

135
2-8

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA



"AISLAMIENTO Y ALGUNOS DATOS BIOLÓGICOS
EN LA DETERMINACION EXPERIMENTAL DE UNA
TECNICA PARA EL CULTIVO DEL ROTIFERO
BRACHIONUS CALYCIFLORUS, PALLAS".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:

JOSÉ JUAN ~~MORALES~~ PALACIOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D.F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO.

- 1.- Resumen.
- 2.- Introducción.
- 3.- Antecedentes.
 - 3.1 - Generalidades.
 - 3.2 - Cultivo de rotíferos de agua dulce.
- 4.- Posición taxonómica de la especie estudiada.
- 5.- Objetivos.
- 6.- Material y métodos
 - 6.1 - Cultivo de microalgas como suministro de alimento para Brachionus calyciflorus
 - 6.2 - Determinación de curvas de calibración.
 - 6.3 - Colecta y aislamiento de los rotíferos.
 - 6.4 - Adaptación de los rotíferos a las diferentes especies de microalgas empleadas y su producción para inóculo
 - 6.5 - Determinación de la tasa reproductiva (r).
 - 6.6 - Determinación de índice de filtración.
 - 6.7 - Cultivo del rotífero en volúmenes de 1000 ml.
 - 6.8 - Ensayos de cultivo semicontinuo.
- 7.- Resultados y análisis.
- 8.- Discusión
- 9.- Conclusiones.
- 10.- Bibliografía.
- 11.- Tablas y figuras.

1.- Resumen.

En el presente trabajo se aisló el rotífero de agua dulce Brachionus calyciflorus (Pallas) de muestras colectadas en las inmediaciones de los canales del lago de Xochimilco, D.F y Chapultepec, D.F, logrando su cultivo alimentándolo con las siguientes especies de microalgas clorofíceas: Ankistrodesmus convolutus y Chlorella sp, que presentan las siguientes medidas promedio en relación a su diámetro 8 y 5 um respectivamente.

B. calyciflorus es una especie con una longitud promedio de 180 um y 110 um de ancho, este rotífero se sometió a cultivos a pequeña escala en tubos de 16 X 150 mm, a través de los cuales se se obtuvo el inóculo requerido para el desarrollo de cultivos en recipientes de 3 l de capacidad, con un volumen de trabajo de 1 l, el inóculo fue de 25 rot ml⁻¹ y se suministro una dosis de 60 mg l⁻¹ dia⁻¹ de cada una de las clorofíceas ya mencionadas. Esta cantidad de alimento fue elegida en base a los resultados obtenidos previamente en la determinación de la tasa intrínseca de reproducción (r) y tasa de filtración de alimento, determinandose los siguientes valores de producción para cada una de las etapas de cultivo mencionadas anteriormente: para el cultivo de rotíferos en tubos de ensaye de 16 X 150 mm se obtuvo una producción de 130 y 116 Rot ml⁻¹ en un tiempo de 8 días, cuando se suministro A. convolutus y Chlorella sp, respectivamente. Para el cultivo de rotíferos en un volumen de trabajo de 1 l y con el suministro de A. convolutus se alcanzó una producción experimental de 318 rot ml⁻¹ en un lapso de 8 días, en tanto que con Chlorella sp se alcanzó una producción experimental de 218 rot ml⁻¹ en un tiempo de 10 días.

2.- Introduccion.

La acuicultura es una biotecnología que en México ha cobrado un gran impulso durante el último par de décadas por ser una actividad capaz de incrementar los rendimientos por unidad de superficie de un cuerpo de agua, siendo como consecuencia una tecnología de gran importancia como alternativa en la producción de alimentos. Aún cuando esta actividad empezó a desarrollarse en nuestro país desde el siglo XIX, con las aportaciones hechas por Chazari al cultivo de peces (Sevilla, 1981), actualmente su aplicación ha derivado en buena medida de experiencias de otros países que en muchos casos son ajenas a las necesidades y condiciones de nuestros sistemas de cultivo, como es el ejemplo del cultivo de especies altamente controladas tales como truchas y bagres.

En terminos generales podemos decir que en México esta actividad se ha desarrollado en dos modalidades:

La primera como practicas de tipo extensivo basadas en la introducción de especies en embalses que representen a corto y mediano plazo una alternativa en la obtención de alimento e ingresos económicos, sobre todo para comunidades de escasos recursos.

La segunda, como práctica basada en la aplicacion de tecnologías de alto rendimiento bajo sistemas de cultivo controlado, es decir una acuicultura de tipo intensivo.

Sin embargo, un factor limitante para el desarrollo de la acuicultura ha sido el mantenimiento y producción de las primeras

etapas de desarrollo, que permitan el suministro de crías.

Esta condición se debe fundamentalmente a la carencia de alimentos que cubran los requerimientos nutricionales de las especies en cultivo sobre todo durante las etapas larvarias.

Con relación a este punto se ha buscado satisfacer las necesidades nutricionales de las especies en cultivo, mediante la producción de alimentos balanceados, que por una parte representan un alto costo de producción y por otra parte son ineficientes al darse comúnmente un bajo aprovechamiento durante estas fases.

En general ha sido poca la atención dirigida al desarrollo de cultivos de apoyo, término que incluye la producción de especies planctónicas y bentónicas necesarias en la alimentación de larvas de peces e invertebrados mayores.

El propósito del siguiente trabajo es establecer una técnica de producción del rotífero B. calyciflorus Pallas, lo que permita su cultivo semicontinuo, para contribuir así a la propuesta de metodologías de apoyo al cultivo de especies consumidoras dulceacuicolas, ya que actualmente aún se considera como un cuello de botella la producción de crías, actividad que generalmente se ve limitada al no contarse con un alimento óptimo durante las primeras etapas de desarrollo.

3.- Antecedentes.

3.1 - Generalidades.

Los rotíferos fueron estudiados por primera vez y descritos por Leeuwenhook en 1703. En el siglo XIX, Ehrenberg los estudió en forma mas detallada, sin embargo los consideró organismos semejantes a los protozoarios, Doutrochet en 1812 considera que poseen semejanzas con los protozoarios pero el plan de organizacion es diferente, separándolos en el Phylum Rotifera (Pennak, 1978).

Estos son organismos microscópicos, pseudocelomados, no segmentados cuya talla fluctúa entre las 40 μ m y 2.5 mm, aunque generalmente esta oscila entre las 100 y 500 μ m de longitud. El Phylum con frecuencia se divide en dos Clases, Digononta y Monogononta, aunque autores como Edmonson.1959 y Meglitsch. 1981 entre otros, eliminan la Clase Digononta y proponen adicionalmente las Clases Seisonidae y Bdelloidae ya que se considera que son grupos lo suficientemente diferentes para esta categoria y con cuya división no se ven afectados el número de Ordenes pertenecientes a la Clase Monogononta. Esta última reviste sumo interes por albergar al 90% de las especies de rotíferos conocidos, siendo un Taxón de gran heterogeneidad y particular interes ya que en el se incluye a la Familia Brachionidae. Los miembros de la Clase Monogononta se caracterizan por ser organismos libres o sésiles que cuentan con un solo ovario, tubo digestivo completo, con boca anterior y

faringe altamente diferenciada que contiene piezas móviles que funcionan como mandíbulas llamadas mástax (Pennak, 1978).

El estudio de los individuos que integran la Clase Monogononta, al igual que la mayoría de las especies que integran el Phylum, es un estudio de organismos hembras (amícticas, $2n$) que se reproducen por partenogénesis (figura. 1), ya que es bastante conocido que los machos de estas especies solo se presentan bajo condiciones adversas y han sido descritos tan solo para algunas especies y se caracterizan por ser individuos más pequeños que las hembras.

La Clase Monogononta incluye tres Ordenes de los cuales el Orden Ploima abarca a la mayoría de los rotíferos libres que componen el plancton limnético. Estos rotíferos se caracterizan por presentar un pie posterior con dos dedos, quedando incluida dentro de este Orden la Familia Brachionidae como se cita anteriormente. Desde principios de siglo se ha dirigido gran parte de la investigación de estos organismos al reconocimiento del efecto de los factores ecológicos, genéticos y fisiológicos en el desarrollo o presencia de machos y hembras mícticas (n), involucrados con procesos de reproducción sexual.

Sin embargo ya que los trabajos de campo y laboratorio encargados del estudio de este fenómeno son muy amplios solo mencionaremos en general algunos de los posibles factores involucrados con la formación de machos y hembras mícticas en las poblaciones de rotíferos.

1.- Cambios en la dieta.

- 2.- Aumento o disminución en la cantidad de alimento.
- 3.- Sobrepoblación.
- 4.- Cambios en algunos parámetros físico-químicos tales como temperatura, pH y amonio no ionizado
- 5.- Cambios estacionales en los que por lo menos una vez al año aparecen los machos.

3.2 - Cultivo de rotíferos de agua dulce.

Si bien el cultivo de microinvertebrados ha despertado gran interés por considerarlos como recurso de apoyo al desarrollo de la acuicultura de especies mayores, gran parte de la atención ha sido dirigida hacia el establecimiento de técnicas de cultivo de especies marinas o eurihalinas por considerarlas como de mayor importancia. Como consecuencia, son extensas las referencias de campo y laboratorio para el cultivo de estas especies y de las cuales investigadores como Gilbert, (1970) y Pourriot (1977), se han encargado de llevar a cabo una revisión más completa de ellas, siendo pocas las técnicas definidas para el cultivo de invertebrados de agua dulce (Gilbert, 1970; Rios, 1987).

Con relación al cultivo de rotíferos de agua dulce, desde 1941, aparecen trabajos como el de Buchner (cit en Rios, 1987), quien desarrolla cultivos de Brachionus urceolaris y B. pallas a partir de un medio químicamente no definido, obtenido de extractos o infusiones de tierra; el autor empleaba el sobrenadante filtrado y suministraba como alimento Chlorella sp. En este

trabajo se aporta la siguiente información: en condiciones de baja densidad los rotíferos se reproducen por partenogénesis, en tanto que cuando la densidad de organismos es alta tiende a presentarse la bisexualidad y con ella procesos de reproducción sexual.

Por su parte Pourriot (1965), desarrolló cultivos de Brachionus urceolaris y E. rubens en un medio de cultivo reconstituido, del cual no indica su composición. Los cultivos se desarrollaron en forma axénica, alimentándolos con el alga Ch. pyrenoidosa; para analizar si los cultivos presentaban contaminación por bacterias, se extraían muestras que eran sembradas en medios de cultivo para bacterias a base de peptona y medio de Sabouraud.

Adachi (1966), describe que la mayoría de los rotíferos de agua dulce aceptan como alimento microalgas de los siguientes géneros: Anabaena, Ankistrodesmus, Chlamydomonas, Chlorella, Dunaliella, Eudorina, Haematococcus, Palmella, Polytoma, Scenedesmus y Euglena.

King (1966), determina la especie de microalga idónea en el cultivo de Euchlanis dilatata y aporta algunos datos sobre su biología y cultivo como son: tasas de mortalidad, natalidad, sobrevivencia y reproducción neta para tres dietas de microalgas en forma aislada Chlamydomonas reinhardi, Euglena gracilis y E. geniculata. Este autor encuentra que Ch. reinhardi y E. gracilis son las especies que brindan mejores resultados, además de que existe una relación directa entre el incremento poblacional y la

concentración de alimento suministrado.

Por su parte Gilbert (1970), cultivó B. calyciflorus empleando en su dieta E. gracilis. El trabajo se desarrolló con hembras amícticas extraídas con micropipetas y cultivadas en tubos de ensayo con tapón de rosca de 75 X 16 mm, suministrando de 4 a 5 ml de algas al inicio del cultivo de los cuales no indica la densidad de células proporcionadas. Este autor obtiene una producción de 93 Rot ml⁻¹ en un lapso de seis días.

Spektrova y Aranovich (1974 cit en Rios 1987) reporta que el rotífero B. calyciflorus puede reproducirse a salinidades de 8 a 10 ‰ siempre y cuando el cambio sea gradual.

Sladeczek (1978), analizó el efecto de diferentes tipos de alimentos en el proceso de filtración de B. calyciflorus, encontrando que este rotífero es capaz de seleccionar el alimento que filtra formando una malla con su aparato masticador, lo cual está en función directa con el tamaño de las partículas y en orden descendente de acuerdo con las siguientes especies de microalgas: Rhodotularia glutinis, Chlamydomonas, Ankistrodesmus falcatus, Scenedesmus acuminatus, y Euglena gracilis. Este rotífero como otros, no ingiere necesariamente alimento en proporción a su abundancia, considerando que esto puede estar controlado por la dieta a la que ha estado sometido en su vida silvestre y además si se trata de organismos que han pasado por periodos de inanición.

Por su parte Shapovalova (1980), cultivó los siguientes rotíferos:

Asplanchna brightwelli, Brachionus sp., Filinia major y F. congregata para la elaboración de filtros biológicos empleándolos en estanques que contenían un 60 % de aguas de desecho industrial y 40 % de desecho doméstico, mostrando que a altas temperaturas los rotíferos son capaces de depurar sustancialmente el agua al consumir una gran cantidad de plancton y bacterias.

Shluter y Groeneweg (1981), analizaron el efecto de algunos factores medio ambientales en el cultivo de B. rubens en aguas de desecho, alimentados con Scenedesmus costato granulatus empleando recipientes de 300 ml, con una cantidad de alimento de 80 mg l^{-1} . Estos autores determinaron que a concentraciones de oxígeno superiores a 1.15 mg l^{-1} no hay inhibición de la reproducción, pero a 0.72 mg l^{-1} mueren a los 2 días, asimismo observaron que el máximo crecimiento se obtiene a una concentración de $4.1 \pm .11 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$. Con respecto a los niveles de nitritos, los rotíferos pueden permanecer sin alteraciones a concentraciones de 12 mg l^{-1} , incluso si han sido aclimatizados previamente a valores superiores, son capaces de tolerar niveles mayores a 12 mg l^{-1} . De igual forma son capaces de sobrevivir a salinidades de 4 g l^{-1} . Con relación al pH pueden alcanzar un crecimiento máximo en un intervalo de 6 a 8 con decrementos grandes en la población a pH arriba de 9 y mortalidad a pH de 4.5 .

Reed (1979), describe en términos generales un método en el cual logró el cultivo de aproximadamente 20 especies de rotíferos de

agua dulce, empleando fertilizantes como ortofosfatos ó mezclas de fósforo, potasio y nitrógeno como medio de cultivo para las microalgas empleadas en la alimentación de los rotíferos. Este autor señala sin embargo, la importancia de alimentar a los rotíferos con algas provenientes del sitio de colecta de los mismos, señalando además que la presencia de bacterias en los medios de cultivos no inhibe el crecimiento de los rotíferos.

Shluter y Groeneweg (1981), cultivaron masivamente B. rubens a partir de un sistema de tratamiento de desechos porcícolas, empleando como alimento el alga Scenedesmus falcatus. Para inocular los estanques de cultivo, los rotíferos de inóculo fueron producidos axénicamente en el medio mineral de Halbach fase en la que se utilizo Scenedesmus costato granulatus como alimento.

Para utilizarlos en la producción de larvas de un centrarquido, Snow et al. (1981), cultivaron el rotífero B. calyciflorus para suministrarlos como alimento de Morone saxatilis bajo condiciones de laboratorio y en áreas libres en estanques de 0.04 has, ellos observaron que la sobrevivencia de las larvas de estos peces es mas alta cuando se alimentan con una dieta a base de rotíferos que cuando las larvas son alimentadas en condiciones libres con una mezcla de zooplancton.

Schluter y Groeneweg (1984), analizaron la influencia del amonio en el cultivo de microalgas y del rotífero B. rubens, con énfasis en su efecto sobre la reproducción y crecimiento, encontrando que lo anterior solo se ve afectado por la forma no

iónica del amonio en las concentraciones por arriba de 3 mg l^{-1} de $\text{NH}_3\text{-N}$; en el intervalo de 3-5 mg de $\text{NH}_3\text{-N}$ la reproducción decrece aunque los animales no mueren, además de que a esta concentración el proceso puede ser reversible si sus niveles disminuyen. A una concentración de 5 mg l^{-1} de $\text{NH}_3\text{-N}$ los rotíferos mueren en dos días; a este mismo valor de $\text{NH}_3\text{-N}$ y a pH altos, los cultivos de microalgas también son afectados. Moor, I. (1987), indica que a una concentración de 7mg de $\text{NH}_3\text{-N}$ y a un pH de 9.85 B. calyciflorus puede mantenerse por 96 hrs, sin efecto aparente. v

Mitchell y Joubert (1986), estudiaron el efecto de valores altos de pH en los cultivos de B. calyciflorus, analizando al mismo tiempo su efecto en el control del rotífero Asplanchna, encontrando que el mejor crecimiento de B. calyciflorus se da en un intervalo de pH de 8.5 a 9.5, y un crecimiento menor a un pH de 10.5, mismo en el que se presenta una alta producción de huevos de resistencia; a un pH de 7.0 se empiezan a presentar machos. Estos autores encontraron que para el control de Asplanchna, es suficiente con mantener por algunos días los medios de cultivo a un pH mayor a 9.0

Mitchell (1986), describe sus experiencias en el cultivo semicontinuo de Brachionus calyciflorus con un sistema de suministro de alimento del alga Chlorella sp de forma automática. Este autor obtiene los siguientes valores óptimos de dilución y producción de recipientes de 500 l: a una dilución de 0.16 d^{-1} la

producción en biomasa fue de 0.1227 g l^{-1} , con una producción total de 9.82 gramos en 500 l^{-1} .

Rios (1987), desarrolló cultivos de B. rubens en recipientes de 1 litro de capacidad alimentandolo con el alga Ankistrodesmus convolutus; los inóculos aplicados fueron de 9, 11, 15 y 22 rot/ml con cuatro concentraciones de microalgas: 9, 17, 21 y 23 $\times 10^6$ cel. ml^{-1} obteniendo los siguientes valores de producción 270, 300, 340 y 350 Rot ml^{-1} respectivamente.

4.- Posición Taxonómica del Rotífero estudiado.
Segun Edmonson, 1959.(fig.2)

Phylum: Rotifera.

Clase : Monogononta.

Orden : Plolima.

Familia : Brachionidae.

Subfamilia : Brachioninae.

Genero : Brachionus.

Especie : B. calyciflorus Pallas.

5.- Objetivos :

- Observar la eficiencia nutricional de dos especies de microalgas, aplicada en tres concentraciones, sobre los procesos de filtración, reproducción y crecimiento poblacional de Brachionus calyciflorus
- Aportar algunos datos biológicos adicionales de B. calyciflorus, en cultivos controlados.
- Analizar la eficiencia del sistema de cultivo manejado en términos de producción y contemplar de esta forma la posibilidad del desarrollo de cultivos a mayor escala.

6.- Material y métodos.

6.1 .- Cultivo de microalgas como suministro de alimento para Brachionus calyciflorus

Para el cultivo del rotífero se suministraron como alimento microalgas clorofíceas de los géneros Ankistrodesmus y Chlorella, ya que se tenían aisladas y se contaba con técnicas para su cultivo en el Laboratorio de Ecología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N.

Se desarrollaron cultivos por lotes de ambas especies de microalgas en recipientes de 1 l y 2 l de capacidad, con un volumen de trabajo de 800 y 1600 ml, los que al alcanzar su fase de máximo crecimiento son utilizados completamente. Para el desarrollo de los cultivos se empleo el medio Bristol o Bold Basal (Stein, 1973) cuya formulación se muestra en la tabla 1. El medio de cultivo era inoculado con 50 a 100 ml procedentes de cultivos de microalgas que se encontraban en su fase exponencial de crecimiento; los cultivos se mantuvieron con aereación continua e iluminación constante con lamparas de luz blanca " luz de día " de 5000 luxes y a una temperatura ambiente de 26 C aproximadamente.

Una vez que el cultivo alcanza su fase exponencial de crecimiento lo que ocurre en aproximadamente 14 días se retiraban de las condiciones descritas y un volumen de 50 a 100 ml era empleado como inóculo de medio fresco; el resto se dejaba a reposar a bajas temperaturas para reducir el crecimiento de

bacterias y permitir que se sedimentara la biomasa de algas, eliminando el sobrenadante.

Este procedimiento es lento ya que el paquete celular queda sedimentado en 6 a 8 días aproximadamente. Todo lo anterior determinó el desarrollo de cultivos alternados con lo que se buscó mantener un suministro constante e alimento.

6.2.- Determinación de curvas de calibración.

La literatura recomienda que en la evaluación de diferentes dietas sobre el crecimiento y desarrollo en general de los organismos consumidores, es importante expresar la concentración alimentaria en términos de peso seco, ya que esto permite hacer comparaciones sobre bases equivalentes. En el caso de las microalgas, las diferentes formas y tamaños que presentan invalidan el tratar de hacer comparaciones en dietas expresadas como densidades celulares, por lo que en este trabajo se decidió expresar los tratamientos como concentraciones en peso seco de las especies empleadas.

Para lograr esto, se procedió a determinar a través de curvas de calibración, el peso seco de cada una de las especies de algas, partiendo de la información determinada por Gutiérrez (1989), quien proporciona la relación que guardan las especies de microalgas ya citadas con respecto a la absorbancia a 660 nm siendo para A. convolutus de :

$$\text{No. de cel.} = - 512507 + 1.01687441 \times 10^8 (\text{Absorb.})$$

y para Chlorella sp :

$$\text{No. de cel.} = 13022 + 8.772759 \times 10^7 \text{ (Absorb.)}$$

A partir de esta información se procedió a determinar la curva de calibración que permitiera conocer el peso seco por célula de ambas especies (ver tablas 2a y 2b). Con esto se obtuvo el peso exacto de cada una de las dosis de alimento a suministrar, expresada, en mg l^{-1} durante los experimentos. Para esta determinación se desarrollaron cultivos de las microalgas antes citadas en matraces Erlenmeyer de 1000 ml, hasta alcanzar su crecimiento exponencial aplicándoles, la técnica descrita por Stein (op. cit) en la determinación de peso seco, utilizando para ello recipientes de aluminio.

6.3 .- Colecta y aislamiento de los rotíferos.

Se realizaron colectas en las inmediaciones de los canales del Lago de Xochimilco, D.F y del Lago de Chapultepec, D.F, con ayuda de una red de de plancton con abertura de malla de 45 micras. Para el aislamiento se efectuó una serie de lavados sucesivos consistentes en cambios continuos de agua desclorada, esterilizada y filtrada; donde los rotíferos eran separados por micromanipulación y con ayuda de un microscopio estereoscopio; los individuos aislados eran depositados en cajas petri de 60 mm de diámetro mismas que contenían agua desclorada y esterilizada. Las muestras eran revisadas continuamente y lavadas como fue

mencionado con el objeto de eliminar otros organismos que pudieran contaminar los cultivos, principalmente protozoarios.

6.4 .- Adaptación de los rotíferos a las diferentes especies de microalgas y cultivo a pequeña escala para producción de inóculo.

Los organismos fueron colectados, en cajas petri de 60 mm de diámetro en una densidad de 5 org ml⁻¹, suministrándoles una mezcla de las especies de microalgas citadas con el objeto de habltuarlos a éstas, los recipientes de cultivo se homogeneizaban diariamente con la finalidad de resuspender el alimento sedimentado, alcanzandose un máximo crecimiento en una semana.

De estos recipientes se resembraron hembras amícticas con 1 o mas huevos, en tubos de ensaye de 16 X 150 mm que contenian 5 ml de agua potable desclorada y filtrada; la densidad inicial fue de 5 rotml⁻¹. En este caso se suministró cada una de las especies de microalgas ya citadas de manera aislada. El suministro del alimento a los rotíferos a esta escala se realizó bajo condiciones de esterilidad con la finalidad de proteger los cultivos de posibles contaminaciones. Estos cultivos se mantuvieron en una temperatura ambiente de 25 C , e iluminacion continua con luz blanca de 1400 luxes , alcanzandose un crecimiento exponencial en aproximadamente una semana.

6.5.- Determinación de tasa reproductiva (r).

Para conocer la influencia del alimento empleado sobre algunos parametros poblacionales de B. calyciflorus como son la tasa intrínseca de crecimiento (r) y el tiempo de duplicación (t_2) se manejaron las dos especies de microalgas ya citadas en tres concentraciones 30, 60 y 120 mg l⁻¹.

Los experimentos se hicieron por triplicado empleándose tubos de 16 X 46 mm; estos recipientes fueron inoculados con una hembra amíctica que poseía un solo huevo, llevándose a un volumen final de trabajo de 4 ml el cual incluía la dosis respectiva de alimento.

Después de 24 h los recipientes eran revisados, cuantificándose los organismos presentes auxiliándose de un microscopio estereoscopio y una micropipeta.

En esta determinación se consideraron para cada observación tanto organismos completamente formados como organismos potenciales siendo estos últimos los que aún cuando son huevos, son virtualmente capaces de generar un nuevo individuo.

La determinación de la tasa intrínseca de reproducción (r) de B. calyciflorus se determinó en base al modelo de crecimiento exponencial cuya expresión matemática es la siguiente: (Krebs, 1978).

$$N_t = N_0 e^{rt} \quad (1)$$

$$\frac{\ln N_t - \ln N_0}{t} = r \quad (2)$$

Donde : N_t = Es el número de individuos en la población al tiempo t .
 N_0 = Es la población inicial al tiempo 0.
 e = Base de los logaritmos naturales.
 r = Capacidad innata de incremento para las condiciones ambientales específicas.
 t = Tiempo.

Con frecuencia r , se conoce también como la tasa intrínseca de de reproducción (TIC), para un medio carente de competidores y sin limitaciones en la disponibilidad por espacio y alimento. (op. cit).

A partir de las estimaciones de r , se calculó el tiempo de duplicación (t_2) definido por la expresión:

$$T_2 = \frac{\ln 2}{r}$$

6.5.- Determinación de índice de filtración.

En relación a este punto, se determinó el número de células filtradas por rotífero por unidad de tiempo. Este experimento se llevó a cabo con una población de rotíferos de clases de edad estables, con lo que se buscó estandarizar el resultado por individuo, estas pruebas se hicieron en tubos de ensayo de 160 X 30 mm, con un volumen de trabajo de 20 ml y un inóculo de 25 rot ml^{-1} , las dosis aplicadas fueron: 30, 60 y 120 $mg\ l^{-1}$ en peso seco de Ankistrodesmus convolutus y Chlorella sp, las pruebas se realizaron por triplicado con tiempos de observación menores a 8 horas. La evaluación del proceso de filtración se llevó a cabo con el monitoreo de los cultivos cada 60 min, homogeneizando las

muestras en las que se determinaba, con ayuda de una cámara de Neubauer la concentración celular de microalgas filtradas por unidad de tiempo, determinandose así la tasa de filtración con la siguiente expresión:

$$\text{No de cel Fil. Rot. Min} = \frac{\text{CoTo} - \text{CT1}}{\text{T} (\text{N})}$$

donde CoTo = Es el número de células en el medio al tiempo To

CT1 = Es el número de células en el medio al tiempo T1

T = Tiempo de experimentación en minutos.

N = Es el número de rotíferos en el medio de Exp.

6.7.- Cultivo de Brachionus calyciflorus en volúmenes de 1000 ml.

Los rotíferos cultivados en tubos de ensayo sirvieron de inóculo para matraces con 120 a 200 ml de medio con los cuales se obtuvo a su vez el número de organismos requerido para el desarrollo de cultivos en volúmenes de trabajo de 1000 ml; En este caso se partió de un inóculo de 25 Rot ml⁻¹. El suministro de cada una de las dosis alimentarias durante las diferentes etapas de cultivo se determinó indirectamente mediante las estimaciones de la densidad óptica de cultivos concentrados, empleando para esto un espectrofotómetro a 860 nm de longitud.

Para los cultivos desarrollados en un volumen de trabajo de 1000 ml se proporcionó únicamente una dosis (óptima) de 60 mg l⁻¹

determinada de las pruebas del efecto de las diferentes dosis de alimento en la T.I.C. (r), e índice de filtración.

Los recipientes empleados fueron instalados de acuerdo a Soergeloos y Persoone (1972), proporcionandoles aereación continua y fotoperiodos de 12 X 12. Diariamente se registro el número de rotíferos, para lo cual se extrajeron muestras de 1 ml con la ayuda de una pipeta de 1 ml, para la cuantificación de los organismos se empleaba un microscopio estereoscopico separando los individuos de cada muestra por micromanipulación, esto se hacia por triplicado diariamente, con la finalidad de minimizar el sesgo en el registro de esta informacion. Asimismo durante esta etapa del cultivo, se llevó a cabo el registro diario de temperatura , pH y oxígeno disuelto, empleando para ello un termómetro de cristal con escala de -20 a 110⁰C, con un potenciómetro Conductronic 21 y un oxímetro YSI Mod 54-A, respectivamente.

El medio de cultivo de los rotíferos era renovado diariamente incluyendo el suministro de alimento, para evitar al mayor grado posible la contaminación principalmente por protozoarios y mantener en un estrecho intervalo los factores físico - químicos ya mencionados.

6.8.- Ensayos de cultivo semicontinuo.

Con relacion a este punto, B. calyciflorus fué mantenido en recipientes de 3.5 l de capacidad, con un volumen de trabajo de

1000 ml en un medio de cultivo que incluía agua potable desclorada y filtrada y un suministro de alimento equivalente $60 \text{ mg} \cdot \text{l} \cdot \text{dia}^{-1}$. A estos cultivos se proporcionó una aereación continua leve para no provocar mortalidad y si encambio permitir un movimiento ascendente de los medios y resuspender con esto el alimento sedimentado; los cultivos se desarrollaron a una temperatura de 25 C y se mantuvieron en un intervalo de pH de 8 a 9.

Una vez que los medios de cultivo alcanzaron su fase de crecimiento mas alta, determinada de la cuantificación de rotíferos en el medio, se removi6 el 50 % del volumen de trabajo que corresponde al volumen de cosecha, mientras que los 500 ml restantes incluian el in6culo requerido para mantener un cultivo semicontinuo. El volumen de cosecha y este 6ltimo eran filtrados a trav6s de una red de plancton con luz de malla de 45 um , separando los rotíferos de cada muestra y resuspendiendo aquellos que seguirian bajo cultivo en nuevo que incluía agua en las condiciones antes señaladas y la dosis de alimento respectiva.

7.- Resultados y Análisis.

El cultivo de Brachionus calyciflorus dió resultados muy favorables ya que esta especie presentó una buena aceptación al suministro de una mezcla de las microalgas manejadas.

Por otra parte, la determinación del peso seco en gramos por célula de las microalgas manejadas, permitió el suministro de dosis equivalentes para cada una de las especies de microalgas partiendo de la siguiente información:

A. convolutus presenta un peso promedio de 5.0249×10^{-12} g, con una desviación estándar = 4.8350×10^{-13} y un Error = 9% .

Chlorella sp presenta un peso promedio de 7.8345×10^{-12} g, con una S = 3.8350×10^{-13} y un E = 5% .

Con lo que respecta a la etapa de aceptación de B. calyciflorus a las microalgas antes citadas en forma aislada, empleando tubos de ensayo de 18 X 150 mm se alcanzó una producción máxima en un lapso de 6 días a partir de un inóculo de 5 org ml^{-1} , obteniendo para A. convolutus una producción de $130 \pm 6.23 \text{ org ml}^{-1}$ con un coeficiente de variación (C.V.), de 4.78 % , mientras que con Chlorella sp se obtuvo una densidad de $118 \pm 5.09 \text{ org ml}^{-1}$ con un C.V. de 4.40 % .

Con relación a la tasa de filtración del rotífero B. calyciflorus se obtuvo que las dosis de 30 y 120 mg l^{-1} de A. convolutus

producen un decaimiento sustancial en el No de cel.fil.rot.min⁻¹ posterior al primer par de horas de cada ensayo llevado a cabo, observando una tasa de filtración menor al 43% , (ver tabla 3). Cuando se suministra la primera de las dosis señaladas, la tasa promedio de filtración más alta fué de 1320 cel rot min⁻¹, mientras que para las últimas cuatro horas se presenta un intervalo en el número de celulas filtradas de 794 a 486 con un valor promedio de 610 ± 93 cel.filt.rot.min⁻¹. Para la concentración de 120 mg l⁻¹ se determinó que durante las primeras dos horas se presenta un valor promedio de 1668 cel fil min⁻¹ (el valor más alto para esta dosis) posteriormente se presenta un intervalo de celulas filtradas de 993 a 434 con un promedio de 675 ± 140 cel fil rot min⁻¹. Cuando se aplicó una dosis de 60 mg l⁻¹ se observa una respuesta más estable ya que tan solo durante la primera hora se presenta un valor máximo en el número de celulas filtradas que es de 1068 cel fil min⁻¹ en tanto que en las últimas 5 hrs el intervalo de celulas filtradas fue de 980 a 715 con variaciones graduales durante la etapa de experimentación con un promedio de 850 ± 55 cel filt rot min⁻¹. Con relación a la respuesta encontrada en el suministro de Chlorella sp se determinó que las dosis de 30 y 60 mg l⁻¹ ofrecen cambios graduales durante el periodo de determinación de la tasa de filtración con esta alga, encontrando que para la primera de ellas se presenta un intervalo de celulas filtradas de 514 a 314 y un valor promedio de 411 ± 80 cel fil rot min⁻¹, para la segunda dosis se determinó un número de celulas filtradas de 760 a 598

con un valor promedio de 691 \pm 68, mientras que para la dosis de 120 mg l⁻¹ en la primera hora del experimento se presenta una tasa de filtración máxima con un valor promedio de 1180 cel filt rot min⁻¹ presentando durante las últimas 5 horas un decaimiento sustancial en el número de células filtradas menor al 40% con un valor promedio para esta dosis de 430 \pm 120 cel filt rot min⁻¹, ver tabla 3. Dado que no fué posible el ajuste de un modelo matemático semejante para cada una de las respuestas de los organismos a las diferentes dietas, no pudo aplicarse un análisis estadístico para comparar las diferencias entre la respuesta de los rotíferos a cada una de las dosis.

Con lo que respecta a la tasa intrínseca de crecimiento o reproducción se determinó que para las tres concentraciones de alimento suministradas, la dosis de 60 mg l⁻¹ brindó los más altos valores de r (ver fig 3) para cada una de las especies de microalgas suministradas, considerando en cada determinación organismos reales e individuos potenciales.

Los valores promedio de las réplicas realizadas para cada dosis de alimento suministrada se muestra en la tabla A, observando para esta dosis de alimento el menor tiempo de duplicación de *B. calyciflorus*. Dado que este último valor se expresa en días, se hicieron las conversiones pertinentes para determinar el tiempo para la duplicación de cada individuo en horas, (ver tabla B).

TABLA, A. Valores de T.I.C (r) para individuos reales y potenciales de Brachionus calyciflorus considerando las dos especies de alimento suministrados.

Dosis mg l^{-1}	<u>A. convolutus</u>		<u>Chlorella sp</u>	
	Ind. Rles	Ind. Pot	Ind. Rles	Ind. Pot
30	1.6582	1.4759	1.4469	1.0986
60	1.8718	1.7047	1.7047	1.5841
120	1.1787	1.0986	1.0986	1.0986

TABLA B. Valores calculados para determinar el tiempo requerido por la especie en estudio para generar dos individuos, considerando las dos especies de alimento suministradas.

Dosis mg l^{-1}	<u>A. convolutus</u> t en hrs		<u>Chlorella sp</u> t en hrs	
	Ind. Rles	Ind Pot	Ind. Rles	Ind. Pot
30	10.0	11.3	11.5	15.1
60	8.9	9.8	9.8	10.5
120	14.1	15.1	15.1	16.4

A los valores anteriores determinados para la T.I.C. se les aplicó un análisis de varianza bifactorial, en el que se compara la respuesta de la tasa de reproducción con respecto a diferentes algas suministradas, así como el de las dosis que se aplicaron ; encontrando que las diferencias obtenidas presentan nivel de significancia de $P = 99.5 \%$ (ver Tablas 4 y 5).

El registro realizado del crecimiento poblacional del rotífero B. calyciflorus en recipientes de 3.0 l y un volumen de trabajo de 1000 ml alimentados con A. convolutus y Chlorella sp en una dosis de 60 mg l dia⁻¹ en peso seco (ver tablas, 6A y 6B), fueron ajustados al modelo de crecimiento logístico cuya expresión es la siguiente:

$$N_t = \frac{K}{1 + e^{(a - rt)}}$$

Donde: K = Capacidad de soporte del sistema.
 r = T.I.C.
 a = Cte. (Ordenada al Origen).
 t = Tiempo (días)

Los ajustes de los datos experimentales (ver tablas 7,8 y 9 y - fig.4) se hicieron aplicando un metodo iterativo, para la determinación de las constantes K, a y r, utilizando para este proposito una microcomputadora HP - 41CV de forma tal que para B. calyciflorus se obtiene la siguiente expresión:

$$N_t = \frac{329}{1 + e^{3.1242 - .7857(t)}}$$

Con un indice de correlación al modelo logístico de 0.9787, una Fb = 288.0171 y una r = - 0.9897 .

En el suministro de Chlorella sp se obtuvo lo siguiente:

$$N_t = \frac{257}{1 + e^{2.2306 - .3582(t)}}$$

Con un indice de correlación al modelo logístico de 0.9678, una Fb = 146.8006 y una r = -.9646 .

Estas expresiones se emplearon para elaborar las curvas teóricas de crecimiento cuyos datos se presentan en la tabla 10 y figs 5,6 respectivamente.

Mediante un análisis de covarianza se encontro que con un 99.5 % ambas curvas de crecimiento presentan diferencias significativas.

Con relación al desarrollo de cultivos semicontinuos con un volumen de trabajo de 1000 ml y una cosecha del 50% se obtuvo lo siguiente: cuando la población alcanzó experimentalmente una densidad promedio de 312 org ml^{-1} y conto con una dieta de 60 mg l dia^{-1} de A. convolutus la población se recupero en un lapso de 48 hrs. Mientras que cuando se suministro Chlorella sp en la dosis antes mencionada pero apartir de una densidad promedio de 214 org ml^{-1} y con una cosecha del 50 % , la población se recupera en un 91% en un lapso de 24 hrs, sin embargo a las 48 hrs la población no sobrepasa el 103% .

8.- Discusion.

En el presente trabajo, B. calyciflorus presenta resultados muy favorables con el suministro de las microalgas ya citadas, lo que coincide con lo señalado por Adachi (1966), quien menciona que la mayoría de los rotíferos de agua dulce aceptan una gran variedad de cloroficeas como alimento. Esto tampoco se contrapone con las recomendaciones de Reed (1979) y Stenberg (1981), quienes indican la importancia de alimentar a las especies de rotíferos deseados con microalgas provenientes del sitio de colecta de los mismos.

Edmonson (1966, en Rios 1987) señala que la concentración de alimento y los cambios de temperatura son factores limitantes en la abundancia de los rotíferos. De acuerdo a los resultados obtenidos, puede decirse que la concentración de alimento no fue un factor limitante en la producción de rotíferos alcanzada ya que la cantidad de alimento proporcionada se sustentó en los resultados obtenidos del efecto de diferentes dosis de alimento en la tasa intrínseca de crecimiento (r) y tasa de filtración observada para las especies de microalgas manejadas, determinando para ambos procesos una dosis óptima de 60 mg l^{-1} , lo que se contrapone en parte con lo descrito por Mitchell y Joubert (1986) quienes indican que existe una relación directa entre el número de rotíferos producidos y la concentración de alimento proporcionada. Los resultados obtenidos coinciden por otra parte con lo reportado por Sladeczek, (1978) quien para Brachionus calyciflorus analiza algunos aspectos fisiológicos de su

alimentación y señala que ésta como otras especies de rotíferos no consume alimento en relación a su abundancia, existiendo de esta forma una concentración óptima de alimento que cubre sus requerimientos nutricionales y fisiológicas que de acuerdo a las experiencias llevadas a cabo fue la dosis señalada anteriormente para ambas especies de microalgas.

Reed (op cit) señala por su parte que bajo condiciones de cultivo los rotíferos son totalmente tolerantes a cambios amplios de temperatura, por arriba de 4 C y abajo de 27 C. En el presente trabajo la temperatura se mantuvo durante todos los experimentos en un estrecho intervalo de temperatura de 25 a 26 C \pm 0.5 C.

Por lo que respecta al pH los resultados están de acuerdo con lo señalado por Mitchell y Joubert, (1986) quienes señalan que B. calyciflorus presenta los niveles más altos de sobrevivencia y el mayor grado de producción de huevos amfícticos en un intervalo de pH de 8.5 a 9.5. En nuestro caso el desarrollo de los cultivos siempre fue en un intervalo de pH de 8 a 9.

Si bien se tuvo como un objetivo determinar un valor constante y óptimo en el proceso de filtración, solo fue posible obtener una estimación promedio basada en el número de células filtradas por rotífero por minuto en cada una de las concentraciones aplicadas, observando que para las dosis por arriba y por abajo de 60 mg l⁻¹ se presenta una caída brusca en la tasa de filtración, mientras que en el mejor de los casos para la dosis de 30 mg l⁻¹ de Chlorella sp la tasa de filtración esta por debajo de la

encontrada para la dosis de 60 mg l^{-1} de la misma especie, obteniendo finalmente un tasa de filtración mas constante para ambas especies de microalgas manejadas con la dosis de 60 mg l^{-1} .

Con lo que respecta al efecto de diferentes dosis de alimento sobre la T.I.C. (r) cabe mencionar que aún cuando no existe una disponibilidad de información suficiente para discutir los resultados obtenidos en el presente trabajo solo mencionaremos que lo reportado por Rios, (1987) no puede compararse de manera exacta ya que los resultados encontrados para B. rubens estan determinados por las densidades de inóculo que manejo en sus ensayos, mientras que en el presente trabajo para B. calyciflorus la determinación de la tasa intrínseca de crecimiento (r) se llevó a cabo con individuos aislados sin competencia por espacio y alimento determinando una T.I.C. (r) óptima a un dosis de 60 mg l^{-1} en peso seco para ambas especies de microalgas.

Con relación a los rendimientos obtenidos para las diferentes escalas de cultivo, se puede decir que en tubos de ensayo de $16 \times 150 \text{ mm}$ se obtuvieron rendimientos mas altos que los reportados por Gilbert(1970), quien señala una producción de 93 Rot ml^{-1} mientras que en nuestro caso se obtuvo una densidad de 130 rot ml^{-1} , cuando se alimentó con A. convolutus y 116 cuando se suministro Chlorella sp, estribando estas diferencias en el tipo de alimento suministrado ya que como ha sido señalado por King (1968), la mayor viabilidad en el cultivo de rotíferos de agua dulce se obtiene al suministrar algas de pequeño tamaño

como es el caso de A. convolutus y Chlorella sp, siendo entre estas, más pequeña Chlorella sp

Aún cuando el objetivo central del trabajo no fue el desarrollo de una producción masiva de este rotífero, sino el establecimiento de un sistema de producción que permita el desarrollo de cultivos a mayor escala, la producción alcanzada no puede compararse con trabajos como el desarrollado por Mitchell (1986) para el cultivo de B. calyciflorus ya que este autor señala para una dilución de 0.16 día^{-1} para recipientes con un volumen de cultivo de 500 lts una producción en términos de biomasa de 0.1227 g l^{-1} , mientras que en nuestro caso los rendimientos alcanzados están dados en densidad de rotíferos por mililitro, además de que este autor señala que sus resultados son sustancialmente inferiores a los reportados por Groeneweg y Shluter (1981) quienes reportan para B. rubens una producción de 500 org ml^{-1} .

Sin embargo los resultados del experimento realizado sobre cultivo semicontinuo han permitido determinar a priori las potencialidades de este rotífero bajo un cultivo semicontinuo a mayor escala.

Si bien los cultivos alimentados con el alga A. convolutus brindaron los más altos valores de producción con un promedio de 311 rot ml^{-1} que extrapolados al volumen de cosecha efectuados representa 155,625 rotíferos por recipiente, no se pudo obtener una recuperación de cultivo en un periodo de 24 hrs, ya que

cuando se proporcionó el alga antes citada cada 24 hrs se observó que el alimento era filtrado por los rotíferos en un periodo menor a las 24 hrs, sin embargo este periodo de recuperación del cultivo podría reducirse a un día con el suministro del alga antes citada dos veces al día, con la posibilidad de incrementar también la densidad de rotíferos producidos, ver tabla 11 y fig 7

Por otra parte los cultivos mantenidos con el alga Chlorella sp aún cuando solamente alcanzan a proporcionar una densidad de 220 rot ml^{-1} que extrapolado al volumen de cosecha equivale a 110000 Rotíferos por recipiente por cosecha el tiempo de recuperación se dio en un lapso de casi 24 hrs. Tales diferencias pueden atribuirse probablemente a que esta alga tarda más tiempo en ser asimilada reflejado esto en el número de células filtradas por minuto por lo que la población disponía por más tiempo de alimento para cubrir sus requerimientos nutricionales. (ver tabla 11 y fig 8).

9.- Conclusiones.

- Brachionus calyciflorus (Pallas) es una especie filtradora que acepta como alimento las algas Ankistrodesmus convolutus y Chlorella sp
- La dosis óptima de alimento para esta especie fue de 60 mg l⁻¹ en peso seco para ambas especies de microalgas.
- La tasa de filtración de B. calyciflorus es mayor con el alga A. convolutus que con el alga Chlorella sp, aún cuando esta última es una especie de menor tamaño. Sin embargo las tasas de filtración más altas fueron para ambas especies de microalgas con el suministro de una dosis de 60 mg l⁻¹ en peso seco.
- La T.I.C. (r) de este rotífero es máxima con la dosis de alimento ya mencionada para ambas especies de alimento suministrado.
- El tiempo mínimo de duplicación (T₂) de este rotífero fue en un lapso de 8.9 hrs cuando se alimentó con A. convolutus. Este valor fluctúa entre 8.9 hrs y 15.1 hrs dependiendo de la especie y dosis de alimento proporcionada.
- El crecimiento poblacional de B. calyciflorus se ajusta al modelo logístico, presentando una capacidad máxima de 329 Rot ml⁻¹ en un volumen de trabajo de 1000 ml, cuando se alimenta con A. convolutus y de 257 rot ml⁻¹ con el mismo volumen de trabajo con Chlorella sp.

- En cultivo de lote los rendimientos obtenidos fueron de 130 y 116 rot ml^{-1} en un lapso de una semana cuando se alimento con las algas ya citadas.
- En el cultivo semicontinuo de esta especie de rotífero con un volúmen de trabajo de 1000 ml y a una dilución del 50% se alcanza una densidad máxima de 329 Rot ml^{-1} que extrapolada al volumen total es de 164,000 Rotíferos cuando se alimenta con A. convolutus.

Por todo lo anterior puede concluirse que esta especie de rotífero es susceptible de cultivo con altos rendimientos, por lo que se puede considerar un cultivo de apoyo bastante adecuado para el abastecimiento de alimento de fases larvarias de peces y crustáceos mayores dulceacuícolas de importancia económica.

11.- Bibliografía.

- Adachi, R. 1966. Studies on the culture of rotifer Lacane Tenviseta prefects. Univ. Mie. J. Fac. Fish; 6 (12): 193-202.
- Chotyaputta, C & K. Hirayama 1978. Food selectivity of the rotifer Brachionus plicatilis feeding on phytoplankton. Marine Biology 45:105-111.
- Edmonson, W.T 1959 Freshwater biology 2nd Ed. Seattle. Univ. Whashington 1248 p.
- Gilbert, J. 1970 Monoaxenic cultivation of the rotifer Brachionus calyciflorus in a defined medium. Oecologia 4:89-101.
- Hirayama, K & K. Nakamura, 1976. Fundamental studies on the physiology of rotifers in mass culture V. Dry Chlorella powder as a food for rotifers. Aquaculture 8: 301-307.
- Krebs, C. 1978. Ecología. Estudio de la Distribucion y la Abundancia, 2nd Ed. Harper & Row. New York 753 p.
- Mitchell, A 1986. Experiences with outdoor semicontinuous mass culture of Brachionus calyciflorus Pallas (Rotifera) Aquaculture, 55 (3): 215 - 220.
- Mitchell, A & H. Joubert 1986. The effect of elevated pH on the survival and reproduction of Brachionus calyciflorus. Aquaculture, 55 (3): 215 - 220.
- Meglitsch, P.A, 1981. Zoología de Invertebrados. 2nd.Ed. Oxford.Univ.Press, New York. 961 pp.

- Moor, I. 1984. The toxic concentration of free ammonia to Brachionus calyciflorus Pallas a rotifer pest species found in high rate algal ponds. J. Limnol. Soc. South Afr. 10(2) 33-36.
- Pennak, R 1978. Fresh water invertebrates of the United States. 2nd John Wiley and Sons. N. Y. 803 pp.
- Pourriot, R 1963. Utilization des algues brunes unicelularies pour l'elevage des rotifers. C.A. Acad. Sc. 256: 1603 - 1605.
- _____, 1977. Food and Feeding habits of rotifera. Arch. Hydrobiol 8: 243 - 260.
- Reed, J. 1979. A general Technique for the culture of rotifer. Microscop. 33: 448 - 458.
- Rios, G. 1987 Aislamiento y algunos datos biológicos del rotífero Brachionus rubens Ehrenberg (Rotifera: Monogononta) para fundamentar una técnica de cultivo masivo. Tesis de Licenciatura. E.N.C.B. IPN. 51 pp.
- Sevilla, M. 1981 Introducción a la Acuicultura. CECSA. (C.N.E.B) Mexico. 111 p
- Shapovalova, L. 1980 Seasonal dynamics of rotifera in biological purification ponds in Akhangaran. Uzbek. SSR. VZB. - Biol. 2H(2)51-53.
- Shluter, M & J. Groeneweg 1981. Mass production of freshwater rotifers on liquid wastes. I. The influence of some environmental factor on growth of Brachionus rubens Ehrenberg, 1838. Aquaculture, 25: 17 - 25.

- _____ 1981. Mass production of freshwater rotifer on liquid on liquid wastes II. Mass production of B. rubens Ehrenberg 1838 in the effluent of high-rate algal ponds used for the treatment of piggery waste. Aquaculture 25: 25 - 31.
- _____, 1985. The inhibition by ammonia of population growth of the rotifer Brachionus rubens in continuous culture. Aquaculture. 45: 215-220.
- Sladeczek, V 1978. Feeding in the rotifer Brachionus calyciflorus 3 direct observation on the effects of food type. Food density Change in food, Type and starvation on the incidence of pseudotrochal screening. Limnol/ Proc. Int. Assoc. Theor. Appl. Limnol/ trny, 20 (4): 2382 - 2388.
- Snow, J, T. Al-Ahmad & J Parsons, 1981. Rotifers as a production diet for striped bass fingerlings. Proc. Southeast. Assoc. fish wildl. U.S.A. 34: 280 - 291.
- Sorgeloos, P. & G. Persoone, 1972 Three simple culture device for aquatic invertebrates and fish larvae with - continuous circulation of the medium. Mar. Biol. 15: 251-254 .
- Spektrova, L. & T. Aronovich 1974 Survival and fecundity of Brachionus calyciflorus in water of different salinity. Biol. Zh. 10(5): 90-95.

Stein, J. 1973 Handbook of phycological methods.
Univ.Press. Cambridge. 448 pp.

Stremberger, R. 1981. A general approach to the culture of
planktonic rotifers. Can.J. Fish. Aquat.Sci. 38: 721-724.

Stein, J. 1973 Handbook of phycological methods.
Univ.Press. Cambridge. 448 pp.

Stremberger, R. 1981. A general approach to the culture of
planktonic rotifers. Can.J. Fish. Aquat.Sci. 38: 721-724.

11.- Tablas y Figuras.

Tabla 1.

Composición del medio Bol-basal o Bristol específico para el cultivo de algas clorofíceas con el que se cultivaron las algas manejadas en este trabajo.

NaNO ₃	6.25 grs	1000 veces concentrado para preparar 250 ml.
CaCl ₂ 2(H ₂ O)	0.625 "	" "
MgSO ₄ 7(H ₂ O)	1.875 "	" "
K ₂ HPO ₄	1.875 "	" "
KH ₂ PO ₄	4.375 "	" "
NaCl	0.625 "	" "
EDTA	12.50 "	1000 veces concentrado para preparar 250 ml
KOH	7.25 "	" "
FeSO ₄	1.245 "	" "
H ₂ SO ₄	.25 ml/L	
H ₃ BO ₃	.2845 "	100 Veces concentrado para 250 ml.
MnCl ₂ 4(H ₂ O)	.036 "	1000 Veces concentrado para - para 250 ml.
ZnSO ₄ 7(H ₂ O)	2.205 "	" "
NaMoO ₄ 7(H ₂ O)	.00882 "	1000 veces concentrado, junto con los dos últimos reactivos aforados a 250 ml.
CuSO ₄ 5(H ₂ O)	.00157 "	
CoCl ₂ 6(H ₂ O)	.000490 "	

Regulado el medio a un pH = 6.6

Tabla 2A .

Relación entre número de células , absorbancia y peso seco para conocer el peso en gramos por célula de A. convolutus en la dieta de B. calyciflorus.

No.de cel/ml	(X) Abs.	(Y) p.seco
6.4768268X10 ⁷	0.642	0.0031
	0.642	0.0028
	0.642	0.0029
5.1346053X10 ⁷	0.510	0.0021
	0.510	0.0022
	0.510	0.0027
3.7923667X10 ⁷	0.264	0.0012
	0.264	0.0015
	0.264	0.0013
1.1587626X10 ⁷	0.119	0.0008
	0.119	0.0006
	0.119	0.0008

Valores de la regresión entre absorbancia y peso seco

$$a = .00022$$

$$b = .004181$$

$$r = .9811$$

$$Fb = 333.62$$

$$S = 8.675486 \times 10^{-13}$$

$$\text{Peso seco/cél} = 4.848 \times 10^{-13} \quad E = 9 \%$$

Tabla 2B.

Relación entre número de células, absorbancia y peso seco para conocer el peso seco en gramos por célula de Chlorella sp. en la dieta de E. calyciflorus.

No.de cel/ml	(X) Abs.	(Y) p.seco.
5.0631842X10 ⁷	0.577	0.0039
4.1595900X10 ⁷	0.474	0.0034
	0.474	0.0031
	0.474	0.0033
3.2209647X10 ⁷	0.367	0.0025
	0.367	0.0025
	0.367	0.0025
2.0365823X10 ⁷	0.232	0.0017
	0.232	0.0015
	0.232	0.0016
1.0364877X10 ⁷	0.118	0.0008
	0.118	0.0008
	0.118	0.0009

Valores de la regresión entre absorbancia y peso seco

$$\begin{aligned}
 a &= .000229 \\
 b &= .0068 \\
 r &= .9856 \\
 Fb &= 385.64 \\
 S &= 3.654823X10^{-13}
 \end{aligned}$$

$$\text{Peso seco/cél } X = 7.834519 \times 10^{-12}$$

Tabla 3.

Tasa de filtración de B. calyciflorus con el suministro de tres concentraciones de alimento en peso seco de A. convolutus.

Tiempo hrs	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
	30 mg l ⁻¹ Cel.Fil.rot.min	60 mg l ⁻¹ Cel.Fil.rot.min	120 mg l ⁻¹ Cel.fil.rot.min
1	1320	1068	1668
2	828	980	993
3	794	922	675
5	551	783	625
6	486	715	431

Tasa de filtración con el suministro de Chlorella sp.

Tiempo hrs	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
	30 mg l ⁻¹ Cel.fil.rot.min	60 mg l ⁻¹ Cel.fil.rot.min	120 mg l ⁻¹ Cel.fil.rot.min
1	514	760	1200
2	460	693	985
3	434	720	629
5	333	687	317
6	314	598	120

Tabla 4 .

Análisis de varianza bifactorial para el efecto de las dos especies de microalgas empleadas en la determinación de la T.I.C. de *E. calyciflorus*, empleando las tres dosis ya señaladas. A partir de los siguientes datos experimentales para individuos totales.

Dosis mg l ⁻¹	<i>A. convolutus</i>		<i>Chlorella</i> sp	
	Rot/ml	X	Rot/ml	X
30	5	5.25	4	4.25
	5		4	
	5		4	
	6		5	
60	6	6.50	5	5.50
	6		5	
	7		6	
	7		6	
120	3	3.25	2	3.00
	3		3	
	3		3	
	4		3	

* Análisis Estadístico.

Fuente de variación	S.S	G.L.	M.S.	F	P
Especie A	3.3750	1	3.3750	9.72	**
Dosis B	33.25	2	16.6250	47.88	**
Interacción A * B	0.75	2	0.3750	1.08	n.s.
Error (dentro)	6.25	18	0.3472		
Total	43.626	23			

$$F_{0,05} (1, 18) = 5.98$$

$$F_{0,005} (2, 18) = 4.57$$

Tabla 5.

Análisis de varianza bifactorial para el efecto de las dos especies de microalgas sobre la T.I.C de B. calyciflorus los datos corresponden a individuos totales e individuos potenciales.

Dosis mg l ⁻¹	<u>A. convolutus</u> Rot/ml	X	<u>Chlorella sp</u> Rot/ml	X
30	8	8.75	5	6.00
	8		5	
	9		6	
	10		8	
60	9	11.00	9	9.75
	11		9	
	12		10	
	12		11	
120	5	6.00	4	5.50
	6		5	
	6		6	
	7		7	

* Análisis estadístico.

Fuente de variación	S.S	G.L.	M.S	F	P
Especie A	13.5	1	13.5	9.9184	**
Dosis B	88.083	2	44.04	32.35	**
A * B	5.25	2	2.625	1.9286	n.s
Error (dentro)	24.5	18	1.361		
Total	131.33	23			

$$F_{0.05} (1 , 18) = 5.98$$

$$F_{0.005} (2 , 18) = 4.57$$

Tabla 6A.

Ecuaciones de regresión entre absorbancia y número de células.

ESPECIE DE MICROALGA	EC. LINEAL No. de cel/abs.	PESO SECO/CELULA
<u>A. convolutus</u>	No.cel= $-512507+1.016874 \times 10^8$	$4.8480 \times 10^{-13} \text{g}$
<u>Chlorella</u> sp	No.cel= $13022+8.772755 \times 10^7$	$7.83451 \times 10^{-12} \text{g}$

Tabla 6B

Equivalencia entre la dosis de peso seco y el número de células requerido para cada una.

	No. de cel/ml para 30 mg l^{-1}	No. de cel/ml para 60 mg l^{-1}	No. de cel/ml para 120 mg l^{-1}
sp (A)	5.970284×10^6	11.94056×10^6	23.88113×10^6
sp (B)	3.82976×10^6	7.65841×10^6	15.31683×10^6

* sp (A) A. convolutus , sp (B) Chlorella sp

Tabla 7.
 Datos experimentales del cultivo de Brachionus calyciflorus
 alimentado con una dosis de 60 mg/l. (día) de A. convolutus

T (días)	No.de rotml X Replica No.1	No.de rotml X Replica No.2	No.de rotml X Replica No.3
0	25	25	25
1	32 31 28	30.33	25 29 18
			26.00
			19 18 23
			20.00
2	39 38 48	41.67	59 65 69
			64.33
			34 26 31
			30.00
3	112 122 114	116.00	89 95 91
			91.67
			64 69 64
			65.00
4	173 134 159	155.33	197 168 178
			181.00
			110 101 97
			102.67
5	206 209 212	209.00	238 219 225
			227.33
			198 224 189
			203.67
6	350 317 337	334.67	333 305 356
			331.33
			324 321 323
			322.67
7	304 301 310	305.00	305 308 310
			307.667
			297 310 303
			303.33
8	320 314 317	317.00	318 322 319
			319.67
			317 320
			318.50

* La tabla incluye los valores promedio del registro.

Tabla 8 .

Datos experimentales del cultivo de Brachionus calyciflorus alimentado con una dosis de 60 mg/l (día) con Chlorella sp

T (días)	No.de rotml	X	No.de rotml	X	No.de rotml	X
1	29	26.67	14	21.33	15	19.00
	29		26		21	
	22		24		21	
2	63	80.33	67	65.33	47	45.00
	54		67		46	
	64		62			
3	85	85.67	115	110.00	79	80.00
	92		105		81	
	83					
4	62	69.33	86	73.33	61	60.00
	77		73		60	
	69		73		59	
5	87	93.67	116	113.50	69	67.33
	106		111		72	
	88				61	
6	111	114.00	112	111.00	108	112.50
	117		110		117	
7	106	110.67	148	135.67	115	115.00
	107		139		113	
	119		126		117	
8	162	166.00	147	161.00	130	146.67
	184		158		159	
	152		178		151	
9	209	211.33	218	212.00	208	212.67
	215		207		214	
	210		211		216	
10	229	221.67	226	220.33	225	214.67
	221		220		203	
	215		215		216	
11	212	213.00	217	217.33	217	219.00
	216		221		222	
	211		214		228	
12	207	209.67	213	210.67	214	210.33
	210		209		206	
	212		210		211	

Tabla 9 .

Datos experimentales promedio del crecimiento de B. calyciflorus con una dieta de 60 mg l dia peso seco de A) A. convolutus y B) Chlorella sp.

T (dias)	sp (A) rotml	sp (B) rotml
0	25.0	25.0
1	25.4	22.3
2	45.3	57.0
3	90.9	91.8
4	146.3	68.8
5	213.7	91.5
6	329.6	112.5
7	305.3	120.4
8	318.4	177.9
9	-	212.7
10	-	218.9
11	-	216.4
12	-	210.0

Tabla 10 .

Datos teóricos para las curvas de crecimiento de B. calyciflorus con una dieta de 60 mg l día en peso seco de las algas A) A. convolutus y B) Chlorella sp. obtenidos a partir del ajuste de valores experimentales al modelo de crecimiento logístico.

T (días)	Dieta (A) Rot ml	Dieta (B) Rot ml
1	13.9	24.9
2	28.9	34.2
3	104.3	46.3
4	186.0	79.8
5	227.3	100.7
6	273.3	123.3
7	301.0	146.2
8	315.6	168.0
9	322.8	187.5
10	326.1	204.2
11	327.2	217.6
12	328.3	236.1
13	328.7	242.1
14	328.9	246.4
15	329.0	249.5
16		251.7
17		253.3
18		254.4
19		255.2

Los valores de ajuste al modelo logístico obtenidos a partir de los datos experimentales se presentan en las ecuaciones presentadas anteriormente.

Tabla 11 .

Ensayo de cultivo semicontinuo de B. calyciflorus en un volumen de trabajo de 1000 ml, con una dieta de 60 mg/l de A) A. convolutus y B) Chlorella sp.

No.de Replica	No de rot al inicio.	Especie (A). Tiempo de Recuperación.	
		24 Hrs desp	48 Hrs desp.
1	317	151	304
2	319	146	309
3	318	141	316
Segunda Cosecha.			
1	304	187	308
2	309	192	312
3	316	170	304
Tercera Cosecha .			
1	308	200	318
2	312	188	310
3	304	179	312

No. de Replica	No de Rot al inicio	Especie (B) Tiempo de Recuperación.	
		24 Hrs desp	48 Hrs des.
1	209	188	218
2	211	188	221
3	210	179	212
Segunda Cosecha			
1	218	200	216
2	221	201	220
3	212	208	214
Tercera Cosecha			
1	216	196	210
2	220	200	224
3	214	198	218

Tabla 12.

Factores físico - químicos registrados en el crecimiento de Brachionus calyciflorus en un volúmen de trabajo de 1000 ml con - las dietas de A) A. convolutus y B) Chlorella sp. Se presentán los valores mínimos y máximos.

Dieta	Temperatura °C	pH	O dis.mg/l
A	25 .5	8.0 - 9.0	4.0 - 4.4
B	25 .5	7.8 - 8.9	3.8 - 4.1

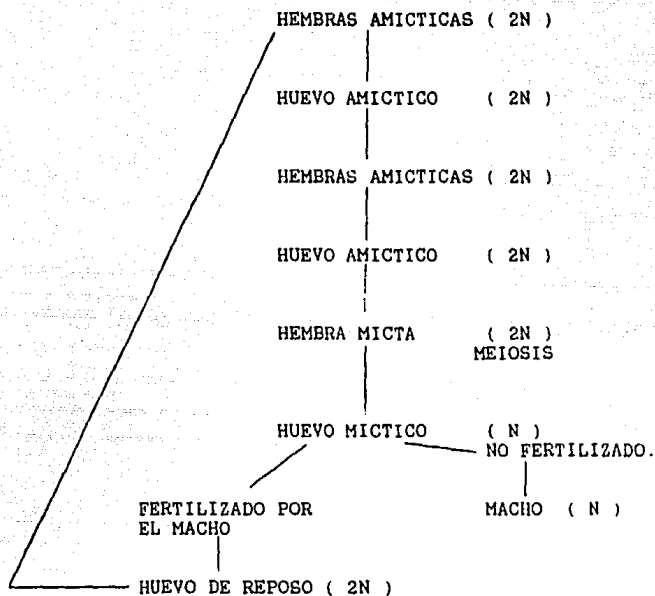
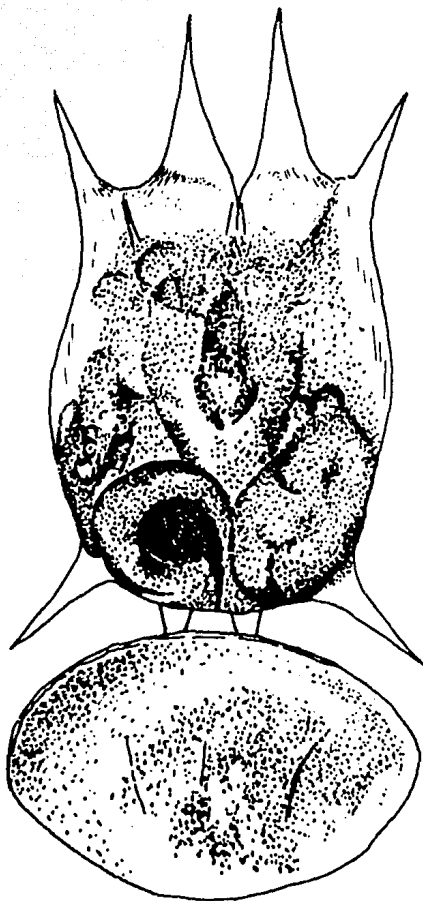


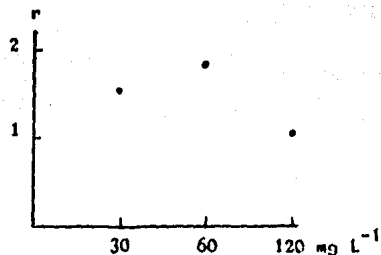
fig.1 Ciclo de vida de los rotiferos del Orden Plouma.
 (Esquema general). Tomado de Pennak, 1978.



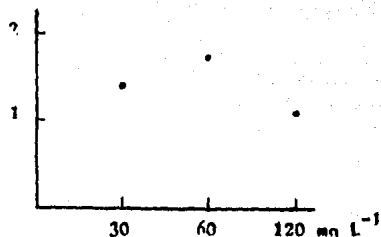
180 μ m.

J. J. C. P.

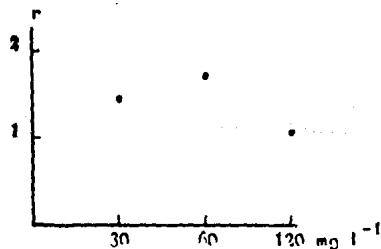
Fig 2. Brachionus calyciflorus Pallas



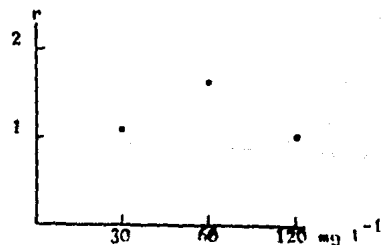
Tasa intrínseca de crecimiento (r)
para organismos reales alimentados -
con A. convolutus



Tasa intrínseca de crecimiento (r)
para organismos reales alimentados -
con Chlorella sp.



Tasa intrínseca de crecimiento (r)
para organismos reales y potenciales
alimentados con A. convolutus .



Tasa intrínseca de crecimiento (r)
para organismos reales y potenciales
alimentados con Chlorella sp.

Fig 3.

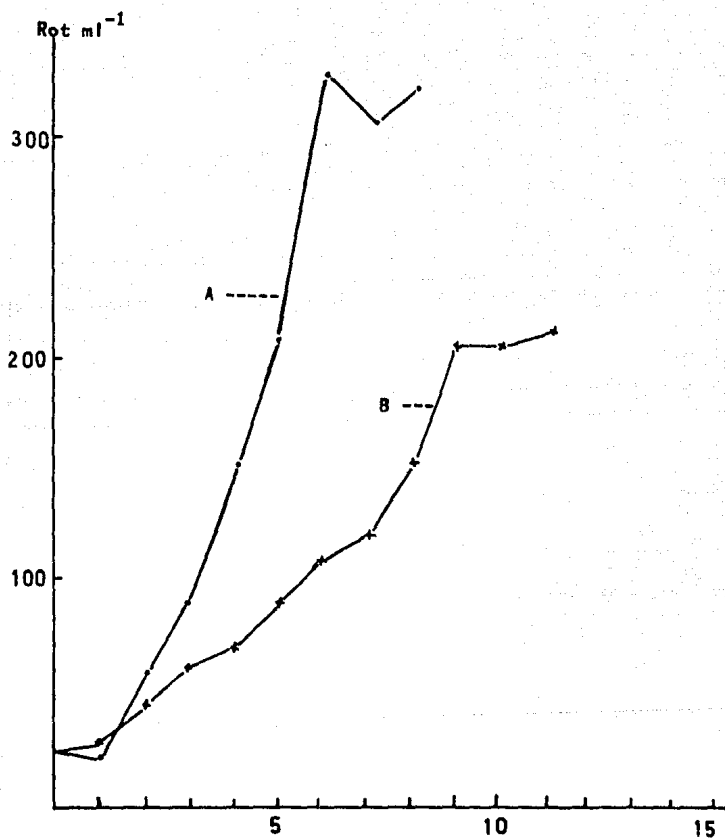


Fig 4. Curvas experimentales del cultivo de Brachionus calyciflorus en volumen de 1000 ml, alimentados con las algas :

- A) Ankistrodesmus convolutus
- B) Chlorella sp

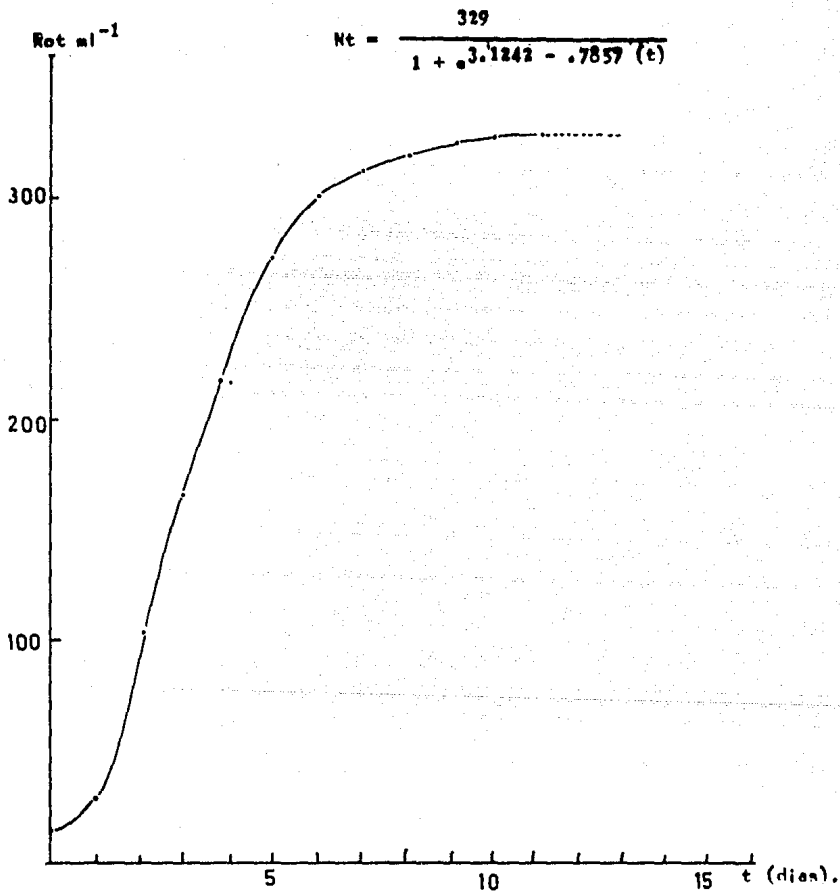


Fig 5. Curva teorica del crecimiento de Brachionus calyciflorus - con una dieta de 60 mg l dia⁻¹ de Ankistrodesmus convolutus ajustada al modelo logistico.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

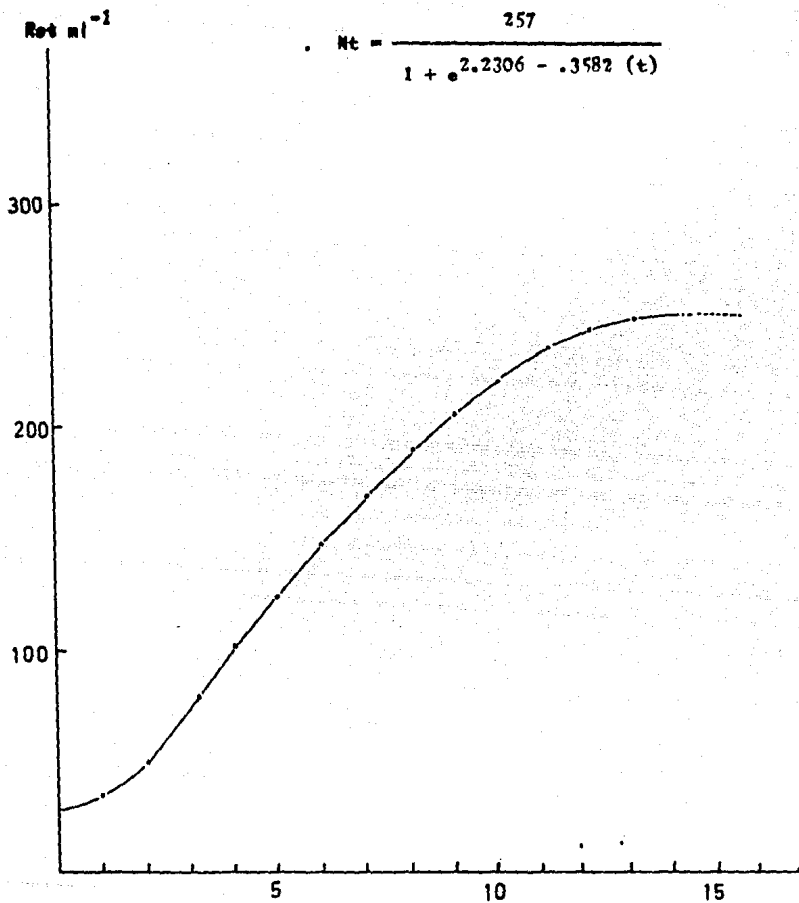


Fig 6. Curva teorica del crecimiento de Brachionus calyciflorus - con una dieta de 60 mg l día^{-1} de Chlorella sp ajustada al modelo logístico.

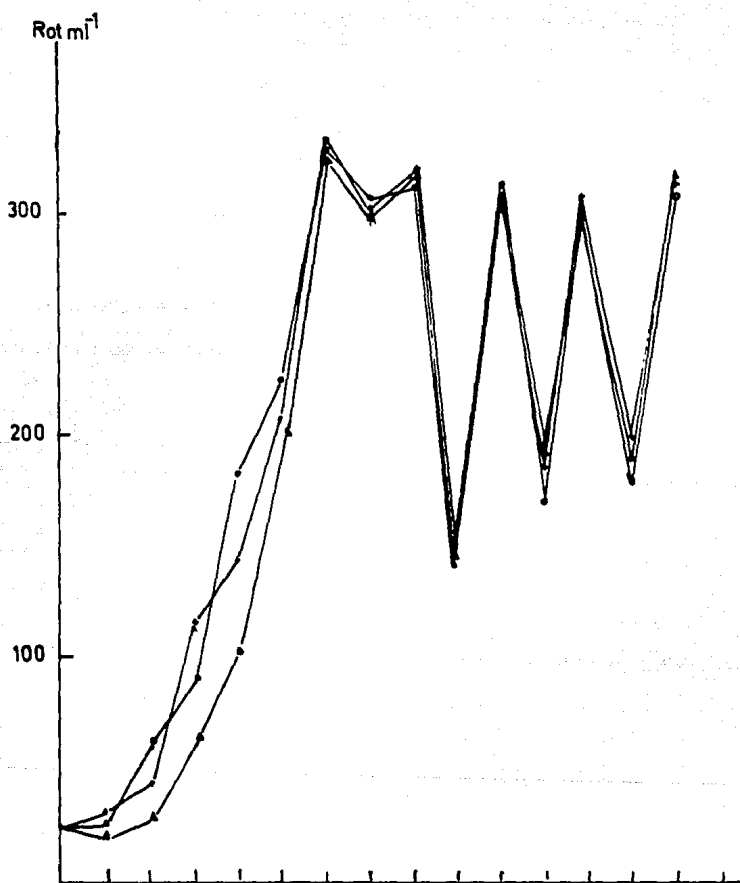


Fig 7 . Ensayo de cultivo semicontinuo de *Brachionus calyciflorus* en un volumen de trabajo de 1000 ml, con una dieta de $50 \text{mg l}^{-1} \text{día}^{-1}$ del alga *A. convolutus*

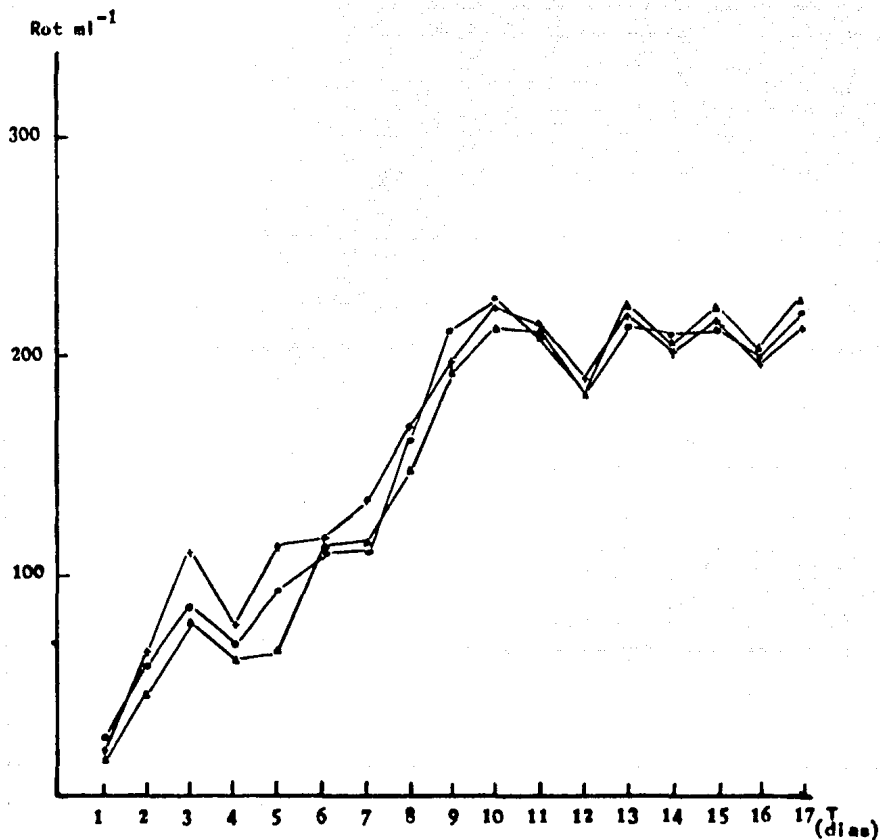


Fig 8 . Ensayo de cultivo semicontinuo de Brachionus calyciflorus en un volumen de trabajo de 1000 ml y con una dieta de 60 mg l dia⁻¹ del alga Chlorella sp.