito por Rombaut *et al.* (1999), Douillet (2000b) y Zink *et al.* (2013), quienes reportan que las tasas de crecimiento son mayores al suministrar probióticos a los cultivos de rotíferos. Cabe enfatizar que las comparaciones con otros autores corresponden a trabajos realizados con *B. plicatilis*, ya que no existen trabajos realizados con probióticos en el cultivo de rotíferos de agua dulce.

Los resultados obtenidos evidencian un efecto sinérgico de los probióticos con *C. vulgaris*, ya que al suministrarse a las mismas densidades experimentales sin la microalga, los rotíferos se mantuvieron a una densidad baja sin mostrar un crecimiento poblacional (Figura 7). Las diferencias presentadas en la densidad máxima y la tasa de crecimiento indican los beneficios de suministrar probióticos en el cultivo de *B. calyciflorus*. Con los resultados obtenidos se evidencia que los rotíferos se ven beneficiados al suministrarles probióticos como complemento de *C. vulgaris*.

Al graficar los valores de proporción de huevos contra la densidad poblacional resultó en una relación inversa (Figura 11). Edmonson (1965), empleó la información de los huevos para predecir las oscilaciones en la población. Él mostró que cuando la población es abundante, la proporción de huevos decrece. Este patrón se pudo observar en los resultados obtenidos. Cabe mencionar que los valores de proporción de huevos en los tratamientos con probióticos fueron

mayores a los valores del tratamiento testigo. Esto concuerda con lo reportado por Rombaut *et al.* (1999) y Zink *et al.* (2013). Hagiwara *et al.* (1994) demostró que la adición de ciertas cepas de bacterias al cultivo de *B. plicatilis* tiene un efecto positivo en la reproducción.

En general, los valores más altos en proporción de huevos (huevos hembra<sup>-1</sup>) se presentaron en los tratamientos con probióticos y los valores menores en el tratamiento control. Esto puede explicarse ya que tanto el tipo como la concentración del alimento tienen un impacto en la sobrevivencia de los rotíferos y en la reproducción (Sarma *et al.*, 2005). Se ha demostrado que hay una mayor producción de huevos relacionada a un aumento en la concentración de alimento (Dumont *et al.*, 1995; Nandini y Sarma, 2001). Por otro lado, el suministrar bacterias puede incrementar la proporción de huevos de *B. plicatilis* como lo reportan Rombaut *et al.* (1999) y Zink *et al.* (2013).

## **Conclusiones**

El presente experimento representa el primer reporte del efecto del uso de probióticos en el cultivo de rotíferos de agua dulce, en específico de *B. calyciflorus*. La densidad baja suministrada de *C. vulgaris* ( $1 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>), permitió evidenciar el efecto de los probióticos.

Cuando los probióticos fueron suministrados en conjunto con *C. vulgaris* se tuvo un efecto positivo reflejado en densidades máximas y tasas de crecimiento poblacional superiores al tratamiento testigo, con diferencias significativas. El efecto del uso de probióticos resultó en un incremento del 42% en la densidad máxima comparado con el tratamiento testigo.

Los resultados obtenidos evidencian un efecto sinérgico entre los probióticos y *C. vulgaris*, ya que al suministrarse a las mismas densidades experimentales sin la microalga, los rotíferos se mantuvieron a una densidad baja sin mostrar un crecimiento poblacional.

Las diferencias presentadas en la densidad máxima y la tasa de crecimiento indican los beneficios de suministrar probióticos en el cultivo de *B. calyciflorus*. Con los resultados obtenidos se demostró que los rotíferos se ven beneficiados al suministrarles probióticos como complemento de *C. vulgaris*.

## Literatura citada

Alavandi, S.V., K.K. Vijayan, T.C. Santiago, M. Poornima, K.P. Jithendran, S.A. Ali y J.J.S. Rajan, 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM11 and *Vibrio fluviales* PM17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 17: 115-120.

Arévalo-Stevenson, R.A., S.S.S. Sarma y S. Nandini, 1998. Population dynamics of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera: Brachionidae) in waste water from food-processing industry in Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 46(3): 595-600.

Austin, B., L. Stuckey, P. Robertson, I. Effendi y D. Griffith, 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Dis.* 18, 93-96.

Bai, F., Y. Han, J. Chen y Z. Xiao-Hua, 2008. Disruption of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by the AiiA protein of *Bacillus thuringiensis*. *Aquaculture*, 274: 36-40.

Bailey, K.M. y J.T. Duffy-Anderson, 2001. Fish predation and mortality. En: John, H.S., K.T. Karl y A.T. Steve (Eds.) *Encyclopedia of Ocean Sciences*. Academic Press, Oxford, 961-968.

Bailey, K.M., y E.D. Houde, 1989. Predation on eggs and larvae of marine fishes and recruitment problem. *Advances in Marine Biology*, 25, 1-83.

Balcázar, J.L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell y J.L. Múzquiz, 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114: 173-186.

Blazka, P., 1966. The ratio of crude protein, glycogen and fat in the individual steps of the production chain. En: Hrbacek, J. (Ed.), *Hydrobiological studies 1*. Prague Academia Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prage, 395-409.

Bogaert, P., M. Dehasque y P. Sorgeloos, 1993. Probiotic effects of bacteria on the growth of the rotifer *Brachionus plicatilis* in culture. Presented at the World Aquaculture Conference, Torremolinos, Spain. European Aquaculture Society, Special Publication no. 19, Oostende, Belgium, 1-7.

Brett, J.R. 1971. Growth responses of Young sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) to different diets and plants of nutrition. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 28: 1635-1643.

Castellanos-Páez, M.E., G. Garza-Mouriño y S. Marañón-Herrera, 1999. Aislamiento, caracterización, biología y cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* (O. F. Müller). Libros de Texto. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. 119 p.

Chen, Y.C., 2007. Immobilization of twelve benthic diatom species for long-term storage and as feed for post-larval abalone *Haliotis diversicolor*. Aquaculture 263, 97-106.

Chigbu, P., y V.S. Suchar, 2006. Isolation of the marine rotifer, *Colurella dicentra* (Gosse, 1887), from Mississippi Gulf Coast estuary. Aquaculture Research, 37: 1400-1405.

Chotiyaputta, C. y K. Hirayama, 1978. Food selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* feeding on phytoplankton. Marine Biology, 45: 105-111.

Coves, D., P. Audineau, y J.L. Nicolas, 1990. Rotifer-rearing technology. En: Barnabe, G. (Ed.) Aquaculture, Volume I, Ellis Harwood, West Sussex, England, 232-245.

Creswell, R.L. 1993. Aquaculture desk reference. AVI Book, New York, 206 p.

Defoirdt, T., N. Boon, P. Bossier, W. Verstraete, 2004: Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. Aquaculture, 240: 69-88.

Dhert, P., G. Rombaut, G. Suantika y P. Sorgeloos. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. Aquaculture, 200: 129-146.

Dhont, J., K. Dierckens, J. Støttrup, G. Van Stappen, M. Wille, y P. Sorgeloos, 2013. Rotifers, *Artemia* and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. Advances in Aquaculture Hatchery Technology, 157-202.

Douillet P.A., 2000a. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic conditions 1. Evaluation of commercial products and pure isolates. Aquaculture, 182: 249-260.

Douillet P.A., 2000b. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic conditions 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. *Aquaculture*, 182: 241-248.

Dumont, H.J., S.S.S. Sarma y A.J. Ali, 1995. Laboratory studies on the population dynamics of *Anuraeopsis fissa* (Rotifera) in relation to food density. *Freshwater Biology*, 33: 39-46.

Edmonson, W.T. 1965. Reproductive rate of planktonic rotifers as related to food and temperatura. *Ecological Monographs*, 35: 65-111.

FAO/OMS, 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Departamento de Pesca y Acuicultura – Organización Mundial de Salud,. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London Ontario, Canada, 11 p.

Fernández-Araiza, M., S. Sarma, y S. Nandini, 2005. Combined effects of food concentration and temperature on competition among four species of *Brachionus* (Rotifera). *Developments in Hydrobiology*, 519-534.

Flores-Burgos, J., S.S.S. Sarma, y S. Nandini, 2005. Effect of single species or mixed algal (*Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*) diets on the life table demography of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 33(6): 614-621.

Gama-Flores, J., M. Castellanos-Páez, S.S.S. Sarma, y S. Nandini, 2007. Effect of pulsed exposure to heavy metals (copper and cadmium) on some population variables of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera: Brachionidae: Monogononta). *Hydrobiologia*, 593: 201-208.

García de la Banda, I., O. Chereguini, I. Rasines, 1992. Influencia de la adición de bacterias lácticas en el cultivo larvario del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) Boletín del Instituto Español de Oceanografía, 8: 247-254.

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.

Gatesoupe, F.J., 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. *Aquatic Living Resources*, 7: 277-282.

Gatesoupe, F.J., 1997. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources*, 10: 239-246.

Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165.

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

Gibson, L.F., J. Woodworth y A.M. George, 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*, 169: 111-120.

Gildberg, A., y H. Mikkelsen, 1998. Effect of supplementing the feed of Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture*, 167: 103-113.

Gisbert, E. y P. Williot, 1997. Larval behaviour and effect of the timing of initial feeding on growth and survival of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) larvae under small scale hatchery production. *Aquaculture*, 156: 63-76.

Gómez-Gil, B., A. Roque y J.F. Turnbull, 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191: 259-270.

Gómez, R.D., J.L. Balcázar y M.A. Shen, 2007. Probiotics as Control Agents in Aquaculture. *Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research)*, 6(1): 76-79.

Gullian, M., F. Thompson, J. Rodríguez, 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233: 1-14.

Hagiwara, A., K. Hamada, S. Hori, y K. Hirayama, 1994. Increased sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* Rotifera, with the addition of bacteria and rotifer extracts. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 181: 1-8.

Hagiwara, A., M.M. Jung, T. Sato y K. Hirayama, 1995. Interspecific relations between the marine rotifer *Brachionus plicatilis* and zooplankton species contaminating in the rotifer mass culture tank. Fisheries Science, 61: 623-627.

Hagiwara, A., W.G. Gallardo, M. Assavaaree, T. Kotani y A.B. de Araujo, 2001. Live food production in Japan: recent progress and future aspects. Aquaculture, 200: 111-127.

Harzevili, A.R.S., H. Van Duffel, P. Dhert, J. Swings, P. Sorgeloos, 1998. Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). Aquaculture Research, 29: 411-417.

Heming, T.A., J.E. McInerney y D.F. Alderdice, 1982. Effect of Temperature on Initial Feeding in Alevins of Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 39: 1154-1562.

Hino, A., S. Aoki y M. Ushiro, 1997. Nitrogen-flow in the rotifer *Brachionus rotundiformis* and its significance in mass cultures. Hydrobiologia, 358: 77-82.

Hirata, H. 1965. Culture of food organisms in the Yashima Station (Part 3). Saibai-Gyogyo (Fish Farming) News (Seto Inland Sea Fish Farming Association), 3: 4.

Hirata, H., 1980. Culture methods of the marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. Mini Review Data File Fisheries Research Kagoshima University, 1: 27-46.

Hirata, H., O. Murata, S. Yamada, H. Ishitani y M. Wachi, 1998. Probiotic culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Hydrobiologia, 387: 495-498.

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



Hirayama, K. y K. Nakamura, 1976. Fundamental studies on physiology of rotifers in mass culture .5. dry *Chlorella* powder as a food for rotifers. *Aquaculture*, 8: 301-307.

Hirayama, K., 1987. A consideration of why mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* with baker's yeast is unstable. *Hydrobiologia*, 147: 269-270.

Hjelm, M., Ø. Bergh, A. Riaza, J. Nielsen, J. Melchiorson, S. Jensen, H. Duncan, P. Ahrens, H. Birkbeck y L. Gram, 2004. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 360-371.

Holt, G.J. 2003. Research on culturing the early life stages of marine ornamental fish. En: Cato, J.C. y C.L. Brown, (Eds.) *Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation*, Ames, Iowa: Iowa State Press, 251-254.

Houde, E.D., 1989. Comparative growth, mortality, and energetics of marine fish larvae: temperature and implied latitudinal effects. *Fishery Bulletin*, 87: 471-495.

Houde, E.D., 1996. Mortality. En: Watanabe, Y., Y. Yamashita, y Y. Oozeki (Eds.) *Survival strategies in early life stages of marine resources*. A.A.Balkema, Rotterdam, The Netherlands. pp. 51-66.

Hu, H. y Y. Xi, 2008. Demographic parameters and mixis of three *Brachionus angularis* Gosse (Rotatoria) strains feed on different algae. *Limnologica*, 38: 56-62.

Hunt von Herbing, I. y S.M. Gallager, 2000. Foraging behavior in early Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*) feeding on a protozoan (*Balanion* sp.) and a copepod nauplius (*Pseudodiaptomus* sp.). *Marine Biology*, 136: 591-602.

Ito, T. 1960. On the culture of mixohaline rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller in the sea water. Report of the Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie, 3(3): 708-740.

Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M.J. Lategan y L. Gibson, 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274: 1-14.

Kibria, G., D. Nugegoda, R. Fairclough, P. Lam y A. Bradley, 1997. Zooplankton: its biochemistry and significance in aquaculture, Naga, The World Fish Center, 20(2): 8-14.

Koops, H. K. Tiewes, J. Gropp y H. Beck, 1979. Krill in trout diets. En: Halvers, J.E. y K. Tiewes (Eds.), Proceedings of the World Symposium of Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Hamburg, 20-23 June, 1978, Berlin, 2: 281-292.

Kostopoulou, V., M.J. Carmona y P. Divanach, 2012. The rotifer *Brachionus plicatilis*: an emerging bio-tool for numerous applications. Journal of Biological Research-Thessaloniki, 17: 97-112.

Lategan, M.J., F.R. Torpy y L.F. Gibson, 2004. Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199. Aquaculture, 240: 19-27.

Lee, W.J., Y.S. Park, Y.T. Park, S.J. Kim y K.Y. Kim, 1997. Studies on the availability of marine bacteria and the environmental factors for the mass culture of the high quality of Rotifera and Artemia: 1. Change of fatty acid and amino acid composition during cultivation and rotifer, *Brachionus plicatilis* by marine bacteria *Erythrobacter* sp. Journal of Korean Fisheries Society, 30: 319-328.

Lewis, W.M. y D.P. Morris, 1986: Toxicity of nitrite to fish: a review. Transactions American Fisheries Society, 115: 183-195.

Lim, L.C., P. Dhert y P. Sorgeloos, 2003. Recent developments in the application of live feeds in the freshwater ornamental fish culture. Aquaculture, 227: 319-331.

Liu, C.H., y C.S. Chiu, P.L. Ho y S.W. Wang, 2009. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology 107 (2009) 1031-1041.

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

Lubzens, E., A. Tandler, y G. Minkoff, 1989. Rotifers as food in aquaculture. En: Ricci, C., Snell, T. W. Y King, C. E. (Eds.), Rotifer Symposium V. Hydrobiologia 186/187: 387-400.

Lukowicz, M.V., 1979. Experiences with krill (*Euphausia superba* Dana) in the diet for young carp (*Cyprinus carpio*). En: Halvers, J.E. y K. Tiewes (Eds.), Proceedings of the World Symposium of Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Hamburg, 20-23 June, 1978, Berlin, 2: 293-302.

Maeda, M. y A. Hino, 1991. Environmental management for mass culture of rotifer, *Brachionus plicatilis* Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceedings US-Asia Workshop. The Oceanic Institute, Honolulu, 125-133.

Marteua, P. y J.C. Ramboud, 1993. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. FEMS Microbiology Letters, 12: 207-220.

Mercier, L., C. Audet, J. de la Noue, B. Parent, C.C. Parrish y N.W. Ross, 2004. First feeding of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) larvae: use of *Brachionus plicatilis* acclimated at low temperature as live prey. Aquaculture, 229: 361-376.

Millamena, O.M., V.D. Peñaflores y P.F. Subosa, 1990. The macronutrient composition of natural food organisms mass cultured as larval feed for fish and prawns. Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 42(3): 77-83.

Mims, S.D., C.D. Webster, J.H. Tidwell y D.H. Yancey, 1991. Fatty acid composition of *Daphnia pulex* cultured by two different methods. Journal of World Aquaculture Society, 22(2): 153-156.

Mohapatra, S., T. Chakraborty, V. Kumar, G. DeBoeck y K.N. Mohanta, 2013. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 97: 405-430.

Moorhead, J.A. y C. Zeng, 2010. Development of captive breeding techniques for marine ornamental fish: a review. Reviews in Fisheries Science, 18(4): 315-343.

Moriarty, D., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164: 351-358.

Morizane, T., 1991. A review of automation and mechanization used in the production of rotifer in Japan. Rotifer and microalgae culture systems. En: The Oceanic Institute. Proceeding of US-Asia workshop, Honolulu, Hawaii, 79-88 p.

Naidu, A.S., W.R. Bidlack, R.A., Clemens, 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39: 13-126.

Nandini, S. y S.S.S. Sarma, 2001. Population growth of *Lepadella patella* (O.F. Müller, 1786) at different algal (*Chlorella vulgaris*) densities and in association with *Philodina roséola* Ehrenberg, 1832. *Hydrobiologia*, 446/447: 63-69.

Nandini, S. y T.R. Rao, 1998. Somatic and population growth in selected cladoceran and rotifer species offered the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as food. *Aquatic Ecology*, 31: 283-298.

Nicolas, J.L., E. Robic y D. Ansquer, 1989. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of micro-algae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture*, 83: 237-248.

Nikoskelainen, S., S. Salminen, G. Bylund y A. Ouwehand, 2001. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2430-2435.

Nogami, K. y M. Maeda, 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49: 2373-2376.

Nogami, K., K. Hamasaki, M. Maeda, y K. Hirayama, 1997. Biocontrol method in aquaculture for rearing the swimming crab larvae *Portunus trituberculatus*. *Hydrobiologia*, 358: 291-295.

Olsson, J.C., A. Westerdahl, P.L. Conway y S. Kjelleberg, 1992. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*) associated bacteria with

inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. Applied and Environmental Microbiology, 58, 551-556.

Panigrahi, A., V. Kiron, T. Kobayashi, J. Puangkaew, S. Satoh y H. Sugita, 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. Veterinary Immunology and Immunopathology, 102: 379-388.

Peredo-Álvarez, V.M., S.S.S. Sarma y S. Nandini, 2003. Combined effect of concentrations of algal food (*Chlorella vulgaris*) and salt (sodium chloride) on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). Revista de Biología Tropical, 51(2): 399-407.

Phianphak, W., S. Rengpipat, S. Piyatiratitivorakul, P. Menasveta, 1999. Probiotic use of *Lactobacillus* spp. for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. The Journal of Scientific Research, Chulalongkorn University, 24: 42-51.

Piasecki, W., A.E. Goodwin, J.C. Eiras y B.F. Nowak, 2004. Importance of copepoda in freshwater aquaculture. Zoological Studies, 43(2): 193-205.

Planas M., J.A. Vázquez, J. Marqués, R. Pérez-Lomba, M.P. González y M. Murado, 2004. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. Aquaculture, 240: 313-329.

Pybus, V., M.W. Loutit, I.L. Lamont y J.R. Tagg, 1994. Growth inhibition of the salmon pathogen *Vibrio ordalii* by a siderophore produced by *Vibrio anguillarum* strain VL4335. Journal of Fish Disease, 17: 311-324.

Qin, J.G. y A.W. Fast, 1997. Food selection and growth of young snakehead (*Channa striatus*). Journal of Applied Ichthyology, 13, 21-26.

Queiroz, F. y C. Boyd, 1998. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. Journal Of The World Aquaculture Society, 29: 67-73.

Rehberg-Haas, S., S. Meyer, S. Lippemeier, y C. Schulz, 2015. A comparison among different *Pavlova* sp. products for cultivation of *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 435: 424-430.

Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul, P. Menasaveta, 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191: 271-288.

Ringø, E., E. Strøm y J. Tabacheck, 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research*, 26: 773-789.

Riquelme, C., R. Araya y R. Escribano, 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture*, 1(81): 25-36.

Rombaut, G., P. Dhert, J. Vandenberghe, L. Verschuere, P. Sorgeloos, y W.Verstraete, 1999. Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 176: 195-207.

Rottmann, R.W., J.S. Graves, C. Watson y R.P.E. Yanong, 2011. Culture techniques of *Moina* : the ideal daphnia for feeding freshwater fish fry. Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 7 p.

Ruíz-Ponte, C., J.F. Samain, J.L. Sánchez y J.L. Nicolas, 1999. The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Marine Biotechnology*, 1: 52-59.

Sakai, M., T. Yoshida, S. Astuta y M. Kobayashi, 1995. Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) by oral administration of *Clostridium butyricum* bacteria. *Journal of Fish Diseases*, 18: 187-190.

Salvesen, I., J. Skjermo y O. Vadstein, 1999. Growth of turbot *Scophthalmus maximus* L.. during first feeding in relation to the proportion of r/K-strategists in the bacterial community of the rearing water. *Aquaculture*, 175: 337-350.

Sarma, S.S.S. 1993. Feeding responses of *Asplanchna brightwelli* (Rotifera): laboratory and field studies. *Hydrobiologia*, 255/256: 275-282.

Sarma, S.S.S., F. Martínez-Jerónimo, T. Ramírez-Pérez, y S. Nandini, 2006. Effect of cadmium and chromium toxicity on the demography and population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). *Journal of Environmental Science and Health*, 41: 543-558.

Sarma, S.S.S., M. Fernández-Araiza, y S. Nandini, 1999. Effect of methyl parathion-treated prey (*Brachionus calyciflorus*) on the population growth of the predator *Asplanchna sieboldi* (Rotifera). *Aquatic Ecology*, 33: 339-345.

Sarma, S.S.S., P.S. Larios-Jurado y S. Nandini. 2001. Effect of three food types on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Revista de Biología Tropical*, 77-84.

Sarma, S.S.S., R.D. Gulati y S. Nandini, 2005. Factors affecting egg-ratio in planktonic rotifers. *Hydrobiologia*, 546: 361-373.

Scholz, U., G. García-Díaz, D. Ricque, L.E. Cruz-Suarez, F. Vargas-Albores, J. Latchford, 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*, 176: 271-283.

Schrezenmeir J. y M. de Vrese, 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 361S-364S.

Shiri-Harzevili, A.R., H. Van Duffel, P. Dhert, J. Swings y P. Sorgeloos, 1998. Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). *Aquaculture Research*, 29: 411-417.

Skjermo J. y O. Vadstein, 1993. Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 255/256: 185-191.

Slembrouck, J., E. Baras, J. Subagja, L.T. Hung y M. Legendre, 2009. Survival, growth and food conversion of cultured larvae of *Pangasianodon hypophthalmus*, depending on feeding level, prey density and fish density. *Aquaculture*, 294: 52-59.

Snell, T.W., B.E. Burke y S.D. Messur, 1983. Size and distribution of resting eggs in a natural population of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Gulf and Caribbean Research*, 7(3):285-287.

Sorgeloos, P., 1980. The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. En: Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (Eds.), *The Brine Shrimp Artemia Vol. 3, Ecology, Culturing. Use in aquaculture*. Universa Press, Wetteren, Belgium, 25-46 p.

Suantika, G., P. Dhert, M. Nurhudah y P. Sorgeloos, 2000. High-density production of the rotifer *Brachionus plicatilis* in a recirculation system: consideration of water quality, zootechnical and nutritional aspects. *Aquaculture Engineering*, 21: 201-214.

Suminto, K. y K. Hirayama, 1997. Application of a growth-promoting bacterium for stable mass culture of three marine microalgae. *Hydrobiologia*, 358, 223-230.

Tacon, A.G.J., 1990. Standard methods for nutrition farmed fish and shrimp. Argent Laboratories, Inc. U.K., 454 p.

Tanasomwang, V. y K. Muroga, 1989. Intestinal microflora of rockfish *Sebastes schlegeli*, tiger puffer *Takifugu rubripes* and red grouper *Epinephelus akaara* at their larval and juvenile stages. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1371-1377.

Theilacker, G.H. y A.S. Kimball, 1984. Comparative quality of rotifers and copepods as foods for larval fishes. *CalCOFI Reports*, 25: 80-86.

Tinh, N.T.N., N.D. Linh, T.K. Wood, K. Dierckens, P. Sorgeloos y P. Bossier, 2007. Interference with the quorum sensing systems in a *Vibrio harveyi* strain alters the growth rate of gnotobiotically cultured rotifer *Brachionus plicatilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 194-203.



Ushiro, M., S. Yamasaki y I. Hirata, 1980. Examinations of bacteria as food for *Brachionus plicatilis* in culture. Mini Review and Data File of Fishries Research, 1: 96-106.

Vadstein, O., G. Øie, Y. Olsen, I. Salvesen y J. Skjermo, 1993. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. En: Reinertsen, D. y T. Jorgensen, (Eds)..., Fish Farming Technology. Balkema, Rotterdam, p 69-75.

Vandenbergh, P., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiology Review, 12: 221-237.

Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos y W. Verstraete, 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64: 655-671.

Vijverberg, J. y T.H. Frank, 1976. The chemical composition and energy contents of copepods and cladocerans in relation to their size. Freshwater Biology, 6: 333-345.

Villamil, L., A. Figueras, M. Planas, B. Novoa, 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. Aquaculture, 219: 43-45.

Vine, N.G., W.D. Leukes, H. Kaiser, S. Daya, J. Baxter y T. Hecht, 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. Journal of Fish Diseases, 27: 319-325.

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

Williams, S.T. y Vickers, J.C., 1986. The ecology of antibiotic production. Microbial Ecology, 12: 43-52.

Yasuda, K. y N. Taga, 1980. A mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. La Mer (Bulletin de la Societé Franco-Japonaise d'Océanographie), 18: 53-62.

Yoseda, K., S. Dan, T. Sugaya, K. Yokogi, M. Tanaka, y S. Tawada, 2006. Effects of temperature and delayed initial feeding on the growth of Malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*) larvae. *Aquaculture*, 256: 192-200.

Yoshimatsu, T., y M. Hossain, 2014. Recent advances in the high-density rotifer culture in Japan. *Aquaculture International*, 22: 1587-1603.

Yu, J.P., A. Hino, M. Ushiro y M. Maeda, 1989. Function of bacteria as vitamin B12-producers during mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1799-1806.

Yúfera, M., C. Fernandez-Diaz, E. Pascual, M. Sarasquete, F. Moyano, M. Diaz, F. Alarcon, M. Garcia-Gallego, y G. Parra, 2000. Towards an inert diet for first-feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae. *Aquaculture Nutrition*, 6: 143-152.

Yurkowski, M. y J.L. Tabacheck, 1979. Proximate and amino acid composition of some natural fish foods En: Halver, J.E. y K. Tiews (Eds.). *Proceedings of the World Symposium on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, Hamburg 20-23 Junio, 1978. Berlín, Vol. 2, 435-448 p.

Zar, J.H. 1996. *Bioestatistical Analysis*. Prentice Hall PTR, 121 p.

Zink, I.C., P.A. Douillet y D.D. Benetti, 2013. Improvement of rotifer *Brachionus plicatilis* population growth dynamics with inclusion of *Bacillus* spp. probiotics. *Aquaculture Research*, 44: 200-211.

### Capítulo 3: Determinación de la dosis óptima de probióticos en el cultivo de *B. calyciflorus*.

#### Resumen

El presente experimento se llevó a cabo para determinar la dosis óptima de probióticos comerciales NanoCrusta (Altacrusta SAPI) en el cultivo de *Brachionus calyciflorus*. Los probióticos se suministraron en cinco densidades ( $2.12 - 33.92 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>) en conjunto con *Chlorella vulgaris* ( $1 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>). Tres tratamientos con probióticos presentaron su pico de densidad poblacional un día antes que el tratamiento testigo. Los rotíferos de los tratamientos a los que se les alimentó con probióticos en concentraciones de entre 2.12 y 16.96 cél ml<sup>-1</sup>, presentaron densidades máximas y tasas de crecimiento poblacional ( $r$ ), superiores al tratamiento testigo ( $56.22 \pm 1.92$ ,  $r = 0.22$ ). Los tratamientos citados presentaron diferencias significativas con el testigo. La densidad más alta suministrada de probióticos ( $33.92$  cél ml<sup>-1</sup>) no presentó diferencias significativas en la densidad máxima ni en la  $r$  con el tratamiento testigo. El tratamiento con *C. vulgaris*  $1.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> + probióticos  $16.96 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>, presentó una densidad máxima 2.16 veces superior a la densidad máxima del testigo. Las tasas de crecimiento fueron superiores en los tratamientos a los que se les adicionaron probióticos. La densidad de probióticos más alta no tuvo diferencias significativas en la densidad máxima y la  $r$ , por lo que no se tienen efectos negativos al aplicar los probióticos en el cultivo de *B. calyciflorus*.

#### Abstract

The following experiment was conducted to determine the optimum density of commercial probiotics in the cultivation of *Brachionus calyciflorus*. The probiotics were supplied in five densities ( $2.12 - 33.92 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>) with *Chlorella vulgaris* ( $1 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>). Three treatments with probiotics showed their peak population density one day before the control treatment. Treatments with probiotics supplied between 2.12 and 16.96 cel ml<sup>-1</sup> showed higher maximum density and population growth rate ( $r$ ) than the control. These treatments presented significant differences with the control. No significant differences were found in the maximum density and  $r$  between the control and the highest density supplied of probiotics ( $33.92$  cel ml<sup>-1</sup>). When *B. calyciflorus* was fed with *C. vulgaris*  $1.0 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup> + probiotics  $16.96 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>, it showed a maximum density 2.16 times higher than the density of the control. Growth rates were higher in the treatments with probiotics compared to the control. The highest density of

probiotics did not show significant differences in the maximum density neither the population growth rate, so there are no negative effects when applying probiotics in the cultivation of *B. calyciflorus*.

## Introducción

Las especies más cultivadas de rotíferos para su uso en acuicultura de agua dulce son: *Brachionus urceolaris*, *B. angularis*, *B. quadridentatus*, *B. rubens*, *B. calyciflorus*, *Keratella quadrata*, *Ephifanes* sp. y *Pterodina patina*; y de ambientes salobres y marinos: *B. plicatilis*, *Colurella colorus* y *K. cruciformis* (Castellanos-Páez *et al.*, 1999). Las especies del género *Brachionus* han sido las especies más utilizadas como alimento para crías de peces (Lubzens, 1987; Castellanos-Páez, 1999; Hagiwara *et al.*, 2001; Chigbu y Suchar, 2006; Moorhead y Zeng, 2010). La especie eurialina *B. plicatilis* es el rotífero que más se ha utilizado como alimento primerizo, debido a su tamaño (lorica de 130 a 340  $\mu\text{m}$ ) y a su lenta natación (Chotiyaputta y Hirayama, 1978; Lubzens, 1987; Lubzens *et al.*, 1989; Lim *et al.*, 2003; Hu y Xi, 2008).

*B. plicatilis* sobrevive en el agua dulce cerca de 2 horas. Esto hace que se acumulen en el fondo rápidamente lo cual no los hace un alimento conveniente para larvas pelágicas. La utilización de rotíferos de agua dulce como alimento (*e.g.* *B. calyciflorus*), tiene una aplicación potencial en la larvicultura. El cultivo de estos rotíferos permitiría una producción intensiva de larvas de especies de agua dulce (Lim *et al.*, 2003).

*Brachionus calyciflorus* Pallas, 1766, es un rotífero de agua dulce con un potencial alto de reproducción que lo posiciona como alimento vivo ideal para especies dulceacuícolas (Arimoro, 2006; Rufchaie *et al.*, 2012). Es una especie utilizada como alimento vivo en la producción masiva de peces. Las distintas cepas de este rotífero tienen tamaños diferentes, por lo cual puede ser suministrado para crías de varias especies (Sulehria y Malik, 2012). Para el cultivo de *B. calyciflorus* se han utilizado como alimento microalgas (*e.g.* *Chlorella vulgaris*; Gama-Flores *et al.*, 1999), y levadura (*e.g.* *Saccharomyces cerevisiae*; Khatun *et al.*, 2014).

Existe evidencia en la literatura que el género *Brachionus* se puede alimentar de bacterias y utilizar compuestos solubles que excretan las bacterias en el medio (Starkweather *et al.*, 1980; Yasuda y Taga, 1980; Sakamoto y Hirayama, 1983; Yu *et al.*, 1988; Watanabe *et al.*, 1992;

Hagiwara *et al.*, 1994). Desde hace varias décadas se han demostrado los beneficios de la presencia de bacterias en los cultivos de rotíferos (Hirayama, 1987; Planas *et al.*, 2004). Las condiciones de cultivo no axénicas permiten que ciertos microorganismos provean nutrientes esenciales (Hirayama, 1987). Beneficios que se ven reflejados en un mejor crecimiento (Douillet, 2000b). Yu *et al.* (1988), demostró que las bacterias que producen vitamina B<sub>12</sub> tienen un papel fundamental en promover la reproducción asexual de los rotíferos, lo que resulta en un mejor crecimiento poblacional. La comunidad bacteriana influye en factores como la calidad del medio, suplementación de nutrientes y vitaminas, reducción de bacterias potencialmente patógenas, y reducción de la presencia de toxinas bacterianas (Yu *et al.*, 1989; Rombaut *et al.*, 1999; Douillet, 2000a; Dhert *et al.*, 2001; Rombaut *et al.*, 2001; Rombaut *et al.*, 2003; Zink *et al.*, 2013). El incorporar probióticos es parte de un manejo microbiano que ha permitido mejorar el crecimiento poblacional de rotíferos y brinda estabilidad en el cultivo (Skjermo y Vadstein, 1993; Rombaut *et al.*, 1999; Douillet, 2000a; Dhert *et al.*, 2001; Lubzens *et al.*, 2001; Planas *et al.*, 2004; Skjermo *et al.*, 2015). Sin embargo, todas las investigaciones se han realizado con *B. plicatilis*, y no se tienen reportes de su aplicación en el cultivo de especies de rotíferos de agua dulce.

## Revisión bibliográfica

### Género *Brachionus*

El género *Brachionus* está conformado por especies de tamaño de 150 a 500  $\mu\text{m}$ , con cuerpo oval, ligeramente aplanado dorsoventralmente, con una distintiva lorica. La lorica en muchas especies tiene 6 espinas, en otras solo 4 o 2, en el margen dorsal anterior, y un margen ventral anterior de forma característica en muchas especies, algunas especies tienen espinas que varían en tamaño y forma en las esquinas posteriores del cuerpo y en la apertura del pié. El pié tiene mucha motilidad y puede ser tan largo como el cuerpo, anular y completamente retráctil. La corona tiene cinco distintos lóbulos y entre ellos tiene largas cerdas sensoriales, una antena dorsal entre las espinas medias frontales y un ojo cerebral (Ruttner-Kolisko, 1974; Pourriot, 1980).

El mástax es largo con un *trophi* malleado, *uncus* con cinco dientes, un esófago con una pared delgada, estómago celular, claramente separado del intestino, con dos largas glándulas gástricas que varían en tamaño y termina en el ano. El órgano excretor tiene cuatro células terminales a cada lado del cuerpo, tienen una vejiga larga. El vitelario siempre tiene 8 núcleos (Ruttner-Kolisko, 1974).

Los miembros del género *Brachionus* tienen dietas similares, alimentándose de bacterias y algas no coloniales ni filamentosas. Así, la competencia entre especies del género *Brachionus* depende de los factores ambientales. En ambientes naturales, los factores que más influyen en la sobrevivencia y reproducción son la concentración de alimento y la temperatura (Wallace *et al.*, 2006).

Las hembras del género *Brachionus*, invariablemente cargan los huevos partenogenéticos en la apertura del pié, cada huevo está agarrado individualmente al cuerpo. Normalmente cargan en forma simultánea 1 o 2, si son huevos que darán origen a hembras partenogenéticas, y en gran cantidad si son huevos de machos. Los quistes son lisos y levemente espinosos, la concha de los quistes está cubierta por una fina membrana. Los machos están presentes en muchas de las especies, existen pequeñas diferencias en ellos: el campo apical tiene cilios, ojos y antenas diferentes, pié con dos pequeños dedos y un pene (Ruttner-Kolisko, 1974).

El género *Brachionus* es termófilo y habita principalmente aguas someras y charcas. Solamente pocas especies son verdaderamente pelágicas, la mayoría vive en el litoral y ocasionalmente colonizan los sustratos. Casi todas las especies tienen una transición entre las capas béntica y pelágica durante la vida. Todas las especies se alimentan de algas y algunas de bacterias. Los miembros de este género son fácilmente cultivables y consecuentemente se conoce más de su vida, propagación y reproducción que de muchos otros géneros de rotíferos (Ruttner-Kolisko, 1974).

La taxonomía de este género está basada exclusivamente en las características de la lórica, en particular en las espinas del margen dorsal y ventral anterior, en la forma y las espinas de la abertura del pié, la presencia de espinas caudales, y en la forma, estructura y facetas de la lórica. Todas estas características varían independientemente en cada especie, resultan en un vasto número de formas. Es posible distinguir muchos grupos de formas y tendencias de variación. Cada grupo contiene formas polimórficas, que varían considerablemente de acuerdo a las estaciones climáticas y el hábitat (Ruttner-Kolisko, 1974).

El género *Brachionus* ha sido el tema principal de diversas investigaciones, existen reportadas más de 1,000 publicaciones desde 1950, aunque la mayoría se enfocan en tres especies, *Brachionus plicatilis*, *B. rotundiformis* y *B. calyciflorus*, y en estudios relacionados con su uso como alimento para organismos acuáticos. Esto se debe, a la aplicación comercial de estas especies y el número relativamente alto de investigadores que trabajan en la tecnología acuática. Los avances en el conocimiento de su biología fundamental, se han aplicado para mejorar la producción de rotíferos. El principal objetivo de los estudios que se han realizado sobre el género *Brachionus* es el de examinar las mejores condiciones para el crecimiento de la población (Yúfera, 2001).

### ***Brachionus calyciflorus***

*Brachionus calyciflorus* Pallas, 1766, es un rotífero de agua dulce con un potencial alto de reproducción que lo posiciona como alimento vivo ideal para especies dulceacuícolas (Arimoro, 2006; Rufchaie *et al.*, 2012). Es una especie utilizada como alimento vivo en la producción masiva de peces. Las diferentes cepas de este rotífero tienen tamaños diversos, por lo cual puede ser suministrado para crías de diferentes especies (Sulehria y Malik, 2012). Para el cultivo de *B.*

*calyciflorus* se han utilizado como alimento microalgas (e.g. *Chlorella vulgaris*; Gama-Flores *et al.*, 1999), y levadura (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*; Khatun *et al.*, 2014).

La microalga que más se ha utilizado como alimento de *B. calyciflorus* es *Chlorella vulgaris*. En la Tabla 19 se enlistan las densidades de *C. vulgaris* (expresadas en células por mililitro), para el cultivo de *B. calyciflorus*, además de las condiciones de cultivo y las densidades máximas alcanzadas que han sido reportadas en la literatura.

Como se muestra en la Tabla 19, la menor cantidad de *C. vulgaris* proporcionada es de  $0.3 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> (Sarma *et al.* 1999). La cantidad de alimento más utilizada es  $1.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> reportada por diferentes autores (Sarma *et al.* 1999; Gama-Flores *et al.*, 2007). La densidad máxima alcanzada en los cultivos depende de factores como la cantidad de alimento, la temperatura y el volumen del cultivo. En condiciones similares de cultivo se puede observar que el suministrar una cantidad baja de alimento ( $1.5 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>) contra una cantidad relativamente alta ( $4.5 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>) permite obtener un mayor número de organismos por unidad de volumen (Peredo-Álvarez *et al.*, 2003; Fernández-Araiza *et al.*, 2005). La diferencia que se observa en el crecimiento poblacional al suministrar la misma cantidad de alimento, puede deberse a que son diferentes cepas (Hagiwara *et al.*, 2007). La densidad máxima alcanzada en los cultivos y el día en que se presenta son muy variables. La máxima densidad alcanzada ( $480 \text{ ind} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), reportada por Lucía-Pavón *et al.* (2001), corresponde al suministro de *C. vulgaris* fresca, sin ningún proceso de refrigeración. El pico máximo de crecimiento se presenta entre los días 5 y 10 de cultivo.

La mayoría de la información referida en la Tabla 19 corresponde a cultivos a pequeña escala cuyo objetivo es evaluar el efecto de la concentración del alimento (Gama-Flores *et al.*, 1999), la temperatura (Fernández-Araiza *et al.*, 2005), competencia (Gama-Flores *et al.*, 2006), depredación (Sarma *et al.*, 2010) y en trabajos de ecotoxicología (Ramírez-Pérez *et al.*, 2004; Gama-Flores *et al.*, 2007).



**Tabla 19. Cantidad de *C. vulgaris* suministrada como alimento en el cultivo de *B. calyciflorus*.**

Volumen del cultivo (ml)	Cantidad de alimento (x 10 <sup>6</sup> cél ml <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	pH	Densidad máxima (ind·ml <sup>-1</sup> )	Día máximo de crecimiento	Referencia
25	1.0	23	7.1 - 7.6	47	14	Alva-Martínez <i>et al.</i> , 2007
20	1.0	23	7.0 - 7.5	80	10	Alva-Martínez <i>et al.</i> , 2009
n.e.	3.0	25	n.e.	n.e.	n.e.	Araujo-McNair, 2007
20	2.0	25	7.0	77	8	Arévalo-Stevenson <i>et al.</i> , 1998
20	1.5	22	n.e.	36	16	
20	3.0	22	n.e.	72	14	
20	4.5	22	n.e.	110	16	
20	1.5	28	n.e.	40	12	Fernández-Araiza <i>et al.</i> , 2005
20	3.0	28	n.e.	72	28	
20	4.5	28	n.e.	94	10	
20	1.0	24	7.0 - 7.5	n.e.	n.e.	Flores-Brugos <i>et al.</i> , 2005
20	0.8	27	n.e.	n.e.	n.e.	
20	1.5	27	n.e.	n.e.	n.e.	
20	3.0	27	n.e.	40	6	Gama-Flores <i>et al.</i> , 1999
20	6.0	27	n.e.	89	9	
50	1.0	23	7.0 - 7.5	125	12	Gama-Flores <i>et al.</i> , 2007
1,000	1.6	24.5 - 30	7	73	8	Khatun <i>et al.</i> , 2014
n.e.	2.0	25	8.0	n.e.	n.e.	Kumar y Rao, 2001
50	0.5	22	7.2 - 7.5	480	9	
50	1.5	22	7.2 - 7.5	160	8	Lucía-Pavón <i>et al.</i> 2001
50	4.5	22	7.2 - 7.5	50	7	
50	0.5	25	7.2 - 7.5	23	4	
50	1.5	25	7.2 - 7.5	40	6	Peredo-Álvarez <i>et al.</i> 2003
50	4.5	25	7.2 - 7.5	75	6	
20	0.5	25	7.5	n.e.	n.e.	
20	1.5	25	7.5	n.e.	n.e.	Ramírez-Pérez <i>et al.</i> 2004
100	1.0	n.e.	n.e.	30	5	
100	3.0	n.e.	n.e.	80	6	Sarma <i>et al.</i> 1999
20	0.3	25	n.e.	n.e.	n.e.	Sarma <i>et al.</i> 1999
50	1.0	25	7.5	n.e.	n.e.	
50	3.0	25	7.5	n.e.	n.e.	Sarma, 2000
20	1.0	23	n.e.	77	4	
20	3.0	23	n.e.	105	5	Sarma <i>et al.</i> 2001
20	1.0	24	7.0 - 7.5	100	10	Sarma <i>et al.</i> 2006
20	1.0	23	n.e.	86	14	Sarma <i>et al.</i> 2010
n.e.	2.0	25	7.5	n.e.	n.e.	Sugumar y Munuswamy, 2006

## Objetivo

Determinar la dosis óptima de probióticos NanoCrusta en el cultivo de *Brachionus calyciflorus*.

## Material y Métodos

### Diseño experimental

Para determinar la dosis óptima de los probióticos empleados en el cultivo, se efectuaron cinco tratamientos con probióticos y un testigo, como se observa en la Tabla 20. Los cultivos se realizaron por triplicado en tubos de polipropileno de 30 ml con un volumen de 30 ml de medio EPA. La densidad inicial de *B. calyciflorus* fue de 10 ind ml<sup>-1</sup>. La temperatura fue de 25 ± 1°C, con un fotoperiodo de 12:12 (L:O). Diariamente se cambió el medio con la densidad de alimento y de probióticos correspondientes a cada tratamiento y testigo.

**Tabla 20. Tratamientos experimentales para determinar la ración óptima de probióticos en el cultivo de *B. calyciflorus***

Clave	Tratamiento	Volumen (ml)	Densidad inicial de <i>B. calyciflorus</i> (ind ml <sup>-1</sup> )	# de réplicas	Densidad de <i>C. vulgaris</i> (x10 <sup>6</sup> cél ml <sup>-1</sup> )	Densidad de probióticos (x10 <sup>6</sup> cél ml <sup>-1</sup> )
P1	Testigo <i>C. vulgaris</i>	30	10	3	1.0	0
P11	Probiótico 1	30	10	3	1.0	2.12
P12	Probiótico 2	30	10	3	1.0	4.24
P13	Probiótico 3	30	10	3	1.0	8.48
P14	Probiótico 4	30	10	3	1.0	16.96
P15	Probiótico 5	30	10	3	1.0	33.92

### Conteo de rotíferos

Cada día se contaron alícuotas de 1 ml de cada réplica por triplicado. La muestra se colocó en portaobjetos excavados y se registró el número de individuos y huevos por mililitro. Los conteos de cada tratamiento y sus réplicas se emplearon para elaborar las curvas de crecimiento poblacional.

## Tasa de crecimiento poblacional

A partir de los datos registrados se calculó la tasa de crecimiento poblacional con la siguiente ecuación (Nandini y Rao, 1998):

$$r = \frac{(\ln N_t - \ln N_0)}{t}$$

Donde:

$N_0$  = densidad inicial

$N_t$  = densidad final

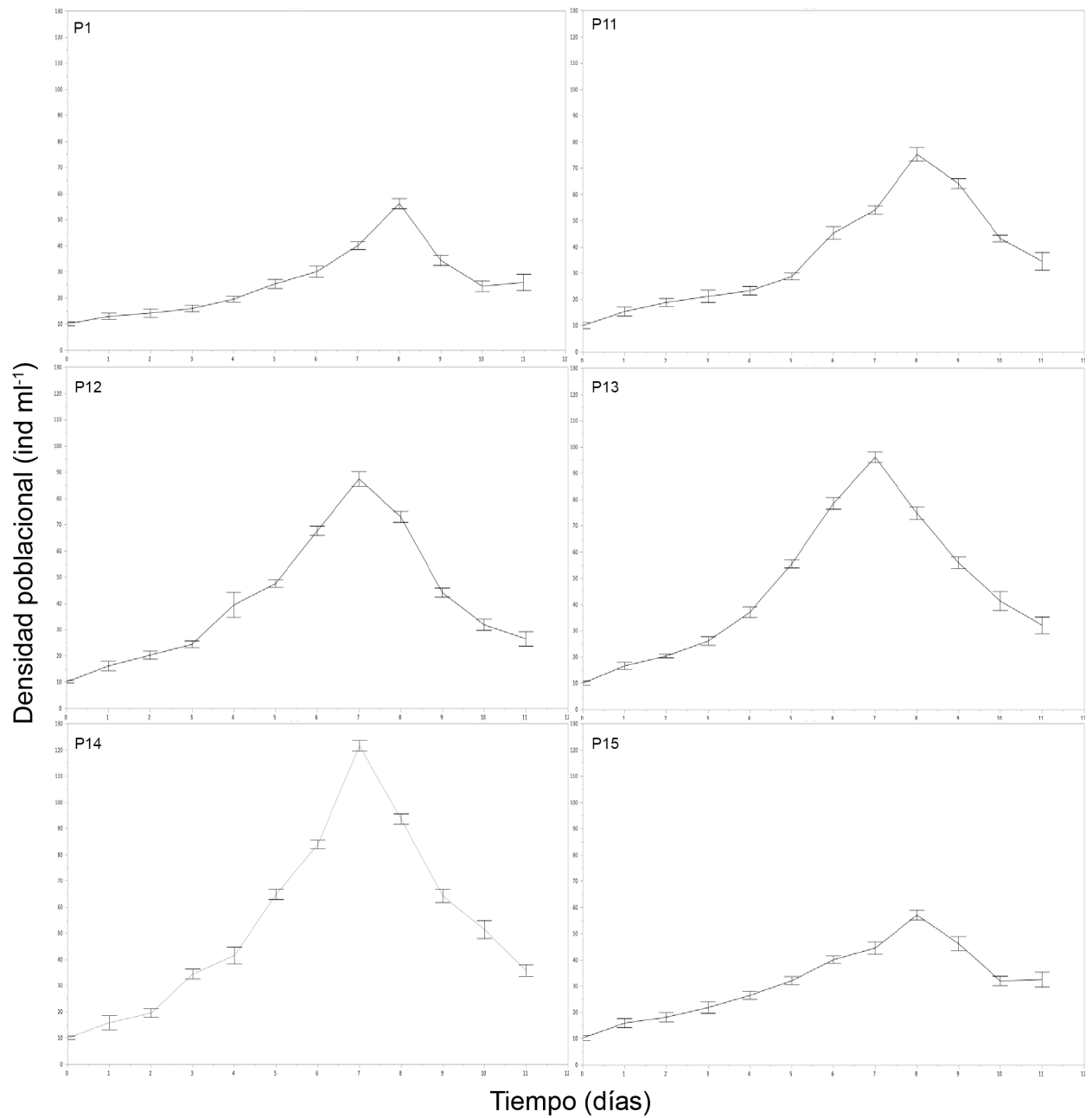
$t$  = tiempo en días

## Análisis de datos

Se utilizó estadística descriptiva para la presentación de los datos. Posteriormente, se aplicaron pruebas de significancia estadística (Zar, 1996). Para determinar la normalidad de los datos de la densidad máxima y la tasa de crecimiento poblacional se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov. Una vez comprobada la normalidad de los datos se empleó estadística paramétrica para su análisis. Para determinar si existen diferencias significativas en la densidad máxima y la tasa de crecimiento poblacional de los tratamientos con probióticos se hizo un análisis de varianza (ANOVA  $p < 0.05$ ). Se realizó una prueba de Tukey para determinar entre cuáles tratamientos se presentaron las diferencias.

## Resultados

Las curvas de crecimiento de *B. calyciflorus* con los tratamientos de probióticos y tratamiento testigo se muestran en la Figura 13. El resumen del crecimiento poblacional, densidad máxima y tasa de crecimiento de los tratamientos experimentales se muestra en la Tabla 21.

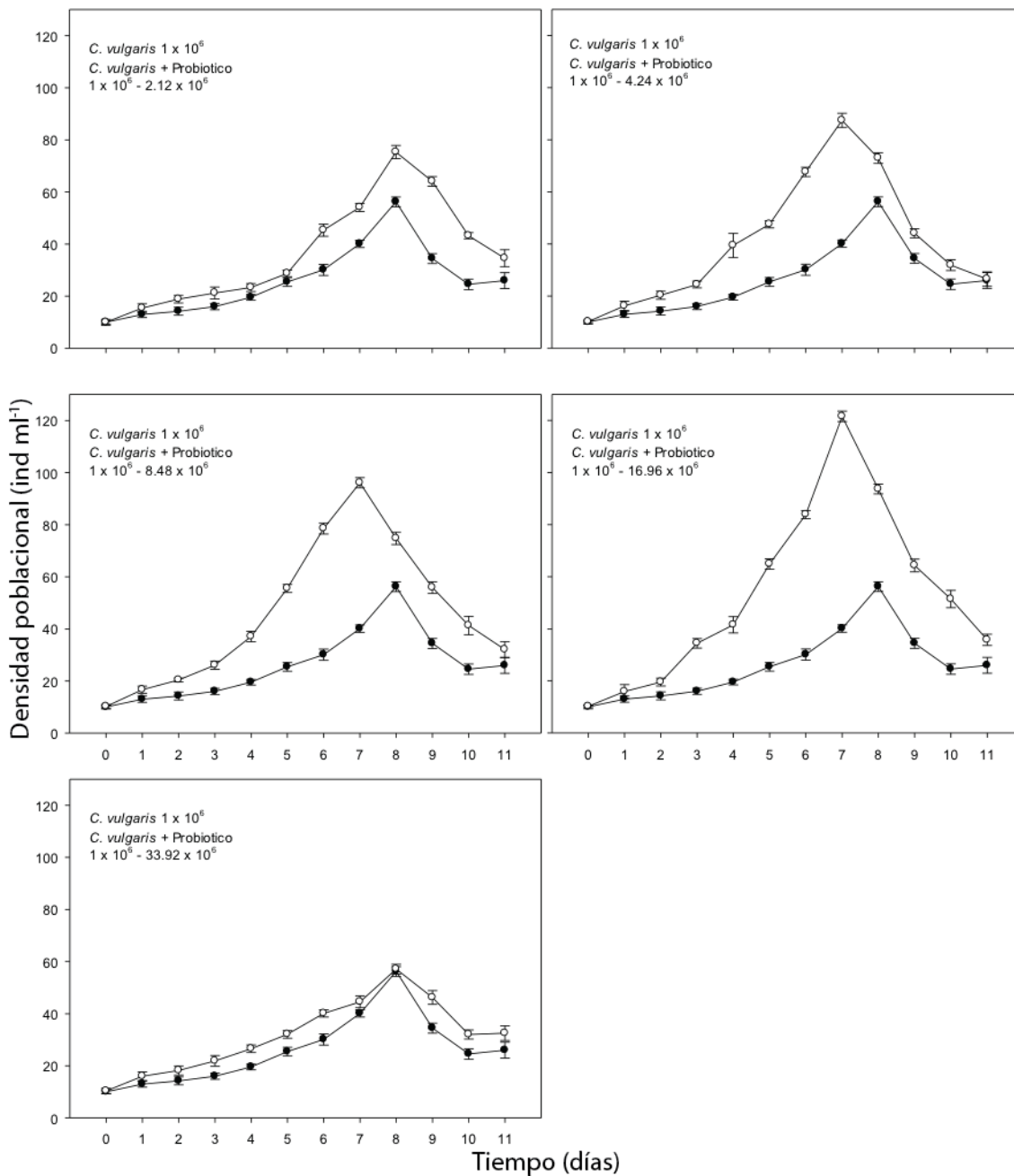


**Figura 13. Curvas de crecimiento poblacional de los tratamientos experimentales con probióticos. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar, basado en las tres réplicas.**

**Tabla 21. Resumen del crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* alimentado con diferentes densidades de probióticos.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Densidad de probióticos (x 10<sup>6</sup> cel ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Densidad máxima (ind ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Día de máxima densidad</b>	<b>Tasa de crecimiento poblacional <i>r</i></b>
P1	0	56.22 ± 1.92	8	0.22
P11	2.12	75.33 ± 2.60	8	0.25
P12	4.24	87.44 ± 2.79	7	0.31
P13	8.48	96.11 ± 2.03	7	0.32
P14	16.96	121.56 ± 2.07	7	0.36
P15	33.92	57.11 ± 1.90	8	0.22

A excepción del tratamiento con mayor densidad de probióticos (P15), el aumento en la densidad de probióticos resultó en un incremento en la densidad máxima, día de máxima densidad y la tasa de crecimiento poblacional. En la Figura 14 se muestra el crecimiento poblacional obtenido en los tratamientos con probióticos (P11, P12, P13, P14 y P15) comparados con el tratamiento testigo (P1).

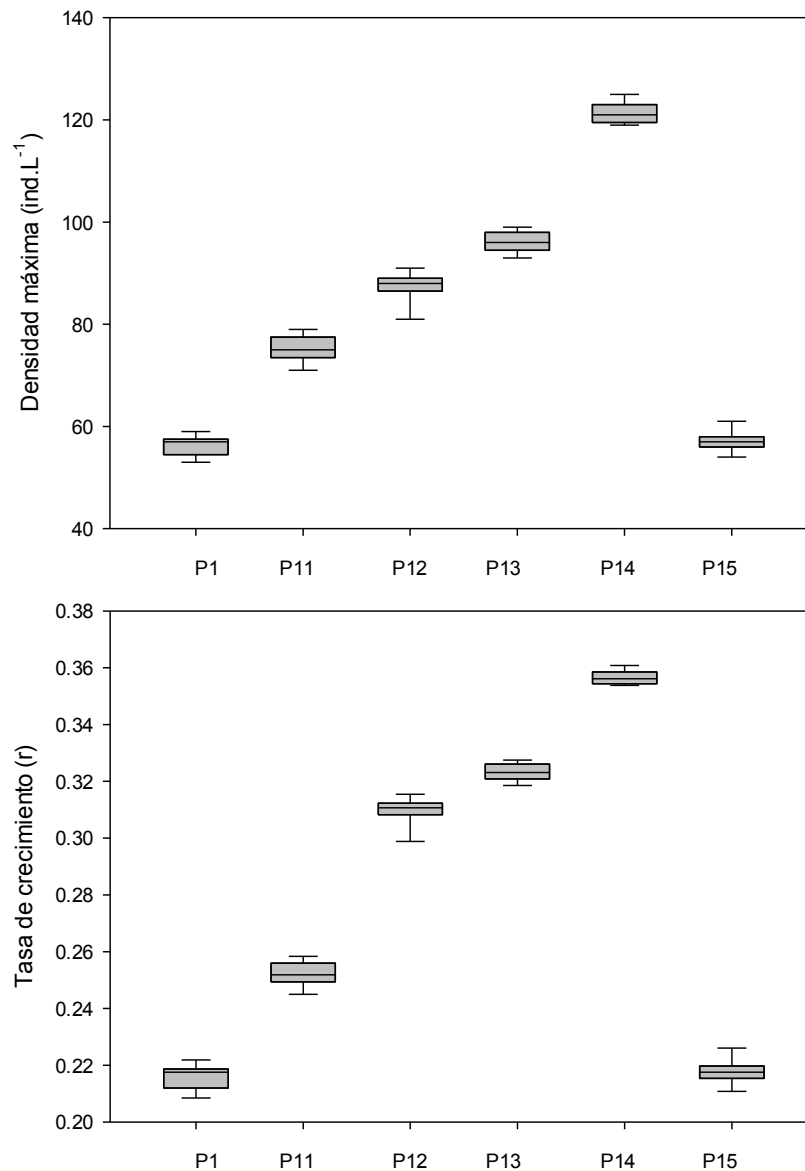


**Figura 14. Curvas de crecimiento poblacional de *Brachionus calyciflorus* (ind ml<sup>-1</sup>).**

**Cada tratamiento es comparado con el testigo *C. vulgaris*. Los puntos negros representan el tratamiento testigo y los puntos blancos representan los tratamientos con probióticos.**

Las densidades máximas y tasas de crecimiento poblacional de los tratamientos se muestran en la Figura 15. La densidad máxima se presentó en el tratamiento P14 ( $121.56 \pm 2.07$  ind ml<sup>-1</sup>) que fue alimentado con *C. vulgaris* 1.0 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup> + probióticos de 16.96 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup>, mientras

que la menor se presentó en el tratamiento P1 (testigo) con  $56.22 \pm 1.92$  ind  $\text{ml}^{-1}$  y el tratamiento P15 con  $57.11 \pm 1.90$  ind  $\text{ml}^{-1}$  (*C. vulgaris*  $1.0 \times 10^6$  cél  $\text{ml}^{-1}$  + probióticos  $33.92 \times 10^6$  cél  $\text{ml}^{-1}$ ).



**Figura 15. Densidad máxima poblacional (ind  $\text{ml}^{-1}$ ) y tasa de crecimiento ( $r$ ) de los tratamientos con probióticos y el testigo.**

La densidad máxima poblacional tuvo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos. La mayor variabilidad se presentó entre todos los tratamientos (Tabla 22).

**Tabla 22. Análisis de varianza de la máxima densidad poblacional de los tratamientos experimentales.**

Source Term	DF	Sum of squares	Mean squares	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Tratamientos	5	28091.48	5618.29	1115.40	0.000000*	1.0
S(A)	48	241.77	5.03			
Total (Adjusted)	53	28333.25				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0.05

En la Tabla 23 se enlistan las diferencias entre los tratamientos. Entre el tratamiento P1 y el tratamiento con la mayor densidad de probióticos no se presentaron diferencias significativas (P15). Los demás tratamientos presentaron diferencias significativas con el tratamiento testigo.

**Tabla 23. Relación de diferencias de densidad máxima entre tratamientos.**

Tratamiento	Diferente al tratamiento
<b>P1</b>	P11, P12, P13, P14
<b>P15</b>	P11, P12, P13, P14
P11	P1, P15, P12, P13, P14
P12	P1, P15, P11, P13, P14
P13	P1, P15, P11, P12, P14
P14	P1, P15, P11, P12, P13

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=48 MSE=5.037037 Critical Value=4.1972

La máxima tasa de crecimiento ( $r$ ) se presentó en el tratamiento P14 con 0.36, mientras que la menor  $r$  fue el testigo P1 con 0.20 (Figura 15). La  $r$  tuvo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre los tratamientos (Tabla 24). La mayor variabilidad se debió a los tratamientos más que dentro de cada tratamiento. Como se observa en la Tabla 25, el tratamiento P1 y P15 fueron diferentes significativamente de los tratamientos con probióticos (P11, P12, P13 y P14).



**Tabla 24. Análisis de varianza de *r* de los tratamientos experimentales**

Source Term	DF	Sum of squares	Mean squares	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
<b>A: tratamiento</b>	<b>4</b>	<b>0.0695</b>	0.0174	1845.34	0.000000*	1
S(A)	40	0.000376	0.00000941			
Total (Adjusted)	44	0.0698				
Total	45					

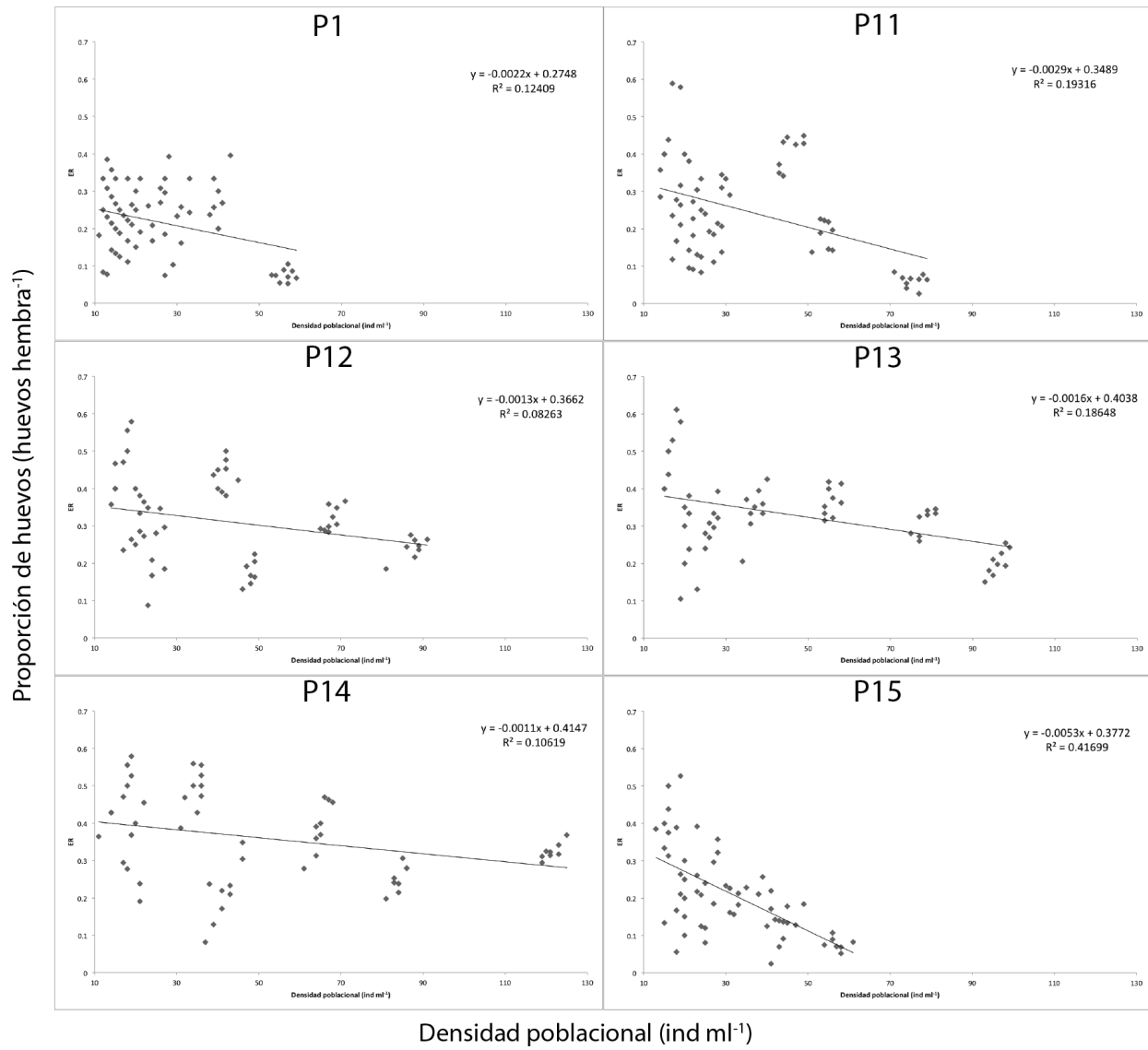
\* Term significant at alpha = 0.05

**Tabla 25. Relación de diferencias de *r* entre tratamientos.**

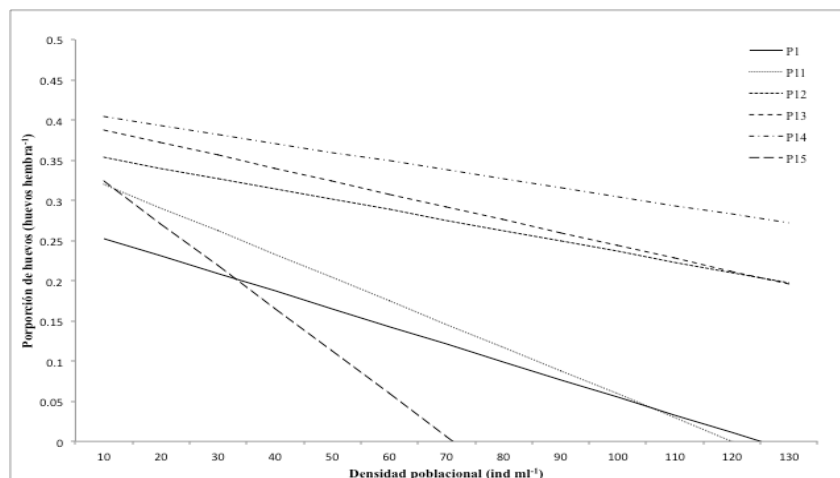
Tratamiento	Diferente al tratamiento
P1	P11, P12, P13, P14
P15	P11, P12, P13, P14
P11	P1, P15, P12, P13, P14
P12	P1, P15, P11, P13, P14
P13	P1, P15, P11, P12, P14
P14	P1, P15, P11, P12, P13

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=48 MSE=1.515366E-05 Critical Value=4.1972

La proporción de huevos fue diferente en función de los tratamientos experimentales. La relación de la proporción de huevos con la densidad poblacional se muestra en la Figura 16. Como se puede observar en todos los tratamientos se presentó una relación inversa entre la densidad poblacional y la proporción de huevos. La comparación de los modelos expresados por la relación entre ambos factores para todos los tratamientos se muestra en la Figura 17.



**Figura 16. Relación de la proporción de huevos con la densidad poblacional de *B. calyciflorus* con diferentes tratamientos de probióticos.**



**Figura 17. Modelos graficados de la relación entre la proporción de huevos y la densidad poblacional**

## Discusión

La densidad de *Chlorella vulgaris* empleada para la experimentación fue de  $1.0 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>, que representa una densidad baja de alimento (ver Capítulo 1), por lo que el efecto de los probióticos pudo reflejarse en mayor medida. Se ha demostrado que los efectos de probióticos al suministrar un régimen alimenticio óptimo para los rotíferos son menores que cuando se someten a un régimen subóptimo (Harzevili *et al.*, 1998), y que una combinación de bacterias permite incrementar la tasa de crecimiento (Gatesoupe, 1991; Douillet, 2000b). Pérez-Lomba (2001), reporta que la densidad de bacterias es relativamente estable durante los primeros 2 a 4 días, dependiendo de las especies. Después de esto, las bacterias se incrementan de manera exponencial. En el presente estudio se realizaron recambios de medio diario por lo que la cantidad de probióticos fue la misma cuando se suministró el alimento. Es posible que la adición periódica de bacterias tenga mejores resultados que una sola aplicación (Planas *et al.*, 2004).

En los tratamientos que se suministraron probióticos de entre 2.12 y 16.96 cél ml<sup>-1</sup>, presentaron densidades máximas y tasas de crecimiento superiores al tratamiento testigo (Figura 16). Los tratamientos citados presentaron diferencias significativas con el testigo. Los tratamientos P12, P13 y P14 alcanzaron la densidad máxima en el día 7 de cultivo, a diferencia de los tratamientos P1, P11 y P15 (día 8).

Sólo la densidad más alta de probióticos (P15, 33.92 cél ml<sup>-1</sup>), presentó una densidad máxima y tasa de crecimiento similar al tratamiento testigo. El tratamiento P15 no presentó diferencias significativas con el testigo. El tratamiento con *C. vulgaris* 1.0 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup> + probióticos 16.96 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup> (P14), presentó una densidad máxima 2.16 veces más que la densidad máxima del testigo.

Las tasas de crecimiento fueron superiores en los tratamientos a los que se les adicionaron probióticos con respecto al testigo. El tratamiento P15 presentó la misma *r* que el tratamiento testigo. Estos resultados son comparables con lo descrito por Rombaut *et al.* (1999), Douillet (2000a; 2000b) y Zink *et al.* (2013), quienes reportan que las tasas de crecimiento son mayores al suministrar probióticos a los cultivos de *B. plicatilis*.

En los tratamientos P11, P12, P13 y P14 se presentó una *r* de entre 1.13 y 1.63 veces mayor al testigo. Este incremento en la *r* es menor al reportado por Douillet (2000a), quien obtuvo un incremento de hasta 5.9 veces. Douillet (2000a; 2000b), demostró que los cultivos adicionados con complejos bacterianos tienen más variabilidad entre réplicas que los cultivos adicionados con cepas puras de bacterias. En la presente investigación se empleó un complejo bacteriano, sin embargo, no se observó variación entre las réplicas de los tratamientos.

Se han obtenido mejores resultados al implementar un complejo de bacterias de uso general que al usar complejos específicos con bacterias nitrificantes (*e.g.* *Nitrosomonas* sp. y *Nitrobacter* sp.), cuyos cultivos no presentan diferencias significativas en la *r* comparada con un tratamiento testigo (Douillet, 2000a).

El incremento en el crecimiento poblacional y la tasa de crecimiento poblacional de los rotíferos en presencia de las bacterias se puede deber a diferentes razones. Existe evidencia en la literatura que el género *Brachionus* se puede alimentar de bacterias y utilizar compuestos solubles que excretan las bacterias en el medio (Starkweather *et al.*, 1980; Yasuda y Taga, 1980; Sakamoto y Hirayama, 1983; Yu *et al.*, 1988; Watanabe *et al.*, 1992; Hagiwara *et al.*, 1994). Desde hace varias décadas se han demostrado los beneficios de la presencia de bacterias en los cultivos de rotíferos (Hirayama, 1987; Planas *et al.*, 2004). Las condiciones de cultivo no axénicas permiten que ciertos microorganismos provean de nutrientes esenciales (Hirayama, 1987). Beneficios que se ven reflejados en un mejor crecimiento (Douillet, 2000b). Yu *et al.* (1988), demostró que las

las bacterias que producen vitamina B<sub>12</sub> tienen un papel fundamental en promover la reproducción asexual de los rotíferos, lo cual resulta en un mejor crecimiento poblacional. La comunidad bacteriana influye en factores como la calidad del medio, suplementación de nutrientes y vitaminas, reducción de bacterias potencialmente patógenas, y reducción de la presencia de toxinas bacterianas (Yu et al., 1989; Rombaut *et al.*, 1999; Douillet, 2000a; Dhert *et al.*, 2001; Rombaut *et al.*, 2001; Rombaut *et al.*, 2003; Zink *et al.*, 2013). El incorporar probióticos es parte de un manejo microbiano que ha permitido mejorar el crecimiento poblacional de rotíferos y brinda estabilidad en el cultivo (Skjeremo y Vadstein, 1993; Rombaut *et al.*, 1999; Douillet, 2000a; Dhert *et al.*, 2001; Lubzens *et al.*, 2001; Planas *et al.*, 2004; Skjeremo *et al.*, 2015).

Al graficar los valores de proporción de huevos contra la densidad poblacional resultó en una relación inversa (Figura 17). Edmonson (1965), empleó la información del número de huevos para predecir las oscilaciones en la población en ambiente natural. Él mostró que cuando la población es abundante, la proporción de huevos decrece. Este patrón se pudo observar en los resultados obtenidos. Cabe mencionar que los valores de proporción de huevos en los tratamientos con probióticos fueron mayores a los valores del tratamiento testigo, con excepción del tratamiento P15. El tratamiento con mayor proporción de huevos fue el P14 (*C. vulgaris* 1.0 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup> + probióticos 16.96 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup>). El aumento en la proporción de huevos concuerda con lo reportado por Rombaut *et al.* (1999) y Zink *et al.* (2013). Hagiwara *et al.* (1994), quienes demostraron que la adición de ciertas cepas de bacterias al cultivo de rotíferos tiene un efecto positivo en la reproducción.

El tratamiento P15 correspondiente a la mayor densidad de probióticos suministrada, tuvo una densidad máxima en el día 8 de 57.11 ± 1.90 ind ml<sup>-1</sup>, comparado con 56.22 ± 1.92 ind ml<sup>-1</sup> del tratamiento testigo, en el mismo día. Por otro lado, presentó una *r* de 0.22, mismo valor que presentó el tratamiento testigo. Esto indica que, a pesar de ser una densidad alta de probióticos, no se tiene efecto negativo en la densidad máxima, por lo que es seguro emplear los probióticos NanoCrusta para el cultivo de *B. calyciflorus*.

Al tomar en cuenta los resultados obtenidos en el Capítulo 1 con diferentes densidades de *C. vulgaris*, el tratamiento P14 (*C. vulgaris* 1.0 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup> + probióticos 16.96 x 10<sup>6</sup> cél ml<sup>-1</sup>),

presentó una densidad máxima y  $r$  similar al suministrar  $6.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> de *C. vulgaris*. Es decir, al emplear los probióticos se sustituyeron  $5.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> de *C. vulgaris* obteniendo los mismos efectos en la dinámica poblacional de *B. calyciflorus*.

Con el rango de densidades de probióticos empleadas en el experimento del Capítulo 2 y el presente se tiene la densidad más baja de probióticos (P8) y la densidad más alta (P14) que incrementan la densidad máxima y la tasa de crecimiento del cultivo de *B. calyciflorus*. El rango corresponde de 0.0021 a  $16.96 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> de probióticos.

## Conclusiones

Los probióticos empleados en el cultivo de rotíferos tuvieron un efecto positivo en la dinámica poblacional de los rotíferos, lo cual sugiere un beneficio en términos productivos.

Con el rango de densidades de probióticos empleadas en el experimento del Capítulo 2 y el presente se tiene la densidad más baja de probióticos (tratamiento P8) y la densidad más alta (P14) que incrementan la densidad máxima y la tasa de crecimiento del cultivo de *B. calyciflorus*. El rango corresponde de 0.0021 a  $16.96 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> de probióticos. No se tuvo un efecto claro al suministrarse la densidad más alta de probióticos, ya que no se presentaron diferencias significativas con el tratamiento testigo. Es decir, a pesar de suministrar una dosis alta de probióticos no se tienen evidencias de un efecto negativo en la dinámica poblacional de *B. calyciflorus*.

El tratamiento P14 (*C. vulgaris*  $1.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> + probióticos  $16.96 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>), presentó una densidad máxima y *r* similar al suministrar  $6.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> de *C. vulgaris* (tratamiento D4; Capítulo 1). Es decir, al emplear los probióticos se sustituyeron  $5.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> de *C. vulgaris* obteniendo los mismos efectos en la dinámica poblacional de *B. calyciflorus*.

## Literatura citada

Alva-Martínez, A.F., R. Fernández, S.S.S. Sarma y S. Nandini, 2009. Effect of mixed toxic diets (*Microcystis* and *Chlorella*) on the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* cultured alone and together. *Limnologica*, 39: 302-305.

Alva-Martínez, A.F., S.S.S. Sarma y S. Nandini, 2007. Population dynamics of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* (Rotifera) on mixed diets with *Microcystis aeruginosa* and green algae. *Hidrobiológica*, 17(1): 59-67.

Araujo, A. y J. McNair. 2007. Individual- and population-level effects of antibiotics on the rotifers, *Brachionus calyciflorus* and *B. plicatilis*. *Hydrobiologia*, 593: 185-199.

Arévalo-Stevenson, R.A., S.S.S. Sarma y S. Nandini, 1998. Population dynamics of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera: Brachionidae) in waste water from food-processing industry in Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 46(3): 595-600.

Arimoro, F.O., 2006. Culture of the freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus*, and its application in fish larviculture technology. *African Journal of Biotechnology*, 5 (7): 536-541.

Castellanos-Páez, M.E., G. Garza-Mouriño y S. Marañón-Herrera, 1999. Aislamiento, caracterización, biología y cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* (O. F. Müller). Libros de

Chigbu, P., y V.S. Suchar, 2006. Isolation of the marine rotifer, *Colurella dicentra* (Gosse, 1887), from Mississippi Gulf Coast estuary. *Aquaculture Research*, 37: 1400-1405.

Chotiyaputta, C. y K. Hirayama, 1978. Food selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* feeding on phytoplankton. *Marine Biology*, 45: 105-111.

Dhert, P., G. Rombaut, G. Suantika y P. Sorgeloos. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, 200: 129-146.

Douillet P.A., 2000a. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic conditions 1. Evaluation of commercial products and pure isolates. *Aquaculture*, 182: 249-260.



Douillet P.A., 2000b. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic conditions 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. *Aquaculture*, 182: 241-248.

Edmonson, W.T. 1965. Reproductive rate of planktonic rotifers as related to food and temperature. *Ecological Monographs*, 35: 65-111.

Fernández-Araiza, M., S. Sarma, y S. Nandini, 2005. Combined effects of food concentration and temperature on competition among four species of *Brachionus* (Rotifera). *Developments in Hydrobiology*, 519-534.

Flores-Burgos, J., S.S.S. Sarma, y S. Nandini, 2005. Effect of single species or mixed algal (*Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*) diets on the life table demography of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 33(6): 614-621.

Gama-Flores, J., M. Castellanos-Páez, S.S.S. Sarma, y S. Nandini, 2007. Effect of pulsed exposure to heavy metals (copper and cadmium) on some population variables of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera: Brachionidae: Monogononta). *Hydrobiologia*, 593: 201-208.

Gama-Flores, J., S. Sarma, y M. Fernández-Araiza, 1999. Combined Effects of *Chlorella* Density and Methyl Parathion Concentration on the Population Growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 769-775.

Gama-Flores, J., S.S.S. Sarma, y S. Nandini. 2006. Effect of cadmium level and exposure time on the competition between zooplankton species *Moina macrocopa* (Cladocera) and *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Journal of Environmental Science and Health*, 41: 1057-1070.

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.

Hagiwara, A., K. Hamada, S. Hori, y K. Hirayama, 1994. Increased sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* Rotifera, with the addition of bacteria and rotifer extracts. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 181: 1-8.

Hagiwara, A., K. Suga, A. Akazawa, T. Kotani y Y. Sakakura, 2007. Development of rotifer strains with useful traits for rearing fish larvae. *Aquaculture*, 268 (1): 44-52.

Hagiwara, A., W.G. Gallardo, M. Assavaaree, T. Kotani y A.B. de Araujo, 2001. Live food production in Japan: recent progress and future aspects. *Aquaculture*, 200: 111-127.

Harzevili, A.R.S., H. Van Duffel, P. Dhert, J. Swings, P. Sorgeloos, 1998. Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *Aquaculture Research*, 29: 411-417.

Hirayama, K., 1987. A consideration of why mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* with baker's yeast is unstable. *Hydrobiologia*, 147: 269-270.

Hu, H. y Y. Xi, 2008. Demographic parameters and mixis of three *Brachionus angularis* Gosse (Rotatoria) strains feed on different algae. *Limnologica*, 38: 56-62.

Khatun, B., R., Rahman y M.S. Rahman, 2014. Evaluation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and algae *Chlorella vulgaris* as diet for rotifer *Brachionus calyciflorus*. *The Agriculturists*, 12(1): 1-9.

Kumar, R., y T.R. Rao, 2001. Effect of the cyclopoid copepod *Mesocyclops thermocyclopoides* on the interactions between the predatory rotifer *Asplanchna intermedia* and its prey *Brachionus calyciflorus* and *B. angularis*. *Developments in Hydrobiology*, 261-268.

Lim, L.C., P. Dhert y P. Sorgeloos, 2003. Recent developments in the application of live feeds in the freshwater ornamental fish culture. *Aquaculture*, 227: 319-331.

Lubzens E., O. Zmora e Y. Barr, 2001. Biotechnology and aquaculture of rotifers. *Hydrobiologia*, 446/447: 337-353.

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

Lubzens, E., A. Tandler, y G. Minkoff, 1989. Rotifers as food in aquaculture. En: Ricci, C., Snell, T. W. Y King, C. E. (Eds.), *Rotifer Symposium V*. *Hydrobiologia* 186/187: 387-400.

Lucía-Pavón, E., S.S.S. Sarma, y S. Nandini, 2001. Effect of different densities of live and dead *Chlorella vulgaris* on the population growth of rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). *Revista de Biología Tropical*, 49(3-4): 895-902.

Moorhead, J.A. y C. Zeng, 2010. Development of captive breeding techniques for marine ornamental fish: a review. *Reviews in Fisheries Science*, 18(4): 315-343.

Nandini, S. y T.R. Rao, 1998. Somatic and population growth in selected cladoceran and rotifer species offered the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as food. *Aquatic Ecology*, 31: 283-298.

Peredo-Álvarez, V.M., S.S.S. Sarma y S. Nandini, 2003. Combined effect of concentrations of algal food (*Chlorella vulgaris*) and salt (sodium chloride) on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). *Revista de Biología Tropical*, 51(2): 399-407.

Pérez-Lomba, R.M., 2001. Aplicación de bacterias lácticas nos sistemas de cultivo larvario de peixes. Tese de Licenciatura. University of Vigo (España), 74 p.

Planas M., J.A. Vázquez, J. Marqués, R. Pérez-Lomba, M.P. González y M. Murado, 2004. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture*, 240: 313-329.

Pourriot, R. 1980. Rotifères. En: Durand, J.R. y C. Lévêque (Eds.), *Flore et faune aquatiques de l'Afrique sahélo-soudanienne*, Volumen 1, 219-244 p.

Ramírez-Pérez, T., S. Sarma, y S. Nandini, 2004. Effects of Mercury on the Life Table Demography of the Rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera). *Ecotoxicology*, 13: 535-544.

Rombaut G., G. Sauntika, N. Boon, S. Maertens, P. Dhert, E. Top, P. Sorgeloos y W. Verstraete, 2001. Monitoring of the evolving diversity of the microbial community present in rotifer cultures. *Aquaculture*, 198: 237-252.

Rombaut G., R. Grommen, Q. Zizhong. V. Vanhoof, G. Suantika, P. Dhert, P. Sorgeloos y W. Verstraete, 2003. Improved performance of an intensive rotifer culture system by using a nitrifying inoculums (ABIL). *Aquaculture Research*, 34: 165-174.

Rombaut, G., P. Dhert, J. Vandenberghe, L. Verschuere, P. Sorgeloos, y W.Verstraete, 1999. Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 176: 195-207.

Rufchaie, R., M.F. Kapourchali, R. Armoudli, L. Azizzadeh, M. Salavatian, F. Chubian y Z. Pajand, 2012. Potential to use the native freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus* in feeding *Acipenser persicus* larvae. *Annals of Biological Research*, 3 (2): 965-974.

Ruttner-Kolisko, A., 1974. Plankton rotifers: biology and taxonomy. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller) Stuttgart, Alemania, 146 p.

Sakamoto, H. y K. Hirayama, 1983. Dietary effect of *Thiocapsa roseopersicina* (photosynthetic bacteria) on the rotifer *Brachionus plicatilis* (in Japanese with English abstract). *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.*, 54: 13-20.

Sarma, S.S.S., 2000. Comparison of the sensitivity of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera) to selected heavy metals under low and high food (*Chlorella vulgaris*) levels. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64: 735-739.

Sarma, S.S.S., F. Martínez-Jerónimo, T. Ramírez-Pérez, y S. Nandini, 2006. Effect of cadmium and chromium toxicity on the demography and population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). *Journal of Environmental Science and Health*, 41: 543-558.

Sarma, S.S.S., M. Fernández-Araiza, y S. Nandini, 1999. Effect of methyl parathion-treated prey (*Brachionus calyciflorus*) on the population growth of the predator *Asplanchna sieboldi* (Rotifera). *Aquatic Ecology*, 33: 339-345.

Sarma, S.S.S., P.S. Larios-Jurado y S. Nandini. 2001. Effect of three food types on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Revista de Biología Tropical*, 77-84.

Sarma, S.S.S., R. Resendiz y S. Nandini, 2010. Morphometric and demographic responses of Brachionid prey (*Brachionus calyciflorus* Pallas and *Platyonus macracanthus* (Daday)) in the presence of different densities of the predator *Asplanchna brightwellii* (Rotifera: Asplanchnidae). *Hydrobiologia*, 662: 179-187.

Skjermo J. y O. Vadstein, 1993. Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 255/256: 185–191.

Skjermo, J., I. Bakke, S.W. Dahle y O. Vadstein, 2015. Probiotic strains introduced through live feed and rearing water have low colonizing success in developing Atlantic cod larvae. *Aquaculture*, 438: 17-23.

Starkweather, P.L., 1980. Aspects of the feeding behavior and trophic ecology of suspension. *Hydrobiologia*, 73: 63-72.

Sugumar, V., y N. Munuswamy, 2006. Induction of population growth, mictic female production and body size by treatment of a synthetic GnRH analogue in the freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Aquaculture*, 258: 529-534.

Sulehria, A.Q.K., y M.A. Malik, 2012. Evaluation of rearing *Cyprinus carpio* fry on freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus*. *Pakistan Journal of Zoology*, 44(4): 1117-1180.

Wallace, R.L., T.W. Snell, C. Ricci y T. Nogrady, 2006. Rotifera. Volume 1: biology, ecology and systematics (2nd Edition). En Segers H. y J. Dumont (Eds.), *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*. Kenobi Productions, Ghent. 299 p.

Watanabe, K., K. Sezaki, K. Yazawa y A. Hino, 1992. Nutritive fortification of the rotifer *Brachionus plicatilis* with eicosapentaenoic acid-producing bacteria. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 271-276.

Yasuda, K. y N. Taga, 1980. A mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. *La Mer* (Bulletin de la Société Franco-Japonaise d'Océanographie), 18: 53-62.

Yu, J.P., A. Hino, M. Ushiro y M. Maeda, 1989. Function of bacteria as vitamin B12-producers during mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi, 55: 1799-1806.

Yu, J.P., A. Hino, R. Hirano y K. Hirayama, 1988. Vitamin B12-producing bacteria as a nutritive complement for a culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi, 54: 1873-1880.

Yúfera, M., 2001. Studies on *Brachionus* (Rotifera): an example of interaction between fundamental and applied research. Hydrobiologia, 446/447: 383-392.

Zar, J.H. 1996. Bioestatistical Analysis. Prentice Hall PTR, 121 p.

Zink, I.C., P.A. Douillet y D.D. Benetti, 2013. Improvement of rotifer *Brachionus plicatilis* population growth dynamics with inclusion of *Bacillus* spp. probiotics. Aquaculture Research, 44: 200-211.

## Capítulo 4: Tasas de alimentación de crías de *Amatitlania nigrofasciata* alimentadas con *B. calyciflorus* cultivado con probióticos y sin probióticos.

### Resumen

El presente experimento se llevó a cabo para determinar: a) si las crías de *Amatitlania nigrofasciata* aceptan como presa al rotífero *Brachionus calyciflorus* y b) evaluar si el rotífero cultivado con probióticos es mejor como alimento que aquellos cultivados con solo *Chlorella vulgaris*. Se alimentaron crías de *Amatitlania nigrofasciata* con dos calidades de *B. calyciflorus*: cultivado con probióticos ( $2.12 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>) + *C. vulgaris* ( $1 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>) y cultivado con sólo *C. vulgaris* ( $1 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>). Las crías fueron alimentadas con 20 ind ml<sup>-1</sup> de *B. calyciflorus* en pozos de 2 ml en una multicaja Corning de 24 pozos con 2 ml de medio. Cada tratamiento tuvo 5 réplicas. Se calculó la tasa de ingestión (presa cría<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) contando la cantidad de rotíferos consumidos en intervalos de 1 hora por un tiempo total de 8 horas. Durante la primera hora la tasa de ingestión para ambos tratamientos fue alta (10.8 – 11.8 presa cría<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Posteriormente, el tratamiento testigo mantuvo tasas de ingestión bajas hasta la cuarta hora, a diferencia del tratamiento con probióticos donde la tasa se mantuvo baja hasta la quinta hora. Se encontraron diferencias significativas entre las tasas de ingestión de ambos tratamientos ( $p < 0.05$ ). Los resultados sugieren que los organismos alimentados con rotíferos alimentados con microalgas y probióticos permanecieron mayor tiempo en el punto de saciedad.

### Abstract

This experiment was conducted to evaluate: a) if *Amatitlania nigrofasciata* fry fed on *Brachionus calyciflorus* and b) evaluate the quality of *Brachionus calyciflorus* cultivated with probiotics. *Amatitlania nigrofasciata* fry were fed with two qualities of *B. calyciflorus*: cultivated with probiotics ( $2.12 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>) + *C. vulgaris* ( $1 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>) and cultivated with only *C. vulgaris* ( $1 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>). Fry were fed with 20 ind ml<sup>-1</sup> of *B. calyciflorus* in 2 ml wells. Each treatment had 5 replicates. The ingestion rate (prey fry<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) was calculated by counting the number of rotifers consumed in 1 hour intervals for a total time of 8 hours. During the first hour the ingestion rate for both treatments was high (10.8 - 11.8 prey fry<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Subsequently, the control treatment kept low rates until the fourth hour, unlike the treatment with probiotics whose rate remained low until the fifth hour. Significant differences between ingestion rates of both

treatments were found ( $p < 0.05$ ). The results suggest that fry fed on rotifers (cultivated with microalgae and probiotics) remained longer at the point of satiety.

## **Introducción**

*B. calyciflorus* se ha empleado satisfactoriamente como alimento primerizo de especies comerciales como la lobina rayada (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*; Ludwig, 1994), la perca de río (*Perca fluviatilis*; Awaiss, 1991; Awaiss *et al.*, 1992), pez gato africano (*Clarias anguillaris*; Arimoro, 2007) y lota (*Lota lota*; Harzevili *et al.* 2003). Además de esto, *B. calyciflorus* ha sido empleado como alimento para peces ornamentales como el gourami enano (*Colisa lalia*) o el cíclido disco marrón (*Symphysodon aequifasciata axelrodi*), encontrando una mejora en el crecimiento y en la supervivencia (Lim y Wong, 1997).

*Amatitlania nigrofasciata* (Günther, 1867), es una especie de pez dulceacuícola de la Familia Cichlidae, que habita desde el río Suchiate en la costa del Pacífico de Guatemala hasta El Salvador, Honduras, Nicaragua y Costa Rica (Schmitter-Soto, 2007). Se tiene registro de *A. nigrofasciata* en acuariofilia desde los principios del siglo pasado. Es una especie de interés en la acuariofilia de la cual se tiene muy poca información acerca de sus hábitos alimenticios.

El presente trabajo aporta información importante acerca de la alimentación de *Amatitlania nigrofasciata* y constituye el primer reporte de crías *Amatitlania nigrofasciata* alimentadas con rotíferos.



## Revisión bibliográfica

### *B. calyciflorus* como alimento en acuicultura

*B. calyciflorus* se ha empleado satisfactoriamente como alimento primerizo de especies comerciales como la lobina rayada (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*; Ludwig, 1994), la perca de río (*Perca fluviatilis*; Awaiss, 1991; Awaiss *et al.*, 1992), pez gato africano (*Clarias anguillaris*; Arimoro, 2007) y lota (*Lota lota*; Harzevili *et al.* 2003). Además de esto, *B. calyciflorus* ha sido empleado como alimento para peces ornamentales como el gourami enano (*Colisa lalia*) o el cíclido disco marrón (*Symphysodon aequifasciata axelrodi*), encontrando una mejora en el crecimiento y en la supervivencia (Lim y Wong, 1997). Lim *et al.* (2003), proporcionan una lista de especies de peces ornamentales que requieren de zooplancton de tamaño pequeño como *B. calyciflorus* (Tabla 26).

**Tabla 26. Listado de especies de peces ornamentales de agua dulce con crías de tamaño pequeño que requieren zooplancton como los rotíferos para su producción. Lim *et al.* (2003).**

Familia	Nombre científico	Nombre común
	Tetra farolito	<i>Hemigrammus ocellifer</i>
	Tetra luminoso	<i>Hemigrammus erythrozonus</i>
	Tetra cobre	<i>Hasemania nana</i>
	Neón negro	<i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>
	Tetra limón	<i>Hyphessobrycon pulchripinnis</i>
	Tetra llama	<i>Hyphessobrycon flammeus</i>
	Tetra negro	<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>
<b>Characidae</b>	Tetra ojo rojo balón	<i>Moenkhausia oligolepis</i>
	Neón tetra	<i>Paracheirodon innesi</i>
	Tetra pingüino	<i>Thayeria boehlkei</i>
	Tetra serpa	<i>Hyphessobrycon serpae</i>
	Tetra cola roja	<i>Aphyocharax anisitsi</i>
	Tetra cabeza roja	<i>Hemigrammus bleheri</i>
	Tetra fantasma negro	<i>Megalampodus megalopterus</i>
<b>Melanotaeniidae</b>	Pez arcoiris rojo	<i>Glossolepis incisus</i>
	Pez beta	<i>Betta splendens</i>
<b>Belontiidae</b>	Pez del paraíso	<i>Macropodus opercularis</i>

	Gourami enano	<i>Colisa lalia</i>
	Gourami dorado	<i>Trichogaster trichopterus</i>
	Gourami azul	<i>Trichogaster trichopterus</i>
	Gourami perla	<i>Trichogaster leeri</i>
	Pez cebra	<i>Brachydanio rerio</i>
	Pez leopardo	<i>Brachydanio frankei</i>
	Neón chino	<i>Tanichthys albonubes</i>
<b>Cyprinidae</b>	Tiburón bala	<i>Balantiocheilos melanopterus</i>
	Tiburón de cola roja	<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>
	Labeo erythrurus	<i>Epalzeorhynchus erythrurus</i>
	Labeo bicolor	<i>Epalzeorhynchus bicolor</i>
<b>Cyprinodontidae</b>	Killi	<i>Cynolebias nigripinnis</i>
	Panchax cola de lira	<i>Aphyosemion australe</i>
<b>Cichlidae</b>	Disco marrón	<i>Symphysodon aequifasciata axelrodi</i>
	Pez angel	<i>Pterophyllum scalare</i>
	Coridora bronce	<i>Corydoras aeneus</i>
<b>Callichthyidae</b>	Coridora albino	<i>Corydoras aeneus</i>
	Coridora pimienta	<i>Corydoras paleatus</i>

---

### ***Amatitlania nigrofasciata***

*Amatitlania nigrofasciata* (Günther, 1867), es una especie de pez dulceacuícola de la Familia Cichlidae, que habita desde el río Suchiate en la costa del Pacífico de Guatemala hasta El Salvador, Honduras, Nicaragua y Costa Rica (Schmitter-Soto, 2007). El nombre *Amatitlania* deriva de la localidad tipo, la laguna de Amatitlan, mientras que *nigro*: negro y *fasciatus*: rayado; en referencia a sus rayas verticales de color negro a los costados (Artigas-Azas, 2014; Figura 18). El nombre común que recibe esta especie es *burra* o cíclido convicto.

Es una especie que cuida biparentalmente a sus crías de manera prolongada (Bernstein, 1980; Keenleyside, 1991). Esta especie ha sido poco estudiada en ambientes naturales, pero ampliamente estudiada en condiciones de laboratorio (Wisenden, 1995). Los adultos crecen hasta 100 mm de longitud estándar (Kullander, 2003) y las hembras alcanzan la madurez sexual a los 32 mm (Ishikawa y Tachihara, 2010). *A. nigrofasciata* es una especie omnívora que se alimenta de insectos acuáticos, semillas, algas y detritus (Bussing-Burhaus, 1993).



Figura 18. Ejemplares adultos de *Amatitlania nigrofasciata* (Contreras-Tapia, 2015).

### ***A. nigrofasciata* en la acuariofilia**

El primer registro de *A. nigrofasciata* data de 1904, que refiere a su presencia en Hamburgo, Alemania. No se tiene la fecha exacta de la introducción de *A. nigrofasciata* en la acuariofilia de Estados Unidos, pero se estima que fue en la década de 1930. En 1939, comenzaron las primeras importaciones de esta especie a Alemania, provenientes de Estados Unidos (Artigas-Azas, 2014). *A. nigrofasciatus* es bien conocido por los acuariófilos como una especie de fácil mantenimiento y que se ha logrado reproducir en cautiverio. Actualmente, es una de las especies de cíclidos más representativas en la acuariofilia (Artigas-Azas, 2014).

## Objetivos

Evaluar las tasas de ingestión de crías de *Amatitlania nigrofasciata* alimentadas con *B. calyciflorus* cultivado sin probióticos y con probióticos.

## Material y Métodos

La experimentación consistió en determinar las tasas de alimentación de crías del pez *Amatitlania nigrofasciata* alimentadas con *B. calyciflorus* cultivado sin probiótico y con probiótico. Previa a la experimentación se cultivó a *B. calyciflorus* bajo las condiciones experimentales previamente descritas para dos tratamientos P2 (testigo, sólo *C. vulgaris* a  $1.0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>) y P7 (tratamiento con *C. vulgaris* +  $2.12 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup> de probióticos), hasta obtener la cantidad suficiente de organismos a utilizarse en el experimento. Previa a la experimentación se verificó que los peces se alimentaran de los rotíferos.

**Tabla 27. Diseño experimental para evaluar la calidad de *B. calyciflorus* cultivado con y sin probióticos**

Grupo	# réplicas	Calidad de <i>B.</i> <i>calyciflorus</i>	Densidad inicial de <i>B. calyciflorus</i> (ind ml <sup>-1</sup> )	Hora de conteo
1	5	Sin probióticos	20	1
	5	Con probióticos	20	
2	5	Sin probióticos	20	2
	5	Con probióticos	20	
3	5	Sin probióticos	20	3
	5	Con probióticos	20	
4	5	Sin probióticos	20	4
	5	Con probióticos	20	
5	5	Sin probióticos	20	5
	5	Con probióticos	20	
6	5	Sin probióticos	20	6
	5	Con probióticos	20	
7	5	Sin probióticos	20	7
	5	Con probióticos	20	
8	5	Sin probióticos	20	8
	5	Con probióticos	20	

Se emplearon crías de un día de eclosión de *Amatitlania nigrofasciata* ( $6.53 \pm 0.62\text{mm} - 1.06 \pm 0.04\text{ mg}$ ). En multicajas de 24 pozos se colocó un individuo de *A. nigrofasciata* en cada pozo con 2 ml de medio. Los peces fueron alimentados con *B. calyciflorus* de cada tratamiento a una densidad de  $20\text{ ind ml}^{-1}$  y se colocaron en series de 5 réplicas por tratamiento, separados por grupos de hora de observación (Tabla 32). El número de rotíferos restantes se contó para cada grupo de hora, desde una hasta ocho horas. Cada grupo se colocó en multicajas distintas para evitar que la manipulación bajo el microscopio interfiriera en la alimentación de las crías. Los conteos se realizaron empleando un microscopio estereoscópico marca Nikon SMZ800.

### Tasa de ingestión

A partir de los datos obtenidos de consumo por hora se calculó la tasa de ingestión. La tasa de ingestión se determinó al comparar la densidad inicial y final de la presa *B. calyciflorus*. Para cada réplica se calculó la tasa de ingestión ( $I$ ; presa cría<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), se usó la siguiente fórmula (Caldeira *et al.*, 2014):

$$I = \frac{\left( \frac{C_i - C_l - (C_i - C_f)}{n} \right)}{t}$$

Donde:

$C_i$ = concentración inicial de la presa

$C_f$ = densidad de la presa final

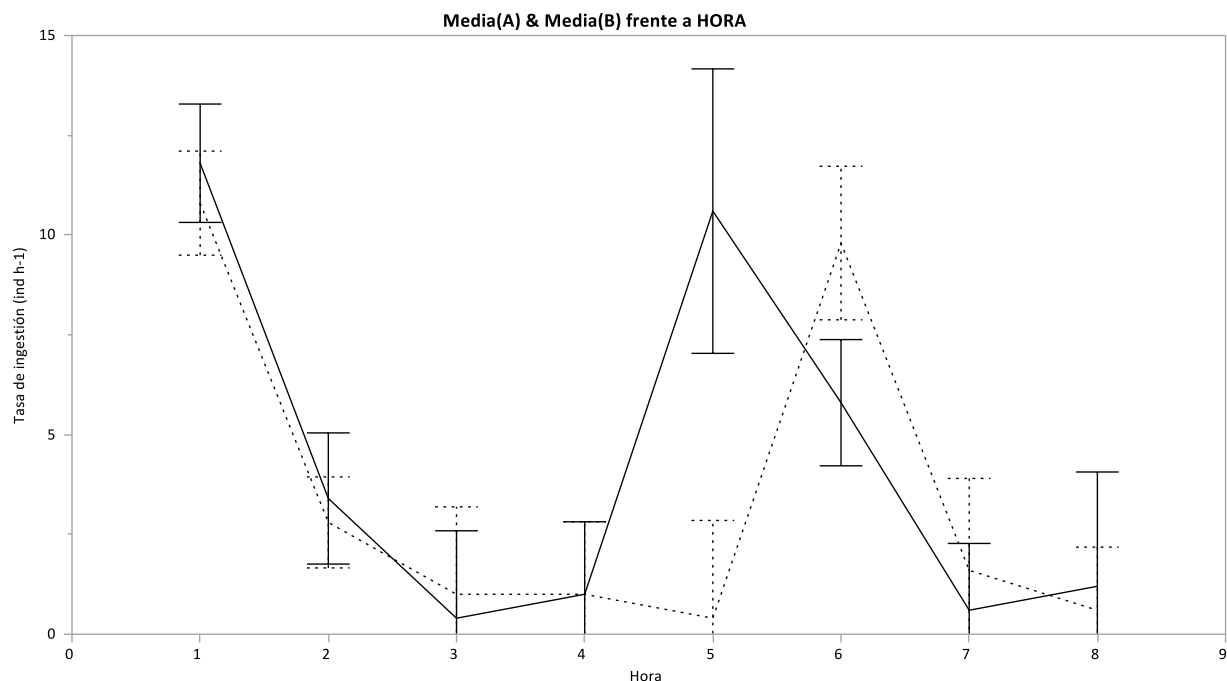
$C_l$ = concentración final de presas

$n$ = número de crías

$t$ = duración del experimento.

### Resultados

Las tasas de ingestión de *B. calyciflorus* por *A. nigrofasciata* durante un periodo de 8 horas se muestran en la Figura 19. Las tasas de ingestión de *A. nigrofasciata* alimentada con ambos tratamientos presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ; Tabla 28).



**Figura 19. Tasas de ingestión de *B. calyciflorus* por *A. nigrofasciata*.**

La línea solida representa el tratamiento con *B. calyciflorus* control, mientras que la línea punteada representa el tratamiento con *B. calyciflorus* cultivado con probióticos.

**Tabla 28. Análisis multivariado de las tasas de ingestión**

Source Term	DF	Sum of squares	Mean squares	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
<b>A: tratamiento</b>	<b>1</b>	4.83636125	4.83636125	7.14	0.009545*	0.749228
B: hora	7	37.75899875	5.394142679	7.96	0.000001*	0.99995
AB	7	13.79528875	1.970755536	2.91	0.010479*	0.900023
S	64	43.3436	0.67724375			
Total (Adjusted)	79	99.73424875				
Total	80					

\* Term significant at alpha = 0.05

## Discusión

Parte del cuidado parental en cíclidos se ve representado por las estrategias de selección de sitios de anidación y crianza. Estos sitios permiten reducir la depredación y permiten brindar de suficiente alimento (zooplancton) disponible para las crías. Todos los peces de agua dulce se alimentan de zooplancton en alguna etapa de sus vidas, principalmente durante la etapa post larvaria (después de la desaparición del saco vitelino). A medida que los peces crecen en tamaño, las partículas de las que se alimentan son de mayor tamaño (Stewart, 1988; Robotham, 1990). Existe poca información acerca de los hábitos alimenticios de *A. nigrofasciata* en ambiente natural (Wisenden, 1995) y en condiciones de laboratorio se han empleado dietas comerciales (Lee *et al.*, 2011). El presente trabajo representa el primer reporte de *A. nigrofasciata* alimentado con rotíferos. Esta especie ha sido ampliamente utilizada como objeto de estudio en investigaciones de temas diversos como: comportamiento (Wong *et al.*, 2008) y reproducción (Gagliardi-Seeley *et al.*, 2009; Leese *et al.*, 2010). Sin embargo, las investigaciones acerca de sus hábitos alimenticios son escasos. En el presente trabajo se presenta el primer reporte de tasas de ingestión de *A. nigrofasciata*.

Durante la primera hora la tasa de ingestión para ambos tratamientos fue alta (10.8 – 11.8 presa cría<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). El tratamiento control mantuvo tasas de ingestión bajas hasta la cuarta hora. En la quinta hora nuevamente se tuvo una tasa de ingestión alta, que fue bajando hasta la hora 8. Caso contrario, el tratamiento con probiótico mantuvo una tasa de ingestión baja hasta la quinta hora, posterior a esto, en la sexta hora incrementó y volvió a descender en las horas 7 y 8. El patrón de tasas altas de ingestión y una posterior disminución ha sido demostrado previamente para primeros estadios de otras especies de peces (Houde y Schekter, 1981; Parra y Yúfera, 2001). Las tasas de ingestión de *Amantitlania nigrofasciata* no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, al analizar la combinación de tasas de ingestión de cada tratamiento y las horas, si se encontraron diferencias significativas. En la Figura 19 se muestra como los organismos alimentados con *B. calyciflorus* cultivado con probióticos mantuvieron tasas de ingestión menores por un periodo más prolongado que el tratamiento control. Esto puede deberse a que, en términos nutricionales, las bacterias presentes o adicionadas a los cultivos de rotíferos pueden incrementar el valor dietético de los rotíferos (Gatesoupe *et al.*, 1989; Gatesoupe, 1991; Lee *et al.*, 1997).

El lapso en el que las tasas de ingestión fueron bajas fue de 3 y 4 horas para el tratamiento testigo y con probióticos respectivamente. En el presente estudio no se evaluó el tiempo de evacuación de *A. nigrofasciata*, sin embargo, tomando en cuenta el tamaño de los organismos empleados ( $6.53 \pm 0.62\text{mm}$ ), el tiempo de evacuación se estima que es de 3.5 horas (Wuenschel y Werner, 2004) y corresponde al tiempo de digestión del alimento consumido (Bowen, 1976). Después de este evento, generalmente los peces vuelven a consumir presas para saciar su hambre (Lazzaro, 1987).

La cantidad y calidad de la presa ofrecida al depredador en un periodo determina la tasa de ingestión. El evaluar la tasa de ingestión permite estudiar cómo un depredador altera su comportamiento alimenticio en respuesta a la presa (Lazzaro, 1987). En la presente investigación tanto el periodo como la cantidad de presas fue el mismo para ambos tratamientos, sin embargo, las tasas de ingestión evidencian una diferencia en la calidad de las presas ofrecidas. Es importante resaltar que se deben considerar 3 eventos durante la alimentación de los peces: 1) captura de la presa, 2) retención y 3) digestión (Lazzaro, 1987). Sin embargo, el zooplancton es generalmente de fácil y rápida digestión (Gannon, 1976). Las tasas de ingestión también permiten examinar la respuesta funcional de los peces en respuesta a la cantidad y calidad del alimento, estas respuestas indican el rango de tiempo y cantidad con el que los peces obtienen la energía necesaria de sus presas (Figueiredo *et al.*, 2007; Montagnes *et al.*, 2010). Por lo tanto, los resultados sugieren que los organismos alimentados con rotíferos alimentados con microalgas y probióticos permanecieron mayor tiempo en el punto de saciedad. Durante el punto de saciedad la tasa de ingestión permanece constante, inclusive cuando la densidad de presas incrementa (Valiela, 1995).

## **Conclusiones**

Este reporte brinda información acerca de los hábitos alimenticios de *A. nigrofasciata*. Las crías de *A. nigrofasciata* aceptaron como presa al rotífero *Brachionus calyciflorus*. Las tasas de ingestión no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, se presentaron diferencias significativas en las horas que se presentan dichas tasas de ingestión. Los resultados sugieren que los organismos alimentados con rotíferos alimentados con microalgas y probióticos permanecieron mayor tiempo en el punto de saciedad.



## Literatura citada

Arimoro, F.O., 2007. First feeding in the african catfish *Clarias anguillaris* fry in tanks with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* cultured in a continuous feedback mechanism in comparison with a mixed zooplankton Diet. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 2 (4): 275-284.

Artigas-Azas, J.M., 2014. *Amatitlania nigrofasciata* (Günther, 1867). Cichlid Room Companion. Consultado en abril 02, 2016, desde: <http://www.cichlidae.com/species.php?id=200&lang=es>.

Awaiss, A., 1991. Mass culture and nutritional quality of the freshwater rotifer (*Brachionus calyciflorus* P.) for gudgeon (*Gobio gobio* L.) and perch (*Perca fluviatilis* L.) larvae. Special Publication - European Aquaculture Society, 15: 113-115.

Awaiss, A., P. Kestemont, J.C. y Micha, 1992. Nutritional suitability of the rotifer, *Brachionus calyciflorus* Pallas for rearing freshwater fish larvae. Journal Applied Ichthyology, 8: 263-270.

Bernstein, J.W. 1980. Parental care behavior in the cichlid fish *Cichlasoma nigrofasciatum*. Copeia, 4: 682-686.

Bowen, S.H., 1976. Mechanism for digestion of detrital bacteria by the cichlid fish *Sarotherodon mossambicus* (Peters). Nature, 260: 137-138.

Bussing-Burhaus, W. A. 1993. Fish communities and environmental characteristics of a tropical rain forest river in Costa Rica. Revista de Biología Tropical, 41: 791-809.

Caldeira, C., A.M.P., Santos, P. Ré, M.A. Peck, E. Saiz y S. Garrido, 2014. Effects of prey concentration on ingestion rates of European sardine *Sardina pilchardus* larvae in the laboratory. Marine Ecology Progress Series, 517: 217-228.

Contreras-Tapia, R.A., 2015. Ejemplares adultos de *Amatitlania nigrofasciata*. Imagen.

Figueiredo, G.M., R.D.M. Nash y D.J.S. Montagnes, 2007. Do protozoa contribute significantly to the diet of larval fish in the Irish sea? *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87: 843-850.

Gagliardi-Seeley, J., J. Leese, N. Santangelo, y M. Itzkowitz, 2009. Mate choice in female convict cichlids (*Amatitlania nigrofasciata*) and the relationship between male size and dominance. *Journal of ethology*, 27(2): 249-254.

Gannon, J.E., 1976. The effects of differential digestion rates of zooplankton by alewife, *Alosa pseudoharengus*, on determination of selective feeding. *Trans. Am. Fish. Soc.* 105: 89-95.

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.

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

Harzevili, A.R.S., D. Charleroy, J. Auwerx, I. Vught, J. Slycken, P. Dhert, y P. Sorgeloos, 2003. Larval rearing of burbot (*Lota lota* L.) using *Brachionus calyciflorus* rotifer as starter food. *Journal of Applied Ichthyology*, 19: 84-87.

Houde, E.D. y R.C. Schekter, 1981. Growth rates, rations and cohort consumption of marine fish larvae in relation to prey concentrations. *Rapports et Proces-Verbaux Reunions International Council for Exploration of the Sea*, 178: 441-453.

Ishikawa, T. y K. Tachihara, 2010. Life history of the nonnative convict cichlid *Amatitlania nigrofasciata* in the Haebaru Reservoir on Okinawa-jima Island, Japan. *Environmental Biology of Fishes*, 88: 283-292.

Keenleyside, M.H.A. 1991. Parental care. *Cichlid fishes: Behaviour, ecology and evolution*. Chapman and Hall: London, 191-208.

Kullander, S.O. 2003. Family Cichlidae (Cichlids). En: Reis, R.E., S.O. Kullander y C.J. Ferraris (Eds.) Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America, Edipucrs: Porto Alegre: 605-654.

Lazzaro, X. 1987. A review of planktivorous fishes: their evolution, feeding behaviours, selectivities, and impacts. *Hydrobiologia*, 146(2): 97-167.

Lee, G., J.W. Granty y P. Comolli, 2011. Dominant convict cichlids (*Amatitlania nigrofasciata*) grow faster than subordinates when fed an equal ration. *Behaviour*, 148(8): 877-887.

Lee, W.J., Y.S. Park, Y.T. Park, S.J. Kim y K.Y. Kim, 1997. Studies on the availability of marine bacteria and the environmental factors for the mass culture of the high quality of Rotifera and Artemia: 1. Change of fatty acid and amino acid composition during cultivation and rotifer, *Brachionus plicatilis* by marine bacteria *Erythrobacter* sp. *Journal of Korean Fisheries Society*, 30: 319-328.

Leese, J., H. Wilson, A. Ganim y M. Itzkowitz, 2010. Effects of reversed size-assortative mating on spawning success in the monogamous convict cichlid, *Amatitlania nigrofasciata*. *Ethology Ecology & Evolution*, 22(1): 95-100.

Lim, L.C. y C.C. Wong, 1997. Use of the rotifer, *Brachionus calyciflorus* Pallas, in freshwater ornamental fish larviculture. *Hydrobiologia*, 358: 269-273.

Lim, L.C., P. Dhert y P. Sorgeloos, 2003. Recent developments in the application of live feeds in the freshwater ornamental fish culture. *Aquaculture*, 227: 319-331.

Ludwig, G.M., 1994. Tank culture of sunshine bass *Morone chrysops* x *M. saxatilis* fry with freshwater rotifers *Brachionus calyciflorus* and salmon starter meal as first food sources. *Journal of World Aquaculture Society*, 25 (2): 337-341.

Montagnes, D.J.S., J.F. Dower y G.M. Figueiredo, 2010. The Protozooplankton–Ichthyoplankton Trophic Link: An Overlooked Aspect of Aquatic Food Webs. *Journal Eukaryotic Microbiology*, 57(3): 223-228.

Parra, G. y Yúfera, 2001. Comparative energetics during early development of two marine fish species, *Solea senegalensis* (Kaup) and *Sparus aurata* (L.). *Journal of Experimental Biology*, 204: 2175-2183.

Robotham, P.W.J., 1990. Trophic niche overlap of the fry and juveniles of *Oreochromis leucostictus* (Teleostei, Cichlidae) in the littoral zone of a tropical lake (L. Naivasha, Kenya). *Revue Hydrobiol. Trop.*, 23: 209-218.

Schmitter-Soto, J.J. 2007. A systematic revision of the genus *Archocentrus* (Perciformes: Cichlidae), with the description of two new genera and six new species. *Zootaxa*, 1603: 1-78.

Stewart, K.M., 1988. Changes in condition and maturation of *Oreochromis niloticus* (L.) population of Ferguson Gulf, Lake Turkana, Kenya. *J. Fish. Biol.* 33: 181-188.

Valiela, I. 1995. *Marine Ecological Processes*. 2nd Edition, Springer, New York, 686 p.

Wisenden, B.D. 1995. Reproductive behaviour of freeranging convict cichlids, *Cichlasoma nigrofasciatum*. *Environmental Biology of Fishes* 43: 121-134.

Wong, S.C., M. Dykstra, J.M. Campbell, y R.L. Earley, 2008. Measuring water-borne cortisol in convict cichlids (*Amatitlania nigrofasciata*): is the procedure a stressor?. *Behaviour*, 145(10): 1283-1305.

Wuenschel, M.J. y R.G. Werner, 2004. Consumption and gut evacuation rate of laboratory - reared spotted seatrout (Sciaenidae) larvae and juveniles. *Journal of Fish Biology*, 65(3): 723-743.

## **Capítulo 5: Transferencia Tecnológica – Paquete tecnológico LR-50**

### **Resumen**

Se presenta un paquete tecnológico que consiste en un prototipo para el cultivo de microalgas y rotíferos de agua dulce, acompañado de un manual de operación y un programa de capacitación para la operación del prototipo. El sistema de producción presentado permite producir microalgas, rotíferos y otros zooplanctones a mediana escala en un espacio reducido. El método de producción incluye la aplicación de probióticos para enriquecer el cultivo de rotíferos.

### **Abstract**

A technological package consisting of a prototype for the cultivation of freshwater microalgae and rotifers, an operation manual and a training program for the operation of the prototype is presented. The production system presented allows to produce microalgae, rotifers and other zooplanctones in a small space. The production method includes the application of probiotics to enrich rotifers cultivation.

## Definición y delimitación del paquete tecnológico

El paquete tecnológico fue diseñado para emplearse en la producción de alimento vivo (microalgas y rotíferos). El paquete tecnológico está diseñado para ser empleado por acuicultores y acuariófilos que requieran de rotíferos como alimento para crías de peces. El paquete consiste en tres componentes: modulo LR-50, manual del usuario y la capacitación. El sistema de producción LR-50 permite producir microalgas y rotíferos en un volumen de 50 L (Figura 20 y 21). El método de producción de rotíferos incluye el empleo de probióticos (NanoCrusta, Altacrusta). Complementario al prototipo se ofrece un curso de capacitación para los usuarios de dicho sistema de producción.

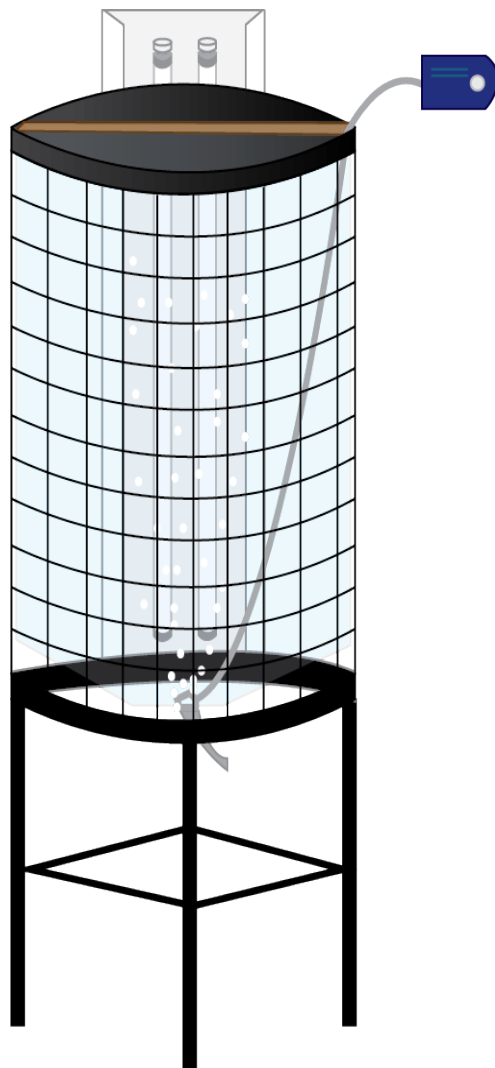
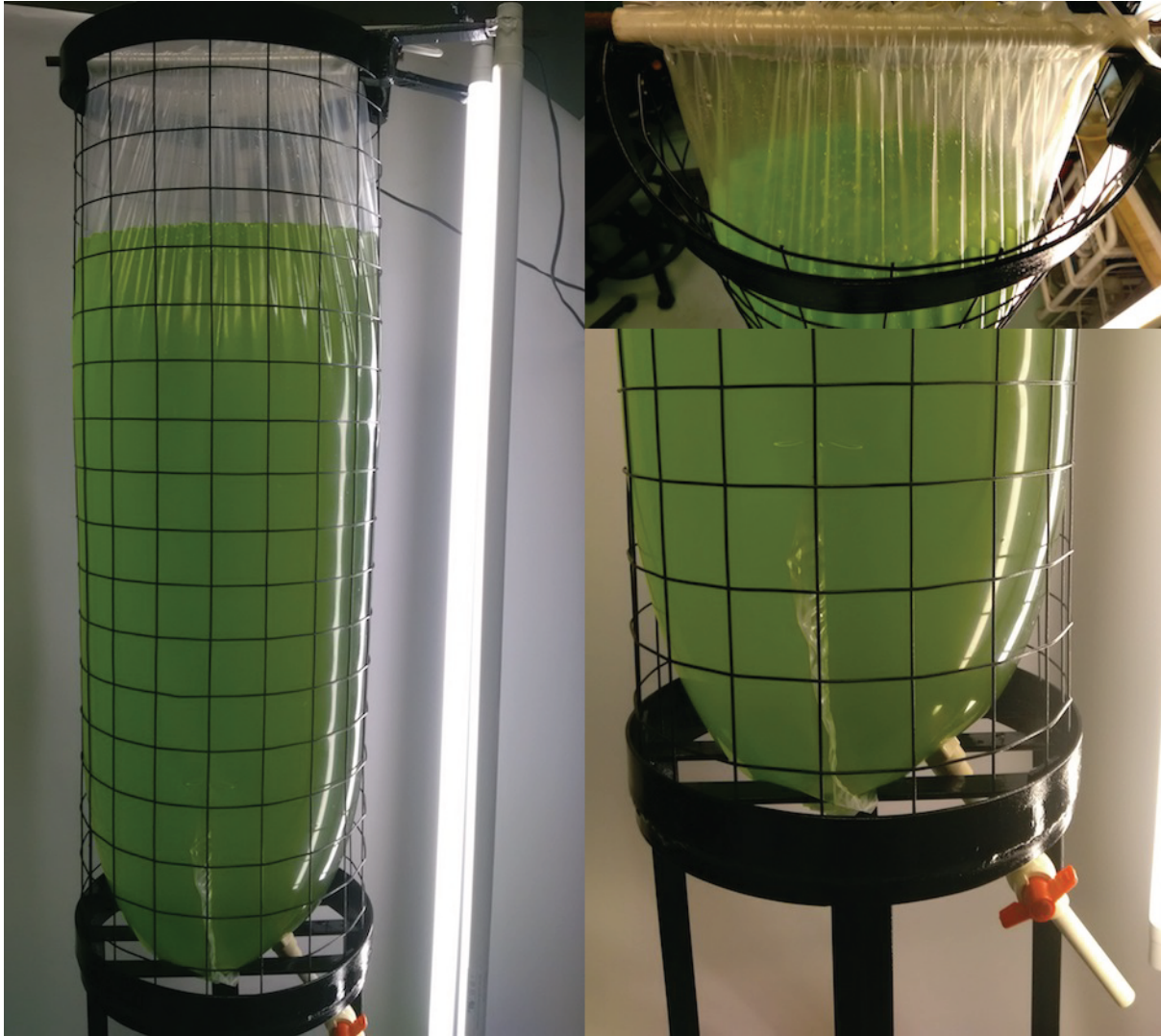


Figura 20. Diagrama del sistema LR-50



**Figura 21. Sistema de producción de alimento vivo LR-50**

### **Modelo LR-50**

El LR-50 es un sistema de producción de microalgas y rotíferos (Figura 20). Este sistema consiste en una estructura de metal que soporta una bolsa con una capacidad de 50 L. El sistema incluye los elementos necesarios para su operación (Tabla 29). El diámetro del sistema es de 35 cm, lo que permite que el sistema se emplee de manera modular. La altura es ajustada por el usuario sin afectar el funcionamiento.

**Tabla 29. Contenido del LR-50.**

<b>Cantidad</b>	<b>Equipo</b>
1	Estructura (35 x 35 x 180 cm)
2	Bolsas de polietileno (50 L)
1	Cepa de <i>Chlorella vulgaris</i>
1	Cepa de <i>Brachionus calyciflorus</i>
3 m	Manguera
1	Válvula check
1	Difusor de plástico
1	Bomba de aire Elite Maxima
1	Lámpara 2x20 W
120 ml	Bayfolan Forte (Bayer)
50 ml	NanoCrusta (Altacrusta)

### **Manual de usuario**

El manual de usuario contiene la información necesaria para la operación del sistema LR-50 (ver Tabla 30 para el contenido). Enlista los componentes y partes del sistema, como debe ser operado y el mantenimiento del mismo. En la sección de *Procesos* se describen claramente los métodos a seguir para la producción de alimento vivo, desde la preparación del material hasta el manejo post cosecha.

**Tabla 30. Contenido del manual del usuario LR-50**

<b>Contenido</b>	
Acerca de su equipo	<b>Procesos</b>
<b>Inicio</b>	Lavado de material
Componentes y partes	Manejo de los inóculos
Montaje del sistema	Establecimiento de los cultivos
Montaje de la bolsa	Monitoreo e indicadores de contaminación
Montaje del aireador	Cosecha y manejo post cosecha
	Métodos de suministro del alimento cosechado
	Glosario



## **Capacitación**

La capacitación para el empleo del sistema LR-50 consiste en un curso teórico-práctico. Dicho curso tiene como objetivo que el usuario adquiera los conocimientos sobre la producción de alimento vivo empleando el sistema LR-50.