



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**“Evaluación de la producción y uso del rotífero
Brachionus plicatilis en la larvicultura de *Litopenaeus*
vannamei”**

Tesis de Grado

Previa a la obtención del título de:

MAGISTER EN CIENCIAS

Presentado por:

GABRIEL MODESTO DURÁN COBO

Guayaquil – Ecuador

2002

TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:



FUNDACIÓN CENAIM-ESPOL



COOPERACIÓN TÉCNICA BELGA



UNIVERSIDAD DE GANTE
BÉLGICA



KATHOLIEKE UNIVERSITEIT
LEUVEN

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE LOBAINA – BÉLGICA

VITA

Gabriel Modesto Durán Cobo, hijo de Fanny Cobo y Agenor Durán, nació en Valledupar (Colombia) el 11 de diciembre de 1972. En 1990 obtiene el título de Bachiller en Ciencias Naturales en el Colegio Nacional Loperena de Valledupar, viaja a Barranquilla e ingresa en 1991 a la Universidad del Atlántico como estudiante de Ingeniería Química.

En 1993 la Universidad del Atlántico crea el programa de Biología al cual se vincula. Asiste a congresos y simposios en diversas áreas, colabora en el Departamento de Biología como monitor de Biología Celular en los programas de Nutrición y Dietética y Química y Farmacia, Biología y Educación en Biología y Química, y realiza pasantía en el programa de Calidad Ambiental Marina del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras de Colombia.

En junio de 1998 culmina los estudios de Biología y participa durante 15 meses en el proyecto de evaluación del recurso natural *Artemia* en las salinas del Caribe colombiano, bajo la dirección del Doctor William Camargo y auspicio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Universidad del Atlántico. En 1999 obtiene beca de la Cooperación Belga para estudiar la Maestría en la cual desarrolla el presente trabajo de tesis.

DECLARACIÓN EXPRESA

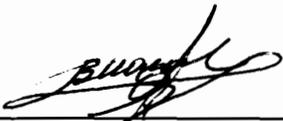
“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL.”

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).



Gabriel Modesto Durán Cobo

TRIBUNAL DE TESIS



Ing. Bolívar Vaca Romo
Presidente del Tribunal



Phillipe Dhert, Ph.D.
Director de Tesis



María de Lourdes Cobo, M.Sc.
Co-Director de Tesis
Miembro del Tribunal



Jorge Calderón V., Ph.D.
Miembro del Tribunal



Laurence Massaut, Ph.D.
Miembro del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

Doy Gracias a Dios, quién trajo mis pasos al Ecuador a través de la beca otorgada por la Cooperación Técnica Belga.

Agradezco además al Dr. Jorge Calderón y a la Dra. Laurance Massaut, coordinadores del programa de Maestría; al Dr. Philippe Dhert, promotor de la presente Tesis de Grado; al igual que a los Biólogos María de Lourdes Cobo, *M. Sc.*, co-promotora de la presente Tesis y William Camargo, *Ph. D.*, del Centro de Investigaciones y Acuicultura de Illinois (E. E. U. U.). Gracias por la energía y ánimos brindados en los momentos más difíciles!

También expreso mis agradecimientos al Ingeniero acuicultor Javier Santacruz, al Biólogo Rubén Román, a María Panchana, Julio Baque, Víctor Orrala y demás personas del Departamento de Plancton del CENAIM. Su colaboración favoreció la realización de los experimentos del presente estudio.

Además el agradecimiento a mi madre, hermanos y familiares, por el apoyo brindado a pesar de la distancia; al tío Henry, quien me inspiró superación en todo momento, de vivir, compartiría la alegría de la meta alcanzada con esta maestría; a mi esposa Gianella y sus familiares, por su afecto y apoyo, encontrado a tanta distancia de la patria donde nació.

TABLA DE CONTENIDO

Página No.

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. ASPECTOS GENERALES DE <i>Brachionus plicatilis</i>	3
2.1.1. Ciclo de vida	4
2.1.2. Taxonomía	5
2.2. IMPORTANCIA DE <i>Brachionus plicatilis</i>	5
2.2.1. Descubrimiento e importancia en la larvicultura	5
2.2.2. Valor nutricional.....	6
2.3. CONDICIONES GENERALES DEL CULTIVO.....	6
2.3.1. Salinidad	6
2.3.2. Temperatura	7
2.3.3. Oxígeno disuelto.....	7
2.3.4. pH	7
2.3.5. Amonio (NH ₃).....	7
2.3.6. Presencia de microbios	7
2.4. PRODUCCIÓN DE <i>Brachionus plicatilis</i>	8
2.4.1. Dietas	8
2.4.1.1. Algas.....	8
2.4.1.2. Levaduras.....	9

2.4.2. Densidad de siembra.....	10
2.4.3. Sistemas de cultivo	10
2.5. IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS EN LA PRODUCCIÓN DE <i>Brachionus plicatilis</i>	11
2.6. PRESERVACIÓN DE <i>Brachionus plicatilis</i>	13
2.7. USO DE <i>Brachionus plicatilis</i> EN LA LARVICULTURA DE CAMARONES	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. CONDICIONES EXPERIMENTALES	16
3.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LOS MORFOTIPOS SS, S, L Y XL.....	17
3.2.1. Evaluación de la producción en cultivos alimentados con <i>N. oculata</i>	17
3.2.2. Evaluación de la producción en cultivos alimentados con CS.....	17
3.3. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROTÍFEROS A PARTIR DE DIFERENTES DIETAS	18
3.3.1. Evaluación del uso de microalgas vivas y criopreservadas	18
3.3.2. Evaluación del uso de levaduras	19
3.3.3. Evaluación del uso de combinaciones de levaduras y microalgas	19
3.4. EVALUACIÓN DEL USO DE BACTERIAS NITRIFICANTES Y <i>Vibrio</i> <i>alginolyticus</i> EN LA PRODUCCIÓN DE <i>Brachionus plicatilis</i>	20
3.5. EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRESERVACIÓN DE <i>Brachionus plicatilis</i> Y SU USO EN LA LARVICULTURA DE <i>Litopenaeus</i> <i>vannamei</i>	21
3.5.1. Evaluación de métodos de preservación.....	21
3.5.1.1. Preservación por liofilización	21



3.5.1.2. Preservación por inmersión en nitrógeno líquido	22
3.5.1.3. Preservación por congelación sin preservantes	22
3.5.1.4. Preservación por congelación utilizando preservantes	22
3.5.2. Evaluación del uso en larvicultura	22
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
4. RESULTADOS	26
4.1. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LOS MORFOTIPOS SS, S, L Y XL.....	26
4.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROTÍFEROS A PARTIR DE DIFERENTES DIETAS	27
4.2.1. Evaluación del uso de microalgas vivas y criopreservadas	27
4.2.2. Evaluación del uso de levaduras	28
4.2.3. Evaluación del uso de combinaciones de levaduras y microalgas	29
4.3. EVALUACIÓN DEL USO DE BACTERIAS NITRIFICANTES Y <i>Vibrio</i> <i>alginolyticus</i> EN LA PRODUCCIÓN DE <i>Brachionus plicatilis</i>	30
4.4. EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRESERVACIÓN DE <i>Brachionus plicatilis</i> Y SU USO EN LA LARVICULTURA DE <i>Litopenaeus</i> <i>vannamei</i>	30
4.4.1. Evaluación de métodos de preservación.....	30
4.4.2. Evaluación del uso en larvicultura	31
5. DISCUSIÓN.....	34
5.1. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LOS MORFOTIPOS SS, S, L Y XL.	34
5.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN A PARTIR DE DIFERENTES DIETAS.....	35
5.2.1. Evaluación del uso de microalgas vivas y criopreservadas	35



5.2.2. Evaluación del uso de levaduras	36
5.2.3. Evaluación de combinaciones de levaduras y microalgas	38
5.3. EVALUACIÓN DEL USO DE BACTERIAS NITRIFICANTES Y <i>Vibrio</i> <i>alginolyticus</i> EN LA PRODUCCIÓN DE <i>Brachionus plicatilis</i>	39
5.4. EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRESERVACIÓN DE <i>Brachionus plicatilis</i> Y SU USO EN LARVICULTURA DE <i>Litopenaeus</i> <i>vannamei</i>	41
5.4.1. Evaluación de métodos de preservación.....	41
5.4.2. Evaluación del uso en larvicultura	41
6. CONCLUSIONES	46
7. REFERENCIAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Brachionus plicatilis</i> indicando sus órganos (modificado de Dhert 1996).....	3
FIGURA 2. Ciclo de vida de <i>Brachionus plicatilis</i> (modificado de Dhert 1996).....	4
FIGURA 3. Aparato utilizado para realizar la prueba de nado en contracorriente (modificado de Santacruz y Cobo 2001).....	24
FIGURA 4. Porcentajes de supervivencia de PL ₁₂ de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentadas con <i>Brachionus plicatilis</i> vivos y preservados durante 15 días	31

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Clasificación taxonómica de <i>Brachionus plicatilis</i> (Según Suzuki 1964)	5
TABLA 2. Experimentos realizados para la evaluación de la producción de los morfotipos SS, S, L y XL del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i>	17
TABLA 3. Tratamientos y raciones establecidos en el experimento realizado para evaluar la producción de rotíferos a partir de diferentes microalgas	18
TABLA 4. Tratamientos y raciones establecidos en el experimento realizado para evaluar la producción de rotíferos a partir de diferentes levaduras	19
TABLA 5. Tratamientos y raciones establecidos en el experimento realizado para evaluar la producción de rotíferos a partir de combinaciones de levaduras y microalgas	20
TABLA 6. Tratamientos establecidos para la evaluación del uso de bacterias nitrificantes y <i>Vibrio alginolyticus</i> en la producción de <i>Brachionus plicatilis</i>	20
TABLA 7. Tratamientos establecidos para la evaluación del uso del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> en la larvicultura de <i>Litopenaeus vannamei</i>	23
TABLA 8. Densidad (rotíferos/mL) y tasa específica de crecimiento (TEC) presentada por los morfotipos de <i>Brachionus plicatilis</i> al cuarto día de cultivo, durante las tres repeticiones del experimento con <i>Nannochloropsis oculata</i>	26
TABLA 9. Densidad (rotíferos/mL) y tasa específica de crecimiento (TEC) presentada por los morfotipos de <i>Brachionus plicatilis</i> al cuarto día de cultivo, durante las tres repeticiones del experimento con <i>Culture Selco</i> [®]	27

TABLA 10. Densidad (rotíferos/mL) y tasa específica de crecimiento (TEC) presentadas por *Brachionus plicatilis* al cuarto día de cultivo, durante la evaluación del uso de microalgas vivas y criopreservadas28

TABLA 11. Densidad (rotíferos/mL) y tasa específica de crecimiento (TEC) presentada por *Brachionus plicatilis* al cuarto día de cultivo, durante la evaluación del uso de levaduras....29

TABLA 12. Densidad (rotíferos/mL) y Tasa específica de crecimiento (TEC) presentada por *Brachionus plicatilis* al cuarto día de cultivo, durante la evaluación del uso de combinaciones de levaduras y microalgas29

TABLA 13. Niveles de amonio total como Nitrógeno (mg/L), pH, densidad (rotíferos/mL) y tasa específica de crecimiento (TEC) de *Brachionus plicatilis* tratados con *Vibrio alginolyticus*, bacterias nitrificantes (BN) y combinaciones de bacterias.....30

TABLA 14. Porcentajes de supervivencia y resistencia* de PL₁₂ de *Litopenaeus vannamei*, alimentadas con diferentes tratamientos de *Brachionus plicatilis*, sometidas a cuatro pruebas de estrés32

TABLA 15. Resultados del análisis de correlación simple de *Spearman* aplicado a los porcentajes de supervivencia y resistencia de las PL₁₂ de *Litopenaeus vannamei* a las pruebas de estrés y el porcentaje de supervivencia en larvicultura33

LISTA DE ABREVIATURAS

AGAI.- Ácidos grasos altamente insaturados.

BDC.- Cultivos en sistema de recolección completa con densidad constante (*Bacth* a densidad constante).

BN.- Bacterias nitrificantes.

BCV.- Cultivos en sistema de recolección completa (batch) con volumen constante (*Bacth* a volumen constante).

cels/mL.- Células por mililitro.

Com. Per.- Comunicación personal.

CS.- Culture Selco®.

DMSO.- Dimetilsulfóxido.

g.- Gramo.

g/L.- Gramo por litro.

L.- 1.) Litros, 2.) Sigla en inglés, indica rotíferos de morfotipo grande (*large*).

$\ln N_d$.- Logaritmo natural del número de individuos en el día d.

$\ln N_0$.- Logaritmo natural del número de individuos en el día 0.

m^3 .- Metros cúbicos.

mg/L.- Miligramos por litro.

N_5 .- nauplio 5.

μL .- Microlitro.

PL₁.- Postlarva 1.

PL₂.- Postlarva 2.

PL₄.- Postlarva 4.

PL₁₂.- Postlarva 12.

ppm.- Partes por millón.

rotíferos/mL.- Rotíferos por mililitro.

rpm.- Revoluciones por minuto.

S.- Sigla en inglés, indica rotíferos de morfotipo pequeño (*small*).

SNA.- Substitución de nauplios de *Artemia*.

SS.- Sigla en inglés, indica rotíferos de morfotipo muy pequeño (*super small*).

TAN.- Sigla en inglés, indica Amonio total como Nitrógeno (*Total Ammonia Nitrogen*).

TEC.- Tasa específica de crecimiento.

UFC.- Unidades formadoras de colonias.

UFC/mL.- Unidades formadoras de colonias por mililitro.

$\frac{v}{v}$.- volumen sobre volumen.

vs.- versus.

XL.- Sigla en inglés, indica rotíferos de morfotipo extra grande (*extra large*).

RESUMEN

Se evaluó el crecimiento de los morfotipos S, SS, L y XL del rotífero *Brachionus plicatilis* en dos experimentos con tres repeticiones, alimentando respectivamente con la microalga *Nannochloropsis oculata* y la dieta artificial *Culture Selco*[®] (CS). En las repeticiones del experimento con *N. oculata* sobresalió el morfotipo L ($p < 0,05$), igualado durante la primera y segunda repetición respectivamente por los morfotipos S y XL; en la tercera repetición sobresalió el morfotipo XL ($p < 0,05$), igualado por el morfotipo L, el que a su vez fue igualado por el morfotipo SS. En las repeticiones del experimento con CS sobresalió el morfotipo SS ($p < 0,05$), igualado por el morfotipo L en la primera repetición, y por los morfotipos S y XL en las siguientes repeticiones.

En un segundo estudio, se evaluó la producción de *B. plicatilis* a partir del uso de microalgas vivas y criopreservadas suministradas en monodietas y combinaciones, de diferentes levaduras como sustituto de las microalgas, y de combinaciones de levaduras y microalgas. Las mayores tasas específicas de crecimiento ($p < 0,05$) fueron presentadas por los rotíferos alimentados con las microalgas vivas: *Tetraselmis maculata*, *Isochrysis galbana*, *N. oculata* + *I. galbana*, *N. oculata* + *T. maculata* y *T. maculata* + *I. galbana*; con las microalgas criopreservadas: *T. maculata* y *N. oculata* + *T. maculata*; con las levaduras: CS, *Levapán*[®] fresca y *Levapán*[®] seca; y con las combinaciones de levaduras y microalgas: *Candida glabrata* (levadura marina) + *T. maculata*, *C. glabrata* + *N. oculata*, CS + *N. oculata* y CS + *T. maculata*.

En un tercer estudio, cultivos de rotíferos alimentados con la levadura *Levapán*[®] fueron diariamente inoculados a una concentración de 1×10^5 UFC/mL con bacterias nitrificantes

y una cepa probiótica de *Vibrio alginolyticus*. Los cultivos tratados con estas bacterias no presentaron diferencias significativas con el grupo control, en cuanto a las tasas específicas de crecimiento de los rotíferos, los niveles amonio total y pH.

Rotíferos enriquecidos con DHA *Selco*[®] fueron preservados mediante liofilización, congelación por inmersión en nitrógeno líquido y congelación a -4, -20 y -80 °C sin preservantes y con los preservantes dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y metanol al 10%. Los rotíferos congelados no presentaron daño en las lóricas, mientras los liofilizados presentaban lóricas severamente deterioradas.

Finalmente, en un experimento de 13 tratamientos, larvas de *Litopenaeus vannamei* fueron alimentadas con rotíferos vivos al 50% (control) de sustitución de nauplios de *Artemia* (SNA), 100% de SNA, y los rotíferos preservados, también al 50% de SNA desde Zoea 2 hasta PL₄; la supervivencia en el estadio PL₁₂ fue el parámetro de evaluación considerado. Adicionalmente, se aplicaron pruebas de estrés osmótico, por formalina, osmótico combinado con formalina y de resistencia al nado en contracorriente. La supervivencia del grupo control (71,9%) fue significativamente superior ($p < 0,05$) a los demás grupos, los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí. De igual modo, al nivel $\alpha = 0,05$ no se observó correlación significativa entre la supervivencia de las PL₁₂ alimentadas con las diferentes aplicaciones de rotíferos y los resultados de las pruebas de estrés.

1. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo inicial de la acuicultura de camarones en Ecuador, la industria dependió totalmente de las postlarvas silvestres capturadas por pescadores artesanales. En los años 1982 y 1983 el fenómeno del Niño provocó la abundancia de postlarvas silvestres, la cual disminuyó dos años después. Esta situación trajo como consecuencia el establecimiento de laboratorios para la producción de postlarvas de *L. vannamei* (Stern 1995). Producción que requiere del uso de alimento vivo (fitoplancton y zooplancton) debido a su alto contenido de aminoácidos, ácidos grasos esenciales y enzimas digestivas (Lavens y Sorgeloos 1996). El uso de estos organismos mejora la supervivencia y crecimiento de las larvas, las cuales no podrían aprovechar los nutrientes presentes en las dietas inertes (Dhert *et al.* 2001) debido a que durante los primeros estadios larvales de los crustáceos existe una pobre actividad a nivel de tracto digestivo, el cual será funcional a partir de los estadios postlarvales (Jones *et al.* 1997).

La *Artemia* ha sido el zooplancton más utilizado en la producción de postlarvas de camarón. Sin embargo, a medida que la acuicultura se expande, su demanda (quistes, biomasa viva, congelada, etc.) supera la oferta, que en un 90% depende de las extracciones realizadas en el Gran Lago Salado de Utah (E.E.U.U.). Éstas varían con las condiciones ambientales, que eventualmente son desfavorables (Vinatea 1999). Las variaciones de las condiciones ambientales además de producir colapsos que incrementan los precios, obligan a la a modificación de los protocolos empleados en larvicultura (Sorgeloos y Lavens 1998), lo cual puede afectar la calidad de las postlarvas producidas debido a un deficiente suministro de alimento vivo (Cobo, Com. Per.).

Por lo anterior, como una alternativa a la necesidad de alimento vivo para la larvicultura de *L. vannamei* se presenta al rotífero *B. plicatilis*, el cual puede ser producido a altas densidades en condiciones controladas (Dhert 1996). Además, debido a su pequeña talla, lento desplazamiento, habilidad de permanecer suspendido en la columna del agua, y de bioencapsular sustancias nutritivas y profilácticas en menor tiempo que la *Artemia*, es ideal como alimento vivo (Lubzens *et al.* 1989). Los beneficios de su empleo en la larvicultura de camarones peneídos incluyen mayores supervivencias, disminución del requerimientos de nauplios de *Artemia* (Ulloa 1992, Yamasaki e Hirata 1982), aumento del índice de estadio larvario, del peso seco de las postlarvas y de la resistencia a las pruebas de estrés osmótico (CENAIM 1993b y Naessens *et al.* 1993).

Pese a ser producido y empleado en la larvicultura comercial del CENAIM desde 1999 (Cobo, Com. Per.), el uso de *B. plicatilis* en Ecuador ha sido subestimado debido principalmente a las grandes cantidades de rotíferos requeridas durante la larvicultura, alto requerimiento de microalgas e infraestructura para su cultivo, y la ocurrencia de colapsos que ocasionalmente se presentan en los cultivos. Por ello, con el ánimo de impulsar su uso en la producción de postlarvas de *L. vannamei*, fueron realizados diferentes estudios orientados a la evaluación de su producción, preservación y uso en larvicultura de *L. vannamei*.

2. ANTECEDENTES

2.1. ASPECTOS GENERALES DE *Brachionus plicatilis*

B. plicatilis es un rotífero de aguas salobres compuesto de aproximadamente 1000 células. Estos filtran pequeñas partículas de la columna del agua (bacterias o microalgas) por medio de la corona de cilios localizada en la región anterior del cuerpo (figura 1) que además usan para la locomoción (Fulks y Main 1991).

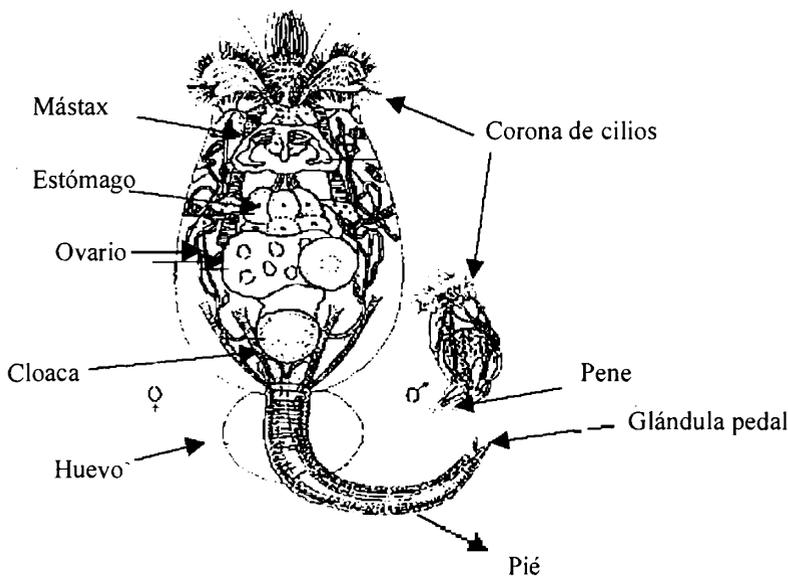


Figura 1. *Brachionus plicatilis* indicando sus órganos (modificado de Dhert 1996).

El rango de talla está entre 100 y 340 μm , y su incremento se debe sólo al incremento del plasma celular. La epidermis se compone de una densa capa de queratina y proteínas, la lóricas. La forma de la lóricas y el perfil de las espinas y ornamentos permiten la determinación de las diferentes especies y morfotipos. Suzuki (1964) y Fukusho (1989a) afirman que el tipo de espinas (agudas u obtusas) permiten identificar subespecies.

2.1.1. **Ciclo de vida.** El ciclo de vida comprende la vía partenogenética y la vía sexual (figura 2). En la primera, que ocurre en condiciones ambientales normales, las hembras producen huevos diploides ($2n$), que dan lugar a hembras genéticamente iguales a sus progenitoras. La vía sexual ocurre en condiciones desfavorables como respuesta fisiológica a la calidad del agua, altas densidades de cultivo y cambios en la cantidad y/o calidad del alimento (Lubzens *et al.* 1985). En este caso se producen hembras míticas y amícticas. Aunque ambas no son morfológicamente diferentes, las hembras míticas producen huevos haploides (n) que originarán machos haploides, predominando la reproducción sexual y la producción de huevos resistentes, que estarán en latencia hasta cuando las condiciones ambientales sean mejoradas (Dhert 1996, Fulks y Main 1991 y Fukusho 1989a).

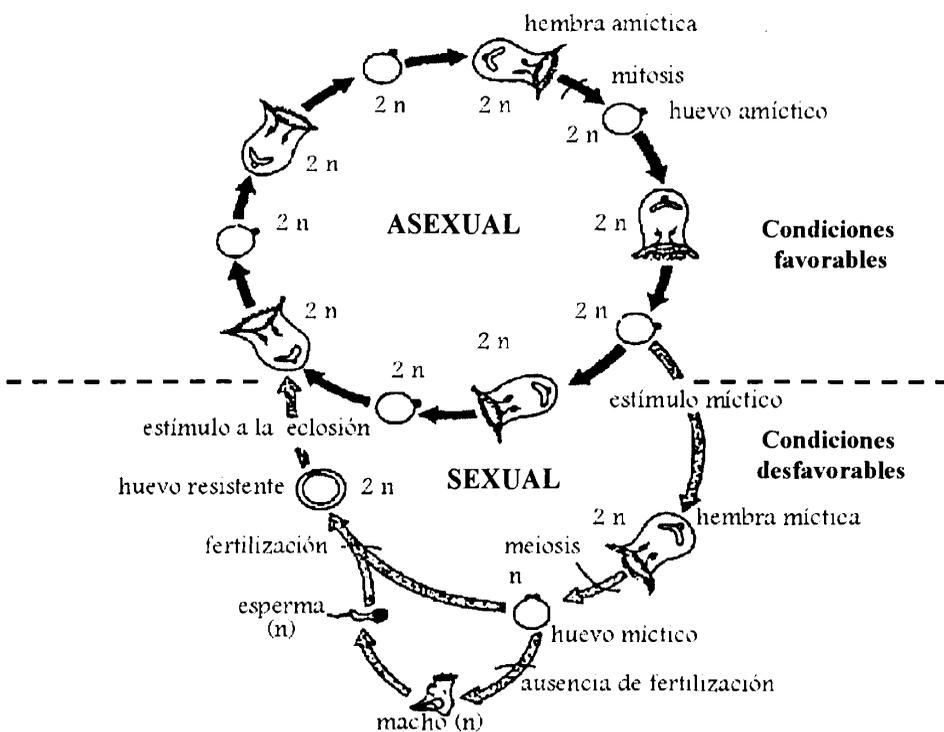


Figura 2. Ciclo de vida de *Brachionus plicatilis* (modificado de Dhert 1996).

2.1.2. **Taxonomía.** La clasificación considerada para este estudio es la de Suzuki (1964) que agrupa a los rotíferos dentro del phylum *Aschelminthes* (Tabla 1) y a *B. plicatilis* como un complejo de subespecies con diferencias morfológicas entre sí.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Brachionus plicatilis* (Según Suzuki 1964).

Phylum: <i>Aschelminthes</i>
Clase: <i>Rotatoria</i>
Subclase: <i>Eurotatoria</i>
Orden: <i>Monogonota</i>
Sección: <i>Brachionida</i>
Familia: <i>Brachionidae</i>
Género: <i>Brachionus</i>
Especie: <i>Brachionus plicatilis</i>

2.2. IMPORTANCIA DE *Brachionus plicatilis*

2.2.1. **Descubrimiento e importancia en la larvicultura.** Aunque *B. plicatilis* está presente en aguas marinas y estuarinas, pudiendo formar parte de la dieta natural de las larvas silvestres, originalmente fue reconocido por los japoneses como un organismo dañino para los cultivos de anguilas, pues por su alta tasa reproductiva agotaban el oxígeno de los estanques de cultivo (Fukusho 1989a). Este fenómeno fue llamado “desnaturalización del agua” y para prevenirlo se realizaron diferentes estudios entre los años 1950 y 1960. De estos estudios se concluyó que por el contrario, su uso en la larvicultura de peces mejoraba la supervivencia de las larvas, siendo utilizados por primera vez en 1965 para alimentar larvas del pez *Pargus major* (Fukusho 1989a).

B. plicatilis es ideal como alimento vivo debido a su pequeña talla, lento desplazamiento, habilidad de estar suspendidos en la columna de agua, facilidad relativa de cultivar a altas densidades y de bioencapsulación de sustancias nutritivas o profilácticas (Lubzens *et al.*



1989 y Lubzens 1987). Su uso está muy extendido en la larvicultura de peces y crustáceos marinos, siendo esencial en los programas de larvicultura de peces marinos (Dhert, 1996).

2.2.2. **Valor nutricional.** La composición bioquímica y valor nutricional es determinada por la dieta. Watanabe *et al.* (1983) observaron que los rotíferos alimentados con *Nannochloropsis* contenían en peso seco un 75% de proteínas, 22% de lípidos y 3% de cenizas mientras los alimentados con levaduras un 71%, 17% y 12% respectivamente. También observaron que a diferencia de los rotíferos alimentados con *Nannochloropsis*, los alimentados con levaduras, eran pobres en ácidos grasos altamente insaturados (AGAI) de las series 22: 5n - 3 y 26: 6n - 3 esenciales en la larvicultura de peces marinos (Watanabe *et al.* 1983).

La capacidad de bioencapsulación que presentan los rotíferos es aprovechada con el fin de mejorar su valor nutricional aumentando así la supervivencia y crecimiento de las larvas alimentadas. De este modo, los niveles de AGAI de los rotíferos alimentados con levaduras pueden ser mejorados mediante la bioencapsulación de microalgas como *Nannochloropsis* e *Isochrysis*, de diversos productos comerciales con excelente composición de AGAI y niveles de proteínas, o preparaciones caseras como harina de calamar (Gatesoupe 1989) o aceite de hígado de bacalao. La bioencapsulación permite además el enriquecimiento de rotíferos con vitaminas y aminoácidos (Dhert 1996).

2.3. CONDICIONES GENERALES DEL CULTIVO

2.3.1. **Salinidad.** El rango de tolerancia de *B. plicatilis* a la salinidad oscila entre 1 y 97 g/L siendo óptimo entre 4 y 35 g/L (Dhert 1996).



2.3.2. **Temperatura.** El rango óptimo de temperatura varía de acuerdo a factores específicos e intraespecíficos como especie o cepa (Fielder *et al.* 2000 y Dhert 1996). Los rotíferos del morfotipo L crecen mejor cuando la temperatura del agua está entre 18 y 25 °C mientras que los del morfotipo S crecen mejor entre 28 y 35 °C (Dhert 1996).

2.3.3. **Oxígeno disuelto.** Está reportado que los rotíferos pueden sobrevivir en aguas con niveles de oxígeno tan bajos como 2 ppm (Dhert 1996).

2.3.4. **pH.** En el medio natural los rotíferos pueden vivir a niveles de pH inferiores a 6,6. El rango óptimo de producción ha sido establecido entre 6,6 y 8,0 (Hoff y Snell 1999).

2.3.5. **Amonio (NH₃).** En el agua los niveles de amonio no ionizado (NH₃) están en equilibrio con el ionizado (NH₄⁺) en una relación NH₃/NH₄⁺ que es afectada por la temperatura y el pH del agua. Altos niveles de NH₃ son tóxicos para los rotíferos por lo que en cultivos debe vigilarse que estos no superen 1 ppm de concentración (Hoff y Snell 1999 y Dhert 1996).

2.3.6. **Presencia de microbios.** Los cultivos de rotíferos son adecuados para la proliferación de microorganismos que pueden afectar el cultivo o representar un riesgo sanitario a las larvas por alimentar. Algunos microorganismos (*Pseudomonas*) producen vitamina B₁₂, necesaria para la reproducción de los rotíferos; otros son oportunistas que deterioran la calidad del agua y aparecen indicando exceso de materia orgánica (los ciliados *Euplotes* y *Uronema*), también existen patógenos como las bacterias *Vibrio* spp y los hongos *Aspergillus* que producen una disminución drástica de la población de rotíferos (Dhert 1996).

2.4. PRODUCCIÓN DE *Brachionus plicatilis*

2.4.1. **Dietas.** Los requerimientos nutricionales pueden ser cubiertos empleando microalgas frescas, secas o congeladas, levaduras de pan, levaduras marinas, dietas artificiales, o combinaciones de microalgas y levaduras (Hoff y Snell 1999, Dhert 1996 y Fukusho 1989b).

2.4.1.1. Algas. Las dietas a base de algas abarcan una gran variedad de especies siendo *N. oculata*, –introducida en la acuicultura por los japoneses con el nombre vulgar “*Chlorella marina*”– una de las mejores (Hoff y Snell 1999 y Fukusho 1989b). Otras algas que ofrecen al rotífero un alto valor nutritivo, debido a su contenido de vitaminas y ácidos grasos esenciales son las pertenecientes a los géneros *Chaetoceros*, *Dunaliella*, *Pyramimomonas*, *Isochrysis* y *Tetraselmis* (Hoff y Snell 1999).

Los avances alcanzados en la producción y procesamiento de las microalgas introducen la posibilidad de nuevas dietas para los rotíferos. Barclay y Zeller (1986) probaron el uso de *Schizochytrium* sp. secadas mediante deshidratación (*Spray dried*) encontrando resultados semejantes a las mismas algas cuando se aplicaban frescas. Snell *et al.* en 1990 (*vide* Hoff y Snell, 1999) probaron el crecimiento de *B. plicatilis* empleando *Nannochloropsis salina* preservada mediante tres tipos de congelación y dos tipos de deshidratación, utilizando algas frescas como control. Las algas congeladas dieron un crecimiento del 30% y las deshidratadas del 70% comparado con las algas frescas. En un segundo experimento, compararon el crecimiento de los rotíferos alimentados con *N. oculata* seca y fresca, *Tetraselmis suecica* y levaduras de pan de las marcas *Microfeast*[®], *L-10 yeast*[®], *7B yeast*[®] y *Culture Selco*[®] observando que las algas secas indujeron un mayor crecimiento



poblacional que las levaduras, concluyendo que las algas secas podían suplir las necesidades nutricionales de los rotíferos de un 80 a 90%. Sin embargo, su uso está limitado por los costos de producción.

Lubzens *et al.* (1995) compararon el uso de *Nannochloropsis* congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con algas frescas, secas y levaduras, encontrando una tasa reproductiva del 81% en algas congeladas, 58% en *Nannochloropsis* seca, 76% en levaduras frescas y 38% en levaduras secas tomando como 100% a *Nannochloropsis* fresca. También demostraron que el perfil de ácidos grasos de los rotíferos alimentados con algas congeladas era semejante a los de las algas frescas indicando que *Nannochloropsis* congelada podía emplearse en la producción de rotíferos con buenos resultados en la larvicultura de peces marinos.

Santacruz (1999) empleando los crioprotectores dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, metanol al 10%, glicerol al 10% y glicerol + glucosa al 5% (en proporción 1:1) en la conservación de las algas *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis maculata* probó su uso en la producción de rotíferos. Los resultados no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), concluyendo que el crecimiento de los rotíferos no era afectado por el uso de los crioprotectores mencionados (Santacruz 1999).

2.4.1.2. Levaduras. Los altos requerimientos de microalgas que limitaban la producción de rotíferos para los programas de larvicultura en Japón, llevaron a introducir las levaduras como alimento alternativo (Fukusho 1989b). Pese a ser ricas en proteínas, este tipo de cultivo es inestable presentándose ocasionalmente colapsos súbitos, además de producirse rotíferos de un valor nutricional no adecuado para las larvas de peces y crustáceos (Dhert 1996, Gatesoupe 1989 y Watanabe *et al.* 1983). Los colapsos son explicados en una pobre

digestibilidad de las levaduras, deficiencia de vitamina B₁₂ (Dhert 1996) y deterioro de la calidad del agua por exceso de materia orgánica (Hoff y Sell 1999). Ante ello diversos autores proponen: 1) combinar el uso de levaduras con *Chlorella* o *Nannochloropsis*; 2) adicionar a los cultivos vitamina B₁₂, o bacterias productoras de esta vitamina (Hoff y Snell 1999, Dhert 1996 y Gatesoupe, *et al.* 1989); 3) el posterior enriquecimiento de los rotíferos (Dhert 1996); 4) emplear levaduras formuladas como *ω* - yeast que los japoneses producían al cultivar *Saccharomyces cerevisiae* en medio enriquecido con aceite de hígado de calamar (Fukusho 1989b) o *Culture Selco*[®], que es *S. cerevisiae* formulada con un balance de ácidos grasos de las series 22: 5n - 3 y 22: 6n -3 (Lavens *et al.* 1994); y 5) emplear levaduras marinas como *Candida* y *Rhodotorula* (Dhert 1996).

2.4.2. **Densidad de siembra.** La densidad a inocular depende tanto del tipo de alimento como del sistema de cultivo. Dhert (1996) recomienda densidades entre 50 y 100 rotíferos/mL cuando se usa *N. oculata* a 6×10^6 cels/mL en sistemas de cultivo por lotes. La densidad de siembra permite clasificar los cultivos como extensivos cuando ésta es de 50 a 100 rotíferos/mL y el volumen de los tanques de 100 a 150 m³, e intensivos cuando la densidad varía de 500 a 1000 rotíferos/mL y el volumen de los tanques de 1 a 2 m³ (Fukusho 1989b).

2.4.3. **Sistemas de cultivo.** Su clasificación depende del tipo de cosecha, manejo del agua y alimentos. Hoff y Snell (1999) y Dhert (1996) se refieren a la clasificación según el tipo de cosecha como sistema de recolección completa (*batch*), que tiene dos variantes: densidad constante (BDC), donde el volumen del tanque incrementa a lo largo del cultivo sin afectar la densidad, y recolección completa con volumen constante (BVC). Otros sistemas son el semi-continuo, cuando a partir del tercer día se hacen cosechas parciales



reponiéndose el volumen del tanque; y el continuo cuando se cosecha un volumen específico y se renueva el medio manteniendo la población en fase logarítmica mediante un control ya sea quimostático (nivel estable de nutrientes) o turbidostático (densidad constante de rotíferos). Fulks y Main (1991) se refieren a los sistemas según el manejo del agua y alimentos como el sistema *Galveston*, donde se usa agua sin filtrar, se alimenta con levaduras marinas y la cosecha se hace en la superficie; y el de retroalimentación, donde el agua de desecho es tratada por bacterias, y los nutrientes liberados son usados para fertilizar microalgas, las cuales son cultivadas en tanques separados. Estas algas son utilizadas para la alimentación de los rotíferos.

2.5. IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS EN LA PRODUCCIÓN DE *Brachionus plicatilis*

Existen numerosos trabajos relacionados con el empleo o control bacteriano en los cultivos de rotíferos. En 1988, Yu *et al.* encontraron 8 cepas productoras de vitamina B₁₂, de las cuales 6 correspondían al género *Pseudomonas*. Estas bacterias inoculadas en los tanques de cultivo mejoraron la reproducción y crecimiento de los rotíferos evidenciando la importancia de ciertas cepas en la producción de *B. plicatilis*. Posteriormente, Yu *et al.* (1989) realizaron un balance de los niveles de vitamina B₁₂ en tanques alimentados con levaduras, encontrando que los niveles presentes en la cosecha eran superiores a los introducidos a través del alimento como resultado de la proliferación de *Pseudomonas* y otras especies productoras de esta vitamina. En un siguiente estudio Yu *et al.* (1990), estudiaron la toxicidad de *Vibrio alginolyticus* concluyendo que el afloramiento de este tipo de bacterias en tanques alimentados con levaduras podía estar incidiendo en las caídas repentinas de los cultivos.

Nicolas y Joubert (1986) estudiando las bacterias asociadas a los cultivos de rotíferos encontraron predominio de *Pseudomonas*. Gatesoupe (1989) encontró que algunas bacterias autóctonas de los cultivos de rotíferos afectaban la supervivencia de las larvas de lenguado, mientras la adición de cepas específicas mejoraban la tasa de producción de rotíferos y el crecimiento de las larvas. Gatesoupe *et al.* (1989) encontraron que la aplicación de lactobacterias reducía las poblaciones de aerobios en los tanques de cultivo, mejoraba el crecimiento de las poblaciones de rotíferos y disminuía la mortalidad de larvas de *Paralichthys olivaceus*. En estudios posteriores Gatesoupe (1991) identificó en *Lactobacillus plantarum* funciones probióticas al incrementar la tasa de crecimiento y valor nutricional de los rotíferos así como mejorar la supervivencia de larvas de rodaballo.

Skejermo y Vadstein (1993) caracterizaron la flora bacteriana de cultivos masivos de *B. plicatilis* alimentados con levadura y durante la fase de enriquecimiento, encontrando concentraciones variables entre 0,6 y $2,5 \times 10^7$ bacterias por mL y 1,8 a 7,6 UFC/mL respectivamente, de igual manera, la composición de la microflora del cultivo varió de bacterias de los géneros *Cytophaga* y *Flavobacterium*, a *Pseudomonas* y *Alcaligenes*.

Douillet (2000) inoculó cepas de bacterias marinas puras y combinadas en tanques de rotíferos, alimentados con una dieta artificial libre de bacterias. Los resultados indicaron mayores crecimientos de *B. plicatilis* y *Brachionus rotundiformis* en los tratamientos inoculados con *Alteromonas* y sus combinaciones.

2.6. PRESERVACIÓN DE *Brachionus plicatilis*

El reto de proporcionar constantemente rotíferos a los programas de larvicultura introdujo la necesidad de probar diferentes modos de preservación y su uso posterior. Lubzens *et al.* (1990) conservando rotíferos vivos a 1 °C encontraron que éstos sobrevivían entre 7 y 10 días de almacenamiento. Lubzens *et al.* (1991) observaron que a una densidad de 1000 rotíferos/mL pueden ser almacenados a 4 °C y 10 g/L para su posterior uso en larvicultura. Toledo *et al.* (1991) observaron que embriones de rotíferos gradualmente congelados con DMSO hasta -20 °C y luego almacenados en nitrógeno líquido conservaban una supervivencia promedio entre el 36 y 58% dependiendo de la cepa y la especie. Holt (1992) probó el uso de rotíferos sin preservantes a -80 °C en la larvicultura del pez *Scianops ocellatus*, observando menores supervivencias que en el control; estas diferencias se explicaron en la lixiviación de nutrientes y enzimas digestivas de los rotíferos congelados, una vez aplicados en los tanques de larvicultura. Balompapueng *et al.* (1997) probando la viabilidad de eclosión de los quistes preservados por liofilización y enlatado a diferentes presiones, encontraron que es posible preservar los quistes libres de bacterias que afecten su tasa de eclosión mediante liofilización y enlatado a 88 kilopascales. Assavaare *et al.* (2001) encontraron que *B. plicatilis* y *B. rotundiformis* pueden ser confinados vivos a una densidad entre 2000 y 20000 rotíferos/mL a 4 °C por un tiempo no mayor a 14 días, pudiendo ser usados en larvicultura o para inoculación de tanques de cultivo.

2.7. USO DE *Brachionus plicatilis* EN LA LARVICULTURA DE CAMARONES

Diversos autores han observado beneficios en el uso de rotíferos en la larvicultura de camarones al obtener mayores supervivencias de *Marsupenaeus japonicus* (Yamasaki e Hirata 1982), *Penaeus semisulcatus* y *Melicertus kerathurus* (Ulloa 1992).

Yamasaki e Hirata (1982) comparando el uso de *B. plicatilis* vivos y congelados a -20 °C en la larvicultura de *M. japonicus* en los estadios de Mysis 1 a PL₂ encontraron que no habían diferencias significativas en la supervivencia de las larvas cuando los rotíferos eran alimentados con “*Chlorella marina*”.

Ulloa (1992) caracterizó y evaluó el uso de *B. plicatilis* vivos y congelados a -20 °C en la larvicultura de *L. vannamei* y *Farfantepenaeus brevisrostris* sugiriendo que su uso es adecuado durante los estadios de Zoea y Mysis siempre y cuando se empleen vivos y enriquecidos con formulaciones ricas en AGAI. Además, su uso en la larvicultura fue visto como una alternativa para bajar los costos de producción de postlarvas (Ulloa 1992).

Naessens *et al.* (1993) emplearon rotíferos como suplemento en la larvicultura de *L. vannamei* durante los estadios Zoea 2 a Mysis 3, anotando que *B. plicatilis* acelera el desarrollo larval. También observaron que la administración prolongada de rotíferos incrementaba el peso seco de las postlarvas y la resistencia a la prueba de estrés osmótico (Naessens *et al.* 1993).

En 1993, en el CENAIM se realizaron pruebas sobre producción y uso de *B. plicatilis* en la larvicultura de *L. vannamei* observándose que las mayores producciones eran



alcanzadas empleando el alga *Chlorella* sp. o dietas artificiales a base de levaduras (CENAIM 1993a). En los experimentos de larvicultura se observó que las larvas alimentadas con rotíferos presentaban mayor resistencia a las pruebas de estrés osmótico y un mayor índice de estadio larvario que las que no fueron alimentadas con rotíferos (CENAIM 1993b). En 1994 *B. plicatilis* fue probado en dos laboratorios comerciales de producción de postlarvas de *L. vannamei* del Ecuador, alcanzando porcentajes de supervivencia del 60 al 80% (CENAIM 1994). Desde 1999 se utiliza en la producción comercial de larvas del CENAIM substituyendo en un 50% el suministro de *Artemia*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CONDICIONES EXPERIMENTALES

El diseño experimental aplicado en todos los experimentos fue el del modelo completamente aleatorizado, empleando cuatro réplicas por tratamiento. Los experimentos fueron realizados en tanques cilindro-cónicos de 50 L. La temperatura del agua varió según las condiciones ambientales ($22,0 \pm 2,0$ °C de mayo a noviembre, y $27,0 \pm 2,5$ °C de diciembre a abril) y fue determinada con termómetro de $\pm 0,1$ °C de exactitud. La salinidad se determinó utilizando un refractómetro *Atago S-100* de ± 1 g/L de exactitud. En el caso de los experimentos con rotíferos alimentados con microalgas y combinaciones de microalgas y levaduras la salinidad fue de 34 ± 1 g/L, y de 20 ± 1 g/L cuando se emplearon levaduras y probióticos; esta salinidad se obtuvo mezclando agua de mar y agua del grifo.

En los cultivos de rotíferos alimentados con microalgas, la densidad de inoculación fue de 50 ± 5 rotíferos/mL, mientras en los cultivos con levaduras, mezclas de microalgas y levaduras, y experimentos con probióticos la densidad de inoculación fue de 100 ± 10 rotíferos/mL. La densidad se determinó diariamente, mediante el cálculo del número promedio de individuos presentes en cinco muestras de 100 ± 5 μ L. El parámetro de evaluación fue la tasa específica de crecimiento (TEC) obtenida al cuarto día de cultivo. Las TEC fueron calculadas mediante la ecuación $TEC = \frac{\ln N_d - \ln N_0}{d}$, donde: $\ln N_d$ es el logaritmo natural de la densidad determinada en el día de cultivo d , $\ln N_0$ el logaritmo natural de la densidad de inoculación, y d el tiempo en días. Los cultivos tuvieron una duración de cinco días, contados de 0 (día de inoculación) a 4 (día de cosecha).



3.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LOS MORFOTIPOS SS, S, L Y XL

Fueron desarrollados dos experimentos con tres repeticiones de cada uno, de acuerdo a lo indicado en la tabla 2. Los rotíferos fueron cultivados en sistema de recolección completa, siendo la temperatura del agua de $22,0 \pm 2,0$ °C.

Tabla 2. Experimentos realizados para la evaluación de la producción de los morfotipos SS, S, L y XL del rotífero *Brachionus plicatilis*

EXPERIMENTOS	TRATAMIENTOS
Alimentación con <i>Nannochloropsis oculata</i> .	Morfotipo SS
	Morfotipo S
	Morfotipo L
	Morfotipo XL
Alimentación con <i>Culture Selco</i> (CS)	Morfotipo SS
	Morfotipo S
	Morfotipo L
	Morfotipo XL

3.2.1. **Evaluación de la producción en cultivos alimentados con *N. oculata***. Los tanques fueron llenados con 20 L de *N. oculata* a una concentración de 6×10^6 cels/mL. Posteriormente, fueron inoculados con rotíferos de los morfotipos SS, S, L y XL, provenientes de cultivos en tanques de 500 L, adaptados previamente a la alimentación con la microalga mencionada. Diariamente se determinó la densidad celular en los tanques con la microalga mencionada. Diariamente se determinó la densidad celular en los tanques a fin de calcular el volumen de microalgas necesario para mantener la concentración celular indicada anteriormente.

3.2.2. **Evaluación de la producción en cultivos alimentados con CS**. Previo a la inoculación, los rotíferos fueron aclimatados durante cuatro horas a la salinidad de cultivo (20 g/L), siendo alimentados con CS. Los tanques fueron llenados a 50 L, siendo inoculados los rotíferos una vez transcurrido el tiempo de aclimatación. CS fue suministrado diariamente cada cuatro horas a una ración diaria de $0,55 \text{ g}/10^6$ rotíferos.



3.3. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROTÍFEROS A PARTIR DE DIFERENTES DIETAS

El uso de microalgas vivas y criopreservadas, el uso de levaduras, y el uso de combinaciones de levaduras y microalgas fue evaluado en experimentos diferentes, a través de cultivos en sistema de recolección completa. La temperatura del agua durante la realización de los experimentos fue de $27,0 \pm 2,5$ °C.

3.3.1. **Evaluación del uso de microalgas vivas y criopreservadas.** Las microalgas *I. galbana*, *N. oculata* y *T. maculata* fueron empleadas de acuerdo a lo indicado en la tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos y raciones establecidos en el experimento realizado para evaluar la producción de rotíferos a partir de diferentes microalgas.

TRATAMIENTOS	RACIÓN (x 10 ⁵ cels/rotífero)
Microalgas vivas:	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	1,00 - 1,50
<i>Tetraselmis maculata</i>	0,06- 0,12
<i>Isochrysis galbana</i>	0,40 - 0,48
<i>N. oculata</i> + <i>T. maculata</i>	Proporción 50:50
<i>N. oculata</i> + <i>I. galbana</i>	Proporción 50:50
<i>T. maculata</i> + <i>I. galbana</i>	Proporción 50:50
Microalgas criopreservadas:	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	1,00 - 1,50
<i>Tetraselmis maculata</i>	0,06- 0,12
<i>Isochrysis galbana</i>	0,40 - 0,48
<i>N. oculata</i> + <i>T. maculata</i>	Proporción 50:50
<i>N. oculata</i> + <i>I. galbana</i>	Proporción 50:50
<i>T. maculata</i> + <i>I. galbana</i>	Proporción 50:50

Las algas fueron proporcionadas por el laboratorio de fitoplancton del CENAIM, siendo cultivadas con medio *Guillard*^F/2 en tanques de cultivo masivo. Para la criopreservación, microalgas vivas fueron concentradas por centrifugación a 8600 rpm empleando un separador marca *Alfa Laval*, modelo MAB103B-24. Los concentrados fueron homogeneizados con un agitador magnético, en una fiola de vidrio, adicionando el

criopreservante glicerol al 10% v/v . Una vez homogeneizados, fueron almacenados en bolsas plásticas autosellables, y refrigerados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para ser utilizados luego de 15 días de criopreservación.

3.3.2. **Evaluación del uso de levaduras.** Se emplearon las levaduras de pan *Levapán*[®] fresca y *Levapán*[®] seca, la dieta artificial CS y la levadura marina *Candida glabrata*, de acuerdo a lo indicado en la tabla 4. *C. glabrata* se suministró a una ración diaria. Ésta fue producida en medio líquido compuesto por melaza, fertilizantes agrícolas (urea y fosfatos) y agua de mar. Las levaduras *Levapán*[®] fresca, *Levapán*[®] seca y CS fueron suministradas cada cuatro horas.

Tabla 4. Tratamientos y raciones establecidos en el experimento realizado para evaluar la producción de rotíferos a partir de diferentes levaduras.

TRATAMIENTOS	RACIÓN
<i>Levapán</i> [®] fresca	1g/10 ⁶ rotíferos
<i>Levapán</i> [®] seca	0,35g/10 ⁶ rotíferos
CS	0,55g/10 ⁶ rotíferos
<i>Candida glabrata</i>	200 ml de suspensión de 1,45 x 10 ⁹ cels/mL

3.3.3. **Evaluación del uso de combinaciones de levaduras y microalgas.** El experimento se realizó de acuerdo a lo indicado en la tabla 5. El día 0 de cultivo los rotíferos fueron inoculados en tanques llenados hasta la mitad con microalgas procedentes de cultivos masivos. El día 1 se duplicó el volumen de los tanques, y desde el día 2, de acuerdo a lo propuesto por Dhert (1996) fueron suministradas las levaduras. Al igual que en el experimento anterior, *C. glabrata* se suministró a una ración diaria, mientras *Levapán*[®] fresca y CS fueron suministradas cada cuatro horas.

Tabla 5. Tratamientos y raciones establecidos en el experimento realizado para evaluar la producción de rotíferos a partir de combinaciones de levaduras y microalgas.

TRATAMIENTOS	RACIÓN DE LEVADURAS	DENSIDAD DE LAS MICROALGAS
<i>Levapán</i> [®] fresca + <i>N. oculata</i>	0,75 g/10 ⁶ rotíferos	6 x 10 ⁶ cels/mL de <i>N. oculata</i>
<i>Levapán</i> [®] fresca + <i>T. maculata</i>		6,35 x 10 ⁵ cels/mL de <i>T. maculata</i>
<i>Levapán</i> [®] fresca + <i>I. galbana</i>		1,5 x 10 ⁶ cels/mL de <i>I. galbana</i>
CS + <i>N. oculata</i>	0.55 g/10 ⁶ rotíferos	6 x 10 ⁶ cels/mL de <i>N. oculata</i>
CS + <i>T. maculata</i>		6,35 x 10 ⁵ cels/mL de <i>T. maculata</i>
CS + <i>I. galbana</i>		1,5 x 10 ⁶ cels/mL de <i>I. galbana</i>
<i>C. glabrata</i> + <i>N. oculata</i>	100 ml de suspensión	6 x 10 ⁶ cels/mL de <i>N. oculata</i>
<i>C. glabrata</i> + <i>T. maculata</i>	de 1,45 x 10 ⁹ cels/mL	6,35 x 10 ⁵ cels/mL de <i>T. maculata</i>
<i>C. glabrata</i> + <i>I. galbana</i>		1,5 x 10 ⁶ cels/mL de <i>I. galbana</i>

3.4. EVALUACIÓN DEL USO DE BACTERIAS NITRIFICANTES Y *Vibrio alginolyticus* EN LA PRODUCCIÓN DE *Brachionus plicatilis*

El uso de bacterias nitrificantes, *Vibrio alginolyticus* y combinación de bacterias en la producción de *B. plicatilis* fue evaluado en cultivos de rotíferos alimentados con *Levapán*[®] fresca, de acuerdo a lo indicado en la tabla 6. La alimentación se hizo suministrando diariamente 1g/10⁶ rotíferos de levadura. Durante la realización de este experimento la temperatura del agua fue de 22,0 ± 2,0 °C.

Tabla 6. Tratamientos establecidos para la evaluación del uso de bacterias nitrificantes y *Vibrio alginolyticus* en la producción de *Brachionus plicatilis*.

TRATAMIENTOS	ADICIÓN DE BACTERIAS (UFC/mL)
Control	No adición
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1 x 10 ⁵
Bacterias nitrificantes	1 x 10 ⁵
Bacterias nitrificantes + <i>V. alginolyticus</i>	Proporción 1:1

Con el fin de determinar posibles efectos sobre la calidad del agua en los cultivos fueron medidos los niveles de amonio total como Nitrógeno (TAN, siglas en inglés) y pH los días 0, 2 y 4 de cultivo. Los niveles de TAN fueron determinados mediante la técnica del fenol



descrita por Solórzano (1984). La determinación del pH fue realizada utilizando un potenciómetro marca TOA HM-5S de 0,01 de exactitud.

Todas las bacterias fueron proporcionadas por el Departamento de Microbiología del CENAIM. Las bacterias nitrificantes fueron cultivadas en agua de peptona y extracto de levaduras, empleando como inóculo una muestra de *Abil*[®] (*Avecom, Bélgica*). Por otro lado, la cepa probiótica de *V. alginolyticus*, que es usada en el CENAIM en la larvicultura de *L. vannamei* fue cultivada en medio líquido de *LB Broth Base*[®] (*Oxoid, Inglaterra*).

3.5. EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRESERVACIÓN DE *Brachionus plicatilis* Y SU USO EN LA LARVICULTURA DE *Litopenaeus vannamei*

3.5.1. **Evaluación de métodos de preservación.** Rotíferos enriquecidos con *DHA Selco*[®] fueron preservados mediante los métodos de liofilización, congelación por inmersión en nitrógeno líquido, congelación a -4, -20, -80 °C sin preservantes, y con los preservantes metanol al 10% y DMSO al 10%. El criterio de evaluación fue el estado presentado por las lóricas después de 15 días de almacenamiento. Para ello fueron observadas al microscopio muestras de cada tipo de preservación.

3.5.1.1. **Preservación por liofilización.** Los rotíferos para liofilización fueron depositados en una bolsa plástica, sellada, que se extendió en capa delgada, para ser congelados a -80 °C durante 24 horas. Una vez congelados, fueron deshidratados en un liofilizador *Eyela DRC-1* durante 36 horas. Luego de ser liofilizados fueron almacenados en refrigerador doméstico a una temperatura de 4 °C.

3.5.1.2. Preservación por inmersión en nitrógeno líquido. Los rotíferos fueron confinados en tubos *Falcon* de 15 mL, e introducidos en nitrógeno líquido durante dos minutos. Posteriormente fueron almacenados en un congelador de -20 °C.

3.5.1.3. Preservación por congelación sin preservantes. En la congelación sin preservantes los rotíferos fueron depositados en bolsas plásticas, selladas y extendidas en capa delgada. Las bolsas fueron almacenadas a -4, -20 y -80 °C.

3.5.1.4. Preservación por congelación utilizando preservantes. Los rotíferos fueron previamente homogeneizados en un vaso de precipitado agregando 10 mL de DMSO o metanol, agitando suavemente con una varilla de vidrio, a fin de no romper las lóricas de los rotíferos. Una vez homogeneizados, fueron depositados en bolsas plásticas, extendiéndose en capa delgada y almacenándose a -4, -20 y -80 °C.

3.5.2. **Evaluación del uso en larvicultura**. Larvas de *L. vannamei* fueron cultivadas según el régimen de alimentación y manejo del CENAIM (CENAIM 1999). El grupo control fue alimentado con rotíferos vivos al 50% de sustitución de nauplios de *Artemia* (SNA), y los grupos de experimentación fueron alimentados con rotíferos vivos suministrados al 100% de SNA, y rotíferos preservados según los métodos indicados anteriormente (tabla 7). El parámetro de evaluación fue el porcentaje de supervivencia en el estadio PL₁₂, determinado mediante la ecuación $\%Sup = \frac{PL_{12TOT}}{N_{sinoc}} \times 100$, donde PL_{12TOT} es el número total de PL₁₂ producidas y N_{sinoc} el número total de nauplios N₅ inoculados.

Tabla 7. Tratamientos establecidos para la evaluación del uso del rotífero *Brachionus plicatilis* en la larvicultura de *Litopenaeus vannamei*.

TRATAMIENTOS	TIPO DE APLICACIÓN	TIPO DE SNA
1 (control)	Rotíferos vivos	50%
2	Rotíferos vivos	100%
3	Rotíferos congelados sin preservantes a -4 °C	50%
4	Rotíferos congelados sin preservantes a -20 °C	50%
5	Rotíferos congelados sin preservantes a -80 °C	50%
6	Rotíferos congelados con metanol a -4 °C	50%
7	Rotíferos congelados con metanol a -20 °C	50%
8	Rotíferos congelados con metanol a -80 °C	50%
9	Rotíferos congelados con DMSO a -4 °C	50%
10	Rotíferos congelados con DMSO a -20 °C	50%
11	Rotíferos congelados con DMSO a -80 °C	50%
12	Rotíferos liofilizados	50%
13	Rotíferos congelados en Nitrógeno líquido	50%

SNA. - Substitución de nauplios de *Artemia*

Durante el experimento los tanques fueron cubiertos con plástico a fin de evitar que la temperatura del agua bajase demasiado. En promedio ésta fue de $28,5 \pm 2,5$ °C, mientras que la salinidad fue de 34 ± 1 g/L.

Adicionalmente se aplicaron las pruebas de estrés osmótico, por formalina, osmótico combinado con formalina, y de nado en contracorriente, estandarizadas en el CENAIM para evaluar la calidad de las postlarvas. En cada prueba se emplearon tres réplicas por tratamiento, las cuales contenían 10 individuos por réplica. En la prueba de estrés osmótico, las PL₁₂ fueron sometidas a un cambio brusco de salinidad de 35 a 0 g/L durante 30 minutos, después se cambió a 35 g/L. En la prueba de estrés por formalina las PL₁₂ fueron sometidas a una concentración de 1400 ppm durante 60 minutos. En la prueba combinada se empleó la misma concentración de formalina a una salinidad de 10 g/L. En la prueba de nado en contracorriente las PL₁₂ fueron sometidas a una corriente de 0.14 L/seg durante 2 minutos, utilizando el aparato ilustrado en la figura 3. Al final se

determinaron los porcentajes de supervivencia de las postlarvas a las pruebas de estrés y los porcentajes de resistencia a la prueba de nado en contracorriente.

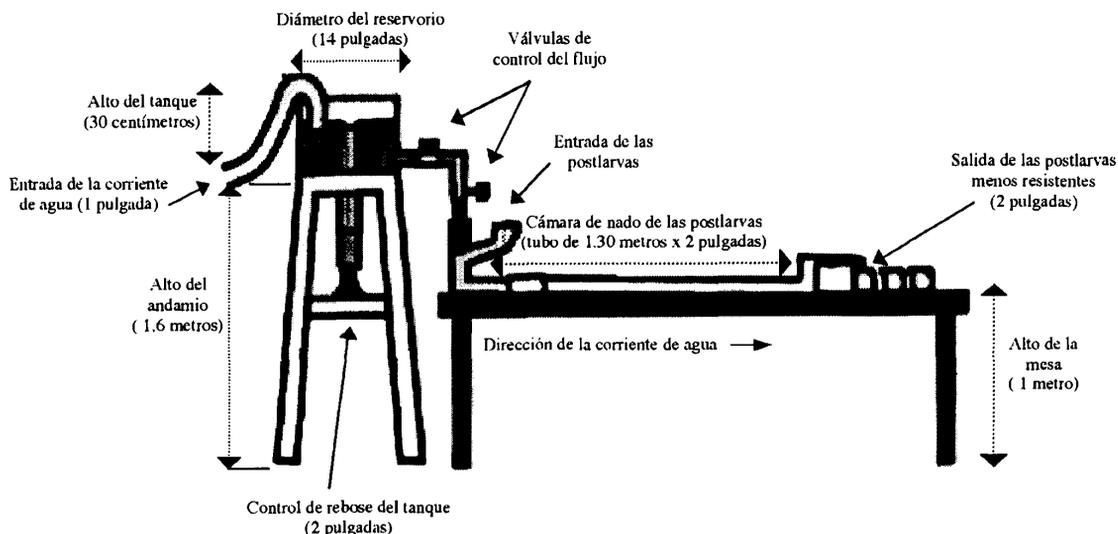


Figura 3. Aparato utilizado para realizar la prueba de nado en contracorriente (modificado de Santacruz y Cobo 2001).

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El manejo de los datos se realizó con los programas Excel (Microsoft Office 2001) y Statistica 4.0 (Statsoft, Inc.). Una vez tabulados los datos, se aplicó la prueba de *Bartlett* con el fin de verificar homogeneidad en sus varianzas. En algunos casos la homogeneidad fue observada después de aplicar transformación cuadrática o transformación arcoseno de raíz cuadrada. Posteriormente, dependiendo si sus varianzas eran o no homogéneas, los datos fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía o la prueba no paramétrica de *Kruskal Wallis* a un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

En el caso de los datos analizados mediante análisis de varianza de una vía, cuando se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó la prueba de

contraste de *Tukey*. En el caso de los datos analizados mediante la técnica de *Kruskal Wallis*, se aplicó prueba no paramétrica de *Dunn*. Estas pruebas fueron utilizadas debido a su poder para detectar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de igual o diferente número de réplicas, y tener un error experimental inferior a α (Zar 1999).

Los porcentajes de supervivencia y resistencia que presentaron las PL₁₂ en el experimento de larvicultura, en las pruebas de estrés y de nado en contracorriente fueron analizados mediante la prueba de correlación simple de *Spearman*. Esta prueba se basa en el cálculo de un valor r_s , que se utiliza para probar la hipótesis nula H_0 : no existe correlación entre las variables (Gibbons 1997).

4. RESULTADOS

4.1. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LOS MORFOTIPOS SS, S, L Y XL

Las tablas 8 y 9 muestran las densidades y tasas específicas de crecimiento (TEC) que presentaron los diferentes morfotipos de *B. plicatilis* al cuarto día de cultivo. Durante la primera repetición con *N. oculata* los morfotipos S y L presentaron las mayores TEC ($p < 0,05$). En la segunda repetición, las TEC de los morfotipos L y XL no presentaron diferencias significativas entre sí, y fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) a las TEC de los morfotipos SS y S. En la tercera repetición los morfotipos L y XL presentaron la mayor TEC ($p < 0,05$), seguidos por SS, cuya TEC no presentó diferencias significativas con el morfotipo L; y por el morfotipo S, el cual presentó la menor TEC (tabla 8).

Tabla 8. Densidad (rotíferos/mL) y tasa específica de crecimiento (TEC) presentada por los morfotipos de *Brachionus plicatilis* al cuarto día de cultivo, durante las tres repeticiones del experimento con *Nannochloropsis oculata*.

MORFOTIPOS	REPETICIONES					
	1		2		3	
	DENSIDAD	TEC	DENSIDAD	TEC	DENSIDAD	TEC
SS	181,7 ± 24,8	0,378 ^b	40,8 ± 8,3	-0,019 ^{b,c}	176,7 ± 31,5	0,214 ^b
S	129,2 ± 22,4	0,411 ^a	35,0 ± 9,6	-0,053 ^c	85,8 ± 30,1	0,062 ^c
L	160,8 ± 20,2	0,424 ^a	60,8 ± 17,2	0,177 ^a	177,5 ± 35,5	0,267 ^{a,b}
XL	100,0 ± 21,5	0,291 ^b	66,7 ± 11,3	0,114 ^a	250,0 ± 20,4	0,328 ^a

Se empleó Análisis de varianza de una vía y la prueba de *Tukey* en el análisis de los datos.

Los exponentes distintos indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Durante la primera repetición del experimento con CS la TEC del morfotipo SS fue significativamente superior ($p < 0,05$) a las de los morfotipos S y XL, pero no a la TEC del morfotipo L. La TEC de éste no presentó diferencias significativas con los morfotipos S y XL. Durante la segunda repetición, los morfotipos S, SS y XL fueron semejantes entre sí



y significativamente superiores ($p < 0,05$) a la del morfotipo L. Durante la tercera repetición la TEC presentada por el morfotipo XL fue semejante a las TEC de los morfotipos SS y S, y significativamente superior a la del morfotipo L ($p < 0,05$); las TEC de SS y S no presentaron diferencias significativas con la TEC del morfotipo L (tabla 9).

Tabla 9. Densidad (rotíferos/mL) y tasa específica de crecimiento (TEC) presentada por los morfotipos de *Brachionus plicatilis* al cuarto día de cultivo, durante las tres repeticiones del experimento con *Culture Selco*[®].

MORFOTIPOS	REPETICIONES					
	1		2		3	
	DENSIDAD	TEC	DENSIDAD	TEC	DENSIDAD	TEC
SS	377,8 ± 42,2	0,313 ^a	340,8 ± 43,8	0,332 ^a	260,8 ± 38,0	0,249 ^{a,b}
S	155,1 ± 80,3	-0,217 ^b	318,0 ± 28,1	0,281 ^a	225,8 ± 42,7	0,236 ^{a,b}
L	151,6 ± 80,3	0,038 ^{a,b}	135,8 ± 68,6	0,127 ^b	198,3 ± 87,2	0,211 ^b
XL	41,1 ± 9,6	-0,216 ^b	319,2 ± 74,7	0,309 ^a	415,0 ± 65,1	0,309 ^a

Se empleó Análisis de varianza de una vía y la prueba de *Tukey* en el análisis de los datos.

Los exponentes distintos indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Debido a que las TEC alcanzadas por los morfotipos al cuarto día de cultivo en los con *N. oculata* y CS variaron entre experimentos, y a que se iniciaba la temporada de aguas cálidas ($27,0 \pm 2,5$ °C) se eligió el morfotipo S para las siguientes evaluaciones. Este morfotipo es producido en el CENAIM y utilizado en la larvicultura comercial de *L. vannamei*.

4.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROTÍFEROS A PARTIR DE DIFERENTES DIETAS

4.2.1 Evaluación del uso de microalgas vivas y criopreservadas. La tabla 10 presenta las densidades y las TEC alcanzadas por el morfotipo S de *B. plicatilis* al cuarto día de cultivo. Previo al análisis estadístico de los resultados, fue necesario aplicar la transformación cuadrática $y' = y^2$. Las mayores TEC ($p < 0,05$) fueron observadas en los

rotíferos alimentados con *I. galbana* viva y las combinaciones de microalgas vivas *T. maculata* + *I. galbana*, *N. oculata* + *I. galbana* y *N. oculata* + *T. maculata*, seguidos de los rotíferos alimentados con *T. maculata* viva, *T. maculata* criopreservada y *N. oculata* + *T. maculata* criopreservada. *N. oculata* viva, *I. galbana* criopreservada, y sus combinaciones produjeron TEC negativas. En estos cultivos se produjo deterioro de la calidad del agua y proliferación de protozoarios.

Tabla 10. Densidad (rotíferos/mL) y tasa específica de crecimiento (TEC) presentadas por *Brachionus plicatilis* al cuarto día de cultivo, durante la evaluación del uso de microalgas vivas y criopreservadas.

MICROALGAS	DENSIDAD	TEC
Microalgas vivas		
<i>Nannochloropsis oculata</i>	31,3 ± 30,1	-0,006 ^{c,d}
<i>Tetraselmis maculata</i>	138,5 ± 24,3	0,328 ^{b,c}
<i>Isochrysis galbana</i>	119,5 ± 22,1	0,397 ^{a,b}
<i>N. oculata</i> + <i>T. maculata</i>	116,5 ± 19,4	0,400 ^{a,b}
<i>N. oculata</i> + <i>I. galbana</i>	103,0 ± 50,6	0,407 ^{a,b}
<i>T. maculata</i> + <i>I. galbana</i>	108,5 ± 50,6	0,449 ^a
Microalgas criopreservadas		
<i>Nannochloropsis oculata</i>	65,3 ± 22,1	0,231 ^{c,d}
<i>Tetraselmis maculata</i>	83,5 ± 50,4	0,292 ^{b,c,d}
<i>Isochrysis galbana</i>	14,7 ± 2,5	-0,128 ^d
<i>N. oculata</i> + <i>T. maculata</i>	75,5 ± 42,3	0,329 ^{b,c}
<i>N. oculata</i> + <i>I. galbana</i>	13,5 ± 7,9	-0,109 ^d
<i>T. maculata</i> + <i>I. galbana</i>	9,5 ± 6,5	-0,182 ^d

Se empleó Análisis de varianza de una vía y prueba de Tukey para $n_a \neq n_b$, en el análisis de los datos. Los exponentes distintos indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2.2. **Evaluación del uso de levaduras.** La tabla 11 presenta las TEC alcanzadas al cuarto día de cultivo por el morfotipo S de *B. plicatilis* alimentado con las levaduras *Levapán*[®] fresca, *Levapán*[®] seca, CS y *C. glabrata*. Las TEC de los rotíferos alimentados con CS, *Levapán*[®] fresca y *Levapán*[®] no presentaron diferencias significativas entre sí, y fueron significativamente superiores a las TEC ($p < 0,05$) de los rotíferos alimentados con *C. glabrata*. Los cultivos presentaron proliferación de protozoarios ciliados y sésiles sobre los rotíferos, siendo mayor en los cultivos realizados con *C. glabrata*.

Tabla 11. Densidad (rotíferos/mL) y tasa específica de crecimiento (TEC) presentada por *Brachionus plicatilis* al cuarto día de cultivo, durante la evaluación del uso de levaduras.

LEVADURAS	DENSIDAD	TEC
Culture Selco®	120,6 ± 16.7	0.059 ^a
Levapán® fresca	78,0 ± 14	-0.054 ^a
Levapán® seca	72,0 ± 12	-0.053 ^a
<i>Candida glabrata</i>	13,0 ± 4.2	-0.508 ^b

Se empleó Análisis de varianza de una vía y la prueba de Tukey en el análisis de los datos.

Los exponentes distintos indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2.3. **Evaluación del uso de combinaciones de levaduras y microalgas.** La tabla 12 muestra las densidades y TEC alcanzadas por el morfotipo S de *B. plicatilis* alimentado con diferentes combinaciones de levaduras y microalgas al cuarto día de cultivo. Los rotíferos alimentados con *C. glabrata* + *T. maculata*, *C. glabrata* + *N. oculata*, CS + *N. oculata* y CS + *T. maculata* presentaron TEC semejantes entre sí y significativamente superiores ($p < 0,05$) a las TEC de los rotíferos alimentados con *Levapán*® + *T. maculata* y *Levapán*® + *N. oculata*. Las TEC de los rotíferos alimentados con las combinaciones que incluían a *I. galbana* presentaron valores negativos.

Tabla 12. Densidad (rotíferos/mL) y Tasa específica de crecimiento (TEC) presentada por *Brachionus plicatilis* al cuarto día de cultivo, durante la evaluación del uso de combinaciones de levaduras y microalgas.

COMBINACIONES	DENSIDAD	TEC
<i>Levapán</i> ® + <i>N. oculata</i>	53,3 ± 28,8	0,012 ^{b,c}
<i>Levapán</i> ® + <i>T. maculata</i>	61,33 ± 44,4	0,043 ^{b,c}
<i>Levapán</i> ® + <i>I. galbana</i>	24,0 ± 9,1	-0,223 ^{c,d}
CS + <i>N. oculata</i>	79,3 ± 15,9	0,125 ^{a,b}
CS + <i>T. maculata</i>	128,7 ± 18,4	0,226 ^{a,b}
CS + <i>I. galbana</i>	10,7 ± 4,1	-0,411 ^{d,e}
<i>C. glabrata</i> + <i>N. oculata</i>	148,7 ± 13,9	0,290 ^{a,b}
<i>C. glabrata</i> + <i>T. maculata</i>	191,3 ± 23,2	0,340 ^a
<i>C. glabrata</i> + <i>I. galbana</i>	3,0 ± 1,0	-0,716 ^e

Se empleó Análisis de varianza de una vía y la prueba de Tukey en el análisis de los datos.

Los exponentes distintos indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.3. EVALUACIÓN DEL USO DE BACTERIAS NITRIFICANTES Y *Vibrio alginolyticus* EN LA PRODUCCIÓN DE *Brachionus plicatilis*

La tabla 13 presenta los niveles de amonio total y pH durante los días 0, 2 y 4 de cultivo, así como las densidades y TEC alcanzadas por el morfotipo S de *B. plicatilis* al cuarto día del cultivo. Durante los días 2 y 4 de cultivo, el tratamiento con bacterias nitrificantes presentó niveles inferiores de amonio total; sin embargo estas diferencias no fueron significativas con los otros tratamientos. El día cuarto de cultivo se observó una disminución del pH; sin embargo esta disminución y los diferentes niveles observados no presentaron diferencias significativas al nivel $\alpha = 0,05$. En el caso de las TEC tampoco fueron observadas diferencias significativas.

Tabla 13. Niveles de amonio total como Nitrógeno (mg/L), pH, densidad (rotíferos/mL) y tasa específica de crecimiento (TEC) de *Brachionus plicatilis* tratados con *Vibrio alginolyticus*, bacterias nitrificantes (BN) y combinaciones de bacterias.

TRATAMIENTOS	DIAS							
	0		2		4			
	TAN	pH	TAN	pH	TAN	pH	Densidad	TEC
Control	0,48 ± 0,02 ^a	8,23 ^a	1,77 ± 0,11 ^a	7,98 ^a	1,93 ± 0,06 ^a	7,70 ^a	205,0 ± 23,5	0,193 ^a
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0,48 ± 0,06 ^a	8,20 ^a	1,80 ± 0,19 ^a	7,93 ^a	1,98 ± 0,02 ^a	7,75 ^a	214,0 ± 23,5	0,183 ^a
Bacterias nitrificantes	0,49 ± 0,05 ^a	8,25 ^a	1,71 ± 0,11 ^a	7,88 ^a	1,75 ± 0,50 ^a	7,88 ^a	207,0 ± 23,5	0,191 ^a
<i>V. alginolyticus</i> + BN	0,46 ± 0,05 ^a	8,20 ^a	1,80 ± 0,19 ^a	7,90 ^a	1,90 ± 0,10 ^a	7,85 ^a	202,5 ± 14,7	0,182 ^a

TAN.- Amonio total como Nitrógeno (siglas en Inglés).

Se empleó Análisis de varianza de una vía para el análisis de los datos.

4.4. EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRESERVACIÓN DE *Brachionus plicatilis* Y SU USO EN LA LARVICULTURA DE *Litopenaeus vannamei*

4.4.1. **Evaluación de métodos de preservación.** No se observó daño en las lóricas de los rotíferos congelados por inmersión en nitrógeno líquido, o congelados a -4, -20, y -80 °C sin preservantes o con los preservantes metanol y DMSO después de 15 días de



almacenamiento. Por el contrario, las lóricas de los rotíferos liofilizados se observaron severamente deterioradas.

4.4.2. **Evaluación del uso en larvicultura.** La figura 7 muestra los porcentajes de supervivencia de las PL₁₂ de *L. vannamei* alimentadas con rotíferos vivos al 50% (Control) y 100% de SNA, congelados a -4, -20, y -80 °C sin preservantes, con metanol al 10%, y con DMSO al 10%, congelados por inmersión en nitrógeno líquido y liofilizados. Previo al análisis de los resultados se aplicó transformación logarítmica $y' = \arccoseno(\sqrt{y})$. Sólo fueron observadas diferencias significativas ($p < 0,05$) entre control y los demás grupos.

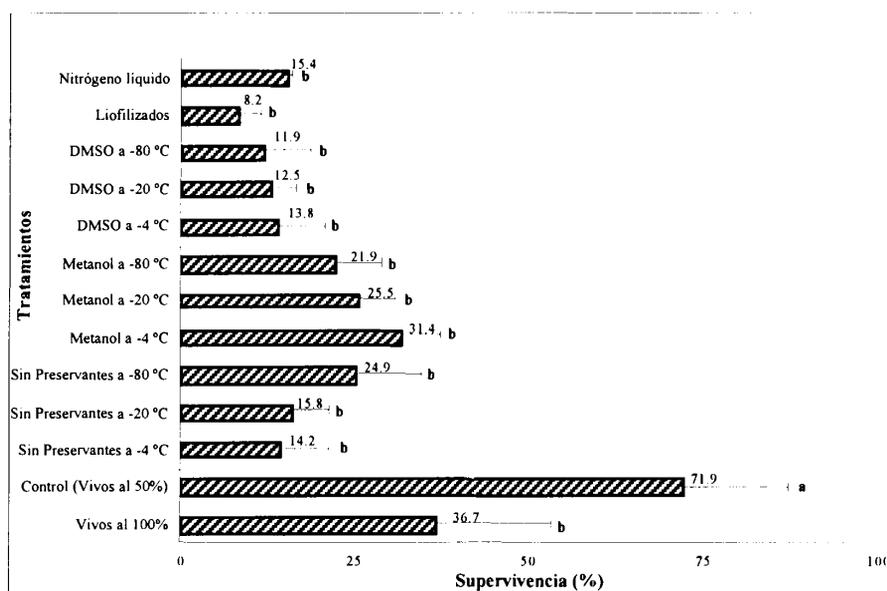


Figura 4. Porcentajes de supervivencia de PL₁₂ de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con *Brachionus plicatilis* vivos y preservados durante 15 días. Los literales distintos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) determinadas mediante la prueba de Tukey.

La tabla 14 presenta los porcentajes de supervivencia de las PL₁₂ sometidas a las pruebas de estrés osmótico, por formalina, osmótico combinado con formalina, y los porcentajes

de resistencia a la prueba de nado en contracorriente. Sólo fueron observadas diferencias significativas ($p < 0,05$) en las pruebas de estrés osmótico y osmótico combinado con formalina. En la prueba de estrés osmótico, el porcentaje de supervivencia de las PL₁₂ alimentadas con rotíferos vivos al 100% de SNA y congelados sin preservantes a -20 °C fue significativamente ($p < 0,05$) superior al control y demás tratamientos, mientras la supervivencia de las PL₁₂ alimentadas con rotíferos congelados sin preservantes a -4 °C, preservados con metanol a -4 y -20 °C, y preservados con DMSO a -4 y a -80°C fueron significativamente ($p < 0,05$) inferiores. En la prueba de estrés osmótico combinado con formalina la supervivencia de las PL₁₂ alimentadas con rotíferos vivos al 100% de SNA, congelados sin preservantes a -4 y -20 °C, preservados con DMSO a -80°C y congelados en nitrógeno líquido fueron significativamente ($p < 0,05$) superiores al control y demás tratamientos, los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí.

Tabla 14. Porcentajes de supervivencia y resistencia* de PL₁₂ de *Litopenaeus vannamei*, alimentadas con diferentes tratamientos de *Brachionus plicatilis*, sometidas a cuatro pruebas de estrés.

TRATAMIENTOS	PRUEBAS DE ESTRÉS			
	Osmótico	Formalina	Osmótico + Formalina	Nado en contracorriente*
Vivos al 100%	47% ^a	100% ^a	90% ^a	83% ^a
Control (Vivos al 50%)	27% ^b	100% ^a	67% ^b	77% ^a
Sin preservantes a -4 °C	0% ^c	93% ^a	80% ^a	60% ^a
Sin preservantes a -20 °C	37% ^a	97% ^a	80% ^a	67% ^a
Sin preservantes a -80 °C	10% ^b	97% ^a	67% ^b	70% ^a
Metanol a -4 °C	7% ^c	100% ^a	70% ^b	70% ^a
Metanol a -20 °C	7% ^c	100% ^a	77% ^b	63% ^a
Metanol a -80 °C	17% ^b	93% ^a	73% ^b	80% ^a
DMSO a -4 °C	0% ^c	100% ^a	73% ^b	90% ^a
DMSO a -20 °C	10% ^b	100% ^a	63% ^b	77% ^a
DMSO a -80 °C	3% ^c	93% ^a	83% ^a	57% ^a
Liofilizados	20% ^b	97% ^a	70% ^b	77% ^a
Nitrógeno líquido	23% ^b	100% ^a	93% ^a	80% ^a

Se emplearon las pruebas no paramétricas de *Kruskal Wallis* y *Dunn* en el análisis de los datos.

Los exponentes distintos en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

La tabla 15 presenta los resultados del análisis de correlación de *Spearman* aplicado a los porcentajes de supervivencia y resistencia de las PL₁₂ a las pruebas de estrés y el porcentaje de supervivencia en larvicultura. Al nivel $\alpha = 0,05$ el análisis no detectó correlación estadísticamente significativa entre las diferentes pruebas de estrés y las diferentes aplicaciones de rotíferos.

Tabla 15. Resultados del análisis de correlación simple de *Spearman* aplicado a los porcentajes de supervivencia y resistencia de las PL₁₂ de *Litopenaeus vannamei* a las pruebas de estrés y el porcentaje de supervivencia en larvicultura.

VARIABLES	Coefficiente de <i>Spearman</i> (r_s)	Nivel p
Supervivencia en Larvicultura vs. Supervivencia al Estrés Osmótico	0.3917	0.1856
Supervivencia en Larvicultura vs. Supervivencia al Estrés por Formalina	0.4116	0.1623
Supervivencia en Larvicultura vs. Supervivencia al Estrés combinado	0.0304	0.9214
Supervivencia en Larvicultura vs. Resistencia al nado en contracorriente	0.1219	0.6916

5. DISCUSIÓN

5.1. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LOS MORFOTIPOS SS, S, L Y XL

Pese a que la producción de *B. plicatilis* ha sido evaluada a partir de diferentes cepas, dietas, aplicación de bacterias o sistemas de cultivo, no existen reportes suficientes de la evaluación de morfotipos. Los morfotipos S y L son producidos dependiendo de la talla máxima de presa requerida por las larvas cultivadas (Fukusho, 1989a). Hagiwara y Lee (1991) en cultivos de 8 y 32 g/L observaron mayor capacidad eurihalina en rotíferos S de cepa hawayana que en rotíferos L de una cepa japonesa. Mustahal *et al.* (1991) en cultivos de cinco cepas de los morfotipos S y L a 25 °C y salinidades entre 5 y 45 g/L observaron que la producción de los morfotipos estaba afectada por factores genéticos de las cepas. Dhert (1996) reporta mayor crecimiento del morfotipo L en cultivos a temperaturas de 18 a 25 °C, y mayor crecimiento del morfotipo S en cultivos entre 28 y 35 °C.

En este estudio, durante las repeticiones del experimento con *N. oculata* a 34 g/L y $22,0 \pm 2,0$ °C sobresalió el morfotipo L ($p < 0,05$), igualado por el morfotipo S en la primera repetición y por el morfotipo XL durante las siguientes repeticiones. Estos resultados coinciden con lo reportado por Dhert (1996) acerca del morfotipo L, el cual presenta mayor crecimiento que el morfotipo S cuando se cultiva a temperaturas entre 18 y 25 °C. Hagiwara *et al.* (2001) y Rombaut (2001) se refieren a los morfotipos XL y SS como cepas respectivas de L y S. Esto explicaría el crecimiento del morfotipo XL, el cual fue igual al del morfotipo L en dos de las tres repeticiones del experimento. Sin embargo, durante las repeticiones del experimento con CS, a igual temperatura y salinidad de 20 g/L, sobresalió el morfotipo SS ($p < 0,05$), igualado por el morfotipo L en la primera

repetición y por los morfotipos S y XL durante las repeticiones siguientes. Esto coincidió con lo reportado por Rombaut (2001), quien observó en cultivos de rotíferos alimentados con CS mayores TEC en los del morfotipo SS que en los otros, indicando mayor capacidad de crecimiento del morfotipo SS en cultivos con dietas artificiales.

5.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN A PARTIR DE DIFERENTES DIETAS

5.2.1. **Evaluación del uso de microalgas vivas y criopreservadas.** Inicialmente el suministro de *B. plicatilis* para larvicultura se hacía a partir de la colectas en el medio natural o estanques de cultivo de anguila. Ante el incremento de los programas de larvicultura y consecuente requerimiento de rotíferos, los japoneses investigaron técnicas de cultivo para la producción de rotíferos (Hirata 1980). Dicha producción comprende el uso de diferentes microalgas que pueden ser administradas vivas o preservadas, en monodietas o combinaciones (Hoff y Snell 1999, Lubzens *et al.* 1995 y Santacruz 1999). Snell *et al.* (1983) compararon el uso de las microalgas verdes *Chlorella* sp. y *Dunaliella* sp. y la microalga verde-azul *Schyzotrix* sp., observando que los rotíferos alimentados con combinaciones de *Schyzotrix* sp. y *Chlorella* sp. presentaban mayor crecimiento que los alimentados con monodietas o combinaciones de *Chlorella* sp. y *Dunaliella* sp. También reportaron que no todas las microalgas verde-azules son benéficas, y su valor nutricional afecta la calidad nutricional de los rotíferos (Snell *et al.* 1983). La búsqueda de técnicas de producción de rotíferos por parte de los japoneses dio lugar a la introducción de la microalga verde *N. oculata*, considerada al igual que *Tetraselmis*, una de las mejores debido a su contenido de ácidos grasos esenciales importantes para la larvicultura de peces y crustáceos marinos, y por producir altas tasas de crecimiento en los cultivos de rotíferos (Fukusho 1989a, 1989b). Al igual que *Nannochloropsis* y *Tetraselmis*, se destaca el uso de



Isochrysis, la cual es utilizada además para el enriquecimiento de rotíferos con vitamina C (Dhert 1996 y Hoff y Snell 1999).

En el presente trabajo, el uso de las microalgas vivas *T. maculata*, *N. oculata* + *T. maculata*, *I. galbana* y sus diferentes combinaciones produjeron las más altas TEC. Sin embargo *N. oculata* viva produjo una de las más bajas TEC. En este cultivo dio una caída súbita el día 3 posiblemente atribuida al deterioro de la calidad del agua y presencia de protozoarios. En general, los resultados indicaron que *I. galbana* debido a sus altos niveles de vitamina C (Dhert 1996), y niveles de AGAI mayores a los de *Tetraselmis* (Hoff y Snell 1999), puede emplearse no sólo para el enriquecimiento de rotíferos con la mencionada vitamina como indica Dhert (1996), sino también para su cultivo, suministrada viva en monodieta o combinación con *N. oculata* o *T. maculata*.

Los resultados observados por Lubzens *et al.* (1995) y Santacruz (1999) indican que la producción de rotíferos no se afecta significativamente cuando se emplean microalgas criopreservadas. En el presente caso, las TEC de los rotíferos alimentados con las microalgas vivas y criopreservadas *N. oculata*, *T. maculata*, y sus combinaciones no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, los rotíferos alimentados con *I. galbana* presentaron una de las más bajas TEC. Esto se explicaría en la acumulación de materia orgánica en los tanques de cultivo y consecuente deterioro de la calidad del agua.

5.2.2. **Evaluación del uso de levaduras.** Las levaduras fueron introducidas en la producción de rotíferos como alternativa a los altos requerimientos de microalgas. Sin embargo, los cultivos son poco estables y dan lugar a rotíferos con pobres niveles de ácidos grasos esenciales importantes para la larvicultura de peces y crustáceos marinos

5.2.3. **Evaluación de combinaciones de levaduras y microalgas.** Ante las caídas súbitas de los cultivos de rotíferos alimentados con levaduras, la baja digestibilidad y deficiencia de vitamina B₁₂ de las levaduras (Hirayama 1987) y el valor nutricional de los rotíferos no adecuado para peces y crustáceos marinos (Tamaru *et al.* 1993), fueron propuestas las combinaciones de microalgas y levaduras (Hoff y Snell 1999, Dhert 1996 y Fukusho 1989b, entre otros). Con estas combinaciones se obtienen mejores producciones de rotíferos (Hirayama y Watanabe *vide*: Hoff y Snell 1999) y niveles adecuados de ácidos grasos esenciales requeridos por las larvas de peces y crustáceos marinos (Dhert 1996 y Tamaru *et al.* 1993).

En el presente trabajo se comparó la producción de *B. plicatilis* empleando las combinaciones de las levaduras CS, *C. glabrata* y *Levapán*[®] fresca con las microalgas *N. oculata*, *T. maculata* e *I. galbana*. Las TEC presentadas por los rotíferos en este estudio fueron mayores a las del experimento con levaduras, confirmando las anotaciones de Hirayama y Watanabe (*vide*: Hoff y Snell 1999) acerca de la mayor producción de rotíferos utilizando combinaciones de levaduras y microalgas. Las producciones al emplear *C. glabrata* + *T. maculata*, *C. glabrata* + *N. oculata*, y CS + *T. maculata* fueron superiores a las combinaciones que incluían a la levadura *Levapán*[®] y a la microalga *I. galbana*. Estos resultados se explican en el mayor valor nutricional y digestibilidad de las levaduras formuladas y marinas (Hoff y Snell 1999, Dhert 1996 y Fulks y Main 1991), y a la propiedad bacteriostática y reguladora de la calidad del agua de las microalgas (Suantika 2001). Pese a lo anterior y como consecuencia del aumento de la materia orgánica en los cultivos alimentados con levaduras, la calidad del agua afectó la producción de rotíferos en los cultivos alimentados con *I. galbana* y las diferentes

levaduras, hecho que contrastó con los resultados de la evaluación de microalgas donde *I. galbana* produjo uno de los mejores resultados.

5.3. EVALUACIÓN DEL USO DE BACTERIAS NITRIFICANTES Y *Vibrio alginolyticus* EN LA PRODUCCIÓN DE *Brachionus plicatilis*

Hoff y Snell (1999) y Dhert (1996) reportan que los cultivos de rotíferos son medios adecuados para la proliferación de bacterias que pueden causar decrecimiento en la población de rotíferos o caídas súbitas de los cultivos (Suantika 2001 y Yu *et al.* 1990), o constituir un riesgo sanitario para las larvas a alimentar (Skejermo y Vadstein 1993 y Gatesoupe *et al.* 1989) y deben ser controlados ante los riesgos de acumulación y transferencia a través de la cadena trófica a los sucesivos predadores (Dhert 1996). También ha sido reportada la presencia de bacterias benéficas que incrementan el crecimiento de los rotíferos al producir vitamina B₁₂ (Yu *et al.* 1989 y Yu *et al.* 1988) y nutrientes no presentes en la dieta (Douillet 2000 y Rombaut 2001), limitar el crecimiento de bacterias patógenas (Shiri *et al.* 1998 y Gatesoupe 1991), reducir los niveles de amonio no ionizado y nitritos (Qi 2001 y Rombaut 2001) y mejorar la supervivencia y crecimiento de las larvas alimentadas (Gatesoupe 1991 y Gatesoupe *et al.* 1989).

En este trabajo, se evaluó el uso de una cepa probiótica de *V. alginolyticus* producida en el CENAIM y empleada en la larvicultura comercial de *L. vannamei*, y el uso de bacterias nitrificantes cultivadas en agua de peptona y extracto de levadura a partir de un inóculo del *Abil*[®] (Avecom, Bélgica) en cultivos de *B. plicatilis* alimentados con *Levapán*[®].

V. alginolyticus crece en tanques de rotíferos alimentados con levaduras alcanzando concentraciones superiores a 10^5 UFC/mL, por lo cual se cree que la proliferación de cepas tóxicas de *V. alginolyticus* ocasionaría caídas súbitas en los cultivos (Yu *et al.* 1990). En este estudio, el crecimiento de los rotíferos tratados con *V. alginolyticus* fue igual al control y demás tratamientos. Sin embargo, debido a su capacidad probiótica, *V. alginolyticus* controlaría la proliferación de bacterias nocivas para *B. plicatilis* y las larvas de *L. vannamei* a alimentar, disminuyendo los riesgos potenciales de acumulación y transferencia a través de la cadena trófica de bacterias nocivas para sucesivos predadores como indica Dhert (1996). Este planteamiento se sustenta en lo observado por Shiri *et al.* (1998), quienes no observaron diferencias en el crecimiento de rotíferos tratados con el probiótico *Lactococcus lactis* y el control; sin embargo, los rotíferos tratados presentaron mayor supervivencia a pruebas de desafío con el patógeno *Vibrio anguillarum*.

Rombaut (2001) y Qi (2001) observaron mayor crecimiento de *B. plicatilis* y reducción de la concentración de amonio en tanques de cultivo y biofiltros de sistemas cerrados de recirculación al aplicar *Abil* (Avecom, Bélgica). En el presente estudio, el crecimiento de *B. plicatilis*, los niveles de amonio total y el pH del agua de los cultivos inoculados con bacterias nitrificantes no fueron diferentes al control y demás tratamientos. Las bacterias nitrificantes tienen una baja tasa de crecimiento requiriendo de un sustrato sólido para el establecimiento de la colonia bacteriana y la posterior remoción del amonio (Rombaut 2001). Por lo cual, los resultados obtenidos se explicarían en las condiciones del experimento, ya que las bacterias fueron adicionadas directamente en los cultivos de rotíferos careciendo de un sustrato sólido para el establecimiento de la colonia.

5.4. EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRESERVACIÓN DE *Brachionus plicatilis* Y SU USO EN LARVICULTURA DE *Litopenaeus vannamei*

5.4.1. **Evaluación de métodos de preservación.** La necesidad de proporcionar constantemente rotíferos a los programas de larvicultura ha dado lugar a diversas investigaciones relacionadas con la preservación de rotíferos (Hagiwara *et al.* 2001 y Hagiwara e Hirayama 1993). Existen estudios de criopreservación de rotíferos (Assavaare *et al.* 2001, Holt 1992, Ulloa 1992, Lubzens *et al.* 1991 y Lubzens *et al.* 1990), congelación de huevos partenogénicos (Okamoto *et al.* 1987), criopreservación de embriones (Toledo *et al.* 1991) y preservación de quistes por liofilización y enlatado (Balompapueng *et al.* 1997).

En este estudio se evaluaron los métodos de liofilización, congelación sin preservantes, y con los preservantes dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y metanol al 10%, a las temperaturas de -4, -20 y -80 °C, y congelación por inmersión en nitrógeno líquido. Como resultado se observó que las lóricas de los rotíferos congelados no fueron afectadas, coincidiendo con los resultados de Holt (1992), Ulloa (1992) y Okamoto *et al.* (1987), los cuales tampoco observaron deterioro en las lóricas de rotíferos congelados. Por otro lado, la liofilización afectó las lóricas de los rotíferos, las cuales estaban rotas, coincidiendo con lo observado por Futagawa durante 1994 en experimentos de larvicultura del lenguado *Paralichthys woolmani* realizados en el CENAIM (Blacio, *Com. Per.*).



5.4.2. **Evaluación del uso en larvicultura.** Diversos autores han estudiado el uso de rotíferos en la larvicultura de camarones peneídos reportando sus beneficios al obtener mayores supervivencias y disminuir los requerimientos de nauplios de *Artemia* (Ulloa

1992, Yamasaki e Hirata 1982), aumento del índice de estadio larvario, del peso seco de las postlarvas y resistencia a las pruebas de estrés osmótico cuando se utilizan como suplemento (CENAIM 1993b y Naessens *et al.* 1993).

En el presente trabajo, se evaluó el uso de rotíferos vivos y preservados (según los métodos discutidos anteriormente) en la larvicultura de *L. vannamei*. Los rotíferos preservados fueron suministrados al 50% de SNA, y los vivos al 50% (Control) y al 100% de SNA, durante los estadios de Zoea 2 a PL₄. Los resultados indican que el uso de rotíferos vivos y enriquecidos con *DHA Selco*[®] suministrados al 50% de SNA es adecuada para la producción de postlarvas de *L. vannamei*. Éstos se asemejan a los resultados obtenidos en 1993 en el CENAIM (CENAIM 1993b) y por Naessens *et al.* (1993) quienes emplearon rotíferos como suplemento, y confirman lo reportado por Ulloa (1992), quien recomienda emplearlos vivos y enriquecidos con ácidos grasos esenciales.

La supervivencia del grupo alimentado con rotíferos vivos suministrados al 100% de SNA fue inferior ($p < 0,05$) al control, lo cual indicaría que la substitución total de nauplios de *Artemia* por rotíferos vivos no es adecuada para la producción de PL₁₂ de *L. vannamei*. Al respecto Ulloa (1992), anota que *B. plicatilis* es un excelente transportador de compuestos específicos que no puede suplir completamente el uso de la *Artemia* en el larvicultivo de crustáceos, sino que puede ser utilizado como suplemento y/o complemento alimenticio durante los primeros estadios larvales en los que las larvas adoptan hábitos alimenticios carnívoros.

En los grupos alimentados con las diferentes preservaciones de rotíferos también se observaron supervivencias inferiores ($p < 0,05$) al control. Dhont y Lavens (1996)

recomendaron preservar biomasa de *Artemia* en capas delgadas a temperaturas inferiores a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, con el fin de evitar deterioro del exoesqueleto y pérdida de nutrientes por lixiviación. En el caso de los rotíferos, éstos fueron congelados en capas delgadas a -4 , -20 y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, y congelados por inmersión en nitrógeno líquido, siendo previamente confinados en tubos *Falcon*. Ello indicaría una posible lixiviación de nutrientes en los rotíferos congelados a -4 y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, y explicaría las supervivencias presentadas por las larvas alimentadas con este tipo de rotíferos. Por otro lado, Holt (1992) observó en rotíferos congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ lixiviación de nutrientes y enzimas digestivas, lo cual explicaría las supervivencia presentadas por las larvas alimentadas con rotíferos congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y por inmersión en nitrógeno líquido. En el caso de las larvas alimentadas con rotíferos liofilizados, su supervivencia también se explicaría en una posible lixiviación de nutrientes y enzimas digestivas en los rotíferos, puesto que sus lóricas estaban severamente deterioradas; además estos rotíferos flotaban en la superficie del agua formando espuma, lo cual los hacía poco disponibles para las larvas. También es probable que en los grupos alimentados con rotíferos preservados con DMSO los resultados hayan sido afectados por la toxicidad del preservante (Simione 1998), a la cual Santacruz (1999) atribuyó las supervivencias observadas en larvas de *L. vannamei* alimentadas con microalgas criopreservadas con esta substancia.



La producción camaronera exige el uso de postlarvas resistentes a las condiciones de cultivo, cuya supervivencia, crecimiento homogéneo y resistencia a enfermedades de cultivo garanticen una buena producción (Peeters 2000). Ante ello, han sido desarrolladas diferentes pruebas de estrés basadas principalmente en la osmoregulación (Lignot *et al.* 2000, Tackaert *et al.* 1989 y Samocha *et al.* 1998). Aunque estas pruebas permiten separar las postlarvas saludables de las postlarvas débiles (Samocha 1998 y Tackaert *et al.* 1989),

los resultados pueden ser afectados por el estadio de muda, el estadio de desarrollo, talla y estado nutricional de las postlarvas (Lignot *et al.* 2000). También se menciona que las pruebas de estrés indican la calidad momentánea de la postlarva a ser sembrada (Tackaert *et al.* 1989), y sus resultados no siempre están correlacionados con la supervivencia en la larvicultura (Cobo Com. Pres.).

CENAIM (1993b) y Naessens *et al.* (1993) emplearon rotíferos como suplemento en la larvicultura de *L. vannamei*, indicando que su uso aumenta la supervivencia de las postlarvas a la prueba de estrés osmótico. Pese a que en este estudio se emplearon rotíferos al 50 y 100% de SNA, los resultados de las pruebas de estrés variaron entre grupos. Lavens y Sorgeloos (2000) indican que la dieta influye sobre la calidad de las postlarvas, por lo cual se esperaría que las pruebas de estrés permitieran distinguir la mejor aplicación de rotíferos. Sin embargo, se observó: 1) que los grupos alimentados con rotíferos vivos al 100% de SNA y congelados sin preservantes a -20 °C, cuya supervivencia en larvicultura fue inferior ($p < 0,05$) al control, presentaron la mayor supervivencia a las pruebas de estrés osmótico y osmótico + formalina; y 2) que la supervivencia de los grupos alimentados con rotíferos congelados sin preservantes a -80 °C, con metanol a -80 °C, con DMSO a -80 °C, liofilizados y congelados en nitrógeno líquido, no presentó diferencias significativas con el control. En el caso de la prueba de estrés de formalina combinado con osmótico, los resultados indicaron la presencia de un grupo con supervivencias superiores ($p < 0,05$) al control, conformado por las PL₁₂ alimentadas con rotíferos vivos al 100% de SNA, con rotíferos congelados sin preservantes a -4 y -20 °C, con rotíferos congelados con DMSO a -80 °C, y con rotíferos congelados en nitrógeno líquido; y otro cuyas supervivencias no fueron significativamente diferentes al control. Es probable que los resultados de estas pruebas, además de ser afectados por las diferentes aplicaciones de rotíferos, estén

afectados por el estadio de muda, el estadio de desarrollo, la talla y el estado nutricional que presentaban las postlarvas al momento de la prueba (Lignot *et al.* 2000).

Samocha *et al.* (1998) han reportado que las postlarvas se hacen tolerantes a la formalina con la edad. Esta substancia, que fue empleada desde el estadio de Mysis 3 para facilitar la muda a PL₁ y demás estadios, es usada en laboratorios de maduración para profilaxis de los reproductores y desinfección de huevos de camarones, influyendo en una posible tolerancia de las larvas de *L. vannamei* (Santacruz y Cobo 2001). Esto explicaría la alta supervivencia que presentaron las postlarvas a la prueba de estrés a la formalina.

Peeters (2000) reportó que la prueba de nado en contracorriente permite detectar diferencias entre dietas. Sin embargo, la aplicación de esta prueba no permitió observar diferencias entre las distintas aplicaciones de rotíferos, debido a la alta resistencia presentada por las postlarvas.

Mediante el análisis de correlación simple de *Spearman* se observó que no existía correlación entre la supervivencia y resistencia de las PL₁₂ a las pruebas de estrés y nado en contracorriente y la supervivencia presentada en la larvicultura, de modo que ninguna de las pruebas aplicadas permitió determinar la mejor aplicación de rotíferos para la producción de postlarvas de *L. vannamei*. Esto contrastó con lo reportado por Dhert *et al.* (1992) quienes indicaron que estas pruebas son importantes para la evaluación de las dietas. La falta de correlación se explicaría debido a que no existe hasta el momento una prueba universalmente aceptada para evaluar la calidad de las larvas (Samocha *et al.* 1998).



5. CONCLUSIONES

1. Los morfotipos L y XL de *B. plicatilis* presentaron mejor crecimiento cuando fueron alimentados con *N. oculata* a $20,0 \pm 2,0$ °C y 34 g/L de salinidad, mientras que en los cultivos con CS a igual temperatura y 20 g/L el morfotipo SS presentó el mejor crecimiento.
2. El uso de las microalgas vivas *I. galbana*, *N. oculata* + *I. galbana*, *T. maculata* + *I. galbana* y *N. oculata* + *T. maculata* produjo mejores TEC que *N. oculata* viva y criopreservada y las dietas de microalgas criopreservadas que incluían a *I. galbana*.
3. El uso de las microalgas criopreservadas *T. maculata* y *T. maculata* + *N. oculata* produjo TEC semejantes a las de los rotíferos alimentados con las microalgas vivas *I. galbana*, *N. oculata* + *I. galbana*, y *N. oculata* + *T. maculata*.
4. Los rotíferos alimentados con las combinaciones de la microalgas *N. oculata* y *T. maculata* con las levaduras *C. glabrata* y CS presentaron las mayores TEC.
5. La inoculación de bacterias nitrificantes y *V. alginolyticus* en tanques de cultivo de rotíferos alimentados con la levadura *Levapán*[®] no mejoró el crecimiento de los rotíferos, ni la calidad del agua en lo que respecta a niveles de amonio total y pH.
6. Las lóricas de los rotíferos congelados sin preservante y con los preservantes metanol y DMSO al 10% no fueron afectadas. Por el contrario, las lóricas de rotíferos liofilizados fueron severamente deterioradas.

7. Ni la substitución de total de nauplios de *Artemia* por rotíferos vivos enriquecidos con *DHA Selco*[®], ni la substitución parcial (al 50%) por rotíferos preservados enriquecidos con *DHA Selco*[®] permitieron alcanzar supervivencias semejantes al control (vivos al 50% de SNA) durante la larvicultura de *L. vannamei*.

8. Sólo las pruebas de estrés osmótico y osmótico combinado con formalina permitieron diferenciar las aplicaciones de rotíferos empleadas en la larvicultura de *L. vannamei*, indicando a la substitución total por rotíferos vivos enriquecidos con *DHA Selco*[®] como una de las mejores. Sin embargo, los resultados de estas pruebas no estuvieron correlacionados con la supervivencia en larvicultura.

7. REFERENCIAS

- Assavaare, M., A. Hagiwara, K. Ide, K. Maruyama y E. Lubzens. 2001.** Low-temperature preservation (at 4 °C) of marine rotifer *Brachionus*. *Aquaculture Research*, Vol. 32: 29 - 39.
- Balompapueng, M. B., A. Hagiwara, Y. Nozaki y K. Hirayama. 1997.** Preservation of resting eggs of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller by canning. *Hydrobiologia*. 358: 163 - 166.
- Barclay, W. y Zeller. 1996.** Nutritional enhancement of n - 3 and n - 6 fatty acids in rotifers and *Artemia* nauplii by feeding Spray - dried *Schizochytrium* sp. *Journal of World Aquaculture Society*, 27: 314 - 322.
- CENAIM. 1993a.** Cultivo y Aplicación de Rotíferos en Acuicultura. Boletín informativo, Vol. 2 (1): 15.
- CENAIM. 1993b.** Avances de resultados en experimentos de alimentación de *Brachionus plicatilis* en la larvicultura de *Penaeus vannamei*. Boletín informativo 2 (3): 12.
- CENAIM 1994.** Rotifer Application in Shrimp Larviculture Rotifer Feeding. Informe Técnico Departamento de Zooplancton.
- CENAIM 1999.** Organismos zoopláctónicos como alternativa de alimentación en la Larvicultura del camarón. Informe científico anual Departamento de Plancton.
- Dhert, P., P. Lavens y P. Sorgeloos. 1992.** Stress evaluation: a tool for quality control of hatchery-produced shrimp and fish fry. *Aquaculture Europe* 17(2): 6 - 10
- Dhert, P. 1996.** Rotifers. In P. Lavens and P. Sorgeloos (Eds.), *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Technical paper FAO - ARC.
- Dhert, P., G. Rombaut, G. Suantika and P. Sorgeloos. 2001.** Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, Vol. 200: 129 - 146.

Dhont, J y P. Lavens. 1996. Tank production and use of ongrown *Artemia*. In P. Lavens and P. Sorgeloos (Eds.), Manual on the production and use of live food for aquaculture. Technical paper FAO - ARC.

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

Fielder, D. S., G. J. Purser y S. C. Battaglione. 2000. Effect of rapid changes in temperature on availability of the Rotifers *Brachionus rotundiformis* and *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 189: 85 - 99.

Fukusho, K. 1989a. Biology and Mass Production of the Rotifer I, *Brachionus plicatilis* (1). *Int. J. Aq. Fish. Tech.* 1: 232 - 240.

Fukusho, K. 1989b. Biology and Mass Production of the Rotifer II, *Brachionus plicatilis* (2). *Int. J. Aq. Fish. Tech.* 1: 292 - 299.

Fulks, W. y K. Main. 1991. Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceedings of U.S.-Asia Workshop, Honolulu. USA.

Furukawa, I. y K. Hidaka. 1973. Technical problems encountered in the mass culture of the rotifers using Marine yeast as food organisms. *Inf. Bull. Planktology Japan.* 20: 61 - 71.

Gatesoupe, F. J. 1989. Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L, *vide in*: 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



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

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.

Gibbons, J. D. 1997. Nonparametric Methods for Quantitative Analysis. 3rd. Edition. American Sciences Press, Inc. Colombus.

Hagiwara, A. y C. Lee. 1991. Resting egg formation of the *L*- and *S*- type rotifer *Brachionus plicatilis* under different water temperature. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57 (9): 1645 - 1650.

Hagiwara, A. y K. Hirayama. 1993. Preservation of rotifers and its application in the finfish hatchery. *TML Conference Proceedings* 3: 61 - 71.

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

Hirata, H. 1980. Culture Methods of the Marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Min. Rev. Data File Fish. Res.* 1: 27 - 46

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. of Japan. Soc. of Sci. Fish.* 49: 505 - 510

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

Hoff, H., y T. W. Snell 1999. Plankton culture manual. 5th. Edition. Florida Aqua Farms Inc.



Holt, G. 1992. Experimental Studies of Feeding in Larval Red Drum. *Journal of The World Aquaculture Society* 23 (4): 265 – 269.

Jones, D., A. Yule and D. Holland. 1997. Larval Nutrition, in: Louis R. D’Abramo, D. Conklin and D. Akiyama (Eds.). *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture. Vol. 6.* World Aquaculture Society. 353 - 389.

Lavens, P., Ph. Dhert, G. Merchie, M. Stael y P. Sorgeloos. 1994. A Standard procedure for the mass production on an Artificial diet of rotifers with a High nutritional quality for marine fish larvae *in:* L. M. Chou, A. D. Munro, T. J. Chen, L. K. K. Cheong, J. K. Ding, K. K. Hooi, H. W. Khoo, V. P. E. Phang, K. F. Shing y T. H. Tan (Ed.). 1994. The Third Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

Lavens, P. y P. Sorgeloos, 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Technical paper. FAO-ARC.

Lavens, P. y P. Sorgeloos, 2000. Experiences on importance of diet for shrimp postlarval quality. *Aquaculture* 191: 169 - 176.

Lignot, J. H., C Spanings-pierrot y G. Charmantier. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological conditions and the effects of stress in crustaceans. *Aquaculture*, Vol. 191: 209 - 245.

Lubzens, E., G. Minkoff y S. Maron. 1985. Salinity dependence of sexual and asexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Mar. Biol.* 85: 123 - 126.

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. *Hydrobiologia*, 186/187: 387 - 400.



Lubzens, E., B. Perry, S. Euteneujer y R. Berghahn. 1990. Preservation of Rotifers for use in Aquaculture *vide in*: Hoff, H., and T. W. Snell. 1999. Plankton culture manual. 5th. Edition. Florida Aqua Farms Inc., Florida.

Lubzens, E., G. Kolodny, B. Perry, N. Galai, R. Sheshinski e Y. Wax. 1991. Factors affecting Survival of Rotifers (*Brachionus plicatilis* O.F. Müller) at 4 °C. Aquaculture 91: 385 - 394.

Lubzens, E., O. Gibson, O. Zmora y A. Snkenik. 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis sp.*) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. Aquaculture 133: 292 - 309.

Mustahal, S. Yamasaki, y H. Hirata. 1991. Salinity Adaptability of Five Different Strains of the Rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suissan Gakkaishi 57 (11): 1197 - 2000

Naessens, E., M. L. Cobo, A. Van Hauwaert, M. Van Horenbeeck y P. Sorgeloos. 1993. Advances of the *Artemia* Project: Improvement of White shrimp *Penaeus vannamei* production through feeding strategies based on live and formulated feed *in*: J. Calderón y P. Sorgeloos (Eds.) Mem. II Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Escuela Superior Politécnica del Litoral. pp. 101 – 108.

Nicolas, J. L. y M. N. Jourbet. 1986. Bactéries associées aux productions de *Brachionus plicatilis*. In: 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.

Okamoto, S., M. Tanaka and S. Kasahara. 1987. Cryopreservation of Parthenogenetic Eggs of the Rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi. 53(11) 2093.

Peeters, J. 2000. Calidad de larvas. Informe final Proyecto CENAIM – VVOB, Ecuador.

Qi, Z. 2001. The use of Probiotics and microbial additives in Rotifer cultures (*Brachionus plicatilis*). Master's Thesis, Ghent University, Belgium.



- Rombaut, G. 2001.** Control of the microbial community in Rotifer cultures (*Brachionus plicatilis*). Tesis Doctoral, Doctoral Thesis, Ghent University, Belgium.
- Samocha, T., H. Gajardo, A. Lawrence, F. Castille, M. Speed, D. Mc Kee, K. Page. 1998.** A simple stress test for *Penaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture* 165: 233 – 242.
- Santacruz, J. 1999.** Criopreservación de microalgas como alternativa para la alimentación de organismos marinos. Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Machala. Ecuador.
- Santacruz, J. y M. L. Cobo. 2001.** Evaluación de pruebas de estrés para determinar la calidad de las postlarvas de *Litopenaeus vannamei*. VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Guayaquil, octubre del 2001.
- Shiri, A. R., H. Van Duffel, Ph. Dhert, J. Swings y P. Sorgeloos. 1998.** Use of a potential probiotic *Latococcus 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.
- Simione, F. P. 1998.** Cryopreservation Manual. Nalge Nunc International Corporation.
- Snell, T., Ch. Bieberich y R. Fuerst. 1983.** The Effects of Green and Blue-Green algal diets on the Reproductive rate of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 31:21-30
- Solórzano, L. 1984.** Métodos de análisis químicos utilizados en el curso Latinoamericano de Postgrado: “Instrumentación y análisis químico de agentes contaminantes en el mar”. *Boletín Científico y Tecnico, Instituto Nacional de Pesca*. Vol. VII (I): 19 - 20.
- Sorgeloos, P. y P. Lavens. 1998.** Situación actual y perspectivas de la disponibilidad de los quistes de *Artemia*. *El mundo Acuícola* 4 (1): 3 - 4.

Stern, S. 1995. Swimming through Troubled waters in Shrimp farming: Ecuador country review in: C. Browdy y J. Hopkins (Eds.). Swimming through Troubled water, Proceedings of the Special Session on Shrimp farming. The World Aquaculture Society. pp. 35 - 39.

Suantika, G. 2001. Development of a Recirculation System for the mass culturing of the Rotifer *Brachionus plicatilis*. Doctoral Thesis, Ghent University, Belgium.

Suzuki, M. 1964. New systematic approach to the Japanese planktonic Rotatoria, Hydrobiologia, 23, 1- 24. In K. Fukusho. 1989. Biology and mass production of the rotifer *Brachionus plicatilis* (1). Int. J. Aq. Fish Tech. 1: 232 - 240.

Tackaert, W., P. Abelin, P. Dhert, P. Léger, D. Grymonpré, R. Bombeo y P. Sorgeloos. 1989. Stress resistance in Postlarvae Penaeid Shrimp reared under different feeding procedures. Presented at Aquaculture'89, Los Angeles, CA-USA, February 12 al 14 de 1989.

Tamaru, C., R. Murashige, C-S. Lee, H. Ako y V. Safo. 1993. Rotifers fed various diets of baker's yeast and/or *Nannochloropsis oculata* and their effect of growth and survival of striped mullet (*Mugil cephalus*) and milkfish (*Chanos chanos*) larvae. Aquaculture 110: 361 - 372

Toledo, J. D., H. Kurokura y H. Nakagawa. 1991. Cryopreservation of Different Strains of the Euryhaline Rotifer *Brachionus plicatilis* Embryos. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 57 (7): 1347 - 1350.

Ulloa, M. 1992. Caracterización y evaluación del uso de una cepa del rotífero *Brachionus plicatilis* en el larvicultivo de camarones penaeidos, pp. 93 - 100. Mem. I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura.

Vinatea, L. 1999. Manual de producción de *Artemia* (Quistes y Biomasa) en módulos de cultivo. CYTED. Proyecto II-A/2 "Localización, Caracterización y Evaluación del Potencial Extractivo de *Artemia* en Ibero-América con destino a la Acuicultura". Universidad Autónoma Metropolitana. México D. F.



Watanabe, T., C. Kitajima y S. Fujita. 1983. Nutritional value of live food organisms used in Japan form mass culture of fish: A review. *Aquaculture* 34: 115 - 143.

Yamasaki S. y H. Hirata. 1982. Rearing of the Prawn, *Penaeus japonicus* Fed on Frozen and Living rotifers. *Min. Rev. Data File Fish. Res.* 2: 87 - 89.

Yu, J. P., A. Hino, R. Hirano y K. Hirayama. 1988. Vitamin B₁₂-Producing Bacteria as a nutritive component for a Culture of the Rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 (11): 1873 - 1880.

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 (10): 1799 -1806.

Yu, J. P., A. Hino, T. Noguchi y H. Wakabayashi. 1990. Toxicity of *Vibrio alginolyticus* on the Survival of the Rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56 (9): 1455 - 1460.

Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th. Edition. Prentice Hall. New Jersey.

