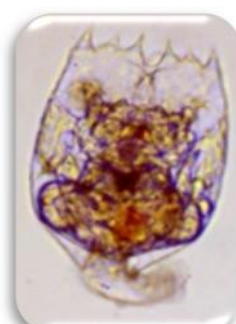
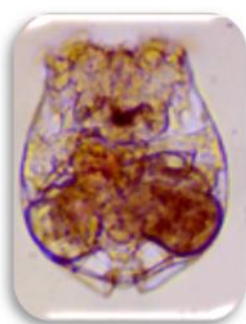
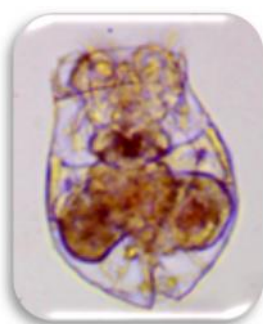




CULTIVO MASIVO DE ROTÍFEROS

Brachionus spp.

Mendoza M., Salazar M., Suárez C.A., Micolta V.



MinAgricultura
Ministerio de Agricultura
y Desarrollo Rural

100 AÑOS



COLCIENCIAS
Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación



Director Ejecutivo

Nicolás del Castillo

Directora Científica

Marcela Salazar

Director Sede Cartagena

Andrés Suárez

Director Sanidad

Luis Fernando Aranguren

Directora Diversificación

Mabel Mendoza

Personal de apoyo en el proyecto:

Oscar Álvarez
Erlis González
Alejandro Hernández
Yolima Martínez
Salvador Herrera

Resultado del proyecto de investigación titulado Aumento de la productividad en un cultivo masivo de alimento vivo como pilar de la larvicultura de especies marinas, código 6507-586-35739, con el apoyo financiero del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural a través del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS.

Todos los derechos reservados, prohibida la reproducción total o parcial, incluyendo cualquier medio electrónico o magnético, con fines comerciales. Esta publicación es de divulgación científica y para fines de investigación.

INTRODUCCIÓN

Aunque los rotíferos fueron primero identificados como una peste en los tanques de cultivos de anguilas en los años 50 y 60, los investigadores japoneses pronto se dieron cuenta que este rotífero podía ser utilizado como alimento vivo para los primeros estadíos de peces marinos. El uso exitoso de los rotíferos en las operaciones comerciales de larvicultura del besugo impulsó las investigaciones en el desarrollo de las técnicas de cultivo masivo de rotíferos. Sesenta años después de ser usados por primera vez se están aplicando técnicas de cultivo para la producción intensiva de rotíferos a nivel mundial. La disponibilidad de grandes cantidades de esta fuente de alimento vivo han contribuido a la producción exitosa en larvicultura de más de 60 especies de peces marinos y 18 especies de crustáceos.

La experiencia de CENIACUA en la acuicultura de peces marinos es reciente, sabemos que al igual que con el camarón la consolidación de un paquete acuícola requiere tiempo y cubre diversos campos del conocimiento biológico. Los rotíferos, integrantes del zooplancton, son los organismos que mejor se adaptan para el levante de especies de interés comercial por su pequeño tamaño (50 – 150 micras) ideal para los primeros estadíos de desarrollo, nado lento y la característica más importante por su capacidad de incorporar elementos nutricionales esenciales como son los grasos poli-insaturados que se agregan directamente al cultivo, los cuales promueven la sobrevivencia y calidad de las larvas de peces.

A continuación se presentan los materiales y procedimientos que permitieron optimizar la producción masiva de rotíferos en el laboratorio de CENIACUA, en términos de estabilidad del cultivo y tasa de fertilidad, bajo un esquema sencillo de trabajo con el fin de ser replicado por otros laboratorios que deseen incursionar en este campo.

ROTÍFEROS

Descripción Biológica

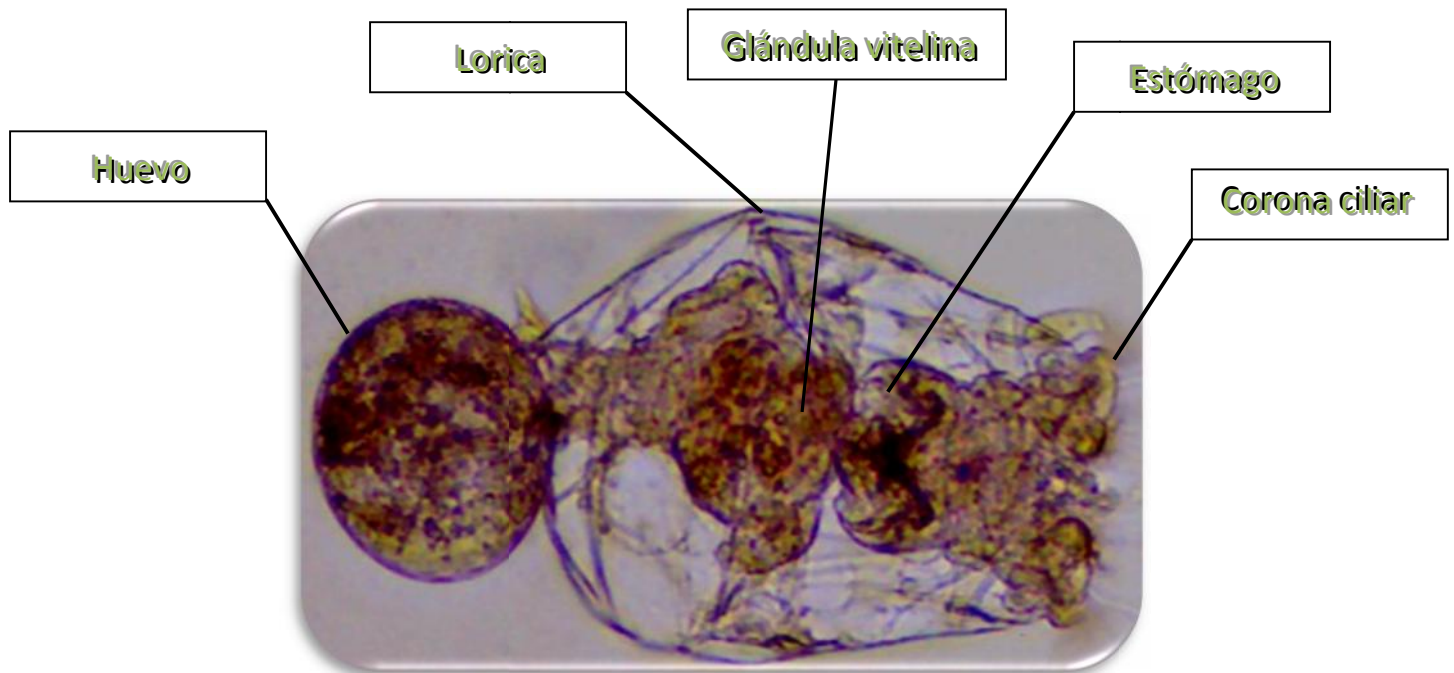


Fig.1. Morfología del rotífero *Brachionus* spp.

El nombre rotífero hace referencia a la corona de cilios en la parte anterior del cuerpo, la cual crea pequeñas corrientes que facilitan el transporte de alimento a la cavidad bucal. Es un organismo filtrador que no selecciona su alimento por lo que se considera polífago, y tiene una cápsula rígida denominada lorica. Además posee una característica particular que lo hace atractivo para la acuicultura, y es su alternancia de reproducción sexual y asexual, por lo que produce cistos o huevos latentes.

Uso de Rotíferos en Acuicultura

El éxito de los rotíferos como organismo de cultivo son múltiples, por su naturaleza planctónica, tolerancia a un amplio rango de condiciones ambientales particularmente salinidad y temperatura,

alta tasa de producción (0.7-1.4 desoves.hembra-1 día-1). Su pequeño tamaño y lenta velocidad de nado hacen de ellos una presa ideal para las larvas de los peces que apenas están reabsorbiendo su saco vitelino pero no pueden ingerir aún el nauplio más grande de *Artemia* (Civera et al., 2004). El mayor potencial de los rotíferos reside, sin embargo, en la posibilidad de llevar estos animales a altas densidades (1000 rotíferos.mL-1). Aún a altas densidades, los animales se reproducen rápidamente y pueden así contribuir con grandes cantidades de alimento vivo en corto tiempo. Por último pero no menos importante su naturaleza de filtradores les permite incluir en sus tejidos corporales nutrientes específicos esenciales para las larvas predatoras (bio encapsulación), con aquellos nutrientes esenciales para su buen desarrollo y crecimiento como son los ácidos grasos poli-insaturados DHA y EPA, los cuales se adicionan como alimento suplementario en enriquecimiento (Tuner y Rooker, 2005).

A 25 °C la duración de vida de los rotíferos ha sido estimada de 3.4 a 4.4 días. Generalmente las larvas llegan a ser adultas después de 0.5 a 1.5 días después de lo cual las hembras comienzan a producir huevos aproximadamente cada cuatro horas. Se cree que las hembras pueden producir diez generaciones de descendientes antes de morir. La actividad reproductiva de *Brachionus* depende de la temperatura del ambiente como se muestra en la tabla 1 (Lavens y Sorgeloos, 1996).

Tabla 1. Efecto de la temperatura en la actividad reproductiva de *Brachionus plicatilis*

Temperatura °C	15°C	20°C	25°C
Tiempo de desarrollo embrionario (días)	1.3	1	0.6
Tiempo para que las hembras jóvenes desoven por primera vez (días)	3	1.9	1.3
Intervalo entre dos desoves (horas)	7	5.3	4
Tiempo de vida (días)	15	10	7
Número de huevos puestos por una hembra durante su vida	23	23	20

A nivel mundial se calcula que el costo de producción de rotíferos depende de la escala total de producción, con un costo estimado de US\$0.04 por millón de rotíferos en un sistema que produce 4 mil millones por día, y de US\$0.15 en un sistema de producción de mil millones por día (Lubzens y Zmora, 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

Inicio de un cultivo de rotíferos

Cepas de Poblaciones Naturales

Para iniciar un cultivo de rotíferos se puede partir de poblaciones naturales que crecen particularmente en aguas con altos contenidos de materia orgánica como lagunas o ciénagas. Este método requiere bombeo de hasta 500 litros de agua con motobombas, filtrando a través de mallas de 55 micras y concentrándolas en galones. Inmediatamente se pasa al laboratorio, donde se homogeneizan las muestras de agua y se toman alícuotas para observar e identificar los rotíferos con el microscopio. Se deben escoger aquellos individuos que muestren nado libre porque algunas especies de rotíferos se fijan por el pedúnculo al sustrato, organismos sésiles. Una vez se identifican los individuos se separan usando pipetas y capilares y se transfieren a tubos de ensayo (160 mm) con algas como *Chaetoceros* o *Nannochloropsis* a una densidad de 1 rot/mL. Los tubos se monitorean a diario para observar la fertilidad y desarrollo de los rotíferos, de forma que cuando se alcanza una densidad de 10 rot/mL, se traspasan a un volumen mayor (eg. 125 mL) con algas nuevas hasta llegar a 30 rot/mL, y así sucesivamente hasta pasarlos a volúmenes de 200 L hasta una densidad de 150 rot/mL hasta llegar a producción masiva de 900 L.

Cepas comerciales

Las cepas comerciales son huevos resistentes (cistos) que se obtienen bajo condiciones controladas en laboratorio. Se pueden obtener cepas para agua salada o dulce, y aún especies de tamaños específicos denominados S (small) o L (large) por sus siglas en inglés, en referencia a pequeños y grandes respectivamente.

Los huevos llegan en un frasco de vidrio cerrado con un tapón (Fig. 2) y deben ser almacenados en un sitio fresco y seco hasta su uso.



Fig. 2. Presentación cepa comercial

Para iniciar el cultivo se debe tener agua de mar estéril por autoclave con una salinidad de 15 UPS, pero con unos diez días de preparación. Se toma con una jeringa 2 mL de esta agua y se utilizan para hidratar los huevos en el frasco, vaciando el contenido en una caja de petri que contiene la misma agua estéril a razón de 20 mL de volumen con iluminación continua (500 – 2000 lux) y una temperatura aproximada de 25°C. Se asume que de 1 a 3 días comienza la eclosión y se debe monitorear el momento en que ocurra, para agregar microalgas preferiblemente *Nannochloropsis sp.*, procurando que la coloración sea verde clara. Pasadas 72 horas post eclosión se alimenta de nuevo y a las 96 horas post eclosión se transfiere a un frasco de 2 litros con la misma agua estéril y con microalgas, y en la medida que la población va creciendo se aumenta la cantidad y la tasa de alimentación, y se va escalando el cultivo como se indicó anteriormente.

Requerimientos y preparación de tanques

Se debe contar con un área exclusiva para el manejo de rotíferos evitando el traslado de elementos con otras áreas además de contar con utensilios de limpieza de uso exclusivo para esta zona.

A continuación se enumeran los principales elementos que se requieren:

- Tanques cilíndrico cónicos de 1000 litros en fibra de vidrio con válvula inferior de 1 pulgada.
- Suministro de aire tanque (anillo de manguera porosa conectado a la derivación del tanque)
- Cosechador con malla de 55 micras
- Tanque plástico para el lavado y concentración de rotíferos
- Cartuchos 10"
- Filtros de 1 micra
- Cloro
- Vitamina C

Antes de iniciar un nuevo cultivo de rotíferos, a los tanques se les realiza limpieza con agua filtrada, jabón y cepillo, después se enjuaga con agua dulce, abriendo y cerrando la válvula inferior. Adicionalmente y dado que algunas bacterias tienden a formar biofilms, es recomendable lavar las paredes de los tanques con una concentración de cloro de 20 ppm y a continuación se enjuaga con vitamina C y agua filtrada. Para verificar que no quedan rastros de cloro se recomienda la prueba de ortotoluidina, producto que en medio clorhídrico y en presencia de cloro libre se oxida, dando un compuesto de coloración amarilla. La prueba consiste en utilizar tubos de ensayo donde se colocan 10 ml del agua a analizar y 0,2 ml del reactivo dejando en reposo 5 o 10 minutos, en oscuridad. Si se observa viraje a color amarillo, es necesario neutralizar con tiosulfato de sodio, y se aplica de nuevo la prueba hasta obtener una muestra incolora.

Se le coloca al tanque la aireación, que consiste en un anillo de manguera porosa que abraza un tubo de PVC de $\frac{3}{4}$ " en el fondo del tanque con una ranura de $\frac{1}{4}$ ", y que porta un terminal en T al

que se le conecta la manguera de aireación, de esta forma se logra una aireación uniforme en el tanque (Fig.3).

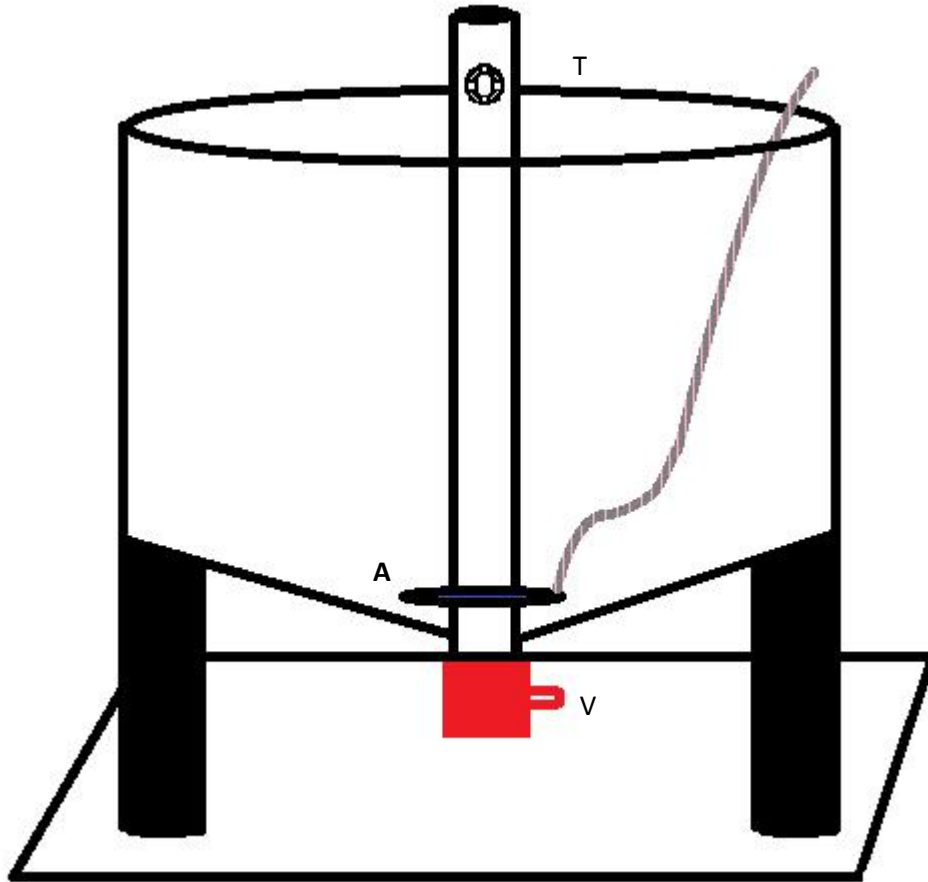


Fig.3. Esquema del montaje del sistema de aireación en el tanque de cultivo de rotíferos. T= Tubo central de PVC, A = Anillo de aireación, V= válvula inferior de desagüe

Manejo de poblaciones, conteo y estimación de densidad

Los elementos que requiere esta actividad son:

- Microscopio binocular
- Cámara de conteo Sedgwick Rafter
- Pipeta 1 mL
- Lugol
- Contador de organismos

Para estimar la densidad de la población se toma 1 mL de muestra con la pipeta y se sirve sobre la placa de Sedgwick Rafter, la cual consiste de una lámina con una cuadrícula de 50 filas por 20 columnas. Se fija el objetivo del microscopio en 10x o 20x y se realiza una observación general de los organismos registrando motilidad, presencia de alimento o algas, y de ciliados en el formato establecido (Tabla 2). Con una pipeta se le agrega a la placa una gota de lugol, se homogeniza y una vez cesa la actividad de los organismos, se procede a hacer el conteo de toda la placa leyendo la totalidad de los campos (Fig.4), registrando el número total de rotíferos y simultáneamente el de aquellos que presentan huevos con un contador digital, es recomendable tomar entre 2 a 3 alícuotas en diferentes puntos del tanque y promediar las lecturas expresándolas como total de rotíferos/mL.



Fig.4. Lectura para el conteo de rotíferos en la cámara de Sedgwick Rafter

La información se tabula en una tabla de registro como la que se indica a continuación:

Tabla 2. Encabezado formato de registro para cada tanque de cultivo de rotíferos

MES/AÑO: _____ TANQUE : _____ VOL.(L): _____

Fecha	Día de Cultivo	Rot/ml	Rot con huevo	% Fert.	Total Rot ($\times 10^6$)	Factor Alimenticio	Alimento total (g)	Protein Plus	Emulsión de Scott	O.D. (mg/L)	Temp. (°C)	Sal (ppt)	% Recambio	Motilidad	Ciliados	LAVADO	
																SI	No
1																	
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9																	

De la información se procede a calcular el porcentaje de fertilidad, el total de organismos y la cantidad de alimento a suministrar como se indica en las siguientes ecuaciones.

$$\% \text{ Fertilidad} = \left(\frac{\text{Total Rotíferos con Huevo}}{\text{Total Rotíferos}} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\text{Total Rotíferos} = \text{Total Rotíferos} * \text{Vol Tanque (Litros)} * 10^{-3} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$\text{Alimento total (g)} = \text{Total Rotíferos} * 10^6 * (0.3) \quad (\text{Ec. 3})$$

Mantenimiento diario del cultivo

A diario se debe recambiar el 70% del volumen del tanque con algas, para este fin existen dos modelos de recambio que permiten bajar suavemente el nivel en los tanques de cultivo masivo de 900 L (Ver Anexos sobre el diseño); estos dispositivos cuentan con un área de filtración amplia, Al recambiador lateral (Fig.5) se le introduce una manguera flexible de $\frac{1}{4}$ " , mientras que el recambiador central (Fig.6) cuenta con un tubo interno con un orificio de $\frac{1}{4}$ " en la porción inferior, para que el recambio se realice de forma paulatina pero constante, a una razón de 100 L en 8 minutos hasta llegar a 200 L de volumen en el cultivo. Con esta velocidad de descenso no se forma aglutinamiento de rotíferos en la malla ya que se mantiene la aireación del anillo central evitando así la pérdida de huevos por fricción o manipulación.

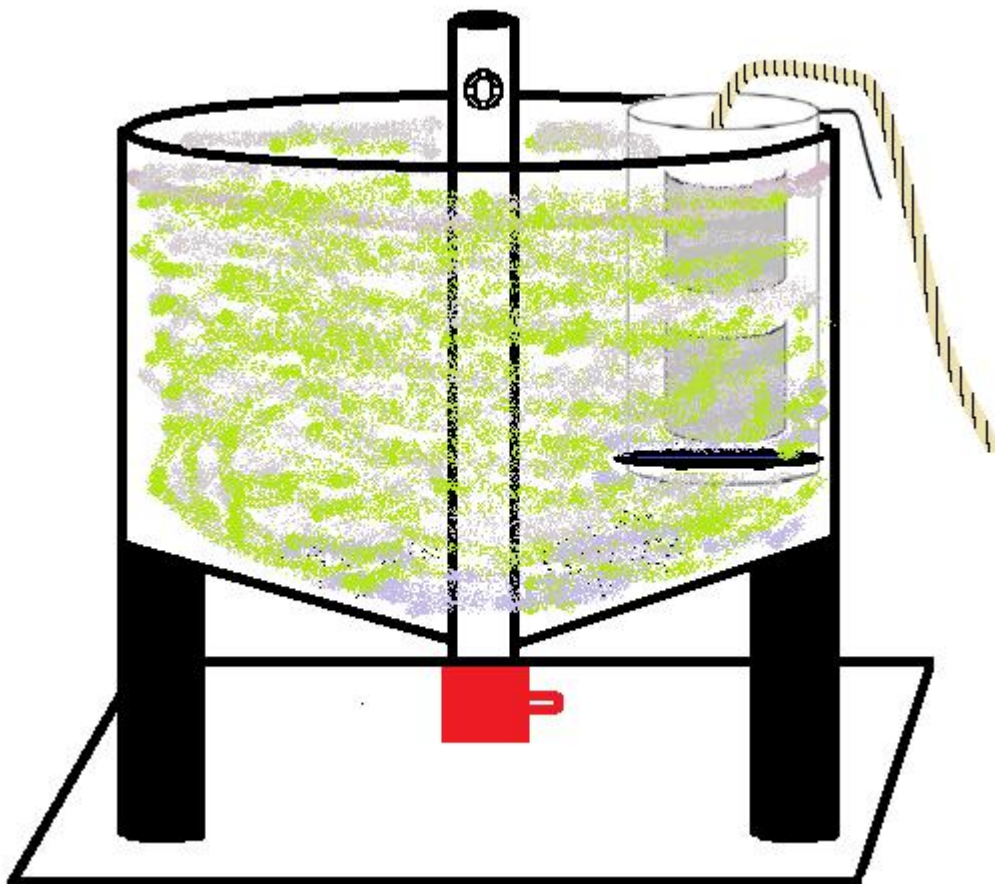


Fig.5. Esquema del montaje del recambiador lateral en el tanque de cultivo

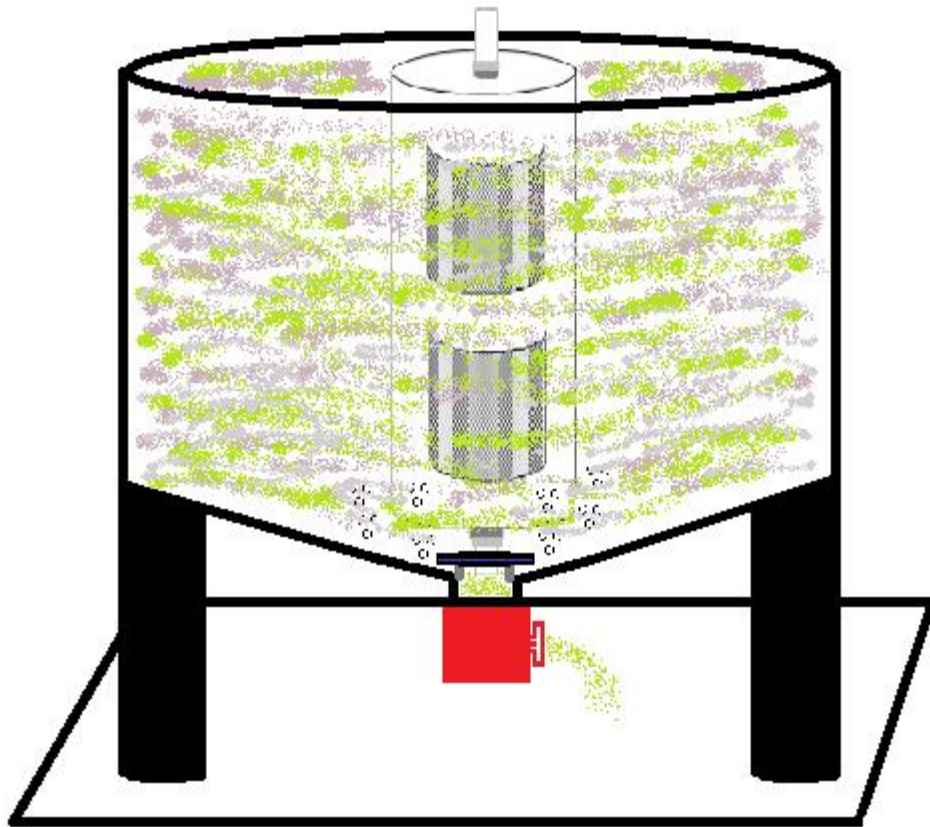


Fig.6. Esquema del montaje del recambiador central en el tanque de cultivo

En la medida que desciende el nivel del tanque se enjuagan suavemente las paredes del mismo para evitar que queden organismos adheridos y antes de proceder al suministro de algas, se limpian con una espuma las paredes del tanque para eliminar la acumulación de residuos sólidos.

Lavado del cultivo de rotíferos

A continuación se enumeran los principales elementos que se requieren:

- Tanques 1000 litros en fibra de vidrio con válvula inferior de 1 pulgada.
- Suministro de aire tanque (anillo de manguera porosa conectado a la derivación de aire)
- Cosechador con malla de 55 micras

El porcentaje de fertilidad es un indicador útil del estado general del cultivo, y se considera que cuando este se encuentra por debajo del 15% se hace necesario revisar si obedece a 1) un aumento de amonio por sobrealimentación o falta de sifón, 2) contaminación de ciliados que compiten por alimento con los rotíferos o, 3) presencia del género *Vorticella* que se adhiere a los huevos.

En cualquier situación, lo recomendable es realizar el lavado de todo el cultivo, para esto se suspende la aireación en el tanque de rotíferos y se da vuelta al tubo central ubicando la ranura de $\frac{1}{4}$ " en la parte inferior y se espera por espacio de 45 minutos hasta que se observa la agrupación de los rotíferos en el extremo superior de la columna de agua, y los residuos alimenticios se depositan en el fondo del tanque.

Aparte se llena con un agua de mar filtrada el cosechador, el cual consiste en un tanque rectangular en fibra de vidrio, que en el primer tercio cuenta con un marco en madera inclinado con un ángulo de 50° que porta una malla de 55 micras; en la parte inferior del marco se ubica un tubo difusor conectado al sistema de aireación para evitar la colmatación de la malla, además en la parte posterior del tanque se ubica un tubo de PVC de $\frac{3}{4}$ " que se remueve para controlar el nivel.

Por gravedad a través de una manguera se hace descender el volumen del tanque conectado a la válvula inferior y se limpian suavemente con agua filtrada las paredes del tanque en la medida que va descendiendo. En el cosechador fluye continuamente el agua de mar filtrada de forma que van quedando los rotíferos concentrados y por la malla se desechan las algas y los ciliados (Fig.7).

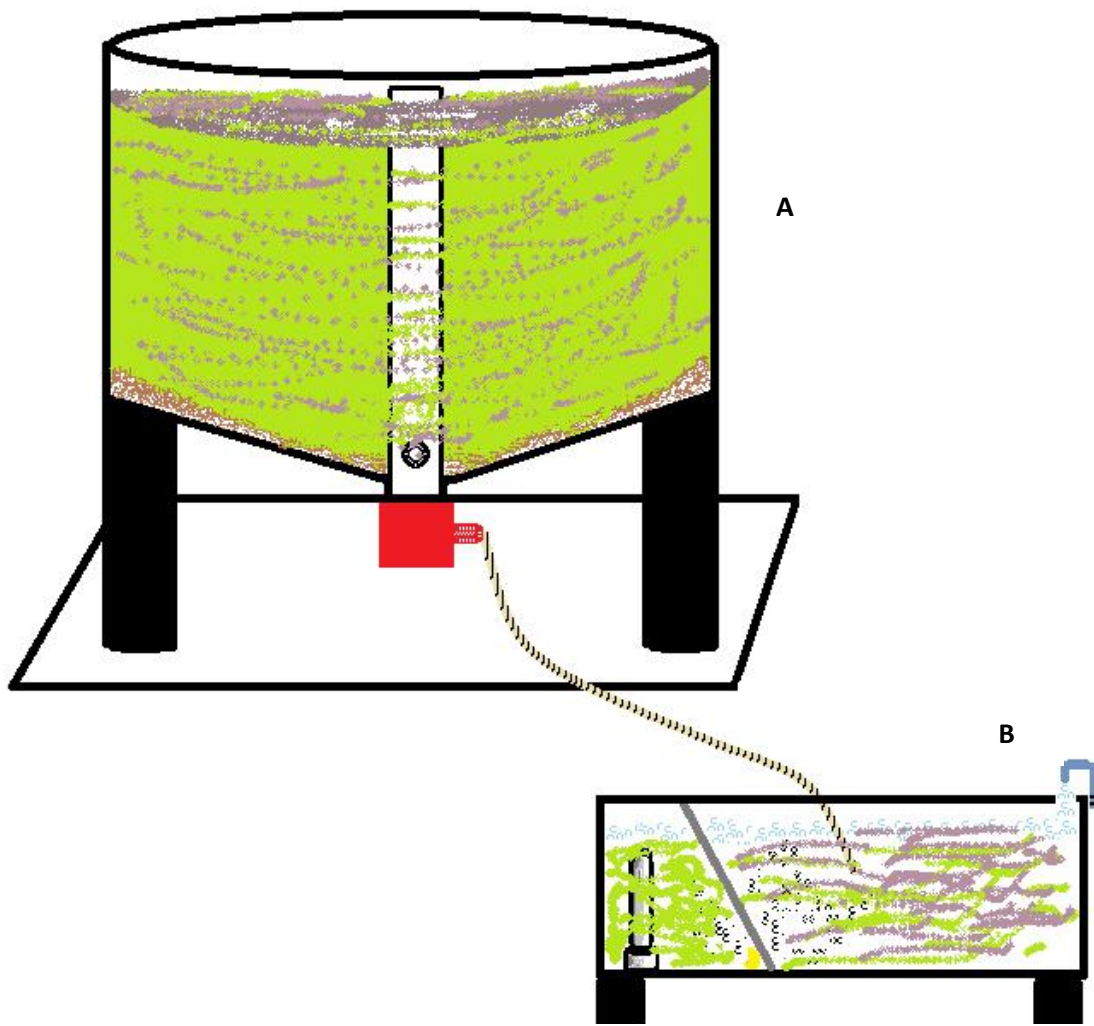
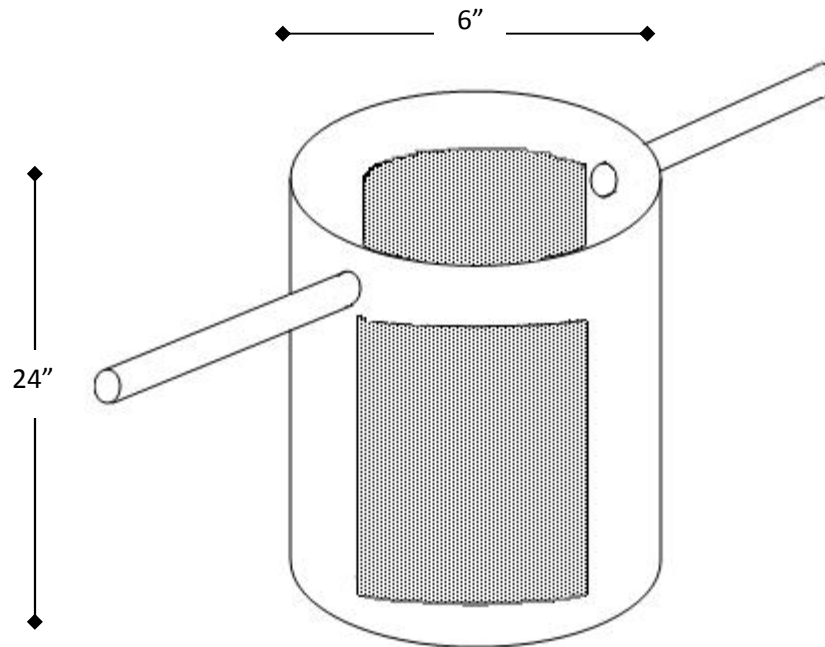


Fig.7. Esquema de lavado del cultivo de rotíferos. A= Tanque de cultivo masivo de rotíferos, B = Cosechador

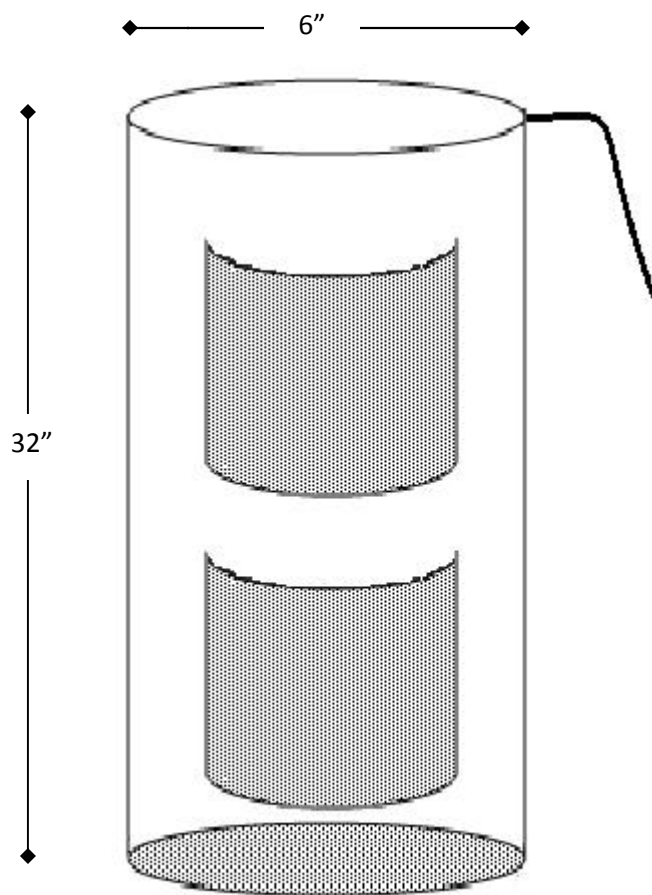
Para el tratamiento de la *Vorticella* se recomienda concentrar los rotíferos después del lavado en un cosechador redondo con dos mallas de 55 micras en los costados (Figura 7) y sumergirlo durante 10 segundos en un balde con agua dulce, de esta forma se provoca un choque osmótico que afecta a este protozoo desprendiéndose de los huevos y son removidos sin generar un efecto adverso sobre los rotíferos.

Anexos

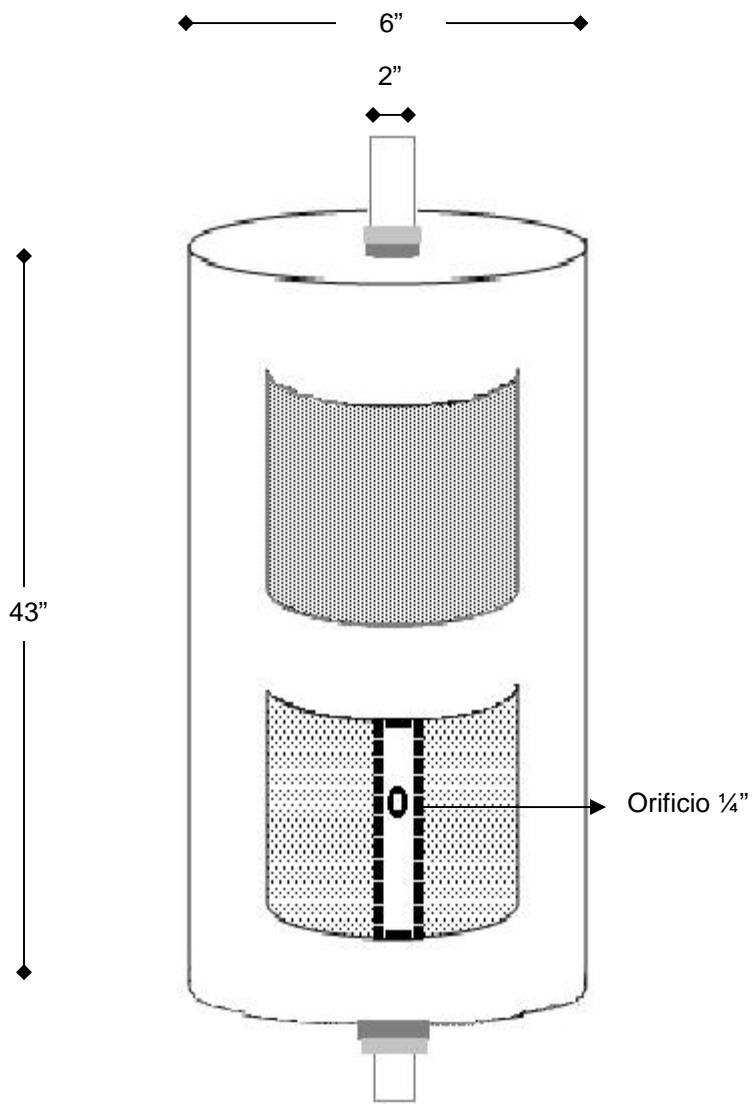
En los diagramas adjuntos se dan las medidas de los principales elementos utilizados en el cultivo masivo de rotíferos para ser construidos por aquellos interesados en incursionar en el cultivo masivo de *Brachionus plicatilis*.



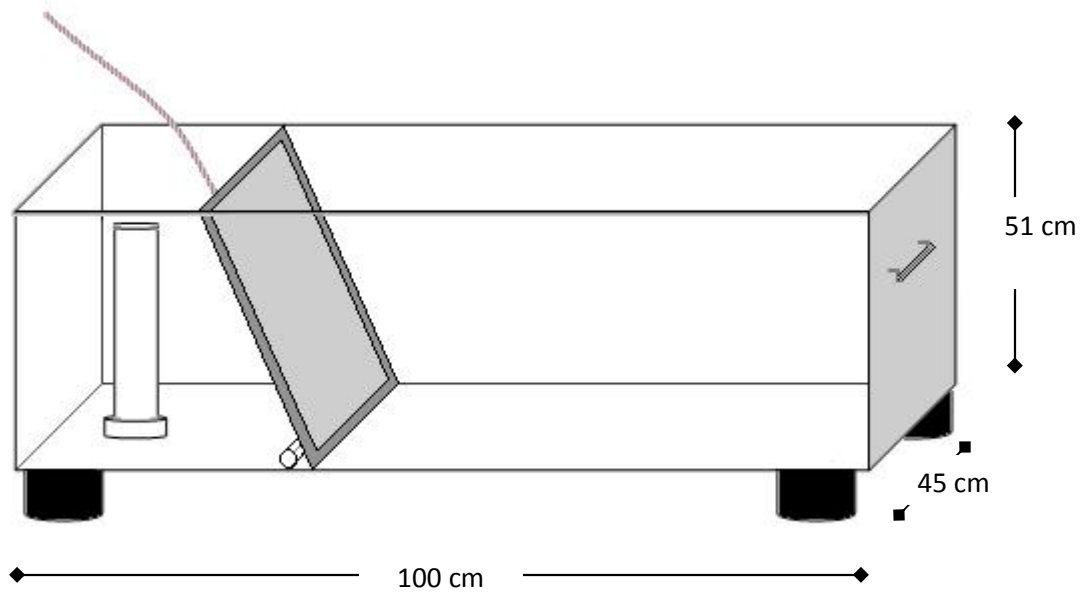
Anexo 1. Cosechador redondo en fibra de vidrio para el tratamiento de *Vorticella sp.*



Anexo 2. Recambiador en PVC para uso lateral



Anexo 3. Recambiador en PVC para usar en el drenaje central.



Anexo 4. Cosechador rectangular

BIBLIOGRAFÍA

Civera R, Álvarez CA, Moyano FJ. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. En Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium de Nutrición Acuícola. 2004. México.

Lavens P, Sorgeloos P. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Artemia Reference Center. 1996. FAO. Bélgica. 375 p.

Lubzens E, Zmora O. Production and Nutritional value of rotifers. En Live feeds in marine aquaculture. 2003. Støttrup JG, McEvoy LA (Ed); p. 17 – 64.

Turner JP, Rooker JR. Effect of dietary fatty acids on the body tissues of larval and juvenile cobia and their prey. In Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2005. No. 322; p 13 – 27.