

**EFFECTO NUTRICIONAL DE TRES MICROALGAS Y UNA  
CIANOBACTERIA EN EL CULTIVO DEL ROTÍFERO  
*Brachionus plicatilis* MÜLLER: 1786**

**NUTRITIONAL EFFECT OF THREE MICROALGAE AND ONE  
CYANOBACTERIA ON THE CULTURE OF THE ROTIFER  
*Brachionus plicatilis* MÜLLER: 1786**

R.A. Rueda-Jasso

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN  
Apartado postal 592  
La Paz, Baja California Sur 23080  
México  
E-mail: rrueda@vmredipn.ipn.mx

Recibido en abril de 1995; aceptado en mayo de 1996

**RESUMEN**

Se probaron tres microalgas y una cianobacteria deshidratada como alimento para el cultivo de una cepa del rotífero *Brachionus plicatilis* tipo L, de origen local. Se cuantificó la densidad de rotíferos, la fecundidad y las determinaciones bioquímicas (carbohidratos, proteínas y lípidos totales) de los rotíferos alimentados con la mejor concentración de cada microalga. *Nannochloris* sp., en una densidad de  $25 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, produce las mayores densidades y fecundidades de rotíferos, seguido por *Nannochloropsis* sp. con  $25 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, *Chlorella* sp. con  $35 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup> y, finalmente, *Spirulina* sp. deshidratada, que en concentraciones de 0.67 y 0.9 g en 1.5 l alcanza altos valores de fecundidad y densidad, respectivamente. Con base en las determinaciones bioquímicas, el mejor alimento fue *Chlorella* sp., seguido por *Nannochloropsis* sp., *Nannochloris* sp. y finalmente por *Spirulina* sp. deshidratada. Se concluye que *Nannochloropsis* sp. y *Nannochloris* sp., a ración de  $25 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, son alimentos adecuados para el cultivo del rotífero *B. plicatilis*.

*Palabras clave:* rotífero, *Brachionus plicatilis*, microalga, cultivos, bioensayo.

**ABSTRACT**

Three microalgae and one dehydrated cyanobacteria were tested to determine the best concentration and the best food for the culture of a local strain of the rotifer *Brachionus plicatilis* type L. The observations were: density of rotifers, fecundity and biochemical analyses (carbohydrates, proteins and total lipids). Of the food tested, *Nannochloris* sp., with a density of  $25 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>, produced the best yields and fecundities in the rotifer culture, followed by *Nannochloropsis* sp. at  $25 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>, *Chlorella* sp. at  $35 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup> and, finally, dried *Spirulina* sp. with densities of 0.67 and 0.9 g per 1.5-l volume (fecundity and density, respectively). According to the biochemical analyses, the best food was *Chlorella* sp., followed by *Nannochloropsis* sp., *Nannochloris* sp. and dried *Spirulina* sp. It is concluded that *Nannochloropsis* sp. and *Nannochloris* sp., at a concentration of  $25 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>, are suitable feeds for the culture of *B. plicatilis*.

*Key words:* rotifer, *Brachionus plicatilis*, microalga, cultures, bioassay.

## INTRODUCCIÓN

Las investigaciones en el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* han evolucionado en diferentes etapas, a partir de sus inicios en los años sesentas con los trabajos de Ito. En la primera etapa, se han realizado estudios tendientes a conocer las condiciones óptimas para el cultivo de rotíferos (tipo de alimento, salinidad, temperatura, densidad de organismos, entre otros) (Lubzens, 1987; Hirayama y Maruyama, 1993; Oie *et al.*, 1994; Yoshimura *et al.*, 1994) y en la segunda, la realización de los cultivos masivos. La tercera abarcaría las investigaciones de punta (obtención de quistes y probióticos, entre otros) (Hagiwara, 1992; Minkoff *et al.*, 1992; Skjeremo y Vadstein, 1993).

La aplicación de los conocimientos generados en las tres etapas ha permitido que el cultivo de rotíferos sustente exitosamente el cultivo de larvas de crustáceos y peces, logrando cubrir las demandas tanto en la calidad nutricional como en la cantidad, especialmente de la primera alimentación de peces, etapa en la cual se presentan altas mortalidades si no se cuenta con el alimento adecuado.

En este trabajo, se alimentó a una cepa del rotífero *B. plicatilis* tipo L, de origen local, con diferentes concentraciones de tres microalgas, *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis* sp. y *Chlorella* sp., y un alimento inerte, *Spirulina* sp. deshidratada. A los rotíferos alimentados con la mejor concentración de cada microalga se le realizaron determinaciones bioquímicas, con el fin de conocer la calidad nutricional y, consecuentemente, el mejor alimento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la cepa del rotífero *Brachionus plicatilis* tipo L, de origen local (Ramírez-Sevilla *et al.*, 1991). Los bioensayos se realizaron en recipientes cilíndricos de 2 l de capacidad en volúmenes de 1.5 l. Se utilizó agua de mar (33 a 36‰ S), filtrada por 20 µm. La aireación fue continua y de fondo. La iluminación se proporcionó con lámparas fluorescentes de luz de día de 55 W. La temperatura osciló entre 24 ± 2°C. Las microalgas *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis* sp. y

## INTRODUCTION

Research on the culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* has evolved in stages, beginning in the 1960s with the works of Ito. In the first stage, studies have been conducted to determine the optimum conditions for the culture of rotifers (type of food, salinity, temperature, density of organisms, among others) (Lubzens, 1987; Hirayama and Maruyama, 1993; Oie *et al.*, 1994; Yoshimura *et al.*, 1994) and in the second, massive cultures have been carried out. The third stage encompasses the most recent research (obtaining cysts and probiotics, among others) (Hagiwara, 1992; Minkoff *et al.*, 1992; Skjeremo and Vadstein, 1993).

The knowledge acquired from these three stages has resulted in rotifer cultures that effectively sustain the culture of crustacean and fish larvae. The demands of nutritional quality as well as quantity have been met, especially in the first feeding stage of the fish, but high mortality occurs if the appropriate feed is not supplied.

In this study, a local stock of the rotifer *B. plicatilis* type L was fed different concentrations of three microalgae, *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis* sp. and *Chlorella* sp., and one inert food, dried *Spirulina* sp. Biochemical determinations were conducted on the rotifers fed the best concentration of each microalga, in order to determine the nutritional quality and, hence, the best feed.

## MATERIALS AND METHODS

A local stock of the rotifer *Brachionus plicatilis* type L was used (Ramírez-Sevilla *et al.*, 1991). The bioassays were conducted in 2-l cylindrical cones in volumes of 1.5 l. Sea water (33 to 36‰ S), filtered through 20 µm, was used. Aeration was continuous and from the bottom. Lighting was supplied from 55-W fluorescent lamps. Temperature varied between 24 ± 2°C. The microalgae *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis* sp. and *Chlorella* sp. were provided by the Laboratory of Experimental Biology at CICIMAR-IPN and the dried *Spirulina* sp. was produced by Sosa Texcoco,

*Chlorella* sp. fueron abastecidas por el Laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR-IPN y *Spirulina* sp. deshidratada fue producida por Sosa Texcoco, México. Los cultivos de microalgas se realizaron con agua de mar filtrada por 0.5  $\mu\text{m}$ , esterilizada en autoclave (volúmenes de 2 l) y por UV (volúmenes de 14, 50, 100 y 150 l), enriquecida con el medio Marino 1 (González-Acosta y Ramírez-Sevilla, 1987). La iluminación, aireación y salinidad fueron las mismas que en el cultivo de rotíferos.

Las concentraciones de las microalgas *Nannochloris* sp. y *Nannochloropsis* sp. se eligieron con base en las experiencias de su manejo en el laboratorio; éstas fueron 10, 15, 20, 25, 30 y  $35 \times 10^6$  cel. $\text{ml}^{-1}$  y 15, 20, 25, 30 y  $35 \times 10^6$  cel. $\text{ml}^{-1}$ , respectivamente. Para la elección de las concentraciones de *Chlorella* sp., se consideraron los datos reportados por Rezeq y James (1987), siendo 20, 25, 30, 35 y  $40 \times 10^6$  cel. $\text{ml}^{-1}$ , y en el caso de *Spirulina* sp. deshidratada, las concentraciones se obtuvieron con base en las recomendaciones de Person-Le Ruyet (1975), adaptadas a nuestro volumen de cultivo, utilizándose 0.225, 0.450, 0.675, 0.900, 1.125 y 1.350 g en 1.5 l de agua de mar.

Los bioensayos se iniciaron con inóculos de 80 rotíferos por mililitro, con una fecundidad superior a 1.0 (para garantizar el estado saludable de la cepa).

Cada 24 h los cultivos se tamizaron, se resuspendieron y se aforaron a 500 ml de agua de mar filtrada. Para determinar los índices de densidad de rotíferos y fecundidad promedio, se utilizaron los procedimientos descritos por Ramírez-Sevilla *et al.* (1991). Los bioensayos se realizaron por duplicado y tuvieron una duración de 16 días, teniendo en cuenta que es el tiempo máximo que las larvas de peces marinos requieren en forma constante a los rotíferos como alimento (Hirayama, 1985).

Con la mejor concentración de cada alimento se realizó un nuevo bioensayo, en el cual se probaron de manera simultánea todos los alimentos. Este experimento tuvo una duración de 16 días y se realizó por triplicado, siguiéndose la metodología anteriormente descrita, con la variante de que de cada volumen de

México. The cultures of microalgae were conducted with 0.5  $\mu\text{m}$  filtered sea water, sterilized in an autoclave (2-l volumes) and by UV (14-, 50-, 100- and 150-l volumes), enriched with Marino 1 medium (González-Acosta and Ramírez-Sevilla, 1987). The same lighting, aeration and salinity were used as in the rotifer cultures.

The concentrations of the microalgae *Nannochloris* sp. and *Nannochloropsis* sp. were selected based on their performance in the laboratory; these were 10, 15, 20, 25, 30 and  $35 \times 10^6$  cells. $\text{ml}^{-1}$  and 15, 20, 25, 30 and  $35 \times 10^6$  cells. $\text{ml}^{-1}$ , respectively. The data of Rezeq and James (1987) were considered for the concentrations of *Chlorella* sp.; these were 20, 25, 30, 35 and  $40 \times 10^6$  cells. $\text{ml}^{-1}$ . The concentrations of dried *Spirulina* sp. were obtained from the recommendations of Person-Le Ruyet (1975) and adapted to our culture volume; these were 0.225, 0.450, 0.675, 0.900, 1.125 and 1.350 g in 1.5 l of sea water.

The bioassays started with inoculations of 80 rotifers per milliliter, with a fecundity greater than 1.0 (to guarantee the healthy state of the stock).

Every 24 h the cultures were sieved and resuspended in 500 ml of filtered sea water. The procedures described by Ramírez-Sevilla *et al.* (1991) were used to determine the indexes of density of rotifers and average fecundity. The bioassays were conducted in duplicate for 16 days, which is the maximum time that marine fish larvae require a constant supply of rotifers as food (Hirayama, 1985).

Using the best concentration of each feed, a new bioassay was carried out, in which all the feeds were tested simultaneously. This experiment lasted 16 days and was conducted in triplicate, following the method previously described, except that 100 ml were taken from each volume of resuspension and used for the biochemical determinations. The rotifers present in these volumes were sieved and rinsed with a solution of 0.8 mM of NaCl (Gatesoupe and Robin, 1981) and were concentrated in the lowest volume of water possible (1.5 and 2 ml).

The Antrona method (Dreywood, 1946) was used to determine carbohydrates, after acid hydrolysis using HCl 2N. The proteins were

resuspensión se tomaron 100 ml, los cuales se utilizaron para realizar las determinaciones bioquímicas. Los rotíferos presentes en estos volúmenes se tamizaron y se enjuagaron con una solución de 0.8 mM de NaCl (Gatesoupe y Robin, 1981) y se concentraron en el menor volumen posible de agua (1.5 y 2 ml).

Para la determinación de los carbohidratos, se aplicó el método de Antrona (Dreywood, 1946) previa hidrólisis ácida con HCl 2N. Las determinaciones de proteínas se realizaron mediante la técnica de Lowry *et al.* (1951) y, en el caso de los lípidos, se aplicó la técnica de Bligh y Dyer (1959). Las fases lipídicas se deshidrataron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Las fracciones obtenidas se concentraron a sequedad en el rotovapor a 55°C de temperatura; posteriormente se recuperaron, secaron con N<sub>2</sub> gaseoso y se pesaron en la balanza analítica.

Para el análisis estadístico se utilizaron las pruebas de Friedman, de Wilcoxon y de comparaciones múltiples entre grupos, descritas por Siegel y Castellan (1988), así como el análisis de variancia de dos vías con repeticiones (Sokal y Rohlf, 1982).

## RESULTADOS

La prueba de Friedman de dos vías ( $P < 0.05$ ) mostró diferencias significativas entre las densidades de rotíferos y las fecundidades de al menos una de las concentraciones en los diferentes tratamientos, excepto para el caso de los rotíferos tratados con *Chlorella* sp.

En todos los tratamientos se observó que conforme se incrementó la concentración, la producción de rotíferos aumentó, alcanzando un máximo en las raciones intermedias y tendiendo a decrecer hacia las concentraciones más altas. El caso menos evidente fue el de *Chlorella* sp. y el más marcado fue el de los rotíferos tratados con *Spirulina* sp. (figs. 1, 2, 3, 4A-F).

La fecundidad de los rotíferos alimentados con *Nannochloris* sp. en la concentración  $25 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup> tuvo un comportamiento muy estable, manteniéndose la mayor parte del periodo experimental con fecundidades superiores a 1.0 (fig. 5D). Con *Nannochloropsis* sp. presentó un comportamiento estable a partir de la concentración de  $25 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup> (fig. 6C-E).

determined using the technique of Lowry *et al.* (1951), and the lipids according to Bligh and Dyer (1959). The lipidic phases were dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The portions obtained were dry concentrated in an evaporator at 55°C, after which they were recovered, dried with gaseous N<sub>2</sub> and weighed using an analytical balance.

For the statistical analysis, the tests of Friedman, of Wilcoxon and of multiple comparisons between groups, described by Siegel and Castellan (1988), were used, as well as the two-way analysis of variance with replicates (Sokal and Rohlf, 1982).

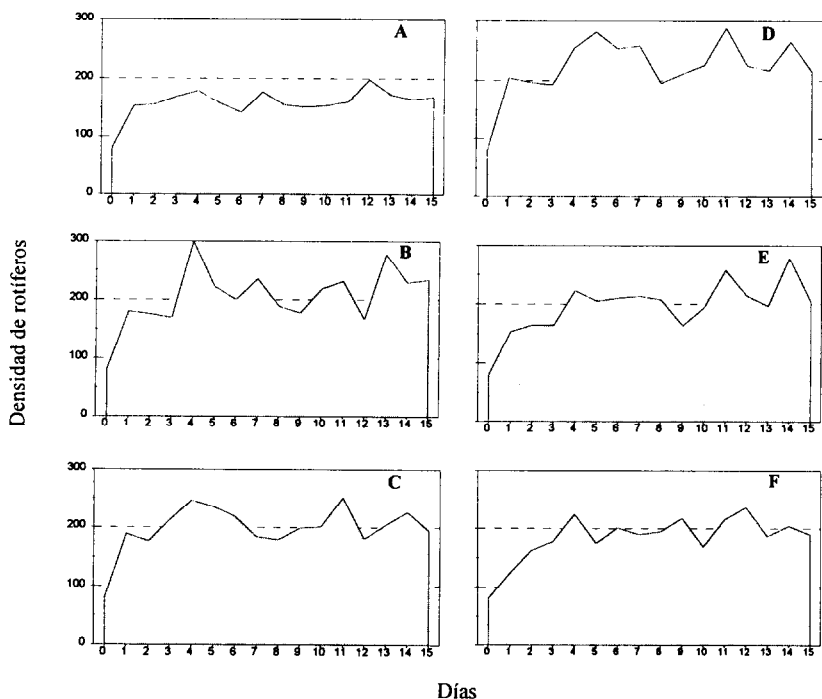
## RESULTS

Friedman's two-way test ( $P < 0.05$ ) showed significant differences between densities of rotifers and fecundities in at least one of the concentrations of the different treatments, except in the case of the rotifers treated with *Chlorella* sp.

It was observed in all treatments that the production of rotifers increased as the concentration increased, reaching a maximum in the intermediate concentrations and decreasing towards the higher concentrations. The least evident case was that of *Chlorella* sp., and the most notable was that of the rotifers treated with *Spirulina* sp. (figs. 1, 2, 3, 4A-F).

The fecundity of the rotifers fed *Nannochloris* sp. at the concentration of  $25 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup> was very stable, with values greater than 1.0 during most of the experiment (fig. 5D). It was also stable with *Nannochloropsis* sp. at the concentration of  $25 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup> (fig. 6C-E). The rotifers fed *Chlorella* sp. and *Spirulina* sp. produced lower fecundity values (figs. 7, 8A-F). In the case of *Spirulina* sp., fecundity values increased as the concentration increased, with maximums at 0.67 g, and decreased at higher concentrations (fig. 8A-F).

The cell density that produced the greatest density of rotifers was  $25 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup> for *Nannochloris* sp. and *Nannochloropsis* sp. and 0.900 g 1.5 l<sup>-1</sup> for *Spirulina* sp. (figs. 1D, 2C, 4D). The rotifers fed *Chlorella* sp. presented a very homogeneous behavior in all the concentrations. The concentration that presented



**Figura 1.** Densidades de rotíferos por mililitro, cultivados con *Nannochloris* sp.  
**Figure 1.** Density of rotifers per milliliter, cultured with *Nannochloris* sp.  
 (A)  $10 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (B)  $15 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (C)  $20 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (D)  $25 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>,  
 (E)  $30 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (F)  $35 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>.

Los rotíferos alimentados con *Chlorella* sp. y *Spirulina* sp. produjeron los valores más bajos de fecundidad (figs. 7, 8A-F) y, en el caso del alimento *Spirulina* sp., se incrementaron los valores de fecundidad conforme la concentración aumentó, siendo máximos en 0.67 g y decreciendo en concentraciones superiores (fig. 8A-F).

La densidad celular que produjo la mayor densidad de rotíferos fue de  $25 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup> para *Nannochloris* sp. y *Nannochloropsis* sp. y de 0.900 g 1.5 l<sup>-1</sup> en el caso de *Spirulina* sp. (figs. 1D, 2C, 4D). Los rotíferos alimentados con *Chlorella* sp. manifestaron un comportamiento muy homogéneo en todas las concentraciones. La ración que presentó un valor de densidad y fecundidad más elevado fue de  $35 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup> (tabla 1).

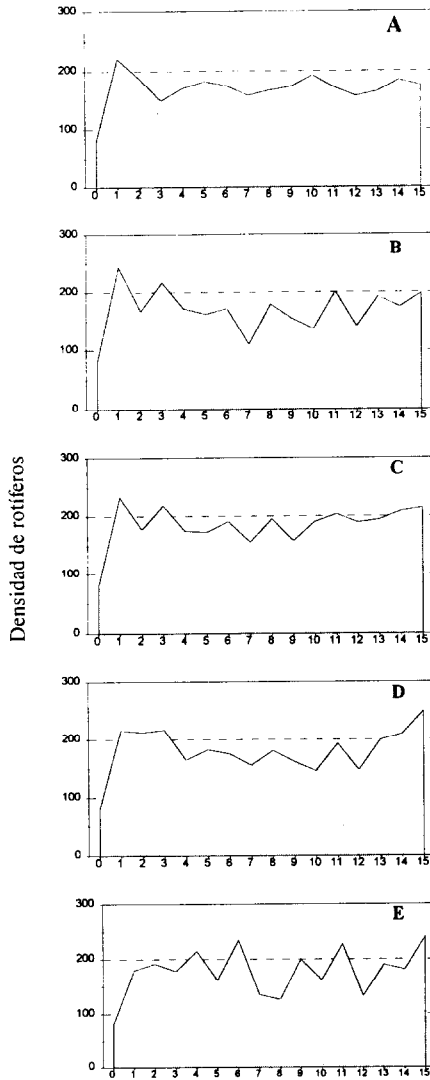
a higher density and fecundity value was  $35 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup> (table 1).

#### Biochemical composition

The results of the comparisons of the effects of carbohydrate, protein and total lipid contents on the rotifers are shown in table 2. The greatest percentage of carbohydrates (24.6%) was obtained in the rotifers fed *Nannochloris* sp., that of proteins with *Spirulina* sp. (69.7%) and of total lipids with *Chlorella* sp. (20.9%) (table 3).

#### DISCUSSION

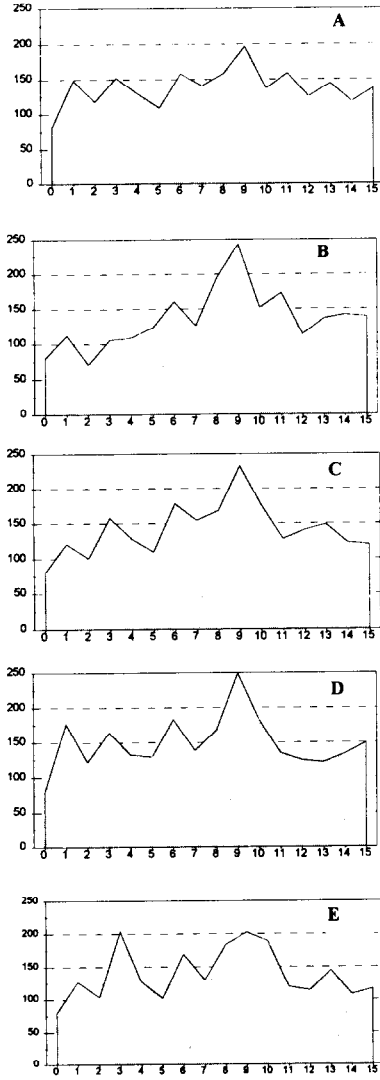
Dried *Spirulina* sp. was used to determine the possibility of using an alternative feed that,



**Figura 2.** Densidades de rotíferos por mililitro, cultivados con *Nannochloropsis* sp.

**Figure 2.** Density of rotifers per milliliter, cultured with *Nannochloropsis* sp.

- (A)  $15 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (B)  $20 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>,  
 (C)  $25 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (D)  $30 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>,  
 (E)  $35 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>.

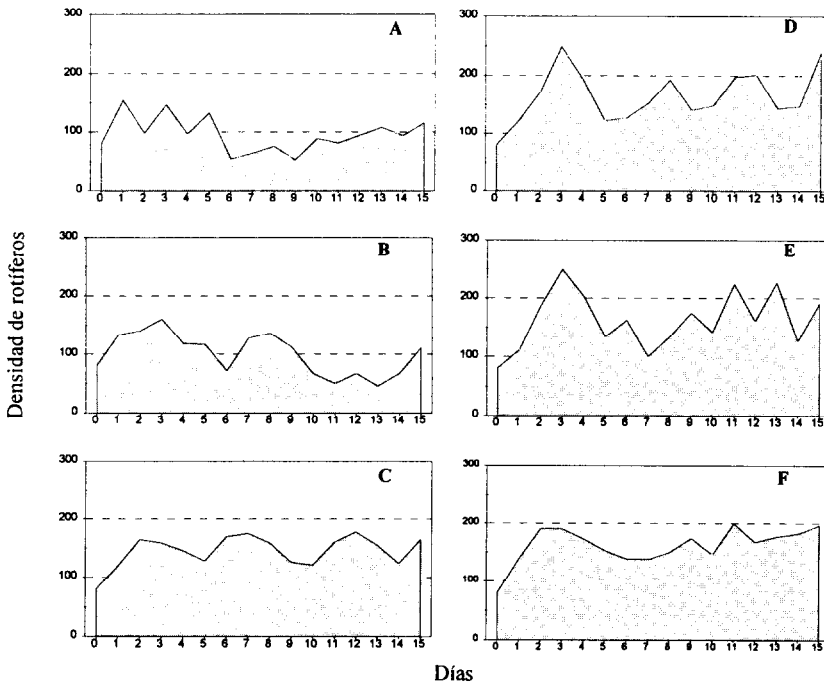


Días

**Figura 3.** Densidades de rotíferos por mililitro, cultivados con *Chlorella* sp.

**Figure 3.** Density of rotifers per milliliter, cultured with *Chlorella* sp.

- (A)  $20 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (B)  $25 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>,  
 (C)  $30 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (D)  $35 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>,  
 (E)  $40 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>.



**Figura 4.** Densidades de rotíferos por mililitro, cultivados con *Spirulina* sp. deshidratada.  
**Figure 4.** Density of rotifers per milliliter, cultured with dried *Spirulina* sp.  
 (A) 0.225 g 1.5 l<sup>-1</sup>, (B) 0.450 g 1.5 l<sup>-1</sup>, (C) 0.675 g 1.5 l<sup>-1</sup>, (D) 0.900 g 1.5 l<sup>-1</sup>, (E) 1.125 g 1.5 l<sup>-1</sup>, (F) 1.350 g 1.5 l<sup>-1</sup>.

### Caracterización bioquímica

Al comparar el efecto en los rotíferos de los contenidos de carbohidratos, proteínas y lípidos totales, se obtuvieron los resultados que se resumen en la tabla 2. El mayor porcentaje de carbohidratos (24.6%) se presentó en los rotíferos alimentados con *Nannochloris* sp., el de proteínas en *Spirulina* sp. (69.7%) y los lípidos totales en *Chlorella* sp. (20.9%) (tabla 3).

### DISCUSIÓN

Al utilizar el alimento inerte *Spirulina* sp., se buscó conocer la posibilidad de usar un alimento alternativo, que sin disminuir la calidad del producto terminal (rotíferos) permitiese sustituirlo y facilitar el trabajo, además de contrastarlo con el alimento vivo, que se sabe tiene la

without decreasing the quality of the end product (rotifers), could be substituted to facilitate the work and compared to live feed that is known to have the nutritional qualities necessary for sustaining the culture of rotifers.

It was observed in this study that the density of rotifers increased slightly as the concentration of *Chlorella* sp. increased, and remained stable at different concentrations. This is because once the maximum level of ingestion is reached, the microalgae are not consumed. Yúfera and Pascual (1985) observed increases in filtration and ingestion at low cell densities. However, as the density of cells increases, filtration decreases and ingestion remains constant. This disagrees with that found by Rezeq and James (1987) and Person-Le Ruyet (1975), who observed an increase in the density of the population as the concentration

**Tabla 1.** Densidades y fecundidades promedio de rotíferos cultivados con las diferentes microalgas.  
**Table 1.** Average densities and fecundities of rotifers cultured with the different microalgae.

Alimentos	Densidad promedio (rot.ml <sup>-1</sup> )	Fecundidad promedio
<i>Nannochloris</i> sp.	233.4	1.05
<i>Nannochloropsis</i> sp.	193.0	0.99
<i>Chlorella</i> sp.	150.0	0.71
<i>Spirulina</i> sp.	79.0	0.60

**Tabla 2.** Comparaciones entre los componentes bioquímicos de los rotíferos cultivados con diferentes alimentos y sus niveles de significancia. N1, *Nannochloris* sp.; N2, *Nannochloropsis* sp.

**Table 2.** Comparisons of the biochemical components of the rotifers cultured with different feeds and their levels of significance. N1, *Nannochloris* sp.; N2, *Nannochloropsis* sp.

Componentes bioquímicos	Relaciones			
	Vivo vs inerte	Entre vivo	N1 y N2 vs <i>Chlorella</i>	N1 vs N2
Carbohidratos	★★	★★★	ns	★★★
Proteínas	★★	★★	★★	ns
Lípidos	★★★	ns	ns	ns

**Tabla 3.** Porcentajes de los componentes bioquímicos de los rotíferos sometidos a diferentes dietas.

**Table 3.** Percentages of the biochemical components of the rotifers fed different diets.

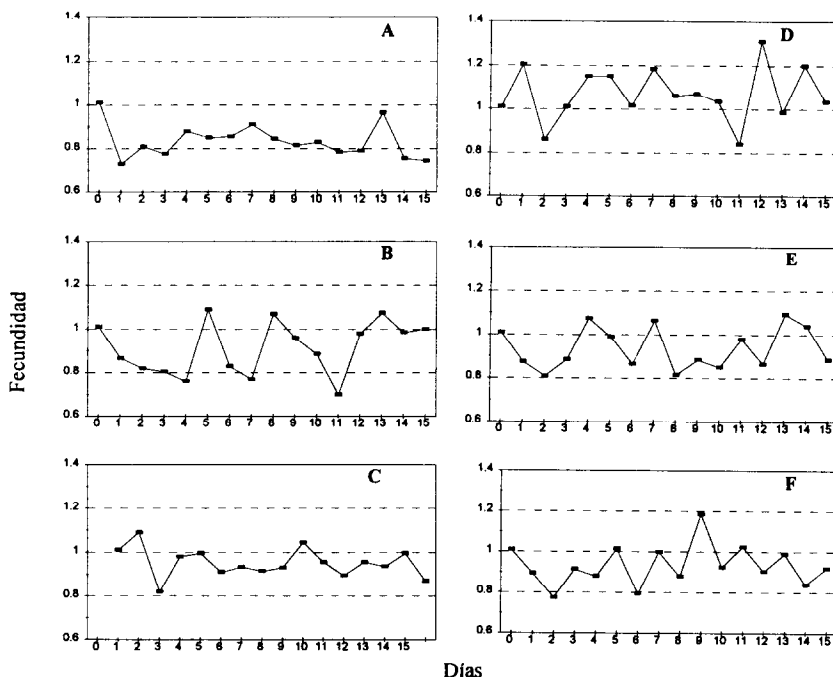
Alimentos	Carbohidratos	Proteínas	Lípidos
<i>Nannochloris</i> sp.	24.6	59.9	15.5
<i>Nannochloropsis</i> sp.	19.4	64.9	15.7
<i>Chlorella</i> sp.	22.5	56.5	20.9
<i>Spirulina</i> sp.	23.8	69.7	6.5

calidad nutricional adecuada para sostener el cultivo de rotíferos.

En este estudio se observó que la densidad de rotíferos se incrementó poco al aumentar la concentración de *Chlorella* sp., manteniendo un comportamiento muy estable entre las diferentes concentraciones. Esto puede deberse a que una vez que se alcanza el máximo intervalo de ingestión, las microalgas no son consumidas. Yúfera y Pascual (1985) observaron que a bajas densidades de células, el intervalo de

of microalgae increased. In the first study, a short doubling time and maximum instantaneous growth rate were obtained with a concentration of  $37 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>. This density is similar to that considered optimum in this study ( $35 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>). Although this concentration was not significantly better, there was an increase in the density of rotifers which at higher concentrations tended to decrease. Person-Le Ruyet (1975) obtained 180 rot.ml<sup>-1</sup> with a density of *Chlorella* sp. of  $65 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>.





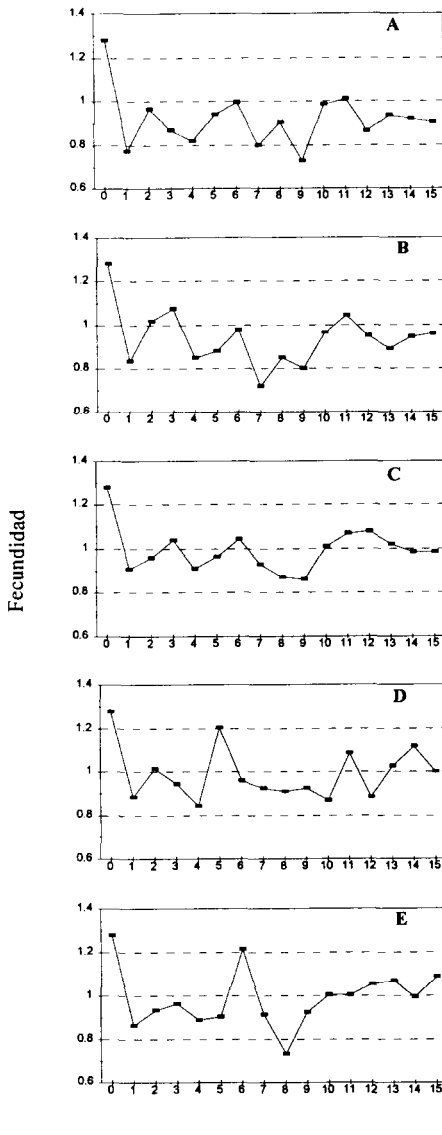
**Figura 5.** Fecundidades observadas en los rotíferos cultivados con *Nannochloris* sp.  
**Figure 5.** Fecundities observed in the rotifers cultured with *Nannochloris* sp.  
 (A)  $10 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (B)  $15 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (C)  $20 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (D)  $25 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>,  
 (E)  $30 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (F)  $35 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>.

filtración e ingestión se incrementa. Sin embargo, al aumentar la densidad de células, el intervalo de filtración decrece y la ingestión se mantiene constante. Lo anterior es contrario a lo encontrado por Rezeq y James (1987) y Person-Le Ruyet (1975), quienes observaron un incremento de la densidad poblacional conforme se incrementó la concentración de la microalga, alcanzando en el primer trabajo un tiempo de duplicación mínimo y una tasa de crecimiento instantáneo máxima en la ración  $37 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>. Esta densidad es similar a la considerada como óptima en el presente trabajo ( $35 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>). Aunque la ración elegida no fue marcadamente mejor, sí existió un incremento en la densidad de rotíferos que a mayores concentraciones tendió a disminuir. Por su parte, Person-Le Ruyet (1975) obtuvo 180 rot.ml<sup>-1</sup> con una densidad de  $65 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup> de *Chlorella* sp. En

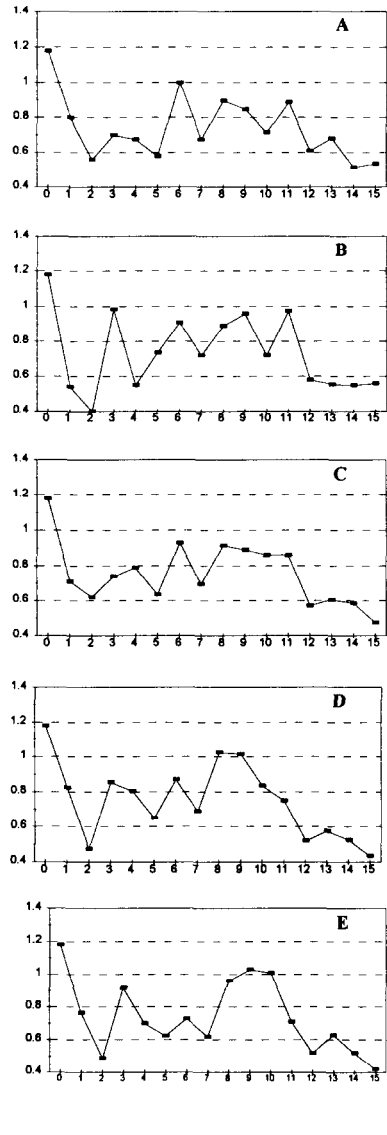
An average of 150 rot.ml<sup>-1</sup> was obtained in this study, with a significantly smaller density of *Chlorella* sp. of  $35 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>.

With the microalga *Nannochloris* sp. at a density of  $25 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>, average yields of 233.4 rot.ml<sup>-1</sup> were obtained, with a fecundity of 1.05, which were the highest values found of the feeds tested. Hung (1989) obtained yields of 183 rot.ml<sup>-1</sup> with *Nannochloris oculata* at a density of  $20 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>, which were less than those obtained in this study at the same concentration of microalgae (213 rot.ml<sup>-1</sup>).

The concentrations of *Nannochloris* sp. affected the density and fecundity values of the rotifers, since the lowest and two highest concentrations presented lower values in the parameters observed than in the intermediate concentrations, among which the best concentration was found,  $25 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>. Yúfera and Pascual (1985) observed that the

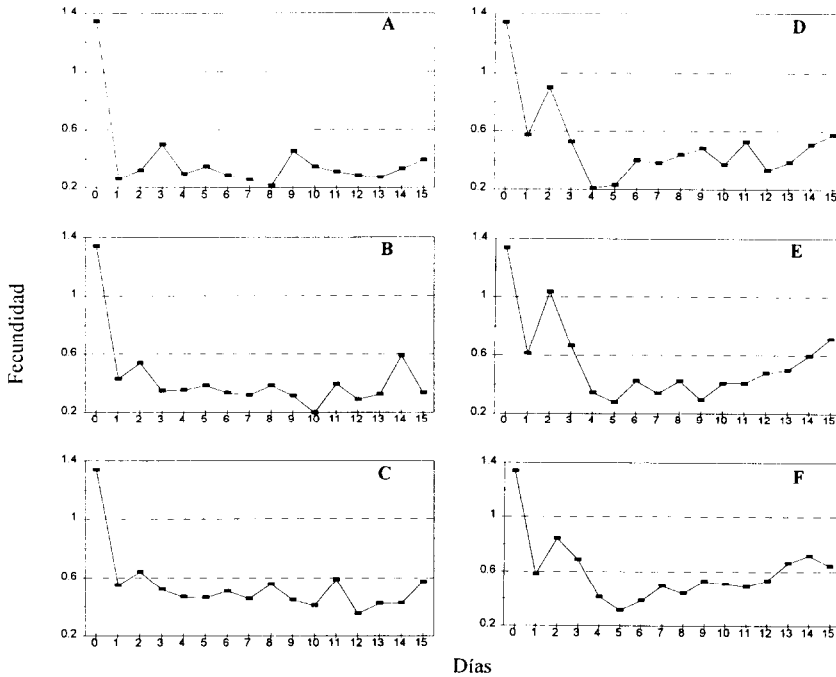


**Figura 6.** Fecundidades observadas en los rotíferos cultivados con *Nannochloropsis* sp.  
**Figure 6.** Fecundities observed in the rotifers cultured with *Nannochloropsis* sp.  
 (A)  $15 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (B)  $20 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>,  
 (C)  $25 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (D)  $30 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>,  
 (E)  $35 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>.



Días

**Figura 7.** Fecundidades observadas en los rotíferos cultivados con *Chlorella* sp.  
**Figure 7.** Fecundities observed in the rotifers cultured with *Chlorella* sp.  
 (A)  $20 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (B)  $25 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>,  
 (C)  $30 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, (D)  $35 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>,  
 (E)  $40 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>.



**Figura 8.** Fecundidades observadas en los rotíferos cultivados con *Spirulina* sp. deshidratada.  
**Figure 8.** Fecundities observed in the rotifers cultured with dried *Spirulina* sp.  
 (A) 0.225 g 1.5 l<sup>-1</sup>, (B) 0.450 g 1.5 l<sup>-1</sup>, (C) 0.675 g 1.5 l<sup>-1</sup>, (D) 0.900 g 1.5 l<sup>-1</sup>, (E) 1.125 g 1.5 l<sup>-1</sup>, (F) 1.350 g 1.5 l<sup>-1</sup>.

nuestras experiencias, se obtuvo un promedio de 150 rot.ml<sup>-1</sup>, con una densidad de *Chlorella* sp. bastante menor de 35 × 10<sup>6</sup> cel.ml<sup>-1</sup>.

Con la microalga *Nannochloris* sp. a una densidad de 25 × 10<sup>6</sup> cel.ml<sup>-1</sup>, se obtuvieron rendimientos promedio de 233.4 rot.ml<sup>-1</sup> con una fecundidad de 1.05, siendo éstos los valores más altos encontrados de los alimentos probados. Hung (1989) obtuvo rendimientos de 183 rot.ml<sup>-1</sup> en una densidad de 20 × 10<sup>6</sup> cel.ml<sup>-1</sup> de *Nannochloris oculata*, los cuales fueron menores a los obtenidos en este trabajo a la misma concentración de microalgas (213 rot.ml<sup>-1</sup>).

Las concentraciones de *Nannochloris* sp. afectaron los valores de densidad y fecundidad en los rotíferos, ya que la ración más baja y las dos más altas tuvieron valores menores en los parámetros observados que en las raciones intermedias, entre las cuales se encontró la mejor ración, 25 × 10<sup>6</sup> cel.ml<sup>-1</sup>. Yúfera y Pascual

intervals of filtration and ingestion are determined by the concentration and type of microalga. With *Nannochloris maculata*, *N. oculata* and *Nannochloropsis gaditana*, the interval of filtration decreased as the microalgal concentration increased, reaching a constant level of 60 to 80 µg.ml<sup>-1</sup>. This agrees with that observed in this study, where the maximum density of rotifers was obtained with the concentration of 25 × 10<sup>6</sup> cells.ml<sup>-1</sup>, whereas with the previous and subsequent concentrations, the densities of rotifers and fecundities decreased. This can be due to deterioration brought about by greater filtration and less ingestion.

For Hirayama *et al.* (1979), the microalga *Nannochloropsis* sp. was an excellent feed for the culture of rotifers of the eight species studied. However, their culture conditions were different from those in this study, consisting of very low densities of microalgae and

(1985) observaron que los intervalos de filtración e ingestión están determinados tanto por la concentración como por el tipo de microalga. Con *Nannochloris maculata*, *N. oculata* y *Nannochloropsis gaditana* el intervalo de filtración decreció al incrementarse la concentración de la microalga, alcanzando un nivel constante de 60 a 80  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Esto coincide con lo observado en este trabajo, donde a la concentración de  $25 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$  se alcanzó la máxima densidad de rotíferos, en tanto que en las raciones anteriores y subsecuentes las densidades de rotíferos y las fecundidades disminuyeron, lo cual puede ser resultado del desgaste provocado por una mayor actividad de filtración y una menor ingestión.

Para Hirayama *et al.* (1979), la microalga *Nannochloropsis* sp. resultó ser un excelente alimento para el cultivo de rotíferos de entre ocho especies de microalgas. No obstante, las condiciones de cultivo no son comparables con las nuestras, ya que se usaron muy bajas densidades de microalgas y se experimentó en pequeños volúmenes (2 a 5 ml). Caric *et al.* (1993) obtuvieron los mejores índices (densidad de rotíferos, intervalo de reproducción y tiempo de duplicación) usando las microalgas *Nannochloropsis* sp., *Dunaliella tertiolecta* y *Phaeodactylum tricornerutum* como alimento de rotíferos. Además de que con estas microalgas se alcanzó la fase exponencial en breve tiempo. Si bien en este trabajo *Nannochloropsis* sp. no fue el alimento con el cual se obtuvieron los mayores rendimientos, fue el segundo mejor, con 193 rot. $\text{ml}^{-1}$  y una fecundidad de 0.99.

En el caso de *Spirulina* sp. deshidratada, la ración evaluada como óptima es mucho mayor que la recomendada por Person-Le Ruyet (1975), quien con 0.2 g. $\text{l}^{-1}$  obtiene rendimientos de 145 rot. $\text{ml}^{-1}$  en cultivos de 20 l; en nuestros experimentos utilizando el triple de la ración recomendada por este autor, 0.6 g. $\text{l}^{-1}$ , se producen 124 rot. $\text{ml}^{-1}$  en 1.5 l de volumen. La diferencia en los rendimientos puede ser provocada tanto por el volumen (20 l) como por la forma de mantenimiento del cultivo, al que se le extrajo diariamente un cuarto del volumen, quedando una fracción en la que se acumulan tanto excreciones de los rotíferos como alimento en descomposición, lo cual genera bacterias que sirven de alimento para los rotíferos.

small volumes (2 to 5 ml). Caric *et al.* (1993) obtained the best indexes (density of rotifers, reproduction interval, doubling time) using the microalgae *Nannochloropsis* sp., *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornerutum* as feed for the rotifers. The exponential phase was also reached in a short time using these microalgae. *Nannochloropsis* sp. did not produce the greatest yields, but was second best, with 193 rot.  $\text{ml}^{-1}$  and a fecundity of 0.99.

As for dried *Spirulina* sp., the concentration determined to be optimum is much greater than that recommended by Person-Le Ruyet (1975), who obtained yields of 145 rot. $\text{ml}^{-1}$  with 0.2 g. $\text{l}^{-1}$  in 20-l cultures; this study used three times that recommended by this author, 0.6 g. $\text{l}^{-1}$ , and produced 124 rot. $\text{ml}^{-1}$  in 1.5 l of volume. The difference in the yields can be due to the volume (20 l) and how the culture was handled, by daily extracting one fourth of the volume and leaving portions of rotifer excretions and decomposing food, which generate bacteria that serve as food for the rotifers.

### Biochemical composition

In the evaluation of the effect of each type of feed on the rotifers, the biochemical determinations (of the rotifers) were used as another criterion for defining the best feed. Frolov *et al.* (1991) and Caric *et al.* (1993) studied the influence of the biochemical composition of the different feeds on the nutritional quality of the rotifers, and found that nutritional quality depends on the growth cycle and the biochemical composition of the feed used.

Since carbohydrates are a low source of energy, they are of secondary importance in nutritional studies of invertebrates and fish, with greater importance given to lipids and proteins. The percentages of carbohydrates determined from the rotifers fed *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis* sp., *Chlorella* sp. and *Spirulina* sp. (24.6, 23.8, 22.5 and 19.4) are similar to those reported by Frolov *et al.* (1991), who found carbohydrate contents of 26.8, 20.7 and 20.5%, using the microalgae *Phaeodactylum tricornerutum*, *Monochrysis lutheri* and *Nephrochloris salina* as feed for the rotifers.

### Caracterización bioquímica

La evaluación del efecto de cada tipo de alimento en los rotíferos consideró a las determinaciones bioquímicas (de los rotíferos) como un criterio más para definir el mejor alimento. Frolov *et al.* (1991) y Caric *et al.* (1993) investigaron la influencia de la composición bioquímica de los diversos alimentos en la calidad nutricional de los rotíferos, encontrando que ésta depende del ciclo de crecimiento y de la composición bioquímica del alimento utilizado.

Debido al bajo aporte energético de los carbohidratos, se les considera de importancia secundaria en los estudios nutricionales de invertebrados e incluso peces, dándole mayor importancia a los lípidos y proteínas. Los porcentajes de carbohidratos cuantificados en los rotíferos alimentados con *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis* sp., *Chlorella* sp. y *Spirulina* sp. (24.6, 23.8, 22.5 y 19.4) son similares a los reportados por Frolov *et al.* (1991), quienes encontraron contenidos de carbohidratos de 26.8, 20.7 y 20.5% usando como alimento de rotíferos a las microalgas *Phaeodactylum tricornutum*, *Monochrysis lutheri* y *Nephrochloris salina*.

En cuanto a los porcentajes de proteínas cuantificados para los rotíferos tratados con los cuatro alimentos, fueron 69.7% en *Spirulina* sp., 64.9% en *Nannochloropsis* sp., 59.9% en *Nannochloris* sp. y 56.5% en *Chlorella* sp., mayores que los observados por Frolov *et al.* (1991) de 57.2, 48.1 y 50.2% para *P. tricornutum*, *M. lutheri* y *N. salina*, respectivamente. Rezeq y James (1987) observaron que a una concentración de  $37 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup> de *Chlorella* sp., se obtuvo un 23.32% de proteínas. Por su parte, los rotíferos cultivados con la microalga *Nannochloropsis* sp. en el Instituto de Pesquerías de Nagasaki (1975 y 1976) y en la Estación de Pesquerías Experimentales en Gifu (1975) (Watanabe *et al.*, 1983) presentaron 71, 73.7 y 74.1% de proteínas totales, valores que son considerablemente mayores a los cuantificados con la misma microalga en este trabajo.

Los lípidos son de importancia primaria, ya que algunos de ellos son esenciales para el crecimiento, el desarrollo y mantenimiento de

The percentages of proteins determined for the rotifers treated with the four feeds were 69.7% for *Spirulina* sp., 64.9% for *Nannochloropsis* sp., 59.9% for *Nannochloris* sp. and 56.5% for *Chlorella* sp., and are greater than those reported by Frolov *et al.* (1991) of 57.2, 48.1 and 50.2% for *P. tricornutum*, *M. lutheri* and *N. salina*, respectively. Rezeq and James (1987) observed that 23.32% of proteins was obtained with *Chlorella* sp. at a concentration of  $37 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>. The rotifers fed the microalga *Nannochloropsis* sp. at the Nagasaki Fisheries Institute (1975 and 1976) and at the Experimental Fisheries Station in Gifu (1975) (Watanabe *et al.*, 1983) presented 71, 73.7 and 74.1% of total proteins; these values are considerably greater than those determined with the same microalga in this study.

Lipids are of primary importance, since some of them are essential for growth, development and maintenance of the physiological processes (Frolov *et al.*, 1991). Of the different feeds used for the rotifers, *Chlorella* sp. had the greatest percentage of lipids (20.9%). Frolov *et al.* (1991) observed a very similar percentage of lipids (20.4%) in the rotifers fed *M. lutheri*. When *Nannochloropsis* sp. and *Nannochloris* sp. were used, smaller percentages of lipids were found (15.7 and 15.5%), comparable to those determined by Caric *et al.* (1983) for *Nannochloropsis* sp. (14.6%) and by Frolov *et al.* (1991) for *N. salina* (13.6%). Whyte and Nagata (1990) report similar percentages of lipids to those obtained here (*Isochrysis galbana*, 15.8%, and *Tetraselmis suecica*, 13.1%); however, for *Chlorella sacharophila*, the percentage observed by these authors (9.8%) is considerably lower than that obtained for *Chlorella* sp. (20.9%) in this study.

Rezeq and James (1987) observed that the percentage of total lipids as well as the N-3 fraction of the HUFA polyunsaturated fatty acids, varied in relation to the concentration of *Chlorella* sp. in which rotifers are cultured. The maximum percentage of total lipids (36.98%) and of the N-3 fraction (22.85%) obtained by these authors was found at a concentration of  $37 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>, which is 1.76 times greater than that obtained here. Caric *et al.* (1993) determined the lipids in the rotifers during

los procesos fisiológicos (Frolov *et al.*, 1991). De los diferentes alimentos utilizados para los rotíferos, *Chlorella* sp. presentó el mayor porcentaje de lípidos (20.9%). Frolov *et al.* (1991) observaron un porcentaje muy similar de lípidos (20.4%) en los rotíferos alimentados con *M. lutheri*. Cuando se utilizaron los alimentos *Nannochloropsis* sp. y *Nannochloris* sp., se presentaron porcentajes menores de lípidos (15.7 y 15.5%), comparables a los cuantificados para *Nannochloropsis* sp. (14.6%) por Caric *et al.* (1983) y *N. salina* (13.6%) por Frolov *et al.* (1991). Whyte y Nagata (1990) refieren porcentajes similares de lípidos a los obtenidos en nuestra experiencia (*Isochrysis galbana*, 15.8%, y *Tetraselmis suecica*, 13.1%); sin embargo, para *Chlorella sacharophila* el porcentaje observado por estos autores (9.8%) es considerablemente menor que el obtenido para *Chlorella* sp. (20.9%) en este trabajo.

Rezeq y James (1987) observaron que el porcentaje de lípidos totales, así como la fracción N-3 de los ácidos grasos polinsaturados HUFA (por su abreviatura en inglés), varía en relación con la concentración de *Chlorella* sp. en que se cultiva a los rotíferos. El máximo porcentaje de lípidos totales (36.98%) y de la fracción N-3 (22.85%) obtenido por éstos, se presenta en la ración  $37 \times 10^{-6}$  cel.ml<sup>-1</sup>, que es 1.76 veces mayor que el obtenido en nuestros resultados. Caric *et al.* (1993) cuantificaron los lípidos en los rotíferos, en las diferentes etapas de crecimiento de las microalgas, encontrando que sus concentraciones disminuyen conforme la edad del cultivo aumenta, siendo máximas en la fase exponencial. De lo anterior se desprende la importancia de utilizar cultivos de microalgas "jóvenes" como alimento para rotíferos.

Con base en las determinaciones bioquímicas (carbohidratos, proteínas y lípidos), como elementos que son transferidos a los rotíferos por el alimento que consumen y que a su vez son importantes (especialmente lípidos) para el adecuado crecimiento y desarrollo de las larvas de peces, el mejor alimento en nuestras condiciones de trabajo fue *Chlorella* sp., con la mayor cantidad de lípidos y buenos contenidos de proteínas y carbohidratos. Es seguido por *Nannochloropsis* sp., con una cantidad de lípidos muy similar a la obtenida

different stages of growth of the microalgae and found that their concentrations decrease as the age of the culture increases, being highest during the exponential phase. The above shows the importance of using cultures of "young" microalgae as feed for rotifers.

Based on the biochemical determinations (carbohydrates, proteins and lipids), as elements that are transferred to the rotifers through the food they consume and at the same time are important (especially lipids) for the appropriate growth and development of the fish larvae, the best feed in this study was *Chlorella* sp., with the highest amount of lipids and ample amounts of proteins and carbohydrates. *Nannochloropsis* sp. follows, with a lipid content similar to that obtained for *Nannochloris* sp., although the latter had a greater content of carbohydrates and the former of proteins. Dried *Spirulina* sp. had the lowest values of lipids, but a high amount of proteins and a good portion of carbohydrates.

The high densities obtained in the cultures of the microalgae *Nannochloropsis* sp. and *Nannochloris* sp. during short periods of time, as well as their easy handling were also considered, since with dried *Spirulina* sp., even though it is an inexpensive feed, easily obtained in the market and does not require special handling or equipment, it is not possible to obtain rotifers with appropriate nutritional quality.

## CONCLUSIONS

Using the density of rotifers per unit of volume as a criterion for evaluating the feeds tested during the study period, the best feed was *Nannochloris* sp., followed by *Nannochloropsis* sp., *Chlorella* sp. and, lastly, *Spirulina* sp.

Based on the biochemical determinations carried out on the rotifers tested with the different feeds, the best feed was *Chlorella* sp., followed by *Nannochloropsis* sp., *Nannochloris* sp. and dried *Spirulina* sp.

Considering both criteria, as well as the ease with which the microalgae are handled, it is concluded that *Nannochloropsis* sp. and *Nannochloris* sp., at a density of  $25 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>, are appropriate feeds for maintaining the culture of rotifers.

para *Nannochloris* sp., aunque esta última presentó mayor contenido de carbohidratos y *Nannochloropsis* sp. de proteínas y, finalmente, *Spirulina* sp. deshidratada, con los valores más bajos de lípidos y con una elevada cantidad de proteínas y una buena proporción de carbohidratos.

Asimismo, se consideraron las altas densidades logradas en los cultivos de las microalgas *Nannochloropsis* sp. y *Nannochloris* sp. en cortos periodos de tiempo y la facilidad de manejo, ya que con *Spirulina* sp. deshidratada, aunque es un alimento barato, fácilmente accesible en el mercado y cuyo uso no requiere mano de obra especializada ni de instalaciones especiales, no se obtienen rotíferos con adecuada calidad nutricional.

## CONCLUSIONES

Tomando como criterio para la evaluación de los alimentos probados la densidad de rotíferos por unidad de volumen a lo largo del periodo experimental, el mejor alimento fue *Nannochloris* sp., seguido en orden descendente por *Nannochloropsis* sp., *Chlorella* sp. y *Spirulina* sp.

Con base en las determinaciones bioquímicas realizadas a los rotíferos tratados con los diferentes alimentos, el mejor alimento fue *Chlorella* sp., seguido por *Nannochloropsis* sp., *Nannochloris* sp. y *Spirulina* sp. deshidratada.

Conjuntando ambos criterios, así como la facilidad de manejo de las microalgas, se concluye que *Nannochloropsis* sp. y *Nannochloris* sp., en una densidad de  $25 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, son alimentos adecuados para mantener el cultivo de rotíferos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto institucional "Biología y cultivo de peces marinos de importancia comercial", clave DEPI 931390. Un agradecimiento para mis compañeros que colaboraron en la realización del presente trabajo.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by the project "Biología y cultivo de peces marinos de importancia comercial" (DEPI 931390). Many thanks to the colleagues that participated in this study.

English translation by Jennifer Davis.

## REFERENCIAS

- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.
- Caric, M., Sanko-Njire, J. and Skaramuca, B. (1993). Dietary effects of different feeds on the biochemical composition of the rotifer (*Brachionus plicatilis* Müller). *Aquaculture*, 110: 141-150.
- Dreywood, R. (1946). Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 18: 499.
- Frolov, A.V., Pankov, S.L., Geradze, K.N., Pankova, S.A. and Spektorova, L.V. (1991). Influence of the biochemical composition of food on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 97(2/3): 181-202.
- Gatesoupe, F.J. and Robin, J.H. (1981). Commercial single-cell proteins either as sole source or in formulated diets for intensive and continuous production of rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, 25: 1-15.
- González-Acosta, B. y Ramírez-Sevilla, R. (1987). Criterios para la selección de un medio de cultivo para microalgas marinas. 2º Congreso de la Asociación Mexicana de Acuicultura. AMAC '87, La Paz, BCS, 24-28 de noviembre de 1987.
- Hagiwara, A. (1992). Practical use of marine rotifer cysts. *Isr. J. Aquacult. Bamidgch*, 44(4): 129.
- Hirayama, K. (1985). Biological aspect of the rotifer *Brachionus plicatilis* as a food organism for mass culture of seedling. *Colloque Franco-Japonais d'Océanographie, Marseille*, 16-21 Sept. 85, pp. 41-50.

- Hirayama, K. and Maruyama, I. (1993). Vitamin B12 content as a limiting factor for mass production of the rotifer *Brachionus plicatilis*. In: P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier (eds.), LARVI' 91. Spec. Publ. Eur. Aquacul. Soc., 15: 101-103.
- Hirayama, K., Takagi, K. and Kimura, H. (1979). Nutritional effect of eight species of marine phytoplankton on population growth of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45: 11-16.
- Hung, M. (1989). Ensayo de cultivo de una cepa del rotífero *Brachionus plicatilis* aislada en Venezuela. Rev. Latinoamericana de Acuicultura, 40: 83-112.
- Lowry, O.H., Rosebrugh, N.H., Lewis, F.A. and Randal, R.I. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biochem. Chem., 193: 265-275.
- Lubzens, E. (1987). Raising rotifers for use in aquaculture. Hydrobiologia, 147: 245-255.
- Minkoff, G., Blanch, A.R., Alisina, M. and Jofre, J.T. (1992). Control of microflora associated with rotifers *Brachionus plicatilis*. Isr. J. Aquacult. Bamidgeh, 44(4): 180.
- Oie, G., Reitan, K.I. and Olsen, Y. (1994). Comparison of rotifer culture quality with yeast plus oil and algal based cultivation diets. Aquaculture, 2(4): 225-238.
- Person-Le Ruyet, J. (1975). Techniques d'élevage en masse d'un rotifère (*Brachionus plicatilis* Müller) et d'un crustacé branchiopode (*Artemia salina* L.). 10th European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, 1: 331-343.
- Ramírez-Sevilla, R., Rueda-Jasso, R.A., Ortiz-Galindo, J.L. y González-Acosta, B. (1991). Metodología para el cultivo experimental del rotífero *Brachionus plicatilis*. Inv. Mar. CICIMAR, 6(2): 287-290.
- Rezeq, T.A. and James, C.M. (1987). Production and nutritional quality of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed marine *Chlorella* sp. at different cell densities. Hydrobiologia, 147: 257-261.
- Siegel, S. and Castellan, N.J. (1988). Non-parametric Statistics for the Behavioral Sciences. 2nd ed. McGraw-Hill, 399 pp.
- Skjermo, J. and Vadstein, O. (1993). Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. In: J.J. Gilbert, E. Lubzens and E. Miracle (eds.), IV Rotifer Symposium, Vol. 255-256, pp. 185-191.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1982). Biometry. 2nd ed. W.H. Freeman Co., 689 pp.
- Watanabe, T., Kitajima, C. and Fujita, S. (1983). Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. Aquaculture, 34: 115-143.
- Whyte, J.N.C. and Nagata, W.D. (1990). Carbohydrate and fatty acid composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*, fed monospecific diet of yeast or phytoplankton. Aquaculture, 89: 263-272.
- Yoshimura, K., Kitajima, C., Miyamoto, Y. and Kishimoto, G. (1994). Factors inhibiting growth of the rotifer *Brachionus plicatilis* in high density cultivation by feeding condensed *Chlorella*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 60(2): 207-213.
- Yúfera, M. and Pascual, E. (1985). Effects of algal food concentration and ingestion rate of *Brachionus plicatilis* in mass culture. Hydrobiologia, 122: 181-187.