

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León
Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinaria
Departamento de Acuícola.
Carrera Ingeniería Acuícola.



Memoria de investigación para optar al título de Ingeniero Acuícola

***Ritmo de crecimiento de *Brachionus plicatilis* alimentado con
Nannochloropsis oculata, Probiótico y dieta mixta (*N. oculata* y Probiótico)***

Autores

Br. Wiston José Flores Rodríguez
Br. Dayana Rashel Icaza Zapata
Br. Freddy Alberto Rodríguez Quintana

Tutores

M.Sc. Karen Palacios Sánchez
Dr. Ariel José Aguilar

León, julio 2023

“A la libertad por la Universidad”

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León
Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinaria
Departamento de Acuícola.
Carrera Ingeniería Acuícola.



Memoria de investigación para optar al título de Ingeniero Acuícola

***Ritmo de crecimiento de *Brachionus plicatilis* alimentado con
Nannochloropsis oculata, Probiótico y dieta mixta (*N. oculata* y Probiótico)***

Autores

Br. Wiston José Flores Rodríguez
Br. Dayana Rashel Icaza Zapata
Br. Freddy Alberto Rodríguez Quintana

Tutores

M.Sc. Karen Palacios Sánchez
Dr. Ariel José Aguilar

Asesores

M.Sc. Po-Yuan Hsieh

León, julio 2023

“A la libertad por la Universidad”

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the population growth rate of *Brachionus plicatilis* fed with *Nannochloropsis oculata*, probiotic and mixed diet (*N. oculata* + probiotic). Rotifers were cultured at an initial density of 10 rot/ml, in dark glass containers and an operating volume of 700 ml of UV-filtered seawater (35 ‰). Constant aeration was used throughout the experiment and three experimental diets were fed once at the beginning of the experiment: T1: probiotic; T2: *Nannochloropsis oculata*; T3: *Nannochloropsis oculata*+probiotic. Our results show that when *B. plicatilis* is cultured in seawater (35 ‰) and fed with T3, it has a higher growth rate than when it is fed with T2 or T1, respectively, denoting a probable mediating role at the level of metabolism between the activity of probiotic bacteria and the nutritional quality of *N. oculata*, a situation that could be facilitating the efficient use of nutrients for the somatic growth and reproduction of *B. plicatilis*. However, regardless of the effect of the three diets on the growth of the rotifers, when performing the Pearson correlation analysis, the results show a close correlation with $P \leq 0.05$, indicating that *B. plicatilis* fed with a single dose of the tested diets, at the beginning of the experiment, presents its maximum growth peak at 48 hours of culture and, later, the population density begins to decrease.

Keywords: Rotifer, salinity, food, growth and reproduction

RESUMEN

El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el ritmo de crecimiento poblacional de *Brachionus plicatilis* alimentado con *Nannochloropsis oculata*, probiótico y dieta mixta (N. oculata + probiótico). Los rotíferos se cultivaron en una densidad inicial de 10 rot/ml, en recipientes de vidrio oscuros y volumen operativo de 700 ml de agua marina (35 ‰) filtrada por UV. Se utilizó aireación constante durante todo el experimento y se alimentó una sola vez al inicio del experimento con tres dietas experimentales: T1: probiótico; T2: *Nannochloropsis oculata*; T3: *Nannochloropsis oculata*+probiótico. Nuestros resultados muestran que cuando *B. plicatilis* es cultivado en agua marina (35 ‰) y se alimenta con T3 presenta mayor ritmo de crecimiento que cuando se alimenta con T2 o T1, respectivamente, denotando un probable papel mediático a nivel del metabolismo entre la actividad de las bacterias probióticas y la calidad nutricional de *N. oculata*, situación que podría estar facilitando el aprovechamiento eficiente de los nutrientes para el crecimiento somático y reproducción de *B. plicatilis*. No obstante, independiente del efecto de las tres dietas sobre el crecimiento de los rotíferos, al realizar el análisis de correlación de Pearson los resultados muestran estrecha correlación con $P \leq 0.05$, indicando que *B. plicatilis* alimentado con una sola dosis de las dietas testadas, al inicio del experimento, presenta su máximo pico de crecimiento a las 48 horas de cultivo y, posterior, inicia el decrecimiento de la densidad poblacional.

Palabras claves: Rotífero, salinidad, alimento, crecimiento y reproducción

CERTIFICADO

Dr. Ariel José Aguilar, Profesor Titular del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología y **M.Sc. Karen Palacios Sánchez**, Profesora adjunto del Departamento de Acuicola de la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua- León (UNAN-León)

CERTIFICAN QUE:

La presente memoria titulada “***Ritmo de crecimiento de Brachionus plicatilis alimentado con Nannochloropsis oculata, Probiótico, dieta mixta (N. oculata y Probiótico).***” presentada por los bachilleres: **Wiston José Flores Rodríguez, Dayana Rashel Icaza Zapata y Freddy Alberto Rodríguez Quintana** para optar al grado de Ingeniero Acuicola, por la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua- León, ha sido realizada bajo nuestra dirección y que hallándose concluida.

AUTORIZAMOS:

Su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente. Dado en la ciudad de León, Departamento de León, 21 de julio del 2023

M. Sc. Karen Palacios Sánchez

Dr. Ariel José Aguilar

FINANCIACIÓN

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuícolas (LIMA), Departamento de Biología, Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, bajo la dirección del Dr. Ariel José Aguilar y la M.Sc. Karen Palacios Sánchez. La investigación desarrollada en esta Tesis, ha sido realizada con el apoyo de:

1. Instituto Nicaragüense de la Pesca y Acuicultura (INPESCA) a través del Proyecto de Maricultura con el que se acondicionó y amplió la infraestructura del LIMA para reproducir al pargo lunarejo. Asimismo, se fortalecieron las áreas de investigación con equipos y reactivos para el desarrollo de las investigaciones.
2. Al grupo SEAJQY Q: Laboratorio de Semillas Acuáticas, Acuicultura Torrecillas, SEAFOOD International por el apoyo brindado al proyecto de reproducción de pargo lunarejo en condiciones de laboratorio que desarrolla INPESCA y UNAN-León.
3. Grupo CAMANICA-PESCANOVA por apoyarnos con el mantenimiento del sistema eléctrico y de bombeo.

DEDICATORIA

Primeramente, le doy gracias a Dios por brindarme la sabiduría para poder concluir mis estudios de manera satisfactoria y por haber puesto personas en mi camino que han recorrido conmigo esta gran etapa de mi vida guiándome por el camino del bien.

Seguidamente le doy gracias a mis padres: Rosa María Rodríguez Sánchez y Wiston José Flores López por haberme apoyado económica y emocionalmente dándome consejos y ánimos para seguir adelante para conseguir mis logros.

A mi novia Dra. Wendy Maricela Mercado Bojórquez por el apoyo incondicional y esa voz alentadora para seguir adelante y poder terminar con éxito este trabajo investigativo.

Br. WISTON FLORES

Dedico en primer lugar a Dios por permitirme llegar hasta este lugar por darme la paciencia, sabiduría y entendimiento que lo he requerido en este proceso de mi formación profesional.

A mi madre Lisbeth Susana Zapata Guadamuz y abuela Rosa Amelia Guadamuz por no dejarme nunca sola, por su persistencia en que culminaran mis estudios, porque gracias a sus consejos y determinación en que no podía desistir de objetivo pude lograrlo y valió la pena la espera.

Gracias a nuestra alma mater, a cada maestro que estuvo en el proceso de mi formación, gracias por cada consejo que cada uno dio, el compartir experiencia, anécdota, risas y lagrima que pasaron en el transcurso de los años, simplemente fueron únicos que hoy solo quedarán en la mente y corazón como recuerdos inolvidables que siempre estarán presente.

Br. DAYANA ICAZA

Dedico este trabajo investigativo a:

Dios principalmente por bendecirme y darme fuerzas para continuar en este proceso de obtener un título universitario.

Mis padres Santos Rodríguez Y Lizeth Quintana de Rodríguez, por todo su apoyo incondicional, por el sacrificio y esmero que han realizado en pro de mi desarrollo profesional, espiritual y moral.

A mis abuelos Freddy Quintana y Dinora Jarquín por sus oraciones y todo su apoyo.

A mi hermana Katherinne Rodríguez esperando siga mis pasos.

¡A mis familiares y amigos!

Br. FREDDY RODRÍGUEZ

AGRADECIMIENTO

En primera instancia, agradecemos a Dios por hacer posible este trabajo investigativo.

A mis tutores Dr. Ariel José Aguilar y M.Sc. Karen Palacios Sánchez, por haberme dado la oportunidad de haber realizado este trabajo investigativo, compartiéndonos sus conocimientos lo que facilitó mi entendimiento con respecto al área investigada.

También queremos agradecerle de manera especial al Laboratorio Investigaciones Marinas y Acuícolas (LIMA) perteneciente a UNAN-León por el apoyo incondicional brindado para la realización y culminación de esta investigación.

Br. WISTON FLORES

Principalmente a Dios por brindarme la oportunidad de concluir un ciclo más en mi vida y darme esa confianza que todo lo que quiera en sus manos lo podre lograr, un padre que no es físico, pero siempre está ahí para decirme “hija tú puedes”.

Agradezco a mi familia y amigos por siempre apoyarme, cuidarme, defenderme y contar con ustedes por darme animo a cada momento, en especial a mi madre el pilar que Dios me dio mujer virtuosa y guerrera supiste darme la mejor herencia como lo es hoy culminar con mi estudio superior hoy yo puedo decirte “Madre ha valido la pena tu sacrificio, gracias por no soltarme y siempre tener tu apoyo incondicional” y “lo logramos” porque este triunfo es más tuyo que mío.

Br. DAYANA ICAZA

Agradezco infinitamente a mi Padre Celestial por permitirme la vida hasta el día de hoy, por darme la sabiduría y la inteligencia que me han sido de bendición para culminar una meta más en mi vida. Por otra parte, mencionar y agradecerles a todas las personas que de una u otra manera me han ayudado a finalizar este trabajo sería una labor poco menos interminable. Es por ello que me limitare a mencionar a aquellas personas cuya contribución ha sido más significativa.

Muchas gracias a mis mentores y tutores de esta investigación el Dr. Ariel José Aguilar y la M.Sc. Karen Palacios Sánchez por haberme permitido la oportunidad de formar parte del grupo de investigación del Laboratorio de Investigaciones marinas y acuícolas LIMA de la UNAN-León, gracias por su ayuda prestada y atención en todo momento, por sus palabras de ánimo, su optimismo, por no ser egoísta y trasmitirme sus conocimientos y consejos, en fin, gracias por formar parte de esta etapa de mi formación profesional que, pese a todos los inconvenientes presentados en el camino, la he culminado con mucho éxito y esperando en Dios que aún mejores cosas vendrán.

Gracias de manera especial a mis amigos y colegas M.Sc. Karelía Hernández e Ing. Wiston Flores por su apoyo y amistad.

Br. FREDDY RODRÍGUEZ

LISTA DE FIGURAS Y TABLA

Figura 1: Morfología interna y externa de <i>Brachionus plicatilis</i> . Tomado de (Dhert, 1996).....	22
Figura 2: ciclo reproductivo de <i>B. plicatilis</i> . Tomado de Denekamp, et al (2009). 27	
Figura 3: Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuícolas. (LIMA).....	33
Figura 4. Ritmo de crecimiento poblacional (rot/ml) de los rotíferos alimentados con diferentes dietas (T). T1: Rotíferos + Probiótico; T2: Rotíferos + <i>N. oculata</i> ; T3: Rotíferos + <i>N. oculata</i> + Probiótico.....	38
Figura 5: Valores de pendiente del ritmo de crecimiento de <i>B. plicatilis</i> alimentado con tres dietas (T): T1: Rotíferos + Probiótico; T2: Rotíferos + <i>N. oculata</i> ; T3: Rotíferos + <i>N. oculata</i> + Probiótico. Barras en color naranja indican los valores de pendiente en el periodo de 0 horas-48 horas y el color gris indica los valores de pendiente en el periodo de 48 horas-96 horas, en los tres tratamientos Experimentales.....	39
Figura 6. Revisión de Muestras de <i>B. Plicatilis</i>	52
Figura 7. 1-Oxigenometro multiparámetro (YSI), 2- Ph-metro, 3-Cámara Sedgewick Rafter, 4-cámara de Neubauer y 5- Refractómetro.....	53
Figura 8. Diseño experimental por triplicado (T1, T2, T3).....	54
Figura 9. Conteo de Rotíferos en cámara Sedgwick-Rafter.....	55
Figura 10. <i>Brachionus plicatilis</i> . Fuente: foto tomada en LIMA.....	56
Tabla 1. Correlación de Pearson sobre el ritmo de crecimiento de <i>B. plicatilis</i> entre los grupos experimentales.....	41

ABREVIATURAS

Cel/ml: células sobre mililitro

Rot/ml: rotíferos sobre mililitro

cm: centímetro

DHA: ácido docosahexaenoico

EEM: error estándar de la media

EPA: ácido eicosapentaenoico

HUFA: ácidos grasos poliinsaturados

Ind/l: individuos sobre litro

L: litro **ml:** mililitro

mm: milímetros **mm²:**

milímetro cuadrado **O:**

oxígeno

S/R: Sedgwick – Rafter

NB: NEUNAU

T: temperatura

‰: partes por mil

ARA: ácido araquidónico

AA: aminoácidos

ANOVA: Análisis de varianza con un factor

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. MARCO TEORICO.....	4
3.1. GENERALIDADES DE LOS ROTÍFEROS	4
3.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>BRACHIONUS PLICATILIS</i>	4
3.3. ROTÍFERO <i>BRACHIONUS PLICATILIS</i>	4
3.4. DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA.	5
3.5. MORFOLOGÍA DE <i>BRACHIONUS PLICATILIS</i>	6
3.5.1. <i>Morfología Externa</i>	6
3.5.2. <i>Morfología Interna</i>	6
3.6. COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO	9
3.7. SISTEMA REPRODUCTOR.....	10
3.8. PROPIEDADES NUTRICIONALES DE LA LEVADURA (<i>SACCHAROMYCES</i>	14
3.9. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE <i>NANNOCHLOROPSIS SPP.</i>	15
3.10. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE <i>N. OCULATA</i>	16
3.11. CONDICIONES GENERALES DEL CULTIVO DE <i>B. PLICATILIS</i>	16
3.12. USO DE PROBIÓTICOS EN CULTIVOS DE ROTÍFEROS	18
3.13. ¿QUÉ ES UN PROBIÓTICO?	19
4. MATERIALES Y METODOS.....	20
4.1. TIPO Y UBICACIÓN DEL ESTUDIO.....	20
4.2. ANIMALES EN ESTUDIO.....	20
4.3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TOMA DE MUESTRA	21
4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	21
5.1. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DEL ESTUDIO	23

5.2. CAPACIDAD REPRODUCTIVA DE <i>B. PLICATILIS</i> ALIMENTADO CON PROBIÓTICO Y <i>NANNOCHLOROPSIS OCULATA</i>	24
5.2.1. <i>Ritmo de crecimiento poblacional (rot/ml) de los rotíferos alimentados con diferentes dietas</i>	25
5.2.2. <i>Valores de pendiente del ritmo de crecimiento de B. plicatilis alimentado con tres dietas</i> 27	
5.3. CORRELACIÓN DEL RITMO DE CRECIMIENTO DE LOS TRES GRUPOS EXPERIMENTALES DE <i>B. PLICATILIS</i> ALIMENTADO CON DIETAS (T): T1: ROTÍFEROS + PROBIÓTICO; T2: ROTÍFEROS + <i>N. OCULATA</i> ; T3: ROTÍFEROS + <i>N. OCULATA</i> + PROBIÓTICO.	29
6. CONCLUSIONES	30
7. RECOMENDACIONES	31
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
9. ANEXOS	39

1. INTRODUCCIÓN

En Nicaragua, se ha venido incrementado el cultivo del Pargo Lunarejo (*Lutjanus guttatus*) en jaulas flotantes en los esteros de la costa pacífica, a través del Proyecto Pargo, actividad que desde el 2009 se ha impulsado y está dentro de los lineamientos de Plan Nacional de Lucha contra la Pobreza y el Desarrollo Humano (PNLCP-DH) que impulsa el Gobierno de Reconciliación y Unidad Nacional (GRUN), en aras de contribuir a garantizar la Seguridad Alimentaria y Nutricional y mejorar la condición de vida de las familias de los pescadores que, tiempo atrás, han venido obteniendo poca captura por unidad de esfuerzo, propiciando el deterioro de la economía familiar. Por lo tanto, para proveer alevines a los grupos de pescadores artesanales que se dedican a esa actividad, el grupo de investigación del proyecto Pargo-UNAN-León en conjunto con INPESCA, están realizando la investigación de “Inducción a la reproducción del Pargo Lunarejo en condiciones de laboratorio”, y poner a punto los protocolos bajo las condiciones de las diferentes áreas de trabajo en LIMA-UNAN-León, como el cultivo de alimento vivo, para ofrecer a la larva de Pargo, específicamente el cultivo de rotíferos *Brachionus plicatilis*.

Se sabe, que el rotífero *B. plicatilis* son organismos de tamaño pequeño (50-300 μm), eurihalinos, euritermos y capaces de alimentarse de microalgas, bacterias, levaduras, entre otros microorganismos presentes en el medio acuático (Vallejo et al., 1993; Lowe et al., 2005). Asimismo, la interacción entre los factores salinidad-temperatura y cantidad-calidad de alimento es muy importante para el crecimiento y reproducción de *B. plicatilis*, debido a que, estos factores regulan el tiempo de desarrollo embrionario, porcentaje de fecundidad, sobrevivencia y el tiempo de reproducción (Lubzens et al., 1985; Lowe et al., 2005). En ese sentido, un estudio reporta que el ritmo de crecimiento poblacional y la capacidad reproductiva de *B. plicatilis* disminuye significativamente cuando son sometidos a estrés por reducción de salinidad (35 ‰ a 7‰), sin previa aclimatación (Osorio et al., 2021).

Por lo tanto, el presente estudio pretende fortalecer el conocimiento sobre el ritmo de crecimiento de *B. plicatilis* bajo las condiciones ambientales que prevalecen en el Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuícola de la UNAN-León.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el ritmo de crecimiento de *Brachionus plicatilis* alimentado con *Nannochloropsis oculata*, Probiótico y dieta mixta (*N. oculata* y Probiótico).

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar el ritmo de crecimiento poblacional de *B. plicatilis* alimentado con *Nannochloropsis oculata*, probiótico y dieta mixta (*N. oculata* y Probiótico).
- Establecer el tiempo de mayor densidad poblacional de *B. plicatilis* alimentado con *Nannochloropsis oculata*, probiótico y dieta mixta (*N. oculata* y Probiótico).
- Correlacionar el ritmo de crecimiento de *B. plicatilis* alimentado con *Nannochloropsis oculata*, probiótico y dieta mixta (*N. oculata* y Probiótico).

3. MARCO TEORICO

3.1. Generalidades de los rotíferos

Se reportan aproximadamente 2030 especie de rotíferos en el mundo y la mayor cantidad se encuentra en el grupo Monogononta con 1570 especies, le sigue el grupo Bdelloidea presentando 461 especies y finalmente el grupo Seisonacea con 3 especies. (Segers, 2007).

3.2. Clasificación taxonómica de *Brachionus plicatilis*

Phylum	Rotífera
Clase	Rotatoria
subclase	Eurotatoria
Orden	Ploimida
Familia	Brachionidae
Género	Brachionius
Especie	Bachionius picatilis

3.3. Rotífero *Brachionus plicatilis*.

El *Phylum Rotífera* es un grupo de organismos microscópicos invertebrados, perteneciente a los pseudocelomados, no segmentados y de simetría bilateral, se caracterizan principalmente por poseer el mástax, la corona y la lorica, y pueden encontrarse en casi todo tipo de ambientes desde dulceacuícolas, marinas y terrestres. Los machos son de menor tamaño que las hembras y en algunas especies no existen. Pueden sobrevivir a extensos periodos de sequedad y a altas temperaturas de entre – 27 °C y 40 °C (Romero, 2008; Moreno, 2012).

El rotífero *Brachionus plicatilis* tiene una amplia distribución en el mundo, siendo reportada en diversos continentes, esta especie pertenece a los metazoarios más pequeños ya que tienen una longitud de 60 µm, alcanzando raramente un máximo de 2mm. La duración de vida de los rotíferos a una temperatura de 25 °C se estima entre 3.4 a 4.4 días y alcanzan la etapa de adultez a los 0.5 a 1.5 días después de

la eclosión, al llegar a la adultez las hembras empiezan la producción de huevos aproximadamente cada cuatro horas, las hembras llegar a producir diez generaciones de descendientes antes de que muera. La reproducción de *Brachionus* depende principalmente de la temperatura del ambiente (Romero, 2008; Moreno, 2012).

3.4. Distribución y ecología.

El rotífero *B. plicatilis* es un organismo planctónico que prefiere ambientes formados por aguas con elevado residuo salino de elevada alcalinidad (Hammer, 1986), teniendo mayor presencia en lagunas que no tiene salida fluvial hacia el océano, aunque también es frecuente en lagunas litorales salobres (Bérszins, 1960). *B. plicatilis* se ha encontrado en todas las regiones biogeográficas excepto en la Antártida (Pejler, 1977), siendo más frecuente en aguas subtropicales. Su presencia en el zooplancton de una localidad depende fundamentalmente de que las condiciones ambientales le resulten tolerables y de su eficacia bajo los distintos factores ecológicos. Tienen la capacidad de soportar y adaptarse a cambios bruscos de salinidad, como mínimo, desde 1 g/l hasta 97 g/l (Epp y Winston, 1977). Es considerado un organismo con alta capacidad de osmorregulación ya que tolera altas concentración de solutos, lo cual lo caracteriza como osmoconformador (Epp y Winston, 1977).

Estos organismos han sido observados en la naturaleza, según diversas literaturas, varían entre un mínimo de 5°C (Walker, 1981) hasta un máximo de 30°C (Yúfera, 1982).

Su tolerancia a altas salinidades indica que tiene capacidad de soportar bajas concentraciones de oxígeno (Walker, 1981).

3.5. Morfología de *Brachionus plicatilis*

3.5.1. Morfología Externa

Las características principales de la hembra partenogenética son: lórica suave en forma de pera, placas dorsales y ventrales fusionados lateralmente. Cuentan con una superficie de la lórica lisa o punteada, en el lado dorsal anterior tienen 3 pares de espinas flanqueando un sinus en forma de “U” (Ciros-Pérez et al., 2001). Todas las espinas de la lórica son ligeramente triangulares y similares en tamaño, con base ancha y ápices relativamente puntiagudos; el margen externo de las espinas medias de forma sigmoidal con ápices afilados (Ciros-Pérez et al., 2001). El margen ventral anterior de la lórica cuenta con dos pares de lóbulos redondeados flanqueando un ligero sinus. Las bases de los lóbulos exteriores son más anchas que los interiores (más de 1.5 veces aproximadamente). Abertura del pie sub-terminal sobre la placa ventral (Ciros-Pérez et al., 2001).

La pared del cuerpo de estos organismos está formada por: cutícula, epitelio sincitial (membrana basal) y musculatura. Las fibras musculares tienen una distinguida forma de malla con amplios huecos. El pseudocele está relleno de líquido con amebocitos (Wallace et al., 2006).

La epidermis contiene una capa densamente recubierta de proteínas semejante a la queratina denominada la loriga. El cuerpo del rotífero se distingue en tres partes que consisten de la cabeza, el tronco y pie. La cabeza posee el órgano rotatorio o corona que es identificado fácilmente por sus cilios anulares. La corona retráctil con bordes de cilios asegura el movimiento, estos cilios agitan el agua con un movimiento de remolino que contiene oxígeno y alimento hacia el extremo cefálico. (Moreno, 2012). Son considerados organismos polívoros, es decir que son filtradores no selectivos (Wallace et al., 2006).

3.5.2. Morfología Interna

Pared del cuerpo: tiene la característica singular de ser traslucido, está formada por cutícula, epitelio sincitial (membrana basal) y musculatura. Las fibras de los

músculos tienen una formación como malla con amplios huecos. El pseudocele está relleno de líquido con amebocitos.

El citoplasma del tegumento es la encargada de la síntesis de la cutícula, de naturaleza proteino-polisacáridica (Clément, 1969). El tegumento posee una lámina intracitoplasmática de naturaleza escleroproteínica que forma el exoesqueleto del rotífero. La estructura de esta lámina en el género *Brachionus* consiste en la yuxtaposición de estructuras tubulares verticales (Clément, 1975).

El espesor de la lámina intracitoplasmática cambia en las diversas partes del cuerpo y se modifica significativamente aumentando con la edad del animal. La lámina es gruesa en el tronco, donde se forma la loriga, adelgazándose en el pie (Bender y Kleinow, 1988).

Sistema nervioso: Es de tipo ortogonal. El cerebro está situado sobre la faringe del que salen dos cordones longitudinales que se unen en un ganglio en la parte posterior del cuerpo (Moreno, 2012).

Órganos sensoriales: Ocelos (en número y posición variable); cerdas sensoriales; fosetas ciliadas (olfativas); papilas (táctiles) y antenas sensoriales. Órganos retro cerebrales: está en relación con el cerebro y en comunicación con el exterior; puede que tenga una función endocrina (Moreno, 2012).

Musculatura: está formada a partir de dos tipos de músculos, los viscerales que se desarrollan a lo largo del tubo digestivo y envuelven otros órganos internos; y los músculos esqueléticos que controlan la forma del cuerpo, la movilidad y el desplazamiento del animal (Clément y Amsellem, 1989).

La cavidad visceral: está atravesada por músculos longitudinales que se enlazan en la pared del cuerpo y forman dos grupos: los músculos retractores cefálicos (dos pares: retractores dorsales y retractores centrales) y los retractores pédicos (un par). El diseño de cada músculo está desarrollado de manera precisa para que cada uno ejecute un rol determinado en el comportamiento del rotífero.

(Clément y Amsellem, 1989).

Aparato excretor: es protonefridial y está compuesto por dos canales principales ramificados, ubicados a cada lado del cuerpo, cuyos canales secundarios concluyen en células flamígeras (células huecas, con movimientos similar al centello de una flama) que tienen una función de filtrar; el género *Brachionus* presenta 4 células terminales en cada conducto (Koste y Shiel, 1987).

Los conductos de los protonefridios desembocan en una vejiga ventral, voluminosa, que se contrae rítmicamente y expulsa las excretas. Los protonefridios, además de eliminar las sustancias de excreción, tienen un papel osmorregulador.

Sistema digestivo: El sistema del animal inicia en la boca ubicada ventralmente en el campo bucal, ubicada entre el cíngulo y el pseudotroco. El conducto bucal es ciliado y se halla apartado de la faringe por un velo tenue que impide que el alimento ingerido retroceda. (Clément y Amsellem, 1989). En la parte ventral de la faringe, y colocado en una invaginación del tubo digestivo que traza una especie de bolsa blanda o buche, se localiza el mástax o aparato masticador. Característico de todos los rotíferos, está formado por un conjunto de piezas duras quitinosas que siempre están en circulación debido a la presencia de la musculatura muy desarrollada que estos poseen. *B. plicatilis* posee el tipo de mástax poco especializado, el nombrado maleado (Clément, 1975). Las paredes donde está localizado el mástax presenta glándulas salivares que producen secreciones que van al interior de la misma, al igual que sensores nerviosos. La faringe va seguida de un corto esófago ciliado que desemboca en el estómago (Clément, 1975).

El estómago se caracteriza por ser un órgano ciliado formado por un sin número de células y se encuentra envuelto de una delgada malla de músculos longitudinales y circulares. En su interior desembocan un par de glándulas gástricas (Clément, 1977) que realizan la segregación de enzimas para poder llegar a la digestión, la cual es extracelular. Seguido de un intestino globoso, corto, de paredes sincitiales, fino y densamente ciliado, sigue al estómago, y se abre en la base del pie en una

cloaca dorsal, en la que también desembocan el oviducto y la vejiga (Beaumont y Cassier, 1981). Existe un esfínter pilórico que separa el estómago del intestino.

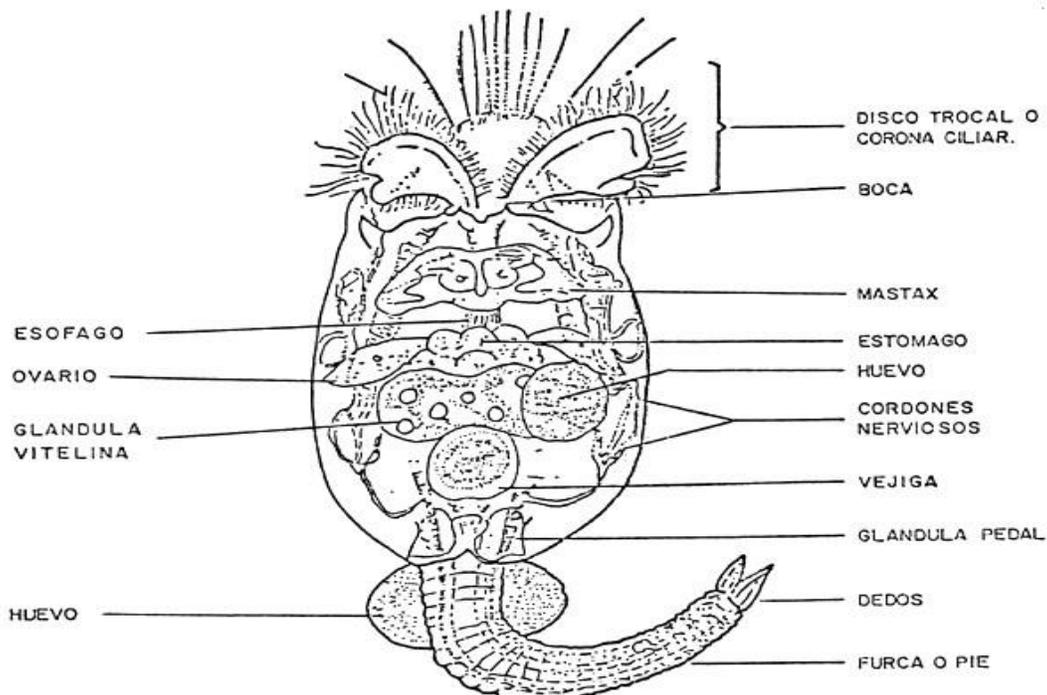


Figura 1: Morfología interna y externa de *Brachionus plicatilis*. Tomado de (Dhert, 1996).

3.6. Comportamiento Alimentario

Por el importante papel que desempeña en la cadena trófica el *B. plicatilis* es un organismo filtrador, que crea una corriente mediante su corona ciliada para atraer las partículas de las cuales se alimenta. En general, se afirma que se trata de un organismo polífago, por ser poco selectivo, habiéndose citado una gran variedad de tipos de alimento, Sin embargo, existe la posibilidad que lleve a cabo una selección por tamaño y por la actividad de las partículas que captura tomando en cuenta la facilidad de ingesta y la calidad de éste. Hirata (1980), descubrió que el tamaño de partículas que puede ingerir oscila entre 2 y 28 μm . En la producción intensiva de rotíferos, el principal problema que se presenta es obtener el alimento apropiado. Se han aplicado esencialmente especies de microalgas tales como (*Nannochloris sp*, *Chlorella spp*, *Isochrysisgalbana*, *Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricornutum*), pero debido a la gran demanda de alimento que ello implica, se requiere de máximo esfuerzo y de un espacio de cultivo muy amplio, por lo que se han

implementado técnicas con alimentos almacenables, tal como la levadura de pan *Saccharomyces cerevisiae* (Reguera et al., 1982).

3.7. Sistema reproductor

Estos microorganismos pueden realizar la reproducción de forma sexual o partenogenética o sexual (De la Cruz, 1974). Los huevos salen en la parte posterior del individuo y se adhieren para posteriormente dar origen a un individuo por huevo. Asimismo, *B. plicatilis* posee dimorfismo sexual donde el macho es un organismo efímero, de dimensiones reducidas (su longitud varía entre un tercio y un cuarto de la longitud de la hembra) (Gilbert, 1983).

La reproducción sexual está influenciada por las condiciones del medio, como temperatura y salinidad, niveles de oxígeno disuelto, así como al aumento en la población y a cambios en la cantidad y calidad de alimento (Gilbert, 1983).

En el aparato reproductor o germovitelario existe una clara diferencia entre la función germinativa y el vitelo génico. La gónada es bilobulada y con una porción ovárica y otra vitelógena, ambas envueltas por una membrana que continúa en un oviducto el cual desemboca en la cloaca. En las hembras de *B. plicatilis* existen glándulas sexuales accesorias que segregan un material que adhiere el huevo al cuerpo de la madre tras su salida al exterior (Wallace y Snell, 1991).

En la parte posterior del cuerpo se contempla un pie muy corto que se encuentra desplazado lateralmente por un voluminoso pene situado en posición terminal. El tubo digestivo del macho está atrofiado, desprovisto de cloaca y ano, encontrándose la cavidad del cuerpo casi completamente ocupada por un gran testículo con un espermiducto ciliado que se encuentra flanqueado por dos masas glandulares (glándulas prostáticas) y que desemboca en un gonópodo situado en la extremidad del pene (Gilbert, 1983). En el testículo existen espermatozoides con una morfología similar a la típica de estas células. En *B. plicatilis* el testículo presenta entre 40 y 200 espermatozoides junto a ellos se encuentran unas formaciones bastonoides que al parecer son estructuras derivadas de células germinales atípicas (Clément, 1977) y no una forma especial de espermátidas como se pensó en un principio.

El ciclo reproductivo de *Brachionus plicatilis* muestra las características generales del ciclo de los rotíferos monogonontos, el cual ha sido principalmente estudiado en los géneros *Asplanchna* y *Brachionus* (Lubzens et al., 1985).

Los rotíferos monogonontos son organismos partenogenéticos cíclicos heterogónicas que presentan un ciclo de vida característico por la alternancia de periodos de reproducción asexual en insuficiencia de machos (fase amítica), y periodos de reproducción sexual fase mítica (Rutner-Kolisko, 1974). Durante los periodos de reproducción asexual, las hembras amíticas diploides siempre producen huevos diploides mitóticos, que trasladan adheridos a su cuerpo. Estos huevos que durante su maduración han experimentado una única división ecuacional formando un único cuerpo polar, se desarrollan partenogenéticamente en hembras (Rutner-Kolisko, 1974).

Los periodos de reproducción sexual empiezan después de obtener el estímulo apropiado, las hembras amíticas comienzan a producir hembras míticas entre su descendencia. La cantidad de hembras míticas y la duración de su producción dependen de la intensidad del estímulo mítico recibido (Gilbert, 1983).

Las hembras míticas, morfológicamente indistinguibles de las hembras amíticas en el género *Brachionus*, producen huevos que experimentan divisiones meióticas durante su maduración dando lugar a la formación de dos cuerpos polares. Estos huevos míticos haploides, si no son fecundados, se desarrollan partenogenéticamente en machos. Cuando los huevos haploides son transportados por las hembras se diferencian con facilidad de los huevos diploides por su reducido tamaño (Gilbert, 1983).

Tan pronto como surgen los primeros machos en la población puede producirse la fecundación de las hembras míticas. La copulación se produce mediante una firme adherencia del aparato copulador del macho a la pared corporal de la hembra. La inseminación tiene lugar mediante impregnación (fecundación) hipodérmica, desconociéndose el mecanismo por el cual el esperma atraviesa el tegumento de la hembra (Gilbert, 1983).

La fecundación se realiza preferiblemente en las zonas del cuerpo de donde parte el pie o la corona ciliada, en las cuales el tegumento es más delgado. Asimismo, la fertilización del huevo se produce solamente cuando el macho se aparee con hembras míticas muy jóvenes (de unas horas de vida) ya que su susceptibilidad de fecundación desciende con la edad (Snell y Childress, 1987).

El apareamiento depende del reconocimiento por parte del macho, vía quimio recepción, de las hembras de su misma especie (Gilbert, 1983). El factor de reconocimiento en *B. plicatilis* es una glicoproteína localizada en mayor concentración en los lugares de la superficie corporal de la hembra favorables para la penetración, y cuyos receptores específicos en el macho se encuentran ubicados fundamentalmente en la corona y el campo bucal (Snell y Nacionales, 1989). Si los huevos haploides aún dentro de la hembra mítica son fecundados, dan lugar a embriones latentes enquistados que se denominan como huevos durables (Gilbert, 1974). Estos huevos diploides, los únicos de origen sexual que aparecen en el ciclo, poseen una cubierta endurecida, son más oscuros y grandes que los huevos partenogénéticos, y en uno de sus extremos presentan una cámara clara en forma de casquete. Los huevos durables pueden ser transportados fuera o dentro del cuerpo de la hembra; en este último caso son puestos en libertad tras la muerte de la madre (Serra, 1987).

Los huevos de resistencia pueden soportar condiciones desfavorables de desecación durante largos periodos de tiempo. Después de un plazo de latencia que varía en función de las especies, los huevos durables responden a señales específicas para cada especie (Pourriot y Snell, 1983), y eclosionan dando lugar a hembras diploides amíticas que entran de nuevo en la fase asexual del ciclo.

La localización de machos en los estudios de campo requiere largos programas de muestreo con observaciones constantes, dada la naturaleza efímera de la reproducción sexual en las poblaciones naturales de rotíferos (King y Snell, 1980). Por otra parte, la inexperiencia en los factores específicos provoca el cambio en el modo de reproducción, y la posible pérdida del potencial mítico con el cultivo en el laboratorio documentada por algunos autores (Buchner, 1987) convierten casi en

impredecible la detección de machos en los cultivos de laboratorio. No obstante, la reproducción sexual ha sido comúnmente observada en cultivos de laboratorio de muchas especies, por ejemplo, las de los géneros, *Asplanchna* y *Brachionus*, especialmente cuando el aislamiento a partir del campo es reciente, siendo la reproducción sexual un rasgo primordial de su ciclo vital (Snell, 1989).

En segundo lugar, se ha descrito la existencia de huevos pseudosexuales es decir huevos de resistencia no fertilizados (Ruttner-Kolisko, 1983), hecho que implica que no basta la observación de huevos durables, sino que deben ser observados los machos para la confirmación de la reproducción sexual en algunas especies.

En tercer lugar, además de los dos tipos de hembras (mícticas y amícticas) descritas clásicamente en los monogonontos, se ha observado y estudiado la existencia de un tercer tipo, la hembra anfotérica, capaz de crear huevos mícticos y amícticos. Estas hembras, que aparecen con una frecuencia muy baja, se han observado en algunas poblaciones de los géneros *Asplanchna*, *Sintherina* y *Conochiloides* (Snell y King, 1977) y constituyen una importante excepción al esquema clásico del ciclo de vida de los rotíferos monogonontes (figura 2)

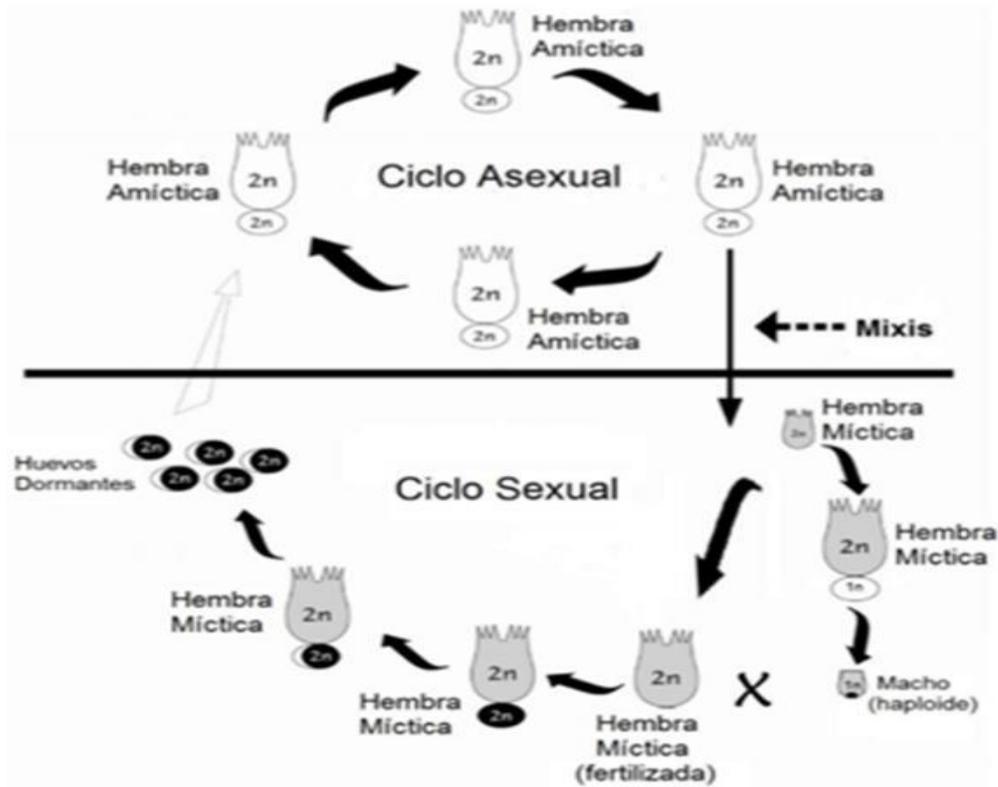


Figura 2: ciclo reproductivo de *B. plicatilis*. Tomado de Denekamp, et al (2009).

3.8. Propiedades nutricionales de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

El suministro de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como alimento en cultivo de rotíferos se debe a su destacado contenido nutricional.

La composición bioquímica de las levaduras es variable. Levadura seca típica contiene entre el 93-97% de materia seca y numerosos investigadores concuerdan en que el mayor porcentaje está representado por las proteínas, aunque tienen diferencias en el espectro de valores (Soto, 2003).

Del 35-45% de carbohidratos, y del 5-9 por ciento de lípidos. Una importante fracción del nitrógeno se encuentra bajo la forma de ácidos nucleico (hasta 12%) lo que conlleva a producir niveles significativos de ácido úrico, que pueden condicionar su uso en altas concentración debido a su toxicidad (Soto, 2003). El perfil de

aminoácidos de la levadura es muy parecido a la harina de soja, por lo que se adapta perfectamente a la alimentación animal; además es rica en ácido glutámico y lisina (hasta 8%), pero relativamente baja en metionina. (Soto, 2003)

La levadura es por naturaleza rica en vitamina B como la biotina, tiamina y ácido fólico. También produce niacina, pero por lo contrario a algunas creencias, no produce vitamina B12 (Soto, 2003).

3.9. Características biológicas de *Nannochloropsis* spp.

Entre las microalgas que poseen la capacidad de producir altas concentraciones de lípidos se encuentran *Nannochloropsis oculata* con contenidos que varían de 31 a 68 % (Sanchez-Torrez et al., 2008)

El Género *Nannochloropsis* pertenece al Reino *Chromista* y al Filo *Heterokontophyta*, se caracteriza por ser una microalga unicelular, con formas subesférica o cilíndricas que van de los 2 a los 4 μ m, con cloroplastos que van del color amarillo al verde (Gonzales, 2014). Contiene clorofila a y otros pigmentos como antoxantina, zeaxantina y canthaxantina. Este Género de microalgas congrega a las especies que contienen la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (HUFAs), especialmente ácido eicosapentaenoico (EPA) (SanchezTorrez et al., 2008).

Las microalgas vivas habitualmente se han cultivado para alimentar y enriquecer los cultivos de rotíferos, Normalmente se aplica *Nannochloropsis* y / o *Tetraselmis* para una alimentación diaria de rotíferos, además el *Isochrysis*, se utilizan como un enriquecimiento de DHA justo antes de usar los rotíferos como una alimentación larval. (Mak, 2010).

3.10. Composición nutricional de *N. oculata*.

Este género de microalgas tiene la capacidad de producir ácidos grasos poliinsaturados que al ser digeridos por los rotíferos pasan a almacenarlos en su cuerpo y, por esta razón, son transferidos a las larvas de peces usando a los rotíferos como vehículos alimentarios. Entre los ácidos grasos presentes en *N. oculata* están: Ácidos láuricos, ácido mirístico, pentadecanoico, palmítico, palmitoleico, heptadecanoico, esteárico, oleico, linolénico, linolénico, eicosatrienoico, araquidónico, erucico, eicosapentaenoico (EPA). Asimismo, los rotíferos son portadores de aminoácidos que sirven para la formación de energía en los peces, además de desarrollar un papel importante en la regulación del metabolismo y la síntesis de lípidos (Matzner, 2003).

3.11. Condiciones generales del cultivo de *B. plicatilis*.

Para desarrollar la actividad de reproducción de *B. plicatilis* se deben tomar en cuenta las condiciones ambientales y deben, además, adecuarse a las condiciones del laboratorio. Es importante mantener controlados los principales parámetros como la temperatura, la salinidad, pH, luminosidad, aireación y niveles de oxígeno disuelto para evitar estrés en los microorganismos, así como la calidad y cantidad de alimento (Henry, 2016).

Alimentación: en la producción intensiva de rotíferos, el principal problema que se presenta es obtener el alimento apropiado. Se han aplicado esencialmente especies de microalgas tales como (*Nannochloropsis oculata*, *Chlorella spp*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricornerum*), pero debido a la gran demanda de alimento que ello implica, se requiere de máximo esfuerzo y de un espacio de cultivo muy amplio, por lo que se han implementado técnicas con alimentos almacenables, tal como la levadura de pan *Saccharomyces cerevisiae* (Reguera et al., 1982).

Salinidad: es una condición ambiental que afecta crecimiento y reproducción, ciertas investigaciones han demostrado que Las especies de *Brachionus* pueden

tolerar mejor un cambio a salinidades más altas que las más bajas. Con salinidades entre 30 y 40 ‰ se presenta un óptimo crecimiento en poblacional de *Brachionus plicatilis*. (Osorio et al., 2021)

Temperatura: tanto el periodo de vida y la actividad reproductiva del *B. plicatilis* dependen de la temperatura del cultivo, a una temperatura de 25° C el rango de vida se calcula en 3.4 a 4.4 días (August, 2013). Otro estudio realizado por: Mzimba, (2014) sugiere que el *Brachionus sp.* Requiere una temperatura de entre 22 y 28 °C; es importante mantener un control adecuado de este.

Oxígeno disuelto: los rotíferos del género *Brachionus* requieren concentraciones de oxígeno superiores a 4 mg/l para su apropiado crecimiento (Stottrup y McEvoy, 2003). Se ha reportado que los rotíferos pueden sobrevivir con niveles de oxígeno de 2 mg/l (Ríos, 2019). Aunque este tiene la capacidad de tolerar condiciones anaeróbicas o casi anaeróbicas durante un breve periodo de tiempo, pero no se desarrolla de manera satisfactoria (Mzimba, 2014).

pH: se ha determinado que los rangos óptimos en la producción de rotíferos se establecen entre 6.6 y 8.0 (Ríos, 2019).

Luz: Los operarios deben de estar seguros de que las lámparas de los tanques se mantengan encendidas para proporcionarles la luminosidad idónea en el que se desarrollen correctamente (Henry, 2016).

Aireación: la aireación de los tanques debe ser de manera sutil para favorecer la suspensión y homogeneización del rotífero y evitando así la Re suspensión de la materia orgánica precipitada, es necesario, por tanto, mantener esta aireación homogénea y suave abriendo o cerrando las válvulas de aireación del tanque (Mzimba, 2014).

3.12. Uso de probióticos en cultivos de rotíferos

Los rotíferos, comúnmente utilizados como alimento de partida para la acuicultura de varias especies marinas, representan vectores importantes para la transmisión de enfermedades debido a que transportan una gran carga bacteriana en el tracto digestivo. Las bacterias presentes en los rotíferos pueden transmitirse por ingestión, pero también pueden transmitirse a través del agua de mar contaminada. También se ha demostrado que el inóculo bacteriano seleccionado juega un papel importante en la productividad de los cultivos de rotíferos, afectando principalmente la abundancia de rotíferos y la variabilidad del número dentro de los cultivos replicados. (Murillo y Villamil, 2011)

Las larvas de peces son susceptibles a la infección y tienen una alta tasa de mortalidad debido a los organismos patógenos y oportunistas de las presas. Además, adición de especies de *Bacillus*. El agua de vivero puede aumentar la supervivencia del bagre y la producción neta al mejorar la calidad del agua. En los camarones, se observó una alta tasa de supervivencia de *L. vannamei* durante *Vibrio Harvey* y el síndrome de la mancha blanca, y se informó un aumento en los recuentos sanguíneos y superóxido dismutasa, por lo que otros estudios han sugerido que se debe considerar el tratamiento con *Bacillus*. (Murillo y Villamil, 2011)

Las bacterias del género *Bacillus* son bien conocidas por su fuerte adaptabilidad a una variedad de condiciones, y algunas especies producen esporas altamente resistentes. Se aíslan de peces vivos, corales blandos y esponjas. Este hecho se ha demostrado cuando las larvas y otros invertebrados marinos han aumentado su viabilidad. Los antibióticos de amplio espectro se utilizan ampliamente para tratar y prevenir enfermedades en la acuicultura. Sin embargo, este enfoque es motivo de gran preocupación porque facilita la aparición de patógenos resistentes y la vida media prolongada de algunos productos químicos. (Murillo y Villamil, 2011)

Existe la necesidad de una profilaxis de enfermedades que pueda potenciar la respuesta inmunitaria no específica del huésped mientras suprime o controla los patógenos. Los métodos de prevención, como el uso de vacunas, son limitados ya que los peces en etapa larval temprana dependen principalmente de respuestas

inmunitarias no específicas. Los probióticos son aditivos microbianos vivos que tienen una variedad de efectos beneficiosos en el huésped, principalmente al modificar la comunidad microbiana intestinal del huésped para aumentar la utilización de alimentos y mejorar el valor nutricional. Los probióticos también parecen mejorar la capacidad de respuesta a las enfermedades del huésped y mejorar la calidad del entorno de crianza. Se ha propuesto la introducción de cepas seleccionadas en la cadena alimentaria como tratamiento alternativo para esta enfermedad. *Lactobacillus plantarum* y *Bacillus spp.* Se ha informado que las esporas reducen el número de vibriónidos en los rotíferos alimentados con estos aditivos y, posteriormente, aumentan el peso corporal y la viabilidad de las larvas de lenguado. También una de las ventajas de usar *Bacillus spp.* Una ventaja sobre los probióticos en la acuicultura es que es menos probable que utilicen genes de bacterias Gram-negativas (como *Vibrio*) que pueden conferir resistencia a los antibióticos. Dado que los rotíferos son alimentos vivos importantes y costosos para la cría de peces y larvas de invertebrados y también pueden ser vectores de invasión de bacterias patógenas, este estudio explora el potencial probiótico de *B. cereus*. Diseñado para evaluar y previamente utilizado *Bacillus subtilis* aislado de sedimentos marinos para aumentar producción de rotíferos y control del crecimiento bacteriano en cultivos de rotíferos. (Murillo y Villamil, 2011)

3.13. ¿Qué es un probiótico?

El término probiótico ha ido cambiando de significado a lo largo de los años. Así se definió en 1968 como un suplemento microbiano administrado a animales y humanos. Lo redefinió como un organismo vivo administrado al huésped en una dieta suplementada para promover el equilibrio microbiano intestinal. Luego, el término se aplica a los alimentos microbianos que se administran de una manera que beneficia la fisiología del huésped al permanecer viables en el tracto gastrointestinal, modular el sistema inmunitario y mejorar la colonización preventiva microbiana de bacterias no deseadas en el tracto intestinal. (Murillo y Villamil, 2011)

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Tipo y ubicación del estudio

Esta investigación es de tipo aplicada de corte longitudinal y se llevó a cabo en el área de cultivo de alimento vivo, específicamente en el área de rotíferos, de las instalaciones del Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuícolas (LIMA) de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua –León (UNAN-León), situado en Las Peñitas-León.



Figura 3: Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuícolas. (LIMA)

4.2. Animales en estudio

B. plicatilis fue donado por el LIMA-UNAN-León. Los rotíferos se cultivaron a una densidad inicial de 10 rot/ml en recipientes de vidrio oscuros (simulando las condiciones de cultivo de larvas), a un volumen operativo de 700 ml de agua marina (35 ‰) filtrada por UV. Se utilizó aireación constante durante todo el experimento. Se llevaron a cabo controles diarios del pH con valores oscilantes de 8.2 ± 0.1 y temperatura del agua que perduraron de 30 ± 1 , respectivamente.

4.3. Diseño experimental y toma de muestra

El experimento consistió en evaluar el ritmo de crecimiento y capacidad reproductiva de los rotíferos alimentados con diferentes dietas, en condiciones de escasa iluminación. Para ello, el día del experimento los rotíferos fueron alimentados una única vez y se distribuyeron en los siguientes grupos experimentales: T1: Rotíferos + Probiótico (18×10^4 cel/ml); T2: Rotíferos + *N. oculata* (5×10^5 cel/ml); T3: Rotíferos + Probiótico + *N. oculata* (a ratio 1:3, respectivamente); Para todos los grupos experimentales N= 10 rot/ml. El probiótico fue preparado según las indicaciones del producto comercial "Terminate", que contiene un mix de bacterias del género *Bacillus spp.* (*B. coagulans*, *B. laterosporus*, *B. ehc 100 strain*, *B. pumilis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. lichniformis*). La toma de muestra se realizó una vez al día por un período de 4 días. Se tomó 1 ml de muestra, se fijó con una gota de lugol neutro para inmovilizar a los rotíferos y se contaron usando una cámara Sedgwick- Rafter (S/R), a una magnificación de 10x usando un microscopio óptico convencional. Las lecturas se realizaron por triplicado.

4.4. Análisis estadísticos

Durante la realización del experimento se determinaron las pendientes de crecimiento usando el modelo estadístico de regresión lineal simple $Y=a + bx$ y se determinaron los valores de pendiente desde el día 0 hasta las 48 horas de cultivo (máxima concentración de rotíferos/ml) y de las 48 horas hasta las 96 horas de cultivo (minina concentración de rotíferos/ml), para los tres tratamientos experimentales (T1, T2 y T3).

Para determinar diferencias significativas entre los valores de las medias poblacionales de *B. plicatilis*, en el tiempo, la comparación entre los grupos se realizó usando Sigma Stat (SPSS Inc., Chicago, IL). Los datos se muestran como la media \pm E.E.M de cada tratamiento y las diferencias entre ellos se evaluaron mediante un ANOVA de una vía. Tras los análisis de varianza se realizó el test de comparaciones múltiples de Student Newman Keuls. En todos los casos el nivel de

significación se estableció con un valor de $P < 0.05$. Previamente a estas pruebas estadísticas, se analizaron los datos mediante una prueba de normalidad (ShapiroWilks) y de homogeneidad de varianzas (prueba C de Cochran). Para determinar la relación del ritmo de crecimiento de los rotíferos entre los grupos experimentales se utilizó el estadístico de correlación de Pearson.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización preliminar del estudio

El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el ritmo de crecimiento poblacional de *Brachionus plicatilis* alimentados con *Nannochloropsis oculata*, probiótico y dieta mixta (*N. oculata* + probiótico). Las dietas son similares a las usadas por otros investigadores para evaluar ritmos de crecimiento y capacidad reproductiva de los rotíferos; así como de bioencapsular nutrientes para, posteriormente, ser ofrecidos como alimento vivo a las larvas de peces, tras el agotamiento del saco vitelino (Ferreira et al., 2011; Samat et al., 2020). Se sabe, que la interacción entre los factores salinidad-temperatura y cantidad-calidad de alimento es muy importante para el crecimiento y reproducción de *B. plicatilis*, debido a que estos factores regulan el tiempo de desarrollo embrionario, porcentaje de fecundidad, sobrevivencia y el tiempo de reproducción (Lubzens et al., 1985; Lowe et al., 2005; Cabrerías et al., 2008).

Estudios realizados en el Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuícolas (LIMA) para evaluar el efecto del estrés por salinidad reducida sobre la capacidad reproductiva de *B. plicatilis*, muestran que este rotífero puede tolerar cambios de salinidad en un rango de 35 ‰ a 25 ‰ sin que se afecte el ritmo de crecimiento (Bonilla et al., 2012). Asimismo, los investigadores del LIMA reportaron que cuando *B. plicatilis* se cultiva en concentración salina de 25 ‰ la cantidad de rotíferos con más de dos huevos es mayor que los cultivados en 35 ‰ de salinidad, observación que permite deducir que *B. plicatilis*, bajo estas condiciones experimentales de temperatura, pH, aireación y dieta alimenticia que se ofrece en el LIMA, mantiene un comportamiento de reproducción sexual. Es más, nuestros resultados coinciden con otros estudios donde muestran que *B. plicatilis* se reproduce mejor en salinidades inferiores a 35 ‰ (Lowe et al., 2005) debido a que en salinidad de 35 ‰ dirigen gran parte de su energía hacia el proceso de osmorregulación (activación de

la bomba Na/K) y no a la producción de huevos (Lubzens et al., 1985; Lowe et al., 2005; Malekzadeh et al., 2010).

5.2. Capacidad reproductiva de *B. plicatilis* alimentado con probiótico y *Nannochloropsis oculata*

En nuestro experimento, se observó que bajo las condiciones de temperatura de 30 ± 1 °C y salinidad de 35 ‰ y cantidad-calidad de alimento, para todos los grupos experimentales (T1; T2; T3), el ritmo de crecimiento poblacional de los rotíferos presentó una marcada fase exponencial a las 48 horas de cultivo (figura 3), lo cual podría ser debido al aceleramiento del metabolismo influenciado por la temperatura (Lowe et al., 2005). En contraste, a las 72 h y 96 h de cultivo se observa un decrecimiento de la concentración de rotíferos/ml, en los tres tratamientos testados; situación que invita a sugerir, que la disminución del ritmo de crecimiento de *B. plicatilis* podría deberse a la disminución de algunos nutrientes esenciales usados en su metabolismo, de manera similar a lo reportado por otros investigadores donde muestran disminución del ritmo de crecimiento de rotíferos en situaciones de escasas de nutrientes (Gribble y Mark, 2012).

5.2.1. Ritmo de crecimiento poblacional (rot/ml) de los rotíferos alimentados con diferentes dietas

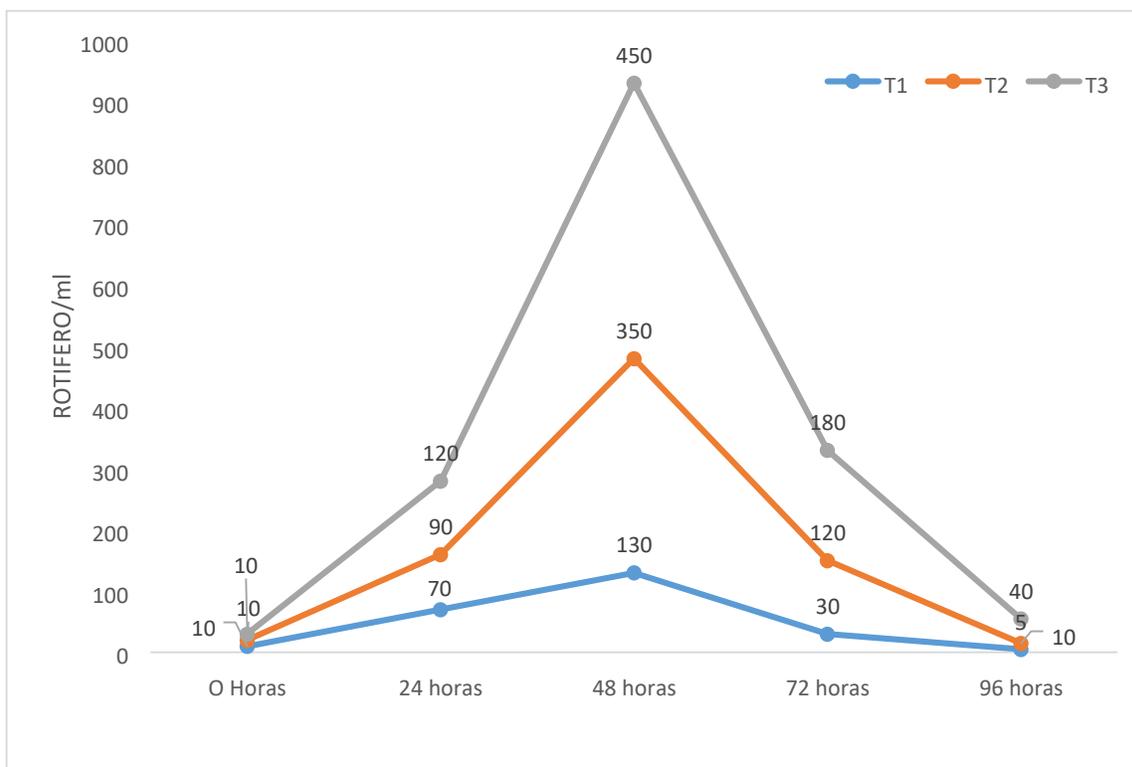


Figura 4. Ritmo de crecimiento poblacional (rot/ml) de los rotíferos alimentados con diferentes dietas (T). T1: Rotíferos + Probiótico; T2: Rotíferos + *N. oculata*; T3: Rotíferos + *N. oculata* + Probiótico.

Por consiguiente, nuestros resultados muestran, que tanto la concentración de microalgas como la de bacterias probióticas en el medio de cultivo, e iniciando con una población de 10 rotíferos/ml, es suficiente para lograr tener poblaciones de hasta 450 rotíferos/ml en un periodo de 48 horas de cultivo, coincidiendo en parte, con resultados de algunos investigadores donde reportan que la mayor concentración de rotíferos la obtienen a las 72 horas tras la alimentación de *B. plicatilis* con *N. oculata* en medio marino y enriquecido con ácidos grasos poliinsaturados (Cisneros, 2011). Asimismo, nuestros resultados coinciden con experimentos previos en LIMA-UNAN-León, donde los rotíferos tras su alimentación con *N. oculata* (3×10^5 cel/ml) y con levadura *Sacharomyces cerevisiae* (1×10^6 cel/ml), presentaron la mayor concentración al tercer día de cultivo (Osorio et al.,

2021). Bajo este contexto, en nuestro estudio se evidencia que la calidad y cantidad del alimento con alto contenido de ácidos grasos polinsaturado es otro factor que determina la tasa de crecimiento de los rotíferos, concordando con lo reportado en otros estudios (Vallejo, 1993; Cabrera, 2008),

BAI evaluar el ritmo de crecimiento en los diferentes tratamientos experimentales se observa mayor valor de la pendiente de crecimiento a las 48 h de cultivo, en los rotíferos que se alimentaron con la dieta (T3) *Nannochloropsis oculata* + probiótico, siguiendo en orden descendente la disminución de los valores en los tratamientos donde se alimentó, solamente con (T2) *Nannochloropsis oculata* o (T1) probiótico, respectivamente (Figura 4).

5.2.2. Valores de pendiente del ritmo de crecimiento de *B. plicatilis* alimentado con tres dietas

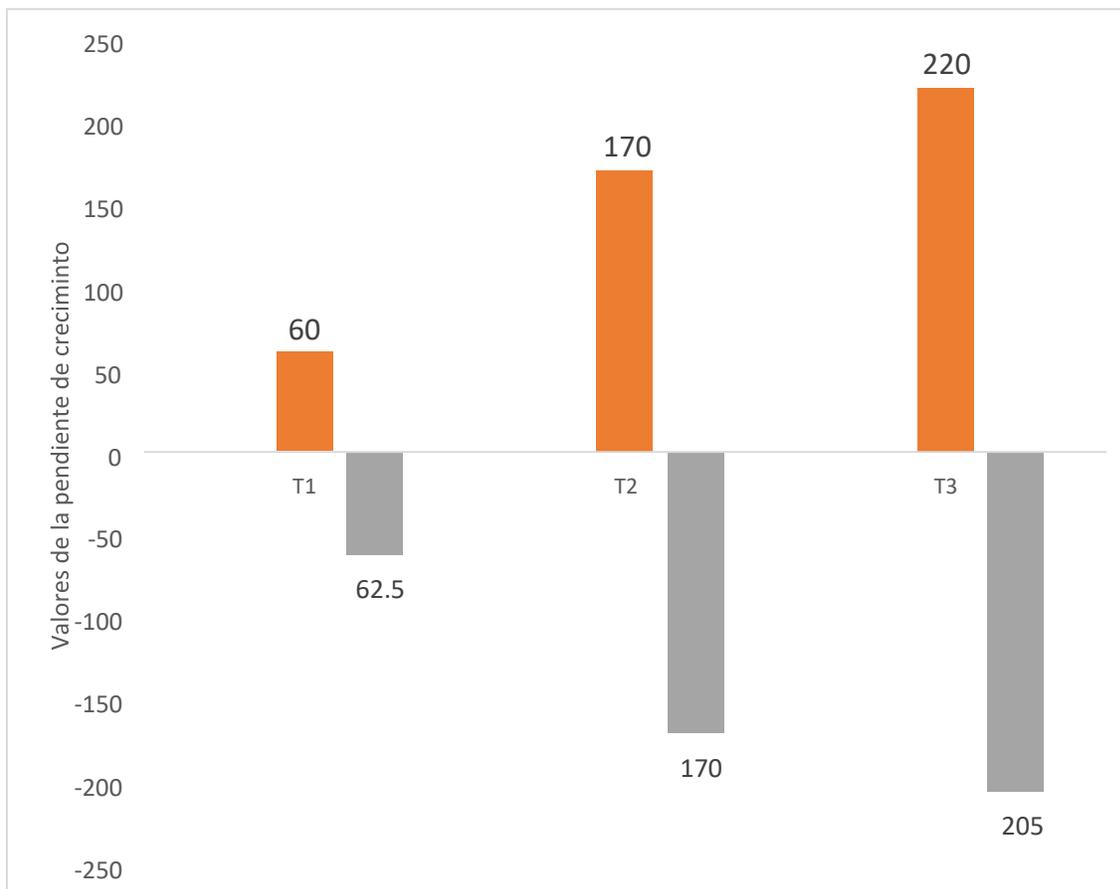


Figura 5 Valores de pendiente del ritmo de crecimiento de *B. plicatilis* alimentado con tres dietas (T): T1: Rotíferos + Probiótico; T2: Rotíferos + *N. oculata*; T3: Rotíferos + *N. oculata* + Probiótico. Barras en color naranja indican los valores de pendiente en el periodo de 0 horas-48 horas y el color gris indica los valores de pendiente en el periodo de 48 horas-96 horas, en los tres tratamientos experimentales.

En ese sentido, nuestros resultados invitan a sugerir que la mayor concentración de rotíferos observada a las 48 h del experimento, en los tratamientos con *Nannochloropsis oculata* y *N. oculata* + probiótico, podría deberse a la capacidad de *N. oculata* de brindar los elementos necesarios para la nutrición de *B. plicatilis* y de la capacidad de las bacterias probiótico de colaborar en el desdoblamiento de los nutrientes contenidos en *N. oculata*, respectivamente. Por otro lado, la disminución de la población de rotíferos tras las 48 h de cultivo pudiese estar siendo parcial por el agotamiento de los nutrientes y el incremento de metabolitos tóxicos

derivados del metabolismo de los aminoácidos tales como el amonio y sulfuro de hidrogeno, similar a lo reportado por otros investigadores (Lowe et al., 2005).

Bajo ese contexto, nuestros resultados coinciden con lo reportado en otros estudios, donde muestran que los rotíferos alimentados con *N. oculata* (Gosh et al., 2002) tienen razonable ritmo de crecimiento, debido a la capacidad de la microalga de sintetizar nutrientes tales como, ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), especialmente ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (ARA), docosahexaenoico (DHA) (Xiao-Nian et al., 2016), y en menor proporción proteínas, carbohidratos y vitaminas (A, C, D, E y K) (Samat et al., 2020), suministrando un aporte de nutrientes para las actividades osmoregulatorias desarrolladas por la bomba sodio-potasio en medio salino y, además, activar los diferentes procesos metabólicos que estimulen el crecimiento somático, tasa de reproducción, longevidad y tasa de crecimiento poblacional de los rotíferos, similar a lo reportado en otras investigaciones (Cisneros, 2011; Ferreira et al., 2011; Samat et al., 2020).

Los rotíferos alimentados solamente con probiótico (T1) mostraron los menores valores de pendiente (60) de crecimiento (ver figura 4), lo cual resulta razonable debido a que las bacterias probióticas no brindan el aporte nutricional necesario para el crecimiento de rotíferos, tal como lo hace *N. oculata* que brinda gran concentración de ácidos grasos polinsaturados (Kagali et al., 2019). Sin embargo, el probiótico podría funcionar en los rotíferos de manera similar a lo reportado en peces, donde contribuyen de forma significativa a la degradación de metabolitos mediante la liberación de exo-enzimas que facilitan la degradación de las macromoléculas (Bairagi et al. 2002, Balcázar et al. 2006), la estimulación del sistema digestivo (Lazado et al. 2012)., exclusión competitiva de bacterias patógenas (Balcázar et al. 2004), la mejora de la calidad del agua (Moriarty 1997), entre otros.

5.3. Correlación del ritmo de crecimiento de los tres grupos experimentales de *B. plicatilis* alimentado con dietas (T): T1: Rotíferos + Probiótico; T2: Rotíferos + *N. oculata*; T3: Rotíferos + *N.*

oculata + Probiótico.

A fin de corroborar el ritmo de crecimiento de *B. plicatilis* bajo las condiciones impuestas en los tres tratamientos experimentales y denotar su comportamiento de crecimiento poblacional, realizamos el análisis de correlación de Simpson y encontramos que T2-T3 si presentan la mayor correlación (R:0.952) seguido de T1-T3 (R:0.943) y T1-T2 (R:0.894), todos con una $P \leq 0.05$ (ver tabla 1), lo cual ratifica que al alimentar una población inicial de 10 rotíferos/ml, en un volumen de agua de 700 ml, con una sola dosis de *N. oculata* (3×10^5 cel./ml), probiótico (1×10^6 cel./ml) o con ambos, el comportamiento del ritmo de crecimiento es similar en los tres tratamientos, coincidiendo a lo reportado en experimentos anteriores (Bonilla et al., 2012; Osorio et al., 2021; Cisneros, 2011; Ferreira et al., 2011; Samat et al., 2020).

Tabla 1. Correlación de Pearson sobre el ritmo de crecimiento de *B. plicatilis* entre los grupos experimentales.

	T2	T3
T1	R: 0.894 P: 6.98E-06	R: 0.943 P: 138E-07
T2		R: 0.952 P: 441E-08

R: valor de coeficiente de correlación de Pearson, P: probabilidad. T1: Rotíferos + Probiótico; T2: Rotíferos + *N. oculata*; T3: Rotíferos + *N. oculata* + Probiótico.

6. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran el efecto sobre el ritmo de crecimiento *B. plicatilis* cuando es alimentado con *N. oculata* y bacterias probióticas, en condiciones de salinidad de 35‰ y poca iluminación. Bajo este contexto, concluimos que:

1) *B. plicatilis* presenta mayor pendiente de crecimiento cuando es alimentado con *Nannochloropsis oculata* y probiótico, seguido en orden decreciente cuando es alimentado solo con *Nannochloropsis oculata* o solo con probiótico, respectivamente.

2) *B. plicatilis* alimentado con una dieta compuesta por *Nannochloropsis oculata*+probiótico presentó la mayor densidad de rotíferos/ml (450/ml) en un periodo de 48 horas, siguiendo en orden decreciente los rotíferos alimentados solo con *Nannochloropsis oculata* (350/ml) y los rotíferos alimentados solo con probiótico (130/ml), respectivamente.

3) Las tres dietas testadas para evaluar el ritmo de crecimiento de *B. plicatilis* presentan correlación de $P \leq 0.05$.

7. RECOMENDACIONES

- 1) Realizar estudio nutricionales con la especie *B. plicatilis* previo y tras la alimentación con diferentes dietas para evaluar el contenido nutricional del rotífero y, de esta forma, tomar las mejores decisiones para ofrecerlo como alimento a las larvas de pargo lunarejo.

- 2) Continuar investigaciones sobre la capacidad reproductiva de *B. plicatilis* con diferentes dietas e implicando diversos parámetros fisicoquímicos relacionados con el medio acuoso para ir propiciando la mejora continua del contenido nutricional de *B. plicatilis* como alimento vivo para ofrecer a las larvas de pargo lunarejo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- August. (2013). efecto de la temperatura sobre el crecimiento poblacional del rotífero *brachionus rotundiformis* (Tschugunof 1921) cultivado con tres dietas. XII Reunión Científica ICBAR. Lima, Perú.
- Bairagi, A., Ghosh, K.S., Kumar, S., and Ray, A.K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish. *Aquaculture International*, 10 (1), 109–121.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., and Múzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology*, 114 (3-4), 173–86.
- Beaumont, A., y Cassier, C. (1981). *Biologie animal: Des Protozoaires aux Métazoaires épithelionéuriens* (Tomo I). Dunod.
- Bender, K., y Kleinow, W. (1988). Chemical properties of the lorica and related parts from the integument of *Brachionus plicatilis*. *Comparative Biochemistry Physiology*, 483-487
- Bérsins, B. (1960). Rotatoria IV. Order: Monogononta. Sub-order Ploima. Family: Brachionidae (cont.). Genera: *Brachionus*, *Kellicottia*, *Argonoiholca*, *Notholca*, *Pseudonotholca*, *Euchlanis*, *Tripleuchlanis*. 3.

- Bonilla, N., Garcia, V., y Menocal, G., (2020). Efecto del estrés por salinidad reducida sobre la capacidad reproductiva de *Brachionus plicatilis*, alimentados con *Saccharomyces cerevisiae*.
- Buchner, H. (1987). Studies on the control of heterogonous reproduction in Rotifers. III. The loss of mictic potential in *Brachionus urceolaris*. *Hydrobiologia*, 333354.
- Cabrera M.I. 2008. Tasa de crecimiento poblacional del rotífero *Brachionus rotundiformis* (Rotifera: Brachionidae) en un quimiostato de dos cámaras. *Rev. Biología Tropical*. 56: 1149-1157.
- Ciros-Pérez, J., Gomez, A., y Serra, M. (2001). On the taxonomy of three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp. *Journal of Plankton Research*, 1311-1328
- Cisneros, R. (2011). Rendimiento poblacional del rotífero nativo *brachionus* sp. "cayman", utilizando diferentes enriquecedores growth performance of the native rotifer *brachionus* sp. "cayman" using different enrichment supplements. *Ecología Aplicada*, 10(2).
- Clément, P. (1969). Premières observations sur l'ultrastructure comparée des teguments des rotifères. *Vie et Milieu A*, 461-482.
- Clément, P. (1975). Ultraestructura de l'oeil cérébral d'un rotifère *Trichocerca ruttus*. *Journal Microscopie Biologique*. Cell. 69-86.
- Clément, P. (1977). Ultrastructural research on rotifers. *Arch. Hydrobiologia Beih.*, 270-297.
- Clément, P., y Amsellem, J. (1989). The skeletal muscles of rotifers and their innervation. *Hydrobiologia*, 255-278.

- De la cruz, A. Y. (1974). Método de cultivo masivo de *Brachionus Plicatilis* (Rotífera) a escala experimental. Centro de investigaciones marinas de la universidad de la Habana.
- Epp, R., y Winston, P. (1977). Osmotic regulation in brackish-water rotifer *Brachionus plicatilis*: (Müller). *Journal of Experimental Biology*. 151-156
- Ferreira, M., Seixas, P. Coutinho, J. Fábregas y A. Otero. (2011). Effect of the nutritional status of semi-continuous microalgal cultures on the productivity and biochemical composition of *Brachionus plicatilis*. *Marine Biotechnology*. 13: 1074–1085.
- Ghosh, K., Sen, K.S., and Ray, A.K., 2002. Characterization of Bacilli Isolated from the Gut of Rohu, *Labeo rohita*, Fingerlings and Its Significance in Digestion. *Journal of Applied Aquaculture*, 12 (3), 33–42.68(4):349–358
Doi:10.1093/gerona/gls170
- Gilbert, J. (1974). Dormancy in rotifers. *Transactions. American. Microscopical. Society*. 490-513.
- Gilbert, J. (1983). Control of sexuality in *Asplanchna brightwelli*: threshold levels of dietary tocopherol and modification of tocopherol response by exogenous and endogenous factors. *Hydrobiologia*, 167-173.
- Gonzales, O. G. (2014). Efecto de la intensidad de la luz y de la tasa de inyección de aire en el crecimiento y la productividad de la microalga *Nannochloropsis* s.p, cultivada en bioreactor plano. Ensenada, Baja California, Mexico.
- Gribble, K., y Mark, D. (2012). Life-Span Extension by Caloric Restriction Is Determined by Type and Level of Food Reduction and by Reproductive Mode in *Brachionus manjavacas* (Rotifera). *Journals of Gerontology: Biological Science*.
- Hammer, V. (1986). *Saline lake ecosystems of the world*. (H. Dumont, Ed.) Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers.

- Henry, E. (2016). Rotíferos Fiables en acuicultura. Recuperado el 4 de marzo de 2020, de Aquafeed:
- Hirata, H. (1980). Culture Methods of the Marine rotifer, *brachionus plicatilis*. Min. Rev. Data File Fisheries Research.
- Kagali, R.; Kim, H...; Koga, T.; Sakakura, Y.; Hagiwara, A. (2019). E_ect of two commercial probiotic products on population growth of rotifer *Brachionus rotundiformis* Tschuguno_. *Hydrobiologia*. 844, 173–182.
- King, C., y Snell, T. (1980). Density dependent sexual reproduction in natural populations of the.
- Koste, W., y Shiel, R. (1987). Rotifera from Australian Inland Waters. II. Epiphanidae and Brachionidae (Rotifera: Monogononta). *Invertebr. Taxon.*, 949-1021.
- Lazado, C., Caipang, A., y Kiron, V. (2012). Enzymes from the gut bacteria of Atlantic cod, *Gadus morhua* and their influence on intestinal enzyme activity. *Aquaculture Nutrition*, 18 (4), 423–431.
- Lowe, C. (2005). Evidence that the rotifer *Brachionus plicatilis* is not an osmoconformer. *Marine Biology*, 923-929. Doi:
<https://doi.org/10.1007/s00227-004-1501-9>
- Lubzens, E., Minkoff, G., y Marom, S. (1985). Salinity dependence of sexual and asexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Marine Biology*, 123-126. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00397430>
- Mak, R. (2010). Los rotíferos. *International Aquafeed*.
- Malekzdeh-Viayeh, R., Mohammadi, H. y Banj Shafiei, A. (2010). Population growth of six Iranian *Brachionus* rotifer strains in response to salinity and food type. *Internacional Review of Hydrobiology*, 95 (6), 461-470.

- Matzner, D. P. (2003). El efecto de la incorporación de distintos niveles de Materias Primas Vegetales sobre los Ácidos Grasos Poliinsaturados. Valdivia, Chile.
- Moreno, A. (2012). Apuntes de Zoología. Universidad Complutense de Madrid, Departamento de biología, Madrid.
- Moriarty, D. (1997). The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, 151 (1-4), 333–349.
- Murillo, I., y Villamil, L. (2011). *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* used as probiotics in rotifer (*Brachionus plicatilis*) cultures. *Journal of Aquaculture Research & Development*. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.S1-007>.
- Mzimba, L. (2014). The effect of disinfection on survival and feeding quality of rotifers (*Brachionus plicatilis*) and brine shrimp (*Artemia salina*). United Nations University Fisheries Training Programme, Iceland.
- Osorio, K., Palacios, K., Lumbi, D., Hsieh, P y Aguilar, A. (2021). Salinity variation affect population growth rate and reproductive capacity of *Brachionus plicatilis*: an approach to climate change. *Rev. iberoam. bioecon. Cambio clim.* 6, 13, 1587-1599.
- Pejler, B. (1977). On the global distribution of the family Brachionidae (Rotatoria). *Hydrobiologia*: 212-220.
- Pourriot, R., y Snell, T. (1983). Resting eggs of rotifers. *Hydrobiologia*, 213-224.
- Reguera, C., Mosquera, C., y Fernández, C. (1982). Consideraciones acerca de la producción del rotífero *Brachionus plicatilis* O.F. Muller, alimentado con levadura de panificación. Informe Técnico Especial en Oceanografía.
- Rios, S. B. (2019). Rotífero como indicador de la calidad ambiental en la planta de tratamiento de Aguas Residuales de San Juan de Miraflores (PTAR sedapal.SJM). Lima, Perú

- Romero, L. (2008). Caracterización morfométrica y aspectos filogenéticos de cepas de rotíferos del grupo *Brachionus plicatilis* (Rotifera: Brachionidae) utilizados en la acuicultura peruana. Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Lima-Perú.
- Rutner-Kolisko, A. (1974). Plankton Rotifers. Biology and taxonomy. Binnengewasser.
- Ruttner-Kolisko, A. (1983). The significance of mating processes for the genetics and for the.
- Samat, N., Yusoff, F., Rasdi, N y, N., Karim, M. (2020). Enhancement of Live Food Nutritional Status with Essential Nutrients for Improving Aquatic Animal Health: A Review. *Animals*. 10, 2457; DOI: 10.3390/ani10122457
- Sanchez-Torrez, H., Juascamaita-Morales, J., Vargas-Cardenas, J., & OliverosRamos, R. (2008). PRODUCCION DE MICROALGA *Nannochloropsis oculata* (Drop) Hibberd, en medios enriquecidos con ensilados biologicos de pescado. Lima, Perú.
- Segers, H. (2007). Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa*, 1-104.
- Serra, M. (1987). Variación morfométrica, isoenzimática y demográfica en poblaciones de *Brachionus plicatilis*: diferenciación genética y plasticidad fenotípica. Tesis doctoral, Universidad de Valencia, Valencia.
- Snell, T. (1989). Systematics, reproductive isolation and species boundaries in monogonont rotifers. *Hydrobiologia*., 299-310.
- Snell, T., y Childress, M. (1987). Aging and loss of fertility in male and female *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Journal Invertebrate Reproduction Development*., 103-110.

- Snell, T., y King, C. (1977). Lifespan and fecundity patterns in rotifers: The cost of reproduction. *Evolution*, 882-890.
- Snell, T., y Nacionales, M. (1989). Localization of the mate recognition glycoprotein on the rotifer *Brachionus plicatilis*.
- Soto, Y. C. (2003). Efecto de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* desintegrada y tres fracciones en una línea celular y como aditivo alimentario en el cultivo de *Artemia*. La Habana.
- Støttrup, J., y McEvoy, L. (2003). *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Oxford: Blackwell Science Ltd, 11-52.
- Vallejo, A., Newmark, F., y Criales, M. (1993). Efecto de la salinidad sobre el crecimiento poblacional y el rendimiento del rotífero *Brachionus plicatilis* (ciénaga grande de Santa Marta). *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras* 22:112-21.
- Walker, K. (1981). A synopsis of ecological information on the saline lake rotifer *Brachionus plicatilis* Muller 1786. *Hydrobiologia*, 159-167.
- Wallace, R., Snell, T., Ricci, C., y Nogardy, T. (2006). *ROTIFERA: Biology, ecology and systematics. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. Leiden: Backhuys Publishers.
- Wallace, R., y Snell, T. (1991). Rotifera. En *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates* (págs. 187-248). Academic Press.
- Xiao-Nian M., Tian-Peng C., Bo Y., Jin L. y Feng, C. (2016). Lipid Production from *Nannochloropsis*
- Yúfera, M. (1982). Aislamiento, caracterización, y puesta en cultivo de una cepa de pequeño tamaño de *Brachionus plicatilis*. O.F. Müller (1786). Tesis doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.

9. ANEXOS



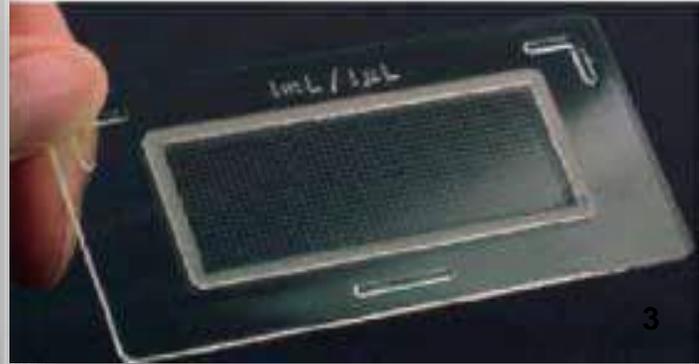
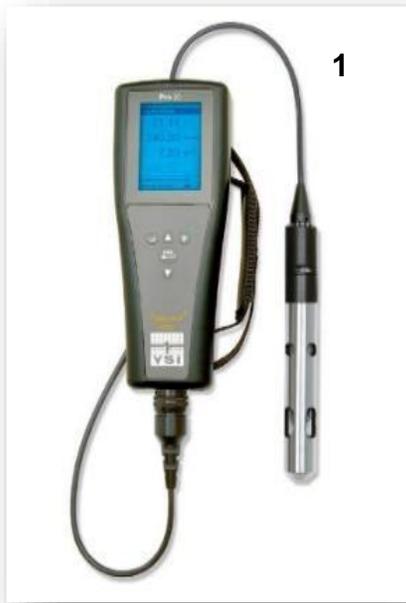


Figura 7. 1-Oxigenometro multiparámetro (YSI), 2- Ph-metro, 3-Cámara Sedgewick Rafter, 4-cámara Figura 6. Revisión de Muestras de B. Plicatilis de Neubauer y 5- Refractómetro



Figura 8. Diseño experimental por triplicado (T1, T2, T3)



Figura 9. Conteo de Rotíferos en cámara Sedgwick-Rafter.



Figura 10. Brachionus plicatilis. Fuente: foto tomada en LIMA