

**EVALUACIÓN DEL PERIODO CRONOLÓGICO DE LLENADO Y EVACUACIÓN
INTESTINAL DEL ROTÍFERO *Brachionus calyciflorus* ALIMENTADO A
DIFERENTES DENSIDADES DE MICROALGA *Chlorella* sp.**

**NATHALIA CAROLINA CALPA ANAGUANO
HUMBERTO ADOLFO JARAMILLO CAMPAÑA**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO-COLOMBIA
2018**

**EVALUACIÓN DEL PERIODO CRONOLÓGICO DE LLENADO Y EVACUACIÓN
INTESTINAL DEL ROTÍFERO *Brachionus calyciflorus* ALIMENTADO A
DIFERENTES DENSIDADES DE MICROALGA *Chlorella sp.***

**NATHALIA CAROLINA CALPA ANAGUANO
HUMBERTO ADOLFO JARAMILLO CAMPAÑA**

**Informe final de trabajo de grado presentado como requisito parcial para
optar al título de Ingeniero en Producción Acuícola**

**Directora
VILMA YOLANDA GÓMEZ NIEVES
Bióloga**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO-COLOMBIA
2018**

“Las ideas y conclusiones aportadas en esta tesis de grado son responsabilidad exclusiva de su autor”.

Artículo 1° del Acuerdo No. 324 de octubre de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

VILMA YOLANDA GÓMEZ NIEVES
Director

JULBRINNER SALAS BENAVIDES
Jurado delegado

ARIEL EMIRO GÓMEZ CERÓN
Jurado

San Juan de Pasto, Mayo del 2018.

DEDICATORIA

A Dios por su infinita bondad y por darme fortaleza en los momentos difíciles.

A mis padres Martha Anaguano y Pedro Antonio Calpa, por su paciencia, apoyo y todas sus enseñanzas.

A mis hermanas Edna Viviana y Ángela María, por todo su amor y cariño, por ser el pilar de mi vida, gracias infinitas por creer en mí, apoyarme incondicionalmente e impulsarme a continuar con mis sueños y proyectos.

A la memoria de María Mercedes Anaguano.

NATHALIA CAROLINA CALPA ANAGUANO

DEDICATORIA

A Dios por poner en mi camino todo aquello que me ha formado como persona.

A mis padres Humberto Jaramillo y Lidia Campaña, por estar siempre a mi lado, por ser mi soporte, por su apoyo constante y su buen ejemplo.

A mi hermana Shirley Revelo Campaña, por su apoyo y compañía durante estos años.

HUMBERTO ADOLFO JARAMILLO CAMPAÑA

AGRADECIMIENTOS

VILMA YOLANDA GÓMEZ	Bióloga. Directora de esta investigación. Profesora del programa de Ingeniería en Producción Acuícola de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño.
ARIEL EMIRO GÓMEZ CERÓN	Biólogo, Esp. Profesor del programa de Ingeniería en Producción Acuícola de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño.
JULBRINNER SALAS BENAVIDES	Biólogo, MSc. Profesor del programa de Ingeniería en Producción Acuícola de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño.
CARLOS MAURICIO TRUJILLO	Biólogo, MSc. Instituto de Ecología INECOL Xalapa - Veracruz, México.
CAMILO LENIN GUERRERO	Ingeniero en Producción Acuícola. Técnico de laboratorio.
LUÍS ALFONSO SOLARTE PORTILLA	Zootecnista. Esp. Secretario Académico de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño.
PIEDAD MEJÍA SANTACRUZ	Secretaria del Departamento de Recursos Hidrobiológicos de la Universidad de Nariño.
ÓSCAR MEJÍA SANTACRUZ	Economista. Auxiliar biblioteca General Luís Santander.

A los demás profesores y funcionarios de la Universidad de Nariño.

Especial agradecimiento a ALEJANDRA CAICEDO, EDWIN RAMOS, CLAUDIA GUADIR, por su valiosa amistad y contribución al desarrollo exitoso de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	18
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GENERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. MARCO TEÓRICO	21
4.1 TAXONOMÍA DE LOS ROTÍFEROS DEL GÉNERO <i>Brachionus</i>	21
4.2 BIOLOGÍA DE ROTÍFEROS.	21
4.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES	22
4.4 REPRODUCCIÓN DE ROTÍFEROS	23
4.5 CULTIVO DE ROTÍFEROS <i>Brachionus calyciflorus</i>	25
4.5.1 Cultivos puros.	25
4.5.2 Cultivos continuos.....	25
4.5.3 Cosecha de Rotíferos.	26
4.6 ALIMENTACIÓN CON MICROALGA	26
4.7 MORFOMETRÍA	27
5. DISEÑO METODOLÓGICO	29
5.1 LOCALIZACIÓN	29
5.2. MATERIAL BIOLÓGICO	29
5.2.1 Microalgas.	29
5.2.2 Rotíferos.	29
5.3 MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS	29
5.3.1 Materiales.	29
5.3.2 Equipos.....	29
5.3.3 Insumos.	30
5.4 PLAN DE MANEJO	30
5.4.1 Adecuación de instalaciones.	30
5.4.2 Producción de Microalgas.	30
5.4.3 Condensación de <i>Chlorella</i> sp.....	31
5.4.4 Cultivo de Rotíferos	32
5.4.5 Periodo de llenado del intestino en rotíferos.....	32

5.4.6 Patrón de evacuación intestinal en rotíferos.....	34
5.4.7 Análisis morfométrico.	34
5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
5.5.1 Variables evaluadas.	36
5.5.1.1 Volumen del cuerpo rotífero.	36
5.5.1.2 Volumen del intestino.....	36
5.5.1.3 Volumen intestinal expresado en porcentaje.....	36
5.5.1.4 Tiempo de llenado y evacuación intestinal.....	37
5.5.2 Formulación de hipótesis.....	37
6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	38
6.1 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	38
6.2 TIEMPO DE LLENADO Y EVACUACIÓN INTESTINAL.....	39
6.2.1 Tiempo de llenado intestinal.....	39
6.2.2 Tiempo de evacuación intestinal.....	41
6.3 VOLUMEN INTESTINAL EN SU MÁXIMA REPLECIÓN CON RELACIÓN AL VOLUMEN CORPORAL DEL ROTÍFERO.....	42
6.4 TIEMPO DE RETENCION ALIMENTICIA DEL ROTÍFERO <i>B. calyciflorus</i>	44
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	48
7.1 CONCLUSIONES.....	48
7.2 RECOMENDACIONES.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50
ANEXOS.....	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Prueba de Tukey para volumen del cuerpo del rotífero.	38
Tabla 2. Tiempo de estabilización fase de llenado	41
Tabla 3. Prueba de Tukey para volumen del intestino.	42
Tabla 4. Valores máximos alcanzados en el ensayo.	43
Tabla 5. Prueba de Tukey para volumen intestinal expresado en porcentaje.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la anatomía externa e interna de un rotífero.....	22
Figura 2. Ciclo reproductivo de los rotíferos.	24
Figura 3. Criterios para la toma de medidas del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> . 28	
Figura 4. Cultivo de microalga <i>Chlorella</i> sp.	31
Figura 5. Microalga condensada <i>Chlorella</i> sp.....	31
Figura 6. Huevos en estado de diapausa.	32
Figura 7. Unidades experimentales.	33
Figura 8. Filtración húmeda.	34
Figura 9. Vesículas intestinales del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> (subrayado con amarillo).....	35
Figura 10. Valores ajustados a la curva de normalidad.....	38
Figura 11. Histograma de frecuencia para volumen del cuerpo.	39
Figura 12. Periodo de Llenado intestinal del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> en los tratamientos.....	40
Figura 13. Periodo de Evacuación intestinal del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> para los diferentes tratamientos.	41
Figura 14. Relación Tiempo y Porcentaje intestinal durante el ensayo para el T ₁ .45	
Figura 15. Relación Tiempo y Porcentaje intestinal durante el ensayo para el T ₂ .45	
Figura 16. Relación Tiempo y Porcentaje intestinal durante el ensayo para el T ₃ .46	
Figura 17. Relación Tiempo y Porcentaje intestinal durante el ensayo para el T ₄ .47	

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Análisis de varianza ANOVA para Volumen del cuerpo del rotífero.....	54
Anexo B. Prueba múltiple de Tukey para Volumen del cuerpo del rotífero.	54
Anexo C Tabla de Frecuencia para Volumen del cuerpo del rotífero.	54
Anexo D. Análisis de varianza ANOVA para Volumen del intestino.	54
Anexo E. Prueba múltiple de Tukey para Volumen del intestino.	55
Anexo F. Promedios para volumen del cuerpo, volumen intestinal y porcentaje intestinal en el Tratamiento 1.	55
Anexo G. Promedios para volumen del cuerpo, volumen intestinal y porcentaje intestinal en el Tratamiento 2.	56
Anexo H. Promedios para volumen del cuerpo, volumen intestinal y porcentaje intestinal en el Tratamiento 3.	57
Anexo I. Promedios para volumen del cuerpo, volumen intestinal y porcentaje intestinal en el Tratamiento 4.	58
Anexo J. Volumen celular (μm^3) de la microalga <i>Chlorella</i> sp.	58
Anexo K. Análisis de varianza ANOVA para Volumen intestinal expresado en porcentaje.....	59
Anexo L. Prueba múltiple de Tukey para Volumen intestinal expresado en porcentaje.....	59

GLOSARIO

ALIMENTO VIVO: Grupo de organismos que componen el plancton (fitoplancton y zooplancton), el cual constituye la unidad básica de producción del material orgánico en los ecosistemas acuáticos.

***Brachionus calyciflorus*:** Es una especie de rotífero planctónico, que se encuentra en agua dulce de la familia Brachionidae siendo un rotífero comercialmente importante, debido a que se ha cultivado en la industria acuícola como alimento para larvas de peces.

CONDENSADO: Es la reducción del volumen de una sustancia, quitando parte de su líquido, dándole mayor densidad, en este caso del cultivo escalonado de microalga *Chlorella sp.*

***Chlorella sp.*:** Es un género de algas verdes unicelulares del filo Chlorophyta. Tiene forma esférica, midiendo de 2 a 10 μm de diámetro, y no posee flagelo.

MICROALGAS: Microorganismos foto-autótrofos, por tanto, capaces de transformar la luz solar en energía química mediante la fotosíntesis oxigénica y además capaces de asimilar carbono en forma de dióxido de carbono.

MORFOMETRÍA: Se refiere al análisis cuantitativo de la forma, un concepto que abarca el tamaño y la forma. Los análisis morfométricos se realizan comúnmente en los organismos, se puede utilizar para cuantificar un carácter de significancia evolutiva, y para detectar los cambios en la forma, deducir algo sobre la ontogenia de los organismos, función o relaciones evolutivas y/o probar estadísticamente las hipótesis sobre los factores que afectan la forma.

ROTÍFERO: Son animales pseudocelomados microscópicos con unas 2.200 especies¹ que habitan en aguas dulces, tierra húmeda, musgos, líquenes, hongos, e incluso agua salada.

RESUMEN

Los rotíferos se usan comúnmente como alimento vivo para las primeras etapas larvianas en algunas especies de peces marinos y continentales. Debido a las posibles deficiencias nutricionales los rotíferos a menudo son enriquecidos con suplementos para mejorar su valor nutricional, además procesos como la medición de volúmenes y áreas intestinales permiten determinar la cantidad de alimento viable para ser suministrado con fines de enriquecimiento. En esta investigación, se evaluó el periodo cronológico de llenado y evacuación intestinal utilizando el rotífero de agua dulce *Brachionus calyciflorus*, mediante la alimentación con diferentes concentraciones de microalga *Chlorella* sp en estado condensado. Los tratamientos fueron, T₁: $1,2 \times 10^6$ células/mL, T₂: $5,2 \times 10^6$ células/mL, T₃: $10,4 \times 10^6$ células/mL y T₄: $15,4 \times 10^6$ células/mL; cada uno de los tratamientos se realizaron por triplicado, utilizando como unidades experimentales recipientes de vidrio con capacidad de tres litros, a una densidad de 40 rotíferos/mL con aireación constante y fotoperiodo natural (1700 Lux); se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con sub muestreo, aplicando un análisis de varianza ANOVA y prueba múltiple de Tukey a los resultados donde se establecieron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$); las variables analizadas fueron: volumen del cuerpo, volumen del intestino, volumen intestinal expresado en porcentaje y tiempo de tránsito intestinal.

Para el análisis morfométrico el rango de volumen del cuerpo fue de $0,7 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ a $2,6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, encontrándose más del 90% de la población entre un volumen corporal de $1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ y $2,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$. El tiempo mínimo de llenado fue de 60 minutos y el tiempo mínimo de evacuación está en 60 minutos después de iniciado el ensayo. Los porcentajes intestinales en su máxima repleción para cada tratamiento fueron T₁: 5,55%, T₂: 8,62% T₃: 10,53% y T₄: 8,08% y el tiempo de viabilidad del rotífero para ser suministrado como alimento vivo en etapas de larvicultura se encuentra en un rango de 105 - 225 minutos. Con esta investigación se determinó el tiempo máximo que se mantiene enriquecido el rotífero *Brachionus calyciflorus*, con el fin de ser suministrado como alimento vivo en etapas de larvicultura.

ABSTRACT

Rotifers are commonly used as live food for the early larval stages in some marine and inland fish species. Due to possible nutritional deficiencies, rotifers are often fortified with supplements to improve their nutritional value, and processes such as measuring intestinal volumes and areas allow the determination of the amount of viable food to be supplied for fortification purposes. In this investigation, the chronological period of intestinal filling and evacuation was evaluated using the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*, by feeding different concentrations of microalgae *Chlorella* sp in a condensed state. The treatments were T1: 1.2×10^6 cells/mL, T2: 5.2×10^6 cells/mL, T3: 10.4×10^6 cells/mL and T4: 15.4×10^6 cells/mL; each treatment was performed in triplicate, using as experimental units glass containers with a capacity of three liters, at a density of 40 rotifers/mL with constant aeration and natural photoperiod (1700 Lux); a completely randomized design (DCA) with sub-sampling was used, applying an variance analysis and multiple Tukey's test to the results where significant differences were established between the treatments ($p \leq 0.05$); the variables analyzed were: body volume, intestinal volume, intestinal volume expressed as a percentage and intestinal transit time.

For morphometric analysis the body volume range was $0.7 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ to $2.6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, with more than 90% of the population ranging from a body volume of $1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ to $2.5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$. The minimum filling time was 60 minutes and the minimum evacuation time is 60 minutes after the start of the test. The intestinal percentages in their maximum repletion for each treatment were T1: 5.55%, T2: 8.62%, T3: 10.53% and T4: 8.08% and the viability time of the rotifer to be fed as live food in larval stages is in the range of 105 - 225 minutes. This research determined the maximum time that the rotifer *Brachionus calyciflorus* is kept enriched, in order to be supplied as live food in larval stages.

INTRODUCCIÓN

Según Støttrup *et al*¹, los rotíferos del género *Brachionus* constituyen el alimento vivo de suma importancia para la primera alimentación larvaria de muchas especies de interés acuícola, debido al tamaño, velocidad de natación y capacidad para permanecer suspendido en la columna de agua, por lo que han sido ampliamente estudiados por su importancia para el desarrollo acuícola.

Sin embargo, el principal desafío para los científicos ha sido desarrollar una técnica de producción de rotíferos estable, sostenible, favorable al medio ambiente y de alta densidad; con el fin de satisfacer la demanda, aumentar el suministro de rotíferos, alimentar un mayor número de larvas de peces y reducir el uso de espacio para el cultivo de alimentos vivos².

Así mismo, la alimentación con microalgas constituye, en cualquier instalación acuícola que pretenda producir rotíferos, una técnica fundamental con grandes ventajas frente a la utilización de alimentos secos como la levadura o dietas comerciales. La utilización de microalgas genera menores desechos, reducción de impactos sobre la calidad del agua, actividad antibacteriana que disminuye la probabilidad de contaminación del cultivo³.

En cuanto a calidad nutricional potencialmente inapropiada de los rotíferos como alimento para las larvas de los peces se ha resuelto enriqueciéndolos con algunas especies de microalgas, emulsiones de aceite y productos microparticulados comerciales antes de ser suministrados a los tanques de cría⁴. Así mismo es importante resaltar que el tiempo de tránsito intestinal en rotíferos, es relativamente rápido y consecuentemente el tiempo que pasan en el tanque de cría antes de ser consumido, afectará la calidad final como presa⁵. En consecuencia, según Lubzens *et al.*⁶ “la supervivencia y el desarrollo normal de las larvas dependen no sólo de los nutrientes adecuados, sino también de la ingestión de alimento suficiente. Por lo

¹ STØTTRUP, J. and McEVOY, L. Live feeds in marine aquaculture. Vol. 1st ed. Oxford, Oxford: John Wiley & Sons. Blackwell Science, 2008. p. 37.

² DHONT, J. Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. In G. Allen (Ed.). En *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Cambridge: Woodhead Publishing. Series in Food Science, Technology and Nutrition; No. 242. 2013. p. 690

³ ROMÁN, José; et al. Dinámica poblacional del rotífero *Brachionus ibericus* aislado de estanques para camarón, alimentado con diferentes dietas. *Latin american journal of aquatic research*, 2014, vol. 42, no 5, p. 1171.

⁴ ROMERO, Sonia; YÚFERA, Manuel. Contribution of gut content to the nutritional value of *Brachionus plicatilis* used as prey in larviculture. En *Aquaculture*, 2012, vol. 364, p. 126.

⁵ *Ibíd.*, p. 124.

⁶ LUBZENS, E.; TANDLER, A.; MINKOFF, G. Rotifers as food in aquaculture. *Hydrobiologia*, 1989, vol. 186, no 1, p. 390.

tanto, el valor nutricional de los rotíferos depende de su composición bioquímica, así como de su masa seca y cantidad celular ingerida”.

Teniendo en cuenta la necesidad de conocer el tiempo de retención y la calidad nutricional que los rotíferos puedan transmitir a las larvas de peces, la presente investigación evaluó el periodo cronológico determinando el patrón de llenado y evacuación intestinal del rotífero *Brachionus calyciflorus*, alimentados con diferentes concentraciones de microalga *Chlorella* sp, por medio de un análisis morfométrico del rotífero, estimación del volumen intestinal en su máxima repleción con relación al volumen corporal del rotífero y determinando el tiempo de mayor retención alimenticia.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Las mayores mortalidades de larvas de peces se presentan en los primeros días de vida lo cual se debe principalmente con el tamaño del alimento vivo suministrado y el valor nutricional del mismo; a una gran mayoría de larvas peces marinos y dulceacuícolas se las alimenta inicialmente con rotíferos⁷, debido a que los rotíferos ofrecen grandes ventajas como: tolerancia a rangos amplios de temperatura y salinidad, fácil alimentación con diferentes especies de fitoplancteres, levaduras y dietas artificiales, su alta velocidad de reproducción bajo condiciones óptimas de cultivo pudiendo duplicar la población en menos de 24 horas, además los rotíferos presentan tamaños que oscila entre 130 a 340 µm permitiendo a las larvas de peces y crustáceos ingerirlos previo a la alimentación con nauplios de *Artemia* sp, lo cual conseguiría altas densidades⁸.

Según Park⁹, afirma que el éxito del cultivo de rotíferos depende de buena oxigenación, pH controlado y suministro de alimento condensado de microalgas de agua dulce, de esta manera se obtiene un cultivo estable de alta densidad poblacional, reduciendo el costo de mano de obra y facilitando el abastecimiento de gran cantidad de rotíferos para larvas de peces.

Por otra parte, Romero *et al* manifiestan que:

En algunos casos el alimento está casi agotado en la recolección y los rotíferos pueden presentar síntomas previos a la inanición que afectan la masa seca del cuerpo y la composición bioquímica con la consiguiente mala calidad nutricional. En tal caso se deben implementar protocolos de enriquecimiento pos cosecha que tengan como finalidad la incorporación de nutrientes en los tejidos del rotífero convirtiéndolo en una presa de buena calidad y mecanismos de cosecha que permitan mantener el tiempo de retención intestinal antes de ser suministrado a larvas de peces¹⁰.

Por lo tanto, esta investigación permitió determinar el tiempo que se debe enriquecer los rotíferos antes de ser suministrados a larvas de peces pequeños, y establecer una frecuencia de alimentación para las mismas, teniendo en cuenta el periodo de retención lo cual incrementaría la supervivencia y crecimiento en la etapa de larvicultura de peces tanto continentales como marinos.

⁷ PRIETO, Martha; CASTAÑO, Fabio; SIERRA, Juan; LOGATO, Priscila; BOTERO, Julián. "Alimento vivo en la larvicultura de peces marinos: copépodos y mesocosmos. En *Revista MVZ. Córdoba*. 2006. p. 30.

⁸ YOSHIMURA, K. Factors inhibiting growth of the rotifer *Brachionus plicatilis* in high-density cultivation by feeding condensed *Chlorella*. *Nippon Suisan Gakkaish* 1994. p. 28

⁹ PARK, Kyun; LEE, Woo; CHO, Sung Hwoan; KIM, Hyung Sun; JUNG, Min; SIN, Kim. High density culture of the freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus*. En *Rotifera IX*. Springer Netherlands, 2001. p. 369-374.

¹⁰ ROMERO, Sonia; YÚFERA, Manuel. Op. cit., p..

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Con base a lo anterior se planteó la siguiente pregunta de investigación, ¿la alimentación de los rotíferos *B. calyciflorus* a diferentes concentraciones de microalga *Chlorella sp* puede generar diferencias en el volumen intestinal y tiempo de retención intestinal en un periodo determinado?

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el periodo cronológico de llenado y evacuación intestinal del rotífero *Brachionus calyciflorus* alimentado a diferentes densidades con microalga *Chlorella* sp.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la condición morfométrica del rotífero de agua dulce *Brachionus calyciflorus*.
- Definir el periodo cronológico de llenado y evacuación intestinal del rotífero *B. calyciflorus* alimentado con diferentes concentraciones de microalga.
- Estimar el volumen intestinal en su máxima repleción con relación al volumen corporal del rotífero *B. calyciflorus*.
- Determinar el tiempo de retención alimenticia del rotífero *B. calyciflorus*.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 TAXONOMÍA DE LOS ROTÍFEROS DEL GÉNERO *Brachionus*.

De acuerdo con Pallas la clasificación taxonómica es:

Reino: Animalia
Phylum: Rotífera
Clase: Eurotatoria
Subclase: Monogononta
Superorden: Pseudotrocha
Orden: Ploima
Familia: Brachionidae
Género: *Brachionus*
Especie: *Brachionus calyciflorus*¹¹.

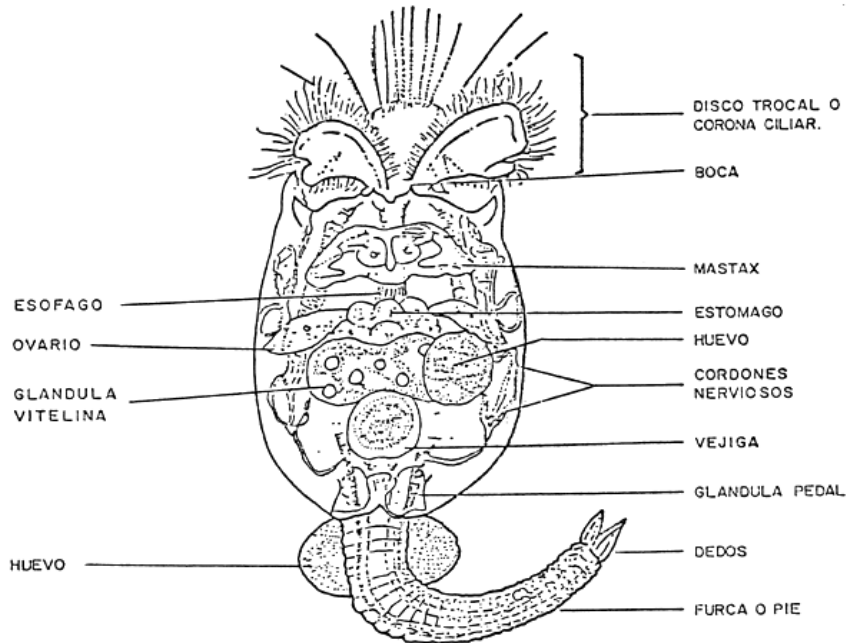
4.2 BIOLOGÍA DE ROTÍFEROS.

Este es un organismo filtrador que no selecciona su alimento por lo que se considera polífago, y tiene una cápsula rígida denominada lorica. 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; de la corona pasan a una faringe y de ésta al aparato masticador denominado mástax, donde se trituran las partículas succionadas para después ser digeridas en el estómago y en él intestino, las glándulas gástricas en la parte anterior del estómago pueden ayudar en la digestión extracelular y finalmente los residuos son excretados por la cloaca, el intestino a veces se pigmenta con alimentos recién ingeridos y el color depende del tipo de alimento consumido. La corona también la utilizan para desplazarse por el agua a modo de turbohélice; en el extremo opuesto a la corona se distingue un pie (generalmente un par de pies) con el cual pueden aferrarse al sustrato¹² (Figura 1).

¹¹ PALLAS, Simón. Base de datos mundial de rotífero (FADA). *Brachionus calyciflorus*, 1766. Disponible en: <http://www.marinespecies.org>.

¹² MENDOZA, M; SALAZAR, M; SUÁREZ, C; MICOLTA, V. Cultivo masivo de rotíferos *Brachionus sp.* Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural a través del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS. Colombia. p. 4.

Figura 1. Esquema de la anatomía externa e interna de un rotífero.



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. 2003. p. 37.

4.3 CARACTERISTICAS GENERALES

El phylum rotífera se compone de un grupo relativamente pequeño de organismos no segmentados, pseudo celomados, invertebrados acuáticos con simetría bilateral. Se conocen alrededor de 2000 especies que pueblan lagos de agua dulce y estanques, pero varias especies son conocidas de aguas salobres o marinas y de musgos y líquenes en los hábitats terrestres húmedos. Aunque los rotíferos son un pequeño filo, son extremadamente importantes en el ambiente de agua dulce contribuyendo hasta en un 30% de la biomasa total del plancton¹³.

Los rotíferos monogontes desarrollan notables grados de polimorfismo que caracterizan poblaciones genéticamente aisladas que acompañan diferencias eco-fisiológicas. Así podemos mencionar formas pequeñas o tipo S que oscilan entre las 150 y 200 μ , o de tipo SS de tamaño entre 70 y 160 μ , ligadas a la existencia de temperaturas superiores a los 28-35°C, y cepas normales o conocidas como L de tamaños de 200 a 350 μ , que presentan su tasa de crecimiento optima a

¹³STØTTRUP, J. and McEVOY, L. Op. cit., p 37.

temperaturas de 25°C, esto permite que el cultivo tenga diferentes tamaños de rotíferos¹⁴.

Espinoza et al¹⁵, afirman que, “dentro de los rotíferos utilizados como alimento vivo se encuentran los del género *Brachionus*, el cual ha demostrado tener potencial para la manutención y desarrollo de especies acuáticas, en especial en las etapas larvales”. Según Dhont¹⁶, “los rotíferos que pertenecen a este género, se han utilizado como alimento vivo en acuicultura desde la década de 1970 por sus características de desarrollo, facilidad de cultivo, aporte nutricional, tamaño adecuado y alta tasa reproductiva”.

4.4 REPRODUCCIÓN DE ROTÍFEROS.

El modo primario de reproducción en rotíferos se denomina partenogénesis que es una forma de reproducción asexual; generalmente cuando las condiciones ambientales son adecuadas los rotíferos femeninos producen hasta 7 huevos simultáneamente sin ningún aporte genético por parte del rotífero macho, estos huevos son genéticamente idénticos y eclosionan para formar nuevos “rotíferos hijas”, después de 12 a 18 horas post-eclosión los rotíferos hijas comienzan a reproducirse y la producción de huevos se mantiene hasta una semana o más¹⁷.

Cano¹⁸, afirma que:

Durante la partenogénesis las hembras amícticas producen también huevos amícticos (diploide, cromosomas 2n), los que se desarrollan nuevamente en hembras amícticas, esta es la manera más rápida de reproducción y por lo tanto la más importante para la producción intensiva de rotíferos, sin embargo, el ciclo de vida puede volverse en reproducción sexual más complicada por condiciones ambientales desfavorables. Durante la reproducción sexual las hembras míticas y amícticas son producidas, aunque ambas no son morfológicamente diferentes; las hembras míticas producen huevos haploides (n cromosomas), y las larvas que son incubadas fuera de estos huevos míticos infértiles se desarrollan en diminutos machos haploides (Figura 2).

¹⁴ORVAY, Francese. Piscicultura marina en Latinoamérica, bases científicas y técnicas para su desarrollo. Publicaciones Universidad de Barcelona. p. 46

¹⁵ ESPINOZA, U. FLORES, A. GONZÁLEZ, A. GONZÁLEZ, C.J. CASTRO J., CASTRO, G. CASTAÑEDA-TRINIDAD, H. Producción controlada de *Brachionus patulus* Müller 1786, utilizando como alimento cuatro dietas a base de microalgas verdes unicelulares en laboratorio. Revista Digital del Departamento El Hombre y su Ambiente. Vol. 1. México D.F. Enero 2014. p. 11.

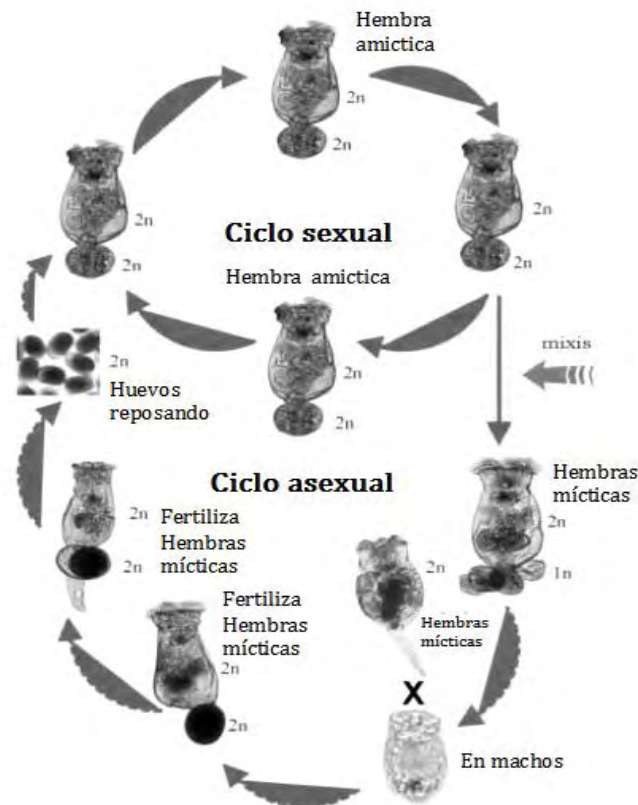
¹⁶ DHONT, J. D. Op. cit., p. 157-160.

¹⁷ ARIMORO, Francis. Culture of the freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus*, and its application in fish larviculture technology. African Journal of Biotechnology. Abraka, Nigeria. 2006, vol. 5, no 7, p. 537.

¹⁸ CANO, A. Cultivo de larvas de pargo de la mancha *Lutjanus guttatus* utilizando rotíferos cultivados y colectados en estanques. Panamá: s.n.e, 1997. p. 128.

La característica más importante del estado fisiológico de los rotíferos es la relación entre el número de huevos en una muestra y el número total de hembras en esa muestra, la proporción de huevos indica la etapa del cultivo exponencial o estacionaria y, más importante provee una estimación del número de rotíferos que es de esperar al día siguiente, la proporción de huevos no debe ser inferior al 10% ya que esto puede indicar un colapso futuro¹⁹. Cuando el cultivo presenta estado de anoxia debido a la sobrepoblación, las hembras producen huevos inactivos fisiológicamente denominándose como una especie xerobionte, es decir sus huevos fertilizados se enquistan y crean formas de resistencia capaces de sobrevivir a los períodos de sequía y desecación en los que el hábitat acuático desaparece por la variación estacional; dichos huevos al ser rehidratados emergen rápidamente (en menos de dos horas) como organismos con capacidad natatoria²⁰.

Figura 2. Ciclo reproductivo de los rotíferos.



STØTTRUP, J. and McEVOY, L. *Live feeds in marine aquaculture*. Vol. 1st ed. Oxford, Oxford: John Wiley & Sons.: UK: Blackwell Science, 2008.

¹⁹DHONT, Op. cit., p. 12.

²⁰STØTTRUP, J. Op. cit., p. 21-36.

4.5 CULTIVO DE ROTÍFEROS *Brachionus calyciflorus*

En la producción artificial de larvas de peces marinos y continentales, los rotíferos son el primer alimento que generalmente se suministra, así mismo su cultivo es un elemento crítico e indispensable en la cría de la mayoría de las especies de peces por lo que ha sido un factor clave en el desarrollo de la producción masiva de juveniles a partir de 1965, año en que se confirmó su valor como alimento en la cría de *P. auratus* y se ha utilizado con éxito desde entonces en decenas de especies²¹.

Según Arimoro²²,

Para poner en marcha el cultivo de rotíferos, se recoge población de rotíferos de medios naturales o cultivos de reserva que deben mantenerse en envases cerrados en una sala aislada para evitar la contaminación con bacterias y ciliados. Los cultivos deben ser aireados y expuestos a fotoperiodo natural y generalmente mantenidos en concentrados de algas. Se debe tener cuidado de no sobrecalentar los cultivos manteniendo temperaturas estables y realizando recambios de agua. Además, existe una gran cantidad de recipientes de cultivo para la producción de rotíferos; cuanto más pequeño sea el contenedor, más pronto tendrá que renovarse para evitar choques debido a la acumulación de amoníaco.

Los cultivos de rotíferos se clasifican de la siguiente manera:

4.5.1 Cultivos puros. Para este tipo de cultivo las algas en su fase de crecimiento exponencial se inoculan con el rotífero *B. calyciflorus*, a temperatura óptima de 20-30°C y pH de 8,0. Además se pueden utilizar otros sustituyentes alimenticios como la levadura de panadería, la harina de camarón molida, el salvado de arroz, algas congeladas y dietas formuladas, son algunas de las fuentes de alimento que se han explotado para el cultivo de rotíferos. El fitoplancton o cualquiera de los sustituyentes mencionados anteriormente se añaden al recipiente, los cultivos se pueden iniciar agregando un mínimo de 10-20 rotíferos/ml para minimizar la posibilidad de mortalidad parcial y total del cultivo o contaminación con protozoarios²³.

4.5.2 Cultivos continuos. En los cultivos continuos de rotíferos se utilizan recipientes más grandes, se añaden rotíferos a una densidad de 10-20 rotíferos/ml al recipiente y se añade fitoplancton para mantener el cultivo en agua verde. Los rotíferos se multiplican y una parte de su población se elimina diariamente para evitar la contaminación del cuerpo de agua, la producción en masa del rotífero de agua dulce *B. calyciflorus* es posible mediante el uso de una colonia de microalga apropiada suplementada con levadura de panadería; la cantidad de levadura de

²¹WATANABE, Nutritional quality of living feeds used in seed production of fish. Proc. 7th Japan-Soviet Joint Symp. 1979. p.126.

²² ARIMORO, Francis O. Op. Cit., p. 537.

²³ Ibíd., p. 539.

panadería suministrada diariamente es aproximadamente 1 g por millón de rotíferos y aunque esta tiene un pequeño tamaño de partícula (5-7µm) posee alto contenido de proteínas siendo aceptable como dieta para *Brachionus*²⁴.

4.5.3 Cosecha de Rotíferos. Cuando los rotíferos alcanzan su punto máximo de vida (5 días)²⁵ en los vasos de plástico, estanques o cultivos en pequeña escala; es aconsejable cosecharlos para evitar mortalidades y posibles contaminaciones; para este ejercicio se recomienda un tamiz de 50 µm, filtrando todo el volumen de cultivo a través del tamiz y los rotíferos recogidos en la malla de plancton se vacían en un recipiente adecuado para su posterior transferencia a los tanques de larvas²⁶. Además la concentración y la cosecha de rotíferos deben realizarse bajo el agua; de lo contrario los animales podrían ser dañados²⁷.

4.6 ALIMENTACIÓN CON MICROALGA

Las microalgas constituyen el primer eslabón orgánico de la cadena trófica acuática, tanto de aguas saladas como dulces y como segundo eslabón de esa cadena a los herbívoros, pequeños organismos que se alimentan de las microalgas y que ellos mismos van a servir de presas a animales carnívoros de talla superior, es decir los constituyentes del zooplancton y que son los que van a utilizarse como alimento de las larvas de los peces y crustáceos objeto del desarrollo acuícola²⁸. Para Gonzales²⁹, “las microalgas son esenciales en el cultivo de larvas de moluscos peces y crustáceos de interés comercial, así como también en la producción de meroplancton, por lo tanto es necesario tener gran cantidad de biomasa microalgal disponible como fuente de alimento para el normal desarrollo y crecimiento de las especies cultivadas”.

²⁴ *Ibíd.*, p. 539.

²⁵ YANG, J., Dong, S., JIANG, Q., KUANG, T., HUANG, W. and YANG, J. Changes in expression of manganese superoxide dismutase, copper and zinc superoxide dismutase and catalase in *Brachionus calyciflorus* during the aging process. *PLoS One*, 8(2), 2013. p.4.

²⁶ ARIMORO, Francis O. *Op. Cit.*, p. 538

²⁷ DHERT, P., ROMBAUT, G., SUANTIKA, G., SORGELOOS, P. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*. 2001. p, 132.

²⁸ ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). *La Acuicultura: Biología, regulación, fomento, nuevas tendencias y estrategia comercial ANÁLISIS DEL DESARROLLO DE LOS CULTIVOS: MEDIO, AGUA Y ESPECIES*. Mundí-Prensa Barcelona Editorial Aedos, s. a. Consell de Cent, 391 - 08009 Barcelona. TOMO I. p. 258.

²⁹ GONZÁLEZ, Breezy; BUITRAGO, Esperanza; FRONTADO, Khenia. Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura. 1999, vol. 59, no 151, p. 78.

Son muchas las especies de microalgas que pueden ser utilizadas como alimento de organismos acuáticos en cultivo³⁰. Infante *et al*³¹, afirman que, “*Chlorella sp* es un alga verde de forma elipsoidal, la cual crece en forma de células simples, pertenece a la división Chlorophyta, a la clase de las Chlorophyceae, a la familia Oocystaceae y al género *Chlorella*, la cual se ha cultivado de forma intensiva con fines de alimentación y obtención de metabolitos, así el sistema por lote es el más utilizado a gran escala por su bajo riesgo de contaminación y fácil implementación”. Según Moreno³², “el género *Chlorella sp* es un organismo ideal para experimentar su capacidad como alimento para zooplancton”. Así mismo Castelló³³ afirma que, “si se alimenta *Brachionus* con *Chlorella sp* esto facilita la reproducción partenogenética y además aporta al rotífero niveles aceptables de ácidos grasos, vitaminas y sales”.

4.7 MORFOMETRÍA

En opinión de Toro *et al*³⁴, “la morfometría es el estudio de la covariación de la forma con factores subyacentes. Su desarrollo en las últimas décadas ha alcanzado áreas de la biología tradicionalmente dedicadas al estudio descriptivo, como las ciencias morfológicas, que con las nuevas herramientas morfométricas geométricas han logrado no sólo objetivar la evaluación cuantitativa de los cambios morfológicos sino también la evaluación cualitativa a través de la recuperación de la forma en estudio”.

El análisis morfométrico sobre *Brachionus calyciflorus* debe ajustarse a los rangos de tamaño como presa viva suministrada a especies de larvas pequeñas comerciales, el tamaño de esas presas debe variar entre 50 y 500 µm, además existen otras especies que necesitan presas con medidas menores de 150-170 pm y entre 50 y 100 µm. Para la toma de medidas en rotíferos del género *Brachionus* se debe tener en cuenta la medida de longitud corporal (b) y longitud de la espina

³⁰ GÓMEZ, Olga; RODRÍGUEZ, Roelia; SUBERO, Sonia. Cultivo polialgal (*Chaetoceros gracilis*, *Chlorella sp.* y *Tetraselmis chuii*) en medios nutritivos no convencionales. SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, 2011, vol. 23, no 1, p. 86.

³¹ INFANTE, Cherlys; ANGULO, Edgardo; ZÁRATE, Ana; FLOREZ, July Z.; BARRIOS, Freddy; ZAPATA, Cindy. Propagación de la microalga *Chlorella sp.* en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular Avances en Ciencias e Ingeniería, vol. 3, núm. 2, abril-junio, 2012.

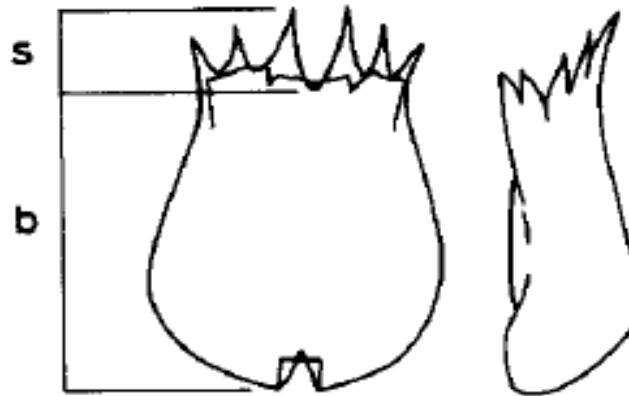
³² MORENO, Yesid. PATARROYO, Nelson. RAMIREZ, Hernando. La importancia del uso de indicadores biológicos en los estudios de impacto ambiental. Universidad industrial Santander. Escuela de Química Bogotá Colombia. 2006. p. 98.

³³ CASTELLÓ, F. ACUACULTURA MARINA: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Publicaciones Universidad de Barcelona 1993. p. 322.

³⁴ TORO, María; MANRIQUEZ, Germán; SUAZO, Iván. Morfometría Geométrica y el Estudio de las Formas Biológicas: De la Morfología Descriptiva a la Morfología Cuantitativa. *International Journal of Morphology*, 2010, vol. 28, no 4, Chile. p. 985.

medial (s); la longitud total se define como la sumatoria de las dos medidas como se muestra en la Figura 3³⁵.

Figura 3. Criterios para la toma de medidas del rotífero *Brachionus calyciflorus*.



Tomado de Yufera (1982).

³⁵ YUFERA, M. Morphometric characterization of a small-sized strain of *Brachionus plicatilis* in culture. *Aquaculture*, 1982, vol. 27, no 1, Amsterdam p. 56.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 LOCALIZACIÓN

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Organismos Hidrobiológicos Ornamentales del programa de Ingeniería en Producción Acuícola de la Universidad de Nariño sede Torobajo, ubicada al noroeste de la ciudad de San Juan de Pasto, Departamento de Nariño, latitud 1° 08' 25", altura de 2510 msnm, temperatura promedio 14°C, precipitación anual 1180 mm y humedad relativa 75%³⁶.

5.2. MATERIAL BIOLÓGICO

5.2.1 Microalgas. Se realizó el cultivo de microalga *Chlorella* sp, a partir de cepas pertenecientes al laboratorio de Ficología y Productividad primaria de la Universidad de Nariño; con el propósito de brindar alimentación al cultivo de rotíferos.

5.2.2 Rotíferos. El cultivo de rotíferos *Brachionus calyciflorus*, se inició a partir de una cepa de huevos diapausa del laboratorio de Ficología y Productividad Primaria de la Universidad de Nariño.

5.3 MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS

5.3.1 Materiales.

- Cajas multiceldas Primo® Multiwell plates 6 TC.
- Piedras difusoras.
- Mangueras para aireación diámetro 3/16 pulgadas.
- Cámara Sedgewick Rafter.
- Cámara Neubauer.
- Recipientes plásticos.
- Cajas Petri.
- Tubos de ensayo.
- Erlenmeyers 500 mL.
- Recipientes de vidrio 3 litros.
- Baldes plásticos de 20 litros.

5.3.2 Equipos.

- Microscopio con micrómetro OLYMPUS CX 21®.
- Termómetro BRIXCO®.
- Multi-parametros EXTSH S-500®.
- Blower RESUM LP-60®.

³⁶ IDEAM, Instituto de hidrología meteorología y estudios ambientales de Colombia, pronóstico de alerta sobre el clima.

- Licuadora UNIVERSAL®.
- Destilador de agua IKA®.
- Autoclave tipo olla Modelo 75X All American®.
- Cámara fotográfica SAMSUNG®.
- Soporte para cámara CELESTROM®.

5.3.3 Insumos.

- Sal marina.
- Hipoclorito de sodio 5%.
- Agua destilada.
- Acid Buffer™ Seachem ®.
- Alkaline Buffer™ Seachem ®.
- Acondicionador de agua Kordon®.
- Desintoxicador de amonio Kordon®.
- Glucosa.
- Medios de cultivo para microalga KENT Marine-Proculture ® A y B.

5.4 PLAN DE MANEJO

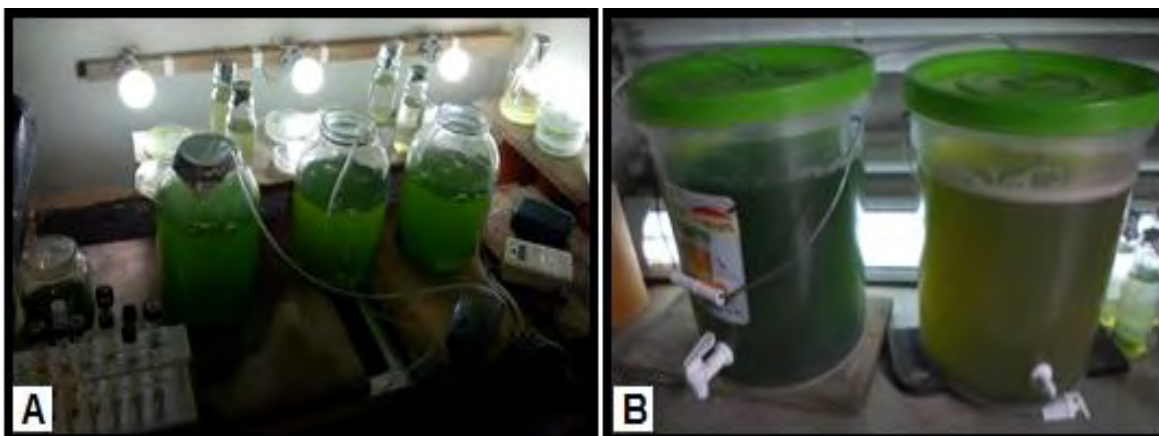
5.4.1 Adecuación de instalaciones. Se desinfectó con Hipoclorito de sodio comercial al 5% todas las instalaciones del laboratorio, equipos y materiales a utilizar. Para la asepsia de los recipientes a utilizar en los medios de cultivo se utilizó una solución a base de sal marina en concentraciones de 4g/L y solución de hipoclorito de sodio 5%; una vez limpios se llenaron los recipientes y se instaló la aireación.

5.4.2 Producción de Microalgas. Para el desarrollo de esta investigación fue necesario realizar una producción escalonada de microalga *Chlorella* sp³⁷, partiendo del manejo de cepas en cajas Petri, tubos de ensayo, erlenmeyers de 500 ml, recipientes de 3 litros y baldes de 20 litros (Figura 4); los cuales contenían los medios de cultivo comerciales para microalga KENT Marine-Pro culture ® A y B. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio con temperatura que oscilo entre 22 y 24°C, intensidad lumínica artificial 5340 Lux y aireación constante; así mismo la pureza de los cultivos se verifico mediante la observación al microscopio de una muestra de cada uno de estos, con el fin de determinar la presencia de la especie a trabajar *Chlorella* sp, además se utilizó glucosa a cantidades de 1g/L, como fuente de carbono orgánico para aumentar la velocidad de crecimiento y obtener mayor productividad de biomasa³⁸.

³⁷ SIPABUA, L; ROCHA, O. Produção de plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para a alimentação de organismos aquáticos. RiMa, São Carlos. 2003.

³⁸ ARDILA, A; LOPEZ, Y; VASQUEZ, M; GONZALES, A; BARAJAS, A. Obtencion de lipidos y carbohidratos a partir de microalgas mediante el diseño de medios de cultivo selectivos. Tecno Lógicas. 2017. vol.20. Colombia. p. 85.

Figura 4. Cultivo de microalga *Chlorella sp.*



A. Cultivo de *Chlorella sp* en Cajas Petri, tubos de ensayo, erlenmeyers de 500 ml y recipientes de 3L, **B.** Cultivo en baldes de 20L.

5.4.3 Condensación de *Chlorella sp.* Después de realizar el cultivo escalonado de microalga *Chlorella sp*, a 20L se suspendió las líneas de aireación por un periodo de 8 días en presencia de luz artificial tiempo en el cual la microalga se precipito, luego se extrajo el precipitado por succión con ayuda de una manguera de 0,23 pulgadas de diámetro y se almacenó en recipientes en un refrigerador a 4 °C (Figura 5). Cabe resaltar que la aplicación de glucosa favoreció el proceso de condensación reduciendo el periodo a 3 días, por tal razón Bermúdez³⁹ afirma que la aplicación de glucosa incrementa el peso celular en microalgas, debido al carbono orgánico que estas almacenan para desarrollar sus procesos metabólicos.

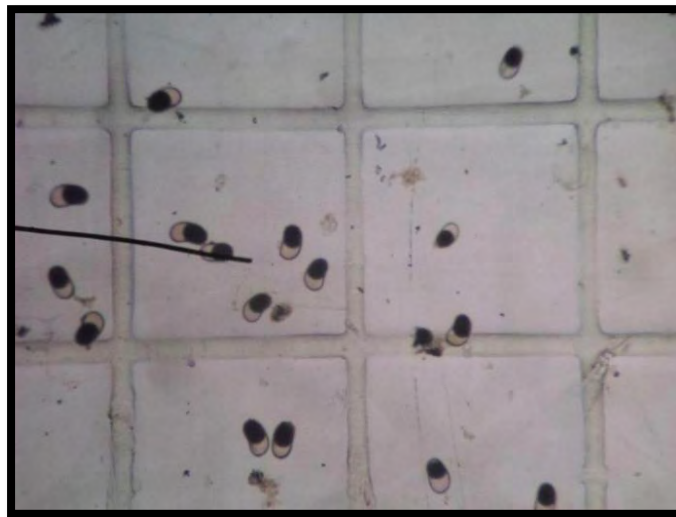
Figura 5. Microalga condensada *Chlorella sp.*



³⁹ BERMÚDEZ, J., SÁNCHEZ, G., FUENMAYOR, G., MORALES, E. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de pigmentos de la microalga marina *Chromonas sp.* *Ciencia*, 2003, vol. 11, no 4. Maracaibo Venezuela. p. 266

5.4.4 Cultivo de Rotíferos. El cultivo de rotíferos inicio a partir de una cepa de huevos secos en estado de diapausa (inactivos fisiológicamente) (Figura 6), posteriormente se preparó el agua a utilizar para el cultivo de los rotíferos con acondicionador Kordon® y desintoxicador de amonio Kordon® en cantidades de 0,5 mL por cada 20 litros de agua con el fin de neutralizar cantidades de cloro y elementos que puedan afectar el cultivo; además se estabilizo el pH entre 7,5 y 8,5 con ayuda de Acid y Alcaline Buffer™ Seachem®. Dichos huevos se eclosionaron en recipientes de vidrio con un volumen de 2 Litros, se suministró aireación suave, agua acondicionada y la microalga *Chlorella* sp como alimento a saciedad, se mantuvo una temperatura constante de 28°C y después de 3 días los rotíferos eclosionaron en la columna de agua; diariamente se suministró microalgas como alimento utilizando 1 mL de condensado por cada 4000 rotíferos.

Figura 6. Huevos en estado de diapausa.



5.4.5 Periodo de llenado del intestino en rotíferos. Para determinar el tiempo de llenado intestinal, los rotíferos se mantuvieron en primer lugar bajo condiciones de ayuno durante 24 horas con el propósito de vaciar el intestino. Los rotíferos se trasladaron a recipientes de vidrio de 3 litros y a densidades de 40 animales/mL donde se alimentaron con algas a cuatro concentraciones diferentes, $1,2 \times 10^6$ cel/mL, $5,2 \times 10^6$ cel/mL, $10,4 \times 10^6$ cel/mL y $15,4 \times 10^6$ cel/mL (Figura 7).

Para calcular la cantidad de microalga a suministrar se utilizó la fórmula de concentraciones y volúmenes:

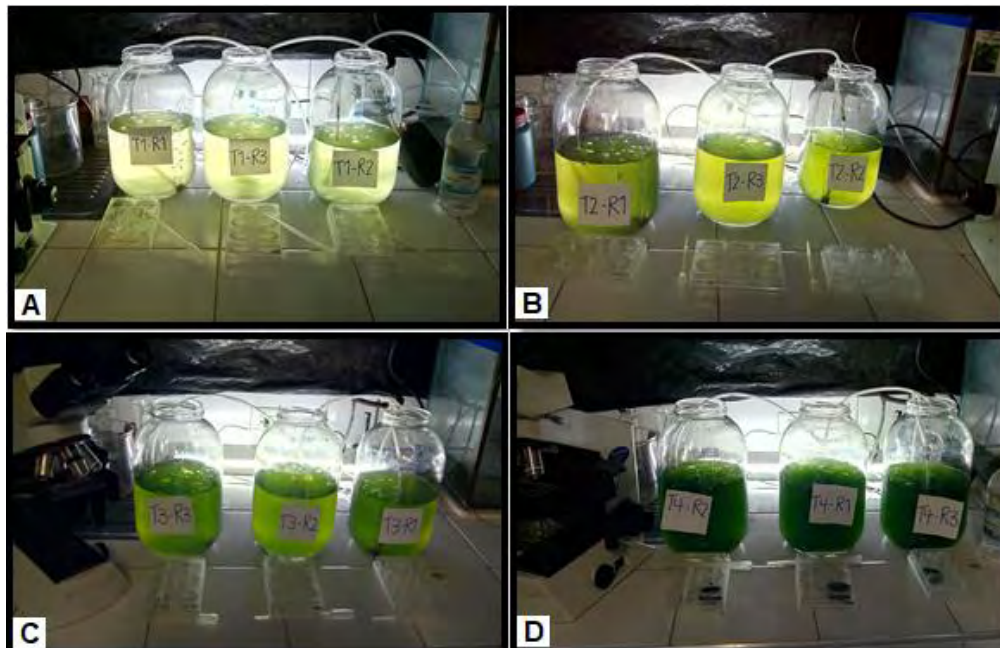
$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad (1)$$

De la cual se despejo V_2 dando como resultado la siguiente formula:

$$V_2 = \frac{C_1 V_1}{C_2} \quad (2)$$

Donde V_2 : es el volumen del condensado que se aplico en el tratamiento, C_1 : es la concentración de Cel/mL por tratamiento, V_1 : es volumen de cada tratamiento y C_2 : es la cantidad total de Cel/mL presentes en el condensado.

Figura 7. Unidades experimentales.



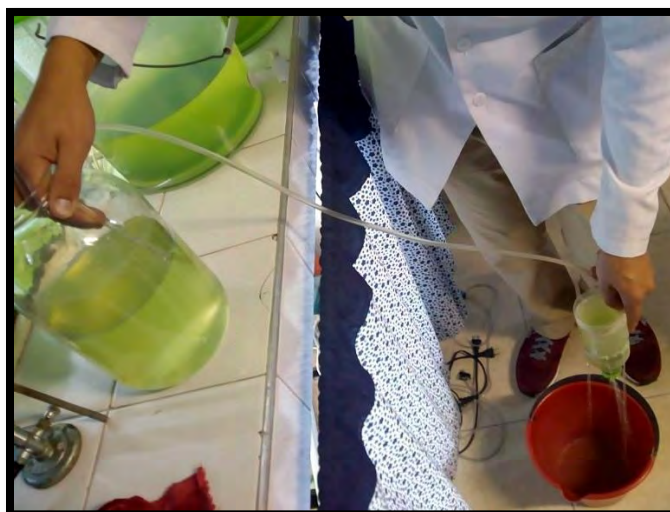
A. Tratamiento 1 ($1,2 \times 10^6$ Cel/mL), **B.** Tratamiento 2 ($5,2 \times 10^6$ Cel/mL), **C.** Tratamiento 3 ($10,4 \times 10^6$ Cel/mL), **D.** Tratamiento 4 ($15,4 \times 10^6$ Cel/mL).

La densidad de los rotíferos sobre las unidades de cultivo fue 40 individuos/mL, para evitar que la ingestión afecte la concentración de células de microalgas durante el tiempo experimental. Para verificar la densidad a utilizar se realizó un conteo, tomando 1 mL de muestra cosechados con una pipeta la cual se deposita en la cámara Sedgewick Rafter, quien fue observada en el microscopio a un objetivo de 10x.

Posteriormente, los rotíferos fueron muestreados en los cuatro tratamientos durante un periodo de 4 horas (para garantizar el comportamiento intestinal en presencia de alimento) tomando una pequeña muestra de cada tratamiento; las muestras se fijaron en formalina 5% en cajas multiceldas, se llevaron a microscopio y se tomaron fotografías cada 15 minutos, donde se midió el área del cuerpo y del intestino por medio del software Image J.

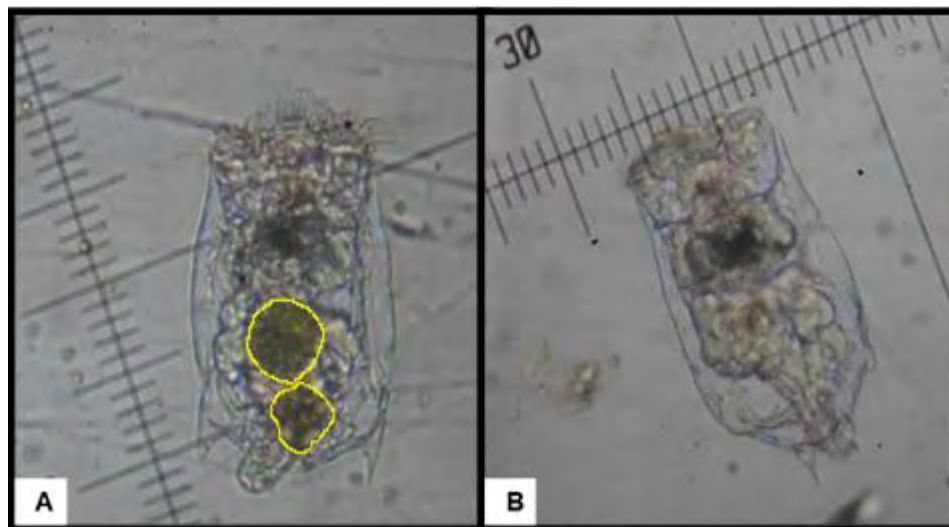
5.4.6 Patrón de evacuación intestinal en rotíferos. Para determinar el patrón de evacuación, los rotíferos fueron alimentados primero con microalgas a diferentes concentraciones según los tratamientos mencionados anteriormente. A continuación, se desecharon las células de microalgas por filtración húmeda (Figura 8), la cual consiste en descartar las células conservando rotíferos en un volumen de agua reducido. Los rotíferos se muestrearon en diferentes momentos durante un periodo de 3 horas (debido a que el periodo de evacuación intestinal es menor al periodo de llenado intestinal) y se fijaron en formalina al 5% en cajas multiceldas, la primera muestra se tomó justo después de la filtración húmeda (considerada como tiempo 0) a partir del cual se tomaron muestras consecutivas cada 15 minutos, se llevaron a microscopio y se tomaron fotografías sucesivamente. La disminución del volumen del intestino se presentó como porcentaje del volumen total del cuerpo.

Figura 8. Filtración húmeda.



5.4.7 Análisis morfométrico. Se realizó mediante análisis de imagen en 8 rotíferos de cada muestra, se tomaron fotografías bajo un microscopio con un aumento de 10x; igualmente las imágenes fueron analizadas utilizando el software libre Image J, donde el ancho, la longitud del cuerpo y el área del intestino se midieron en cada individuo. Para la medida del intestino el criterio fue considerar sólo el área de las vesículas que contengan microalgas (color verde de la imagen), esta zona estuvo compuesta de 1 o 2 manchas correspondientes a las así llamadas vesículas o cavidades intestinales (Figura 9).

Figura 9. Vesículas intestinales del rotífero *Brachionus calyciflorus* (subrayado con amarillo).



A. Rotífero *Brachionus calyciflorus* con vesículas intestinales llenas, **B.** Rotífero *Brachionus calyciflorus* con vesículas intestinales vacías.

Por otra parte, para la estimación de viabilidad alimenticia se tuvo en cuenta los mejores tratamientos respecto a volumen intestinal, cantidad de alga suministrada en Cel/mL y tiempo de tránsito intestinal. En cuanto al manejo de rotíferos, llenado, evacuación intestinal y análisis morfométrico, fue basada en la metodología descrita por Romero et al (2012)⁴⁰.

5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron cuatro tratamientos con diferentes concentraciones las cuales se plantearon con base en el trabajo realizado por Romero et al (2012)⁴¹, estableciendo algunas modificaciones de la siguiente manera:

T1: $1,2 \times 10^6$ Cel/mL

T2: $5,2 \times 10^6$ Cel/mL

T3: $10,4 \times 10^6$ Cel/mL

T4: $15,4 \times 10^6$ Cel/mL

La evaluación se realizó utilizando un diseño completamente al azar (DCA) con sub muestreo, conformado por cuatro tratamientos y tres replicas por tratamiento, para tener un total de 12 unidades experimentales. Cada unidad experimental estuvo conformada por un recipiente de tres litros y una densidad de rotíferos sobre las unidades de cultivo de 40 individuos/mL.

⁴⁰ ROMERO, Sonia; YÚFERA, Manuel. Op. Cit., p 125.

⁴¹ Ibíd., p. 126

Para los resultados se realizaron modelos lineales, con el fin de verificar si existía relación entre el volumen del rotífero, el tratamiento, el tránsito intestinal y el tiempo en que se realizó el ensayo. Se utilizaron métodos de estadística descriptiva, con tablas y gráficos, para las variables que cumplan con los supuestos estadísticos se aplicó análisis de varianza (ANOVA), al encontrar diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó una prueba múltiple de Tukey para establecer la diferencia significativa entre tratamiento y tratamiento. Todas las pruebas se efectuaron con un $\alpha=0.05$ y todos los datos se analizaron a través del programa estadístico R.

5.5.1 Variables evaluadas.

5.5.1.1 Volumen del cuerpo rotífero. Se calculó de acuerdo con un elipsoide de revolución, debido a que la forma del rotífero es ovoide. Para cada individuo, se obtuvieron el ancho y la longitud (μm) midiendo la lorica sin espinas⁴².

$$\text{volumen de rotifero}(\mu\text{m}^3) = \frac{4}{3} \pi \times a \times b^2 \quad (3)$$

Dónde: a y b son la mitad de los ejes mayor y menor (longitud y anchura), respectivamente. Se considera que las cavidades intestinales tienen una forma esférica y el volumen se calculó a partir del área.

5.5.1.2 Volumen del intestino. Se calculó mediante la obtención de áreas utilizando la fórmula planteada por Romero et al (2012)⁴³

$$\text{volumen intestinal} (\mu\text{m}^3) = \frac{4}{3} \left(A_1 \sqrt{\left(\frac{A_1}{\pi}\right)} \right) + \frac{4}{3} \left(A_2 \sqrt{\left(\frac{A_2}{\pi}\right)} \right) \quad (4)$$

Dónde: A_1 y A_2 corresponden al área (μm^2) de las dos cavidades intestinales medida en las imágenes.

5.5.1.3 Volumen intestinal expresado en porcentaje. Teniendo en cuenta la variabilidad del tamaño corporal, el volumen del intestino se presentó como porcentaje relacionado con el volumen total del cuerpo.

$$\% \text{ intestinal} = \frac{V_I}{V_C} \times 100 \quad (5)$$

Dónde: V_I es el volumen del intestino, V_C es el volumen del cuerpo del rotífero.

⁴² YUFERA, M. Op. Cit., p 57.

⁴³ ROMERO, Sonia; YÚFERA, Manuel. Op. Cit., p 126.

5.5.1.4 Tiempo de llenado y evacuación intestinal. Se calculó teniendo en cuenta el tiempo inicial y final del ensayo.

$$T = T_F - T_I \quad (6)$$

Dónde: T_F es el tiempo en el que se estabiliza la curva de crecimiento en el tránsito intestinal y T_I es el tiempo en el que inicia el ensayo.

5.5.2 Formulación de hipótesis. Se plantearon hipótesis nula y alterna evaluando las variables de estudio por tratamiento, así

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

No existen diferencias significativas en los tratamientos.

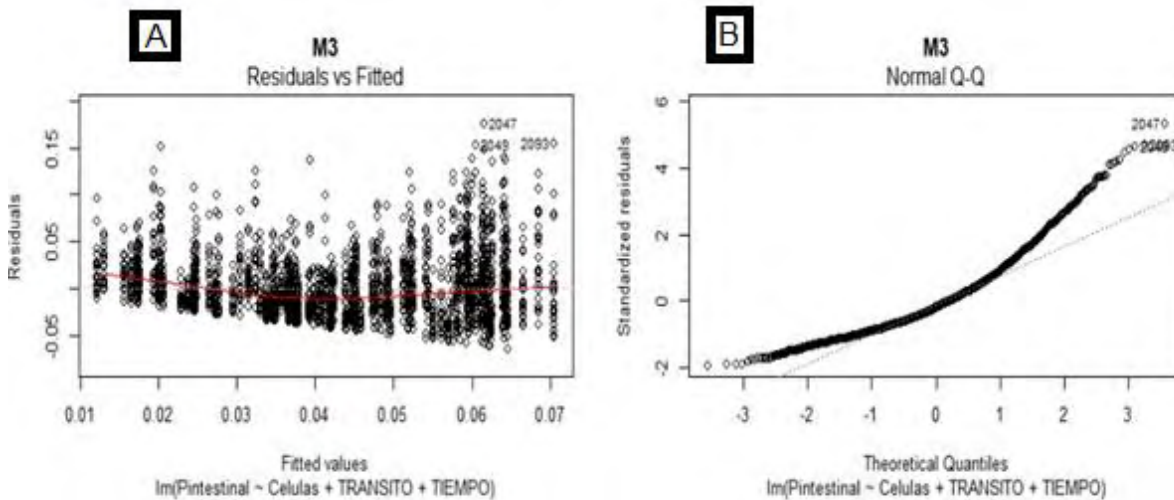
$$H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$$

Por lo menos uno de los tratamientos presenta diferencias significativas en las variables evaluadas.

6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se observó el comportamiento de los datos mediante un modelo lineal donde los valores se ajustaron a la curva de normalidad (Figura 10); parte A de la imagen representa la prueba de homocedasticidad comportamiento de los datos a partir de la media; Parte B ajuste de los datos a la normalidad.

Figura 10. Valores ajustados a la curva de normalidad.



6.1 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

El análisis morfométrico se realizó con base al volumen corporal del rotífero, donde los tratamientos fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA con nivel de significancia ($p \leq 0.05$), el cual estableció diferencias significativas entre los tratamientos (Anexo A), así mismo se realizó la prueba múltiple de Tukey (Anexo B) con el fin de identificar las diferencias estadísticas entre los tratamientos, de acuerdo con esta prueba indica que existen diferencias significativas como se expresa en la Tabla 1.

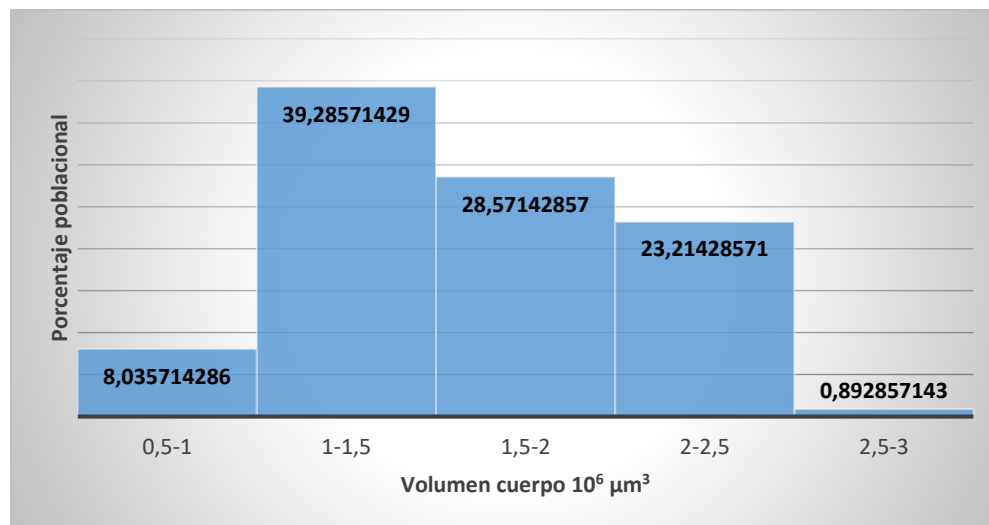
Tabla 1. Prueba de Tukey para volumen del cuerpo del rotífero.

TRATAMIENTO	P adj (significancia)	Diferencia significativa
T ₁ -T ₃	0	Existe
T ₂ -T ₃	0	Existe
T ₄ -T ₃	0	Existe
T ₂ -T ₁	0	Existe
T ₄ -T ₁	0	Existe
T ₄ -T ₂	0	Existe

Se observa el rango de volumen del cuerpo el cual osciló entre $0,7 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ a $2,6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ (Anexo C), encontrándose más del 90% de la población entre un volumen

corporal de $1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ y $2,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ donde el 39% se encuentra entre 1 y $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, el 28% entre 1,5 y 2×10^6 y el 23% representa un volumen de 2 a $2,51,5 \times 10^6$ como se expresa en la Figura 11.

Figura 11. Histograma de frecuencia para volumen del cuerpo.



Según Romero *et al*⁴⁴ en un estudio similar con rotíferos del género *Brachionus*, los datos reportados sobre volumen del cuerpo oscilaron entre $0,73$ y $4,21 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ encontrándose la mayoría de la población entre $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ y $2 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ y Xue Ying-Hao *et al*⁴⁵ en un estudio de morfometría en rotíferos *B. calyciflorus* encontraron un rango de $1,6 \times 10^6$ a $2,2 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, ajustándose a los datos evaluados en esta investigación. Por otra parte, Baer *et al*⁴⁶ afirman que el volumen corporal promedio en rotíferos del género *Brachionus* es de $1,51 \times 10^6 \mu\text{m}^3$; que asemeja al valor promedio obtenido en este estudio el cual fue de $1,6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$.

6.2 TIEMPO DE LLENADO Y EVACUACIÓN INTESTINAL

6.2.1 Tiempo de llenado intestinal.

Para analizar el tiempo de llenado se tuvo en cuenta las variables porcentaje intestinal y tiempo en la primera fase del ensayo. En la Figura 12 se muestra las curvas de regresión lineal que indican la velocidad de llenado intestinal, hasta los 240 minutos de ensayo. Los rotíferos inician el periodo de llenado inmediatamente después de suministrar las concentraciones de microalga correspondiente a cada tratamiento. A los 60 minutos los rotíferos han llenado una parte considerable de

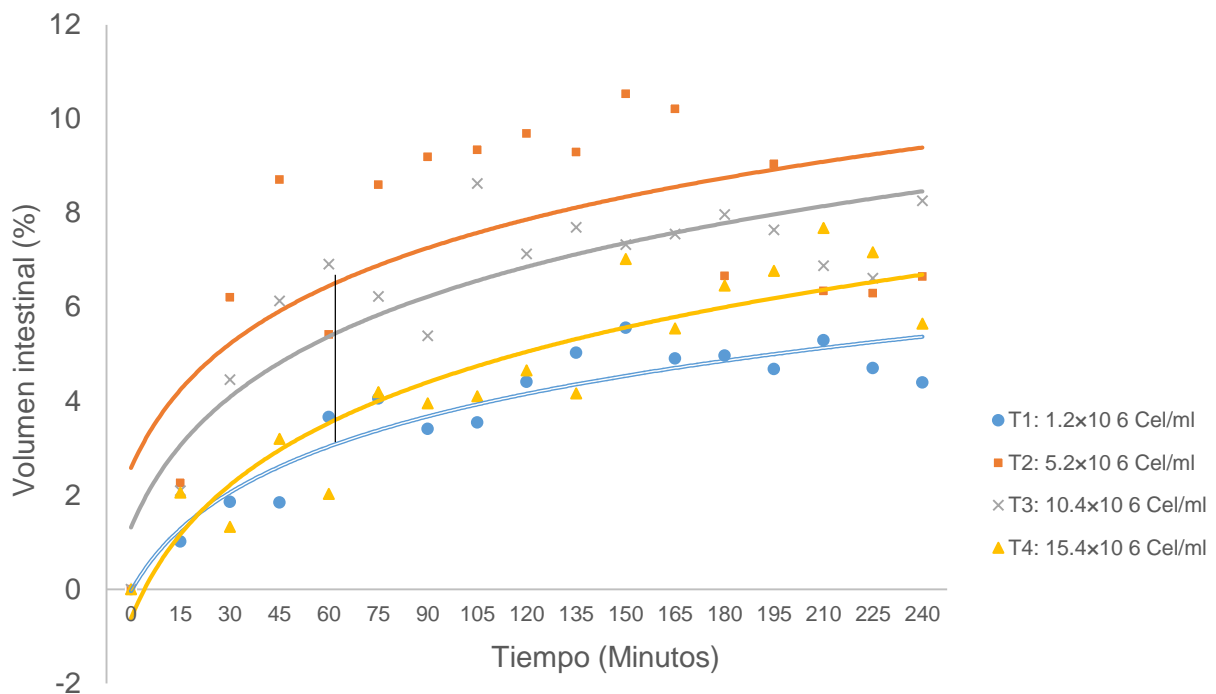
⁴⁴ ROMERO, Sonia; YÚFERA, Manuel. Op. Cit., p 128.

⁴⁵ XUE, Ying Hao; *et al.* Morphological differentiation of *Brachionus calyciflorus* caused by predation and coal ash pollution. En *Scientific reports*. 2017, vol. 7 no 1. p 5.

⁴⁶ BAER, Andreas. *et al.* Particle size preference, gut filling and evacuation rates of the rotifer *Brachionus* "Cayman" using polystyrene latex beads. En *Aquaculture*. 2008. Vol 282 no 1-4. pag 75.

sus intestinos, aproximadamente un 80% del contenido intestinal. Estos valores fueron similares a los mencionados por Romero *et al*⁴⁷, quienes reportan un intestino lleno 60 minutos después del inicio del enriquecimiento. Baer *et al*⁴⁸ en un experimento con micro capsulas de látex reportaron un periodo de llenado más corto de 35 minutos después de iniciado el enriquecimiento, pero ese volumen aumento ligeramente después de 20 minutos adicionales, manteniéndose estable durante el resto del ensayo; lo cual se asemeja al tiempo de llenado observado en esta investigación.

Figura 12. Periodo de Llenado intestinal del rotífero *Brachionus calyciflorus* en los tratamientos.



En la Tabla 2 se observa el tiempo en que se estabiliza la curva de regresión lineal con los volúmenes intestinales para cada tratamiento. Después de este periodo se observó una leve variación en el volumen intestinal durante el resto del ensayo aclarando que esa variación fluctúa entre el 1% y 2%.

⁴⁷ ROMERO, Sonia; YÚFERA, Manuel. Op. Cit., p 125.

⁴⁸ BAER, Andreas; *et al.* Op. Cit., p 76.

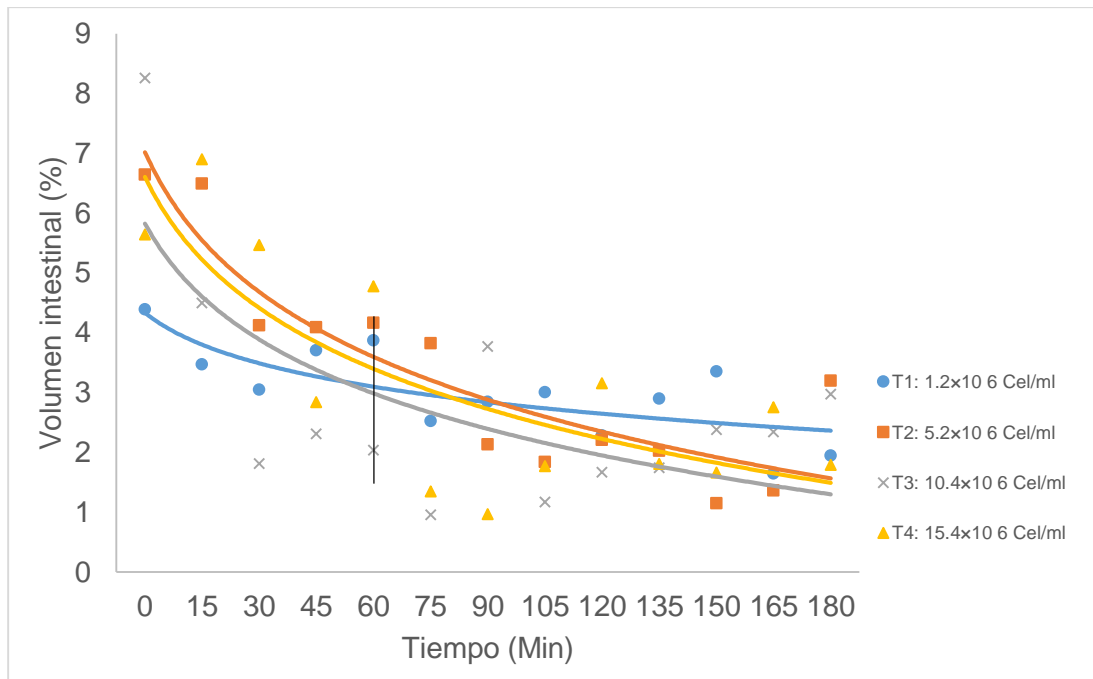
Tabla 2. Tiempo de estabilización fase de llenado

Tratamiento (Cel /mL)	$1,2 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$	$10,4 \times 10^6$	$15,4 \times 10^6$
Vol. Intestinal%	4,06	6,22	8,59	4,19
Tiempo (min)	60	60	60	60

6.2.2 Tiempo de evacuación intestinal.

Para analizar de evacuación intestinal, se tuvo en cuenta las variables porcentaje intestinal y tiempo en la segunda fase del ensayo. En la Figura 13, se expresan las curvas de regresión que indican la velocidad de evacuación, se descartó las concentraciones celulares de todos los tratamientos mediante un método de filtración húmeda, para evitar daños que generen una disminución repentina del 60% del volumen intestinal⁴⁹.

Figura 13. Periodo de Evacuación intestinal del rotífero *Brachionus calyciflorus* para los diferentes tratamientos.



El proceso de evacuación es relativamente rápido; los datos expresados indican que a los 60 minutos de iniciado el ensayo se produce la evacuación intestinal parcial 70% del contenido intestinal del rotífero *Brachionus calyciflorus*. Baer *et al*⁵⁰

⁴⁹ DHERT, P. *et al.* Op. Cit., p 129–146.

⁵⁰ BAER, Andreas; *et al.* Op. Cit., p 76.

encontró que el proceso de evacuación oscila entre 20 y 30 minutos, sin embargo Romero *et al*⁵¹ afirma que la disminución del volumen del intestino se produce progresivamente y se necesita 1 hora para perder el 60% del contenido, además sostiene que las curvas de evacuación son similares cuando los rotíferos se re-suspenden sobre agua limpia, como se obtuvo en esta investigación a excepción del T₁ que presentó un proceso de evacuación más lento a comparación de los demás tratamientos debido a la baja cantidad de alga suministrada⁵². Incluso Dhert *et al*⁵³ afirman que la evacuación intestinal se producirá en un sistema de agua verde con 0.4×10^6 cel/mL. Srivastava⁵⁴ en un estudio de enriquecimiento con yodo y vitaminas en rotíferos *Brachionus sp*, encontró que la evacuación se produjo después de una hora, resultado similar al obtenido para este estudio.

6.3 VOLUMEN INTESTINAL EN SU MÁXIMA REPLECIÓN CON RELACIÓN AL VOLUMEN CORPORAL DEL ROTÍFERO

Se realizó un análisis de varianza ($p \leq 0,05$) aplicando logaritmo más 1 a la variable volumen intestinal, la cual estableció diferencias significativas entre los tratamientos (Anexo D), así mismo se realizó la prueba múltiple de Tukey (Anexo E) con el fin de identificar las diferencias estadísticas entre los tratamientos, de acuerdo con esta prueba indica que existen diferencias significativas como se expresa en la Tabla 3.

Tabla 3. Prueba de Tukey para volumen del intestino.

TRATAMIENTO	P adj (significancia)	Diferencia significativa
T ₁ -T ₃	0,0140617	Existe
T ₂ -T ₃	0,6409182	No existe
T ₄ -T ₃	0,0571780	Existe
T ₂ -T ₁	0,2587223	Existe
T ₄ -T ₁	0,9613786	Existe
T ₄ -T ₂	0,5364131	Existe

En la Tabla 4 se indica los valores para cada tratamiento en cuanto a volúmenes y porcentaje intestinal. Para esta investigación se encontraron porcentajes de 5,5% para el tratamiento 1, 8.62% para el tratamiento 2, 10.53% en el tratamiento 3 y 8.08% en el tratamiento 4; estos porcentajes fueron relativamente bajos en relación a los porcentajes encontrados por Romero *et al*⁵⁵ que fueron del 13% en su máxima

⁵¹ ROMERO, Sonia; YÚFERA, Manuel. Op. Cit., p 125.

⁵² *Ibíd.*, p. 128

⁵³ DHERT, P. *et al*. Op. Cit., p 140.

⁵⁴ SRIVASTAVA, A; HAMRE, K; STOSS, J; NORDGREEN, A. A study on enrichment of the rotifer *Brachionus* "Cayman" with iodine from different sources. *Aquaculture*. vol. 334. 2012. p, 82-88.

⁵⁵ ROMERO, Sonia; YÚFERA, Manuel. Op. Cit., p 127.

repleción. En esta investigación volumen máximo 201752,09 μm^3 represento 10.53% del volumen total del cuerpo, Kleinow *et al*⁵⁶ afirman que el volumen intestinal no supera los 200.000 μm^3 .

Tabla 4. Valores máximos alcanzados en el ensayo.

Tratamiento	Vol. Cuerpo μm^3	Vol. Intestinal μm^3	% Intestinal
1	2255212,67	87683,64	5,55
2	1695434,45	107451,90	8,62
3	2632882,57	201752,09	10,53
4	1986483,05	100636,10	8,08

Teniendo en cuenta los valores máximos obtenidos en esta investigación se puede afirmar que el volumen del cuerpo en relación con el porcentaje intestinal se vio afectado por la concentración celular y el tamaño del rotífero, pero el volumen intestinal no se vio afectado por el tamaño del rotífero y se reportaron porcentajes intestinales similares independientemente del tamaño del individuo. A pesar que el tratamiento 2 y 4 presentaron volúmenes similares la prueba Tukey arrojó diferencias significativas debido al comportamiento del volumen intestinal durante el ensayo, pero el tratamiento 2 no presentó diferencias significativas respecto al tratamiento 3; Yúfera *et al*⁵⁷, en un estudio con *Brachionus plicatilis* afirmó que las tasas de ingestión disminuyen a concentraciones de células superiores a 15×10^6 Cel/mL.

En el ensayo realizado por Romero *et al*⁵⁸, sobre el comportamiento del volumen intestinal en *Brachionus plicatilis* los volúmenes intestinales se mantuvieron estables entre 1 y 3 horas, entre las 3 horas y media y 3 horas 45 minutos experimentaron un leve descenso antes de la filtración húmeda. A pesar de que los volúmenes máximos intestinales para esta investigación se mantuvieron estables, fluctuaron con mayor frecuencia cerca de las 3 horas 35 minutos (Anexos F - I).

En cuanto al diámetro de *Chlorella sp* suministrada para cada tratamiento oscilo entre 3,03 y 9,16 μm y el volumen de la célula alcanzó un valor máximo de 3219,4 μm^3 (Anexo J) contrastando los estudios descritos por Baer⁵⁹, donde se realizó pruebas con perlas de poliestireno en el cual los rotíferos ingirieron partículas con diámetros de 1,6 a 12 μm y volúmenes promedio de 2989 a 3455 μm^3 por lo tanto

⁵⁶ KLEINOW, W; WRATIL, H; KUHLE, K; ESCH, B. Electron microscope studies of the digestive tract of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). En *Zoomorphology*. 1991. p 67.

⁵⁷ YÚFERA, M.; PASCUAL, E. Effects of algal food concentration on feeding and ingestion rates of *Brachionus plicatilis* in mass culture. *Hydrobiologia*, 1985, vol. 122, no 2, p. 185

⁵⁸ ROMERO, Sonia; YÚFERA, Manuel. Op. Cit., p 126.

⁵⁹ BAER, Andreas; *et al*. Op. Cit., p 78

esta especie de microalga se encuentra dentro de los rangos de medida aptos para ser ingeridos por los rotíferos.

6.4 TIEMPO DE RETENCION ALIMENTICIA DEL ROTÍFERO *B. calyciflorus*.

Para determinar el tiempo de viabilidad o retención en que se tuvo en cuenta las variables volumen intestinal expresado en porcentaje y tiempo en el que duro el ensayo.

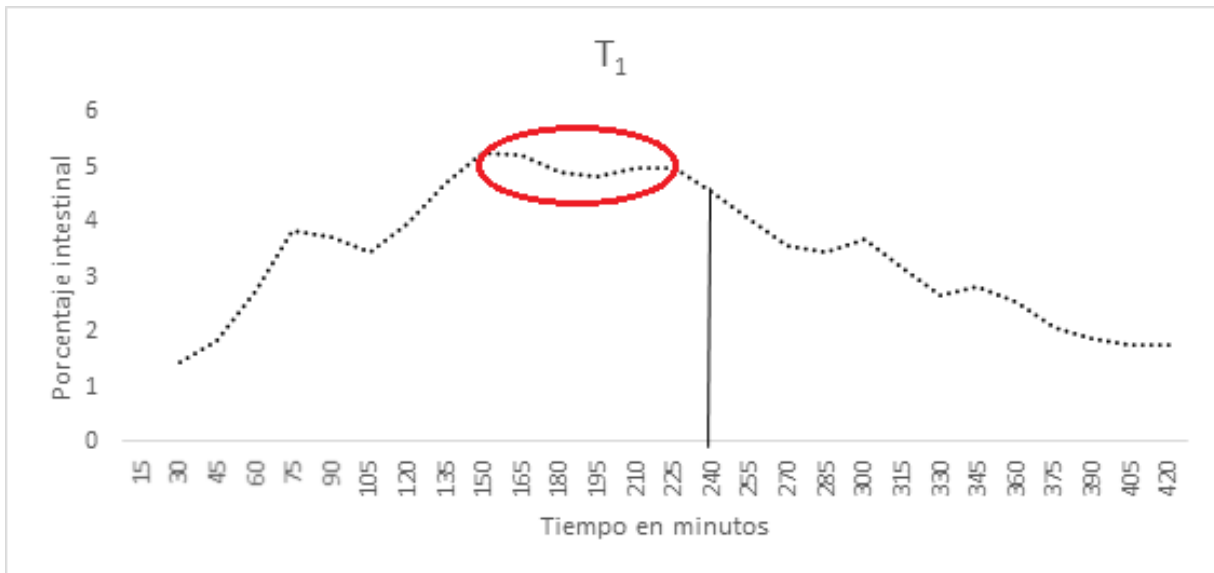
El análisis de varianza ($p \leq 0.05$) estableció diferencias significativas entre los tratamientos con relación a la variable porcentaje intestinal (Anexo K), después se realizó la prueba múltiple de Tukey (Anexo L) con el fin de identificar las diferencias estadísticas entre los tratamientos, de acuerdo con esta prueba indica que existen diferencias significativas como se expresa en la Tabla 5.

Tabla 5. Prueba de Tukey para volumen intestinal expresado en porcentaje.

TRATAMIENTO	P adj (significancia)	Diferencias significativas
T1-T3	0.0000000	Existe
T2-T3	0.7139372	No existe
T4-T3	0.0000002	Existe
T2-T1	0.0000000	Existe
T4-T1	0.0004253	Existe
T4-T2	0.0000000	Existe

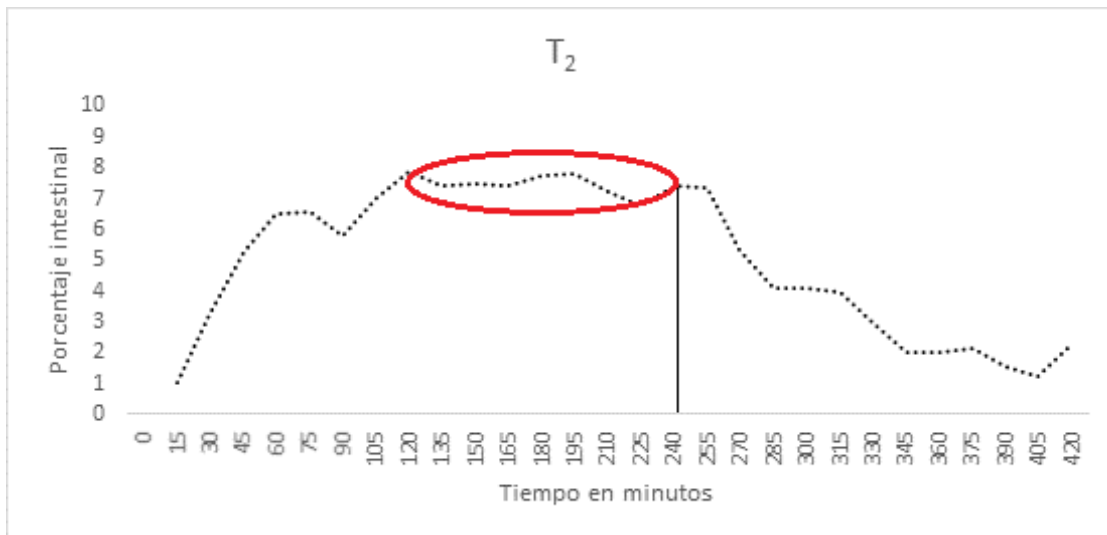
En la figura 14 se observa que para el T₁ el tiempo de retención intestinal se encuentra entre un rango de 150 y 240 minutos (señalado con rojo), tiempo en el cual se estabilizaron los volúmenes intestinales y los rotíferos son viables para cosecharse como alimento vivo enriquecido; el valor medio de este rango se encontró a los 195 minutos y el punto de corte se representó con una línea la cual divide el tiempo de llenado y evacuación intestinal en los 240 minutos. Después del proceso de evacuación hubo un descenso muy notable a largo plazo, pero el volumen se mantuvo constante por encima del 1% desde los 370 minutos hasta los 420 minutos

Figura 14. Relación Tiempo y Porcentaje intestinal durante el ensayo para el T₁.



En la figura 15 se observa que para el T₂ el tiempo de retención intestinal se encuentra entre un rango de 120 y 240 minutos (señalado con rojo), tiempo en el cual se estabilizaron los volúmenes intestinales y los rotíferos son viables para cosecharse como alimento vivo enriquecido; el valor medio de este rango se encontró a los 180 minutos y el punto de corte se representó con una línea la cual divide el tiempo de llenado y evacuación intestinal en los 240 minutos. Después del proceso de evacuación el descenso del porcentaje fue progresivo entre los 250 y 330 minutos donde logro estabilizarse en un porcentaje por encima del 1%.

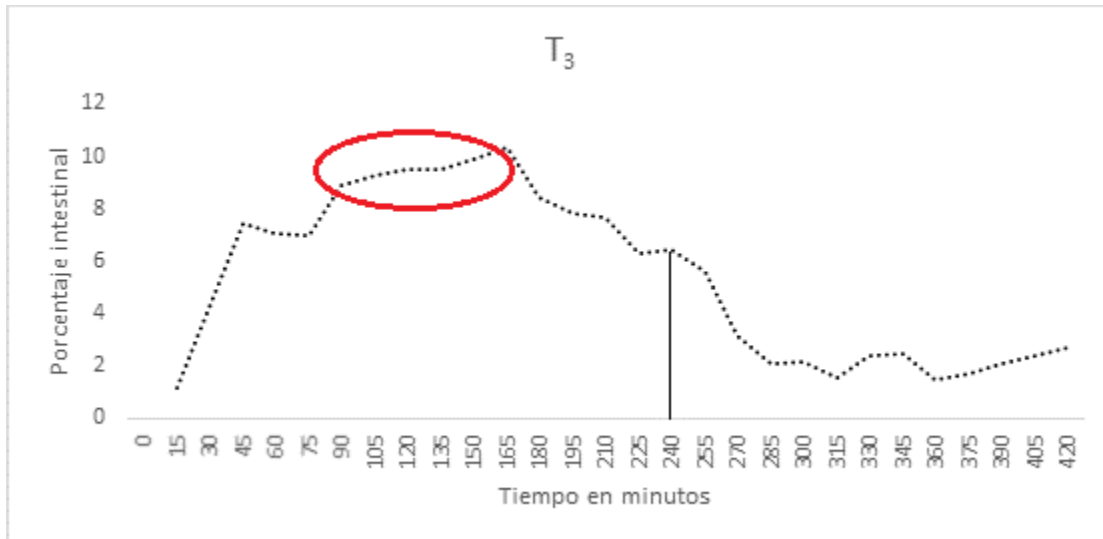
Figura 15. Relación Tiempo y Porcentaje intestinal durante el ensayo para el T₂.



En la figura 16 se observa que para el T₃ el tiempo de retención intestinal se encuentra entre un rango de 90 a 165 minutos (señalado con rojo), tiempo en el cual

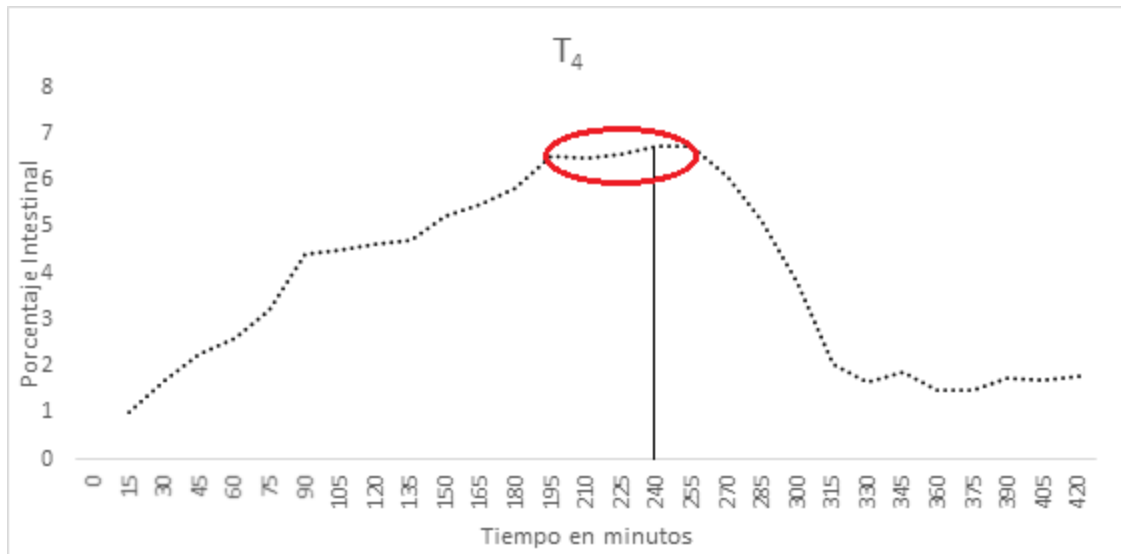
se estabilizaron los volúmenes intestinales y los rotíferos son viables para cosecharse como alimento vivo enriquecido; el valor medio de este rango se encontró a los 130 minutos y el punto de corte se representó con una línea la cual divide el tiempo de llenado y evacuación intestinal en los 240 minutos. La evacuación intestinal inicio a los 180 minutos antes de la filtración húmeda, con un considerable descenso del 4% en el volumen intestinal, por ende, el proceso de evacuación fue mucho más rápido situándose en los 280 minutos, donde logro estabilizarse por encima del 1%.

Figura 16. Relación Tiempo y Porcentaje intestinal durante el ensayo para el T₃.



En la figura 17 se observa que para el T₄ el tiempo de retención intestinal se encuentra entre un rango de 195 y 255 minutos (señalado con rojo), tiempo en el cual se estabilizaron los volúmenes intestinales y los rotíferos son viables para cosecharse como alimento vivo enriquecido; el valor medio de este rango se encontró a los 225 minutos y el punto de corte se representó con una línea la cual divide el tiempo de llenado y evacuación intestinal en los 240 minutos. Presento un incremento lento en el porcentaje intestinal logrando la primera estabilización después de los 90 minutos en el proceso de llenado, periodo en el que vario en un 1% y la segunda estabilización después de los 180 minutos. El proceso de evacuación fue relativamente rápido y se estabilizó por encima del 1% después de los 315 minutos.

Figura 17. Relación Tiempo y Porcentaje intestinal durante el ensayo para el T₄.



Los tratamientos presentaron un comportamiento similar, el T₂ y el T₃ presentaron mayor estabilidad en el rango de viabilidad, el T₁ con menor cantidad celular presentó un tiempo de llenado más lento, por ende, un tiempo de viabilidad más corto y el T₄ presentó el menor tiempo de viabilidad con respecto a todos los tratamientos. Teniendo en cuenta los tratamientos se puede deducir que el periodo para realizar enriquecimiento se encuentra entre 105 y 225 minutos que es el tiempo de retención intestinal, tiempo en el cual se evidenció una estabilización en el porcentaje intestinal. Romero *et al*⁶⁰ encontró que el tiempo óptimo de enriquecimiento oscila entre 120 y 180 minutos, también deduce que un periodo de enriquecimiento más largo conduce a una disminución en el volumen intestinal, Baer *et al*⁶¹ también encontró el mismo fenómeno y deduce que es la consecuencia del inicio de la evacuación después de un tiempo de retención intestinal probablemente debido a un efecto de rebote, lo cual contrasta con lo obtenido en este estudio, donde se produjo una disminución en el volumen intestinal cerca de los 210 minutos de iniciado el enriquecimiento.

⁶⁰ ROMERO, Sonia; YÚFERA, Manuel. Op. Cit., p 128.

⁶¹ BAER, Andreas; *et al*. Op. Cit., p 78.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

- El análisis morfométrico demostró que el volumen corporal de *Brachionus calyciflorus* se encuentra en un rango de $0,5 \times 10^6$ a $2,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, encontrándose el 90% de la población en un volumen de 1×10^6 y $2,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ de la cual el 39% se encuentra entre 1 y $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, el 28% entre 1,5 y 2×10^6 y el 23% representa un volumen de 2 a $2,51,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$
- El periodo de llenado y evacuación intestinal del rotífero *Brachionus calyciflorus* alimentado con diferentes concentraciones de microalga depende de la concentración celular, tamaño del rotífero y volumen intestinal
- Los rotíferos *Brachionus calyciflorus* presentan un tiempo de llenado intestinal después de 60 minutos de iniciado el ensayo donde el % intestinal representa 6,22% 8,59% y presentaron una evacuación después de 60 minutos de realizada la filtración húmeda donde conservaron un porcentaje intestinal que fluctúa entre 1 y 2% en relación al volumen total del cuerpo.
- El volumen intestinal del rotífero *Brachionus calyciflorus* en su máxima repleción alcanzó un valor máximo de $201752,09 \mu\text{m}^3$ que representa un 10,53 % del volumen corporal en una concentración algal de $10,4 \times 10^6$ cel/mL y $107451,90 \mu\text{m}^3$ que representa 8,62 % del volumen corporal en una concentración algal de $5,2 \times 10^6$ cel/mL.
- El enriquecimiento del rotífero *Brachionus calyciflorus* con diferentes densidades de microalga no mostró diferencias significativas en relación volumen intestinal y el tiempo de llenado y evacuación intestinal en los tratamientos 2 y 3, por lo tanto, el proceso de enriquecimiento debe hacerse con volúmenes que oscilen entre $5,2$ y $10,4 \times 10^6$ Cel/mL
- El tiempo de viabilidad alimenticia del rotífero *Brachionus calyciflorus* se encuentra entre los 105 y 225 minutos que es el tiempo de retención intestinal, momento en el cual puede ser suministrado como alimento vivo enriquecido, en la fase de larvicultura para especies de peces con un diámetro bucal pequeño.

7.2 RECOMENDACIONES

- Aplicar este protocolo de enriquecimiento, tiempo de administración y concentración de células de microalgas en la fase de larvicultura de algunas especies de peces marinos y dulceacuícolas.
- Realizar el ensayo de llenado y evacuación intestinal, utilizando microalgas de una especie diferente que varíe en tamaño.
- Evaluar pruebas de selectividad de partícula, con el fin de encontrar la mejor asimilación de microalgas por parte del rotífero.
- Implementar un monitoreo de parámetros como Temperatura y pH en las 4 horas del periodo de llenado y las 3 horas del periodo de evacuación, verificando el comportamiento que presente la cepa de *Brachionus calyciflorus* durante el ensayo.
- No realizar un diseño completamente al azar, de tal forma que se efectúe una selección específica de los rotíferos a estudiar con volúmenes intestinales similares durante el ensayo, con el fin tener mayor uniformidad en los datos analizados.
- Reducir la cantidad de rotíferos en cada muestra entre 6 y 4 rotíferos por muestreo, en lapsos más cortos con el fin de obtener mayor precisión al calcular el tiempo de llenado en la curva de regresión.

BIBLIOGRAFÍA

ARDILA, A; LOPEZ, Y; VASQUEZ, M; GONZALES, A; BARAJAS, A. Obtencion de lipidos y carbohidratos a partir de microalgas mediante el diseño de medios de cultivo selectivos. Tecno Logicas. 2017. vol.20. Colombia. p 83-94.

ARIMORO, Francis. Culture of the freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus*, and its application in fish larviculture technology. African Journal of Biotechnology. Abraka, Nigeria. 2006, vol. 5, no 7, p 537-540.

BAER, Andreas. LANGDON, Chris; MILLS, Scott; SCHULZ, Carsten; HAMRE, Kristin. Particle size preference, gut filling and evacuation rates of the rotifer *Brachionus "Cayman"* using polystyrene latex beads. En Aquaculture. 2008. Vol 282 no 1-4. p 75-82.

BASE DE DATOS MUNDIAL DE ROTIFERA (FADA). *Brachionus calyciflorus* Pallas, 1766. Acceso a través de: Registro mundial de especies marinas en: <http://www.marinespecies.org>.

BERMÚDEZ, J., SÁNCHEZ, G., FUENMAYOR, G., MORALES, E. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de pigmentos de la microalga marina *Chroomonas sp.* *Ciencia*, 2003, vol. 11, no 4. Maracaibo Venezuela. p 265–269.

CANO, A. Cultivo de larvas de pargo de la mancha *Lutjanus guttatus* utilizando rotíferos cultivados y colectados en estanques. Panamá: s.n.e, 1997. p 124-130.

CASTELLÓ, F. ACUACULTURA MARINA: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Publicaciones Universidad de Barcelona 1993. p 1-175.

CASTELLO, Francese. Piscicultura marina en Latinoamérica, bases científicas y técnicas para su desarrollo. Publicaciones Universidad de Barcelona. p 1-80.

DHERT, P., ROMBAUT, G., SUANTIKA, G., SORGELOOS, P. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. Aquaculture. 2001. p 130-146.

DHONT, J. Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. In G. Allen (Ed.). En *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Cambridge: Woodhead Publishing. Series in Food Science, Technology and Nutrition; No. 242. 2013. p 167-191.

ESPINOZA, U. FLORES, A. GONZÁLEZ, A. GONZÁLEZ, CJ. CASTRO J., CASTRO, G. CASTAÑEDA-TRINIDAD, H. Producción controlada de *Brachionus patulus* Müller 1786, utilizando como alimento cuatro dietas a base de microalgas verdes unicelulares en laboratorio. Revista Digital del Departamento El Hombre y su Ambiente. Vol. 1. México D.F. Enero 2014. p 11-17

GÓMEZ, Olga; RODRÍGUEZ, Roelia; SUBERO, Sonia. Cultivo polialgal (*Chaetoceros gracilis*, *Chlorella sp.* y *Tetraselmis chuii*) en medios nutritivos no convencionales. *SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 2011, vol. 23, no 1, p 84-90.

GONZÁLEZ, Breezy; BUITRAGO, Esperanza; FRONTADO, Khenia. Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura. *Memoria*, 1999, vol. 59, no 151, p 75-84.

IDEAM, Instituto de hidrología meteorología y estudios ambientales de Colombia, pronóstico de alerta sobre el clima.

INFANTE, Cherlys; ANGULO, Edgardo; ZÁRATE, Ana; FLOREZ, July Z.; BARRIOS, Freddy; ZAPATA, Cindy. Propagación de la microalga *Chlorella sp.* en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular *Avances en Ciencias e Ingeniería*, vol. 3, núm. 2, abril-junio, 2012. p 159-164.

JEEJA, P. K; I. Joseph & R. P. Raj. Nutritional composition of rotifer (*Brachionus plicatilis*) cultured using selected natural diets. *Indian J. Fish.*, 58: 2011 p 59-65.

KLEINOW, W; WRATIL, H; KUHLE, K; ESCH, B. Electron microscope studies of the digestive tract of *Brachionus plicatilis* (Rotífera). En *Zoomorphology*. 1991. p 67-80.

LUBZENS, E.; TANDLER, A.; MINKOFF, G. Rotifers as food in aquaculture. *Hydrobiologia*, 1989, vol. 186, no 1, p 387-400.

MENDOZA, M; SALAZAR, M; SUÁREZ, C; MICOLTA, V. Cultivo masivo de rotíferos *Brachionus sp.* Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural a través del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS. Colombia. p 1-20.

MORENO, Yesid. PATARROYO, Nelson. RAMIREZ, Hernando. La importancia del uso de indicadores biológicos en los estudios de impacto ambiental. Universidad industrial Santander. Escuela de Química Bogotá Colombia. 2006. p 1-134.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). La Acuicultura: Biología, regulación, fomento, nuevas tendencias y estrategia comercial ANÁLISIS DEL DESARROLLO DE LOS CULTIVOS: MEDIO, AGUA Y ESPECIES. Mandí-Prensa Barcelona Editorial Aedos, s. a. Consell de Cent, 391 - 08009 Barcelona. TOMO I. p 225-258.

ORVAY, Francese. Piscicultura marina en Latinoamérica, bases científicas y técnicas para su desarrollo. Publicaciones Universidad de Barcelona. p 87-137.

PALLAS, Simón. Base de datos mundial de rotífero (FADA). *Brachionus calyciflorus*, 1766. Disponible en: <http://www.marinespecies.org>.

PARK, Kyun; LEE, Woo; CHO, Sung Hwoan; KIM, Hyung Sun; JUNG, Min; SIN, Kim. High density culture of the freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus*. En *Rotifera IX*. Springer Netherlands, 2001. p 369-374.

PRIETO, Martha; CASTAÑO, Fabio; SIERRA, Juan; LOGATO, Priscila; BOTERO, Julián. "Alimento vivo en la larvicultura de peces marinos: copépodos y mesocosmos. En *Revista MVZ. Córdoba*. 2006. p 30-36.

ROMÁN, José; et al. Dinámica poblacional del rotífero *Brachionus ibericus* aislado de estanques para camarón, alimentado con diferentes dietas. *Latin american journal of aquatic research*, 2014, vol. 42, no 5, p 1159-1168.

ROMERO, Sonia; YÚFERA, Manuel. Contribution of gut content to the nutritional value of *Brachionus plicatilis* used as prey in larviculture. En *Aquaculture*, 2012, vol. 364, p 124-129.

SIPABUA Tavares L, ROCHA O. Produção de plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para a alimentação de organismos aquáticos. RiMa, São Carlos. 2003.

SRIVASTAVA, A; HAMRE, K; STOSS, J; NORDGREEN, A. A study on enrichment of the rotifer *Brachionus* "Cayman" with iodine from different sources. *Aquaculture*. vol. 334. 2012. p, 82-88.

STØTTRUP, J. and McEVOY, L. Live feeds in marine aquaculture. Vol. 1st ed. Oxford, Oxford: John Wiley & Sons. Blackwell Science, 2008. p 17-52.

TORO, María. MANRIQUEZ, Germán. SUAZO, Iván. Morfometría Geométrica y el Estudio de las Formas Biológicas: De la Morfología Descriptiva a la Morfología Cuantitativa. *International Journal of Morphology*, 2010, vol. 28, no 4, Chile. p 977-990.

WATANABE, T. Nutritional quality of living feeds used in seed production of fish. Proc. 7th Japan-Soviet Joint Symp. *Aquaculture center.*, 1979. p 176-187.

XUE, Ying Hao; et al. Morphological differentiation of *Brachionus calyciflorus* caused by predation and coal ash pollution. En *Scientific reports*. 2017, vol. 7 no 1. p 1-8.

YANG, J., Dong, S., JIANG, Q., KUANG, T., HUANG, W. and YANG, J. Changes in expression of manganese superoxide dismutase, copper and zinc superoxide dismutase and catalase in *Brachionus calyciflorus* during the aging process. *PLoS One*, 8(2), 2013. p1-8.

YOSHIMURA, K. Factors inhibiting growth of the rotifer *Brachionus plicatilis* in high-density cultivation by feeding condensed *Chlorella*. *Nippon Suisan Gakkaish* 1994. p 207-213.

YUFERA, M. Morphometric characterization of a small-sized strain of *Brachionus plicatilis* in culture. *Aquaculture*, 1982, vol. 27, no 1, Amsterdam p 55-61.

ANEXOS

Anexo A. Análisis de varianza ANOVA para Volumen del cuerpo del rotífero.

V. Rotífero	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Tratamientos (Cel/ml)	3	4,02E+14	1,34E+14	445,875	< 2.2e-16 ***	Altamente significativo
Tránsito intestinal	1	1,86E+13	1,86E+13	61,9064	5.189e-15 ***	Altamente significativo
Tiempo	15	3,19E+13	2,13E+12	7,0737	1.985e-15 ***	Altamente significativo

Debido a que el nivel de significancia es <0.05 , se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

Anexo B. Prueba múltiple de Tukey para Volumen del cuerpo del rotífero.

Cel/ml	diff	lwr	upr	p adj
1200000-1040000	-420640.6	-497522.0	-343759.3	0
5200000-1040000	-1030104.9	-1106986.2	-953223.6	0
15400000-1040000	-770445.5	-847326.8	-693564.1	0
5200000-1200000	-609464.3	-686345.6	-532582.9	0
15400000-1200000	-349804.9	-426686.2	-272923.5	0
15400000-5200000	259659.4	182778.1	336540.7	0

Anexo C Tabla de Frecuencia para Volumen del cuerpo del rotífero.

Rango	Clase	Frecuencia	% acumulado	Frecuencia/No de datos	% Poblacional
500000	1000000	9	8,04%	0,080357143	8,035714286
1000000	1500000	44	47,32%	0,392857143	39,285714289
1500000	2000000	32	75,89%	0,285714286	28,57142857
2000000	2500000	26	99,11%	0,232142857	23,21428571
2500000	3000000	1	100,00%	0,008928571	0,892857143
Sumatoria		112		Sumatoria	100

Anexo D. Análisis de varianza ANOVA para Volumen del intestino.

V. intestinal	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
---------------	----	--------	---------	---------	--------

Tratamientos (cel/mL)	3	1,27E+14	4,22E+13	5,4149	0.0010325 **	Significativo
Tránsito intestinal	1	9,76E+13	9,76E+13	12,5118	0.0004113 ***	Altamente significativo
Tiempo	15	6,86E+14	4,57E+13	5,8614	4.054e-12 ***	Altamente significativo

Debido a que el nivel de significancia es <0.05 , se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

Anexo E. Prueba múltiple de Tukey para Volumen del intestino.

Cel/ml	diff	lwr	upr	p adj
1200000-1040000	-0.39797621	-0.73794246	-0.058009961	0.0140617
5200000-1040000	-0.15577189	-0.49573814	0.184194357	0.6409182
15400000-1040000	-0.33319644	-0.67316269	0.006769808	0.0571780
5200000-1200000	0.24220432	-0.09776193	0.582170566	0.2587223
15400000-1200000	0.06477977	-0.27518648	0.404746018	0.9613786
15400000-5200000	-0.17742455	-0.51739080	0.162541700	0.5364131

Anexo F. Promedios para volumen del cuerpo, volumen intestinal y porcentaje intestinal en el Tratamiento 1.

TRANSITO INTESTINAL	TIEMPO	T1		
		MEDIA V.CUERPO	MEDIA V.INTESTINAL	MEDIA % INTESTINAL
LLENADO	00:00-00:15	1805084,49	22706,49	1,01
	00:15-00:30	1556311,46	29125,22	1,86
	00:30-00:45	1437120,60	22087,50	1,84
	00:45-01:00	1394336,89	42745,60	3,66
	01:00-01:15	1190447,07	41864,71	4,06
	01:15-01:30	1440927,09	39040,66	3,41
	01:30-01:45	1593778,44	44802,99	3,54
	01:45-02:00	1398014,04	50768,42	4,40
	02:00-02:15	1653567,81	81323,88	5,02
	02:15-02:30	1590361,44	87683,64	5,55
	02:30-02:45	1752099,67	41296,12	2,63
	02:45-03:00	1634921,67	45516,35	3,33
	03:00-03:15	1626593,42	51315,86	3,68
	03:15-03:30	1511207,00	71299,39	5,29
	03:30-03:45	1571598,94	65205,01	4,30
03:45-04:00	1759778,39	64596,87	3,99	
EVACUACION	00:00-00:15	1980073,33	65418,42	3,47
	00:15-00:30	2054921,04	57857,16	3,05
	00:30-00:45	1981262,31	64664,57	3,70
	00:45-01:00	1598890,67	56286,53	3,88

	01:00-01:15	2183756,27	54665,50	2,53
	01:15-01:30	2255212,67	61500,30	2,85
	01:30-01:45	2110069,85	59835,58	3,01
	01:45-02:00	1855130,74	41900,01	2,28
	02:00-02:15	1654858,35	46326,09	2,90
	02:15-02:30	1982415,85	56292,11	3,35
	02:30-02:45	2091603,73	34619,59	1,65
	02:45-03:00	1942485,73	41125,70	2,45

Anexo G. Promedios para volumen del cuerpo, volumen intestinal y porcentaje intestinal en el Tratamiento 2.

TRANSITO INTESTINAL	TIEMPO	T2		
		MEDIA V.CUERPO	MEDIA V.INTESTINAL	MEDIA % INTESTINAL
LLENADO	00:00-00:15	840963,17	14435,70	2,09
	00:15-00:30	739158,89	27691,73	4,45
	00:30-00:45	945676,87	48983,44	6,13
	00:45-01:00	776245,21	41796,39	6,91
	01:00-01:15	1011044,70	49472,04	6,22
	01:15-01:30	1049106,28	50074,44	5,38
	01:30-01:45	941210,37	73322,31	8,62
	01:45-02:00	901088,06	56792,35	7,12
	02:00-02:15	1038240,40	65044,98	7,69
	02:15-02:30	1395144,53	82622,06	7,32
	02:30-02:45	1337496,73	82835,41	7,55
	02:45-03:00	1089854,64	70574,29	7,96
	03:00-03:15	1414236,94	104808,73	7,64
	03:15-03:30	1436259,94	84918,89	6,87
	03:30-03:45	1695434,45	100651,86	6,61
03:45-04:00	1415421,87	107451,90	8,26	
EVACUACION	00:00-00:15	1253214,03	61132,51	6,49
	00:15-00:30	1159913,55	42251,86	4,13
	00:30-00:45	1067750,80	36008,81	4,09
	00:45-01:00	1280285,32	43656,27	4,17
	01:00-01:15	1119802,60	35846,82	3,83
	01:15-01:30	1397936,07	26994,95	2,13
	01:30-01:45	1171204,58	17875,84	1,84
	01:45-02:00	884706,09	16842,96	2,21
	02:00-02:15	988732,51	17030,36	2,03
	02:15-02:30	1003962,69	9543,13	1,15
	02:30-02:45	1093827,59	13058,25	1,36
	02:45-03:00	1093910,45	32732,24	4,00

Anexo H. Promedios para volumen del cuerpo, volumen intestinal y porcentaje intestinal en el Tratamiento 3.

TRANSITO INTESTINAL	TIEMPO	T3		
		MEDIA V.CUERPO	MEDIA V.INTESTINAL	MEDIA % INTESTINAL
LLENADO	00:00-00:15	1892614,76	42080,99	2,25
	00:15-00:30	1868755,73	115562,48	6,20
	00:30-00:45	2122098,26	184104,91	8,71
	00:45-01:00	2289201,29	117427,39	5,41
	01:00-01:15	2038825,42	172826,06	8,59
	01:15-01:30	2049999,75	178368,19	9,19
	01:30-01:45	2216783,97	201752,09	9,34
	01:45-02:00	1631313,45	156880,42	9,68
	02:00-02:15	2106986,18	190526,14	9,29
	02:15-02:30	1952817,53	199153,45	10,53
	02:30-02:45	1895183,65	173650,10	9,21
	02:45-03:00	2129869,91	96068,81	4,66
	03:00-03:15	2308791,15	67353,75	3,04
	03:15-03:30	2189215,96	50973,64	2,34
	03:30-03:45	2419823,44	124156,87	5,29
03:45-04:00	2178822,18	104159,09	4,65	
EVACUACION	00:00-00:15	2632882,57	111739,61	4,50
	00:15-00:30	2154437,58	37948,10	1,81
	00:30-00:45	1972125,63	42583,48	2,31
	00:45-01:00	2441081,82	49691,33	2,04
	01:00-01:15	2037447,19	19467,24	0,96
	01:15-01:30	2198503,61	81329,18	3,77
	01:30-01:45	2312373,70	27758,37	1,17
	01:45-02:00	2225123,18	34565,40	1,67
	02:00-02.15	2245608,46	39979,26	1,74
	02:15-02:30	2333918,38	75795,23	2,38
	02:30-02:45	2328323,49	70178,22	2,34
	02:45-03:00	2211838,15	82303,10	2,98

Anexo I. Promedios para volumen del cuerpo, volumen intestinal y porcentaje intestinal en el Tratamiento 4.

TRANSITO INTESTINAL	TIEMPO	T4		
		MEDIA V.CUERPO	MEDIA V.INTESTINAL	MEDIA % INTESTINAL
LLENADO	00:00-00:15	1330634,07	25831,23	2,06
	00:15-00:30	986103,19	14374,02	1,32
	00:30-00:45	1261661,88	36417,52	3,19
	00:45-01:00	1285302,40	21806,84	2,03
	01:00-01:15	1021254,05	36053,23	4,19
	01:15-01:30	1549687,35	58559,18	3,95
	01:30-01:45	1364946,07	56109,74	4,10
	01:45-02:00	1371420,46	58045,35	4,65
	02:00-02:15	1300111,92	52126,86	4,16
	02:15-02:30	1488061,44	100636,10	7,02
	02:30-02:45	1783132,66	73280,06	4,54
	02:45-03:00	1443396,67	91578,11	6,45
	03:00-03:15	1400070,36	90270,65	6,77
	03:15-03:30	1039679,34	84391,28	8,08
	03:30-03:45	1446429,87	98264,16	7,16
03:45-04:00	1566371,20	83900,03	5,64	
EVACUACION	00:00-00:15	1462352,89	90125,51	6,90
	00:15-00:30	1549030,69	73355,09	5,47
	00:30-00:45	1403299,60	36163,73	2,84
	00:45-01:00	1507733,84	64218,35	4,78
	01:00-01:15	1506658,65	17051,14	1,35
	01:15-01:30	1165242,98	10075,64	0,97
	01:30-01:45	1419438,20	23691,19	1,77
	01:45-02:00	1047656,65	30707,40	3,16
	02:00-02.15	1487146,19	25770,22	1,81
	02:15-02:30	1986483,05	33872,79	1,66
	02:30-02:45	1257049,40	32926,83	2,75
02:45-03:00	1381937,87	15106,64	1,79	

Anexo J. Volumen celular (μm^3) de la microalga *Chlorella sp.*

VOLUMEN CELULAR (μm^3)	
PROMEDIO	808,92
MAX	3219,40
MIN	116,52

Anexo K. Análisis de varianza ANOVA para Volumen intestinal expresado en porcentaje.

% Intestinal	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Tratamientos (Cel/ml)	3	1635,5	545,2	49,2947	< 2e-16 ***	Altamente significativo
Tránsito intestinal	1	4184,8	4184,8	378,3968	< 2e-16 ***	Altamente significativo
Tiempo	15	331,1	22,1	1,9957	0.01251 *	significativo

Debido a que el nivel de significancia es <0.05, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

Anexo L. Prueba múltiple de Tukey para Volumen intestinal expresado en porcentaje.

Cel/ml	diff	lwr	upr	p adj
1200000-10400000	-0.017322470	-0.021986233	-0.012658707	0.0000000
5200000-10400000	0.001923065	-0.002740698	0.006586829	0.7139372
15400000-10400000	-0.010116667	-0.014780430	-0.005452904	0.0000002
5200000-1200000	0.019245536	0.014581773	0.023909299	0.0000000
15400000-1200000	0.007205804	0.002542040	0.011869567	0.0004253
15400000-5200000	-0.012039732	-0.016703495	-0.007375969	0.0000000