

REVISTA

# CITECSA

Ciencia Tecnología Sociedad y Ambiente



**UNIPAZ**  
Instituto Universitario de la Paz

Año 2019  
ISSN: 2027 6745  
Volumen II Número. 18

# REVISTA CITECSA

Ciencia Tecnología Sociedad y Ambiente

| Instituto Universitario de la Paz |  
Volumen 11, número 18, año 2019

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE LA PAZ - UNIPAZ

OSCAR ORLANDO PORRAS ATENCIA  
Rector

KELLY CRISTINA TORRES ANGULO  
Vicerrectora

REVISTA CITECSA

Editor  
JANICE BALLESTEROS BANDERA

Comité Editorial  
JAIME CORENA PARRA  
LUIS MANUEL GALINDO  
ALAKXTER OYOLA VILAMIZAR  
MÓNICA MARÍA PACHECO VALDERRAMA  
JORGE ANDRÉS RESTREPO CASTRILLÓN

Soporte técnico  
SANDRA LISBETH CASTRO ARIZA

Dirección web: <https://revistas.unipaz.edu.co/index.php/revcitecsa>

Edición Especial  
Artículos destacados  
2010 - 2015

Correo electrónico: [citecsa@unipaz.edu.co](mailto:citecsa@unipaz.edu.co)  
Dirección: Centro de Investigaciones Santa Lucía, km 14 vía Bucaramanga,  
Vereda el Zarzal.  
Barrancabermeja, Santander, Colombia  
Teléfonos: 057 - 6032701  
Portal institucional: [www.unipaz.edu.co](http://www.unipaz.edu.co)  
Periodicidad: Semestral

Ilustración: Lizette Fernanda García Robles

Dibujo artístico: Rossely Ramírez

## CONTENIDO

Estudio de la variabilidad intraespecífica del gen de fosfomanomutasa en *Leishmania braziliensis* y su correlación con la capacidad infectante, publicado 2014.

Tratamiento de aguas residuales in vitro por medio de la microalga *Chlorella* sp. en el municipio de Barrancabermeja, Colombia, publicado 2015.

Efecto del uso de la escama de pescado en la alimentación de codornices sobre la calidad del huevo, publicado 2015.

Análisis multitemporal del espejo de agua del humedal El Castillo, municipio de Barrancabermeja, Santander, Colombia, publicación 2015.

Evaluación del fruto entero de palma de aceite ofrecido a voluntad en la alimentación de pollos de engorde, publicación 2015.

**Estudio de la variabilidad intraespecífica del gen de fosfomanomutasa en *Leishmania braziliensis* y su correlación con la capacidad infectante**

**Study of intraspecific variability phosphomannomutase gene in *Leishmania braziliensis* and its correlation with infectivity**

Florez Muñoz Angel Alberto<sup>1</sup>, Dea-Ayuela María Auxiliadora<sup>2</sup>, Francisco Bolás Fernández<sup>3</sup>.

Recibido 18 de Julio de 2014;  
Aceptado 27 de Octubre de 2014

**Resumen**

Los protozoos del género *Leishmania*, sintetizan glicoconjugados ricos en manosa (MAN), en su activación está implicada la enzima fosfomanomutasa (PMM), la cual ha sido estrechamente relacionada con mayor capacidad de virulencia y supervivencia del parásito. Realizamos un estudio para determinar la variabilidad intraespecífica de cepas *Leishmania braziliensis*, aportadas por los laboratorios INLASA y UMSA, de la Paz, Bolivia. Se efectuaron infecciones in vitro en macrófagos, una PCR, RFLP para la PMM, y correspondiente análisis bioinformático de los productos de secuenciación, con los programas BioEdit® y MEGA5®. Finalmente se construyeron árboles filogenéticos con el test UPGMA. Posteriormente se llevó a cabo una correlación simple de las variables bajo estudio. Los resultados obtenidos, muestran que las cepas INL (522, 11, 413) presentan promedios totales de infección más altos (superior a 700 amastigotes); las cepas L, presentan promedios totales de infección más bajos (0 a 400 amastigotes). Igualmente, el marcador molecular (PMM) empleado no permitió mostrar variabilidad intraespecífica de las cepas INL, no existiendo correlación entre mayor capacidad de virulencia, y los perfiles electroforéticos de enzima PMM, y distribución filogenética de la enzima PMM, en el Test UPGMA. Por el contrario las cepas L, presentaron variabilidad intraespecífica, pero no estuvo asociada a mayor capacidad de infección. El análisis del árbol obtenido por UPGMA, mostró valores bootstrap en las cepas INL ( $\geq 70\%$ ) y en cepas L (99%). Se deben realizar estudios con mayor número de enzimas de restricción de la PMM que nos permitan determinar una variabilidad intraespecífica del parásito.

(1). Mvz. M.Sc, Escuela Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto Universitario de la Paz UNIPAZ, Barrancabermeja, Colombia, [angelflorezmvz@hotmail.com](mailto:angelflorezmvz@hotmail.com)

(2). PhD, Departamento de Farmacia, Universidad CEU-Cardenal Herrera, Valencia, España

(3). PhD, Departamento Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, España.

**Palabras clave:** *Leishmania*, fosfomanomutasa, macrófagos, virulencia, filogenética.

### Abstract

Protozoa in the genus *Leishmania*, synthesized high-Mannose glycoconjugates (MHG), the enzyme is involved in activation phosphomannomutase (PMM), which has been closely linked with a greater capacity for virulence and survival of the parasite. We conducted a study to determine intraspecific variability of strains of *Leishmania braziliensis*, provided by laboratories INLASA and UMSA, the Paz, Bolivia. Infections in vitro into macrophages, PCR, RFLP to the PMM were carried out, and the corresponding bioinformatic analysis of the products of sequencing, with the BioEdit ® and MEGA5 ® programs. Finally constructed phylogenetic trees using the UPGMA test. Subsequently conducted a simple correlation of the variables under study. The results, show that INL (522, 11, 413) strains have higher overall infection averages (more than 700 amastigotes); L strains, present total infection averages low (0 to 400 amastigotes). Likewise, the molecular marker (PMM) used did not allow show intraspecific variability of the INL strains, there is no correlation between a greater capacity for virulence, and the PMM enzyme electrophoretic profiles, and phylogenetic distribution of the enzyme PMM, in the UPGMA Test. Instead L strains, showed intraspecific variability, but it was not associated with a greater capacity for infection. The analysis of the tree obtained by UPGMA, showed values bootstrap in INL strains ( $\geq 70\%$ ) and strains L (99%). Studies should be with more number of restriction enzymes of the PMM, which will allow us to determine intraspecific variability of the parasite.

**Keywords:** *Leishmania*, phosphomannomutase, macrophages, virulence, phylogenetic.

### Introducción

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades producidas por protozoos del género *Leishmania* transmitidos al hombre por la picadura de mosquitos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (García 2005; Quesada *et al.*, 2005). El agente etiológico es un protozoario dimórfico que pertenece a la familia Trypanosomatidae, del género *Leishmania* (orden kinetoplastida). Morfológicamente todas las especies son similares, con diferencias en el comportamiento biológico, inmunológico, tipo de enfermedad y distribución geográfica (Herwaldt 1999).

Esta parasitosis se contempla dentro del grupo de enfermedades tropicales descuidadas (Neglected Tropical Diseases). Es prevalente en 98 países, 3 territorios y 5 continentes. Se estiman unos 1.3 millones de casos nuevos al año, aunque en realidad solamente se reporta la mitad. Unos 300000 casos corresponden a la enfermedad visceral (90% en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Nepal, Sudán del Sur y Sudán) y 1 millón a la forma cutánea (principalmente en Afganistán, Algeria, Brasil, Colombia, Irán, Pakistán, Perú,

Arabia Saudita, Siria y Túnez) o a la mucocutánea (sobre todo en Brasil, Perú y Bolivia). De los 1,3 millones casos estimados, solo cerca de 600000 son actualmente reportados (Alvar *et al.*, 2012).

La leishmaniasis cutánea localizada es una de las patologías cutáneas más frecuentes en habitantes de zonas tropicales, y *Leishmania braziliensis* es el principal agente etiológico en América del Sur (García 2005; Quesada *et al.*, 2005).

Además el intercambio genético que sufren estos parásitos, es crucial para su sobrevivencia. Los híbridos pueden permitir la adaptación a nuevos nichos ecológicos, vectores y hospederos incluyendo humanos y animales domésticos (Miles *et al.*, 2009; Calvopina *et al.*, 2006). También, *Leishmania braziliensis* presenta una alta variabilidad genética intraespecífica (Cupolillo *et al.*, 2003; Buitrago *et al.*, 2005), y ha sido descrita como la especie más heterogénea (Ishikawa *et al.*, 2002).

En los últimos tiempos el avance de la tecnología ha permitido mejorar la identificación y caracterización de este parásito, especialmente en los métodos moleculares, como el análisis del ADN kinetoplastídico (ADNk), la técnica de PCR seguida de la restricción del producto amplificado (PCR-RFLP) o el uso de genes diana como el gen del citocromo b (cyt b), muy útil en la identificación de las especies de *Leishmania* (Luyo *et al.*, 2004). Así mismo estudios previos sobre el análisis del material genético han permitido la caracterización molecular de las poblaciones de *Leishmania* circulantes en las diferentes regiones endémicas (Fraga *et al.*, 2010; Mauricio *et al.*, 2006). Sin embargo, es necesario considerar la búsqueda de un marcador molecular que permita analizar los clones en una misma especie (Akopyants *et al.*, 2009; Criscione *et al.*, 2005).

Es importante mencionar, que los protozoos del género *Leishmania*, sintetizan una amplia gama de glicoconjugados ricos en manosa (MAN). La activación de MAN, implica la enzima fosfomanomutasa (PMM), GDP-Man pirofosforilasa (GDPMP) y dolicolfosfato-MAN sintasa (DPMS), ruta bioquímica fundamental, como se ha demostrado en experimentos con otros microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* (Hashimoto *et al.*, 1997; Colussi *et al.*, 1997). Se ha visto que mutantes de *Leishmania* con defectos globales en el metabolismo de la manosa no son capaces de infectar macrófagos o sobrevivir en modelos animales altamente susceptibles (Garami; Garami *et al.*, 2001). Se han generado parásitos *Leishmania major* deficientes fosfomanomutasa ( $\Delta$ PMM), que son no virulentos y no persistentes in vivo, pero viables in vitro (Ilgoutz, McConville 2001).

Se debe resaltar que este estudio, reviste importancia, ya que determinados sistemas enzimáticos como la fosfomanomutasa (PMM), se han asociado estrechamente con la virulencia, y por tanto su identificación y caracterización, en diferentes poblaciones de *Leishmania*, puede constituir un buen marcador de

patogenicidad del parásito, mediante la identificación de la variabilidad intraespecífica del gen fosfomanomutasa (PMM) en cepas de *Leishmania braziliensis* y su relación con la capacidad de infección.

## Material y métodos

### 1. Descripción de los aislamientos de *Leishmania* usados en el estudio.

Las cepas INL (524, 606, 213, 459, 412, 505, 481, 11, 626, 554, 582, 466, 448, 464, 484, 503, 2, 522, 413, 65, 436, 415, 485, 474), fueron aportadas por el Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (Inlasa); las cepas L (LB2, LB3, LC3, LD1), fueron aportadas por la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), en la ciudad de La Paz, Bolivia. Todas las cepas fueron aisladas de pacientes. Se utilizó una cepa referencia de *L. braziliensis* (M2904), y las cepas IIFB y 396, *Leishmania lainsoni*, como cepas control género.

### 2. Cultivos y conservación de cepas de *Leishmania*.

Los promastigotes de las distintas cepas fueron mantenidas mediante cultivos *in vitro* en medio de cultivo *Schneider's Drosophila Medium* (Sigma).

### 3. Cultivo y línea celular (macrófagos murinos J774)

Se utilizó la línea celular J774 con capacidad adherente, y fueron mantenidas mediante cultivos *in vitro* en medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma).

### 4. Infección *in vitro* de Macrófagos J774 con *Leishmania*.

En placas de Lab-Tekde 8 pocillos estériles, a continuación se añadieron células J774 (50.000 células/pocillo) en un volumen final de 200  $\mu$ L de medio. Se dejaron en incubación 2 horas a 37°C y 5% de dióxido de carbono, con el fin que las células se adhirieran. Posteriormente, se añadieron 500.000 promastigotes en 200  $\mu$ L de medio de cultivo RPMI-1640 (relación macrófago/promastigotes, 1:10) de cada una de las cepas de *Leishmania* en estudio, durante 72 horas de infección, y en incubación a 33 °C.

### 5. Fijación y tinción de muestras

Se añadió metanol durante 5 minutos. Se aplicó tinción Giemsa al 10% en PBS, y se dejó reposar en los portaobjetos durante 15-20 minutos. Se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente añadimos agua para quitar el colorante. Luego usamos Sellador DPX mounting®, para pegar las laminillas en los respectivos portaobjetos.

### 6. DNeasy® Blood & Tissue Handbook.

Protocolo: Purificación de ADN total a partir de tejidos animales (Protocolo de Spin-columna).

## 7. Reacción en cadena de la polimerasa PCR

### 7.1. Condiciones de PCR (30 ciclos):



95°-----10min (Desnaturalización ADN).

95°-----1min

50°-----1min (Anillamiento).

72°-----1min

72° -----5 min (Elongación final).



**Vol. Final = 50 µL**

## 7.2. Gel pilot ® DNA Molecular Weight Markers.

Gel Pilot 100bp Ladder (100) (cat.no.239035)

## 7.3. Componentes PCR:

|   |               |
|---|---------------|
| 1. Amplitaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems®) | <b>25 µL</b>  |
| 2. Primer PMM forward: AAGCTTGGCGTCGTCGGTGG           | <b>2,0 µL</b> |
| 3. Primer PMM reverse: GTTRCCGCCCTCTGACGTCTT          | <b>2,0 µL</b> |
| 4. ADN 0,5 µg/mL                                      | <b>2,0 µL</b> |
| 5. H <sub>2</sub> O miliQ                             | <b>19 µL</b>  |

## 7.4. ADN.

En gel agarosa al 1% con TAE1X. El marcador de peso molecular se dejará en uno de los pocillos. Se adiciona tampón de muestra. Aplicamos 10 µL de ADN y 5 µL de tampón.

## 7.5. Amplicones.

En gel agarosa al 2% con TAE1X. El marcador de peso molecular se dejará en uno de los pocillos. Aplicamos 10 µL de ADN y 5 µL de tampón.

## 7.6. Análisis de fragmentos por enzimas de restricción (RFLP).

En gel agarosa al 3% con TAE1X. El marcador de peso molecular se dejará en uno de los pocillos. A los 10 µL de producto de PCR, se le añade 1µL de la siguiente mezcla 2 µL de enzima EcoRI y 18 µL de tampón. Posteriormente realizamos la digestión con la enzima de restricción EcoRI a 37 °C 1 hora, e inactivación posterior a 80 °C por 20 minutos.

## 8. Preparación de muestras para secuenciación.

Aplicar 5 µL de ADN más 35 µL de agua destilada. Las muestras fueron enviadas al Servicio de Secuenciación Sanger Unidad de Genómica Fundación Parque Científico de Madrid, de la Facultad de ciencias Biológicas UCM.

## 9. Edición de secuencias programa BioEdit Sequence Alignment Editor®

Las secuencias resultantes, fueron editadas con el programa BioEdit, apoyados en el correspondiente cromatograma de cada una, y se realizó el cambio de bases erróneas (Valor N) en cada secuencia, por el correspondiente nucleótido de cada cromatograma. Posteriormente a las secuencias ya editadas, se les aplica un Clustal W Multiple Alignment.

## 10. Construcción de árboles filogenéticos con el programa MEGA®.

Las respectivas secuencias editadas se exportaron al programa MEGA®.5. 2.2, para la construcción de un árbol filogenético. Se aplica a todas las secuencias un alineamiento ClustalW. Para nuestro estudio, empleamos el Test UPGMA tree (Kimura 2-parameter model) y la medida de confianza de las ramas de los árboles se realizó mediante análisis de bootstrap de 1000 réplicas (Felsenstein 1985).

## Resultados

### 1. Estudio de la capacidad infectante *in vitro* de las distintas cepas de *L. braziliensis* para J774.

|                  |            |            |            |            |            |            |            |           |            |            |            |            |
|------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Cepas INL</b> | <b>524</b> | <b>606</b> | <b>213</b> | <b>459</b> | <b>412</b> | <b>505</b> | <b>481</b> | <b>11</b> | <b>626</b> | <b>554</b> | <b>582</b> | <b>466</b> |
| <b>TiM</b>       | 390        | 351        | 667        | 370        | 498        | 343        | 567        | 875       | 357        | 467        | 438        | 432        |

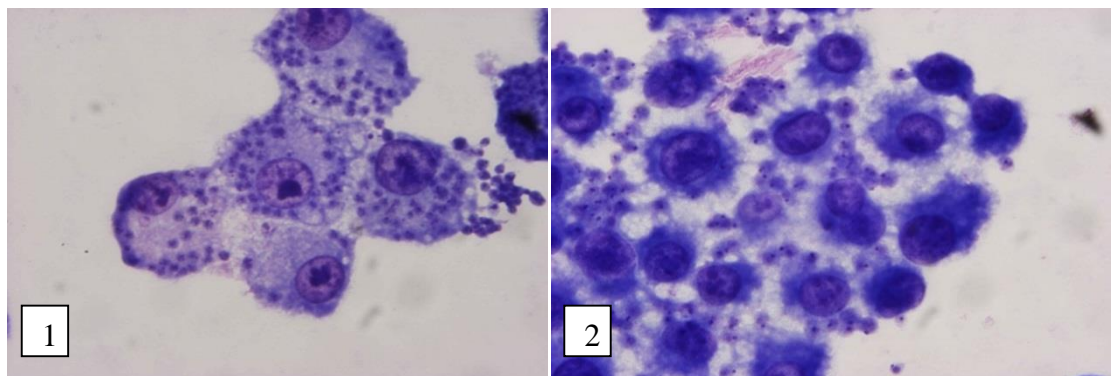
|                  |            |            |            |            |          |            |            |           |            |            |            |            |
|------------------|------------|------------|------------|------------|----------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Cepas INL</b> | <b>448</b> | <b>464</b> | <b>484</b> | <b>503</b> | <b>2</b> | <b>522</b> | <b>413</b> | <b>65</b> | <b>436</b> | <b>415</b> | <b>485</b> | <b>474</b> |
| <b>TiM</b>       | 409        | 357        | 461        | 358        | 463      | 745        | 941        | 630       | 439        | 353        | 495        | 375        |

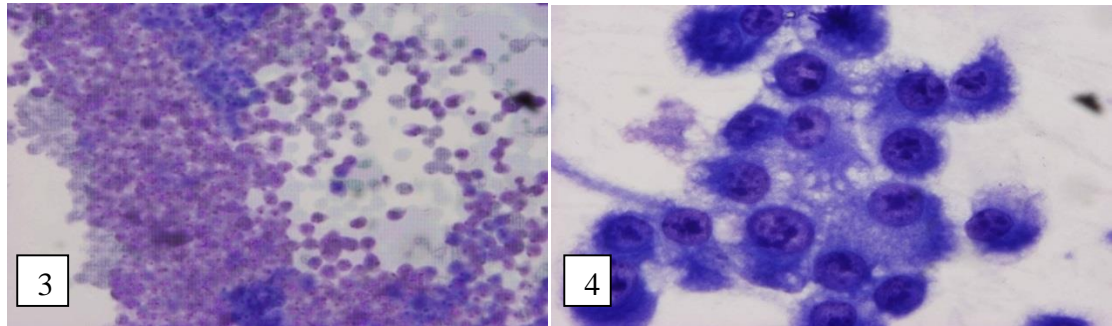
|                |            |            |            |            |
|----------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Cepas L</b> | <b>LB2</b> | <b>LD1</b> | <b>LC3</b> | <b>LB3</b> |
| <b>TiM</b>     | 276        | 182        | 221        | 172        |

|   |             |            |
|---|-------------|------------|
| <b>Cepas <i>Leishmania lainsoni</i></b> | <b>IIFB</b> | <b>396</b> |
| <b>TiM</b>                              | 399         | 469        |

|                        |              |
|------------------------|--------------|
| <b>Cepa referencia</b> | <b>M2904</b> |
| <b>TiM</b>             | 275          |

**Tasa de Infección de Macrófagos (TiM).** Se determinó a partir del recuento de número de amastigotes por cada 100 núcleos, que fueron contados en las placas Lab-Tek por duplicado al microscopio óptico.

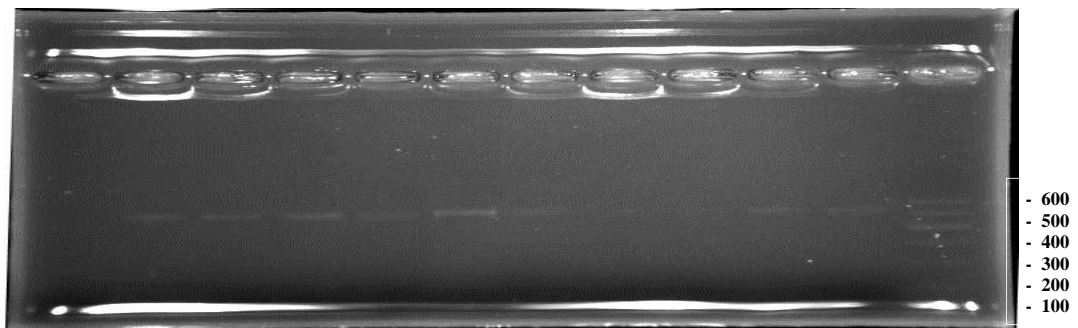




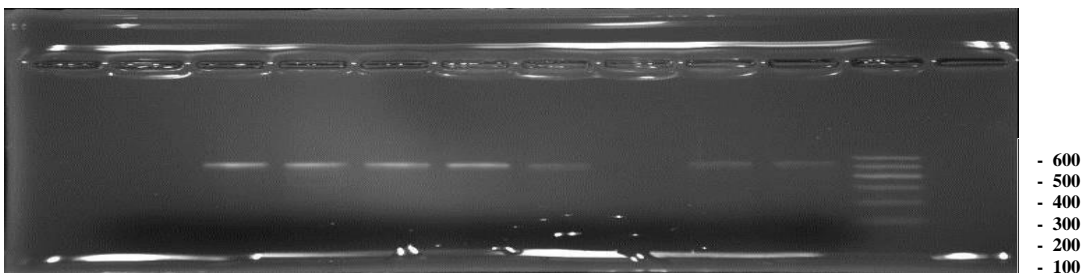
**Fig. 1. Infección de macrófagos con *Leishmania braziliensis*.** 1. Cepa 11 2. Cepa LB3. 3. Amastigotes libres en Ceba LB2. 4. Control macrófagos sin infección.

## 2. Estudio mediante PCR de la fosfomanomutasa (PMM).

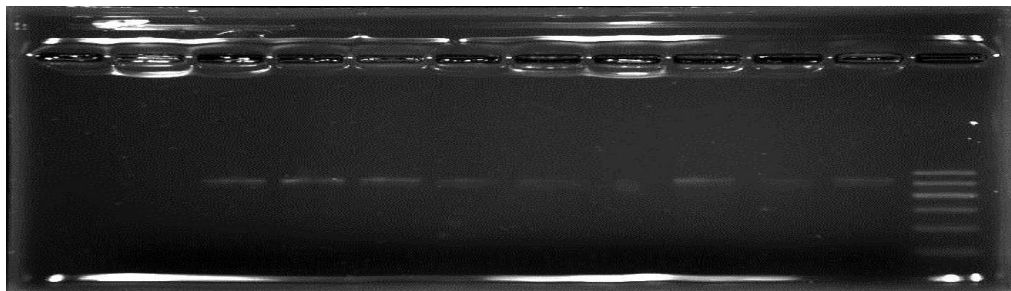
En las figuras 2-5 se muestran los perfiles electroforéticos del amplicón de PMM de las cepas estudiadas. Las cepas INL y la cepa de referencia tienen un perfil electroforético de ADN con un peso molecular de 500 pares de bases (pb). Las cepas L presentaron un perfil electroforético de ADN con un peso molecular de 600 pb. Las cepas 396 y IIFB presentaron un perfil electroforético de ADN con un peso molecular de 500 pb.



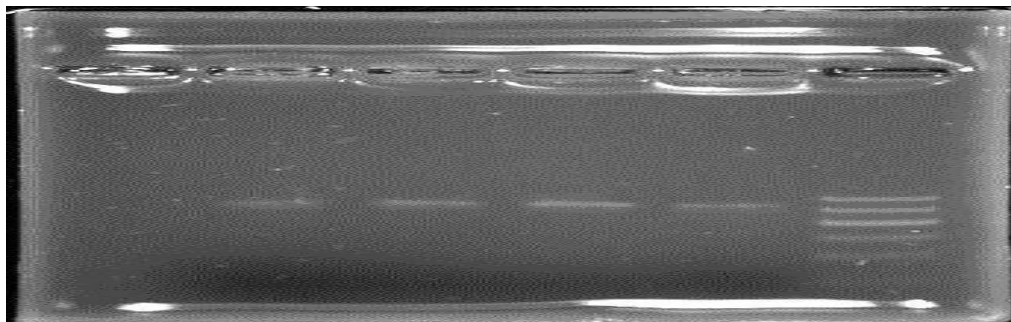
**Fig.2.** Cepas: 213, 459, 466, 481, 505, 524, 554, 582, 606, 626 (de izq. a der.).



**Fig. 3.** Cepa: 65, 396, 413, 436, 464, 471, 474, 503 (de izq. a der.).



**Fig.4.** Cepas: 2, 11, 412, 415, 448, 484, 485, 522, M2904, IIFB (de izq. a der.).



**Fig.5.** Cepas: LD1, LB2, LB3, LC3 (de izq. a der.).

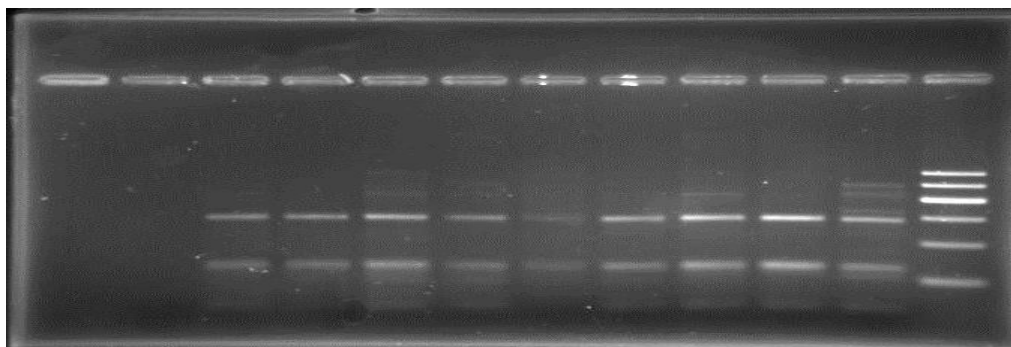
### 3. Estudio mediante PCR- RFLP de la fosfomanomutasa (PMM).

En las figuras 6-8 se muestran los perfiles electroforéticos de los RFLP del gen de PMM tras digestión con EcoRI.

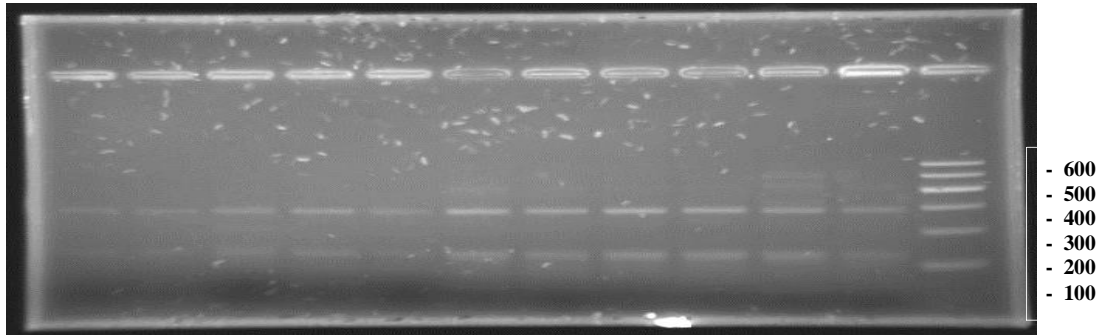
Las cepas INL y la cepa de referencia, presentaron un mismo perfil electroforético de enzima PMM, con dos cortes de restricción, con pesos moleculares alrededor de 100 pb y 300 pb.

Las cepas L presentaron un mismo perfil electroforético de enzima PMM, con un solo corte de restricción alrededor de 200 pb.

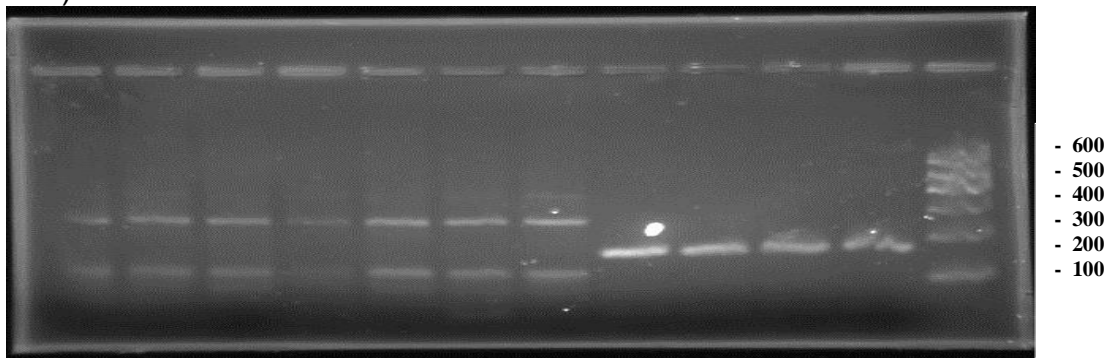
Las cepas IIFB, 396 presentaron un mismo perfil electroforético de enzima PMM, con tres cortes, con pesos moleculares alrededor de 100 pb, 300 pb.



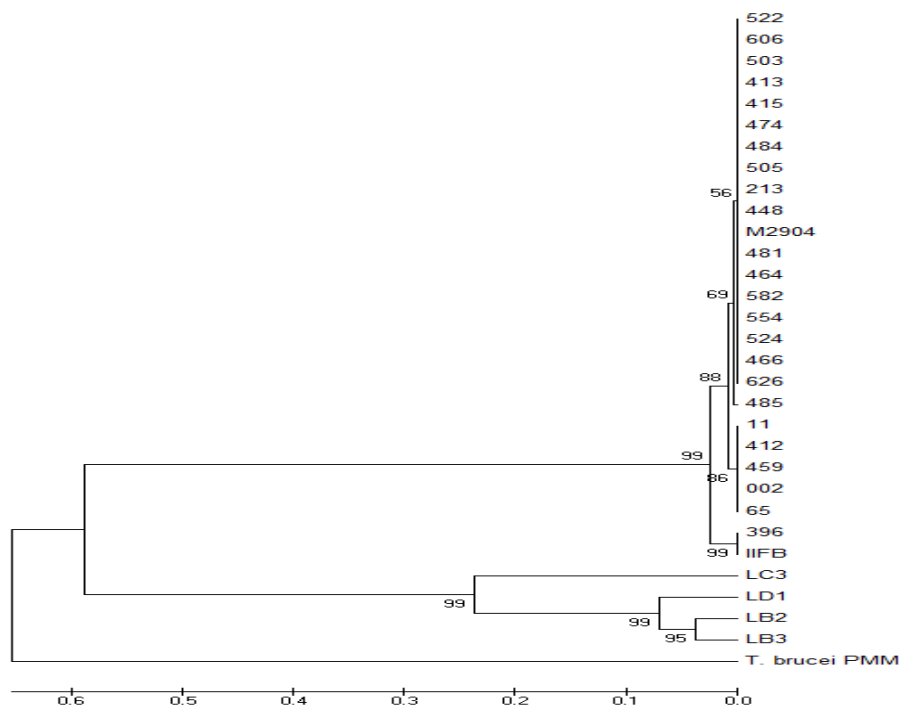
**Fig.6.** Cepas: 213, 459, 466, 481, 505, 524, 582, M2904, IIFB (de izq. a der.).



**Fig.7.** Cepas: 415, 448, 474, 522, 464, 606, 626, 65, 436, 396, 503 (de izq. a der.).



**Fig. 8.** Cepas: 11, 554, 484, 485, 413, 412, 2, LD1, LB2, LB3, LC3 (de izq. a der.).



**Fig.9.** Árbol filogenético mostrando las relaciones de las cepas bajo estudio, con el Test UPGMA tree (método de Kimura 2-parametros), con el marcador molecular PMM. Se utilizó como secuencia outgroup a *T. brucei*.

En el Test UPGMA tree, podemos apreciar una escala de 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 sustituciones / sitio.

**Nota:**

No se obtuvieron resultados de amplificación para la cepa 471, por lo que fue eliminada del estudio. La secuenciación enviada de la cepa 436, presentó muchas bases erróneas, por tanto fue también eliminada del estudio.

**Discusión**

Al correlacionar las variables, capacidad de infección y perfiles electroforéticos de PCR, podemos apreciar que las cepas INL, presentan diferentes rangos de infección, y perfiles electroforéticos de PCR, no existiendo relación precisa entre estas variables. Las cepas L, resultaron más uniformes en la capacidad de infección, y presentan un perfil electroforético igual. Se pueden presentar diversos factores coadyuvantes en la capacidad de infección, como pueden ser diferentes genes asociados a esta, o características intrínsecas o individuales de infección en cada cepa en estudio, por tanto no se pueda establecer una relación precisa en estas variables. Como lo mencionan algunos autores, la mayor o menor infección del parásito *Leishmania* puede ser modulada por diversos factores, ambientales y genéticos, así como por su hospedador vertebrado (Blackwell 1996) y por los vectores (Titus, Ribeiro 1988).

Al correlacionar las variables, capacidad de infección y perfiles electroforéticos de RFLP, las cepas INL presentan un perfil electroforético igual, y su capacidad de infección es diferente, no pudiendo establecer una relación precisa entre estas variables. Estos resultados concuerdan con otros estudios, donde no encontraron diferencias en los perfiles electroforéticos RFLP en las especies de *Leishmania*, dentro del complejo de *Leishmania braziliensis* (Van Eys *et al.*, 1991), y difieren a los reportados por otros autores, que si determinaron la variabilidad intraespecífica de *Leishmania braziliensis*, mediante PCR-RFLP de regiones intergénicas (ITS) de genes rRNA (Buitrago *et al.*, 2005). Las cepas L, presentan un perfil electroforético igual de RFLP, y su capacidad de infección fue baja, a pesar de presentar la enzima PMM, no existiendo una relación entre presencia de la enzima PMM, con una mayor capacidad de infección, resultados que contrastan a lo referido por diversos autores, una asociación del gen PMM a una mayor capacidad de virulencia del parásito *Leishmania* (Ilgoutz, McConville 2001; Kedzierski *et al.*, 2006).

Una de las posibles causas de no poder establecer una relación precisa, entre la presencia de la enzima PMM y la capacidad de infección en las cepas en estudio, como lo han descrito diversos autores, los cuales mencionan que se debe tener en cuenta la gran heterogeneidad genética intraespecífica entre *Leishmania braziliensis* (Cupolillo *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2002). De igual forma, se encuentran diversos estudios, donde se demuestra la existencia de varios

polimorfismos genéticos intraespecíficos (Gomes *et al.*, 1995; Descoteaux, Turco 1999) que afectan igualmente estas variables.

Adicionalmente como lo mencionan algunos autores, la diversidad de las cepas en las distintas áreas geográficas refleja la plasticidad de estos parásitos al adaptarse a diferentes especies de vectores (o poblaciones de estos); la incorporación de marcadores moleculares robustos podría permitir mejorar la determinación de la diversidad genética de varias especies de *Leishmania* que circulan en la naturaleza (Rodríguez *et al.*, 2006; Descoteaux, Turco 1999). Igualmente, la toma de muestras a partir de pacientes puede también corresponder a una mezcla de diferentes parásitos y de genotipos (Bañuls *et al.*, 1999; Cupolillo *et al.*, 2003)

Los resultados muestran, que la confianza en un único marcador molecular, no es suficiente para determinar la variabilidad intraespecífica de *Leishmania braziliensis*, en las cepas en estudio, y aisladas en esta zona geográfica. Esto tiene graves implicaciones para algunos laboratorios, que dependen muchas veces de un solo marcador molecular para el diagnóstico a nivel intra e inter especie de *Leishmania*, viéndose reflejado esto, en un precario diagnóstico del parásito *Leishmania*, retardando el inicio oportuno del específico tratamiento, al paciente afectado.

Al correlacionar las variables, capacidad de infección con el Test UPGMA tree, podemos apreciar como las cepas 11, 65, 2, 412, 459 ubicadas en el mismo grupo filogenético, y con diferentes rangos de infección, en donde podemos resaltar como la cepa 11, presentó el segundo promedio total de infección más alto (875 amastigotes). No pudiendo establecer una relación precisa entre estas variables, ya que una de las cepas con mayor capacidad de infección, se encuentra agrupada filogenéticamente con una de las cepas de menor capacidad de infección. El restante de cepas INL, a pesar de tener dos (413, 522) de las tres cepas con mayor capacidad de infección, se ubicaron filogenéticamente en el mismo grupo de cepas con capacidad de infección baja y media. Queda claro también, que la distribución filogenética de la enzima PMM, no está relacionada con el mayor o menor grado de capacidad de infección en estas cepas bajo estudio.

Las cepas L, a pesar de ubicarse en el mismo rango de infección, y presentar un mismo perfil electroforético de la enzima PMM, la distribución filogenética de la PMM fue diferente, mostrando diferentes ramas evolutivas. En estas cepas se puede apreciar una variabilidad intraespecífica, basados en la distribución filogenética de la enzima PMM. La distribución filogenética de la enzima PMM en las cepas L, se relacionó con menor grado de infección, ya que las cuatro cepas presentaron diferentes grados de infección, pero todas ubicadas en el rango más bajo. No pudiendo establecer una relación precisa en la distribución filogenética de la enzima PMM en estas cepas, con una mayor capacidad de infección, por el contrario se asocia a menor capacidad de infección.

Las cepas *Leishmania lainsoni*, están ubicadas en el mismo grupo, en relación al perfil electroforético de la enzima PMM y separadas filogenéticamente de las cepas bajo estudio.

Los perfiles electroforéticos de RFLP y su distribución filogenética en el Test UPGMA tree obtenidos en el estudio, concuerdan con otros autores, los cuales mencionan, que la gran cantidad de bandas (perfiles), que pueden aparecer entre las diferentes especies de *Leishmania*, e incluso dentro de una misma especie, podrían indicar la proximidad o lejanía filogenética intra-especie o inter-especie (Montoya *et al.*, 2007).

En relación a los valores de bootstrap en el Test UPGMA tree, las cepas INL quedan situadas dentro de grupos con identidades nucleotídicas medias (identidades de secuencias  $\geq 70\%$ ). Las cepas L quedan situadas dentro de grupos claros (con valores de bootstrap de 99%). Las cepas INL y cepas L quedan situadas dentro de un grupo claro (con valores de bootstrap de 99%). No se presentaron valores bootstrap con identidades nucleotídicas bajas ( $\leq 50\%$ ), que indican filogenias de ramas poco claras.

Adicionalmente, en el Test UPGMA se presentan diferentes sustituciones, lo cual nos lleva a pensar que las cepas bajo estudio, posiblemente han presentado diferentes sustituciones génicas (mutaciones o polimorfismos), por ejemplo por recombinación homóloga, pudiendo dar como resultado gran variabilidad en la distribución filogenética de la enzima PMM, en las cepas en estudio.

Es recomendable realizar el análisis con otros métodos de agrupamientos filogenéticos, que nos permitan tener una mayor cantidad de información, con la cual podamos realizar diferentes análisis con las distintas variables usadas en este estudio. Es importante mencionar que el Test de agrupación empleado, no es más que la representación gráfica de una matriz de distancias, y que bajo ciertas condiciones, esta representación, puede ser tomada como una estimación de la filogenia.

El empleo de los métodos moleculares en los estudios de variabilidad intraespecífica del parásito *Leishmania* tiene gran importancia, por lo tanto es muy valioso considerar la utilización de distintos métodos moleculares, para de esta manera poder aclarar la relación de los distintos marcadores moleculares con la capacidad de infección del parásito.

## Conclusiones

Las cepas INL presentan variabilidad intraespecífica en cuanto a la tasa de infección *in vitro* para macrófagos J774, con rangos de infección superiores a 700 amastigotes/100 núcleos, sin apreciarse diferencias en cuanto a los perfiles electroforéticos de la PCR para PMM.



Las cepas L resultan mucho más uniformes en cuanto a la capacidad de infección *in vitro* para macrófagos J774, situándose en un nivel bajo (0-400 amastigotes/100 núcleos), sin variaciones apreciables en los perfiles electroforéticos de la PCR para PMM.

Los perfiles de restricción con EcoRI producen 3 patrones RFLP, correspondientes a los grupos INL, L e IIFB 396, sin que se puedan apreciarse diferencias dentro de cada uno de los grupos.

Para las cepas estudiadas no fue posible establecer una correlación entre las variables capacidad infectante, expresión y distribución filogenética de la enzima PMM.

De nuestro estudio podemos concluir que la presencia de enzima PMM no resultó ser un buen marcador de virulencia de *Leishmania braziliensis*.

### Bibliografía

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS ONE 7(5): e35671.

Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P. 2009. Demonstration of Genetic Exchange During Cyclical Development of *Leishmania* in the Sand Fly Vector. Science. 324:265-268.

Bañuls AL, Hide M, Tibayrenc M. 1999. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. International Journal of Parasitology. 29:1137-1147.

Blackwell JM. 1996. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. Parasitology. 112:567-574.

Buitrago Romero NL, Bastrenta B, Cupolillo E. 2005. Análisis de la variabilidad genética de Cepas de *Leishmania* en aislados naturales de la zona endémica del departamento de La Paz, Bolivia: implicaciones epidemiológicas. La Paz, Bolivia. 97 p.

Calvopina M, Armijos RX, Marco JD, Uezato H, Kato H, Gomez EA, Korenaga M, Barroso PA, Mimori T, Cooper PJ, Nonaka S, Hashiguchi Y. 2006. *Leishmania* isoenzyme polymorphisms in Ecuador: Relationships with geographic distribution and clinical presentation. Biomed Central Infectious Diseases.6:1-9.

Colussi PA, Taron CH, Mack JC, Orlean P. 1997. Human and *Saccharomyces cerevisiae* dolichol phosphate mannose synthases represent two classes of the

enzyme, but both function in *Schizosaccharomyces pombe*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94:7873–7878.

Criscione C, Poulin R, Blouin M. 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology*.14:2247-2257.

Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, Oliveira-Neto MP, Brito MEF, Falqueto A, Naiff MF, Grimaldi Jr G. 2003. Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(7):3126-3132.

Descoteaux A, Turco SJ. 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1455:341–352.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39 :783-791

Fraga J, Montalvo AM, de Doncker S, Dujardin JC, der Auwera GV. 2010. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*.10:238–245.

Garami A, Ilg T. 2001. Disruption of mannose activation in *Leishmania mexicana*: GDP-mannose pyrophosphorylase is required for virulence, but not for viability. *European Molecular Biology Organization Journal*. 20:3657–3666.

Garami A, Mehlert A, Ilg T. 2001. Glycosylation defects and virulence phenotypes of *Leishmania Mexicana* phosphomannomutase and dolicholphosphatemannose synthase gene deletion mutants. *Molecular and Cellular Biology*. 21:8168-8183.

García Almagro D. 2005. Leishmaniasis cutánea. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 96:1-24.

Gomes RF, Macedo AM, Pena SD, Melo MN. 1995. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Experimental Parasitology*. 80:681-687.

Hashimoto H, Sakakibara A, Yamasaki M, Yoda K. 1997. *Saccharomyces cerevisiae*VIG9 encodes GDP-mannose pyrophosphorylase, which is essential for protein glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*. 272:16308–16314.

Herwaldt B. 1999. Leishmaniasis. *The Lancet*. 354:1191-1199.

Ilgoutz SC, McConville MJ. 2001. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *International Journal for Parasitology*. 31:899–908.

Ishikawa EA, Silveira FT, Magalhaes AL, Guerrajr RB, Melo MN, Gomes R, Silveira TG, Shaw JJ. 2002. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 96(1):111-121.

Kedzierski L, Malby RL, Smith B J, Perugini MA, Hodder AN, Ilg T, Colman PM, Handman E. 2006. Structure of *Leishmania mexicana* phosphomannomutase highlights similarities with human isoforms. Journal of Clinical Microbiology. 363:215–227.

Luyo Acero GE, Uezato H, Oshiro M, Takei K, Kariya K, Katakura K, Gomez Landires E, Hashiguchi Y, Nonaka S. 2004. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. Parasitology today. 128:483–491.

Mauricio IL, Yeo M, Baghaei M, Doto D, Pratlong F, Zemanova E, Dedet JP, Lukes J, Miles MA. 2006. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: Resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). International Journal for Parasitology. 36:757–769.

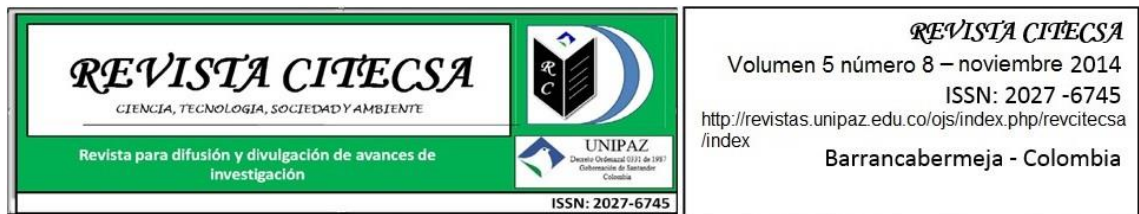
Miles MA, Yeo M, Mauricio IL. 2009. *Leishmania* Exploit Sex. Science. 324:187-188.

Montoya L, Gallego M, Gavignet B, Piarroux R, Rioux JA, Portus M, Fisa R. 2007. Application of microsatellite genotyping to the study of a restricted *Leishmania infantum* focus: different genotype compositions in isolates from dogs and sand flies. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 76(5):888-895.

Quesada Cortés A, Campos Muñoz L, Rubio Flores C, Martín Díaz MA, Navarro Sánchez M, Regojo Zapata RM, Lucas de Laguna R, Herranz Pinto P. 2005. Leishmaniasis cutánea: revisión y avances terapéuticos. Dermatología Práctica. 13(5):11-22.

Rodríguez GI, Marín C, Vargas F, Córdova O, Barrera M, Gutiérrez SR, Alunda JM, Sánchez MM. 2006. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. Experimental Parasitology. 112:44-51.

Rotureau B, Ravel C, Couppié P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP, Carme B. 2006. Use of PCR restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main New World *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application on the assay to clinical samples. Journal of Clinical Microbiology. 4:459-467.



Titus RG, Ribeiro JM. 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*. 239:1306-1308.

Van Eys GJ, Guizani L, Ligthart GS, Dellagí, K. 1991. A nuclear DNA probe for the identification of strains within the *Leishmania donovani* complex. *Experimental Parasitology*. 72:459-463.

**TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES *IN VITRO* POR MEDIO DE LA MICROALGA *CHLORELLA SP* EN EL MUNICIPIO DE BARRANCABERMEJA, COLOMBIA**

Wastewater treatment *in vitro* by means of microalgae *Chlorella sp* in the municipality of Barrancabermeja, Colombia

Tratamento de águas residuais *in vitro* por meio da microalga *Chlorella sp* no município de Barrancabermeja, Colômbia

Tafur Alvarez, Jairo Enrique<sup>1</sup>. Estrada Palencia, Luliana<sup>2</sup>.

---

Recibido: 28 de Mayo de 2015

Aceptado: 18 de Agosto de 2015

---

## Resumen

El aumento de la contaminación de los cuerpos hídricos por la descarga de aguas residuales domésticas ha originado una afectación en la calidad del agua, evidenciado por el aumento en las concentraciones de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). El objetivo de este trabajo es determinar el efecto del cultivo de *Chlorella sp.* como método de tratamiento *in vitro* en aguas residuales para la remoción de estos contaminantes. Se llevó a cabo el aislamiento de la microalga y posterior escalamiento y obtención de un cultivo monoalgal. Para el bioensayo se evaluaron 2 tratamientos el primero compuesto por 100% agua residual (T1), mientras que el otro por conformado por 75% agua residual y 25% agua purificada (T2) y un control con fertilizante foliar. El bioensayo se inició con un inóculo de  $1 \times 10^6$  células/ml en un volumen de cultivo de 1,5 L. Las mayores densidades celulares se alcanzaron en los tratamientos con agua residual ( $p > 0,05$ ) sin diferencias significativas entre ambos. Al final del estudio la remoción de nitratos fue del 64,6% en el control,

---

<sup>1</sup> Ingeniero Ambiental y de Saneamiento. Instituto Universitario de la Paz. e-mail: jairotafur29@gmail.com

<sup>2</sup> Ingeniera Ambiental y de Saneamiento. Instituto Universitario de la Paz. e-mail: lluliana2112@gmail.com

seguido de T1 con 50,1% y de T2 con 49,8%. Con respecto a la remoción de fosfatos, en el control se obtuvo una eficiencia del 65,7%, mientras que T1 y T2 alcanzaron mayores remociones 83,8% y 87,0% respectivamente entre los días 1 y 4. De acuerdo a lo anterior se concluye que la microalga *Chlorella* sp. puede ser usada como tratamiento de aguas residuales debido a su capacidad de adaptación y eficiencia obtenida en la remoción de nitratos y fosfatos.

**Palabras clave:** Bioensayo, eficiencia, nitratos, fosfatos.

## Abstract

The increasing pollution of water bodies by domestic sewage discharge has caused an involvement in water quality, evidenced by increased concentrations of nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) and phosphates ( $\text{PO}_4^{-3}$ ). The aim of this study was to determine the effect of the culture of *Chlorella* sp. as a method of *in vitro* wastewater treatment for the removal of these contaminants. The isolation of the microalgae were carried out followed by scaling and obtaining a monoalgal culture. Two treatments for bioassay composed of 100% domestic wastewater (T1) and another 75% wastewater and 25% purified water (T2) and a control with foliate fertilizer. The bioassay started with an inoculum of  $1 \times 10^6$  cells / ml in a volume of 1.5L culture. The higher cell densities reached in wastewater treatments ( $p > 0.05$ ) with no significant differences between. At endpoint the nitrate removal was 64.6% in the control, followed by T1 and T2 with 50.1% and 49.8%, respectively. With regard to the removal of phosphates, an efficiency of 65.7% was obtained in controlling, while T1 and T2 reached higher removals 87.0% and 83.8% respectively between the days of 1 and 4. According to the above, it is concluded that *Chlorella* sp. can be used as wastewater treatment because of its adaptability and efficiency in nitrate and phosphate removal.

**Key words:** Bioassay, efficiency, nitrates, phosphates.

## Resumo

O aumento da poluição dos corpos d'água pelo lançamento de esgotos domésticos tem causado uma afetação da qualidade da água, evidenciado pelo aumento das concentrações de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) e fosfatos ( $\text{PO}_4^{-3}$ ). O objetivo deste estudo é determinar o efeito do cultivo de *Chlorella* sp. como um método de tratamento de águas residuais *in vitro* para remover estes contaminantes.

Foi levado a cabo o isolamento da microalga e posterior escalonamento e obtenção de um cultivo monoalgal. No bioensaio avaliaram-se 2 tratamentos compostos por 100% de água residual (T1) e outro por 75% água residual e 25% de água purificada (T2) e um controle com adubo foliar. O bioensaio iniciou-se com um inoculo de  $1 \times 10^6$  células / ml num volume de cultivo 1,5L. As mais elevadas densidades celulares foram alcançadas nos tratamentos com água residual ( $p > 0,05$ ), sem diferenças significativas entre ambos. No final do estudo a remoção de nitrato foi de 64,6% no controle, seguido de T1 com 50,1% e de T2 com 49,8%. A respeito da remoção de

fosfatos, no controle foi obtida uma eficácia de 65,7%, enquanto T1 e T2 alcançaram remoções superiores 83,8% e 87,0% respectivamente, entre os dias 1 e 4. De acordo com o anterior, conclui-se que *Chlorella* sp. pode ser usado como tratamento de águas residuais por a sua adaptabilidade e eficiência obtida na remoção de nitratos e fosfatos.

**Palavras chave:** Bioensaio, eficiência, nitratos, fosfatos.

## Introducción

Los microorganismos fotosintéticos han recibido en los últimos años mayor atención como un biosistema alternativo para el tratamiento de aguas residuales. Tales microorganismos se han utilizado principalmente en procesos de tratamiento terciario, debido a su habilidad de remover nutrientes inorgánicos como el nitrógeno y el fósforo de las aguas residuales, los cuales son asimilados para su crecimiento Escorihuela *et al.* (2007). De la Noüe *et al.* (1992). Igualmente a los procesos acoplados a bacterias (quienes realizan la degradación de la materia orgánica) y estas microalgas (quienes utilizan los compuestos inorgánicos), para llevar a cabo una eficiente bioconversión de la energía solar, en la utilización y eliminación de materia orgánica (Salazar 2005).

Los compuestos nitrogenados (nitritos y nitratos) como compuestos de fósforo (fosfatos y otras formas fosfatadas) son nutrientes de las plantas y conducen al crecimiento de algas y gran variedad de microorganismos en las aguas superficiales y dependiendo de la concentración existente en el agua, pueden producir la eutrofización de los cuerpos de agua. Llegando a producir más adelante procesos de descomposición dando como resultado una demanda de oxígeno. Ramalho (1996), Pütz (2012). Además, en unos casos cuando se exige control de la eutrofización de las fuentes receptoras, la remoción de estos compuestos en el agua residual puede ser una condición para el tratamiento de estas aguas. (Romero 1988, 2000).

La implementación de un sistema de tratamiento, a través del cultivo de microalgas, presenta importantes ventajas como el mejoramiento de la calidad del efluente mediante un mecanismo de bajo costo energético, así como el aprovechamiento de nutrientes que están siendo desechados, al ser incorporados a la biomasa, con la consecuente producción y generación de oxígeno. Comúnmente las aguas residuales urbanas contienen los nutrientes requeridos para el crecimiento microalgal, por lo que constituyen un medio apropiado para su desarrollo (Andrade *et al.* 2006; Seoanez 1999).

*Chlorella* sp. es un género de microalga perteneciente a la familia *Oocystaceae*, orden *Chlorococcales* de la división *Chlorophyta* ampliamente estudiada y presenta una alta eficiencia en productividad por su fácil adaptación en condiciones de laboratorio. La sistemática, aislamiento, cultivo y caracterización de cepas nativas de microalgas presentes en cuerpos de agua para el consumo humano constituyen

un objetivo esencial para evaluar la calidad del agua y su posible efecto en casos de eutrofización. Asimismo, el conocimiento de la ecofisiología de las microalgas permite evaluar su potencial biotecnológico y su capacidad mixótrofica para purificar aguas residuales o producción alternativa de biomasa microalgal (Mora *et al.* 2005).

Para el aislamiento y posterior desarrollo de un cultivo de *Chlorella* sp. el primer paso es identificar las condiciones del medio ambiente natural para así llegar a suministrar condiciones idénticas en el laboratorio, ambientes controlados y un medio de cultivo con todos los requerimientos nutritivos necesarios para el crecimiento de la microalga. El segundo paso implica la eliminación de microorganismos no deseados, especialmente aquellos que pueden auto competir con las especie(s) que se quiera aislar. La implementación de diferentes métodos de cultivo es indispensable en este paso; el uso de medios de enriquecimiento, de las técnicas de dilución, de una sola célula de aislamiento por micropipeta, y siembra en estría en agar son ampliamente utilizadas. Esta última es el método preferido para el aislamiento de muchas algas cocoides y algas del suelo, no sólo por la facilidad en su uso, sino también porque cultivos axénicos a menudo puede establecerse directamente sin ningún tratamiento adicional. Posteriormente el paso final requiere el crecimiento continuo en un subcultivo (Andersen 2005).

Las cámaras de crecimiento son ampliamente utilizadas para la incubación de las células aisladas de microalgas. La fuente de luz suministrada y la intensidad deben ser consideradas. Las luces - frías fluorescentes blancas son apropiadas y ampliamente utilizadas; mientras que la luz incandescente debe evitarse. Por otra parte algunas algas requieren un ciclo de luz-oscuridad, es decir, que no crecerán bajo continua condiciones de luz. Para la mayoría de las algas, se utiliza un ciclo de luz-oscuridad entre 12:12 y 16:8 horas. Andersen (2005). Otros factores a tener en cuenta son la temperatura, el pH y la aireación. La mayoría de la especies de microalgas toleran temperaturas entre 16 y 30°C, aunque esto puede variar de acuerdo a la composición del medio de cultivo o la especie cultivada. El pH para la mayoría de las especies de algas cultivadas es entre 7 y 9, siendo el rango óptimo 8.2 - 8.7. La aireación es necesaria para prevenir la sedimentación de las algas, para asegurar que todas las células de la población están igualmente expuestas a la luz y los nutrientes del medio de cultivo (Camacho *et al.* 2012).

Igualmente, la selección del cultivo axénico o no axénico es importante. Un cultivo axénico consiste en la obtención de una sola especie de microalga a partir de una sola célula, libre de contaminantes; mientras que un cultivo no axénico o monoalgal consiste en la obtención de una especie a partir de una sola célula, contaminada parcialmente por otros microorganismos como bacteria y protozoos. Cuando las microalgas están asociadas a bacterias en la naturaleza (no axénicas), se ejerce una interacción que puede ser beneficiosa para ambos; de tal manera que la microalga es capaz de asimilar productos de la actividad bacteriana en el medio. Así mismo, la flora microbiana asociada está implicada en la regulación de parámetros fisiológicos como pH, temperatura y salinidad. Por el contrario, en condiciones axénicas, las microalgas no llegan a alcanzar un crecimiento óptimo,



por carecer de la flora microbiana asociada; la cual le aportará factores esenciales para estimular el crecimiento (Moronta *et al.* 2006; Cañizarez y Ontiveros 1993).

Recientemente algunos cultivos han sido desarrollados en equipos especializados, denominados fotobiorreactores, donde se alcanzan elevadas productividades. Los cultivos son realizados en sistema construidos con tubos de plástico, vidrio o policarbonato, donde es posible controlar las condiciones de cultivo (cantidad de nutrientes, temperatura, iluminación y pH) (Andrade *et al.* 2008).

De acuerdo a lo anterior el objetivo del estudio fue determinar el efecto del cultivo de *Chlorella* sp. como método de tratamiento *in vitro* en aguas residuales para la remoción de nitratos y fosfatos.

## **Materiales y métodos**

### **Muestreo de fitoplancton de agua dulce**

Se llevó a cabo un muestreo simple en la Ciénaga Miramar, ubicada dentro del casco urbano de la ciudad de Barrancabermeja, recolectando un volumen de 0,5L. de muestra de acuerdo a lo recomendado para aguas eutróficas por WPCF, APHA, AWWA (1992). Posteriormente se hizo un pre filtrado de las muestras para la eliminación de organismos no deseados y partículas de gran tamaño de acuerdo a lo descrito por (Andersen 2005).

### **Preparación de medio de aislamiento y cultivo**

Para cumplir con los requerimientos nutricionales de *Chlorella* sp. Se preparó un medio de cultivo utilizando un fertilizante foliar, de acuerdo a lo descrito por Garduño *et al.* (2011), pero con una variación en el tipo y concentración del fertilizante foliar (NPK) a 0,5 ml/l de agua purificada más agar-agar (6 gr/l) con pH 8,3. Para la fase de escalamiento del cultivo monoalgal de *Chlorella* sp. se usó el mismo medio de aislamiento sin agar – agar (medio de cultivo líquido).

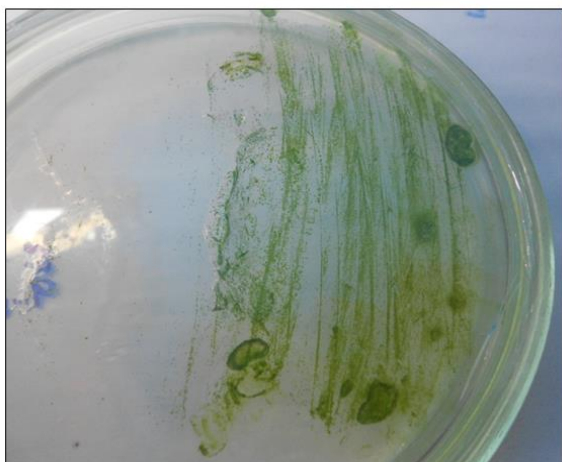
### **Aislamiento de *Chlorella* sp. y establecimiento de un cultivo monoalgal en condiciones controladas**

Para el aislamiento de células de *Chlorella* sp. se utilizó el método de estriado en placas de agar reportado por Andersen (2005). Previamente se filtraron las muestras usando filtros de papel Whatman grado 595 (Figura 1.).

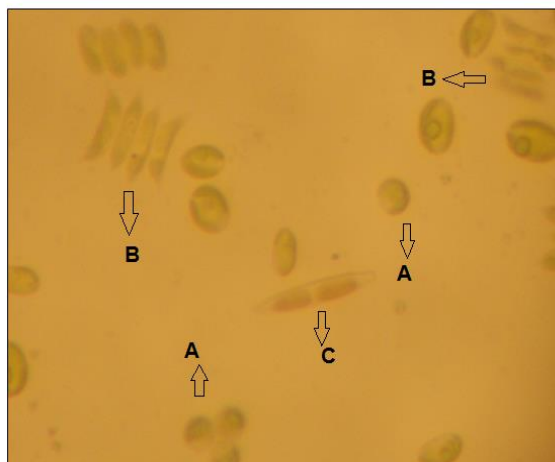


**Figura 1.** Filtrado de fitoplancton por medio de filtros de papel.

Para la observación de células de *Chlorella* sp. en cultivos de laboratorio, se procedió a seleccionar aquellas placas de petri donde se observó crecimiento algal (Figura 2) y la identificación de las células se llevó a cabo teniendo en cuenta las características morfológicas más sobresalientes del género: alga verde unicelular inmóvil de forma elipsoidal Des Abbayes *et al.*, (1989), Infante *et al.*, (2012), Moronta *et al.*, (2006), presencia de plastidios con una o más regiones llamadas pirenoides Ramírez. (2000). Durante la primera etapa (20 días) del cultivo (Figura 3) se evidenció el crecimiento de *Chlorella* sp. y otros tipos de algas de agua dulce como *Demodesmus* sp. (*Scenedesmus* sp.) y Diatomeas.



**Figura 2.** Cultivo algal. Crecimiento por medio de estriado.

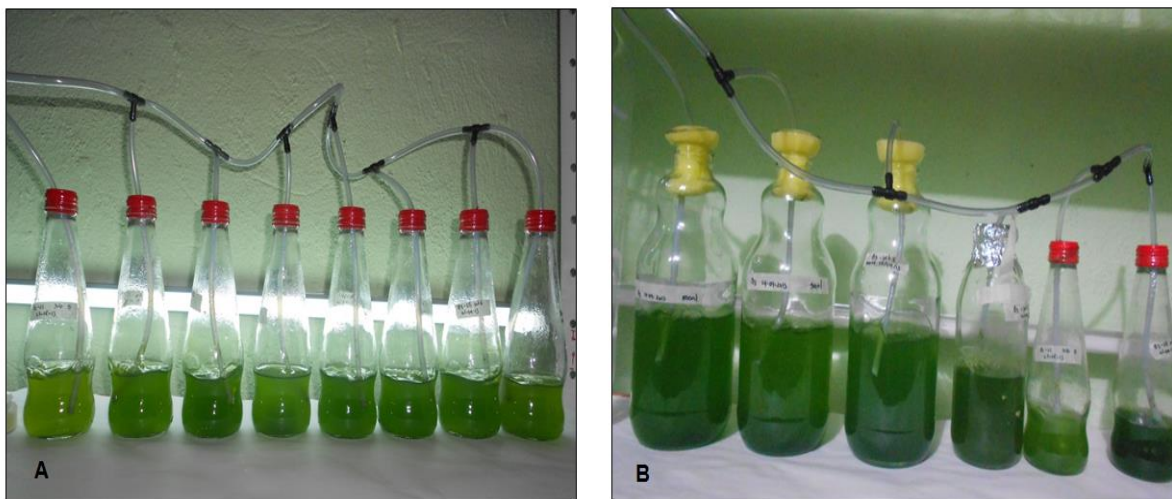


**Figura 3.** Cultivo de células de *Chlorella* sp. Vista microscopio 40x: A. células *Chlorella* sp. B. células de *Demodesmus* sp. C. células de Diatomeas

El establecimiento del cultivo monoalgal requirió la realización de reaislamientos por medio de subcultivos sucesivos. Para el crecimiento de células de *Chlorella* sp. se mantuvieron las placas de petri bajo condiciones controladas de temperatura de  $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , suministro de luz por medio de lámparas fluorescentes blancas de 21 Watts con un fotoperiodo de 12:12 horas luz/oscuridad (Moronta *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2006, 2009).

### **Escalamiento del cultivo monoalgal de *Chlorella* sp**

Los cultivos monoalgales de *Chlorella* sp. en placas se utilizaron para escalar el cultivo en medio líquido a un volumen inicial de 100 ml y posteriormente a un volumen final de 500 ml (Figura 4). A todos los cultivos durante el escalamiento se le proporcionó condiciones controladas de temperatura de  $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , iluminación lateral suministrada por lámparas fluorescentes, con un fotoperiodo de 12:12 horas luz/oscuridad y aireación constante. (Moronta *et al.*, 2006) y (Andrade *et al.*, 2006 y 2009).



**Figura 4.** Escalamiento cultivo monoalgal de *Chlorella* sp. (A) Cultivo en un volumen de 100 ml. (B) Cultivo en un volumen de 500 ml.

### **Muestreo de agua residual para el bioensayo de remoción de nutrientes**

Se realizó un muestreo simple recolectando 20L. de agua residual cruda (sin tratamiento), la cual tenía como punto de descarga el Humedal El Castillo. Posteriormente se esterilizó el agua residual cruda con el objetivo de determinar solo el efecto de la microalga *Chlorella* sp. en el bioensayo sin influencia de otro tipo de microorganismo proveniente inicialmente del agua residual.

### **Montaje de bioensayo y crecimiento de *Chlorella* sp**

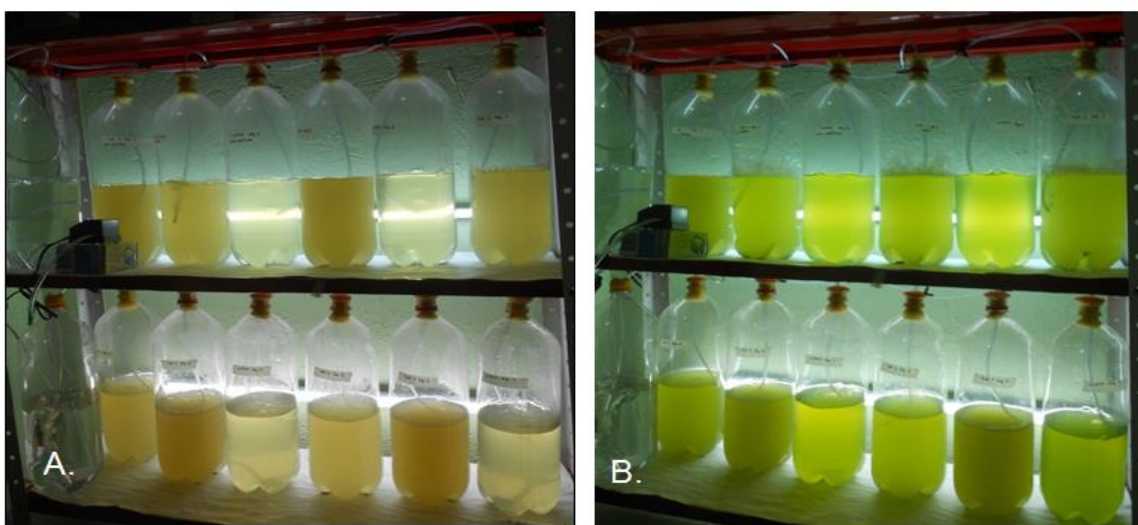
El bioensayo se llevó a cabo utilizando botellas plásticas con un volumen final 1,5l de agua residual y medio fertilizante foliar, con una concentración de inóculo de  $1 \times 10^6$  células/ml de *Chlorella* sp. (Figura 5) Se evaluó el crecimiento en 2 tratamientos diferentes: Tratamiento 1 (T1): Agua residual 100%, Tratamiento 2 (T2): Agua residual 75% - agua purificada 25%, control: Fertilizante foliar NPK 0,5 ml/l en agua purificada. Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones, ubicadas aleatoriamente. Los cultivos correspondientes al bioensayo se mantuvieron con las mismas condiciones controladas mencionadas en la fase de escalamiento. La duración del bioensayo fue de 21 días. Durante el desarrollo del cultivo se determinó la densidad celular realizando recuentos celulares diarios (Figura 6)

### **Análisis químico**

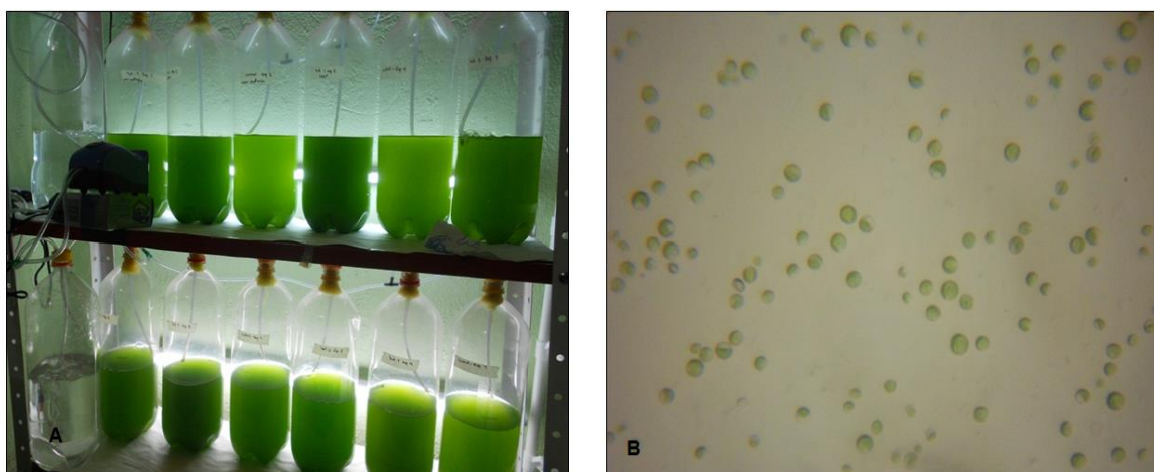
La determinación de nitratos y fosfatos se realizó por espectrofotometría, utilizando los métodos de reducción de cadmio y espectrofotometría ultravioleta respectivamente. Metodologías descritas por WPCF, APHA, AWWA.; (1992). Los datos se reportaron en unidades de absorbancia (ua).

### **Análisis estadístico**

Se aplicó un análisis de ANOVA de un solo factor ( $p \leq 0,05$ ) para la prueba de Scheffe's, utilizando el programa estadístico IBM® SPSS® Statistics versión 22 para la determinación de los tratamientos significativamente diferentes.



**Figura 5.** Bioensayo cultivo de *Chlorella* sp. en agua residual y control. (A) Bioensayo sin inoculo, (B) Bioensayo después de la inoculación con *Chlorella* sp.



**Figura 6.** (A) Cultivo después de los 21 días. Durante este periodo el cultivo alcanzó su fase estacionaria. (B) Células de *Chlorella* sp. a los 21 días de cultivo. Vista microscopio a 40X.

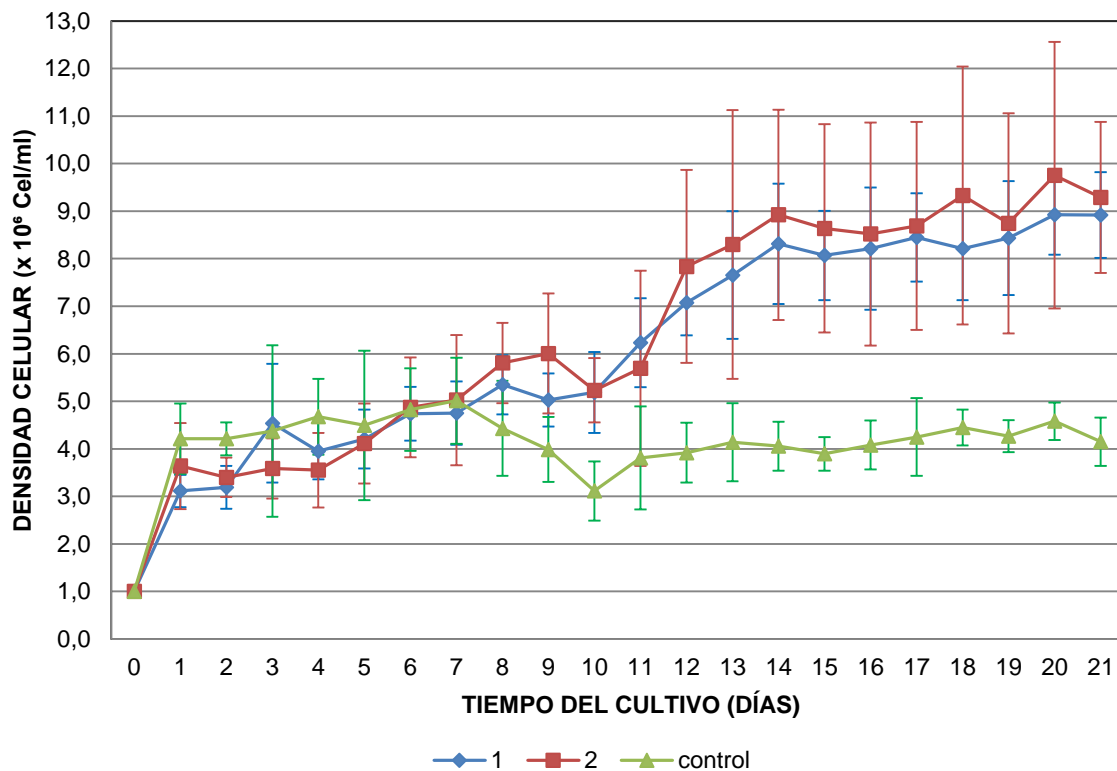
## Resultados y discusión

### Crecimiento de *Chlorella* sp. en agua residual

La microalga *Chlorella* sp. creció satisfactoriamente en todos los medios evaluados, sin embargo, las mayores densidades celulares se obtuvieron en agua residual ( $p < 0,05$ ) tanto para T1 como para T2 en comparación con el control, como se describe en estudios anteriores Andrade *et al.*, (2006), en los que se evaluó el crecimiento de esta alga en agua residual frente a un control de medio comercial. Los valores máximos de crecimiento celular fueron: para T1  $8,9 \pm 0,90 \times 10^6$  cel/ml, para T2  $9,8 \pm 2,80 \times 10^6$  cel/ml y para el control  $5,0 \pm 0,91 \times 10^6$  cel/ml.

Las curvas de crecimiento de *Chlorella* sp. en los dos tratamientos y control (Figura 7) evidencian una rápida adaptación de la microalga al medio, tanto de agua residual como el de fertilizante foliar; sin embargo se observa un menor crecimiento en el control durante todo el bioensayo, en la cual las células se adaptaron a las condiciones del medio ingresando desde el día 11 a su fase estacionaria. Con respecto T1 y T2, el crecimiento mayor con respecto al control de *Chlorella* sp. en agua residual se debe posiblemente a la cantidad, disponibilidad y diversidad de nutrientes contenidos en el agua residual (Andrade *et al.*, 2006; Chacón *et al.*, 2004).

De igual manera se evidenció que la curva de crecimiento de T1 y T2 fueron similares durante el bioensayo, lo que indicó que *Chlorella* sp. se adaptó fácilmente a las condiciones nutritivas tanto del medio con 100% agua residual como de agua residual en mezcla con agua purificada sin diferencias significativas ( $p>0,05$ ). Esto evidenció que el agua residual utilizada es un medio que brinda las condiciones necesarias para el crecimiento y desarrollo de *Chlorella* sp., el cual puede ser aprovechado para la obtención de biomasa algal como se comprobó en estudios previos por Andrade *et al.*, (2006), Chacón *et al.*, (2004). Así mismo, se ha señalado la conveniencia del uso de diferentes tipos de aguas residuales como medio de cultivo para el crecimiento algal y se han puesto en práctica lagunas de algas de grandes proporciones con bastante éxito (Andrade *et al.*, 2006).



**Figura 7.** Crecimiento de la microalga *Chlorella* sp. ( $\times 10^6$  cel/ml) en agua residual y control

### Remoción de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ )

En la remoción de nitratos se observó que para el agua residual y control, *Chlorella* sp. consumió durante todo el bioensayo este nutriente sin obtener diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre T1 y T2, pero sí de estos tratamientos en relación al control ( $p < 0,05$ ). De acuerdo a la curva de absorbancia de nitratos (Figura 8) para el medio control, se evidenció una reducción en la absorbancia y por ende de la concentración de nitratos del 64,6%, desde el día 8 al 21 (final del ensayo) con valores de  $0,749 \pm 0,248$  ua a  $0,484 \pm 0,046$  ua. Para los mismos días en los tratamientos con agua residual también se obtuvo una disminución del contenido de nitratos expresados en ua del 50,1% y del 49,8% para T1 y T2 respectivamente. Los valores de T1 fueron de  $1,279 \pm 0,193$  ua al  $0,641 \pm 0,186$ , mientras que para T2 los valores de absorbancia se redujeron de  $0,912 \pm 0,171$  ua a  $0,455 \pm 0,114$  ua. Teniendo en cuenta este análisis se podría manejar tiempos de retención menores de 10 días o mayores de 15 días para la remoción de  $\text{NO}_3^-$ .

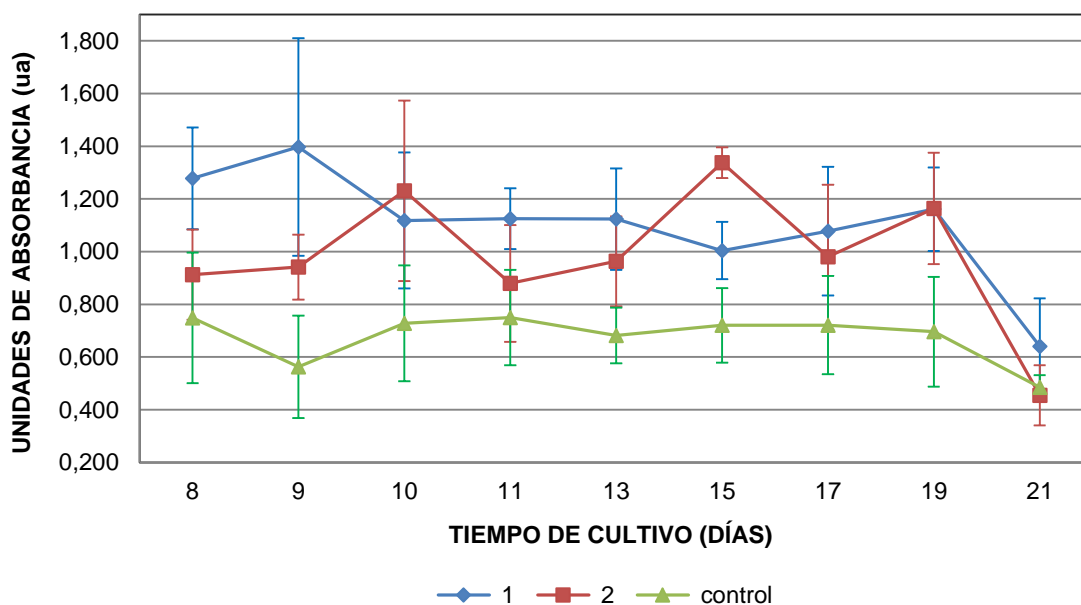


Figura 8. Medición de Absorbancia de Nitratos en agua residual y control.

La eficiencia alcanzada en la reducción del contenido de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 9) en agua residual al implementar un cultivo monoalgal con *Chlorella* sp. en los T1 y T2 (50,1% y 49,8% consecutivamente) fue inferior a lo reportado por Hernández., (2004) el cual logró remociones del 94% y 84% utilizando cultivos co-inmovilizados de dos especies del género *Chlorella* (*C. vulgaris* y *C. sorokiniana*) con *Azospirillum brasilense* y sistemas con la microalga sola respectivamente en agua residual doméstica. Otro estudio realizado por De-Bashan y Bashan., (2003) reporta una eliminación de nitratos del 84% en agua residual sintética co-inmovilizando *Chlorella* sp. No obstante los porcentajes obtenidos en el bioensayo se acercaron a los alcanzados por Roa y Cañizares., (2012) con 60% utilizando la microalga *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizada en agua residual doméstica.

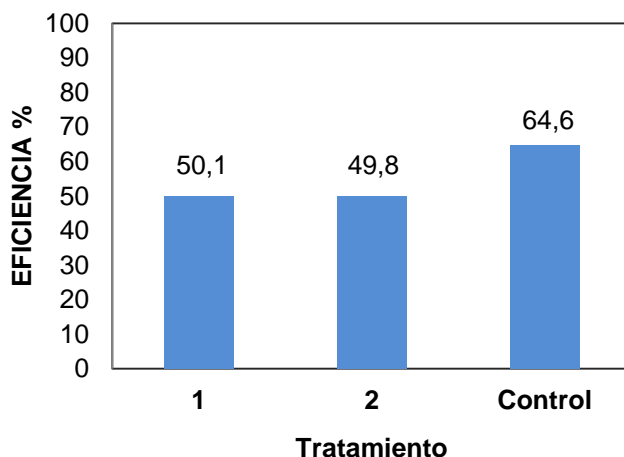
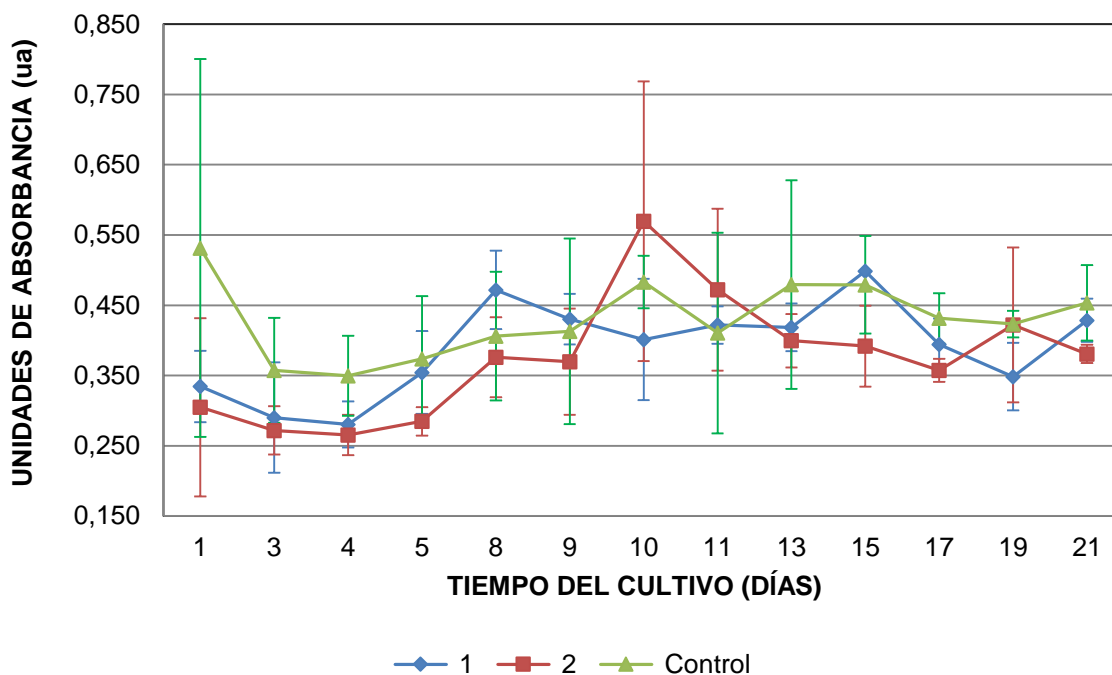


Figura 9. Eficiencia en Remoción Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) utilizando *Chlorella* sp.

### Remoción de fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ )

En cuanto a la remoción de fosfatos se logró determinar que no hubo diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos ( $p > 0,05$ ). Sin embargo se obtuvo una mayor eficiencia en la remoción en T2 con 87,0%, registrando valores de absorbancia de  $0,265 \pm 0,029$  ua para el día 4 (valor más bajo durante el bioensayo) en relación al día 1 ( $0,305 \pm 0,127$ ua), seguido de T1 con una eficiencia del 83,8% con valores de  $0,280 \pm 0,033$  ua y  $0,335 \pm 0,051$  ua para los días 4 y 1 correspondientemente. Para el control la reducción en la concentración de fosfatos fue del 65,7% con valores de absorbancia para los mismos días del  $0,350 \pm 0,057$  y del  $0,531 \pm 0,269$  ua (día 4 y 1).

Observando la curva de absorbancia para fosfatos (Figura 10) se detalla un comportamiento fluctuante en los valores para el control, debido posiblemente a que el cultivo entró en fase estacionaria a partir del día 11 (Figura 7) de alguna manera por una deficiencia en algún nutriente en el medio control utilizado. Un comportamiento similar ocurrió en T1 y T2, en los cuales después del día 4 se obtuvo un aumento en los valores de absorbancia seguidos de descensos en los mismos, demostrando la remoción o asimilación de fosfatos por parte *Chlorella* sp. durante el transcurso del bioensayo. Estas fluctuaciones presentadas durante el bioensayo sugirió la posibilidad de que el fósforo al encontrarse en el agua residual en formas fosfatadas (ortofosfatos, polifosfatos y fosfatos orgánicos) Romero., (2000) forman complejos compuestos con la materia orgánica, los cuales en principio no son asimilables por las microalgas, por lo cual estas en acción con otros microorganismos como las bacterias rompen de alguna manera estos compuestos convirtiéndolos así en formas fosfatadas más simples y asimilables para las microalgas. Por lo cual se generó una liberación de fosfatos y asimilación a su vez por parte de *Chlorella* sp. durante el transcurso del bioensayo. No obstante es recomendable revalidar esta interpretación por medio de estudios más exhaustivos en trabajos futuros, en los cuales se analice la transformación o síntesis bioquímica de los compuestos de fósforo contenidos en el agua residual durante el tiempo del bioensayo y la asimilación de estos por parte de la microalga.



**Figura 10.** Medición de Absorbancia de Fosfatos en agua residual y control.

Los porcentajes de eficiencia obtenidos en la remoción del contenido de  $(\text{PO}_4^{-3})$  (Figura 11) en el agua residual tanto para T1 y T2 (83,8% y 87,0% respectivamente) como para el control (65,7%) fueron superiores a los reportados por Hernández., (2004) en el cual eliminaron 50% del fósforo total con cultivos co-inmovilizados *Azospirillum brasilense* con dos especies del género *Chlorella* en ayuno; igualmente al conseguido por Andrade *et al.*, (2006), los cuales reportaron una remoción de 73,5% de  $(\text{PO}_4^{-3})$  en agua residual proveniente de una laguna facultativa y de la misma forma con lo reportado por Roa y Cañizares., (2012) donde obtuvieron una disminución de  $(\text{PO}_4^{-3})$  del 47%. De la misma manera Chacón *et al.*, (2004) obtuvieron una remoción máxima de fosfatos para *Chlorella sp.* del 44% en agua residual esterilizada y del 48,7% en agua residual no esterilizada para *Scenedesmus sp.* y cercanos a los reportados en estudios realizados por De – Bashan y Bashan.,(2003) los cuales lograron una eliminación del 89% de fósforo de agua residual sintética con *Chlorella sola* y del 92% co-inmovilizando *Chlorella sp.* con *A. brasilense*. El análisis anterior demostró que para la remoción de fosfatos no se puede dejar las células de *Chlorella sp.* mucho tiempo en el agua residual. De acuerdo a las curvas obtenidas el tiempo sería menor a 4 días, en los cuales como se describió anteriormente se lograron los valores más bajos de absorbancia y por ende mayor remoción de fosfatos durante el bioensayo.



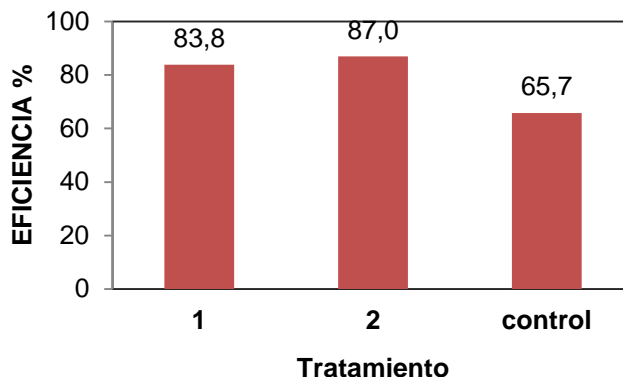


Figura 11. Eficiencia Remoción Fosfatos ( $PO_4^{3-}$ ) utilizando *Chlorella* sp. Periodo: día 1–4.

## Conclusiones

Se logró aislar una cepa autóctona de *Chlorella* sp. en cultivos de laboratorio utilizando como medio de cultivo fertilizante foliar. La microalga mostró un crecimiento significativo en el agua residual, tanto para T1 como para T2, adaptándose fácilmente a las condiciones de estos medios. Igualmente se determinó el efecto *Chlorella* sp. como método de tratamiento *in vitro* en aguas residuales para la remoción de nitratos y fosfatos, logrando remociones considerables en los diferentes tratamientos con agua residual y comprobando su viabilidad como tratamiento terciario de aguas residuales.

## Agradecimientos

Al Biólogo Daniel Arturo Saavedra por la asesoría prestada y compromiso en este trabajo. Al Químico Leonardo Moreno por su orientación en todo lo relacionado con los procedimientos de análisis químicos y al Doctor Seyed Medhi Jazayeri por su asistencia en cuanto al proceso de análisis estadístico. Por último al personal docente responsable de los laboratorios de la UNIPAZ.

## Bibliografía

Andersen, R. (2005). Algal culturing techniques. USA. Elsevier Academic Press. p 578.

Andrade, C., Chacón, C., Cárdenas, C., Morales, E. (2006). Remoción de nitrógeno y fósforo de aguas residuales urbanas por la microalga *Chlorella* sp. en condiciones de laboratorio. Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences. Ciencia. 14 (1): 56-63.

Andrade, C., Vera, A., Cárdenas, C., Morales, E. (2009). Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. Rev. Téc. Ing. Universidad de Zulia. 32 (2): 126-134.

Andrade R., Torres R., Montes E. (2008). Obtención de harina a partir del cultivo de *Chlorella vulgaris* y su análisis proteico. 50-57.

Camacho R., Campos V., Escalera C., González M. Vásquez G. (2012). Cultivo y elaboración de un producto comestible de *Chlorella vulgaris*. p 16. Recuperado de <https://www.feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria17/21.pdf>.

Cañizarez, R., Ontiveros, C. (1993). Comportamiento cinético de un cultivo mixto de la microalga *Tetraselmis chuii* y dos bacterias. Revista de Investigaciones Marinas. 14: 86-91

Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo I., Morales, E. (2004). Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. En la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. 38 (2): 94-108.

De Bashan, L., Bashan, Y. (2003). Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales. Revista Colombiana de Biotecnología. 5 (2): 85-90.

Des Abbayes, H., Gausson, H., Chadefaud, M., Grassé, P., Feldmann, J., Prévot, A., De Ferré, Y. (1989). Botánica vegetales inferiores. Barcelona. 2 Ed. Reverté S.A. p 757.

De la Noüe, J. Laliberte, G., Prouls, D. (1992). Algae and wastewater. J. Appl. Phycol. 4: 247-254.

Escorihuela, A., Núñez, M., Rosales, N., Mora, R., Morales, E. (2007). Microalgas presentes en una laguna para pulimento de efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas. Revista Facultad Agronómica (LUZ). 24: 225–230.

Garduño, G., Rodríguez, M., Martínez, M., Quintanar, R., Lozano, C., Campos, J., Monsalvo, A. (2011). Cultivos de microalgas del Lago de Catemaco, Veracruz. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal. 2 (2): 67-80.

Hernandez, J., (2004). Evaluación de un sistema de microalgas y bacterias para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales domésticas (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional. La Paz.

Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Flórez, J., Barrios, F., Zapata, C., (2012). Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. Revista de Avances en Ciencias e Ingeniería. 3: 159-164.

Mora, R., Moronta, R., Ortega, J., Morales, E. (2005). Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella* sp. aislada de la Represa de Tulé,

Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela. Revista Ciencia, Universidad del Zulia. 12 (2): 1-9.

Moronta, R., Mora, R., Morales, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. Revista Facultad Agronómica (LUZ). 23: 27-41.

Pütz, P. (2012). Informe práctico. Analítica de laboratorio y sistema de control de proceso Nutrientes. Fosfato. Productos de aplicación de laboratorio, HACH LANGE. p 4. Recuperado de: <https://www.hachlange.es>

Ramalho, R. (1996). Tratamiento de aguas residuales. Barcelona (España). Reverté S.A. 1 ed. p 716.

Ramírez, J. (2000). Fitoplancton de agua dulce: aspectos ecológicos, taxonómicos y sanitarios. Medellín. Universidad de Antioquia. p 206.

Roa, AL., Cañizares, R. (2012). Bioremediación de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado. Bistua Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 10 (1): 71-79.

Romero, J. (1988). Acuitratamiento por Lagunas de Estabilización. Bogotá D.C.: Escuela Colombiana de Ingeniería 3 Ed. p 281.

Romero, J. (2000). Tratamiento de Aguas Residuales. Teoría y principios de diseño. Bogotá D.C. Escuela Colombiana de Ingeniería. p 1248.

Salazar, M. (2005). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. Departamento de Biotecnología. p 64–70.

Seoanez, M. (1999). Aguas Residuales Urbanas. Tratamientos Naturales de Bajo Costo y Aprovechamiento. Barcelona (España). Mundi-Prensa 2da Ed. p.114-118.

WPCF, APHA, AWWA. (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Madrid (España). Ediciones Díaz De Santos S.A. 17 Ed. 10 – p 213.

## Efecto del uso de la escama de pescado en la alimentación de codornices sobre la calidad del huevo

Effect of use fish scale in feed quail on quality egg

Hurtado N, Víctor Libardo<sup>1</sup>. Herrera, Yineth Maryori<sup>2</sup>. Gómez, David Alberto<sup>3</sup>.

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del uso de escama de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y tilapia (*Oreochromis sp*) como fuente de calcio en la alimentación de codornices sobre la calidad del huevo. Se utilizaron 360 huevos procedentes de un ensayo con 200 codornices japonesas de 45 días de edad, distribuidas en un diseño experimental completamente al azar con cuatro tratamientos, cinco repeticiones y diez aves por repetición. Los tratamientos consistieron en niveles de sustitución del carbonato de calcio por material sólido de escamas de pescado en 0, 10, 20 y 30% de la dieta basal. La inclusión de 20% de escama de pescado aumentó ( $p=0,04$ ) el diámetro trasversal (20,0 mm) y peso del huevo (11,47 g), las otras características de calidad del huevo no fueron influenciadas ( $p>0,05$ ) por los niveles de escama en la dieta. En conclusión, en la alimentación de codornices en postura se puede utilizar hasta un 20% de material sólido de escama de pescado como fuente alternativa de calcio sin afectar los parámetros de calidad interna y externa del huevo.

**Palabras claves.** Coturnix japónica, acuicultura, calcio, unidades Haugh

### Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of using fish scale of cachama (*Piaractus brachypomus*) and tilapia (*Oreochromis sp*) as a source of dietary calcium on the quality quail egg. Were used 360 eggs from assay with 200 japanese quail of forty-five days of age, distributed in a completely randomized design with four treatments, five replicates and ten birds per replicate. The treatments consisted of substitution levels of calcium carbonate by solid material fish scale to 0, 10, 20 and 30% of the basal diet. The inclusion to 20% fish scale increase ( $p=0.04$ ) the transverse diameter (26,0 mm) and egg weight 11,47 g) the other egg quality characteristics were not influenced ( $p>0,05$ ). In conclusion, in

<sup>1</sup> MVZ, PhD; Universidad de los Llanos; [vhurtado@unillanos.edu.co](mailto:vhurtado@unillanos.edu.co)

<sup>2</sup> MVZ; Universidad de los Llanos; [yinetmartyori@gmail.com](mailto:yinetmartyori@gmail.com)

<sup>3</sup> MVZ; Universidad de los Llanos; [gomezbeltrandavidalberto@gmail.com](mailto:gomezbeltrandavidalberto@gmail.com)



quail in laying may use up to 20% solid material fish scale as an alternative source of calcium without affecting the parameters of internal and external quality of the egg.

**Keywords.** Coturnix japonica, Aquaculture, haugh units

## Introducción

La piscicultura ha crecido de manera considerable durante las últimas décadas (Castillo, 2011). Sin embargo, este aumento ha generado algunos problemas ambientales en las fases de levante, engorde, transformación y fileteado, en las que se desvían los cursos de fuentes hídricas, se contamina el agua, se desechan las escamas e incluso vísceras, ejerciéndose efectos contaminantes de amplia cobertura, en la cual los residuos no se aprovechan dentro del mismo u otros procesos productivos.

La escama de pescado contiene sustancias inorgánicas como el fosfato de calcio (hidroxiapatita) y el carbonato de calcio (Pérez y Garcia, 2009) de potencial uso en la alimentación animal. La escama en estado crudo y procesada de cachama y tilapia contiene 40% de calcio y 10% de fósforo (Gómez y Benítez, 2011).

El calcio es el elemento mineral predominante en el organismo, 99% se encuentra en el hueso y el 1% en los tejidos blandos, es responsable de la excitabilidad del tejido nervioso, de las contracciones cardiacas y colabora en la coagulación sanguínea (Mora, 2007). El calcio es necesario en la dieta de codornices para el mantenimiento y producción de huevo de buena calidad de la cáscara. La cáscara del huevo está compuesta principalmente de carbonato cálcico y constituye, en la gallina se requiere aproximadamente de 2 gramos para formar la cáscara, indicando que cerca del 10% del calcio presente en el organismo es utilizado diariamente. (Angulo, 2009).

La producción de huevos de codornices es una actividad en crecimiento, que se puede realizar en pequeños espacios y exige poca inversión. Sin embargo, en la alimentación de estas aves, se debe atender los requerimientos nutricionales para maximizar la producción de huevos, el fosforo y el calcio debe suministrarse en la cantidades adecuadas para obtener un producto de calidad. Los requerimientos recomendados para codornices japonesas en fase de postura son 3,2 y 0,4% (Silva *et al.*, 2011), 3,099 y 0,323% (Rostagno *et al.*, 2011), 2,5 y 0,35% (NRC, 1994) para calcio y fósforo disponible respectivamente.

Con base en lo anteriormente expuesto el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del uso de la escama de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y de



tilapia (*Oreochromis* sp) en sustitución parcial del carbonato de calcio en dietas para codornices japonesa sobre las características de calidad del huevo.

### **Materiales y métodos**

El trabajo se realizó en la Granja de la Universidad de los Llanos, en Villavicencio, vereda Barcelona que se encuentra ubicada a una altura 387 msnm, con temperatura media de 27° C y 82 % de humedad relativa y 3500 mm de precipitación anual. Se utilizaron 360 huevos procedentes de un ensayo con 200 codornices japonesas (*Coturnix coturnix Japónica*) de 45 días de edad, alojadas en jaulas de cinco niveles con tres divisiones por nivel, cada división estaba dotada de comederos y bebederos automáticos. Las aves fueron distribuidas en un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos, cinco repeticiones y diez aves por repetición. Los tratamientos estaban constituidos por la inclusión de diferentes niveles inclusión de material sólido de escamas de *Piaractus brachypomus* y de *Oreochromis* sp, en sustitución de 0, 10, 20, y 30% del carbonato de calcio de la dieta basal.

La dieta basal estaba compuesta por maíz, torta de soja, aceite vegetal, carbonato de calcio, fosfato bicálcico, sal común, vitaminas, D- L metionina, L -lisina, para atender los requerimientos nutricionales recomendados por NRC (1994) como se observa en la tabla 1.

Se realizaron seis colectas de tres huevos por unidad experimental, con intervalo de cuatro semanas cada una. Para evaluar las características de calidad interna y externa del huevo. Las características evaluadas fueron peso de huevo, diámetro longitudinal y diámetro transversal, altura del albumen, diámetro del albumen, altura de la yema, peso de la yema, diámetro de la yema, peso de la cáscara, peso del albumen, grosor de la cascara, porcentaje de yema, porcentaje de cáscara, porcentaje del albumen, unidades Haugh, índice de la yema e índice del albumen.

Para la evaluación de las características de calidad del huevo, se utilizó una balanza digital Aventures®, inicialmente se determinó el peso del huevo y posteriormente se pesaron por separado los componentes del huevo.

La yema fue separada manualmente del albumen y posteriormente pesada. La cáscara fue lavada para retirar la presencia de otros componentes que constituyen el huevo (albumen y yema) y luego secada a temperatura ambiente con el fin de ser pesada.

Tabla 1. Composición centesimal de las raciones experimentales

|                           | Nivel de inclusión de escama de pescado |       |       |       |
|---------------------------|---|-------|-------|-------|
|                           | 0%                                      | 10%   | 20%   | 30%   |
| Maíz                      | 56,20                                   | 56,20 | 56,20 | 56,20 |
| Torta de soja             | 34,00                                   | 34,00 | 34,00 | 34,00 |
| Aceite vegetal            | 1,45                                    | 1,45  | 1,45  | 1,45  |
| Carbonato de calcio       | 5,41                                    | 4,87  | 4,33  | 3,79  |
| Escama de pescado         | 0,00                                    | 0,54  | 1,08  | 1,62  |
| Fosfato                   | 1,32                                    | 1,23  | 1,13  | 1,03  |
| Sal                       | 0,50                                    | 0,50  | 0,50  | 0,50  |
| Vitamina                  | 0,50                                    | 0,50  | 0,50  | 0,50  |
| D- L metionina            | 0,17                                    | 0,17  | 0,17  | 0,17  |
| OL –lisina                | 0,05                                    | 0,05  | 0,05  | 0,05  |
| Material inerte           | 0,40                                    | 0,49  | 0,59  | 0,69  |
| <b>Análisis calculado</b> |   |       |       |       |
| Proteína bruta, %         | 20,00                                   | 20,00 | 20,00 | 20,00 |
| EM kcal/kg                | 2887                                    | 2887  | 2887  | 2887  |
| P disponible, %           | 0,35                                    | 0,38  | 0,42  | 0,45  |
| Calcio, %                 | 2,50                                    | 2,49  | 2,47  | 2,45  |
| Lisina, %                 | 1,00                                    | 1,00  | 1,00  | 1,00  |
| Metionina, %              | 0,45                                    | 0,45  | 0,45  | 0,45  |
| Treonina, %               | 0,68                                    | 0,68  | 0,68  | 0,68  |
| Fibra bruta, %            | 2,82                                    | 2,82  | 2,82  | 2,82  |
| Relación P:Ca             | 7.14                                    | 6.55  | 5.88  | 5.44  |

El peso del albumen fue determinado por diferencia entre el peso del huevo y los otros componentes (cáscara y yema) del mismo. El valor relativo de cada uno de los constituyentes del huevo se calculó relacionando el peso de estos con el peso del huevo.

Los diámetros longitudinal y transversal del huevo se midieron con Calibrador Pie de Rey Stainless - Hardened<sup>®</sup> digital.

El grosor de la cáscara se estimó según la metodología descrita por Melo *et al.* (2008), retirando cuatro pedazos de aproximadamente 3 a 5 mm<sup>2</sup> de cáscara seca, de posiciones equidistantes de la región ecuatorial del huevo. El grosor de cada fracción de cáscara fue medido con micrómetro externo de Somet<sup>®</sup>, con curso de 25 mm, lectura de 0,01 mm y exactitud de ± 0,002 mm.

Las Unidades Haugh se calcularon relacionando el peso del huevo y la altura del albumen según fórmula sugerida por Dudusola (2010).

$$HU = 100 \log \left( \frac{H - G^{0.5} (30 W^{0.37} - 100)}{100 + 1.9} \right)$$

H = altura de la albúmina, cm

G = 32.2

W = peso del huevo, g

Para medir la altura y diámetro de la yema y la clara se utilizó un Calibrador Pie de Rey Stainless - Hardened<sup>®</sup>, y para estimar los índices de yema y de clara se aplicaron las siguientes formulas:

$$\text{Índice de yema \%} = \frac{\text{altura de la yema}}{\text{Diámetro de la yema}} \times 100$$

$$\text{Índice de clara \%} = \frac{\text{altura de la clara}}{\text{Diámetro de la clara}} \times 100$$

Los datos fueron analizados en el programa Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, SAEG 9.1 (2007), sometidos a análisis de variancia al 5% de probabilidad.

## Resultados

Durante el periodo experimental la temperatura promedio del galpón fue de 28,20 °C y humedad relativa de 72,34 %, según Vásquez y Ballesteros ( 2009) la temperatura óptima para la producción de codornices debe estar entre 18 y 24 °C con humedad relativa entre 60 y 65 %, lo que indica que las codornices no estaban en condiciones de confort térmico. Sin embargo, está situación no afectó la calidad de la cáscara, la cual según Martínez (1999), está relacionada con la pérdida del equilibrio iónico ácido – básico tanto en la sangre como en el oviducto cuando el ave intenta termo- regular, afectando la cantidad de bicarbonato necesaria para la formación de la cáscara.

Los resultados de las características de calidad externa e interna del huevo de codornices alimentadas con diferentes niveles de inclusión de escama de *Piaractus brachypomus* y de *Oreochromis* sp se presentan en las tablas 2 y 3 respectivamente.



Tabla 2. Calidad externa del huevo de codorniz japónica (*Coturnix coturnix Japónica*) utilizando diferentes niveles de inclusión de escama de pescado en la dieta.

| Característica             | Nivel de sustitución de carbonato de calcio por escama de pescado |        |        |        | (p)  | SEM  |
|----------------------------|---|--------|--------|--------|------|------|
|                            | 0%  | 10%    | 20%    | 30%    |      |      |
| Peso huevo (g)             | 11,05b  | 11,19b | 11,47a | 11,20b | 0,04 | 0,09 |
| Diámetro longitudinal (mm) | 32,6  | 32,50  | 32,90  | 32,70  | NS   | 0,17 |
| Diámetro trasversal (mm)   | 25,3b   | 25,40b | 26,00a | 25,20b | 0,04 | 0,18 |
| Grosor de la cascara (mm)  | 0,175   | 0,176  | 0,181  | 0,176  | NS   | 0,30 |
| Peso de la cáscara (g)     | 0,99  | 0,88   | 0,92   | 0,84   | NS   | 0,06 |
| Porcentaje de cascara (%)  | 8,95  | 7,86   | 8,02   | 7,50   | NS   | 0,60 |

p: Probabilidad, letras distintas en la misma línea indican diferencia significativa por la Prueba de Tukey ( $p=0,04$ ).

NS: No significativo ( $p>0,05$ )

SEM: Error estándar de la media.

Tabla 3. Calidad interna del huevo de codorniz japónica (*Coturnix coturnix Japónica*) utilizando diferentes niveles de inclusión de escama de pescado en la dieta.

| Característica            | Nivel de sustitución de carbonato de calcio por escama de pescado |       |       |       | (p) | SEM  |
|---------------------------|---|-------|-------|-------|-----|------|
|                           | 0%  | 10%   | 20%   | 30%   |     |      |
| Altura del albumen (mm)   | 4,53  | 3,91  | 4,44  | 4,18  | NS  | 0,27 |
| Diámetro del albumen (mm) | 41,29   | 40,47 | 39,64 | 40,45 | NS  | 1,01 |
| Peso albumen (g)          | 6,63  | 6,79  | 6,76  | 6,78  | NS  | 1,02 |
| Porcentaje albumen (%)    | 58,66   | 60,64 | 58,89 | 59,75 | NS  | 1,07 |
| Índice albumen (%)        | 11,17   | 11,98 | 11,43 | 10,48 | NS  | 1,31 |
| Unidades Haug (%)         | 88,80   | 86,25 | 88,17 | 87,83 | NS  | 1,09 |
| Altura de la yema (mm)    | 11,44   | 8,30  | 8,49  | 9,30  | NS  | 0,45 |
| Diámetro de la yema (mm)  | 23,31   | 22,51 | 23,05 | 22,22 | NS  | 0,36 |
| Peso de la yema (g)       | 3,46  | 3,47  | 3,70  | 3,53  | NS  | 0,07 |
| Porcentaje de yema (%)    | 30,62   | 31,46 | 31,66 | 31,67 | NS  | 0,07 |
| Índice de yema (%)        | 49,40   | 37,57 | 37,29 | 42,06 | NS  | 6,33 |

p: Probabilidad

NS: No significativo ( $p>0,05$ )

SEM: Error estándar de la media.

La inclusión de 20% de escama de pescado en la dieta incrementó ( $p=0,04$ ) el diámetro trasversal y el peso del huevo, las demás características de calidad externa no fueron influenciados ( $p>0,05$ ) por los niveles de inclusión del material



sólido de escama de pescado. Estos resultados indican una relación positiva entre el peso del huevo y los diámetros estimados.

Del mismo modo, el mayor grosor de cáscara fue obtenido con la dieta con 20% de escama de pescado, en los demás tratamientos el grosor de cáscara fue similar.

El menor peso del huevo estuvo relacionado con el mayor peso de la cáscara obtenido por el tratamiento control. Contrario a lo anterior el menor peso de la cáscara lo presentó la dieta con 30% de escama de pescado.

La sustitución parcial de carbonato de calcio por escama de pescado en la dieta no afectó ( $p > 0.05$ ) las características de calidad interna del huevo de codorniz. La mayor altura del albumen se obtuvo con el tratamiento control, resultado que se refleja en el mayor alto valor relativo de unidades Haug. Con la inclusión de 10% de escama se observaron, los mayores valores relativo y absoluto de peso e de índice de albumen. El porcentaje de albumen fue próximo en las dietas con 0 y 20% de escama.

El tratamiento control mostró la mayor altura y diámetro de la yema, entre tanto los tratamientos con 10 y 30% fueron los de menor valor.

El peso de la yema se incrementó con la inclusión de 20% de escama de pescado en la dieta. Los tratamientos control y con 10% de escama de pescado presentaron los menores valores para esta variable, con similitud entre ellos. Entre peso del huevo y peso de la yema se evidenció una correlación positiva.

El mejor índice de yema lo presentó el tratamiento control, seguido por el tratamiento con 30% de escama de pescado.

## **Discusión**

El peso del huevo obtenido en este trabajo es menor al reportado por Jibaja (2011) de 11,74 g con 3,40 % de calcio en la dieta, indicando que los niveles de calcio no influyen en el peso del huevo, ya que éste depende entre otros factores de la edad del ave, el tamaño de la yema y el medio ambiente en producción.

Los resultados de los diámetros longitudinal y trasversal se explican por la relación de éstos con el peso del huevo (Molina, 2004), estos resultados superan los valores constatados por Jara (2011).



En relación con el peso absoluto y relativo de la cáscara, Moura *et al.* (2009) reportan valores menores de 0,92 g y 8,43 %. Por otro lado, Quintanilla (2012) reportó mayor peso y porcentaje de cáscara de 1,0 g y 9,12 % respectivamente al utilizar 4,3% de calcio de la dieta.

El mayor porcentaje de la cáscara puede estar relacionada con el menor peso del huevo del tratamiento control en relación con los demás tratamientos. Según Martínez (1999) el peso del huevo aumenta con la edad del ave, pero no así la cantidad de cáscara, debido a que es la misma cantidad de cáscara que se emplea para cubrir una superficie más grande.

Según Cruz (2008) la cáscara delgada se puede producir por fallas nutricionales debido a la deficiencia de calcio o de fósforo, o también por exceso de fósforo o cuando las aves están sometidas a estrés térmico. El grosor de la cáscara no fue afectado por la inclusión de escama de pescado, de tal forma se puede considerar que este material contiene una proporción adecuada de calcio y fósforo, indicando que la cantidad absoluta de estos minerales y la relación fósforo: calcio en la dieta atendían los requerimientos de estos nutrientes del ave en fase de postura.

En relación a las características de calidad interna del huevo, Jara (2011) reportó mayor diámetro y altura del albumen de 59,7mm y 5,2 mm respectivamente, a los resultados del presente trabajo, explicando que la altura del albumen depende del tiempo y temperatura de almacenamiento (Moura *et al.*, 2008). Respecto al peso del albumen, Moura *et al.*, (2009) y Dudusola (2010) obtuvieron 6,73 y 6,33 g respectivamente, valores inferiores a los constatados en esta investigación.

El alto valor de índice de albumen denso indica mayor frescura del huevo, dado que hay una menor fluidificación del albumen, es decir el huevo está menos degradado. El índice de albumen es relativamente alto comparado con el reportado por Jara (2011) de 8,78%.

Los niveles de escama en la dieta proporcionaron altura y diámetro de la yema inferiores a los reportados por Jara (2011) de 11,7 y 25,30 mm respectivamente.

El resultado de peso de la yema es superior al reportado por Moura *et al.*, (2009) de 3,33 g de yema. Entre peso del huevo y peso de la yema existe una correlación positiva, es decir el peso del huevo depende del tamaño de la yema.

El índice de yema es un parámetro que informa sobre la forma ideal de la yema y su relación con la frescura y calidad del huevo. Cuanto mayor sea el valor de este índice, mayor es la frescura del huevo, ya que la yema se presenta más compacta.



El índice de yema constatado en este trabajo fue superior a lo reportado por Jara (2011) de 46,09% y Dudusola (2010) de 46%.

La calidad de la clara, depende de la consistencia del albumen denso y se expresa mediante las unidades Haugh, en esta variable los datos obtenidos superan a los valores reportados por Moura *et al.* (2008) de 78,04-85,97% de huevos almacenados al medio ambiente, pero son inferiores a los encontrados por Oliveira *et al.* (2008) de 94,06 utilizando dietas con niveles reducidos de calcio (1,9-2.2%).

Los resultados en general obtenidos en este trabajo indican que la calidad del huevo no se ha alterado por la inclusión de escama de pescado en la dieta, corroborando lo expuesto Moura *et al.* (2007), en el sentido que la calidad interna del huevo se deteriora principalmente por la pérdida de agua y de dióxido de carbono durante el almacenamiento, dependiendo del incremento de la temperatura de conservación, lo que induce al envejecimiento del huevo con la consiguiente licuefacción y pérdida de agua por evaporación, que conduce a una menor altura del albumen denso.

Además, se evidencia que los niveles de calcio y fósforo para codornices japonesas en fase de postura criadas en condiciones tropicales pueden sufrir variaciones, lo cual genera la necesidad de estimar los requerimientos de estos minerales en esas condiciones.

## Conclusiones

En la alimentación de codornices en fase de postura se puede utilizar hasta un 20 % material sólido de escama de pescado como fuente alternativa de calcio, el cual mejoró el diámetro trasversal y peso del huevo sin afectar los demás parámetros de calidad externa del huevo.

La concentración de calcio y fosforo en las dietas experimentales derivada de la inclusión de hasta 30% de escama de pescado en la dieta para codornices japonesas en fase de postura no afecta las características de calidad interna del huevo.

## Bibliografía

Angulo, A. E. 2009. Fisiología aviar. Lleida, España: Universidad de Lleida, p.120.

Castillo, L. (2011). Tilapia Roja, Una evolución de 29 años de la incertidumbre al éxito. Disponible en Internet en: <http://ag.arizona.edu/azaqua/ista/reports/TILAPIAROJA2010.doc>. Acceso mayo 2013.



Cruz, R.M. 2008. Alteraciones de la cáscara, clara y yema de huevo. *Ganadería*, 52: 56-57.

Dudusola, I. O. 2010. Comparative evaluation of internal and external qualities of eggs from quail and guinea fowl. *International Research Journal of Plant Science*. 1(5):112-115.

Gómez, J. Benítez, M. J. 2011. Evaluar el posible uso de la escama de cachama (*Piaractus brachypomus*) y tilapia (*Oreochromis s.p.*) como desecho de la producción piscícola en la producción de nutrición animal y como enmienda en suelos de la región (Trabajo de grado). Universidad de los Llanos. Villavicencio.

Jara, Z. P. 2011. Estudio Comparativo de la Calidad, Propiedades Biológicas y Físicas del huevo de 6 especies de Aves Domésticas (Gallinas, Codorniz, Pato, Pavo, Ganso y Paloma) y sus Alternativas de Industrialización (Trabajo de grado). Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Riobamba.

Jibaja, T.M. 2011. Nivel de calcio en la producción de huevos de codorniz (*Coturnix coturnix* japónica) (Trabajo de grado). Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo.

Martínez, J.J. 1999. Efecto en la calidad del cascarron. *Los Avicultores y su Entorno*, 9 (2): 29-32.

Melo T.V., Ferreira, R.A., Oliveira, V.C., Carneiro, J.B.A., Moura, A.M.A., Silva, C.S., y Nery, V.L.H. 2008. Calidad del huevo de codornices utilizando harina de algas marinas y fosfato monoamónico. *Archivos de zootecnia*, 57(219): 313-319.

Molina, A.S. 2004. Analisis de la calida interna y externa del huevo de gallinas criollas (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Michoacana.

Mora, L. 2007. Nutricion animal. San Jose: EUNED. p 120.

Moura A. M. A., Soares R. T. R. N., Fonseca, J. B., Vieira, R. A. M., Couto, H. P. 2007. Exigencia de lisina para codornas japonesas (*Coturnix japônica*) na fase de cria. *Ciencia e agrotecnologia*, 31 (4):1191-1196.

Moura, A. M. A-, Oliveira, N. T. E., Thiebaut, J. T. L., Melo, T. V. 2008. Efeito da temperatura de estocagem e do tipo de embalagem sobre a qualidade interna de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japônica*). *Ciencia e Agrotecnologia*. 2(2):578-53.



Moura, A.M. Trindade, R. Fonseca, J.B. Mendoza, R. A., y V. L Hurtado. 2009. Efecto de diferentes niveles dietéticos de lisina total sobre la calidad del huevo de codornices japonesas (*Coturnix japonica*). Asociación Latinoamericana de Producción Animal. 17(3): 67-75.

National Research Council –. Nutrient requirements of poultry. Washington, D.C.: 1994. p.44-45.

Oliveira, M. C., Gonçalves, B. N., Machado, M. G., Macedo, C. M. R., Paula, A. P., Francisco Alves de Assis, F. A. 2008. Qualidade de ovos de codornas alimentadas com dietas que contém mananoligossacarídeos e níveis reduzidos de cálcio Acta Scientiarum Animal Sciences. 30(3): 277-281.

Quintanilla, G. J. 2012. Nivel de calcio en la calidad del huevo de codorniz (*Coturnix Coturnix* japónica) en Santo Domingo de los Tsachilas. (Trabajo de grado). Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo. 69p.

Pérez, Z. J., Garcia, M. A. 2009. Modelos adaptativos en zoología (manual de prácticas): 5. Esqueletos: hidrostatos, exoesqueletos y endoesqueletos. Reduca ), 2(2): 54-69.

Rostagno, H. S. Albino, L. F. T., Donzele, J. L., Gomes, P. C., Oliveira, R. F., Lopes, D. C., Ferreira, A. S., Barreto, S. L. T., Euclides, R. F. 2011. Tabelas Brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. ed. Viçosa:UFV, 3ª ed. 252 pp.

Sistema para Análise Estatística e Genética, SAEG. 2007. Versão 9.1. Universidade Federal de Viçosa. Fundação Arthur Bernardes. Viçosa- MG. UFV. 1999

Silva, J. H. V., Jordão Filho, J., Costa, F. G. P., Lacerda, P. B., Vargas, D. G. V. 2011. Nutritional requirements of quails. XXI Congresso Brasileiro de Zootecnia. Associação Brasileira de Zootecnia, Maceió, p 15.

Vasquez, R. R., y Ballesteros, C.H. 2009. La cria de codornices. Bogotá Colombia: Produmedios, p 67.

## **Análisis multitemporal del espejo de agua del humedal El Castillo, municipio de Barrancabermeja, Santander, Colombia**

Multitemporal analysis of the water surface wetland El Castillo, municipality of Barrancabermeja, Santander, Colombia

Meza Naranjo Carlos<sup>1</sup>, Corredor Barrios Fernando<sup>2</sup>, Mendez Medina Johanna<sup>3</sup>, Lobo Vesga Hevertson<sup>4</sup>.

### **Resumen**

El humedal El Castillo ubicado en las comunas 1 y 4 del municipio de Barrancabermeja (Colombia), a través de los años ha sufrido transformaciones en su espejo de agua, inducidos por procesos naturales como las inundaciones y la sucesión vegetal; así, como por factores antropogénicos como los vertimientos de aguas residuales, la deforestación de la cuenca y los procesos de ocupación, perturbaciones consideradas como severas. Para el desarrollo de la investigación se recolectó información de fotografía aérea del área de estudio en el Instituto Geográfico Agustín Codazzi IGAC, donde se obtuvieron fotografías de los años 1976, 1984, 1988, 1992 y 2004, con el fin de analizar multitemporalmente la dinámica del espejo de agua del humedal, usando técnicas de fotointerpretación, procesamiento digital de imágenes y sistemas de información geográfica. Para determinar el área del espejo de agua en las fotografías aéreas, se realizó la corrección geométrica a partir de puntos de control, tomando como referencia una ortofotografía del IGAC de 2009 del municipio de Barrancabermeja. Se realizó el geoprocusamiento de cada uno de los polígonos que representan el área del espejo de agua, para establecer la dinámica de éste, entre los años correspondientes a cada fotografía. Analizando la evolución temporal de la superficie del espejo de agua del humedal El Castillo, se logró establecer que esta se ajusta a un modelo de regresión cuadrática  $R^2=0,972$ . Sin embargo, esta variación espacial está gobernada por los procesos naturales y antropogénicos.

**Palabras claves:** humedal, geoprocusamiento, análisis multitemporal, dinámica espacial.

<sup>1</sup> Ingeniero Ambiental y de Saneamiento, Docente, Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ. Carlos.meza@unipaz.edu.co

<sup>2</sup> Ingeniero Forestal, Docente, Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ,

<sup>3</sup> Ingeniera Ambiental y de Saneamiento

<sup>4</sup> Ingeniero Ambiental y de Saneamiento

## Abstract

The wetland “El Castillo” located in the districts 1 and 4 of Barrancabermeja municipality, through the years has undergone changes in its water surface, induced by natural processes like flooding and vegetal succession; as well as anthropogenic factors such as wastewater discharges, deforestation and migration processes, considered as severe disturbances. For the research development, aerial photography information of the site was collected from Instituto Geográfico Agustín Codazzi IGAC. The information collected corresponds to the years of 1976, 1984, 1988, 1992 y 2004, with the purpose of analyzing the dynamics of wetland water surface in function of time using photo interpretation techniques, digital image processing and geographic information system (GIS). In order to determine the area of the water surface in the aerial photographs, geometric correction was performed from the checkpoints, by reference to the IGAC´ ortho photography of the municipality of Barrancabermeja in 2009. Geographic processing of these polygons of the water surface area was needed in order to establish its dynamics. Analyzing the temporal evolution of the surface of the “El Castillo” wetland, a quadratic regression model fits with a  $R^2 = 0.972$ . However, this spatial variation is governed by natural and anthropogenic processes.

**Key words:** wetland, geoprocessing, multitemporal analysis, spatial dynamics.

## Introducción

Los humedales representan atributos, productos y funciones de cuya existencia se beneficia la sociedad. Dichas funciones son Físicas: regulación del ciclo hídrico superficial y de acuíferos, retención de sedimentos, control de erosión y estabilización microclimática; Químicas: regulación de ciclos de nutrientes (retención, filtración y liberación) y descomposición de biomasa terrestre como base de la productividad de los sistemas acuáticos; Bio- Ecológicas: productividad biológica, estabilidad e integridad de ecosistemas y retención de dióxido de carbono; y Sociales: sistemas productivos y socioculturales (economías extractivas, pesca artesanal, caza, recolección, pastoreo y agricultura en épocas de estiaje), recursos hidrobiológicos y soporte de acuicultura. Según Política Nacional para Humedales Interiores de Colombia (2001).

Algunos humedales sustentan procesos comerciales, tales como la industria del palmito, y la explotación forestal en cativales y guandales. También proveen servicios de recreación, investigación científica y educación. De igual forma estos beneficios ecosistémicos pueden resumirse en dos categorías que son según sus funciones, productos o atributos, como puede verse en el cuadro 1.



Según la Convención Ramsar (1975) (ratificada en Colombia por la Ley 357 de 1997), se entiende por humedales “aquellas extensiones de marismas, pantanos, turberas o aguas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluyendo las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros”. En este sentido, es importante considerar que cualquier superficie que pueda retener permanente o transitoriamente un volumen de agua, puede corresponder a un humedal, haciendo de alguna forma compleja su delimitación en terreno, ya que se deben considerar no solo los límites naturales, sino también los culturales y aquellas modificaciones inducidas en el paisaje.

Cuadro 1. Valores de los humedales

| CATEGORIA | VALOR DEL HUMEDAL  |
|-----------|--|
| FUNCIONES | Recarga de acuíferos<br>Descarga de acuíferos<br>Control de flujo<br>Retención de sedimentos y tóxicos<br>Retención de nutrientes<br>Estabilización de la línea costera<br>Protección contra tormentas<br>Transporte acuático<br>Soporte de cadenas tróficas<br>Hábitat para vida silvestre<br>Recreación activa |
| PRODUCTOS | Recursos de vida silvestre<br>Pesquerías<br>Recursos forrajeros<br>Recursos agrícolas<br>Fuentes de agua<br>Recursos forestales  |
| ATRIBUTOS | Diversidad biológica<br>Importancia cultural e histórica   |

Fuente: Política Nacional para Humedales Interiores de Colombia 2001.

Las actividades transformadoras del entorno desarrolladas por el hombre han inducido la alteración de la estructura de los ecosistemas de humedales, generando pérdida de la biodiversidad y extensión territorial; el desarrollo económico y los continuos cambios del uso del suelo (urbanización, agricultura, ganadería y minería) constituyen los principales agentes generadores del

deterioro, degradación, la pérdida de servicios ecosistémicos y de resiliencia. Vilardy, *et al.* (2014).

Otros factores que afectan directa e indirectamente estos ecosistemas son la inadecuada planificación y manejo, que no reflejan la articulación de las políticas que contemplen los humedales en el contexto de la cuenca a la que pertenecen. De igual forma, se puede sumar el panorama histórico socioambiental que manifiesta una visión extractiva del ecosistema. Vilardy, *et al.* (2014).

De esta forma, es importante considerar que el municipio de Barrancabermeja hace parte de la denominada cuenca de los humedales del Magdalena Medio Santandereano junto con los municipios de Bolívar, Cimitarra, Puerto Parra, Puerto Willches, Sabana de Torres, San Vicente de Chucurí y Simacota Bajo (POT 2002). En total se encuentran 64 ciénagas, de las cuales Barrancabermeja posee 8 cuerpos de agua principales entre ellos se encuentran las ciénagas El Llanito, San Silvestre, Palotal, Miramar, Juan Esteban, Opón, San Rafael de Chucurí y humedal El Castillo, este último objeto de estudio de la presente investigación.

Estudios desarrollados en donde se aplicaron índices de contaminación (ICOMO, ICOTRO e ICOMI) Ramírez *et al.* (1997) y biológico (BMWP/col) Roldán (1999) demuestran el grado de contaminación e intervención que ha sufrido el ecosistema acuático del humedal El Castillo es así como según Cuellar & Rojas (2012) éste humedal presenta aguas eutrofizadas con niveles altos de contaminación.

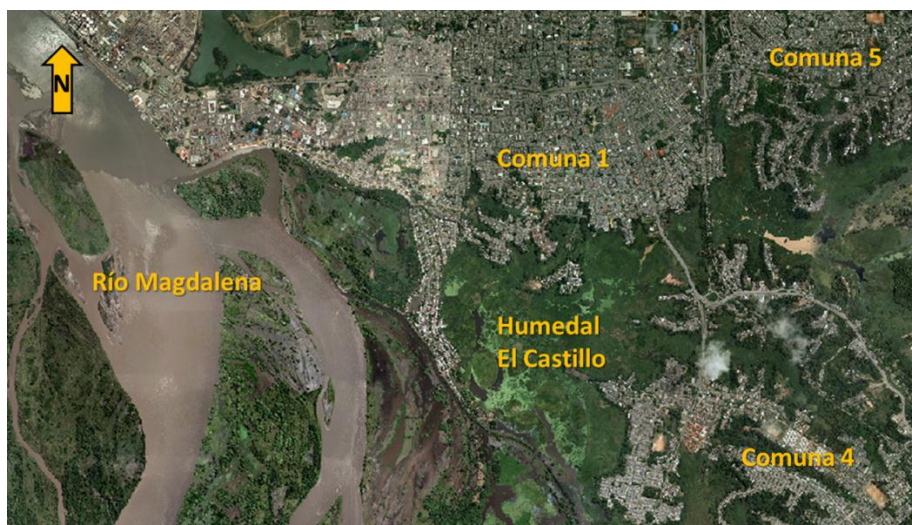
Así mismo, Nieto & Navarro (2013) evaluaron la calidad del agua a través del análisis de bioindicadores de microalgas del perifiton en el humedal El Castillo encontrando 87 especies de las cuales 39 son diatomeas pennales, 1 euglenófito, 24 cianofíceas, 3 diatomeas centrales, 11 clorofíceas indicadoras de eutrofización y empleando el índice compuesto de Nygaard según Pinilla (1998) categorizando el humedal El Castillo en un estado de eutrofización.

## **Materiales y métodos**

La presente investigación se desarrolló en el municipio de Barrancabermeja, ubicado en el departamento de Santander (Colombia), con una latitud Norte de 7° 03' 48"; una Longitud Oeste de 73° 51' 50" y con una altitud sobre el nivel del mar de 75,94 metros. La ciudad cuenta con siete comunas las cuales conforman la zona urbana del Municipio, la extensión territorial es de 1347,83 km<sup>2</sup>, abarcando un segmento del fondo del valle interandino del Magdalena Medio, desde la terrazas aluviales altas, cubriendo hacia el noroccidente terrazas bajas, colinas, bajos y ciénagas hasta la planicie aluvial del Río Magdalena. De esos 1.347,83 km<sup>2</sup> al área urbana le pertenece 30,37 km<sup>2</sup> y al área rural 1317,46 km<sup>2</sup>.

El humedal El Castillo se encuentra ubicado en el área urbana del municipio, limitando al norte con la comuna 1 y al sur con la comuna 4, La extensión del humedal el castillo es de 134.5 hectáreas y su profundidad es de 1.75 metros aproximadamente (Ver Figura 1).

Figura 1. Ubicación del humedal el Castillo



Fuente. Secretaria de Planeación Municipal de Barrancabermeja (2009).

Para la realización de la investigación se siguieron lineamientos metodológicos representados en 3 etapas fundamentales que comprenden: la adquisición de fotografías aéreas, el procesamiento (Georreferenciación y Geoproceso) y análisis de información, como se describe a continuación:

**Adquisición de Fotografías aéreas:** se recopiló información de fotografía aérea de los años 1976, 1984, 1988, 1992 y 2004 del área de estudio en el Instituto Geográfico Agustín Codazzi IGAC. Lobo & Mendez (2013). En el cuadro 2 se presenta la información correspondiente a cada una de las fotografías disponibles.

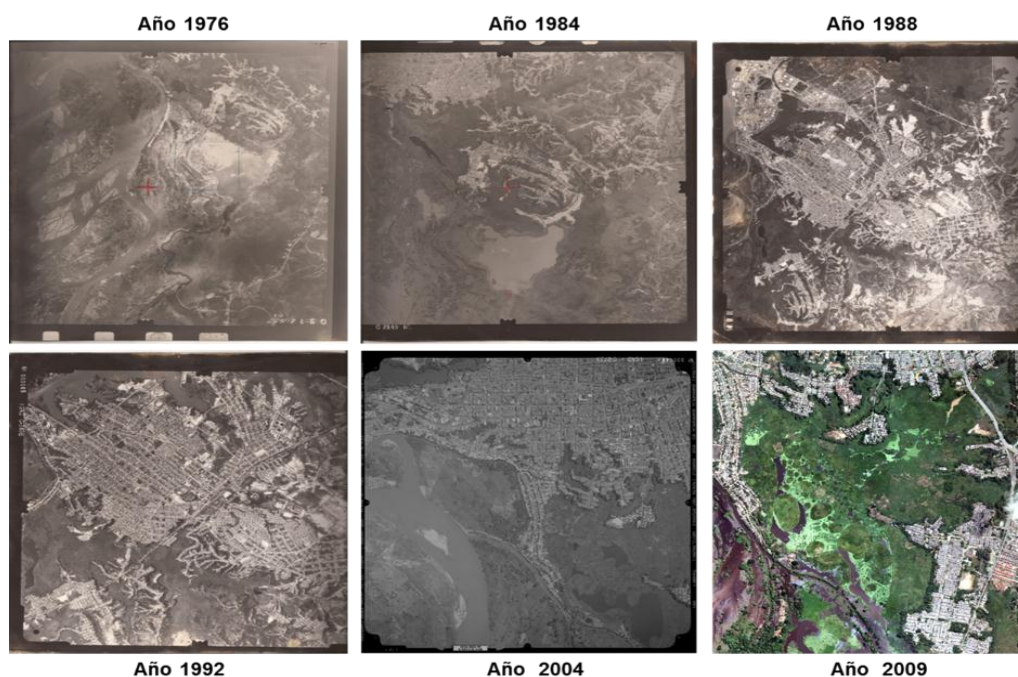
Cuadro 2. Información de fotografías aéreas

| Fotografía/ FECHA     | ESCALA   |
|-----------------------|----------|
| 11 de mayo de 1976    | 1:555000 |
| 15 de octubre de 1984 | 1:224000 |
| 14 de julio de 1988   | 1:224000 |
| 24 de octubre de 1992 | 1:147000 |
| octubre de 2004       | 1:197000 |

Fuente: Instituto Geográfico Agustín Codazzi

Estas fotografías aéreas inicialmente se encontraban en medio físico (excepto fotografía de 2004 que se encontraba en medio digital) por lo cual se hizo necesario someterlas a un proceso de digitalización por medio de un escáner, generándose así una imagen digital de 24 bits. Sin embargo estas imágenes digitales deben ajustarse a un sistema de proyección, denominada corrección geométrica. Sobrino (2000). En la figura 2 se puede observar el resultado del proceso de digitalización de las fotografías aéreas.

Figura 2. Fotografías aéreas digitalizadas.



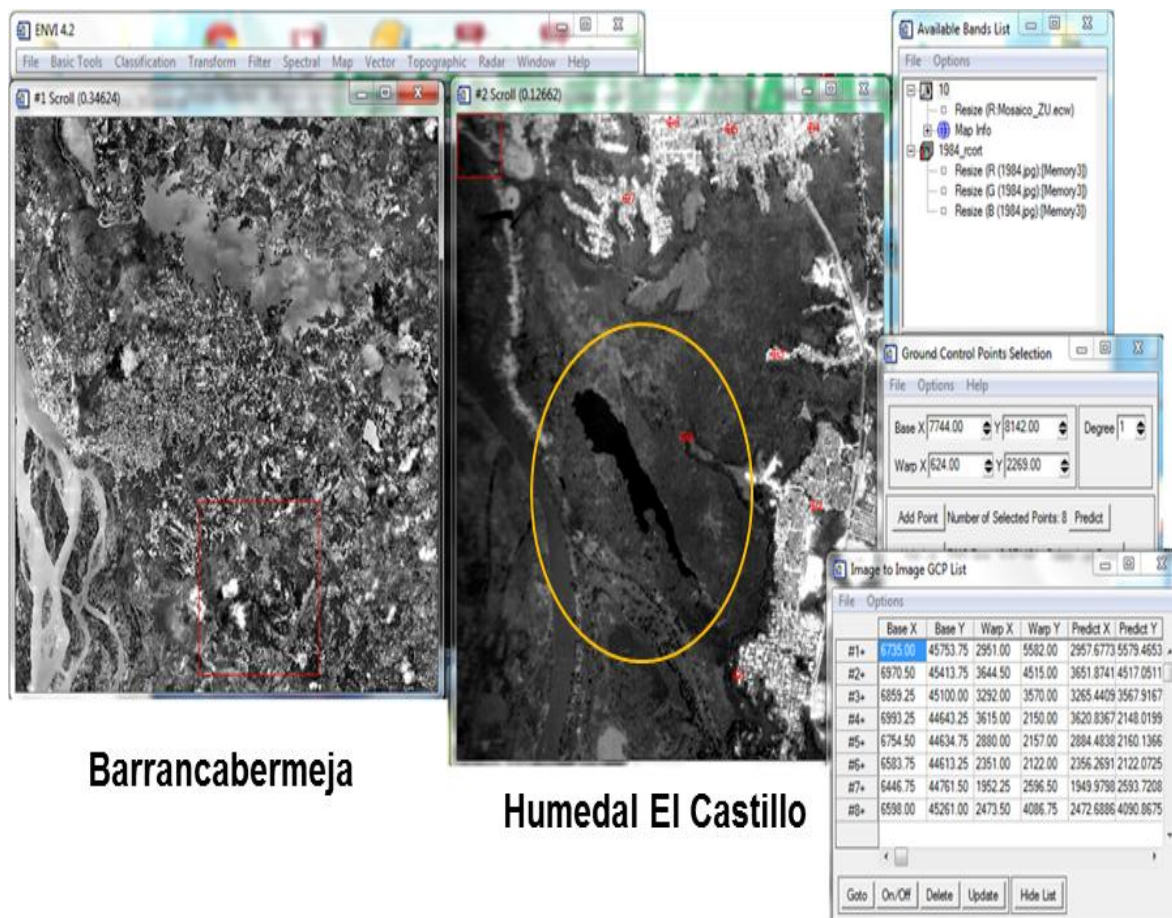
Fuente: Autor

Por otra parte, mediante técnicas de fotointerpretación fueron analizados los elementos de interpretación de la imagen como: tono, color, tamaño, forma, textura, patrón, sombras, altura y profundidad, volumen y asociación; para de esta forma poder delimitar adecuadamente el espejo de agua del humedal. Jense (2007).

**Procesamiento (Corrección geométrica y Geoproceso):** para poder determinar el área del espejo de agua en las fotografías aéreas, se realizó la corrección geométrica a partir de puntos de control (GCP's) y funciones de transformación tomando puntos comunes de la imagen y el mapa. Sobrino (2000). En este proceso de corrección geométrica se utilizó del software ENVI 4.2 el menú georreferenciación imagen a imagen, en donde la primera imagen corresponde a

la imagen digitalizada y la segunda es la imagen de referencia, correspondiendo a una Ortofotografía del IGAC 2009 del Municipio de Barrancabermeja. Revisión POT Barrancabermeja (2009).

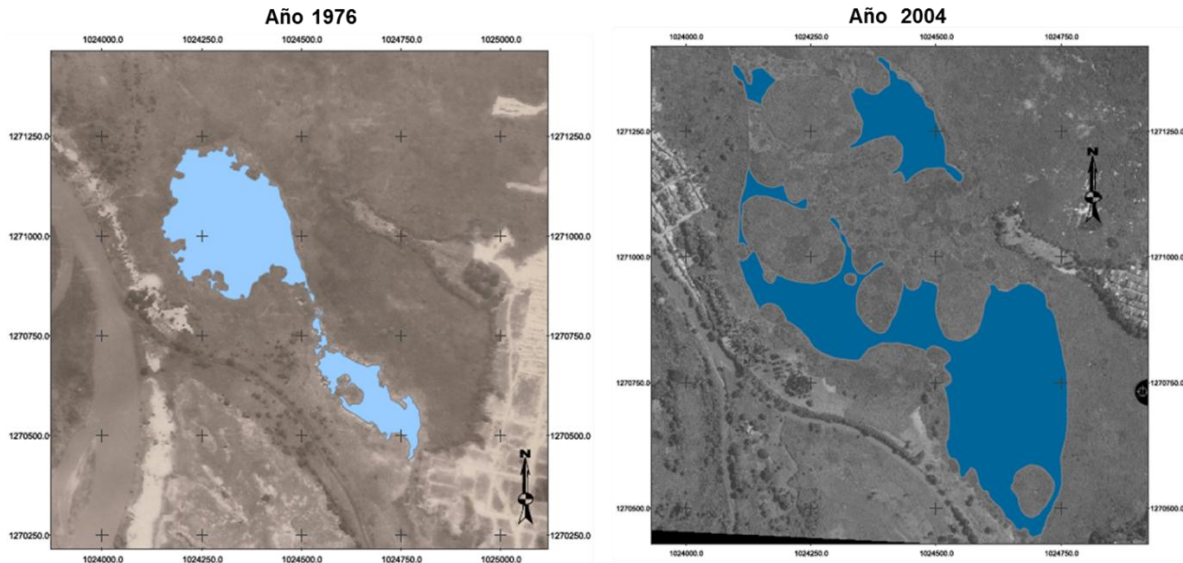
Figura 3. Proceso de corrección geométrica de las fotografías aéreas.



Fuente: Autor

Una vez realizada la georreferenciación de las fotografías aéreas se realizó el geoproceto de áreas, que consiste en la digitalización de cada uno de los polígonos que representan el área del espejo de agua del humedal en la imagen, transformándolo en una capa vectorial (SHP) soportado en el software gvSIG 2.0, para así establecer la dinámica entre los años correspondientes a cada imagen, como se puede observar en la figura 4.

Figura 4. Imágenes georeferenciadas y digitalización de áreas.



Fuente: Autor

## Resultados y discusión

La digitalización de las fotografías aéreas permitió determinar el área del espejo de agua presente en cada uno de los años analizados, mediante técnica de fotointerpretación y el uso del software gvSIG 2.0 como se muestra en el cuadro 3, cabe destacar que en las imágenes no se aplicaron técnicas de clasificación (supervisada o no supervisada), ya que la información radiométrica resultante del proceso de digitalización impide la discriminación de la información contenida en cada pixel. Chuvieco (2008).

Cuadro 3. Área del espejo de agua

| Año  | Área M <sup>2</sup> | Área Ha |
|------|---------------------|---------|
| 1976 | 11.3648,254         | 11.36   |
| 1984 | 64.290,638          | 6.43    |
| 1988 | 73.624,845          | 7.36    |
| 1992 | 88.367,005          | 8.84    |
| 2004 | 15.5305,687         | 15.53   |

Fuente: Autor

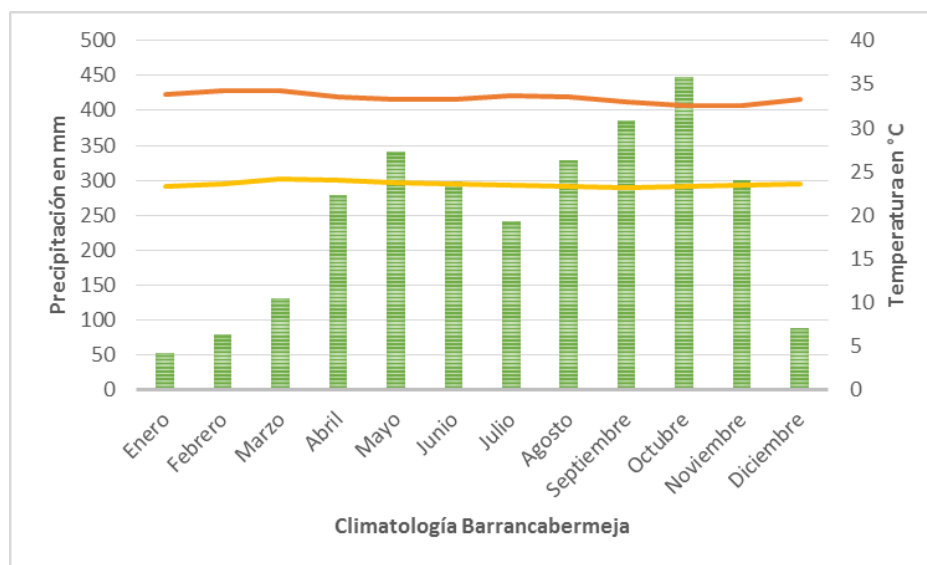
De esta forma se puede evidenciar la dinámica propia de un cuerpo de agua que actúa como cuerpo receptor y amortiguador de crecidas en los periodos de lluvia y de regulación del caudal en periodos secos. Es así como en 1976 el área del

espejo de agua correspondía al 11.36 Ha y en 1984 se existían 6.43 Ha y así sucesivamente.

Por otra parte es importante aclarar que en 2004 si bien se observa un aumento considerable del espejo de agua, esto no indica necesariamente un aumento del volumen almacenado; este fenómeno se puede atribuir al efecto que tiene la sedimentación del humedal debido a la alta intervención presente en su cuenca. Sin embargo esta información de la mayoría de cuerpos de agua del país es escasa y desconocida. Vilardy, et al. (2014).

Sin embargo, la información climatológica de Barrancabermeja permite establecer tendencias bimodales de los periodos secos y de lluvia a lo largo del año, como se puede apreciar en la figura 5, que representan el histórico del comportamiento de estos periodos y permite analizar las fluctuaciones del ecosistema de humedal con la variable de precipitación.

Figura 5. Climatología de Barrancabermeja



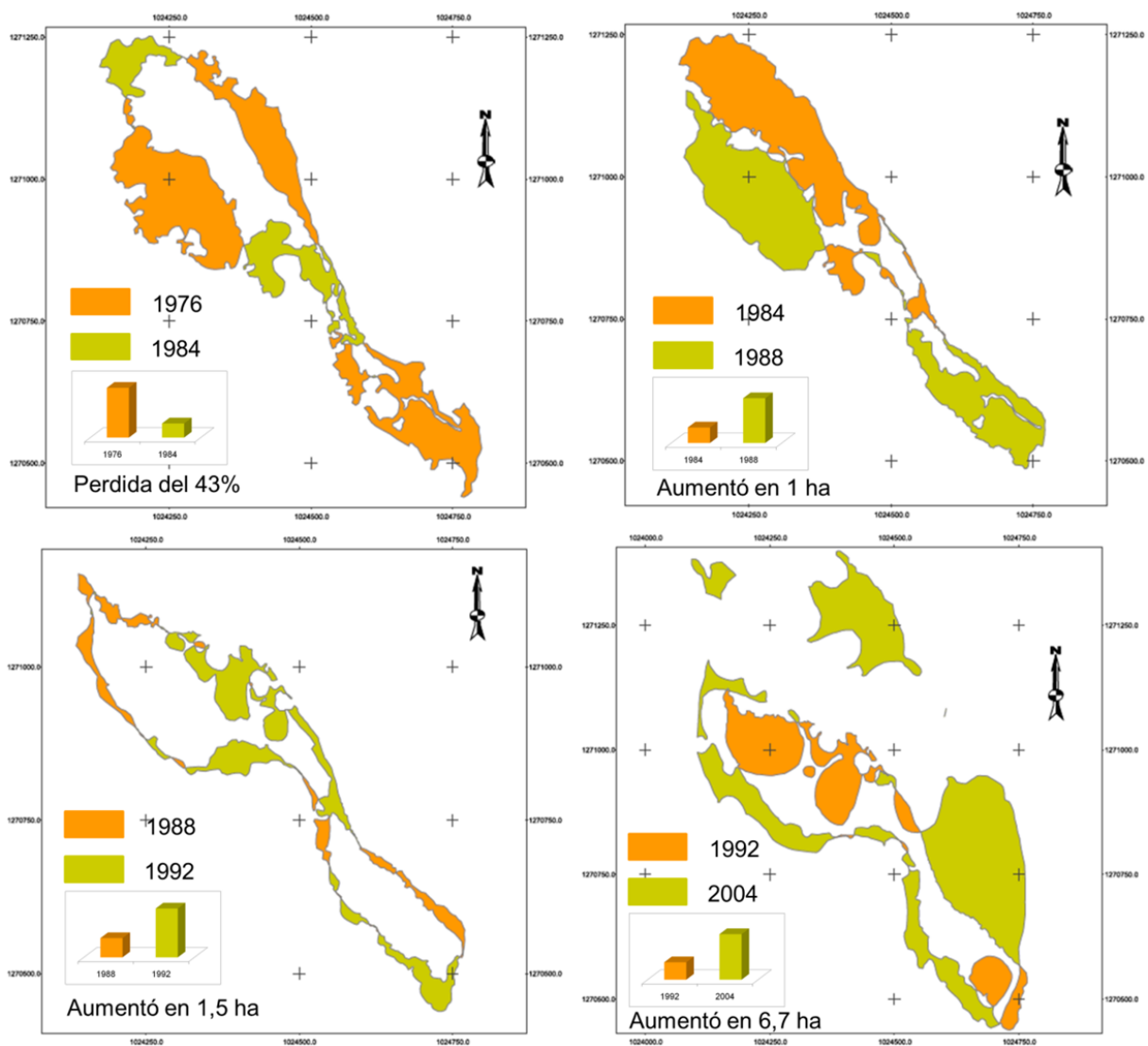
Fuente: Worldmeteo, Barrancabermeja (2015).

Si se analiza la tendencia climatológica del municipio, se puede lograr una aproximación a uno de los eventos que dinamizan el espejo de agua del humedal El Castillo como lo es la precipitación (ver figura 5), en ella se puede observar que históricamente los meses más lluviosos del año son Mayo y Octubre, mientras el mes más secos es Enero, determinando su régimen hidrológico.

Para calcular la diferencia del espejo de agua del humedal existente entre años analizados, fue necesario calcular la diferencia para cada año, ejemplo 1976-1984

y luego 1984-1976. Posteriormente para obtener una capa que contenga las diferencias, se emplea la herramienta Geoproceso unión (es importante conservar el orden) usando el software libre gvSIG 2.0. Resultando en la dinámica del espejo de agua del humedal El Castillo como se puede observar en la figura 6.

Figura 6. Dinámica del espejo de agua del humedal El Castillo entre 1976, 1984, 1988 y 2004.



Fuente: Autor

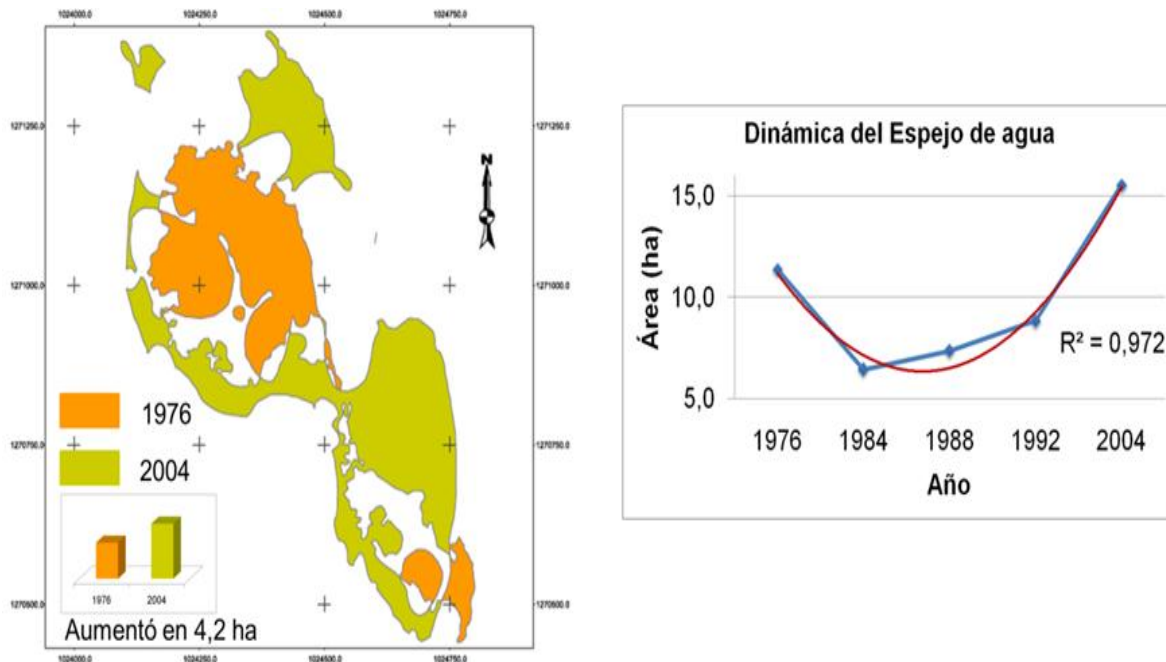
De esta forma se puede analizar los avances y retrocesos de este tipo de ecosistemas respecto al tiempo, entre los años 1976 y 1984 se puede evidenciar



una pérdida del 43%; entre los años 1984 y 1988 un aumento de 1 Ha; entre los años 1988 y 1992 un aumento de 1,5 Ha; y finalmente en el periodo de 1992 y 2004 un aumento de 6,7 Ha.

Por último, se planteó una comparación entre los años de 1976 y 2004, que permitió identificar un aumento del espejo de agua en 4,2 Ha, que no necesariamente indica un aumento del volumen almacenado, ya que para determinarlo se hace necesario la realización de estudios batimétricos. Vilardy, et al. (2014). De igual forma se evidencia el avance de los procesos de eutrofización y colmatación, produciendo la segregación del espejo de agua en masas aisladas.

Figura 7. Dinámica del espejo de agua del humedal El Castillo entre 1976 y 2004.



Fuente: Autor

Analizando la evolución temporal de la superficie del espejo de agua del humedal El Castillo, se logró establecer que esta se ajusta a un modelo de regresión cuadrática  $R^2=0,972$ . Sin embargo, esta variación espacial está gobernada por los procesos naturales y antropogénicos.

Desde el punto de vista ambiental, la dinámica del espejo de agua hace parte de las características propias de un ecosistema como el humedal El Castillo. Sin embargo, el aumento de la vegetación flotante producto de la eutrofización del medio provoca la reducción de la penetración de los rayos del sol y la actividad fotosintética de los organismos fitoplanctónicos, provocando un decaimiento de la



producción de oxígeno libre, generando la anoxia en las zonas profundas que redundan en la pérdida de la diversidad acuática, baja productividad y aumento de la generación de gases de efecto invernadero producto de la sedimentación del humedal. Varis et al. (2012).

## Conclusiones

Analizando la evolución temporal de la superficie del espejo de agua del humedal El Castillo, se logró establecer que esta se ajusta a un modelo de regresión cuadrática  $R^2=0,972$ . Sin embargo, esto no permite predecir el comportamiento del espejo de humedal, ya que estas variaciones espaciales están gobernadas por los procesos naturales y antropogénicos.

En cuanto a la escala temporal, es importante tener en cuenta que esta maneja un cambio en el tiempo muy amplio e irregular, por esta razón no se pueden observar alteraciones estacionales. Debido a la disponibilidad de fotografías aéreas del área de estudio.

## Agradecimientos

Al semillero de investigación FOREST de la Escuela de Ingeniería Ambiental y de Saneamiento del Instituto Universitario de la Paz UNIPAZ, por su aporte a la generación de nuevo conocimiento.

## Bibliografía

Chuvienco S. Emilio. (2008). Teledetección ambiental, La observación de la tierra desde el espacio, 3 edición actualizada. España. Ariel Ciencia.

Convención Ramsar. (1975). Humedales de importancia Internacional.

Cuellar D. Karol V., & ROJAS T. Madeleine. (2012). Evaluación de la calidad hídrica por medio de los índices biológico BMWP/Col y de contaminación (ICOMO, ICOMI, ICOTRO) en el sector que abarca la comuna 1 y 4 del humedal El Castillo, Barrancabermeja. Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ (Trabajo de Grado). Barrancabermeja, Colombia. 135 p.

GVSIG Asociación. (2015). Disponible en URL <http://www.gvsig.com/es/productos/gvsig-desktop>

Jense. Jhon R. Remote sensing of the environment: an earth resource perspective. Prentice Hall series in geographic information science. 2<sup>nd</sup> ed. ISBN 0-13-188950-8. 587 p.



Lobo V. Hervertson. Méndez M. Johanna. (2013). Evaluación del estado actual del humedal El Castillo comuna 1 y 4 a través de la dinámica sucesional de la vegetación. Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ (Trabajo de Grado). Barrancabermeja, Colombia. 112 p.

Nieto M. Mayra A., & Navarro L. Viviana P. (2013). Evaluación de la calidad del agua a través del análisis de bioindicadores de microalgas del perifiton en el humedal El Castillo comuna 1 y 4 de Barrancabermeja – Santander. Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ (Trabajo de Grado). Barrancabermeja, Colombia. 129 p.

Oficina de Planeación Municipal, Barrancabermeja. (2009). Ortofotomosaico Municipio de Barrancabermeja. Instituto Geográfico Agustín Codazzi.

Pinilla Gabriel. (1998). Indicadores biológicos en ecosistemas acuáticos continentales de Colombia. Compilación bibliográfica. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, Colombia. ISBN: 958-9029-15-9. , 67 p.

Plan de Ordenamiento Territorial POT de Barrancabermeja. (2002).

Política Nacional para Humedales Interiores de Colombia. (2001). Estrategias para su conservación y uso racional. Colombia.

Ramirez. A., Restrepo. J., & Viña. G. (1997). Cuatro índices de contaminación para caracterización de aguas continentales. Formulación y aplicación. CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro. ISSN. 0122-5383. Vol. 1 Núm. 3. p. 135-153.

Roldan P. Gabriel. (1999). Los macroinvertebrados y su valor como indicadores del agua. Academia Colombiana de Ciencias. ISSN. 0370-3908. Vol. 23 Núm. 88. Pág. 375-387.

Secretaria de Planeación Municipal de Barrancabermeja. (2009).

Sobrino, José. (2000). Teledetección. Universidad de Valencia. España. AECl.

Varis, O., Kummu, M., Harkonen, S. & Huttunen, J. T. (2012) Greenhouse Gas Emissions from Reservoirs. In Impacts of Large Dams: A Global Assessment. Springer. ISBN 978-3-642-23571-9. p. 69-94.

Vilardy, S., Jaramillo, Ú., Flórez, C., Cortés-Duque, J., Estupiñán, L., Rodríguez, J., Aponte, C. (2014). Principios y criterios para la delimitación de humedales continentales: una herramienta para fortalecer la resiliencia y la adaptación al



cambio climático en Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, 100 pág.

Worldmeteo, Barrancabermeja. (2015). Disponible en URL <http://www.worldmeteo.info/es/america-del-sur/colombia/barranca-bermeja/tiempo-106766/>

## **Evaluación del fruto entero de palma de aceite ofrecido *ad libitum* en la alimentación de pollos de engorde**

### **Evaluation of whole fruit palm oil offered *ad libitum* choice feeding of broilers**

Ruiz Posada, Rodolfo<sup>1</sup>. Romero Cárdenas, Elkin<sup>2</sup>. Hernández Velandia, Helberth<sup>3</sup> y Salinas Gonzales, Iván<sup>4</sup>.

#### **Resumen**

Los estudios sobre la adición de aceites en las aves de corral han presentado resultados satisfactorios sobretodo en regiones cálidas donde los animales están expuestos al estrés calórico. El fruto de palma de aceite tiene altos niveles de extracto etéreo y bajo niveles de proteína, este recurso tiene buena disponibilidad en la región del Magdalena medio santandereano. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la utilización del fruto de palma (*Elaeis guineensis* Jack) *ad libitum* en la alimentación de pollos de engorde en la etapa de finalización. El trabajo se realizó en el Centro Experimental Santa Lucia del Instituto Universitario de la Paz. Se utilizaron 198 pollos de la línea Cobb, divididos en dos tratamientos y tres réplicas. El tratamiento 1 o testigo se alimentó con alimento balanceado comercial, y el tratamiento 2 con alimento balanceado comercial y fruto de palma a voluntad durante la etapa de finalización. Las variables evaluadas fueron: velocidad de crecimiento (VC), índice de conversión (ICA) y rendimiento en canal (RC). El experimento se realizó bajo un diseño de bloques completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento y se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa SPSS 20. Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron favorables para el tratamiento con la adición a voluntad de fruto entero de palma de aceite. Para la variable velocidad de crecimiento (VC), no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ( $p>0.05$ ). Para las variables; índice de conversión alimenticia (ICA) y rendimiento en canal (RC), se presentaron diferencias significativas. El fruto de palma presentó buena palatabilidad por parte de los pollos de engorde y los resultados técnicos fueron satisfactorios lo cual indicaría que es una alternativa viable en la alimentación del pollo del engorde.

**Palabras clave:** aceites, nutrición, palatabilidad, pollos de engorde, rendimiento en canal

<sup>1</sup> Zoot. Esp. Docente Escuela MVZ. Grupo de investigación en producción y ciencia animal. PROCA. UNIPAZ

<sup>2</sup> M.V.Z. Esp. Docente Escuela MVZ. Grupo de investigación en producción y ciencia animal. PROCA. UNIPAZ

<sup>3</sup> MVZ. Estudiante tesista. UNIPAZ.

<sup>4</sup> MVZ. Estudiante tesista. UNIPAZ.

## Abstract

Studies of the addition of oils in poultry satisfactory results have been presented especially in warm regions where animals they are susceptible to heat stress. The oil palm fruit is high in ether extract and is available in the Magdalena Medio region. The objective of the this study was to evaluate the use of palm fruit (*Elaeis guineensis* Jack) ad libitum in feeding broilers in the finishing stage. The work was performed at the Experimental Center Santa Lucia. Chickens of Cobb 198 line, divided into two treatments and three replicates were used. Or control treatment 1 were fed commercial feed, and treatment 2 with commercial feed and palm fruit at will during the stage of finishing. The variables evaluated were: growth rate, feed conversion and carcass yield. The experiment was carried out under a design of randomized complete block with three replicates per treatment and analysis of variance (ANOVA) was applied using the SPSS 20 program. The results obtained in this study were favorable for treatment with the addition of whole fruit will oil palm. For the variable growth rate no statistically significant differences between treatments ( $p>0.05$ ) were presented. Feed conversion ratio (ICA) and carcass yield, significant differences between treatments ( $P>0.05$ ) occurred. The palm fruit palatable presented by broilers and were satisfactory technical results which indicate that it is a viable alternative in chicken fattening food.

**Key words: oils, nutrition, palatability, broiler, carcass yield,**

## Introducción

El pollo de engorde al ser sometido a altas temperaturas, disminuye el consumo de alimento, aumenta el consumo de agua y modifica su comportamiento con el fin de disipar el calor. Es importante tener en cuenta que la piel de las aves no posee glándulas sudoríparas. Álvarez *et al.* (2009). Además la reducción del consumo de alimento es el factor que más afecta el desempeño productivo del pollo de engorde bajo condiciones de estrés calórico (Laganá *et al.*, 2007).

Es común incluir en lugares de excesivo calor un porcentaje de energía mayor en forma de aceite/grasa a la dieta, esta práctica, no solamente aumenta la ingesta de energía por parte del pollo, sino que además disminuye considerablemente el incremento de calor por el menor efecto metabólico de la grasa frente a los carbohidratos (Duran, 2011)

El uso de grasas en la alimentación animal tiene muchas ventajas, es la principal fuente para aumentar el contenido de energía en las dietas, la dieta de pollos de



engorde proporciona mayor tasa de crecimiento, aumento de la eficiencia alimenticia y la ganancia de peso lo que lleva a disminuir la edad al mercado, ayudando a minimizar el calor incrementado durante el estrés calórico (Rahman *et al*, 2010).

Las grasas y aceites suplen de 2 a 2.5 veces más energía que los carbohidratos, también aportan ácidos grasos esenciales en la dieta que no pueden ser sintetizados por el animal (Tomkins y Drackley, 2010).

Según Machado (1997), las grasas producen un incremento calórico más bajo, en los carbohidratos este incremento es intermedio y en las proteínas es alto. Por esta razón, además de la adición de grasas, en climas cálidos también es recomendable evitar los excesos de proteínas y aminoácidos en las dietas (Daghir y Lebanon, 2009).

En raciones para pollos de engorde pueden incorporarse niveles de aceites entre 2 y 5% como fuente de energía en sustitución de los cereales, cantidades superiores al 10 o 12% generalmente pueden causar reducción en el consumo de alimento (Acuero, 1999). Según Ruiz, *et al*. (2009), el fruto de palma integral, molido y mezclado con el alimento comercial, resultó en una alternativa técnicamente viable para ser utilizada en bajos niveles de sustitución (3,5 y 7%), en la alimentación del pollo de engorde.

La suplementación con grasas o aceites en bajas cantidades es una práctica muy común para mejorar la utilización de la energía del alimento y mejorar el desempeño en los pollos de engorde (Chekani-Azar, 2007). En este sentido Nobakht *et al* (2011), atribuyen otros efectos favorables como el incremento en la absorción y digestión de las lipoproteínas.

Diversos trabajos realizados en zonas cálidas por Ocampo (1994a, 1994b), en los Llanos Orientales de Colombia y Ruiz *et al* (2007, 2009a, 2009b, 2012,), en el Magdalena medio santandereano, utilizando el fruto integral de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jack) han reportado resultados favorables en la alimentación animal.

Para Ocampo (1998), La utilización de los productos y subproductos de la palma africana, permiten la diversificación de especies en la unidad de producción, por ejemplo, la utilización del fruto en la alimentación del cerdo, el uso del aceite en dietas para cerdos, aves, equinos, bovinos y ovinos.

El fruto integral de palma africana presenta altos niveles de aceites (68.5%), sin embargo, cerdos en finalización alimentados a voluntad con fruto integral de palma de aceite, presentaron niveles sanguíneos normales de triglicéridos y colesterol.

Rodríguez, *et al* (2013). Podría decirse que la fruta entera de Palma Africana es un alimento rico en energía (Ocampo, 1994).

Por las anteriores razones y teniendo en cuenta, la alta disponibilidad de fruto de palma, las altas temperaturas predominantes durante la mayor parte del año, además la alta humedad relativa en la región y las pocas referencias sobre el tema, se planteó la presente investigación con el objetivo de evaluar la utilización del fruto entero de palma de aceite a voluntad en la alimentación de pollos de engorde.

### Materiales y métodos

El trabajo se realizó en el centro experimental Santa Lucía, propiedad de la Universidad de la Paz, ubicada en el municipio de Barrancabermeja Colombia, con 198 pollos de la línea Cobb distribuidos en diseño experimental completamente al azar con dos tratamientos y tres réplicas de 33 animales. Al tratamiento 1, denominado tratamiento control (concentrado comercial), se le suministro alimento balanceado comercial durante todo el periodo de engorde. Al tratamiento 2 (concentrado comercial + fruto de palma a voluntad), además del alimento comercial se le ofreció fruto de palma a voluntad desde el día 20 hasta el día 40, previo periodo de adaptación de 5 días. El fruto de palma se ubicaba en tolvas y sin desgranar es decir con el raquis, sin embargo no se determinó el consumo de fruto entero de palma ya que se ocasionaron pérdidas por el fruto que se desprendía del raquis o por consumos incompletos del fruto.

Tabla 1. Composición nutricional del fruto entero de palma (*Elaeis guineensis* Jack), en base seca.

| NUTRIENTE                        | FRUTO ENTERO DE PALMA |
|----------------------------------|-----------------------|
| Proteína %                       | 3.2                   |
| Grasa %                          | 68,5                  |
| Fibra cruda %                    | 16.4                  |
| Cenizas %                        | 1.77                  |
| ENN % (extracto no nitrogenado)* | 10,13                 |

Fuente: Laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal. Unalmed. 2011.

La cantidad de alimento balanceado se suministró diariamente cumpliendo con lo especificado en las tablas de requerimientos nutricionales para el consumo de materia seca en pollos de engorde, según Rostagno *et al* (2011).

Tabla 2. Consumo promedio semanal para pollos de engorde.



| SEMANA | CONSUMO PROMEDIO/GRAMOS |
|--------|-------------------------|
| 1      | 25                      |
| 2      | 54                      |
| 3      | 85                      |
| 4      | 112                     |
| 5      | 138                     |
| 6      | 156                     |

Fuente: Rostagno, 2005.

Las variables evaluadas fueron: velocidad de crecimiento (VC), índice de conversión (ICA) y rendimiento en canal (RC). Los datos de suministro de alimento y consumo de alimento comercial fueron tomados diariamente en cada tratamiento a excepción del consumo de fruto de palma. Los pesos se tomaron al inicio del experimento y semanalmente hasta el final de la prueba.

A los datos se les aplicó el análisis de varianza (ANAVA) utilizando el programa SPSS 20, para comparar los resultados entre tratamientos.

### Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron favorables para el tratamiento con la adición a voluntad de fruto entero de palma de aceite. Para la variable velocidad de crecimiento no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ), sin embargo para las variables; índice de conversión alimenticia (ICA) y rendimiento en canal, hubo diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ). Es importante recordar que para el cálculo del ICA no se incluyó el consumo de fruto de palma ya que se ocasionaron pérdidas por el desprendimiento del raquis y/o consumos incompletos.

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos para cada variable evaluada.

Tabla 3. Variables evaluadas de pollos de engorde alimentados con y sin adición de fruto de palma en la dieta.

| VARIABLE                       | Concentrado comercial | Concentrado comercial + fruto de palma a voluntad |
|--------------------------------|-----------------------|---|
| Velocidad de crecimiento (V.C) | 44,7 g.               | 48 g.   |
| Índice de conversión (I.C.A)   | 1,68                  | 1,5   |
| Rendimiento en canal (R.C.)    | 73.6%                 | 79.9%   |

Ruiz *et al.* (2009), al evaluar diferentes proporciones de sustitución (3,5 y 7%) al alimento balanceado con fruto molido de palma de aceite en la dieta para pollos de



engorde, encontraron mejores resultados en ganancia de peso e índice de conversión con respecto al tratamiento testigo sin fruto de palma, el tratamiento que presentó mejor ICA (1.8) y mayor velocidad de crecimiento (86,28 g), fue el de mayor sustitución (7%).

Pocos reportes referencian la utilización del fruto de palma entero en la alimentación de los pollos de engorde, las investigaciones se han dirigido a evaluar el aceite de palma, el palmiste y otros subproductos, tal vez porque los niveles de fibra cruda (16%), pueden limitar su uso en pollos de engorde.

Los resultados del presente trabajo son similares a los reportados por González *et al.* (1998), quienes trabajaron con aceite de fruto de palma, obteniendo mayor ganancia de peso en comparación con el tratamiento testigo. Además concluyeron que al aumentar la proporción de aceite de palma aumentaron las ganancias de peso y la disminución de consumo por parte de los animales tratados.

Un comportamiento similar se observó en los pollos con disponibilidad de fruto de palma a voluntad ya que no disminuyeron el consumo de alimento balanceado, pero si la velocidad de consumo, esto se verificó por la permanencia del alimento en los comederos.

Odreman y Peña (2005), al evaluar el efecto del aceite crudo de palma africana en dietas para pollos de engorde, encontraron que al incorporar en niveles de 4.5 - 6% de aceite de palma, se obtenían los mejores valores de eficiencia en conversión de alimento. Igualmente Ocampo (1998) incluyendo aceite crudo de palma como fuente energética de la dieta en pollos de engorde bajo condiciones no convencionales de manejo y alimentación, presentaron a la séptima semana pesos de 1.9 a 2.1 kg, conversión acumulada entre 1.5 y 1.7; y un rendimiento en canal entre 76 y 79%.

Rahman *et al* (2010) al evaluar el efecto de la inclusión de aceite crudo de palma en diferentes niveles sobre la ganancia de peso, consumo de alimento y rentabilidad en pollos de engorde, concluyeron que la adición al 4% expresaron los mejores resultados.

Sin embargo en pollos de engorde jóvenes con menos de 20 días de edad, la adición de altos niveles de aceite parece no ser una práctica adecuada. En un estudio realizado por Maiorka *et al* (2008), el resultado no fue satisfactorio al aumentar la energía en la dieta a partir de lípidos en pollos jóvenes durante las dos primeras semanas,. Las aves adultas son más adaptadas a digerir y absorber lípidos y pueden tener una mejor regulación del consumo de alimento. Para Krogdahl (1985), citado por Tomkins y Drackley (2010), existen pruebas que el sistema biliar en las aves jóvenes esta poco desarrollado.

## Conclusiones

El fruto integral de palma de aceite ofrecido entero y a voluntad presentó resultados técnicos satisfactorios lo cual indicaría que utilizarlo de esta manera es factible y recomendable como fuente de energía en regiones cálidas donde los animales comúnmente están sometidos a los efectos adversos del estrés calórico.

## Bibliografía

Acurero, M. 1999, Uso de la grasa en la alimentación animal. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias FONAIAP. Nro. 64. [En línea]. Disponible en: [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/FonaiapDivulga/fd64/texto/uso.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd64/texto/uso.htm)

Alvarez, A; Perez, H; Martín, T. C; Quincosa, J. y Sanchez, A. 2009. Fisiología animal aplicada. Medellín, Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. 379 p.

Chekani-Azar, S; Maheri-Sis, N; Agdham Shahriar, H y Ahmadzadeh, A. 2007. Effects of different levels of substitution of fish oil and poultry fat on the performance and carcass parts on male broilers chicks. *Journal of Animal and Veterinay Advances*. v.6; n.12; p.1405-1408. [en línea] Disponible: <http://www.docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/javaa/2007/1405-1408.pdf>

Daghir, N. J y Lebanon, Beirut. 2009. Nutritional Strategies to Reduce Heat Stress in Broilers and Broiler Breeders. [en línea]. Disponible en: [http://www.lohmann-information.com/content/l\\_i\\_44\\_artikel2.pdf](http://www.lohmann-information.com/content/l_i_44_artikel2.pdf)

Duran, Rafael. 2011. Medidas de alimentación para combatir el estrés térmico en broilers. *Danisco Animal Nutrition*, v.1; p.42. [En línea]. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-avicultura/nutricion/articulos/medidas-alimentacion-combatir-estres-t3957/141-p0.htm>

Gonzáles E. R; Avila, E. y Cortés C, A. 1998. Evaluación del aceite de palma africana como fuente de energía en pollos de engorde. *Revista Veterinaria México*. v.29; n.2; p.130 [en línea]. Disponible en internet: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-1998/vm982a.pdf>

Laganá, C. Ribeiro, A. M. N; Kessler A. M; Kratz, L.R y Pinheiro, C. C. 2007. Effects of the reduction of dietary heat increment on the performance, carcass yield, and diet digestibility of broilers submitted to heat stress. *Revista Brasileira de Ciencia Avícola*. v.9; n.1. [En línea] 2007. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-35X2007000100007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-35X2007000100007&script=sci_arttext)



Machado, O. 1997. Valor nutricional de los alimentos. Medellín, Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. 252 p.

Maiorka, A; Dahlke, F.; Santin, E; Giusti B, L D y Macari, M. 2008. Energy and oil levels in broiler starter diets. Revista Ciencia Rural. v.38; n.4; p1099-1104. [en línea]. <http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n4/a30v38n4.pdf>

Nobakht, A. Tabatbaei, S y Khodaei, S. 2011. Effects of Different Sources and Levels of Vegetable Oils on Performance, Carcass Traits and Accumulation of Vitamin E in Breast Meat of Broilers. Current Research Journal of Biological Sciences. v.3; n.6; p. 601-605. [En línea] 2011. Disponible: <http://maxwellsci.com/print/crjbs/v3-601-605.pdf>

Ocampo, A. 1994. Utilización del fruto de palma africana como fuente de energía con niveles restringidos de proteína en la alimentación de cerdos de engorde. Livestock Research for Rural Development. v.6; n.1; [En línea]. Disponible en <http://www.lrrd.org/lrrd6/1/ocampo1.htm>.

Ocampo, Á. 1994. Efecto del nivel de pulidura de arroz en una dieta basada en el fruto entero de palma africana para el engorde de cerdos. Livestock Research for Rural Development: v.6, n.2. [En línea]. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd6/2/ocampo.htm>. 1994.

Ocampo, Á. 1998. Las Palmas, una Estrategia de Vida Tropical. Conferencia electrónica de la FAO sobre: Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica. Roma, Italia. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/agrofor1/Ocampo5.htm>

Odreman, B V; Peña, M. Efecto del aceite crudo de palma africana (*Elaeis guineensis*) en dietas para pollos de engorde sobre parámetros productivos y algunas características físicas y químicas de la canal comestible. [En línea]. 2005. Disponible en: [http://www.researchgate.net/publication/48224381\\_Efecto\\_del\\_aceite\\_crudo\\_de\\_palma\\_africana\\_\(Elaeis\\_guineensis\)\\_en\\_dietas\\_para\\_pollos\\_de\\_engorde\\_sobre\\_parmetros\\_productivos\\_y\\_algnas\\_caractersticas\\_fsicas\\_y\\_qumicas\\_de\\_la\\_canal\\_comestible](http://www.researchgate.net/publication/48224381_Efecto_del_aceite_crudo_de_palma_africana_(Elaeis_guineensis)_en_dietas_para_pollos_de_engorde_sobre_parmetros_productivos_y_algnas_caractersticas_fsicas_y_qumicas_de_la_canal_comestible)

Rahman, M.S; Akbar, M.A; Islam, K.M.S; Iqbal, A y Assaduzzaman, M. 2010. Effect of dietary inclusion of palm oil on feed consumption, growth performance and profitability of broiler. Bangladesh Journal of Animal Science. v.39; n.1-2; p.176-182. Disponible en: <http://www.banglajol.info/index.php/BJAS/article/view/9692/7184>



Rostagno, H; Teixeira, L F; Lopes D, J; Gomes, P C; De Oliveira, R F; Lopes, D; Soares F, A; De Toledo B, S y Euclides, R F. 2011. Composición de Alimentos y Requerimientos Nutricionales. Tablas Brasileñas para cerdos y aves. Vicosa, Estado Minas Gerais, Brasil. Universidad Federal de Vicosa. p.259 [En línea]. Disponible en: <http://www.lisina.com.br/arquivos/ Geral%20Espa%C3%B1ol.pdf>

Rodriguez, J; Ruiz, R; Alzate, S; Canchila, E; Romero, E y Martinez, D. 2013. Efecto de la inclusión de fruto de palma africana en la alimentación de cerdos sobre los niveles sanguíneos de colesterol triglicéridos y glucosa. Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias. v.26; p.434.

Ruiz, R y Canchila, E. 2009. Respuesta a la suplementación de bovinos en pastoreo con pollinaza fruto de palma y yuca. Journals MVZ UNIPAZ. v.1; p. 22-29.

Ruiz, R; Rodriguez, J y Hernandez, O. 2009. Utilización del fruto de palma de aceite en la alimentación de pollos de engorde en fase de finalización. Journals MVZ UNIPAZ. v.1; p. 30-37.

Ruiz, R; Hernández, W y Vásquez, D. 2009. Evaluación de los niveles de urea, colesterol y glucosa en vacas de doble propósito suplementadas con fruto de palma de aceite. Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias. v.22. fasc.N/A. p.537 - 538

Ruiz, R; Canchila, E y Barrios, L. 2012. Utilización del fruto de palma de aceite (*Elaeis guineensis* jack.) en la alimentación de cerdos en fase de ceba. Revista Ciencia y Agricultura. v.9; n.3; p. 161.

Ruiz, R; Hernández, W y Ortiz, E. 2007. Análisis técnico de un modelo de confinamiento utilizando diferentes proporciones de pollinaza, fruto de palma (*Elaeisis Guinnensis Jacq*) y pasto maralfalfa (*Pennisetum sp.*) en la dieta de bovinos machos en fase de levante. Revista colombiana de Ciencias Pecuarias. v.20; N.4; p.614.

Tomkins, T y Drackley, J. 2010. Applications of palm oil in animal nutrition. Journal of Oil Palm Research. v.22; p.835-845. [En línea]. Disponible en: <http://jopr.mpob.gov.my/wp-content/uploads/2013/09/jopr22dec10-Trevor1.pdf>