



AISLAMIENTO DE UNA CEPA DE ROTIFERO DE AGUA DULCE CON POTENCIAL COMO ALIMENTO VIVO EN ACUICULTURA

ISOLATION OF A FRESHWATER ROTIFER STRAIN WITH POTENTIAL AS LIVE FOOD FOR AQUACULTURE

Gustavo A. Torres-Valencia ^a PA PhD(C), Marco A. Imués-Figueroa ^a Zoot MSc,
Wilmer R. Sanguino-Ortiz ^a IPA MSc, Frank A. Chapman ^b PhD

Recibido: 14-dic-2016

Aceptado: 11-may-2017

RESUMEN

Los rotíferos *Brachionus*, especialmente de origen marino, han sido utilizados con gran éxito en acuicultura, siendo comercializados desde diferentes países, a tal punto que el material biológico nativo se ha dejado a un lado. No obstante, estas especies de rotíferos son cosmopolitas, y su obtención en sitios cercanos a los laboratorios de producción podría evitar la necesidad de importar material biológico, como también podrían suponer una mayor adaptación a las condiciones propias de cada sitio. Por lo anterior, el presente estudio realizó la obtención y pruebas para el mantenimiento de una cepa del rotífero *Brachionus calyciflorus*, en el Laboratorio de Alimento vivo de la Universidad de Nariño, en Pasto, Colombia. Para ello se evaluó tres dietas y pruebas de almacenamiento de huevos en estado de mixis, se alimentó los rotíferos con 1 µg de dieta (peso seco) por rotífero, utilizando tres dietas por triplicado (T1: *Scenedesmus* sp., T2: *Saccharomyces cerevisiae* y T3: una combinación de ambas). También se evaluó dos métodos de almacenamiento en seco de huevos de diapausa, a temperatura ambiente (20°C) y en húmedo a 4°C, como también se probó un tratamiento profiláctico con formol (40 ppm por 5 min) previo al almacenamiento de los huevos. Para siete días de mantenimiento se registraron densidades de $108 \pm 21,2$; $4,3 \pm 3,8$ y $40,7 \pm 14,4$ rot.ml⁻¹ en los tratamientos T1, T2, y T3, respectivamente. El mayor porcentaje de eclosión de huevos de diapausa lo presentó el almacenamiento en seco con tratamiento profiláctico ($89,6 \pm 4,9\%$), presentando diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los otros tratamientos. Esto muestra que es posible aislar y cultivar cepas de origen local de rotíferos dulceacuícola de manera sencilla; la cual debería ser alimentada con una mono dieta de microalgas, para luego almacenar los huevos de diapausa en recipientes secos con un previo tratamiento profiláctico; dicha cepa podrá ser utilizada en cualquier momento para iniciar cultivos de rotíferos como alimento en larvicultura.

Palabras clave: *Brachionus calyciflorus*, diapausa, agua dulce, larvas de peces

ABSTRACT

Brachionus rotifers, especially of marine origin, has been used with great success in aquaculture, however only a few species from different countries have been commercialized to the point that native

^a Profesores adscritos al Departamento de Recursos Hidrobiológicos, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.
gustavotorresvalencia@gmail.com, marcoi@udenar.edu.co, wilmer963@gmail.com

^b Profesor University of Florida. fchapman@ufl.edu

biological materials have been left aside. Rotifers are cosmopolitan, and obtaining native species at sites close to hatcheries could avoid the need to incorporate external biological material, as well as being better adapted to the conditions of each site. The present study was carried out to isolate and maintain in culture a native strain of the freshwater rotifer *B. calyciflorus*, in the 'Live Feeds Laboratory' at the Universidad de Narino in Pasto, Colombia. Rotifers were fed three diets (1 µg, dry weight) per rotifer, in triplicate treatments (T1: *Scenedesmus* sp., T2: *Saccharomyces cerevisiae* and T3: a combination of both). Two methods for the storage of diapausing eggs was evaluated: one in dry conditions at room temperature (20°C) and the other wet at 4°C. Also assessed was the prophylactic treatment with formalin (40 ppm for 5 min) prior to storage of the eggs. The three diets and egg storage tests was evaluated in a mixed state. After seven days of maintenance culture, densities of 108 ± 21.2 , 4.3 ± 3.8 and 40.7 ± 14.4 rot.ml⁻¹ were recorded in treatment groups T1, T2, and T3, respectively. The highest percentage of hatching of diapausing eggs was obtained in dry storage with prophylactic treatment ($89.6 \pm 4.9\%$), presenting significant difference ($p < 0.05$) with respect to the other treatments. this study demonstrates that it is possible and in a simple way to isolate and culture local strains of freshwater rotifers. the rotifers can be fed a mono-diet of microalgae, and the eggs in diapause should be stored dry and prophylactically treated. the rotifer culture can be maintained and used at any time to start batch cultures of live food for use in larviculture.

Keywords: *Brachionus calyciflorus*, diapause eggs, freshwater, fish larvae

INTRODUCCIÓN

Varias especies de rotíferos del género *Brachionus*, especialmente de origen marino, han sido utilizadas como alimento vivo en acuicultura, de manera generalizada, debido principalmente a su pequeño tamaño [1]. No obstante, su uso en la alimentación de larvas de peces de agua dulce está muy restringido, puesto que los rotíferos marinos no sobreviven por mucho tiempo en este medio [2].

Ahora bien, algunas especies del género *Brachionus* también existen en ambientes dulceacuícolas, especialmente en aguas cálidas tales como ciénagas, estanques de cultivo acuícola, lagos, charcos, entre otros.

En diferentes países ya se ha intentado trabajar con especies tales como el *B. calyciflorus* o *B. patulus*, en donde son de común uso en cultivos masivos en alta densidad, empleándolos

dentro de los procesos de producción masiva en alevinos de peces de agua dulce [3].

En Colombia, los trabajos en aislamiento y cultivo de rotíferos con potencial acuícola son muy pocos, lo cual ha limitado el desarrollo de muchos peces con larvas pequeñas. En el mundo ya se comercializan especies de *Brachionus* tanto marinas como dulceacuícolas, lo cual implica importación de material biológico extranjero.

La diversidad biológica de rotíferos es muy amplia y el género *Brachionus* muy fácil de encontrar, por cuyas razones, en el presente estudio se estandarizó una metodología que permitiera identificar, aislar y mantener una especie de rotífero nativa de agua dulce, que presenta potencial como fuente de alimento vivo en acuicultura.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en los Laboratorios de Acuicultura de la Universidad de Nariño, en Pasto, Colombia. Allí se realizó el aislamiento de una cepa de rotífero *Brachionus calyciflorus*, para lo cual se efectuó muestreos

de zooplancton de estanques y tanques de producción de tilapia, corregimiento El Remolino, municipio de Taminango, perteneciente al departamento de Nariño, en Colombia.

Cultivo de microalgas

Para mantener el rotífero de agua dulce en condiciones de laboratorio fue necesario cultivar las microalgas de agua dulce *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, utilizando un medio de cultivo comercial, basado en una modificación del F/2 de Guillard (Kent F/2 algal formula), en un sistema de batch, consistente en transvasar tubos de ensayo de 10 ml hasta volúmenes de 20 L, pasando por volúmenes de 200, 500 y 3000 ml. Los cultivos fueron utilizados de manera directa como alimento para el rotífero en aislamiento o fueron dejados por un tiempo aproximado de cuatro días sin aireación y en presencia de luz para que las células se precipiten, donde luego fueron concentradas en volúmenes pequeños y almacenadas en refrigeración.

Aislamiento del rotífero

Con el fin de aislar la cepa del rotífero perteneciente al género *Brachionus*, se realizó una serie de muestreos con una red para zooplancton a varios tanques y estanques de cultivo de tilapia. Las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio utilizando recipientes de un litro, sellados con tapa.

En el laboratorio se procedió a observar la presencia de rotíferos. En el momento de observar la presencia del organismo identificado se procedió a extraer los individuos, utilizando la ayuda de microscopio-estereoscopio y tubos capilares, disponiendo los individuos en recipientes de vidrio 2.000 ml de capacidad, los cuales fueron alimentados con una dieta viva de *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp a una densidad de 100.000 células por ml. Diariamente se realizó el reajuste de la densidad con el fin de mantener suficiente alimento para el crecimiento de los rotíferos. Los rotíferos fueron enjuagados cada cuatro días, utilizando una malla de nylon de 60 micrones y reinoculados en el mismo volumen de cultivo.

Preparación del agua

El agua utilizada provenía del acueducto de la ciudad, por lo cual se dejó reposar sin aireación, en tanques de 250 L, por un periodo de cuatro

días, posteriormente se adicionó un acondicionador de agua (Kordon, NovAqua Plus) en proporción de 1 ml por cada 10 L, mezclándolo fuertemente para eliminar la presencia de cloro en el agua, por cuanto en experiencias previas, en el mismo laboratorio, no se logró mantener los rotíferos utilizando hiposulfito de sodio como neutralizador del cloro.

Experimentos

Dietas de mantenimiento de cepa. Con el propósito de determinar una dieta adecuada para el mantenimiento de la cepa del rotífero, se evaluó tres dietas, colocando 2500 rotíferos en recipientes de vidrio cilíndricos y fondo plano, a un volumen de 2000 ml (2,5 rotíferos/ml) bajo una temperatura de 23°C. Cada dieta fue probada por triplicado, en los siguientes tratamientos: T1 *Scenedesmus* sp (1 mg/1.000 rotíferos), T2 levadura seca *Saccharomyces cerevisiae* (1 mg/1.000 rotíferos), T3 la combinación de los dos tratamientos anteriores en iguales proporciones y en la misma cantidad.

Para determinar el volumen de microalga que se debe agregar diariamente, se determinó el peso seco del condensado de microalgas por mililitro ($33,6 \times 10^6$ cel.ml⁻¹). La levadura seca se pesó cada vez que se iba a alimentar, se centrifugó en licuadora a velocidad baja por tres minutos. Tendiente a relacionar el tamaño y forma de los rotíferos, adecuados para las larvas, al finalizar el experimento se procedió a medir los rotíferos y sus ornamentaciones y así determinar el efecto de las dietas sobre el tamaño o modificación de ornamentaciones.

Producción de Huevos de diapausa. Se realizó un experimento en el que se dispuso huevos míticos en diferentes condiciones de almacenamiento, para mantener la cepa de rotífero. Cada tratamiento con tres réplicas de 1.000 huevos en tubos de ensayo bajo las diferentes condiciones, así: T1 en seco, T2 en agua dulce a un volumen de 3 ml, T3 en seco y desinfectados previamente con 40 ppm de formol (5 min), T4 en agua a un volumen de 3 ml y desinfectados previamente con 40 ppm de formol (5 min). Para la obtención de los huevos se

organizó un cultivo de rotíferos en recipientes con volumen de 10 L, el cual fue sembrado a densidad de 5 rot.ml⁻¹, alimentados con *Scenedesmus* sp (1×10⁵ cel.ml⁻¹).

Se suministró aireación con piedra difusora, durante dos días; luego se suspendió la aireación y se cosechó el fondo del recipiente por sifoneo, para extraer los huevos de diapausa. Se procedió a enjuagarlos con agua dulce madura acondicionada, filtrando los huevos con una malla de nylon de 60 micrones; en este momento los huevos listos fueron almacenados.

Análisis estadístico. Los valores de crecimiento fueron expresados como promedio ±

desviación estándar. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, con tres réplicas por tratamiento. Todos los datos fueron procesados mediante el paquete estadístico Stat Graphics Centurion XVI (versión 16.1.18) aplicando un ANOVA a una vía, con $\alpha = 0,05$, previo el cumplimiento de los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia.

Se aplicó la prueba de Tukey para estimar diferencias significativas entre las medias de crecimiento poblacional. Los datos de porcentaje de eclosión de los huevos se analizaron mediante la aplicación de una prueba de Chi-cuadrado, con igual nivel de confiabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y características de la cepa

El proceso de aislamiento se extendió durante un mes, en el cual se identificó y aisló solamente la especie *Brachionus calyciflorus*. Las muestras no presentaron mucha diversidad de rotíferos (dos especies). La especie seleccionada se adaptó perfectamente a las condiciones de laboratorio. No obstante, la cepa alimentada con microalgas presentó grandes mortalidades cuando se exponía a la luz directa (2.000 lux), en donde se presentaban niveles de pH superiores a 9. Para lograr mantenerla viva se debió alejar de la luz hasta obtener bajos niveles lumínicos (<300 lux).

El *B. calyciflorus* aislado es una especie cosmopolita y, según Lavens y Sorgeloos [4], se encuentra dentro de las más utilizadas a nivel mundial para acuicultura. Más aún, en Colombia existen reportes de su identificación en varios cuerpos de agua dulceacuícolas; Jaramillo & Aguirre [5] reportan la presencia de este rotífero en la ciénaga de Ayapel (Córdoba); también Martínez & Monroy [6] lo reportan para el embalse de Betania (Huila). No obstante, en Colombia no hay reportes del aislamiento y evaluación de alguna cepa nativa con potencial como alimento vivo para acuicultura.

La cepa aislada presentó un tamaño de 171 a 278 μm de largo y 94 a 190 μm de ancho. Este

aspecto es importante, debido a que uno de los aspectos más importantes al seleccionar un alimento vivo para larvas de peces en los primeros estadios es el tamaño [7], especialmente el ancho del cuerpo del organismo vivo, que puede ser el parámetro más importante, fijando los límites de la disponibilidad como presa. Para especies neotropicales con tamaño de boca pequeños, los rotíferos podrían ser una opción viable, para iniciar la alimentación, como el caso de liseta *Leporinus muyscorum*, la cual tiene larvas con abertura bucal de 350 μm . En este sentido, la especie aislada muestra claramente un tamaño dentro de los límites aceptables como presa viva para estas especies con boca pequeña.

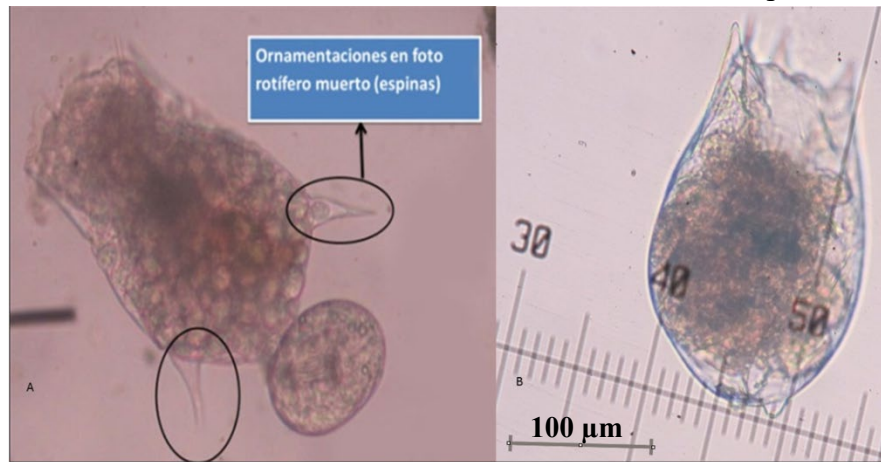
Por su parte, Atencio et al [8] establecieron la abertura bucal del *Prochilodus magdalenae* en 671±12,8 μm , siendo que en estas especies con larvas pequeñas, los rotíferos seguramente tienen el potencial para mejorar el crecimiento y supervivencia de las larvas. Ejemplo de ello es el estudio de Cardona y Grisales [9], quienes mejoraron la supervivencia del bocachico utilizando el rotífero *Phylodina* sp, alcanzando hasta un 93%.

En cuanto al efecto del pH sobre el uso de luz directa en los rotíferos, es posible que esté relacionado por un lado con la proporción de amonio no ionizado en pH altos, tal como lo expresan Park et al [10], el cual es incrementado

debido al aumento del pH. Además, el pH óptimo según algunos autores ^[4] ^[11] está entre 6 y 8, reflejando la importancia de alejar los rotíferos de agua dulce de la luz directa, teniendo en cuenta que ésta casi siempre tiene baja alcalinidad y, por consiguiente, baja estabilidad en este parámetro fisicoquímico importante.

Tal como asegura Zaret ^[12], el desarrollo de ornamentaciones en los rotíferos evidentemente

contra predadores. En las dietas de mantenimiento se observó que la mayoría de los rotíferos perdieron las espinas de la base del cuerpo del rotífero (a los lados del inicio del pie). Lo anterior podría implicar un beneficio como alimento, puesto que facilitaría la ingestión por las larvas de peces, dado que el estudio mostró que en condiciones de cultivo intensivo, las ornamentaciones tienden a perderse. En la Figura 1



están involucradas en mecanismos de defensa se presenta claramente esta situación.

Figura 1. Hembras de Rotíferos *B. calyciflorus*. A: ornamentaciones de rotífero recién aislado del medio natural. B: pérdida de ornamentaciones después de alimentación con diferentes dietas en laboratorio.

Pruebas de alimentación

Los rotíferos alimentados con diferentes dietas, mostraron diferencias significativas en el crecimiento. La dieta que mostró mayor crecimiento, después de siete días de cultivo, correspondió al tratamiento alimentado con *Scenedesmus* sp como única dieta ($p < 0,05$), incrementando la densidad hasta $108 \pm 21,2$ rot. ml^{-1} . No obstante, la dieta combinada mantuvo un crecimiento con diferencias no significativas con respecto a la monodieta de microalgas, durante los primeros cinco días de alimentación, pero disminuyó drásticamente su crecimiento hasta los seis días de experimento, cuyo cultivo presentó una densidad final de $41,7 \pm 11$ rot. ml^{-1} , momento en el cual la diferencia fue significativa ($p < 0,05$).

En el presente experimento, se observó la presencia de gran cantidad de protozoarios en

las dietas que contenían levadura, sin embargo, no se encontró protozoarios en la dieta de microalgas.

En la Figura 2 se presenta el comportamiento del crecimiento poblacional de las dietas experimentales.

En el presente estudio, para garantizar el mantenimiento de la cepa en el tiempo, mostró superioridad la microalga como única dieta, lo cual contrasta con lo establecido por algunos autores al cultivar rotíferos marinos ^[4] y dulceacuícolas ^[1]. Aunque en este estudio las densidades alcanzadas están por debajo a las reportadas por otros autores ^[10], el concepto de mantenimiento de cepa centra su atención en garantizar un stock de rotíferos en buenas condiciones en un periodo de tiempo, los cuales sirven para incrementar la producción como reemplazo de los cultivos que eventualmente fracasan, distinto al de cultivo masivo, puesto

que este pretende un incremento rápido de la densidad de cultivo.

Por otra parte, la levadura de pan ha sido utilizada como fuente de alimento para el cultivo de rotíferos, con buen éxito, pero frecuentemente estimula el deterioro de la

calidad del agua e incrementa el número de protozoarios, y produce deficiencia de algunos nutrientes, tales como la vitamina B12 [13]. Lo anterior implica afrontar retos en su uso como fuente de alimento para el mantenimiento de cepas.

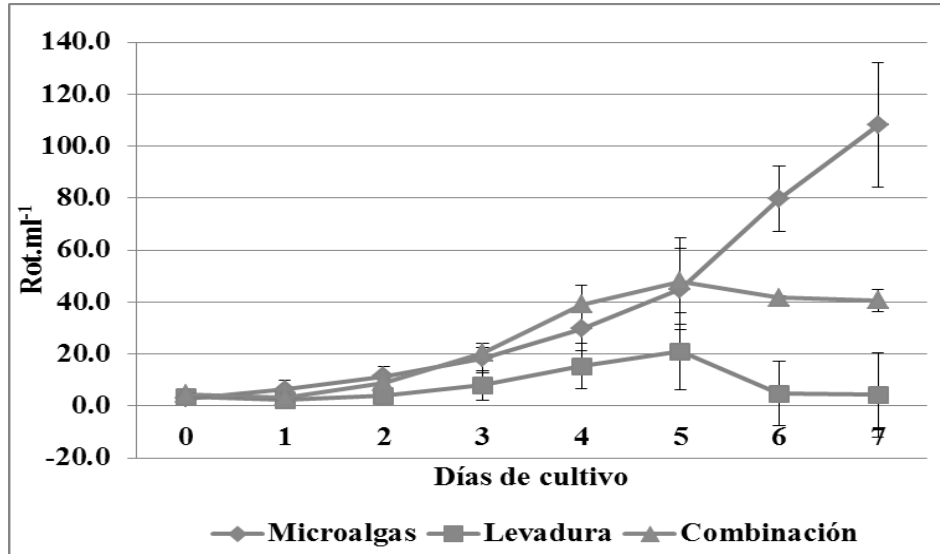


Figura 2. Crecimiento poblacional del rotífero *B. calyciflorus* con diferentes dietas de mantenimiento.

Almacenamiento de huevos de diapausa

Con referencia a los métodos de almacenamiento de los huevos de diapausa, la estrategia que presentó mayor porcentaje de eclosión fue el almacenamiento en seco, previo la desinfección con formalina, la cual generó un promedio

de $89,6 \pm 4,9\%$. El valor más bajo lo presentó el almacenamiento en húmedo sin tratamiento con formalina ($46 \pm 10,2\%$), con diferencias que resultaron significativas respecto a los otros ($p < 0,05$). en la Figura 3 Se presentan los resultados de eclosión de huevos para los cuatro tratamientos.

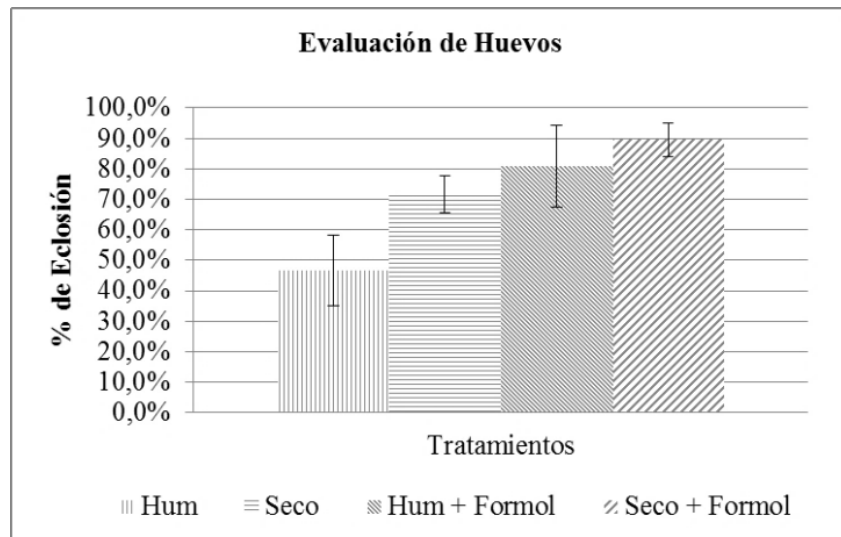


Figura 3. Porcentaje de eclosión de huevos de diapausa del rotífero *B. calyciflorus* bajo diferentes estrategias de almacenamiento.

Lubzens et al ^[1] describen algunos métodos utilizados para conservar rotíferos durante largos periodos de tiempo, los cuales establecen que la criopreservación de huevos amícticos viables; no obstante, no es un método práctico, puesto que requiere equipamiento especial para su aplicación; adicionalmente, el manejo de rotíferos a bajas temperatura no asegura un buen estado fisiológico de los rotíferos en el tiempo.

Varios autores consideran que el mejor método para conservar las cepas de rotíferos, hasta el momento, es el uso de los huevos de diapausa (cuando la especie los produzca) ^[1, 4]. Además, se ha encontrado que los tratamientos profilácticos previos al almacenamiento generan efectos positivos sobre la eclosión de los huevos de diapausa, tal como se encontró aquí.

Por su parte, Hagiwara et al ^[14] consideran que los huevos de diapausa producidos en cultivos masivos no superan el 50%; no obstante, en las condiciones de laboratorio trabajadas se logró observar que los porcentajes de eclosión pueden llegar a niveles superiores. A pesar de ello, en el presente estudio no se logró evaluar el efecto de las dietas sobre la eclosión de los huevos de diapausa, ya que, como se sabe, la dieta de las hembras de rotíferos es uno de los factores que mayor efecto tienen sobre la calidad de los huevos. Dado que se alimentó las hembras con microalgas, siendo una de las mejores dietas para estos organismos, esto pudo haber permitido generar los buenos resultados obtenidos. Por lo anterior, es importante considerar el tipo de dieta que se use para el mantenimiento de cepas, para generar los huevos.

CONCLUSIONES

El rotífero *Brachionus calyciflorus* se puede mantener en condiciones de laboratorio utilizando como fuente alimenticia la microalga *Scenedesmus* sp.

El control del pH es uno de los factores más importantes dentro del mantenimiento de cepa de rotíferos.

La dieta más adecuada para el mantenimiento de cepas de rotíferos *B. calyciflorus* consiste en una monodieta de microalgas.

Una cepa de rotíferos de esta especie se puede mantener fácilmente utilizando los huevos de diapausa almacenados en seco, previo un tratamiento profiláctico con formol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Lubzens E, Zmora O, Stottrup J, McEvoy L. Production and nutritional value of rotifers. Live feeds in marine aquaculture. 2003; 300-303.
- [2] Lim L, Dhert P, Sorgeloos P. Recent developments in the application of live feeds in the freshwater ornamental fish culture. Aquaculture. 2003; 227 (1): 319-331.
- [3] Lim L, Wong C. Use of the rotifer, *Brachionus calyciflorus* Pallas, in freshwater ornamental fish larviculture. Live Food in Aquaculture. 1997; 269-273.
- [4] Lavens P, Sorgeloos P. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Rome: Food and Agriculture Organization (FAO); Nr. 361. 1996.
- [5] Jaramillo-Londoño J, Aguirre-Ramírez N. Cambios espacio-temporales del plancton en la ciénaga de Ayapel (Córdoba-Colombia), durante la época de menor nivel del agua. Caldasia. 2012; 34 (1): 213-226.
- [6] Martínez Y, Monroy G. Composición taxonómica del zooplancton del embalse de Betania, departamento del Huila, Colombia. Acta Biológica Colombiana. 1999; 4 (1): 5-19.

Artículo de Investigación

- [7] Rippingale R, Payne M. Intensive cultivation of a calanoid copepod *Gladiferens imparipes* a guide to procedures. Pert [Australia]: Department of Environmental Biology, Curtin University of Technology; 2001. 60.b
- [8] Atencio V, Kerguelén E, Wadnipar L, Narváez A. Manejo de la primera alimentación del bocachico (*Prochilodus magdalenae*). Revista MVZ Córdoba. 2003; 8 (1): 254-260.
- [9] Cardona A, Grisales F. Producción artesanal del rotífero *Philodina* sp. y de algas para la alimentación de post-larvas de bocachico. Acta Agronómica. 2009; 58 (1): 53.
- [10] Park H, Woo K, Cho S, Kim H, Jung M, Kim H. High density culture of the freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus*. Rotifera IX. 2001; 369-374.
- [11] Yoshimura K, Iwata T, Tanaka K, Kitajima C, Ishizaki F. A high density cultivation of rotifer (*Brachionus rotundiformis*) in an acidified medium for reducing undissociated ammonia. Japan: Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 1995.
- [12] Zaret TM. Predation and freshwater communities. New Haven: Yale Univ. Press; 1980.
- [13] Hirayama K. A consideration of why mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* with baker's yeast is unstable. Hydrobiologia. 1987; 147: 269-270.
- [14] Hagiwara A, Balompapueng M, Munuswamy N, Hirayama K. Mass production and preservation of the resting eggs of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* and *B. rotundiformis*. Aquaculture. 1987; 155 (1): 223-230.