

## Producción controlada de *Brachionus patulus* Müller 1786, utilizando como alimento cuatro dietas a base de microalgas verdes unicelulares en laboratorio.

Espinoza-Barrera U, Flores-Arizmendi AK, González-Pérez A, González-Velasco CJ, Castro-Mejía J\*, Castro-Mejía G y Castañeda-Trinidad H.

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Departamento El Hombre y su Ambiente. Laboratorio de Producción de Alimento Vivo. Calzada del Hueso No.1100. Col. Villa Quietud. México, 04960, D.F. Depto. El Hombre y su Ambiente. Tel. 54837151.

\*Email: [camj7509@correo.xoc.uam.mx](mailto:camj7509@correo.xoc.uam.mx)

### RESUMEN

En este estudio se realizó un cultivo de *B. patulus* a nivel laboratorio con una temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  y un pH de 7-8, en recipientes de 20 L con 10 L de agua ( $10\text{ gL}^{-1}$  salinidad). La densidad inicial del cultivo fue de  $63\text{ org mL}^{-1}$ . Como alimento se suministraron cuatro dietas a base de microalgas ( $500 \times 10^3\text{ cel mL}^{-1}$ ): a) *C. vulgaris*, b) *Sphaerocystis* sp. y c) *H. pluvialis* y d) Una combinación de las tres (200 mL de cada una). Cada tercer día, la densidad de la población de rotíferos fue contada tomando una muestra de 100 mL del medio de cultivo y de esta, 10 muestras de 1 mL con la ayuda de una micropipeta para obtener el valor promedio ( $\pm\text{D.S.}$ ). La mayor densidad de organismos  $\text{mL}^{-1}$  se observó entre los días 6 al 12 de cultivo en todas las dietas. La mayor densidad se encontró en los cultivos alimentados con *H. pluvialis* ( $477\text{ org mL}^{-1}$ ) y *Sphaerocystis* sp. ( $476\text{ org mL}^{-1}$ ). La dieta con menor densidad fue la alimentada con *C. vulgaris* ( $105\text{ org mL}^{-1}$ ). La tendencia de la curva de crecimiento, fue siempre un curva polinómica de sexto grado para todas las dietas. La importancia de este trabajo, permite el manejo de otras microalgas en el cultivo de este rotífero, así como el poder determinar específicamente, ciclos de producción de doce días a nivel laboratorio, a partir de los cuales, se podría comenzar a cosechar la biomasa excedente y utilizarla como alimento directo o secarla e implementarla como materia prima en la elaboración de otras dietas comerciales para especies acuáticas.

**Palabras clave:** *Brachionus patulus*, microalgas, densidad poblacional, curvas de crecimiento.

### INTRODUCCIÓN

A partir del año 2000, el cultivo de especies acuáticas ha tomado gran relevancia por lo que se ha convertido en una de las actividades de mayor importancia en México, tanto por su impacto económico y social en la creación de empleos, en la producción de alimentos, su rápido crecimiento y así como factores de desarrollo regional (SAGARPA 2014 y ESACUA 2011).

Un aspecto de gran importancia en la acuicultura es la alimentación que debe darse a estos organismos y aunque en la actualidad se encuentran disponibles una gran variedad de alimentos balanceados, se ha observado a través del tiempo y diversas investigaciones, que dichos alimentos no poseen el nivel nutricional que las especies demandan para su crecimiento óptimo; otra limitante que se observa en cuanto a los alimentos inertes, es el elevado costo para su adquisición (Castro et al. 2003). Es por esto que la investigación orientada hacia los microorganismos como fuente de alimento, está en pleno desarrollo, donde los cultivos masivos de microalgas, rotíferos, copépodos y cladóceros son la base de la producción comercial (Torretera y Tacon 1989).

En las últimas décadas se ha considerado a los rotíferos como una alternativa en la alimentación, dada por su aporte nutricional, su rápido desarrollo y fácil cultivo (Castro et al. 2003), así como su gran capacidad de sobrevivencia en amplios intervalos de temperatura y salinidad (Lubzens 1987).

Dentro de los rotíferos utilizados como alimento vivo, se encuentran los del género *Brachionus*, el cual ha demostrado tener potencial para la manutención y desarrollo de especies

Producción controlada de *Brachionus patulus*

Espinoza-Barrera U, Flores-Arizmendi AK, González-Pérez A, González-Velasco CJ, Castro-Mejía J, Castro-Mejía G y Castañeda-Trinidad H.

acuáticas, en especial en las etapas larvales (Hung 1989). Específicamente *B. patulus*, es una especie considerada para su cultivo masivo y su uso como alimento vivo, dado que presenta una rápida maduración, corto tiempo generacional, elevada fecundidad y sus huevos, cuando son producidos, presentan un alto porcentaje de eclosión (Hernández et al. 2000).

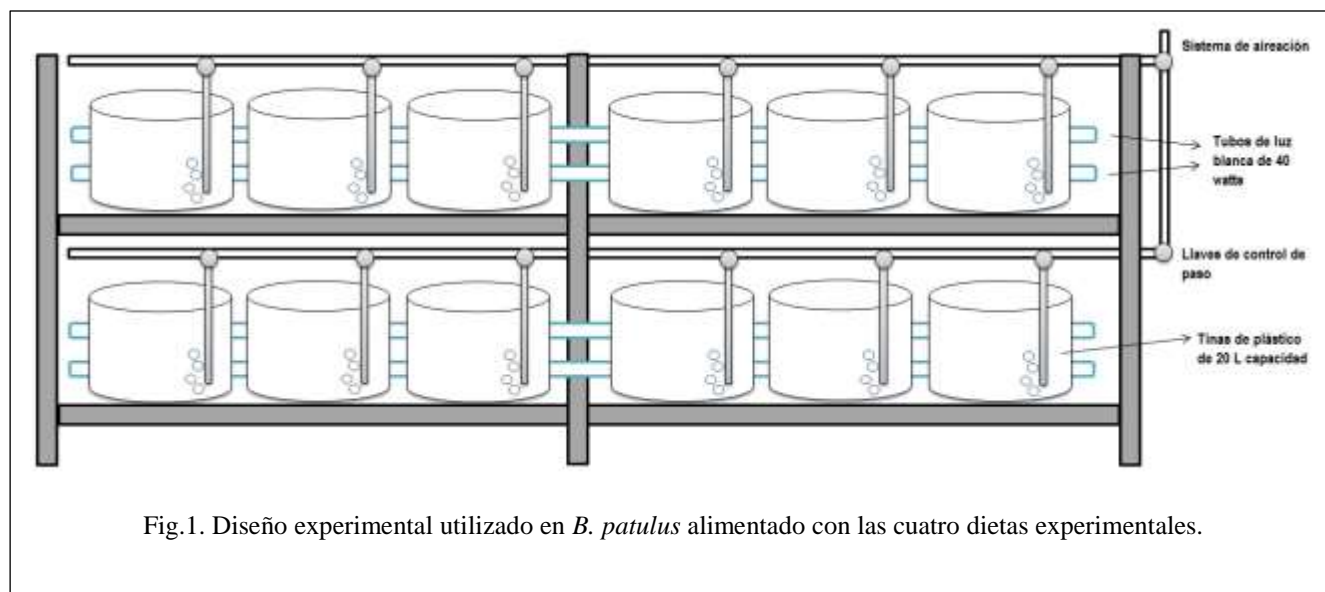
No obstante ante la facilidad de producción de rotíferos, el mayor inconveniente es el conseguir el alimento adecuado para estos, sobre todo cuando la salinidad del cultivo se mantiene a los  $10 \text{ gL}^{-1}$  o se utilizan rotíferos de agua dulce. Por tanto el objetivo de este trabajo es comparar el crecimiento en cultivo del rotífero *Brachionus patulus*, al emplear como alimento diferentes tipos de microalga de agua dulce: *Chorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* y *Sphaerocystis* sp.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Diseño experimental:** Se utilizaron 12 cilindros de plástico con capacidad de 20 L, de los cuales se destinaron tres para cada dieta (Fig.1). La temperatura se controló en el ambiente a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y el pH entre 7-8. La aireación se mantuvo constante, con un flujo de aire mínimo, solo para mantener el

medio en circulación constante. La salinidad se mantuvo en  $10 \text{ gL}^{-1}$ . Al inicio del experimento se pusieron 250 mL de un cultivo de rotíferos a una densidad de  $63 \text{ organismos mL}^{-1}$ , obtenidos del Laboratorio de Alimento Vivo de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. Los organismos se alimentaron con cuatro dietas a base de microalgas verdes unicelulares: a) *Chlorella vulgaris*; b) *Haematococcus pluvialis*; c) *Sphaerocystis* sp. y d) combinación de las tres microalgas anteriores en partes iguales. Cada tercer día, los rotíferos de los cilindros fueron contados para determinar su densidad poblacional. El cultivo se mantuvo en estas condiciones, hasta observar la mortalidad de los organismos.

**Alimentación:** Para la alimentación de las poblaciones de *Brachionus patulus* se utilizaron tres especies de microalgas verdes unicelulares: *Chlorella vulgaris*, *Sphaerocystis* sp. y *Haematococcus pluvialis*. Las cuales fueron cultivadas en garrafones de plástico de 20 L, inoculados con una cepa de microalgas conservadas en agar bacteriológico. Los garrafones de las microalgas fueron fertilizadas con 10 mL de Triple 17 (50 g en 500 mL de agua) y 5 mL de Urea (1 Kg en 4 L de agua). La temperatura se mantuvo en  $19\text{-}20^\circ\text{C}$  y luz (foco de luz blanca de 40 watts) y aireación constante. Cada semana los garrafones de



los cultivos de las microalgas se desdoblaron para mantener una concentración óptima de 500 – 750 x 10<sup>3</sup> células por mL. Cada tercer día se inocularon de cada una de las microalgas 600 mL del medio de cultivo. En el caso de la dieta combinada, de cada una se tomaron 200 mL para completar los 600 mL de alimento inoculado. A todas las garrafrones de cada dieta experimental se le agregó cada tercer día 1 mL de levadura activa seca (10 g en 4 L de agua a 90 g L<sup>-1</sup> de sal).

**Muestreo:** Cada tercer día, de cada uno de los recipientes de cultivo, se tomó una muestra de 100 mL de la cual se tomaron 10 muestras de 1 mL para obtener un promedio ( $\pm$  D.S.) de la densidad poblacional, con la ayuda de una micropipeta marca Bio Hit de 1000 $\mu$ l. Cada submuestra fue fijada con Lugol (10%) y se procedió a contar los organismos con la ayuda de un microscopio estereoscópico Olympus. Los muestreos de densidad continuaron

hasta que la población de rotíferos decayó en su totalidad.

**Procesamiento de datos:** Con los datos obtenidos de cada muestreo, se procedió a realizar una base de datos en Excel 2010 para determinar, por muestreo, el promedio de individuos por mililitro. Asimismo, se procedió a obtener la curva de tendencia poblacional de cada una de las dietas experimentales.

## RESULTADOS

Los valores promedio ( $\pm$ D.S.) de la densidad poblacional por dieta experimental utilizada y por día de cultivo, se presentan en la Tabla 1. Se puede observar en todos los cultivos que la población de *Brachionus patulus*, decae al día 21 de cultivo. La mayor producción de organismos en los cultivos se

Tabla 1. Valores promedio ( $\pm$ D.S.) de la densidad de los organismos (org mL<sup>-1</sup>) por día de cultivo, alimentados con las dietas experimentales.

Día de cultivo	Dieta utilizada			
	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Sphaerocystis</i> sp.	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Combinada
0	63 <sup>a</sup> $\pm 4$	63 <sup>a</sup> $\pm 4$	63 <sup>a</sup> $\pm 4$	63 <sup>a</sup> $\pm 4$
3	66 <sup>a,b</sup> $\pm 4$	73 <sup>d</sup> $\pm 37$	74 <sup>b,c,d</sup> $\pm 24$	61 <sup>a,c</sup> $\pm 22$
6	88 <sup>a</sup> $\pm 12$	98 <sup>a</sup> $\pm 14$	110 <sup>a</sup> $\pm 76$	137 <sup>a</sup> $\pm 64$
9	105 $\pm 17$	424 $\pm 50$	438 $\pm 13$	352 $\pm 38$
12	74 $\pm 13$	476 <sup>a</sup> $\pm 10$	477 <sup>a</sup> $\pm 18$	346 $\pm 45$
15	45 $\pm 11$	185 <sup>a</sup> $\pm 28$	179 $\pm 29$	204 <sup>a</sup> $\pm 50$
18	98 <sup>a,b</sup> $\pm 18$	84 <sup>b</sup> $\pm 26$	103 <sup>a</sup> $\pm 17$	314 $\pm 35$
21	60 $\pm 16$	93 $\pm 12$	123 $\pm 19$	173 $\pm 22$

Letras iguales en fila no presentan diferencias significativas (P>0.05).

presenta en los días 9 a 12. Las dietas con mayor producción de individuos fue la de *Sphaerocystis* sp. y *Haematococcus pluvialis* con 476 y 477 org mL<sup>-1</sup> respectivamente. La de menor densidad fue en la que se empleó la microalga *Chlorella vulgaris* con 105 org mL<sup>-1</sup>. A partir del día 15 de cultivo, la densidad comienza a disminuir hasta que la población muere en su totalidad. El cultivo de *B. patulus* alimentado con la combinación de microalgas, presenta al final (15-21 días de cultivo) una mayor estabilidad en la densidad de organismos.

Las letras del análisis de varianza (ANDEVA) entre las dietas por día de muestreo, no mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) (Tabla 1), mientras que el ANDEVA por muestreo por dieta se muestra en la Fig. 2.

Las curvas de la tendencia del crecimiento

poblacional, se presentan en la Fig. 3. En todas las dietas la fórmula que se presentó fue una curva polinómica de grado seis.

## DISCUSIÓN

El incremento de la densidad de *B. patulus* observado en este experimento utilizando la microalga *Chlorella vulgaris* fue de tan solo 166% más de la densidad inicial a los nueve días de cultivo; mientras que para la dieta con *Sphaerocystis* sp. fue de 755% con respecto a la inicial y de 757% con *H. pluvialis*, ambas a los 12 días de cultivo; con respecto a la dieta con la combinación de las tres microalgas se alcanzó un incremento de 549% con respecto al inicial, también a los días 12 de cultivo, obteniendo densidades entre

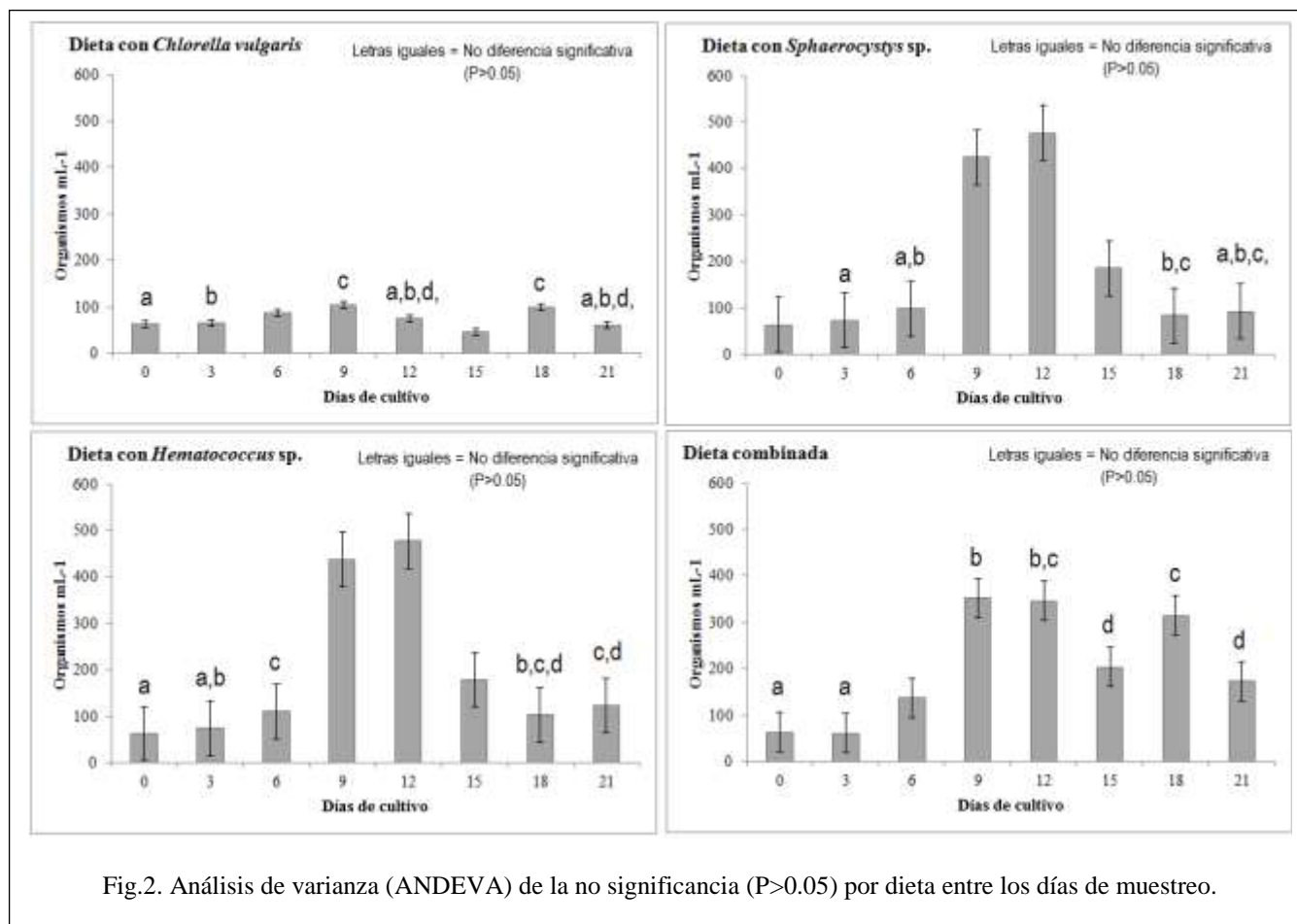


Fig. 2. Análisis de varianza (ANDEVA) de la no significancia ( $P > 0.05$ ) por dieta entre los días de muestreo.

346-477 org mL<sup>-1</sup>, mientras que para *Chlorella vulgaris* entre 98-105 org mL<sup>-1</sup> en los 21 días que duró el cultivo. Estas densidades obtenidas de *B. patulus* para este experimento y con estas dietas, están por arriba de las densidades encontradas por otros autores.

Sarma et al. (2001a), trabajando con *B. patulus* alimentado con una microalga a dos concentraciones diferentes (100 x 10<sup>3</sup> y 300 x 10<sup>3</sup> cel mL<sup>-1</sup>); una levadura y la combinación de ambas dietas, obtuvieron densidades por debajo de lo encontrado en este experimento, ya que estos autores encontraron en 14 días de cultivo a una concentración de 100 x 10<sup>3</sup> cel mL<sup>-1</sup> de microalgas, una densidad de 109 ± 26 org mL<sup>-1</sup>; mientras que a 300 x 10<sup>3</sup> cel mL<sup>-1</sup> de microalgas una densidad de 296 ± 20 org mL<sup>-1</sup>; con la levadura como dieta una densidad entre 50-97 rotíferos mL<sup>-1</sup> y para la dieta

combinada entre 251-259 rotíferos mL<sup>-1</sup>. Esta diferencia en las densidades obtenidas en este experimento, se debe principalmente a la concentración de microalgas utilizadas (500 x 10<sup>3</sup> cel mL<sup>-1</sup>), ya que la diferencia va entre 200-400 x 10<sup>3</sup> cel mL<sup>-1</sup>.

Sarma et al. (2001b), con *B. patulus* alimentado con *Chlorella* sp. a dos concentraciones diferentes 5 x 10<sup>5</sup> y 15 x 10<sup>5</sup> cel mL<sup>-1</sup>, encontraron que a menor concentración de la microalga obtenían una mayor densidad (400 org mL<sup>-1</sup>) que a la concentración mayor (200 org mL<sup>-1</sup>), densidades semejantes a las obtenidas con *Chlorella* sp. en esta investigación, pero por debajo de las otras dos microalgas y la dieta combinada.

Peredo-Alvarez et al. (2003), trabajaron con *B. patulus* a una salinidad entre 1-5 g L<sup>-1</sup>, alimentado con la microalga *C. vulgaris* a una concentración de

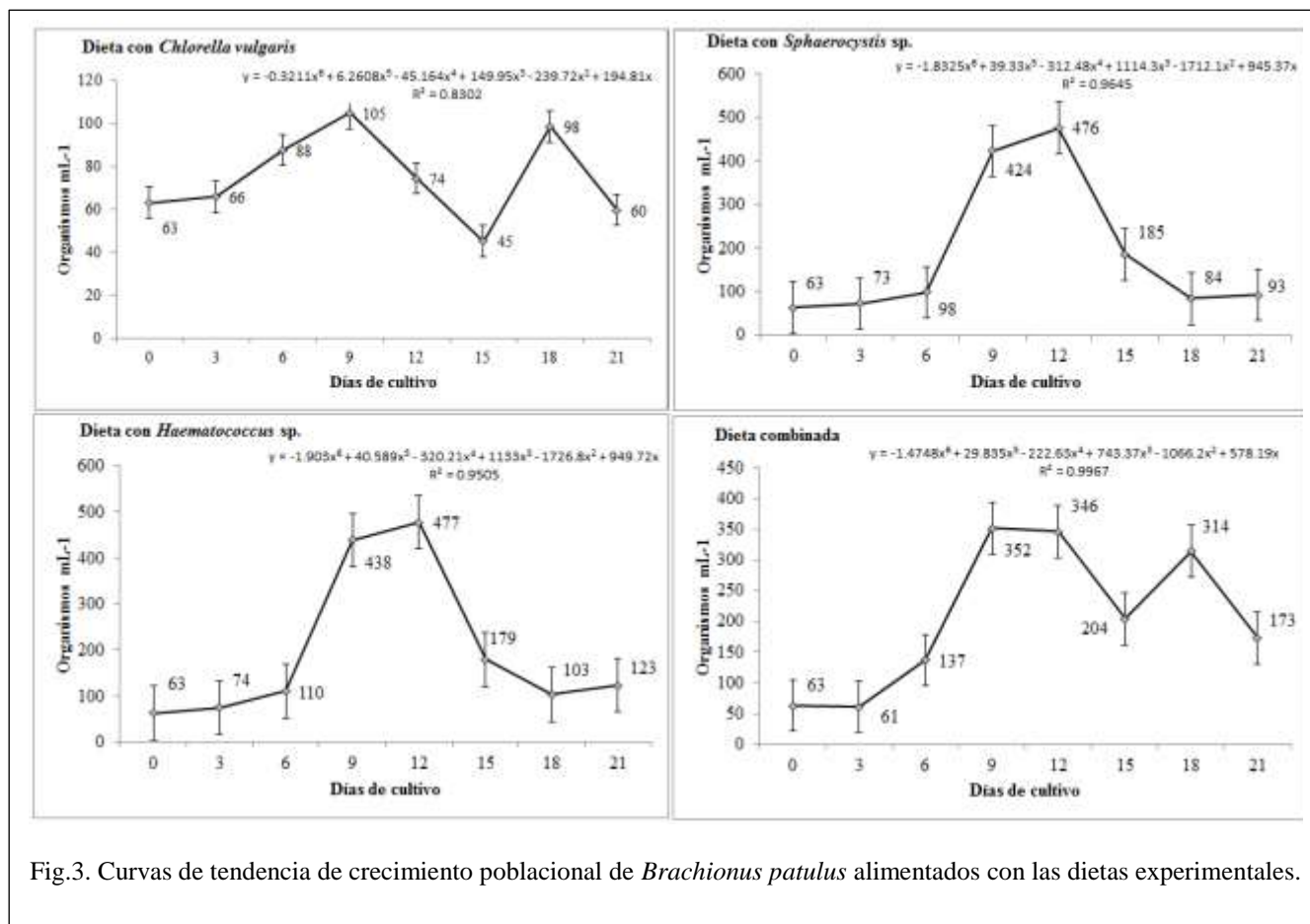


Fig.3. Curvas de tendencia de crecimiento poblacional de *Brachionus patulus* alimentados con las dietas experimentales.



45 x 10<sup>5</sup> cel mL<sup>-1</sup>, obtuvieron valores más cercanos a esta investigación con una densidad máxima de 397 ±7 org mL<sup>-1</sup> (72 org mL<sup>-1</sup> menos). Los días de cultivo en donde se obtuvo el pico máximo a los 11 días a diferencia de los 12 días de este trabajo. Flores-Burgos et al. (2003), los cuales trabajaron con *B. patulus* y *B. calyciflorus* alimentados con una dieta 100% con *C. vulgaris*, 100% *Scenedesmus acutus* y una dieta 50:50% de las anteriores, obtuvieron densidades de 100-125 org mL<sup>-1</sup> con *C. vulgaris*, 60 org mL<sup>-1</sup> con *S. acutus* y con la dieta de 50:50% de 100 org mL<sup>-1</sup>. Valores semejante al obtenido por *C. vulgaris* en este experimento, pero por debajo de las densidades obtenidas con las otras dos microalgas y aún con la combinada, las cuales están 300% por arriba.

Sarma et al. (2007), trabajaron *B. patulus* en cultivos a 20 días, alimentados con *C. vulgaris* a dos concentraciones, una a 0.5 x 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> y la otra a 1.5 x 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup>. En estas dos concentraciones obtuvieron densidades de 40 y 100 org mL<sup>-1</sup> respectivamente. Estos autores mencionan que a una mayor concentración celular se obtiene una mayor densidad de rotíferos, aunque esto no se demuestra en esta investigación debido a que el aumento de la concentración a 5 x 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> se obtiene 105 org mL<sup>-1</sup> en el cultivo. Esto confirma con lo encontrado por Rueda (1993), en donde menciona que la densidad de los rotíferos no se incrementa o es muy poco en altas concentraciones de *C. vulgaris*, atribuyendo este fenómeno a que en el organismo se alcanza la máxima tasa de ingestión de microalgas y el organismo por lo tanto deja de consumirlas y por consiguiente a disminuir su densidad.

Autores como Hirayama (1987) y Maruyama (1997), mencionan que las poblaciones de rotíferos alimentados con *C. vulgaris* muestran una inestabilidad, porque ésta microalga tiene una deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> esencial para el cultivo de rotíferos. Esta vitamina B<sub>12</sub>, si se encuentra en la microalga *H. pluvialis* (Martínez 2010), en la cual se obtuvo una densidad máxima de 477 org mL<sup>-1</sup>. Esto mismo debe de estar sucediendo con la microalga *Sphaerocystis* sp. con 476 org mL<sup>-1</sup> en su pico máximo de densidad de cultivo.

Espinosa-Rodríguez et al. (2014), trabajaron también con *B. patulus* alimentados con *C. vulgaris* y *Pseudokirchneriella subcapitata*, encontraron

densidades de 150 y 60 org mL<sup>-1</sup> en cultivos de 14 días y 10 días respectivamente. La densidad obtenida con *C. vulgaris* es mayor a la densidad encontrada en este experimento con tan solo 98-105 org mL<sup>-1</sup> en sus picos máximos de producción.

La estabilidad en la densidad de los organismos de *B. patulus* alimentados con la dieta combinada confirman lo encontrado por Snell et al. (1983) y Snell y Carrillo (1984), atribuyendo esta condición a que la combinación de dos o más microalgas y el suministro de una dieta inerte (Salvatore y Mazzola 1981), permiten cubrir mejor los requerimientos nutricionales de los organismos en cultivo, en este caso de *B. patulus* y por consiguiente una mejor condición de bienestar de los mismos en el cultivo y mantener densidades entre 100-300 org mL<sup>-1</sup> en el cultivo aún a los 21 días de cultivo.

## CONCLUSIONES

Las microalgas *Sphaerocystis* sp. y *Haematococcus pluvialis*, permiten obtener densidades más altas de organismos que con *Chlorella vulgaris*. Asimismo, la combinación de estas tres microalgas, permite una mayor estabilidad en el cultivo en lo que respecta a la densidad, con una mayor duración del mismo (21 días) y no tan solo de 12 días con las otras dos microalgas y de tan solo nueve días con *C. vulgaris*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Castro BT, De Lara AR, Castro MG, Castro MJ, Malpica SA. (2003). Alimento vivo en acuicultura. Depto. El Hombre y su ambiente. División de CBS. UAM. Unidad Xochimilco. 27 – 33 p.
- ESACUA (2011). Informe de Acuicultura Continental, Asociación Española de Productores de Acuicultura Continental. Unión Europea. España. 43 p. Consulta en: <http://esacua.com/web/wp-content/uploads/2011/03/2010.informe.acuicultura.pdf>.
- Espinosa-Rodríguez CA, Rivera-De la Parra L, Sarma SSS, Nandini S. (2014). Effect of food density of *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella*

- vulgaris* on the population growth rates of four brachionid rotifers. *Inland Waters* 4: 271-278.
- Flores-Burgos F, Sarma SSS, Nandini S. (2003). Population Growth of Zooplankton (Rotifers and Cladocerans) Fed *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* in Different Proportions. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 31(3): 240-248.
- Hernández P, Martínez M, Prieto G. (2000). Aspectos reproductivos del rotífero (*Brachionus patulus* Müller 1786), en condiciones de laboratorio. Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de acuicultura 5 (2): 11.
- Hirayama K. (1987). A consideration of why mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* with baker's yeast is unstable. *Developments in Hydrobiology* 42: 269-270.
- Hung M. (1989). Ensayo de cultivo de una cepa de rotífero *Brachionus plicatilis* aislada en Venezuela. *Rev. Latinoamericana de Acuicultura* 40:83-112.
- Lubzens E. (1987). Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia* 147:245-255.
- Martínez SA. (2010). Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta:Volcanes) cultivada en diferentes medios. Doctorado en tecnología avanzada. Instituto Politécnico Nacional. Área de Alimentos. México, D.F. 91 p.
- Maruyama I, Nakao T, Shigeno I, Ando Y, Hirayama K. (1997). Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass culture of marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia* 358: 133-138.
- Peredo-Álvarez VM, Sarma SSS, Nandini S. (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). *Rev. Biol. Trop.* 51(2): 399-408.
- SAGARPA (2014). Desarrollo Tecnológico: Vinculación Productiva para el Desarrollo Tecnológico. La importancia de la tecnología acuícola. Comisión Nacional De Acuicultura Y Pesca (CONAPESCA), MÉXICO. Consulta en: [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/desarrollo\\_tecnologico](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/desarrollo_tecnologico).
- Salvatore G, Mazzola A. (1981). Mass culture of *Brachionus plicatilis* with one integrated system of *Tetraselmis suecica* y *Saccharomyces cerevisiae*. *J. World Maricul. Soc.* 12(2): 61-62.
- Sarma SSS, Larios-Jurado PS, Nandini S. (2001a). Effect of three food types on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Rev. Biol. Trop.* 49(1): 77-84.
- Sarma SSS, Nandini S, Ramírez- Pérez T. (2001b). Combined Effects of Mercury and Algal Food Density on the Population Dynamics of *Brachionus patulus* (Rotifera). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (2001) 67:841-847.
- Sarma SSS, Rivera SA, Elizalde FH, Nandini S. (2007). Combined Influence of Food Level and Inoculation Density on Competition between *Anuraeopsis fissa* and *Brachionus patulus* or *Brachionus macracanthus* (Rotifera: Brachionidae). *Russian Journal of Ecology* 38 (5): 353-362.
- Snell T, Carrillo K. (1984). Body size variation among strain of rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 37:359-367.
- Snell TW, Bieberich CJ, Fuer R. (1983). The effects of green and blue-green alga diets on the reproductive rate of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 31:21-30.
- Torrentera L, Tacon A. (1989). La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Documento de campo N° 12. Proyecto Aquila. FAO. 89 p.