



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

MORFOMETRÍA Y REPRODUCCIÓN DE *Eisenia andrei* (Bouché, 1972)
BAJO ALIMENTACIÓN SUPLEMENTADA CON
Arthrospira maxima (Setchell & Gardner, 1917)
(Modalidad: Tesis de grado)

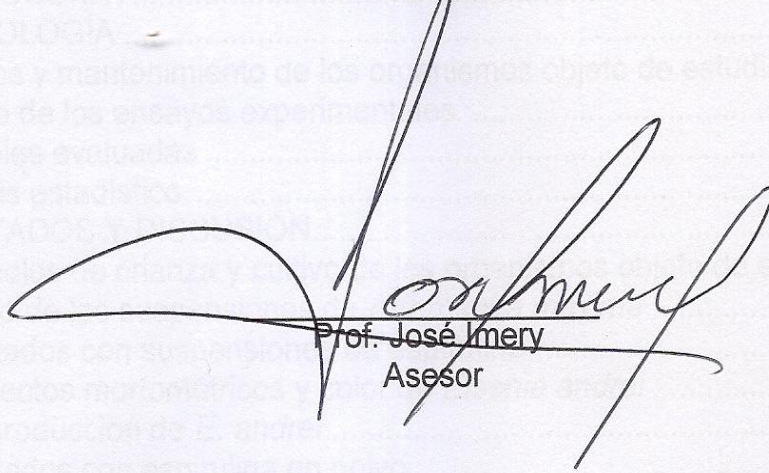
AMARILIS ARACELYS ANDRADE GÓMEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PRACIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

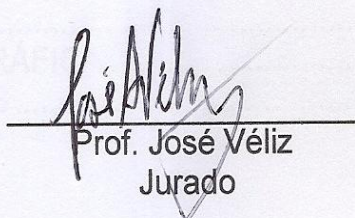
CUMANÁ, 2018

MORFOMETRÍA Y REPRODUCCIÓN DE *Eisenia andrei* (Bouché, 1972)
BAJO ALIMENTACIÓN SUPLEMENTADA CON
Arthrospira maxima (Setchell & Gardner, 1917)

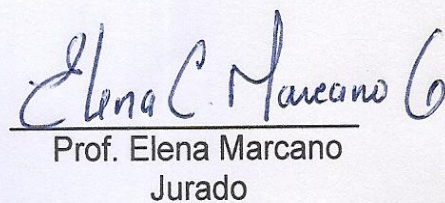
APROBADO POR:



Prof. José Imery
Asesor



Prof. José Véliz
Jurado



Prof. Elena Marciano
Jurado

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	VI
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	9
Cultivos y mantenimiento de los organismos objeto de estudio	9
Diseño de los ensayos experimentales	12
Variables evaluadas	17
Análisis estadístico	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
Protocolos de crianza y cultivo de los organismos objeto de estudio	19
Manejo de las suspensiones de <i>Arthrospira maxima</i>	25
Resultados con suspensiones de espirulina.....	26
Aspectos morfométricos y color de <i>Eisenia andrei</i>	26
Reproducción de <i>E. andrei</i>	36
Resultados con espirulina en polvo	38
Aspectos morfométricos y color de <i>E. andrei</i>	38
Reproducción de <i>E. andrei</i>	44
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	49
HOJAS DE METADATOS	55

DEDICATORIA

A mi madre, Ana Del Jesús Andrade Gómez.
A mi tía-mamá, Nellys del Valle Andrades de Gutiérrez.
A mi abuela, Nellys Aracelys Gómez de Andrade.

AGRADECIMIENTOS

A Dios; por la sabiduría y fuerza brindada durante todo esta etapa de mi vida, gracias por permitirme vivir este sueño.

A mi mamá; **Ana Andrade**, por enseñarme a nunca rendirme por más dura que sea el desafío. ¡TE EXTRAÑO!

A mis tíos-papás; **Nellys Andrades y Felix Gutiérrez**, gracias por creer en mí, por todo su esfuerzo, apoyo y por la confianza que depositaron en mí, por siempre estar ahí y nunca dejarme sola cuando más lo necesité, muchas gracias... Nela eres la mejor del mundo ¡TE AMO!

A mi tutor el Dr. José Imery; cuyo profesionalismo y experiencia marcaron en mí un compromiso de superación constante y búsqueda de excelencia. Para él mi más profunda admiración, estima y respeto por el tiempo dedicado, y por permitir que su experiencia y consejos me guiaran durante esta etapa final.

A mis tíos y tías; **Amarilis, Pedro José, Marlene, Jesús Enrique y Freddy**, gracias por ser ejemplos y modelos de lucha y superación para conseguir este gran logro, y por cuidarme y quererme. ¡LOS QUIERO UN MONTÓN!

A los profesores; a cada uno de ustedes que durante este recorrido tuve la dicha de conocerlos, infinitas gracias por los conocimientos y consejos dados; en especial a los profesores: Mercedes Acosta, María Iabichella, Isabel Mimbela, Fanny Medina, Rosanna Valerio, Víctor Franco y Elena Marcano.

A mi casa de estudio; gracias a la **UNIVERSIDAD DE ORIENTE** por abrirme sus puertas y darme la oportunidad como a miles de bachilleres de la República Bolivariana de Venezuela de concluir una etapa más en mi formación no solo académica sino también personal.

A mi hermana y primas-hermanas; **Anilauris, Anamileth y Nelmileth**, gracias por todo el apoyo, colaboración y cariño demostrado desde el principio de este camino. ¡LAS ADORO!

A mi amiga y hermana del alma; **Rismainy Millán**, Gracias por ser más que una amiga una hermana, ofreciéndome en todo momento sus consejos y apoyo incondicional ¡GRACIAS RIS! Igualmente gracias a sus papás los srs. **Amarilys y Richard Millán**, y a **Eduardo Gómez** por el apoyo brindado.

A mis compañeros y amigos de estudio; **Wendy, Yanecy, Rolando, Rafael, Lederle, Orangel, Jaime, Ambar y Giovanna**; gracias por sus palabras de aliento, consejos, tolerancia y aceptación con mis virtudes y debilidades. Los quiero mucho chicos, siempre estarán en mi mente y corazón.

Y finalmente gracias a todas aquellas personas que de alguna manera u otra formaron parte de este sueño. **MIL GRACIAS A TODOS...**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Combinación de tratamientos con agua y suspensiones de <i>Arthrospira maxima</i> sobre lombricarios experimentales de <i>Eisenia andrei</i>	13
Tabla 2. Tratamientos con polvo de <i>Arthrospira maxima</i> aplicados sobre los lombricarios experimentales de <i>Eisenia andrei</i>	17
Tabla 3. Intensidad de la coloración de las lombrices (<i>Eisenia andrei</i>) en los diferentes lombricarios experimentales tratados con agua y suspensiones de espirulina (<i>Arthrospira maxima</i>) durante los distintos meses de evaluación.	35
Tabla 4. Número de cocones, lombrices recientemente emergidas, juveniles, y adultas cliteladas y no cliteladas presente en los diferentes lombricarios experimentales de <i>Eisenia andrei</i> a los 120 días de evaluación.	36
Tabla 5. Intensidad de coloración en las lombrices experimentales de <i>Eisenia andrei</i> con respecto al tiempo de exposición a la alimentación con <i>Arthrospira maxima</i> y agua.	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de la agrupación biotecnológica “Lombricum” (recuadro blanco) de donde proceden los ejemplares de <i>Eisenia andrei</i> ..	9
Figura 2. Lombricarios originales de <i>Eisenia andrei</i> con aplicación de la dieta preliminar a base de bagazo de caña de azúcar, gallinaza y lixiviados de restos hortícolas.	10
Figura 4. Disposición de los lombricarios experimentales de <i>Eisenia andrei</i> durante el primer ensayo con suspensiones de <i>Arthrospira maxima</i> .	13
Figura 5. Soluciones aplicadas en los diferentes lombricarios experimentales de <i>Eisenia andrei</i>	14
Figura 6. Sistema de filtración al vacío para la separación de la biomasa de <i>Arthrospira maxima</i> desarrollado en el laboratorio..	15
Figura 7. Suspensiones de <i>Arthrospira maxima</i> recién neutralizadas para su aplicación a los lombricarios experimentales de <i>Eisenia andrei</i>	15
Figura 8. Lombricarios experimentales de <i>Eisenia andrei</i> para la evaluación de tratamientos sólidos de <i>Arthrospira maxima</i>	16
Figura 9. Material sólido pulverizado de <i>Arthrospira maxima</i> aplicado en los lombricarios experimentales de <i>Eisenia andrei</i> en el segundo ensayo..	17
Figura 10. Evaluación de las lombrices (<i>Eisenia andrei</i>) luego de la alimentación preliminar con biomasa a base de bagazo de caña de azúcar, gallinaza y lixiviados frescos de restos hortícolas.....	20
Figura 11. Sistema desarrollado para el cultivo experimental de <i>Arthrospira maxima</i>	22
Figura 12. Cultivo experimental de <i>Arthrospira maxima</i>	23
Figura 13. Agregados de <i>Arthrospira maxima</i> en cultivo experimental..	24
Figura 14. Número de lombrices (<i>Eisenia andrei</i>) presente en unidades experimentales suplementadas con diferentes medios líquidos, volúmenes y frecuencias de aplicación durante cuatro meses de estudio.....	27
Figura 15. Biomasa de las lombrices sobrevivientes (<i>Eisenia andrei</i>) en unidades experimentales suplementadas con diferentes medios líquidos y volúmenes de aplicación..	28
Figura 16. Biomasa de las lombrices (<i>Eisenia andrei</i>) presentes en unidades bajo dos frecuencias de aplicación de los medios líquidos.	29
Figura 17. Biomasa de las lombrices (<i>Eisenia andrei</i>) presentes en unidades experimentales suplementadas con diferentes medios líquidos, volúmenes y frecuencias de aplicación durante los distintos meses de estudio.....	30

Figura 18. Longitud de las lombrices (<i>Eisenia andrei</i>) presentes en unidades experimentales suplementadas con diferentes medios líquidos, volúmenes y frecuencias de aplicación durante los distintos meses de estudio.	31
Figura 19. Diámetro de las lombrices (<i>Eisenia andrei</i>) presentes en unidades experimentales suplementadas con diferentes medios líquidos, volúmenes y frecuencias de aplicación durante los distintos meses de estudio.	32
Figura 20. Aspecto de los lombricarios de <i>Eisenia andrei</i> suplementados con diferentes medios líquidos, volúmenes y frecuencias de aplicación a los 110 días de experimentación.	33
Figura 21. Diferencia en la intensidad de coloración observada en los ejemplares de <i>Eisenia andrei</i> sometidos a experimentación.	34
Figura 22. Estado de las lombrices adultas no cliteladas de <i>Eisenia andrei</i> en los tratamientos A-100-5 (a) y SA-100-5 (b) a los 120 días de evaluación.	37
Figura 23. Biomasa (g) y número de lombrices (<i>Eisenia andrei</i>) presentes en unidades experimentales tratadas con diferentes contenidos de espirulina (<i>Arthrospira maxima</i>) en polvo.	40
Figura 24. Longitud y diámetro (mm) de las lombrices (<i>Eisenia andrei</i>) presentes en unidades experimentales tratadas con diferentes contenidos de espirulina (<i>Arthrospira maxima</i>) en polvo.	41
Figura 25. Evolución de la tonalidad de coloración en ejemplares de <i>Eisenia andrei</i> alimentados con <i>Arthrospira maxima</i> en polvo.	43
Figura 26. Intensa coloración en las lombrices (<i>Eisenia andrei</i>) como efecto secundario del consumo de espirulina (<i>Arthrospira maxima</i>) en polvo.	44
Figura 27. Distintos estadios vitales de <i>Eisenia andrei</i> a los 75 días de tratamiento con diferentes dosis de <i>Arthrospira maxima</i> en polvo. ...	45
Figura 28. Crías (a), lombrices juveniles (b) y adultas no cliteladas (c) encontradas en los lombricarios experimentales de <i>Eisenia andrei</i> a los 75 días de tratamientos con polvo de <i>Arthrospira maxima</i>	46

RESUMEN

Eisenia andrei (lombriz roja californiana) es una especie de anélido de interés biotecnológico para la transformación eficiente de la materia orgánica (vermicompostaje) y también es aprovechada como recurso alimentario. En cautividad, se le proporciona una dieta de residuos agroindustriales y estiércoles, los cuales contienen agroquímicos, cadaverinas, putresinas, metales pesados, etc., que se acumulan y pueden resultar desfavorables para estos anélidos u otros organismos en la cadena trófica. Por otra parte, *Arthrospira maxima* (espirulina) es una microalga de alto valor nutracéutico, indicada como alternativa alimentaria para humanos y especies pecuarias. En este sentido, el propósito de esta investigación fue evaluar los efectos de rutinas dietéticas a base de *A. maxima* sobre la lombriz roja californiana (*E. andrei*). Para ello, se requirió desarrollar inicialmente protocolos de conservación de los anélidos y del cultivo experimental de la microalga. Se utilizaron ejemplares de *E. andrei* obtenidos en lombricarios de 1,2x1,8x0,5 m con 10.000 lombrices/m² y con aplicaciones semanales de una mezcla de materiales orgánicos constituida por 50 l de bagazo de caña de azúcar triturado, 3,5 l de gallinaza y 80 l de un lixiviado de la degradación inmediata de restos hortícolas. La microalga fue cultivada en envases de 40 l y 5 l, modificando la solución nutritiva original de Zarrouk (1966) y en condiciones de laboratorio (22-26 °C, 3.000-5.000 lux/12 h y 8 l de aire/min). Se realizaron dos ensayos; para un primer ensayo, se aplicó una diseño factorial de tres suspensiones; estas incluyeron espirulina en su medio de cultivo (SM) neutralizadas con HCl: espirulina en su medio de cultivo (SM), espirulina resuspendida en agua (SA) o solo agua (A); dos volúmenes: 50 y 100 ml; y dos frecuencias de aplicación: cada 5 o 10 días, sobre 50 lombrices en 970 ml de sustrato 1:1 original del lombricario/aserrín de coco, en tres repeticiones por unidad experimental; para el segundo y último ensayo experimental se suministró tres dosis de espirulina en polvo, dosis baja, media y alta (0,5; 1,5 y 2,5 g respectivamente) sobre 25 lombrices en 500 ml de sustrato original de los lombricarios. Para la cosecha de la biomasa microalgal se desarrolló un sistema de filtración al vacío, empleando una doble malla-filtro con un diámetro de poro de 10-12 µm y una jeringa de 60 ml, logrando una separación efectiva de biomasa (0,267 ± 0,019 g/l). Se evidenció que el remanente de sales en el medio de cultivo (SM), la frecuencia y volumen de aplicación fueron determinantes en la sobrevivencia, desarrollo y reproducción de *E. andrei*, razón por la cual se presentaron interacciones significativas de estas fuentes de variación con la mayoría de las variables evaluadas. En contraste, la adicción de espirulina aislada (SA) resultó ligeramente superior sobre las variables estudiadas, pero estadísticamente similar al control (A). En un segundo ensayo, la incorporación de espirulina en polvo produjo diferencias no significativas entre las dosis evaluadas (0; 0,5; 1,5 y 2,5 g/l). Los resultados apuntan hacia el uso de biomasa fresca de espirulina con requerimientos adicionales de lavado y resuspensión en agua para la alimentación de *E. andrei*.

Palabras claves: *Arthrospira maxima*, *Eisenia andrei*, suplemento dietético.

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda alimenticia a nivel mundial y el incremento significativo en la malnutrición global, especialmente en poblaciones con menor poder adquisitivo, ha despertado el interés e inquietud de muchas organizaciones de carácter internacional, tales como la Organización de las Naciones Unidas (IIMSAM, 2010). Actualmente estas organizaciones promueven la búsqueda de nuevas alternativas de alimentos, así como el desarrollo de métodos que permitan, entre otras cosas, mejorar la eficiencia de los cultivos, disminuir los efectos adversos sobre el suelo, reducir el uso de fertilizantes químicos y aumentar las ganancias por área cultivada (Carvajal y Mera, 2010).

Entre las nuevas biotecnologías se encuentran los sistemas biológicos de transformación, como lo son el compostaje y el vermicompostaje (Mamani-Mamani *et al.*, 2012). Este último es una modalidad, donde las protagonista de la transformación de la materia orgánica son las “lombrices de tierra” (FAO, 2013); que además, ayuda a reducir considerablemente los volúmenes de residuos orgánicos generados como consecuencia de las actividades antropogénicas, cooperando de esta manera en la mejora de la calidad ambiental (Santamaría-Romero y Ferrera-Cerrato, 2002).

Para llevar a cabo el proceso de vermicompostaje es indispensable la crianza intensiva de las lombrices bajo condiciones de cautividad (lumbricultura o vermicultura); para ello, se deben cumplir con ciertos requerimientos fundamentales para la sobrevivencia y reproducción de estos invertebrados. Entre los requerimientos básicos, están los contenedores de crianza, que deben ser abiertos (para que facilite la alimentación, aireación y monitoreo permanente), de superficie plana, sombreados o cubiertos y con zanjales de drenaje para evitar la sobresaturación (Samarriba y Guzmán, 2004). También las condiciones ambientales son factores que pudieran ocasionar perturbaciones en esta actividad agropecuaria. La temperatura debe oscilar entre los 19-24 °C; el contenido de humedad debe estar alrededor de los 75-80 % y el pH entre los 6,5-7,5 (Fuentes, 1987; Schuldt *et al.*, 2007).

La vermicultura como disciplina biotecnológica y agroindustrial ha logrado despertar la atención de innumerables personajes, no sólo por la sencillez, bajo costo del proceso y participación activa de las lombrices en la regulación de las propiedades físicas, química y biológicas del suelo, sino también por la producción de humus o vermicompost, empleados como abonos naturales de alta calidad y científicamente comprobados en el cultivo de diversas plantaciones (Boulogne *et al.*, 2008). Por otra parte, debido a su alto valor nutricional, las lombrices también son utilizadas como alimento para diversos animales de granja (pollos, ovejas, cerdos, peces, entre otros), e incluso, su carne fresca puede desecarse para producir harina de lombriz, e incorporarse a la dieta humana en muchos países asiático, entre ellos: China, Japón, Taiwán y Filipinas (Vielma *et al.*, 2003; Pineda, 2006; Vielma y Medina, 2006).

Desde el punto de vista comercial y como actividad pecuaria intensiva, la vermicultura tiene su origen hace más de 50 años en los Estados Unidos de América (EE.UU.). Luego se fue difundiendo a Europa, Asia y por último a América Latina, donde se destacan Argentina, Brasil, Chile, Ecuador y Colombia (De Sanzo y Ravera, 1999). En Venezuela, la lombricultura se introdujo en los años 90 en la región de los Andes; sin embargo, para ese entonces no era de mayor atracción, pues su procedimiento y potencialidad eran prácticamente desconocidos; aunque, actualmente, gracias al auge tecnológico, científico e investigativo, ha cobrado mayor importancia (Hernández *et al.*, 2003). Se considera una importante actividad económica y ecológica que requiere del conocimiento de la biología de los anélidos y de la implementación de técnicas adecuadas para la crianza, alimentación y reproducción de estos organismos (Toccalino *et al.*, 2004).

Según Reynolds y Wetzel (2010), hay aproximadamente 8302 especies, y se estima que cada año se describen aproximadamente 68 nuevas especie. Dentro de la gran diversidad de lombrices, una de las especies más empleadas en la lombricultura es la especie *Eisenia andrei* Bouché 1972, comúnmente llamada lombriz roja californiana, perteneciente

al Phylum: Annelida, Clase: Oligochaeta y a la Familia: Lumbricidae (Domínguez y Pérez-Losada, 2010). Muchas son las razones por las cuales esta es una de las especies predilectas: tienen una distribución mundial, son fácilmente manejables, tienen una excelente tolerancia a la temperatura y pueden vivir en los desechos orgánicos con un alto contenido de humedad (lombrices resilientes); pero son fotosensibles y cuando se mezclan con otras especies se convierten en dominantes dentro de los sistemas de vermicompostaje (Domínguez, 2004). Además *E. andrei* es catalogada como una lombriz epigea, es decir, vive en el horizonte orgánico, cerca o en la superficie del suelo, se alimenta fundamentalmente de la materia orgánica en descomposición, presenta una alta tasa reproductiva y metabólica, pues son aspectos que le permiten adaptarse a las condiciones extremas del clima y a la depredación. De igual forma, su alta tasa de consumo, digestión y asimilación de la materia orgánica son claves para su función en la biotransformación del sustrato (Domínguez y Gómez-Brandón, 2010).

El cuerpo de *E. andrei* es cilíndrico, dividido entre 80 a 120 anillos llamados metámeros, con una organización y anatomía semejante a lo largo del cuerpo de la lombriz. Un gran anillo resalta entre tanto y es denominado clitelo, el cual está dotado de los órganos reproductivos. Es hermafrodita incompleta, es decir un mismo individuo tiene ambos sexos, pero es incapaz de autofecundarse, condición que la obliga a unirse con otro individuo, apareándose cada siete días (Pineda, 2006). Se reproducen todo el año; aunque, la época de reproducción pudiera cambiar en función a las condiciones ambientales y por la alimentación suministrada; asimismo, el apareamiento se produce durante la noche, sobre la superficie del suelo y suele durar aproximadamente de 30 minutos a cuatro horas (Toccalino *et al.*, 2004).

En condiciones óptimas de crecimiento estas lombrices tienen una expectativa de vida de 16 años, aproximadamente, y su ciclo de vida va desde el huevo (“cocuns”, “cocoons” o capullos), hasta la lombriz clitelada sexualmente madura; normalmente, los capullos tienen forma de limón y su color varía a medida que progresa su desarrollo, variando con el tiempo

desde amarillo-transparente a marrón (FAO, 2013). Cada capullo de *E. andrei* contiene alrededor de 2 a 20 lombrices, las cuales emergen pasados los 14 o 21 días de incubación. Al nacer son blancas y a los cinco días posteriores se vuelven rosadas. Los ejemplares juveniles inician su periodo reproductivo a los 3 o 4 meses, en ese preciso momento es cuando pasan a ser adultos y su color se intensifica y se torna rojo púrpura. Finalmente, a los siete meses alcanzan plena adultez (Fuentes, 1987).

Normalmente, cualquier tipo de residuo orgánico, bien sea de origen vegetal o animal, puede incorporarse como materia prima en la dieta de la lombriz *E. andrei* criada en cautiverio, inclusive, los criadores de lombrices utilizan distintos tipos de estiércol de origen equino, bovino, porcino y aviar (León *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 2002; Durán y Henríquez, 2009; Arango y Díaz, 2010), debido a que tienen una composición heterogénea que puede ser velozmente metabolizada por el tracto digestivo de la lombriz. Por su parte, Acosta-Durán *et al.* (2013), sugieren que los sustratos destinados a la alimentación de *Eisenia* deben pasar por un previo composteo, ya que de no ser así los potenciales agentes tóxicos como el amonio, taninos y ciertas sales provocarían afectaciones en el esófago del anélido. Shahmansouri *et al.* (2005) y Loza (2007) manifiestan que *E. andrei* tiene la capacidad de bioacumular en sus tejidos metales pesados, agroquímicos y otros tipos de contaminantes que, fácilmente, por la utilidad de este organismo, podrían llegar a la población humana, ocasionando un sinnúmero de patologías severas; por ello la necesidad de plantear nuevas alternativas alimentarias.

Las microalgas han sido empleadas como alimento para humanos desde tiempos prehistóricos y todavía en la actualidad juegan un papel prominente en la cultura gastronómica de muchos países, especialmente de origen asiático. Uno de los grupos más representativos e importantes a nivel de consumo, son las Cianobacterias (anteriormente conocidas como algas verde-azules), además la importancia evolutiva de estas microalgas es invaluable, pues gracia a éstas, la atmósfera actual es rica en oxígeno, ya que fueron los primeros en desarrollar la fotosíntesis, lo cual dio pie a la evolución de especies dependientes de oxígeno (Belay, 2008).

El término “espirulina” ha sido aplicado para referirse indistintamente a dos géneros de cianobacterias, *Arthrospira* y *Spirulina*; sin embargo, a partir de 1989 se incluyen todas las especies de espirulina en el género *Arthrospira*, siendo las especies de mayor importancia comercial *A. platensis* y *A. maxima*, ya que son cultivadas y comercializadas para la elaboración de muchos productos de valor nutracéutico (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006). *Arthrospira maxima* Setchell y Gardner 1917, así como el resto de las especies pertenecientes a dicho género, está incluida en la División Cyanophyta, Clase Cyanophyceae y Orden Oscillatoriales. Es una agregación filamentosa, multicelular, de aspecto helicoidal, con una longitud aproximada de 200–250 μm (De Lara *et al.*, 2005) y ancho de 3 a 12 μm y hasta los 16 μm (Ciferri, 1983; Tomaselli, 1997); no obstante; muchas de sus características morfológicas dependen en gran medida de las condiciones ambientales, particularmente de la temperatura (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006).

Asimismo, en ocasiones la relacionan con las bacterias gram negativas, puesto que posee una membrana plasmática rodeada por una pared o cubierta celular, aunque gruesa constituida principalmente por peptidoglucano y mucopolisacáridos; aunque, presenta pigmentos como clorofila a y ficocianina, que le proporcionan su color característico y las asocia íntimamente con las algas eucariotas (Sánchez *et al.*, 2003). Su reproducción es asexual, mediante fisión binaria, donde cada ejemplar es capaz de generar dos microorganismos idénticos en un plazo de siete horas, bajo condiciones óptimas en su ambiente natural, lo cual permitiría generar teóricamente unos 15.000 kg/ha anuales de material seco, rendimiento que con biotecnologías eficientes y apropiadas pudiera mejorar (Ponce, 2013).

Uno de los primeros reportes del consumo de espirulina data del año 1521 por las poblaciones antiguas de la Ciudad de México (Tenochtitlán). (Shamosh, 2009). En ciertas épocas del año, los aztecas recolectaban de la superficie del Valle mexicano con ayuda de una red una película de color azul, a la cual le dieron el nombre de “tecuitlat” (excremento de piedra); este material lo colocaban sobre el suelo para secarlo y una vez seco le daban

forma de torta que utilizaban para condimentar el maíz y como acompañante de las tortillas (Sánchez *et al.*, 2003). El “tecuitlat” quedó en el olvido hasta 1940 cuando un ficólogo francés lo redescubrió en África central en el lago Chad donde los habitantes del pueblo Kanem lo llamaban “dihé”, siendo usado en ese entonces para la elaboración de galletas y bizcochos; estudios posteriores confirmaron que estos productos alimenticios contenían realmente *Spirulina platensis* (actualmente *Arthrospira platensis*) (Cárdenas *et al.*, 2010).

La mayoría de las especies del género *Arthrospira* son adaptables a una amplia diversidad de ambientes. Se han encontrado habitando cuerpos de aguas alcalinas, donde proliferan de forma masiva; pero, también algunas se encuentran presentes en cuerpos de agua dulce como ríos, manantiales y estanques (Cárdenas *et al.*, 2010). Aunque hasta ahora no hay reportes para el ambiente marino, con un adecuado suplemento de HCO_3 (bicarbonato), Na (sodio) y K (potasio), en conjunto con salinidad y pH propicio, las especies de *Arthrospira* pueden ser altamente productivas en agua de mar (Vonshak, 1997).

A. maxima es una microalga con una alta productividad; sin embargo, está determinada por factores como el pH del medio, la disponibilidad y concentración de nutrientes, la intensidad y el tipo de luz, la temperatura y la contaminación o la depredación por otros organismos (Malgas, 2013). La disponibilidad de luz es el principal factor de los cultivos fotoautótrofos, pero lo recomendable es que sea en fotoperiodos de 12 horas, puesto que en cada periodo se generan reacciones bioquímicas particulares: el día o la luz, además de favorecer la fotosíntesis promueve la síntesis ATP y NADPH; en cambio, la oscuridad, favorece la asimilación de dióxido de carbono (CO_2) a través del ciclo de Calvin, lo que permite la producción de glucógeno como el principal material de reserva de las células (Cárdenas *et al.*, 2010).

Por su parte, la aplicación constante de agitación en el cultivo facilita la eficiencia en el transporte, impidiendo la sedimentación de la microalga y su adherencia a las paredes del reactor o estanque, homogeniza el pH y asegura la distribución de los gases y de la luz. Con una correcta agitación

se somete a las algas a ciclos rápidos de mezclado, en los que en cuestión de milisegundos pasan de una zona oscura a una zona iluminada (Malgas, 2013). Otros factores a considerar en el crecimiento son la temperatura y pH del medio nutritivo, puesto que influye en los coeficiente de velocidad de las reacciones biosintéticas; la temperatura entre los 25 a 37 °C y pH de 8,5 a 10,5 (Pedraza, 1989).

Al igual que todos los seres vivos, las microalgas necesitan de nutrientes y elementos esenciales; la ausencia de alguno de estos elementos: Carbono (C), Hidrógeno (H), Nitrógeno (N), Fósforo (P) U Oxígeno (O) ocasionaría la detención de su multiplicación y crecimiento (Rojas *et al.*, 2012). Además, aniones como el fosfato (PO^{-4}), sulfuro (SO^{-2}), cloruro (Cl^-) y cationes sódico (Na^+), potásico (K^+), magnésico (Mg^{+2}) y cálcico (Ca^{+2}), son vitales en el medio de cultivo, ya que son requeridos en funciones estructurales y metabólicas. Los microelementos como hierro (Fe), boro (B), cobre (Cu), manganesio (Mn), zinc (Zn), vanadio (V), selenio (Se), cobalto (Co) y molibdeno (Mo) son también indispensables por su función de catalizadores o reguladores en las distintas reacciones enzimáticas (Sánchez *et al.*, 2003).

El interés por *A. maxima* radica principalmente en su alto contenido de macro y micronutrientes de alta digestibilidad, donde se incluyen proteínas (60-70 %), carbohidratos (15-25 %), ácidos grasos esenciales (18 %), vitaminas del complejo B (B_1 , B_2 , B_3 , B_6 , B_7 , B_9 , B_{12}), α -tecoferol (E), provitamina A o β -caroteno y minerales como el hierro, calcio, zinc, cobre y germanio (Sánchez *et al.*, 2003). Se caracteriza además por estar libre de agentes tóxicos y poseer propiedades y/o actividad antitumoral, antiviral, antibacterial y antioxidante. Se ha demostrado que incrementa el rendimiento de los atletas, mejora el apetito, combate enfermedades cardiovasculares y es un buen regulador contra la hiperglicemia e hiperlipidemia (Belay, 2002; Chamorro *et al.*, 2002). Estas propiedades llevaron a su declaración en Roma por parte de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) en 1974 como “El

mejor alimento para el futuro”, pudiendo solventar problemas de alimentación global (IIMSAM, 2010).

Actualmente *A. maxima* también es empleada en la acuicultura en la alimentación de adultos y de las diferentes etapas larvarias de peces, moluscos y crustáceos (De Lara *et al.*, 2005; Rincón *et al.*, 2012), e inclusive, investigaciones recientes la sugieren como alternativa suplementaria en especies de carácter pecuario como aves, rumiantes (bovino y ovino), cerdos y conejos (Henrikson, 2009, Holman y Malau-Aduli, 2012; Bacha, 2015). No obstante, hasta la fecha no se conoce su uso en la alimentación de anélidos y dada la importancia de *E. andrei*, en la agricultura, ganadería piscicultura y alimentación animal se propone explorar el potencial de la espirulina (*A. maxima*) como suplemento dietético alternativo para la lombriz roja californiana criada en cautiverio.

METODOLOGÍA

Para llevar a cabo esta investigación se implementaron las metodologías descritas a continuación:

Cultivos y mantenimiento de los organismos objeto de estudio

Lombriz roja californiana (*Eisenia andrei*):

Los ejemplares de *E. andrei* empleados en esta investigación fueron donados por una agrupación agroecológica dedicada a la lombricultura (“Lombricum”), ubicada en el sector Alejandría, calle Las Lucías, parcela 1, vía al vivero “Loló”, Cumaná estado Sucre, a 10° 26′32″ N y 64° 09′14″ O (Figura 1). Originalmente, estos lombricultores se establecieron con poblaciones de *E. andrei* provenientes de cuatro fuentes diferentes: 1) Instituto Nacional de Capacitación y Educación Socialista (INCES) en Tunapuy, municipio Libertador del estado Sucre, Venezuela; 2) Cooperativa agroecológica “Pedro Camejo”, ubicada en el estado Yaracuy, Venezuela; 3) planta municipal de lombricultura de Teocelo, estado de Veracruz, México y 4) Finca “La Zafira”, provincia de Buenos Aires, Argentina, todas ellas con certificación sanitaria y confirmación de identidad.



Figura 1. Ubicación de la agrupación biotecnológica “Lombricum” (recuadro blanco) de donde proceden los ejemplares de *Eisenia andrei*. Imagen satelital captada a través del programa Google Earth Pro.

Previo a la aplicación de los tratamientos con espirulina se estimularon a los de anélidos con una dieta para promover el crecimiento y formación de clitelo. Durante dos meses se aplicó una alimentación a base de tres residuos orgánicos, siendo el de mayor volumen el bagazo de caña de azúcar, recolectado en los trapiches de la Urbanización Barrio Sucre (Cumaná, estado Sucre). El mismo antes de ser utilizado como fuente de alimento de las lombrices era previamente secado por exposición directa al sol y triturado en una cortadora de pasto modelo B-616 con 3600 rpm, la cual generaba virutas de 1-50 mm. Semanalmente, 50 l de este material fue esparcido uniformemente en la superficie de los lombricarios originales de 1,8x1,2x0,5 m y 10.000 lombrices/m³ (Figura 2). La segunda entrada de alimento estuvo representada por una mezcla de 3,5 l de gallinaza procedente de la granja “Ovopalomo” (Cumaná, estado Sucre) y 19 l de agua, dejando reposar por 30 minutos y luego vertida sobre la capa de bagazo de caña de azúcar. La tercera y última fuente de alimentación fue una suspensión de lixiviados frescos de color café (80 l de aplicación interdiaria), provenientes de la degradación inmediata de “materiales verdes” como malezas típicas de la zona (generalmente verdolaga y pira), residuos domésticos y restos de *Moringa oleifera* (moringa).



Figura 2. Lombricarios originales de *Eisenia andrei* con aplicación de la dieta preliminar a base de bagazo de caña de azúcar, gallinaza y lixiviados de restos hortícolas.

Espirulina (*Arthrospira maxima*):

Se empleó una cepa de *Arthrospira maxima* suministrada por el laboratorio “Algae Research supply” (Florida, EE.UU.) mantenida bajo registro AM-ARS-001 en el laboratorio de Genética Vegetal, Departamento de Biología de la Universidad de Oriente. Para esta investigación una muestra de estas cianobacterias fueron cultivadas en un estanque de 40 l, mantenido en un espacio cerrado con ambiente de laboratorio ($25 \pm 1,2$ °C), con entrada de luz natural indirecta y complementada con tres bombillas fluorescentes (Philips, TL 20W/54 T) para iluminación integral de 3000 a 5000 lux (según luxómetro Tondaj LX-1010B). Un temporizador (“General Electric”, modelo 15076) controlaba la iluminación artificial desde las 6:00 a.m. hasta las 6:00 p.m. El aireado constante (8 l/min) se logró con ayuda de una bomba de pecera (“Power Plus”, p-500). Simultáneamente, se mantuvo un cultivo intermediario, en un recipiente de 5 l, que fue utilizado para reponer el estanque de capacidad mayor a medida que se fue cosechando el medio con espirulina.

El cultivo de *A. maxima* se realizó en el medio nutritivo desarrollado por Zarrouk (1966), con ciertas modificaciones en el suministro de nitrógeno y microelementos, las cuales fueron previamente estandarizadas en cultivos locales de esta microalga y que fueron evaluadas posteriormente en condiciones de laboratorio. Luego de pesar las sales (grado analítico) en una balanza de alta precisión (0,0001g, marca Ohaus, PA214) fueron agregadas bajo agitación constante, siguiendo el orden de aplicación y en las siguientes proporciones en un 1 l de agua destilada: agente quelante ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,11 g/l), bicarbonato de sodio (NaHCO_3 , 17 g/l), fosfato de potasio (K_2HPO_4 , 0,5 g/l), urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 0,9 g/l), sulfato de potasio (K_2SO_4 , 1 g/l), cloruro de sodio (NaCl , 1g/l), sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l), cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,04 g/l) y solución comercial “micro-combi” (Sutton’s Agroquímicos, C.A.) de microelementos quelatados (Mn, Fe, Cu, Zn, Bo, Mo, 1 g/l) (Figura 3), luego se completó hasta los 5 l de solución y se mantuvo almacenado en refrigeración hasta su uso.



Figura 3. Sales y componentes utilizados en el medio nutritivo Zarrouk (1966) con modificaciones propias en sus cantidades respectivas. Se muestran las sales: agente quelante ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,11 g/l), bicarbonato de sodio (NaHCO_3 17 g/l), fosfato de potasio (K_2HPO_4 , 0,5 g/l), Urea (0,9 g/l), sulfato de potasio (K_2SO_4 , 1 g/l), cloruro de sodio (NaCl , 1 g/l), sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l), cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,04 g/l).

Diseño de los ensayos experimentales

Se emplearon dos fases experimentales. La primera consistió en un diseño factorial de $3 \times 2 \times 2$, combinando tres sustancias, dos dosis y dos frecuencias de aplicación, con tres repeticiones para hacer un total de 36 unidades experimentales, representadas por 36 contenedores de aluminio (25x14x7 cm) que contenían a 50 lombrices incluidas en 970 ml de una mezcla 1:1 de sustrato original donde existían las lombrices y aserrín de coco lavado, suministrado éste último por la empresa Deshidratadora del Caribe, S.R.L. (Tabla 1). Las dosis se calcularon como ml de la sustancia por cada litro de sustrato del lombricario. Estas bandejas fueron dispuestas sobre una estructura plana a 80 cm de altura con respecto al piso en el Laboratorio de Genética Vegetal (Figura 4).

Las soluciones experimentales (Figura 5) se aplicaron cuidadosamente con una jeringa de 60 ml de capacidad sobre la superficie de cada replica, los percolados se recogieron en una bandeja de poliestireno que posteriormente eran vaciadas nuevamente en los lombricarios respetivos en caso de restablecer la humedad. La duración de este experimento fue de 120 días (aproximadamente 4 meses).

Tabla 1. Combinación de tratamientos con agua y suspensiones de *Arthrospira maxima* sobre lombricarios experimentales de *Eisenia andrei*.

Soluciones	Volumen (ml/l)	Frecuencia (días)
Agua destilada	50	5
Agua destilada	50	10
Agua destilada	100	5
Agua destilada	100	10
<i>A. maxima</i> en medio nutritivo	50	5
<i>A. maxima</i> en medio nutritivo	50	10
<i>A. maxima</i> en medio nutritivo	100	5
<i>A. maxima</i> en medio nutritivo	100	10
<i>A. maxima</i> en agua destilada	50	5
<i>A. maxima</i> en agua destilada	50	10
<i>A. maxima</i> en agua destilada	100	5
<i>A. maxima</i> en agua destilada	100	10



Figura 4. Disposición de los lombricarios experimentales de *Eisenia andrei* durante el primer ensayo con suspensiones de *Arthrospira maxima*. 12 tratamientos (3x2x2) con tres repeticiones.



Figura 5. Soluciones aplicadas en los diferentes lombricarios experimentales de *Eisenia andrei*. a: suspensión de *Arthrospira maxima* en su medio de cultivo, b: *A. maxima* filtrada y resuspendida en agua destilada, c: solo agua destilada.

La separación por filtrado de *A. maxima* con respecto a su medio de cultivo, a fin de aplicarla bajo suspensión en agua, requirió estandarización, para ello, se ensayó con diferentes tamices de 25-60 μm , sistema de vacío y condiciones estériles. Debido a la falta de un equipo especializado de aislamiento con “grado alimenticio”, fue necesario el desarrollo de un sistema práctico basado en el método de filtración al vacío.

El diseño de este sistema consistía en una doble malla-filtro de nilón con un diámetro de poro de 10-12 μm , un matraz kitasato de 250 ml, un embudo de cerámica, un conector plástico y, como poder de succión, una jeringa de 60 ml (Figura 6). La biomasa fresca depositada en la doble malla-filtro fue entonces resuspendida en agua destilada y neutralizada con HCl para su aplicación (Figura 7).

En cambio, para la aplicación en su forma directa, es decir, inmersa en el medio de cultivo Zarrouk (1966) modificado, se tomó un volumen de 500 ó 1000 ml (dependiendo de la frecuencia de aplicación), y seguidamente, fue neutralizado con ácido clorhídrico para evitar los posibles efectos adversos que pudiera generar la elevada alcalinidad del medio (pH 11,6) sobre los ejemplares de *E. andrei*.



Figura 6. Sistema de filtración al vacío para la separación de la biomasa de *Arthrospira maxima* desarrollado en el laboratorio. E: embudo de porcelana; Q: matraz kitasato; F: filtro malla doble de nilón; C: conector de plástico; S: poder de succión (jeringa de 60 ml). Todos los materiales con “grado alimenticio”.

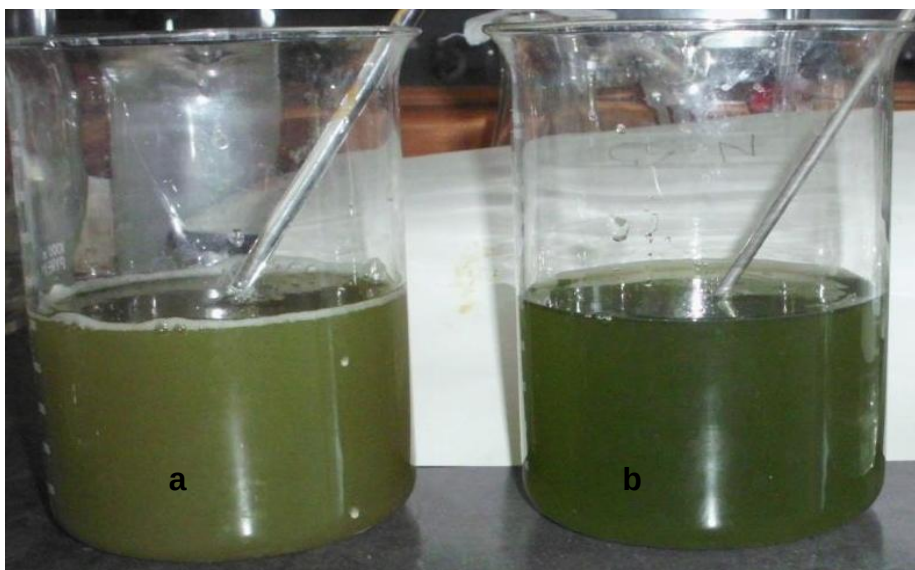


Figura 7. Suspensiones de *Arthrospira maxima* recién neutralizadas para su aplicación a los lombricarios experimentales de *Eisenia andrei*. a: espirulina en su medio de cultivo Zarrouk (1966) modificado. b: espirulina separada de su medio de cultivo mediante filtración y luego resuspendida en agua destilada.

Debido a que los resultados obtenidos en el primer ensayo estuvieron influenciados no sólo por la dotación de las suspensiones de espirulina, sino también por factores relacionados con el medio de cultivo, se planteó entonces ensayar con espirulina en su forma de polvo, además la humedad

constantemente fue monitoreada y controlada como se detalla a continuación.

En el segundo ensayo se aplicaron tratamientos de *A. maxima* en forma sólida. Este experimento estuvo constituido por 12 unidades experimentales (Figura 8) y tuvo una duración de 75 días. Se utilizó un total de 300 lombrices (*E. andrei*), distribuidas en grupos de 25 dentro de recipientes de jardinería (materos de 1 gal), previamente perforados en la parte inferior; además cada recipiente contenía 500 ml de sustrato original. Para mantener la humedad adecuada los lombricarios experimentales fueron regados con 100 ml de agua destilada cada 2 o 3 día, dependiendo de las condiciones del sustrato y evitando el lavado por lixiviación.



Figura 8. Lombricarios experimentales de *Eisenia andrei* para la evaluación de tratamientos sólidos de *Arthrospira maxima*.

La aplicación de los diferentes tratamientos sólidos fue cada dos semanas. Los tratamientos evaluados consistieron en espirulina (*A. maxima*) en polvo en cuatro dosis (0, baja, media y alta) (Tabla 2) (Figura 9). Para ello, la espirulina primero fue filtrada, lavada, prensada, secada en horno

solar artesanal (12 h, 39-48 °C) y finalmente pulverizada con ayuda de un mortero de porcelana.

Tabla 2. Tratamientos con polvo de *Arthrospira maxima* aplicados sobre los lombricarios experimentales de *Eisenia andrei*.

Tratamientos (polvo de espirulina)	Cantidad (g)
Sin espirulina	0
Dosis baja	0,5
Dosis media	1,5
Dosis alta	2,5

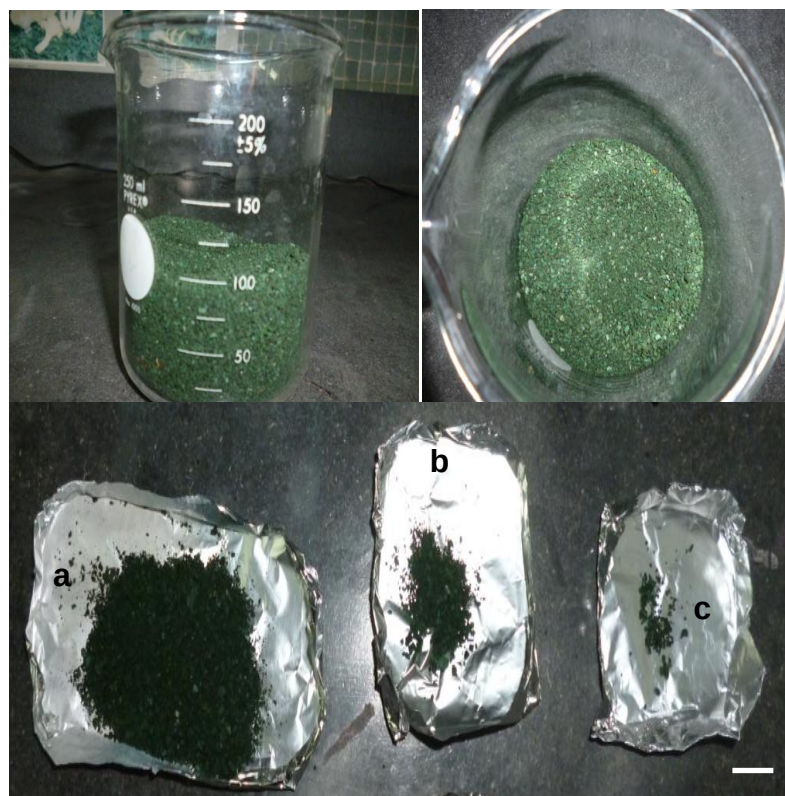


Figura 9. Material sólido pulverizado de *Arthrospira maxima* aplicado en los lombricarios experimentales de *Eisenia andrei* en el segundo ensayo. a: dosis alta (2,5 g); b: dosis media (1,5 g) y c: dosis baja (0,5 g). Barra = 5 mm.

Variables evaluadas

La sobrevivencia de las lombrices y los atributos morfométricos (peso, longitud, diámetro) se monitorearon cada 30 días para los tratamientos líquidos (suspensiones) de espirulina; mientras que para aplicación de

espirulina en polvo se efectuaba cada dos semanas. En ambos casos, se colectaron aleatoriamente 10 lombrices, se les retiró la mayor cantidad de sustrato adherido a sus cuerpos y se fotografiaron con cámara digital (Sony, “Cyber Shot” 7,2 MP) dentro de cápsula de Petri. Las imágenes se analizaron con el programa “SigmaScan Pro 5” para determinar la longitud y diámetro corporal. El peso se determinó en una balanza de precisión (“Denver Instrument” XL-410D, 0,001 g); mientras que el color fue estimado según la carta de colores de Prismacolor.

Para determinar la calidad reproductiva de las lombrices alimentadas con las distintas dietas objeto de estudio, al final del ensayo, cuarto mes para los tratamientos líquidos y segundo mes para los tratamientos sólidos, se procedió a contar el número de capullos, lombrices recientemente emergidas, lombrices juveniles, lombrices adultas cliteladas y no cliteladas en cada lombricario experimental.

La determinación de la productividad del cultivo de *A. maxima* se efectuó bajo un procedimiento de filtración al vacío, utilizando un sistema propio. Inicialmente, la malla-filtro utilizada para la cosecha de la biomasa fresca fue pesada en una balanza analítica de alta precisión (0,0001g, marca Ohaus, PA214), seguidamente se ejecutó el proceso de filtración y posteriormente la biomasa fresca retenida fue secada a peso constante en una estufa a 60 °C durante 48 horas y nuevamente pesada, para finalmente hacer una relación utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Productividad} = \text{Biomasa}_{\text{seca}} - \text{peso}_{\text{inicial}} \text{ del filtro}$$

Análisis estadístico

Los datos correspondientes a las variables cuantitativas fueron procesados mediante un análisis de varianza multifactorial y simple (ANOVA) en los casos pertinentes. Para aquellas variables que mostraron diferencias significativas se les aplicó la prueba *a posteriori* DMS (diferencia mínima significativa). Todas las pruebas estadísticas se efectuaron con $\alpha=0,05$, empleando el programa estadístico Statgraphics Centurión XVII.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Protocolos de crianza y cultivo de los organismos objeto de estudio

Los ejemplares de *Eisenia andrei* empleados en esta investigación mostraron rasgos corporales característicos de su especie según Domínguez y Pérez-Losada (2010), que indicaban condiciones adecuadas de vigor, reproducción y estado sanitario, posiblemente asociadas a un apropiado régimen alimenticio y una suficiente diversidad genética lograda por las diferentes fuentes de poblaciones que integraron originalmente a estos lombricarios. En organismos bajo cautiverio es importante considerar la degeneración por endogamia, razón por la cual resulta conveniente establecer poblaciones fundadoras de base genética amplia y lo menos emparentadas posible, buscando además mejorar la adaptabilidad a los cambios ambientales naturales o provocados por las actividades humanas (Piñero *et al.*, 2008).

Aspectos visuales como la alta proliferación de *E. andrei* y el desarrollo de sus estructuras reproductivas (clitelos) son claves para estimar la calidad de la materia prima destinada como entrada de alimentación a los lombricarios, y por ende, del sustrato donde estos anélidos son criados. Se puede deducir entonces que la fuente de alimentación preliminar a base de bagazo de caña de azúcar, gallinaza y lixiviados frescos de restos hortícolas, resultó propicia para estos organismos, generándose un gran número de lombrices por área, en su mayoría turgentes y con clitelos totalmente visibles y desarrollados (Figura 10). Esta respuesta debe ser una consecuencia del suministro de una biomasa equilibrada en la relación carbono:nitrógeno (C:N) y otras condiciones físico-químicas de los materiales suministrados.

Santamaría-Romero y Ferrera-Cerrato (2002) manifestaron que una relación C:N por debajo de 10:1 pudiera generar problemas fisiológicos como el llamado “síndrome proteico”, un tipo de intoxicación que se produce cuando la alimentación está basada en biomasa rica en nitrógeno, ocasionando una inflamación que conlleva a la muerte; en cambio, cuando la fuente de alimentación tiene un bajo contenido de nitrógeno, y por ende, una

elevada relación C:N (por encima de 40:1), el proceso de reproducción de las lombrices se ve afectado negativamente.



Figura 10. Evaluación de las lombrices (*Eisenia andrei*) luego de la alimentación preliminar con biomasa a base de bagazo de caña de azúcar, gallinaza y lixiviados frescos de restos hortícolas. La flecha indica clitelo.

En esta investigación, el bagazo de caña de azúcar no sólo sirvió como fuente principal de carbono para establecer la relación C:N en aproximadamente 25:1, junto con la gallinaza y los lixiviados frescos (ricos en nitrógeno), sino que también actuó como material estructurante de excelente calidad, aportando moléculas de celulosa de mayor degradabilidad que otras fuentes de carbono más resistentes como las virutas de madera, ricas en lignina o suberina, y que pueden resultar adversas para los anélidos o ralentizar el proceso de vermicomposte (Vargas-Machuca *et al.*, 2008). La mezcla de estos materiales fue suficiente también para proporcionar la debida porosidad, retención de humedad, pH y oferta de elementos

esenciales para el normal desarrollo de *E. andrei* y de sus microorganismos simbioses.

Por otra parte, las microalgas han sido estudiadas y cultivadas intensivamente en los últimos 50 años en países como Estados Unidos, Japón, India, China e Israel, siendo una de las especies más explotadas la *Arthrospira maxima*, no sólo para la producción de alimentos para animales, incluyendo el ser humano, sino también para las industrias farmacéutica y cosmética, para el tratamiento de las aguas residuales y generación de biocombustibles (Martínez, 2011). Actualmente, los sistemas de cultivos han sido perfeccionados gracias al auge tecnológico y científico que caracteriza el siglo XXI; sin embargo, la elección correcta de éste depende exclusivamente de las características y requerimiento de cada especie, así como del estado financiero del productor (Martínez-García, 2008).

En este trabajo, el cultivo de *A. maxima* se llevó a cabo en contenedores circulares de 5 l, utilizando el medio nutritivo desarrollado por Zarrouk (1966), con ciertas modificaciones en el suministro de microelementos y nitrógeno, empleando la formulación agrícola “micro-combi” con los microelementos quelatados (Mn, Fe, Cu, Zn, Bo y Mo) y urea agrícola a cambio de nitrato de sodio, respectivamente.

Aunque existan otros medios de cultivo como el SSM (medio salino de mar); el medio Zarrouk es el más usado en la producción de espirulina, tanto a nivel de laboratorio como industrial, pues le brinda a este microorganismo todos los macro y microelementos requeridos para su existencia y multiplicación (Sánchez *et al.*, 2003). En reiteradas investigaciones se plantea que la alta alcalinidad de este medio, además de promover y facilitar su rápida proliferación, constituye una excelente barrera selectiva que limita el crecimiento de microorganismos contaminantes (Rodríguez y Triana, 2006), destacando así que los cambios realizados al medio Zarrouk original no tuvieron incidencia negativa sobre la alcalinidad del mismo, pues se obtuvo un pH de 11,6; lo que permite inferir que dichas modificaciones pueden ser aplicables con total confiabilidad *a posteriori* en cultivos extensivos. Generalmente, este tipo de medio de cultivo utiliza un agente

quelante ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), puesto que se ha demostrado que aumenta la solubilidad de los iones metálicos, permitiendo así que estén disponibles como nutrientes para *A. maxima* (Sánchez *et al.*, 2003).

Cárdenas *et al.* (2010) advirtieron que muchos filamentos de *A. maxima* pueden ser destruidos por fotólisis al ser expuestos a una excesiva y prolongada iluminación, por lo que nace la necesidad de establecer periodos de tiempo de 12x12, es decir, 12 horas de iluminación (3000-5000 lux) y 12 horas de oscuridad, razón por la cual se empleó un temporizador que sincronizara el encendido del circuito de luces complementarias a las 6:00 a.m. y lo apagara a las 6:00 p.m. Además, partiendo de lo expresado por Jourdan (2011) en cuanto al mantenimiento de aireación y agitación, se incorporó un sistema básico que constaba de una bomba o compresor de acuarios, con una capacidad de 8 l/min y como dispersor del aire una manguera plástica directa. De esta manera el cultivo experimental de *A. maxima* se mantuvo aireado y homogenizado, evitando la acumulación de agregados celulares en la superficie y paredes del contenedor, permitiendo de esta manera una eficiente entrada de iluminación al cultivo (Figura 11).

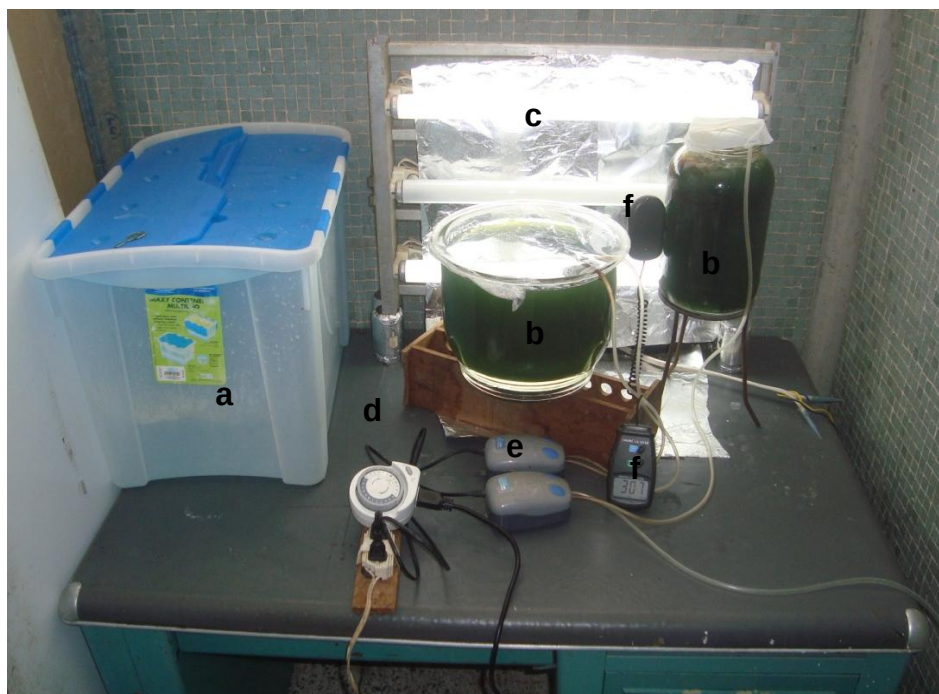


Figura 11. Sistema desarrollado para el cultivo experimental de *Arthrospira maxima*. a: contenedor inicial de 40 l. b: contenedores de 5 l con cultivo de la espirulina, c: circuito de luz artificial (bombillas de 20 W), d: temporizador (6:00 a.m.-6:00 p.m.), e: sistema de agitación y aireación, f: luxómetro, indicando lectura de 3070 lux.

Actualmente son numerosas las formas de constatar que las condiciones y/o métodos desarrollados sobre un cultivo fueron idóneos para su crecimiento; las más certificadas y propicias son las de carácter científico, como la determinación de la densidad y productividad en biomasa. Sin embargo, existen otras más sencillas y prácticas como las características palpables o visuales; en este sentido, se puede presumir que las condiciones aplicadas en relación a temperatura, nutrición, iluminación y agitación fueron ideales para el rápido crecimiento de *A. maxima*, ya que se apreció una coloración verde-azulada intensa, teniendo en cuenta que la coloración es proporcional a la densidad y crecimiento del cultivo (Figura 12).



Figura 12. Cultivo experimental de *Arthospira maxima*. Se observa coloración verde-azulada y agregados de espirulina en constante agitación.

Al aplicar un método más científico de determinación de la biomasa a través de la filtración del cultivo experimental de *A. maxima* con malla de nilón (10 μm), se confirmó que el sistema desarrollado presentó una productividad de $0,267 \pm 0,019$ g de polvo seco de espirulina por cada litro de medio de cultivo. Esta concentración se sitúa dentro del rango que acredita a medios de cultivo aptos para la producción comercial de espirulina, permitiendo reafirmar que las modificaciones realizadas en la solución nutritiva de Zarrouk no perjudicaron bajo ninguna circunstancia el

crecimiento y multiplicación de las microalgas; no obstante, resultó inferior a lo reportado por Rojas *et al.* (2012) y Hurachi-Olivera *et al.* (2014). Posiblemente esta diferencia esté influenciada por el volumen de cultivo, la fotoinhibición o factores no controlados como la evaporación del medio líquido nutritivo, pues se estima que en los cultivos llevados a cabo en sistemas abiertos o semi-cerrados, como en el presente caso, tienen pérdidas de productividad de más del 25 % (Vonshak y Guy, 1992).

Otro aspecto a destacar fue la observación morfológica de los filamentos o agregados celulares de *A. maxima*, detallándose formas típicas en espirales con 5 a 6 espiras y segmentos totalmente rectos, de color verde-azulado (Figura 13), coincidiendo con los caracteres mencionados por Hurachi-Olivera *et al.* (2014).



Figura 13. Agregados de *Arthrospira maxima* en cultivo experimental. Se observan filamentos rectos (flechas blancas) y en espiral (flechas negras). Barra = 50 μm .

La aparición de filamentos rectos está relacionada con los efectos de la radiación ultravioleta (UV). Fox (1996) manifiesta que estos pueden ser transformados a formas espirales cuando se les aplica condiciones de alta luz y radiación UV directa. Wu *et al.* (2005) sugirieron que existen diferentes

escalas de adaptación y aclimatación de la espirulina, pues cuando las células son expuestas a periodos cortos de radiación UV (días), los agregados celulares adquieren formas rectas; sin embargo, a escalas de tiempo más largas (años, décadas), la adaptación a la radiación UV puede producir cambios en la estructura de una hélice más bien alargada a una hélice muy comprimida (usualmente observada en fuentes naturales como lagos y lagunas).

Manejo de las suspensiones de *Arthrospira maxima*

Los grandes productores de biomasa de *A. maxima* señalan que su separación del medio nutritivo es la etapa más compleja y determinante en la economía y balance energético del proceso. De hecho, la selección adecuada del método de aprovechamiento o cosecha puede disminuir el costo total de producción entre un 20-30 % (Acién *et al.*, 2013). Además de la filtración, métodos alternativos de recuperación o cosecha de la espirulina son la centrifugación, sedimentación por gravedad, flotación y floculación (Grima *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2011; Harun *et al.*, 2010; Flotats *et al.*, 2012) y su elección depende en gran medida de las características de las microalgas, especialmente de su tamaño, densidad de cultivo y valor de los productos finales deseados.

Se ha demostrado que el método de filtración es uno de los más empleados y competitivos por su simplicidad en construcción y función, además por su bajo costos de inversión (Chen *et al.*, 2011). Existen muchos modos de filtración como sin salida, microfiltración, a presión, ultrafiltración, de flujo tangencial y al vacío. En general, este método implica pasar o hacer fluir una suspensión con microalgas a través de filtros en los cuales se irá acumulando la microalga, formando una capa pastosa que luego es prensada (Harun *et al.*, 2010).

Asimismo, se ha reconocido que los métodos de filtración, bien sea en su modalidad de presión o al vacío, son eficientes para concentrar microalgas que se consideren de gran tamaño como *Coelastrum proboscideum* y *Arthrospira*; no así para aquellas que se aproximan a las dimensiones bacterianas, por ejemplo, *Scenedesmus*, *Dunaliella* y *Chlorella*

(Grima *et al.*, 2003). En este sentido, la implementación del método de filtración al vacío, utilizando un doble filtro textil y la suficiente succión aplicada por la jeringa de 60 ml, resultó eficiente para la recuperación de biomasa fresca, conociendo que *A. maxima* puede llegar a alcanzar agregaciones filiformes de hasta 200 μm de longitud (De Lara *et al.*, 2005). No obstante, este método puede presentar ciertos inconvenientes como la disminución del flujo de permeabilidad por la sobresaturación o la aparición del “fouling” o acumulación de una sustancia mucilaginoso que aumenta la resistencia a la filtración, puesto que obstruye los poros del filtro, conllevando a la necesidad de reemplazarlos periódicamente (Gaitero-Álvarez *et al.*, 2012).

Resultados con suspensiones de espirulina

Aspectos morfológicos y color de Eisenia andrei

El número de lombrices registrado durante los cuatro meses de evaluación fue disminuyendo paulatinamente, evidenciándose valores inferiores a las 50 lombrices iniciales (cantidad derivada de la relación del número ideal de lombrices por metro cúbico de sustrato). El análisis de varianza (ANOVA) multifactorial detalla que las fuentes de variación (medios líquidos, volúmenes y frecuencias de aplicación) interaccionaron significativamente ($F\text{-cal.}=5,40^*$; $8,80^*$; $15,13^*$ y $29,96^*$, $p\leq 0,05$) sobre el número de lombrices sobrevivientes durante los cuatro meses de evaluación. Aparentemente, la suspensión de *A. maxima* con su medio nutritivo (SM) resulto contraindicada para la sobrevivencia de *E. andrei*, especialmente cuando se suministra a los lombricultores experimentales en mayor volumen (100 ml) y con mayor frecuencia (cada cinco días). La acción prolongada de este tratamiento se hace letal a partir del segundo mes, sin importar el volumen y la frecuencia de aplicación (Figura 14). El suministro de la espirulina separada de su medio de cultivo resultó con el promedio más alto de sobrevivencia de las lombrices, aunque estadísticamente similares al control (solo con agua destilada) en todos los meses de evaluación.

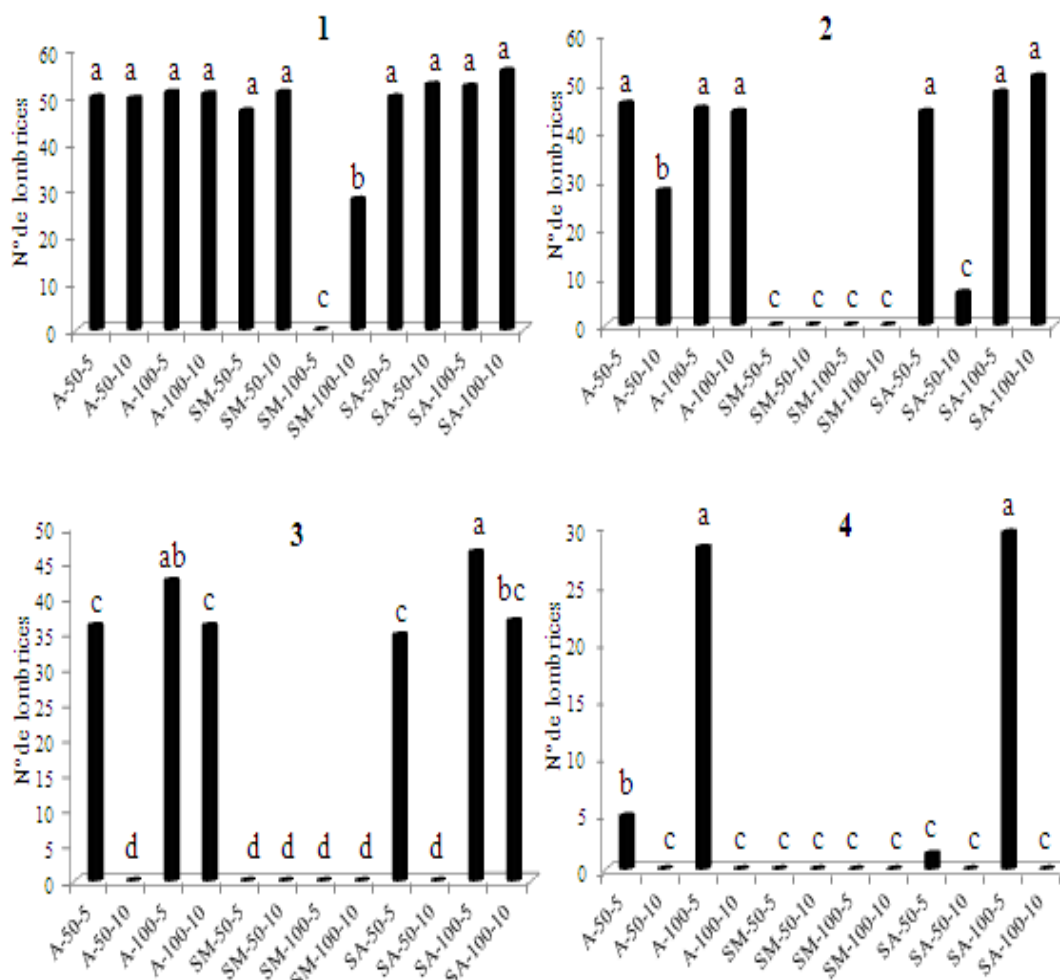


Figura 14. Número de lombrices (*Eisenia andrei*) presente en unidades experimentales suplementadas con diferentes medios líquidos, volúmenes y frecuencias de aplicación durante cuatro meses de estudio. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de MDS ($\alpha = 0,05$). A: agua; S.M: espirulina (*Arthrospira maxima*) en su medio de cultivo; S.A: espirulina suspendida en agua; 50: 50 ml; 100: 100 ml; 5: 5 día; 10: 10 días. 1: primer mes; 2: segundo mes; 3: tercer mes y 4: cuarto mes. Promedios de tres repeticiones.

Otro de los aspectos evaluados durante la investigación fue la biomasa conjunto de las lombrices sobrevivientes en cada uno de los tratamientos, se observó durante el primer mes de evaluación una disminución con respecto a las biomásas iniciales (11-16 g), obteniéndose biomasa totales por debajo de los 10 g (Figura 15). El ANOVA multifactorial manifiesta una interacción entre los medios líquidos y los volúmenes (interacción significativa, $F\text{-cal}=18,98^*$, $p \leq 0,05$) sobre el peso de las lombrices sobrevivientes. La solución de *A. maxima* con su medio nutritivo provocó un efecto negativo sobre la biomasa de las lombrices, más notable al aplicar mayor volumen; mientras que la suspensión de espirulina separada

de su medio de cultivo promovió el mantenimiento de mayor biomasa en las lombrices, pero estadísticamente similar al tratamiento con solo agua destilada.

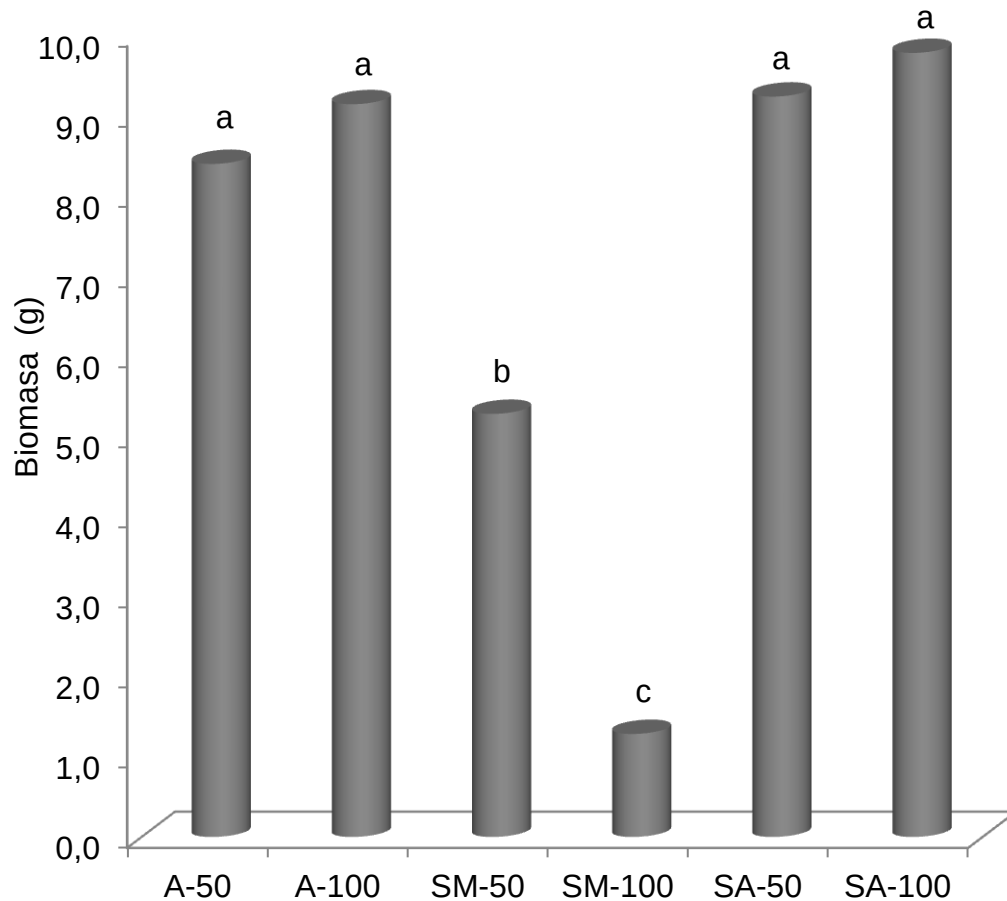


Figura 15. Biomasa de las lombrices sobrevivientes (*Eisenia andrei*) en unidades experimentales suplementadas con diferentes medios líquidos y volúmenes de aplicación. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de MDS ($\alpha = 0,05$). A: agua; S.M: espirulina en su medio de cultivo; S.A: espirulina suspendida en agua. 50: 50 ml; 100: 100 ml. Promedios de tres repeticiones y dos frecuencias de aplicación durante los distintos meses de estudio.

Además se encontraron diferencias significativas ($F\text{-cal}=7,44^*$, $p \leq 0,05$) en la biomasa de las lombrices con respecto a las frecuencias de aplicación del alimento evaluado, demostrando el efecto adverso de las sales acompañantes en el medio de cultivo de la espirulina sobre las lombrices cuando se suministran con mayor frecuencia (cada 5 días). El promedio de biomasa para esta frecuencia mostró una significativa inferioridad (6,64 g) en comparación con el promedio registrado con la aplicación de los medios líquidos cada 10 días (7,72 g) (Figura 16).

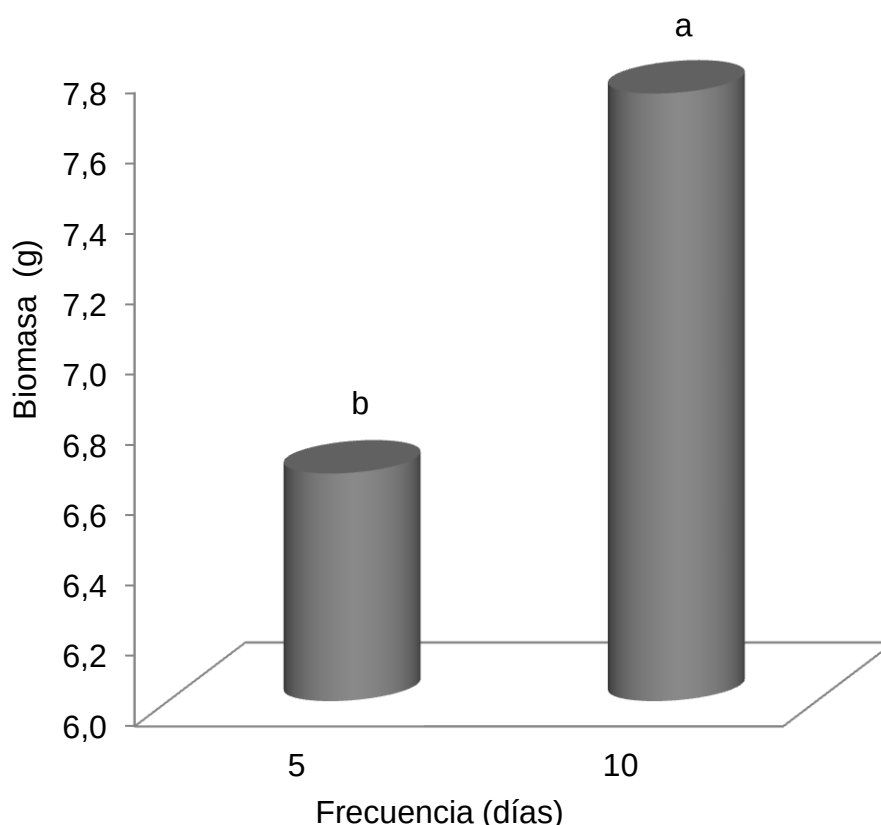


Figura 16. Biomasa de las lombrices (*Eisenia andrei*) presentes en unidades bajo dos frecuencias de aplicación de los medios líquidos. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de MDS ($\alpha = 0,05$). Promedios de tres repeticiones, tres medios líquidos y dos volúmenes de aplicación.

Para el segundo, tercero y cuarto mes se presentaron interacciones significativas entre las tres fuentes de variación ($F\text{-cal}=10,69^*$; $49,99^*$ y $37,45^*$, $p \leq 0,05$), respectivamente, sobre la biomasa de las lombrices. Los resultados demuestran que la biomasa tiene un descenso conforme transcurre el tiempo de experimentación (Figura 17), reiterándose una vez más los efectos negativos de las sales del medio Zarrouk sobre las lombrices y la inocuidad de la espirulina resuspendida en agua destilada. También es evidente la necesidad que tienen estos anélidos de los mayores volúmenes y frecuencias de hidratación, con o sin el suplemento alimenticio proporcionado por la presencia de la espirulina resuspendida en agua.

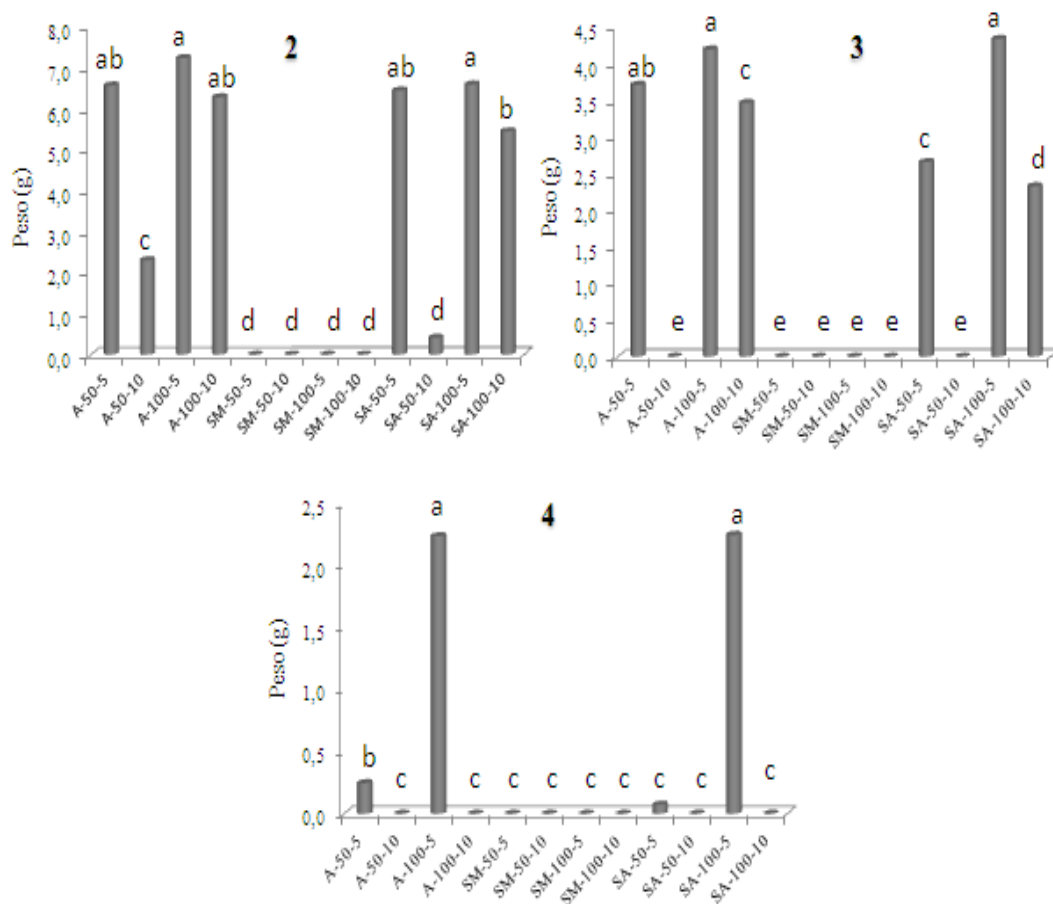


Figura 17. Biomasa de las lombrices (*Eisenia andrei*) presentes en unidades experimentales suplementadas con diferentes medios líquidos, volúmenes y frecuencias de aplicación durante los distintos meses de estudio. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de MDS ($\alpha=0,05$). A: agua; S.M: espirulina en su medio de cultivo; S.A: espirulina suspendida en agua; 50: 50 ml; 100: 100 ml; 5: 5 días; 10: 10 días; 2: segundo mes; 3: tercer mes y 4: cuarto mes. Promedios de tres repeticiones.

Las dimensiones corporales como longitud y diámetro de los anélidos también mostraron sensibilidad a los efectos combinatorios de los factores evaluados y disminución a lo largo del tiempo en ambos casos. Se alcanzaron medidas inferiores a los 50 mm de longitud (Figura 18) y 2,5 mm de diámetro (Figura 19), estando ambas condiciones corporales por debajo de las medidas señaladas como estándares o normales (Fuentes, 1987). Se reflejan tendencias similares a las descritas para el número y biomasa de las lombrices sobrevivientes, donde la baja frecuencia de hidratación, con o sin el suministro de suplemento nutritivo, resulta perjudicial para el desarrollo corporal de *E. andrei* y efectos detrimentales al añadir las suspensiones de cultivo de espirulina sin separarlas de las sales del medio Zarrouk.

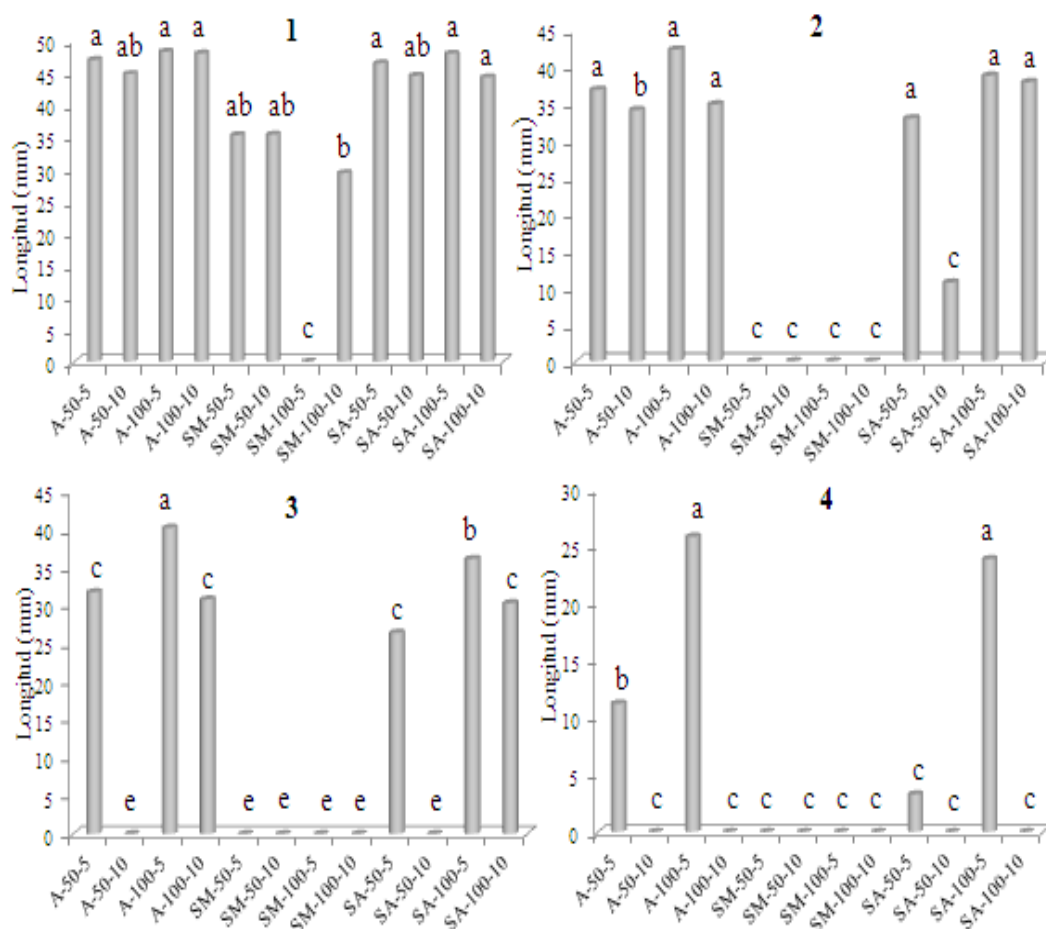


Figura 18. Longitud de las lombrices (*Eisenia andrei*) presentes en unidades experimentales suplementadas con diferentes medios líquidos, volúmenes y frecuencias de aplicación durante los distintos meses de estudio. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de MDS ($\alpha=0,05$). A: agua; S.M: espirulina en su medio de cultivo; S.A: espirulina suspendida en agua; 50: 50 ml; 100: 100 ml; 5: 5 días; 10: 10 días; 1: primer mes; 2: segundo mes; 3: tercer mes y 4: cuarto mes. Promedios de tres repeticiones.

Al final del experimento, la alta mortalidad de las lombrices tratadas con la suspensión de espirulina en su medio de cultivo, así como la deteriorada biomasa y dimensiones corporales señaladas de las aplicaciones de espirulina resuspendida con respecto al tratamiento de solo agua destilada, deben estar relacionados con los efectos directos de las sales empleadas para la preparación del medio nutritivo en el primer caso, y a los posibles remanentes de solutos aún después de la filtración y resuspensión de la biomasa fresca de *A. maxima*. Esta interpretación se ve corroborada con las investigaciones realizadas por Santamaría-Romero y Ferrera-Cerrato (2002), Mamani-Mamani *et al.* (2012) y López-Jiménez *et al.*

(2014), quienes sugieren que la presencia de sales en los medios de crianza es perjudicial para el desarrollo de las lombrices.

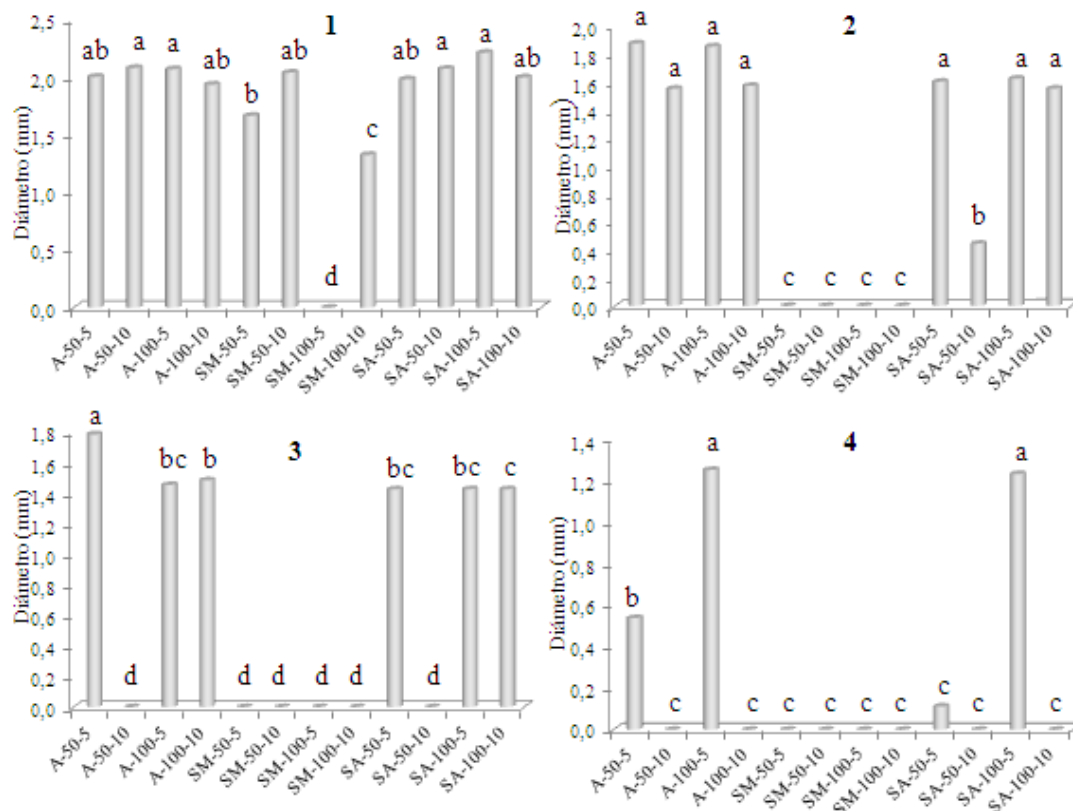


Figura 19. Diámetro de las lombrices (*Eisenia andrei*) presentes en unidades experimentales suplementadas con diferentes medios líquidos, volúmenes y frecuencias de aplicación durante los distintos meses de estudio. Letras desiguales indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de MDS ($\alpha = 0,05$). A: agua; S.M: espirulina en su medio de cultivo; S.A: espirulina suspendida en agua; 50: 50 ml; 100: 100 ml; 5: 5 días; 10: 10 días; 1: primer mes; 2: segundo mes; 3: tercer mes y 4: cuarto mes. Promedio de tres repeticiones.

Mientras mayor sea la frecuencia y volumen de aplicación de la suspensión rica en sales, la acumulación de estos solutos se incrementa considerablemente, puesto que su cutícula corporal es permeable al agua e iones en disolución (Lee, 1985), por lo cual altas concentraciones de sales entran fácilmente ocasionando un posible desequilibrio osmótico mortal y condiciones extremas para la sobrevivencia y mantenimiento de organismos celómicos (Schuldt, 2006). Al considerar que más del 60 % del cuerpo de las lombrices es agua y al exponerlas a un entorno hiperosmótico, es de esperarse que su humedad corporal se transfiera abruptamente al sustrato. Tomando en cuenta que el agua se moviliza de una zona de menor concentración de soluto a una de mayor concentración, debe provocar

entonces la deshidratación de los organismos, e inclusive, la elevada concentración de sales presentes en el medio Zarrouk puede convertirse en un potente agente tóxico, ocasionando serios problemas en el tracto digestivo de estos animales, deterioro y posterior mortalidad de los ejemplares.

Por otra parte, la falta de humedad en los lombricarios experimentales probablemente fue otro de los factores que incidió de manera adversa en el crecimiento y sobrevivencia de los mencionados invertebrados, pues algunos sustratos se observaban opacos, secos y al comprimirlos presentaban un escaso contenido de agua. Estos hechos permiten inferir la existencia de un precario contenido de humedad en aquellos lombricarios de menor volumen y frecuencia de hidratación (Figura 20). Resultados equivalentes fueron presentados por Morales-Valdés y Calero (2008), concluyendo efectos detrimentales sobre los anélidos cuando la humedad del sustrato de crianza se sitúa por debajo del 50 % v/v.



Figura 20. Aspecto de los lombricarios de *Eisenia andrei* suplementados con diferentes medios líquidos, volúmenes y frecuencias de aplicación a los 110 días de experimentación. Flechas indican tratamientos donde se observó escasa humedad acumulada en el sustrato.

Para *E. andrei* es vital que la humedad en el sustrato de crianza esté alrededor de 75-80 %. Al ser organismos carentes de dientes, esta hidratación promueve la fragmentación de las partículas orgánicas, y por ende, la absorción de las sustancias alimenticias, además facilita su movilidad y respiración dentro del sustrato donde se desarrollan (Hernández *et al.*, 2006). Asimismo, Hernández *et al.* (2009) señalaron que para garantizar la ganancia y mantenimiento de biomasa en lombrices epigeas como *E. fetida* y *E. andrei* se les debe suministrar alimentos frescos con regularidad, ya que estas llegan a consumir en 24 horas el 100 % de su peso corporal, requiriendo así la entrada periódica de su material alimenticio. De este modo, y en base a las observaciones del presente trabajo, se puede suponer que los riegos e incorporación de nutrientes (de baja concentración de sales) deben realizarse periódicamente a una frecuencia menor o igual a cada cinco días.

Otro aspectos relevante fue la diferencia en la tonalidad observada en los ejemplares de *E. andrei* durante los distintos meses de experimentación. La suspensión de espirulina en medio nutritivo afectó esta apariencia desde el primer mes de aplicación, pues se observaron en su mayoría ejemplares de aspecto opaco y coloración intensa, inclusive, llegando a verse casi negro (Figura 21); mientras que en los organismos alimentados con espirulina resuspendida en agua y aplicación de solo agua no mostraron mayores cambios físicos (Tabla 3).



Figura 21. Diferencia en la intensidad de coloración observada en los ejemplares de *Eisenia andrei* sometidos a experimentación. a: coloración típica (observada principalmente con aplicación de agua o espirulina resuspendida); b: media-oscuro; c: muy oscura y d: casi negro (coloraciones predominantes con aplicación de espirulina con su medio de cultivo).

Tabla 3. Intensidad de la coloración de las lombrices (*Eisenia andrei*) en los diferentes lombricarios experimentales tratados con agua y suspensiones de espirulina (*Arthrospira maxima*) durante los distintos meses de evaluación.

Tratamientos	1 ^{er} mes	2 ^{do} mes	3 ^{er} mes	4 ^{to} mes
A-50-5	*	*	**	***
A-50-10	*	**		
A-100-5	*	**	**	**
A-100-10	*	**	**	
SM-50-5	****			
SM-50-10	***			
SM-100-5				
SM-100-10	***			
SA-50-5	*	*	**	***
SA-50-10	*	**		
SA-100-5	*	*	**	**
SA-100-10	*	*	**	

A: agua; SM: espirulina en su medio nutritivo; SA: espirulina en agua; 50: 50 ml; 100: 100 ml; 5: 5 días; 10: 10 días. *: típica; **: mediano-oscura; ***: muy oscuro y ****: casi negro.

La diferencia de coloración observada en los ejemplares de *E. andrei* expuestos a las distintas suspensiones experimentales, probablemente está relacionada con el deterioro de los mismos como consecuencia de las sustancias empleadas y el escaso contenido de humedad en aquellos tratamientos de bajo volumen (50 ml) y frecuencia de aplicación (cinco días). Aunque otras investigaciones aluden que el empleo de espirulina como suplemento nutritivo mejora la apariencia y vistosidad del plumaje, pelaje y piel de ciertos animales (Henrikson, 2009; Holman y Malau-Aduli, 2012); al parecer esta respuesta es totalmente adversa en el caso de anélidos, si se suministra junto con su medio de cultivo. El hecho, que la suspensión de *A. maxima* pudiera contener por defecto una elevada concentración de solutos en comparación al agua y a la suspensión de *A. maxima* resuspendida en agua; y que posiblemente pudiera generar la deshidratación de estos organismos, permite suponer que la pérdida del brillo y oscurecimiento de su

tonalidad típica está vinculada con dicha circunstancia, ya que cualquier condición de estrés puede conllevar a alteraciones fisiológicas y morfológicas en los seres vivos (Corrales y Muñoz, 2012).

Reproducción de *E. andrei*

Los resultados obtenidos manifiestan la inexistencia de cocones, lombrices recientemente emergidas, juveniles y adultas cliteladas a los 120 días de evaluación en la totalidad de los tratamientos experimentales; sin embargo, se lograron visualizar lombrices adultas no cliteladas en las combinaciones A-50-5; A-100-5; SA-50-5 y SA-100-5, donde los tratamientos A-100-5 y SA-100-5 presentaron un número mayor con promedios de 28,33 y 29,67; mientras que los restantes tratamientos arrojaron promedio de 4,67 y 1,33, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Número de cocones, lombrices recientemente emergidas, juveniles, y adultas cliteladas y no cliteladas presente en los diferentes lombricarios experimentales de *Eisenia andrei* a los 120 días de evaluación.

Tratamientos	Cocones	Lombrices recién emergidas	Lombrices juveniles	Lombrices adultas no cliteladas	Lombrices adultas cliteladas
A-50-5	0	0	0	4,67	0
A-50-10	0	0	0	0	0
A-100-5	0	0	0	28,33	0
A-100-10	0	0	0	0	0
SM-50-5	0	0	0	0	0
SM-50-10	0	0	0	0	0
SM-100-5	0	0	0	0	0
SM-100-10	0	0	0	0	0
SA-50-5	0	0	0	1,33	0
SA-50-10	0	0	0	0	0
SA-100-5	0	0	0	29,67	0
SA-100-10	0	0	0	0	0

Promedio de tres repeticiones. A: agua; SM: espirulina en su medio nutritivo; SA: espirulina en agua; 50: 50 ml; 100: 100 ml; 5: 5 días; 10: 10 días.

Las lombrices adultas no cliteladas halladas al finalizar la investigación, resultarían de las introducidas inicialmente en los respectivos lumbricarios experimentales (Figura 22), puesto que durante la fase de evaluación no fueron visualizados ni cocones ni lombrices con estados menores de madurez; aunque es importante destacar que estas en su totalidad presentaban clitelos visibles, esto permite suponer que durante el desarrollo de la investigación estas estructuras fundamentalmente de carácter reproductivo sufrieron un proceso degenerativo, y por lo tanto, detención de proceso de reproducción, posiblemente como consecuencia de las condiciones ambientales en su entorno de crianza, producto principalmente del escaso contenido de humedad aunado a la alta concentración de solutos, e inclusive la posible carencia de recursos alimenticios.

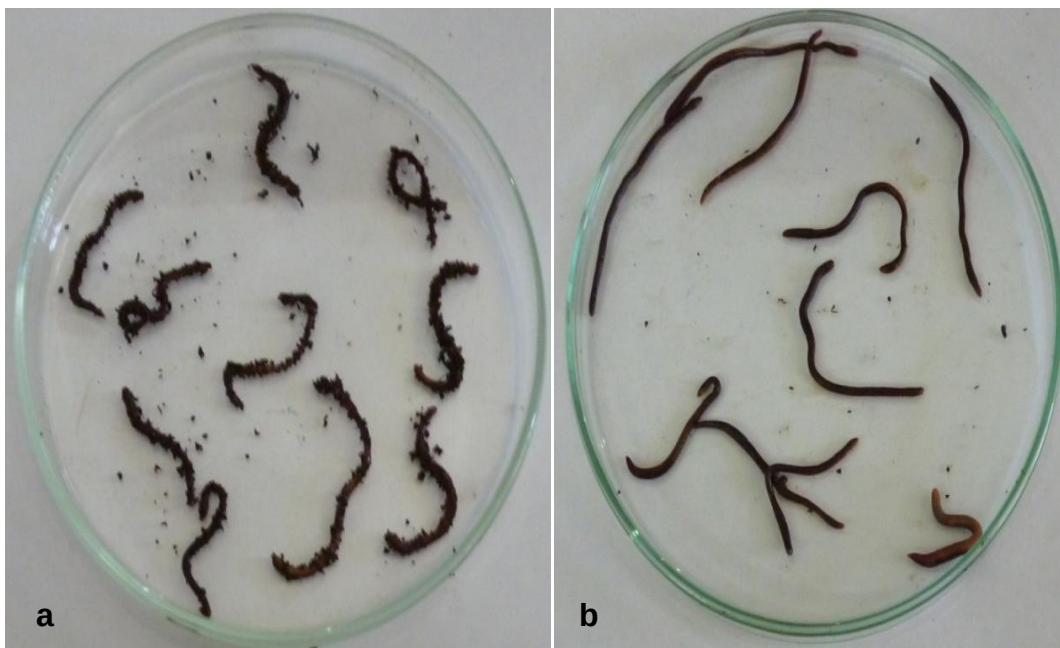


Figura 22. Estado de las lombrices adultas no cliteladas de *Eisenia andrei* en los tratamientos A-100-5 (a) y SA-100-5 (b) a los 120 días de evaluación.

Durán y Henríquez (2009) exponen que aspectos como el crecimiento y reproducción de la lombriz están íntimamente relacionados con el tipo de sustrato en el cual viven y se desarrollan. En este mismo sentido, Aira *et al.* (2007), mencionan que cualquier factor de estrés en el medio o sustrato de crianza se traduce en una elevación de la tasa metabólica de la lombriz, acrecentando el gasto energético y generando una reasignación de

recursos que podría estar enfocado en su permanencia con vida y quizás en su crecimiento corporal en detrimento de la reproducción.

En cuanto a la relación de humedad, es importante mencionar que investigaciones realizadas por Hernández *et al.* (2006), refieren que la producción de cocones se efectúa entre los 65 y 70 % de humedad, y que por encima de los 70 % no se observaban; no obstante, concluyen, que el porcentaje de humedad requerido para la producción y puesta de cocones, necesariamente, no es el mismo para la formación y desarrollo de la estructura clitelar. Por ello, y debido a los resultados obtenidos en esta investigación, se infiere que contenidos de humedad por debajo del 60 % afectan solo el desarrollo y formación del clitelo.

Resultados con espirulina en polvo

Aspectos morfológicos y color de *E. andrei*

El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre la fuente de alimentación suministrada en lombrices de *E. andrei*. En este sentido, la cantidad de lombrices inoculadas (25 lombrices) inicialmente fue incrementada alrededor de un 10 % en la mayoría de los lombricarios expuestos a contenidos de agua y espirulina en polvo en diferentes dosis (dosis baja: DBS; dosis media: DMS y dosis alta: DAS). No obstante, la dinámica poblacional registrada en los lombricarios expuestos al tratamiento DAS y DBS variable, puesto que el número de lombrices decae y asciende hasta la finalización de la investigación (75 días); comportamiento totalmente contrario al resto de los tratamientos, donde a partir de los 45 días después de la inoculación se muestra aparentemente una estabilización, sugiriendo una adaptabilidad a la nueva fuente de nutrientes (Figura 23).

En cuanto, a la biomasa (g) total del conjunto de lombrices registrada quincenalmente, se tiene que pasado 15 días de exposición a los diferentes tratamientos las lombrices manifiestan una respuesta satisfactoria, mostrando incrementos de hasta 2 g con respecto a las biomásas totales iniciales; sin embargo, a partir de 30 días estos presentan una drástica

disminución, tendencia que se mantiene hasta la finalización del ensayo experimental (Figura 23).

Destaca el hecho que, aunque estadísticamente no se evidencio diferencias entre los tratamientos evaluados, la biomasa de las lombrices expuestas a una dosis media de espirulina (1,5 g), mostró posiblemente una mayor adaptabilidad, puesto que durante todo la etapa evaluativa el número de lombrices encontradas se mantuvo equilibrada y constante; esto permitiría deducir que cantidades inferiores o superiores a estas dosis son nocivas para el desarrollo de *E. andrei*, debido a la carencia o exceso de nutrientes, especialmente de proteínas.

Si bien es cierto que el aumento observado inicialmente en la biomasa corporal del conjunto de lombrices puede deberse a una respuesta inmediata como consecuencia al cambio de alimentación, la posible limitación de nutrientes aunado a la densidad poblacional podría explicar la disminución de la biomasa corporal. El hecho que el suministro inicial de los tratamientos incrementara considerablemente la biomasa corporal durante los primeros 15 días, permite suponer que la alimentación con espirulina en polvo, posiblemente, si tiene un efecto positivo; sin embargo, su posterior suministro debe corresponder con la densidad población. Hernández *et al.* (2009) indican que el incremento en el número de lombrices, y por ende, una alta densidad poblacional exige y requiere la reposición frecuente de alimentos, estos animales de manera individual consumen diariamente el 100 % de su biomasa corporal.

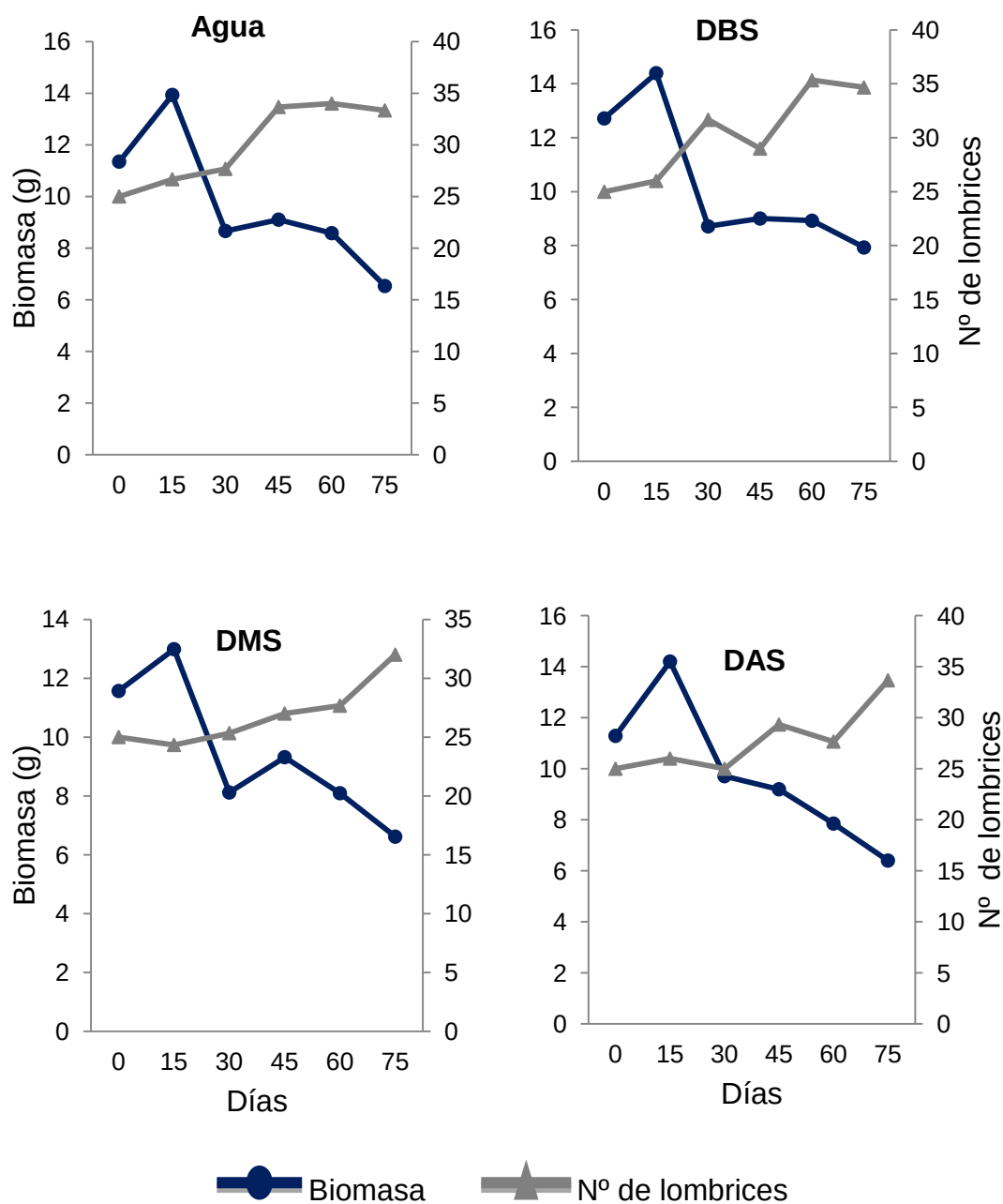


Figura 23. Biomasa (g) y número de lombrices (*Eisenia andrei*) presentes en unidades experimentales tratadas con diferentes contenidos de espirulina (*Arthrospira maxima*) en polvo. DAS: dosis alta de espirulina; DMS: dosis media de espirulina; DBS: dosis baja de espirulina. Promedios de tres repeticiones.

Por su parte, las dimensiones corporales (longitud y diámetro) de la lombriz *E. andrei* no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Pasados los primeros 15 días de evaluación los valores para la longitud y diámetro oscilaron entre los 60 - 70 mm y 2,5 - 3 mm, respectivamente, de tal modo, que pueden ser consideradas medidas

típicas para la especie; no obstante, en los días subsiguientes estas manifestaron un comportamiento diminutivo hasta la finalización de la investigación, alcanzando medidas alrededor de los 50 mm y 2 mm en cada caso. Es importante destacar, que en esta ocasión se decidió no realizar las medidas iniciales para evitar estrés añadido, lo cual pudo incidir en la respuesta inmediata al cambio de alimento (Figura 24).

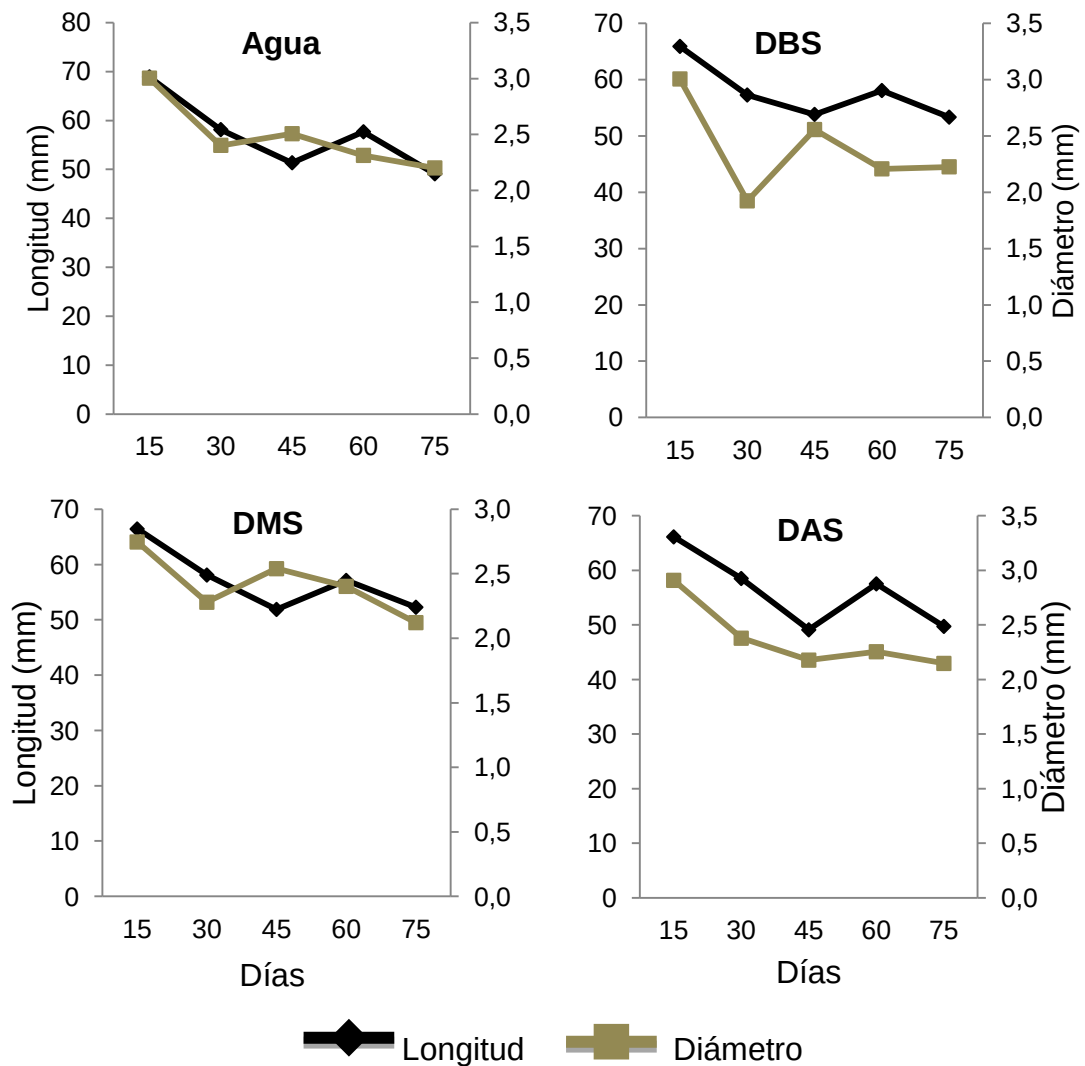


Figura 24. Longitud y diámetro (mm) de las lombrices (*Eisenia andrei*) presentes en unidades experimentales tratadas con diferentes contenidos de espirulina (*Arthrospira maxima*) en polvo. DAS: dosis alta de espirulina; DMS: dosis media de espirulina; DBS: dosis baja de espirulina. Promedios de tres repeticiones.

Las medidas de longitud obtenidas para *E. andrei* en esta investigación se encuentran entre el rango de valores ya reportados por Morales-Valdés y Calero (2008); Juárez-Urbe (2010); Ccasani-Mulato y

Pomo-Enríquez (2012) para otras especies de *Eisenia*. En cambio, los datos publicados para diámetros corporales son muy escasos, teniendo que Morales-Valdes y Calero (2008) aluden medidas estándares entre 3-5 mm, superiores a las observadas en este trabajo. Estos señalamientos permiten conjeturar que el abastecimiento de espirulina como fuente alimentación para *E. andrei*, se debe disponer en su forma sólida, es decir, en polvo, de no ser así la condición corporal se ve afectada drásticamente como lo indican los resultados obtenidos empleando suspensiones de espirulina.

En cuanto a la tonalidad de coloración y condición estética de los ejemplares evaluados, se detalló que durante esta fase de evaluación, la coloración varía con respecto al tiempo de exposición en ejemplares alimentados con *A. maxima* en polvo, y aunque se observaron ejemplares con un cambio de tonalidad intensa a partir de los 30 días de exposición, estos permanecieron relucientes y totalmente brillosos. Los expuestos solo a agua no presentaron esa variación, de hecho la coloración observada fue la reportada como típica (Tabla 5).

Tabla 5. Intensidad de coloración en las lombrices experimentales de *Eisenia andrei* con respecto al tiempo de exposición a la alimentación con *Arthrospira maxima* y agua.

Tratamientos	15 días	30 días	45 días	65 días	75 días
Agua	*	*	*	*	*
Dosis baja (0,5 g)	*	*	**	***	***
Dosis media (1,5 g)	*	**	**	***	***
Dosis alta (2,5 g)	*	**	***	***	***

*: típica; **: mediano-oscuro; ***: muy oscuro.

Al parecer, el suministro de espirulina en polvo, a pesar de no afectar dramáticamente la refulgencia de los ejemplares, si afecta su tonalidad

(figuras 25 y 26). Esta afectación en la coloración puede deberse al alto contenido de pigmento que posee esta microalga, especialmente de carotenoides (xantofila y carotenos), se estima que la concentración de carotenoides puede estar alrededor de los 2,9-4,3 g por kg de peso seco (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006), afirmando así que la intensidad en la coloración observada en los ejemplares de *E. andrei* empleando suspensiones de *A. maxima* está relacionada al suministro de espirulina y no al deterioro de los organismos.

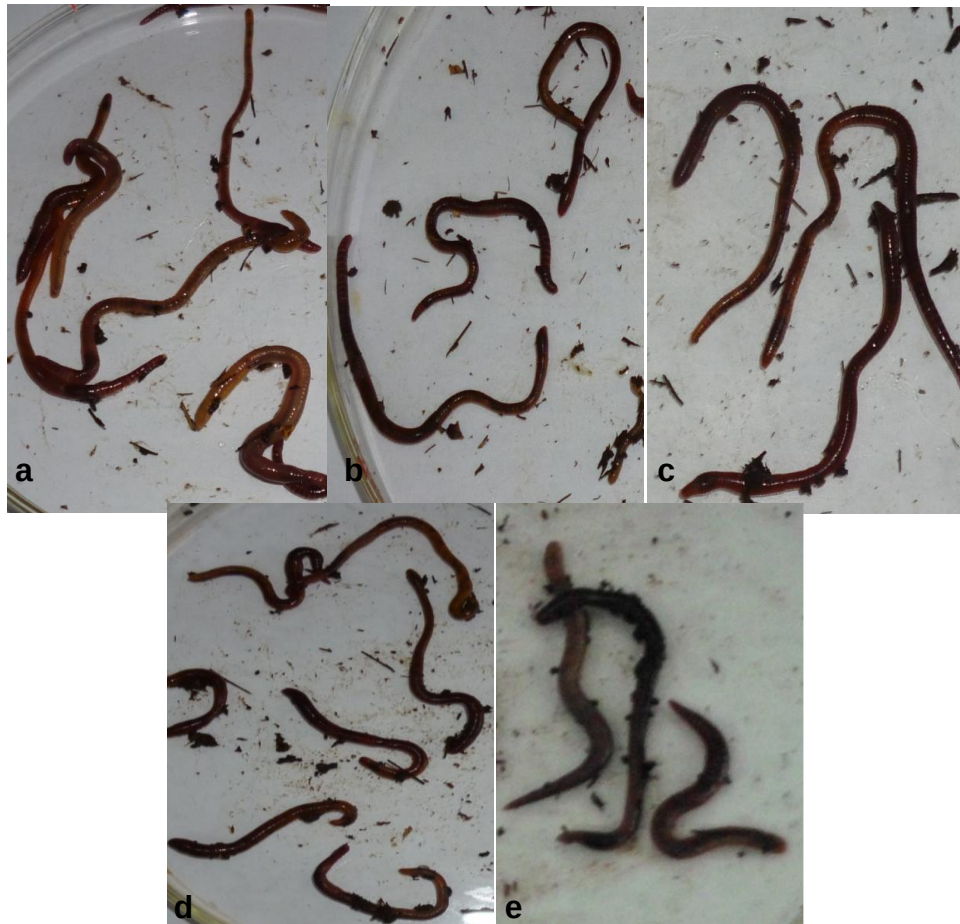


Figura 25. Evolución de la tonalidad de coloración en ejemplares de *Eisenia andrei* alimentados con *Arthrospira maxima* en polvo. a: 15 días; b: 30 días; c: 45 días; d: 60 días; e: 75 días.

Estos resultados coinciden con lo señalado por Díaz-Lozano y León (2014), quienes manifiestan que el suministro de espirulina como suplemento nutritivo intensifica la coloración de alevinos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mikyss*). De hecho, la intensificación de coloración como efecto secundario del consumo de espirulina no solo ha sido reportada para

los ejemplares o animales directamente, sino también en los productos derivados de estos, como el caso de la intensificación de la yema de huevo en gallinas ponedoras (Mariey *et al.*, 2012).

La intensificación de coloración puede llegar a ser un factor positivo, no solo para la visión del consumidor sino también para los criadores, esto le pudiera permitir al criador estimar el estado de salud de los organismos. Sin embargo, la coloración intensa en la lombriz *E. andrei* puede ser inoportuno, ya que al tonarse a una coloración diferente sin llegar a verse negro, puede acarrear pérdidas en su valor económico, por la posible confusión y duda de certificación de especie; aunque, esta intensidad de coloración pudiere mejorar su adaptación a la exposición solar, debido a alta concentración de pigmentación.



Figura 26. Intensa coloración en las lombrices (*Eisenia andrei*) como efecto secundario del consumo de espirulina (*Arthrospira maxima*) en polvo.

Reproducción de *E. andrei*

La figura 27 corresponde a la concurrencia de los distintos estadios vitales de las lombrices a los 75 días de evaluación. Se observó una mayor presencia de lombrices adultas no cliteladas con promedios entre 25 y 27 por cada tratamiento, seguidamente de crías con tamaños de 2-3 mm y lombrices juveniles (Figura 28), sin variar entre tratamientos evaluados,

incluyendo la aplicación de agua únicamente, razón por la cual el análisis estadístico (ANOVA simple) no develó diferencias significativas entre los mismos.

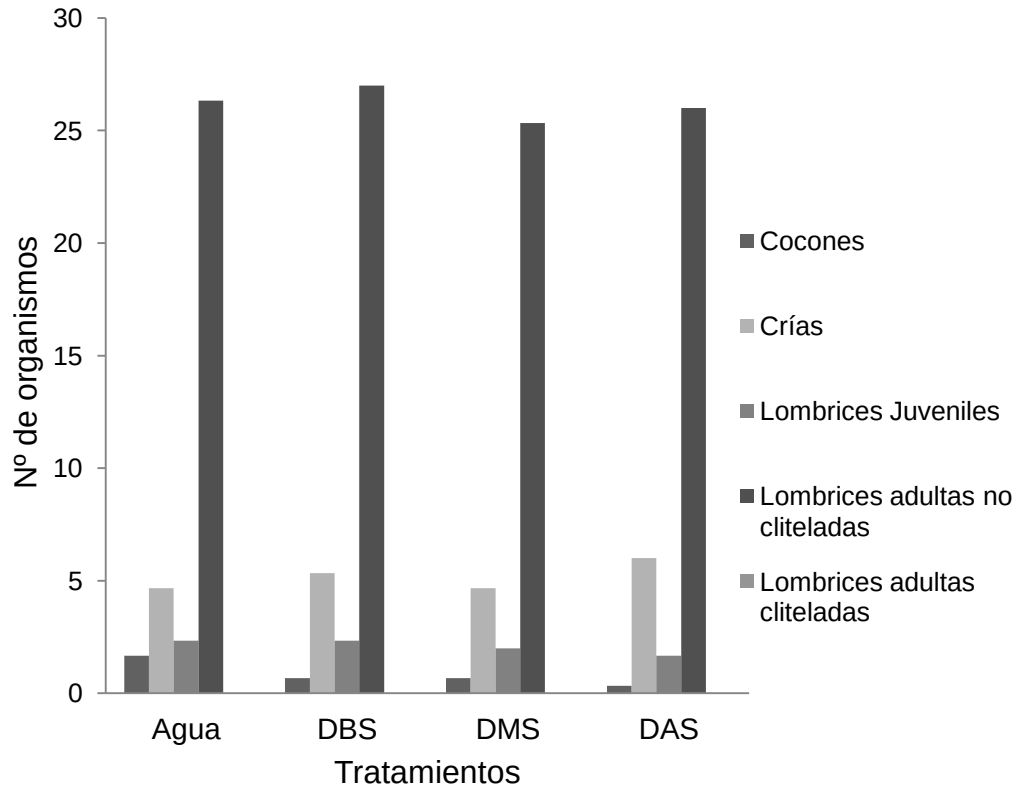


Figura 27. Distintos estadios vitales de *Eisenia andrei* a los 75 días de tratamiento con diferentes dosis de *Arthrospira maxima* en polvo. Promedio de tres repeticiones, DBS: dosis baja de espirulina; DMS: dosis media de espirulina; DAS: dosis alta de espirulina.

Acosta-Durán *et al.* (2013) apuntan que las características biológicas de la especie influyen en la capacidad de las lombrices para reproducirse, por lo que es posible que en un principio hayan tenido la capacidad de reproducirse normalmente, disminuyendo en días y/o semanas posteriores. Otra de las posibles razones por las cuales se pudo visualizar una baja proporción de cocones en los distintos lombricarios experimentales, es sin duda la disponibilidad de alimento. Al respecto, Hernández *et al.* (2009) afirman que la limitación de alimento no solo afecta el crecimiento y desarrollo de *E. andrei* sino también la producción de huevos, argumento que además puede explicar el por qué de la considerable cantidad de crías y lombrices juveniles que aun pasado un tiempo superior a 60 días no alcanzaron su tamaño y estado reproductivo. Santamaría-Romero y Ferrera-

Cerrato (2002) también mencionan que la reproducción de la lombriz, así como su desarrollo y otras condiciones fisiológicas, se encuentran influenciados por la temperatura y demás factores medio-ambientales difícilmente controlables en esta investigación y que debieron influenciar de igual manera a todos los tratamientos.



Figura 28. Crías (a), lombrices juveniles (b) y adultas no cliteladas (c) encontradas en los lombricarios experimentales de *Eisenia andrei* a los 75 días de tratamientos con polvo de *Arthrospira maxima*. El asterisco (*) señala la cría y la flecha indica las lombrices juveniles.

A pesar que los resultados obtenidos en referencia a la incorporación de espirulina bien sea en su forma de suspensión (sin medio nutritivo) o en polvo como alimentación cotidiana a ejemplares de *E. andrei* no evidenciaron mayores cambios y/o alteraciones, son levemente superior al tratamiento control (agua), atribución que deja entre ver una alta expectativa a su potencial uso como alimentación alternativa, que entre otras cosas garantizaría lombrices higienizadas que promuevan un eficiente rendimiento en los lombricarios y, por lo tanto, una producción óptima de abonos (humus o vermicopost), e incluso, de productos de carácter alimenticios calificados para ser aprovechados por la sociedad.

CONCLUSIONES

El suministro del bagazo de caña de azúcar, mezcla de gallinaza y agua y el lixiviado fresco de materiales hortícolas como fuentes de alimentación preliminar para *Eisenia andrei* promueve su proliferación y el desarrollo de las estructuras reproductivas.

Los ajustes al medio Zarrouk (1966) y las condiciones de iluminación y aireación sobre el cultivo de *Arthrospira maxima*, así como la implementación de un sistema de separación al vacío utilizando una doble malla-filtro de nilón con diámetro de poro de 10-12 μm y jeringa de 60 ml, resultaron suficientes para la multiplicación y cosecha de esta microalga, obteniendo una productividad de $0,267 \pm 0,018$ g de biomasa por litro de cultivo.

Las sales acompañantes en la suspensión de espirulina con su medio original de cultivo son adversas para la supervivencia de *E. andrei*.

Las deficiencias en el volumen y frecuencia de hidratación son determinantes para el desarrollo, crecimiento y reproducción de *E. andrei*, e inclusive, letales a corto y mediano plazo.

La incorporación adicional de espirulina como fuente de alimentación intensifica la coloración típica de *E. andrei*.

La adicción de contenidos sólidos de espirulina genera respuestas inocuas, es decir, no perjudiciales en el crecimiento y reproducción de *E. andrei*.

RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones, sería prudente y propicio aumentar la frecuencia y/o reposición de la fuente suplementaria de nutrientes (espirulina en polvo) con el fin de evitar la competencia por alimento; así como la periodicidad en el muestreo de cocones, lombrices recientemente emergidas y juveniles, ya que se pueden mejorar los estimados en la tasa de reproducción. Complementar la información con un análisis del sustrato de crianza (temperatura, pH, conductividad eléctrica, entre otros factores) y evaluación de la calidad de la lombriz, en términos de contenido proteico, impulsando su eventual empleo como suplemento nutritivo.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Acién, F., Fernández, J., Magán, J. y Molina, E. 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances*, 30: 1344–1353.
- Acosta-Durán, C., Solís-Pérez, O., Villegas-Torres, O. y Cardoso-Vigueros. 2013. *Agronomía Costarricense*, 37 (1): 127-139.
- Aira, M., Domínguez, J., Monroy, F. y Velando, A. 2007. Stress promotes changes in resource allocation to growth and reproduction in a simultaneous hermaphrodite with indeterminate growth. *Biological Journal of the Linnean Society*, 91: 593-500.
- Arango, J. y Díaz, D. 2010. Evaluación de la reproducción y desarrollo de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) y componentes físico-químicos de lombricompost con la utilización de tres tipos (3) de sustratos. Trabajo de grado. Unidad de Ciencia y Tecnología. Instituto técnico Agrícola, Guadalajara, México. 34p.
- Bacha, F. 2015. Las algas en la alimentación animal: rumiantes. Recuperado de: <https://nutricionani-mal.info/el-uso-de-las-algas-en-alimentacion-animal-rumiantes>.
- Belay, A. 2002. The potencial application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as nutritional and therapeutic supplement in health management. *The Journal of the American Nutraceutical Association*, 5 (2): 27-48.
- Belay, A. 2008. *Spirulina* (*Arthrospira*): Production and quality assurance. En: *Spirulina in Human Nutrition and Health*. Gershwin, M y Belay, A. (eds).
- Boulogne, S., Márquez, E., García, Y., Medina, A. y Cayot, P. 2008. Optimización de la operación del secado de la carne de la lombriz (*Eisenia andrei*) para producir harina destina al consumo humano. *Revista Ciencia e Ingeniería*, 29 (2): 91-96.
- Cárdenas, J., Díaz, M. y Vizcaíno, M. 2010. Industrialización del alga *Spirulina*. *ReCiTeIA*, 10 (1): 1-41.
- Carvajal, J. y Mera, A. 2010. Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Producción + Limpieza*, 5 (2): 77-96.
- Ccasani-Mulato, N. y Poma-Enríquez, A. 2012. Evaluación de la densidad poblacional; peso y longitud de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetidia*) alimentadas en estiércol y compost de bovino y ovino". Trabajo de grado. Faculta de Ciencias de Ingeniería. Universidad Nacional de Huancavelica, Huancavelica, Perú. 49p.
- Chamorro, G., Salazar, M., Gomes, K., Pereira, C., Ceballos, G. y Fabiola, L. 2002. Actualización en la farmacología de *Spirulina* (*Arthrospira*), un alimento no convencional. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52 (3): 232-240.

- Chen, Y., Yeh, K., Aisyah, R., Lee, D. y Chang, J. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102: 71–81.
- Ciferri, O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiological Reviews*, 47(4): 551-578.
- Corrales, L. y Muñoz, M. 2012. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Ciencias Biomédicas*, 10:(18): 135 – 250.
- De Lara, R., Castro, T. y Castro, J. 2005. La importancia de la *Spirulina* en la alimentación acuícola. *ContactoS*, 57: 13-16.
- De Sanzo, C. y Ravera, A. 1999. Como criar lombrices roja californiana. Recuperado de: http://www.bajatec.net/pdfs/manual_lombricultura.pdf
- Díaz- Lozano, J. y León, J. 2014. Utilización de espirulina (*Spirulina maxima*) en la alimentación de alevinos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mikyss*). Trabajo de grado. Faculta de Ciencias Pecuaría Universidad La Salle, Bogotá, Colombia. 64p.
- Domínguez, J y Gómez-Brandón, M. 2010. Ciclos de vida de las lombrices de tierra aptas para el vermicompostaje. *Revista Zoológica Mexicana*, 2: 309-320
- Domínguez, J. 2004. *State-of-the-art and new perpestives on vermi-composting research*. En: Eduards, C. (ed). 2^{da} edición. *Earthworm ecology*. CRC Press, España. 401-424 (pp).
- Domínguez, J. y Pérez-Losada, M. 2010. *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) y *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) son dos especies diferentes de lombrices de tierra. *Acta Zoológica Mexicana*, 2: 321-331.
- Durán, L. y Henríquez, C. 2009. Crecimiento y reproducción de la lombriz roja (*Eisenia foetida*) en 5 sustrato orgánicos. *Agronomía Costarricense*, 33 (2): 275-281.
- FAO, 2013. *Manual de compostaje del agricultor: Experiencias en América Latina*, Santiago de Chile, Chile. 108 p.
- Flotats, X., Foged, H., Blasi, A., Palatsi, J., Magri, A y Schelde, K. 2011. *Manure Processing Activities in Europe* - Project reference: ENV.B.1/ETU/2010/0007 Manure Processing Technologies. Technical Report 2, European Commission, Directorate-General Environment, 184 p.
- Fox, R. 1996. *Spirulina: Production & Potential*. *Edisud*. 232 p.
- Fuentes, J. 1987. *La crianza de la lombriz roja*. Rivadeneyra, S.A., Madrid, España. 28 p.
- Gaitero- Álvarez, A., Villicaña, E., Paredes, J. y Xiberta, J. 2012. Biofijación de CO₂ mediante el cultivo de algas. Diseño de un prototipo de fotobiorreactor para el cultivo de "*Spirulina platensis*". 25 p.

- Grima, E., Belarbi, E., Ación, F., Robles-Medina, A. y Chisti, Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20: 491–515.
- Harun, R., Singh, M., Forde, G. y Danquah, M. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 1037-1047.
- Henrikson, R. 2009. Earth food *Spirulina*. Recuperado de: <http://www.spirulinas-ource.com/PDF.cfm/EarthFoodSpirulina.pdf>
- Hernández, J., Contreras, C., Palma, R., Sarria, J. y Pietrosevoli, S. 2002. Efectos de los restos de la palma aceitera sobre el desarrollo y reproducción de la lombriz roja (*Eisenia* spp). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 19: 304-311.
- Hernández, J., Mavarez, L., Romero, E., Ruíz, J. y Contreras, C. 2003. Altura del cantero en el comportamiento de la lombriz roja (*Eisenia* spp) bajo condiciones cálidas. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20: 320-327.
- Hernández, J., Pietrosevoli, S., Faría A., Palma, R. y Canelón, R. 2009. Efecto de la frecuencia de alimentación en el crecimiento y la reproducción de la lombriz *Eisenia* spp. *INTERCIENCIA*, 34 (4): 270-273.
- Hernández, J., Pietrosevoli, S., Faría, A., Canelón, R., Palma, R. y Martínez, J. 2006. Frecuencia de riego en el crecimiento de la lombriz (*Eisenia* spp) y caracterización química del vermicompost. *Revista UDO Agrícola*, 6 (1): 20-26.
- Holman, B. y Malau-Aduli, A. 2012. Spirulina as a livestock supplement and animal feed. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97: 615-623.
- Hurachi-Olivera, R., Yapo-pari, U., Dueñas-Gonza, A., González-Juárez, R., Condori-Huamanga, J., Pacheco-Salazar, D. y Soto-Flores, J. 2014. Adaptabilidad de Spirulina (*Arthrospira platensis*) (Cyanophyta) en fotobiorreactor tubular cónico bajo condiciones ambientales. *IDESIA*, 33 (1): 103-112.
- IIMSAM, 2010. Qué dice la ONU sobre la Espirulina. Recuperado de: <http://iimsam.org/images/circulars/spanish/FOLLETO%20PUBLICITA RIO%20DEL%20IIMSAM%20VERSION%202010.pdf>
- Jourdan, JP. 2011. *Manuel de culture artisanale de spiruline*. 223 p.
- Juárez-Urbe, R., 2010. Reciclaje de lodos residuales de la industria del papel mediante lombricultura utilizando la especie "Lombriz roja californiana" *Eisenia foetida*. Trabajo de grado. Escuela de Ciencias ambientales. Universidad Agraria La Molina, Lima, Perú. 81p.
- Lee, K. 1985. Earthworms. Their ecology and relationships with soils and land use. Academic Press. Sydney, Australia 411 p.

- León, S., Villalabos, G., Fraile, J. y González, N. 1992. Cultivo de lombrices (*Eisenia foetida*) utilizando compost y excretas de animales. *Agronomía Costarricense*, 16 (1): 23-28.
- López-Jiménez, M., Hernández-Sánchez, M. y Elorza-Martínez, P. 2014. Evaluación de la densidad de población de la lombriz compostera (*Eisenia andrei* Savigni). *Revista UDO Agrícola*, 3 (1): 12-16.
- Loza, J. 2007. La lombriz de tierra, *Eisenia andrei* (Bouché 1972) como bioaculador de metales pesados (Pb) durante la transformación de los desechos orgánicos de Guadalajara, Jalisco, México. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México. 146p.
- Mamani-Mamani, G., Mamani-Pati, F., Sainz-Mendoza, H. y Villca-Huanaco, R. 2012. Comportamiento de la lombriz roja (*Eisenia* spp.) en sistemas de vermicompostaje de residuos orgánicos. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 3 (1): 44-54.
- Malgas, 2013. Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. AST Ingeniería S.L., Asturias, España. 69 p.
- Mariey, Y., Samak, H. y Ibrahim, M. 2012. Effect of using *spirulina platensis* algae as a feed additive for poultry diets: 1- productive and reproductive performances of local laying hens. *Egyptian Poultry Science Journal*, 32 (1): 201-215.
- Martínez-García, L. 2008. Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas. Trabajo de grado. Área de ingeniería química. Universidad de León, Cuidad de León, España. 209p
- Martínez, A. 2011. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Trabajo de grado. Facultad de ingeniería hidráulica y medio ambiental. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España. 93p.
- Morales-Valdés, A. y Calero, B. 2008. La lombriz de tierra y la práctica de la lombricultura en Cuba. Recuperado de: <https://www.yumpu.com/es/document/-view/14512021/la-lombriz-de-tierra-y-la-practica-de-la-lombricultura-en-cuba>
- Pedraza, G. 1989. Cultivo de *Spirulina maxima* para suplementación proteica. *Livestock Research For Rural Development*, 1 (1): 1-6.
- Pineda, J. 2006. *Lombricultura*. UAP-PASOLAC-Honduras, Tegucigalpa, Honduras. 38 p.
- Piñeiro D., Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha O. y R. Salas L. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aspectos y perspectivas en México. En: Soberón, J., G. Halffter y J. Llorente-Bousquets (comps.). Capital natural de México, Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio. México, D. F., México. 415-435 (pp).

- Ponce, E. 2013. Superalimento para un mundo en crisis: *Spirulina* a bajo costo. *IDESIA*, 31 (1): 135-139.
- Ramírez-Moreno, L. y Olvera-Ramírez, R. 2006. Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia*, 31 (9): 657-663.
- Reynolds, J. y Wetzel, M. 2010. *Nomenclatura Oligochaetologica. Supplementum Quartum*. A catalogue of names, descriptions and type specimens of the Oligochaeta. Illinois Natural History Survey Special Publication. Chicago, EE.UU.
- Rincón, D., Velasquez, H., Dávila, M., Semprum, A., Morales, E. y Hernández, J. 2012. Niveles de sustitución de harina de pescado por harina de *Arthrospira* (= *Spirulina maxima*), en dietas experimentales para alevines de tilapia roja (*Oreochromis* sp). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25: 430-437.
- Rodríguez, A. y Triana, F. 2006. Evaluación del pH en el cultivo de *Spirulina* spp. (= *Arthrospira*) bajo condiciones de laboratorio. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. 62p.
- Rojas, E., Ávila, M. y Parada, G. 2012. Aplicación de estrategias nutricionales y su efecto en el crecimiento en el cultivo continuo de *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40 (3): 763-771.
- Samarriba, R. y Guzmán, F. 2004. *Guía de lombricultura*. Managua, Nicaragua. 18 p.
- Sánchez, M., Bernal, J., Roza, C., Rodríguez, I. 2003. *Spirulina* (*Arthrospira*): An edible microorganism: a review. *Universitas Scientiarum*, 8 (1): 7-24.
- Santamaría-Romero, S. y Ferrera-Cerreto, R. 2002. Dinámica poblacional de *Eisenia andrei* (Bouché 1972) en diferentes residuos orgánicos. *Terra Latinoamericana*, 20 (3): 303-310.
- Schuldt, M., Christiansen, R., Scatturice, L. y Mayo, J. 2007. Lombricultura. Desarrollo y adaptación a diferentes condiciones de temperie. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 8 (8): 1-10.
- Schuldt, M. 2006. *Lombricultura, teoría y práctica*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 307p.
- Shahmansouri, M., Pournoghadas, H., Parvaresh, A. y Alidadi, H. 2005. Heavy metals bioaccumulation by iranian australian earthworms (*Eisenia fetida*) in the sewage sludge vermicomposting. *Journal of Enviromental Health Science and Engineeing*, 2 (1): 28-32
- Shamosh, S. 2009. Historia, nutrición, salud y ecología para generar estrategias de comunicación sobre la espirulina (*Arthrospira maxima*). Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, DF. México. 89 p.

- Toccalino, P., Agüero, M., Serebrinski, C. y Roux, J. 2004. Comportamiento reproductivo de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) según estación del año y tipo de alimentación. *Revista Veterinaria*, 15 (2): 65-69.
- Tomaselli, L. 1997. Morphology, Ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. En: *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) physiology, cell-biology and biotechnology. Vonshak, A. (ed).
- Vargas-Machuca, R., Domínguez, J. y Mato, S. 2008. *Vermicompostaje*. En: *Compostaje*. Moreno, J. y Moral, R. (eds.). Edic. Mundi-Prensa, Barcelona, España. 189-207.
- Vielma, R. y Medina, A. 2006. Determinación de la composición química y estudios de solubilidad en la harina de lombriz *Eisenia foetida*. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 48 (1): 2-8.
- Vielma, R., Ovalles, J., León, A. y Medina, A. 2003. Valor nutritivo de la harina de lombriz (*Eisenia foetida*) como fuente de aminoácidos y su estimación cuantitativa mediante cromatografía en fase reversa (HPLC) y derivatización precolumna con o-ftalaldehído (OPA). *Ars Pharmaceutica*, 44 (1): 43-48.
- Vonshak, A. 1997. *Spirulina*: Growth, physiology and biochemistry. En: *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) physiology, cell-biology and biotechnology. Vonshak, A. (ed).
- Vonshak, A. y Guy, R. 1992. Photoadaptation, photoinhibition and productivity in the blue green alga, grown outdoors. *Plant, Cell & Environment*, 15: 613-616.
- Wu, H., Geo, K., Villafañe, V., Watanabe, T. y Walter-Helbling, E. 2005. Effects of solar UV radiation on morphology and photosynthesis of filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 5004- 5013.
- Zarrouk, C. 1966. Contribution l'étude d' ue cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croisse et la photosynth se de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Universidad de París, Francia, 41p.

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	MORFOMETRÍA Y REPRODUCCIÓN DE <i>Eisenia andrei</i> (Bouché 1972) BAJO ALIMENTACIÓN SUPLEMENTADA CON <i>Arthrospira maxima</i> (Setchell & Gardner 1917)
Subtítulo	

Autor (es):

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Andrade G., Amarilis A.	CVLAC	23 702 970
	e-mail	amarilisandrade160694@gmail.com
	e-mail	amarilis_1606@hotmail.com
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Arthrospira maxima</i>
<i>Eisenia andrei</i>
Suplemento dietético

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Biología

Resumen (abstract):

Eisenia andrei (lombriz roja californiana) es una especie de anélido de interés biotecnológico para la transformación eficiente de la materia orgánica (vermicompostaje) y también es aprovechada como recurso alimentario. En cautividad, se le proporciona una dieta de residuos agroindustriales y estiércoles, los cuales contienen agroquímicos, cadaverinas, putresinas, metales pesados, etc., que se acumulan y pueden resultar desfavorables para estos anélidos u otros organismos en la cadena trófica. Por otra parte, *Arthrospira maxima* (espirulina) es una microalga de alto valor nutracéutico, indicada como alternativa alimentaria para humanos y especies pecuarias. En este sentido, el propósito de esta investigación fue evaluar los efectos de rutinas dietéticas a base de *A. maxima* sobre la lombriz roja californiana (*E. andrei*). Para ello, se requirió desarrollar inicialmente protocolos de conservación de los anélidos y del cultivo experimental de la microalga. Se utilizaron ejemplares de *E. andrei* obtenidos en lombricarios de 1,2x1,8x0,5 m con 10.000 lombrices/m² y con aplicaciones semanales de una mezcla de materiales orgánicos constituida por 50 l de bagazo de caña de azúcar triturado, 3,5 l de gallinaza y 80 l de un lixiviado de la degradación inmediata de restos hortícolas. La microalga fue cultivada en envases de 40 l y 5 l, modificando la solución nutritiva original de Zarrouk (1966) y en condiciones de laboratorio (22-26 °C, 3.000-5.000 lux/12 h y 8 l de aire/min). Se realizaron dos ensayos; para un primer ensayo, se aplicó un diseño factorial de tres suspensiones; estas incluyeron espirulina en su medio de cultivo (SM) neutralizadas con HCl: espirulina en su medio de cultivo (SM), espirulina resuspendida en agua (SA) o solo agua (A): dos volúmenes: 50 v 100 ml; v dos frecuencias de aplicación: cada 5 o 10 días, sobre 50 lombrices en 970 ml de sustrato 1:1 original del lombricario/aserrín de coco, en tres repeticiones por unidad experimental; para el segundo v último ensayo experimental se suministró tres dosis de espirulina en polvo: dosis baja, media v alta (0.5: 1.5 v 2.5 g respectivamente) sobre 25 lombrices en 500 ml de sustrato original de los lombricarios. Para la cosecha de la biomasa microalgal se desarrolló un sistema de filtración al vacío, empleando una doble malla-filtro con un diámetro de poro de 10-12 µm y una jeringa de 60 ml, logrando una separación efectiva de biomasa (0,267 ± 0,019 g/l). Se evidenció que el remanente de sales en el medio de cultivo (SM), la frecuencia v volumen de aplicación fueron determinantes en la sobrevivencia, desarrollo v reproducción de *E. andrei*, razón por la cual se presentaron interacciones significativas de estas fuentes de variación con la mayoría de las variables evaluadas. En contraste, la adición de espirulina aislada (SA) resultó ligeramente superior sobre las variables estudiadas, pero estadísticamente similar al control (A). En un segundo ensayo, la incorporación de espirulina en polvo produjo diferencias no significativas entre las dosis evaluadas (0: 0.5: 1.5 v 2.5 g/l). Los resultados apuntan hacia el uso de biomasa fresca de espirulina con requerimientos adicionales de lavado y resuspensión en agua para la alimentación de *E. andrei*.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Imery B., José del V.	ROL	CA AS TU JU
	CVLAC	8 650 956
	e-mail	joseimery@gmail.com
	e-mail	
Véliz, José A.	ROL	CA AS TU JU
	CVLAC	7 711 312
	e-mail	velizja@gmail.com
	e-mail	
Marcano, Elena C.	ROL	CA AS TU JU
	CVLAC	14 670 813
	e-mail	elenamarcano_24@hotmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2018	08	03

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo (s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TA-AAAG.doc	Word 1997-2003

Alcance:

Espacial: Nacional (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado en Biología

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado

Área de Estudio: Biología

Institución (es) que garantiza (n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO DE SUCRE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

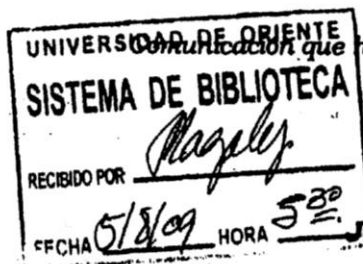
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUNELA
Secretario



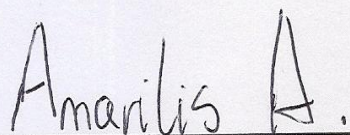
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/marija

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

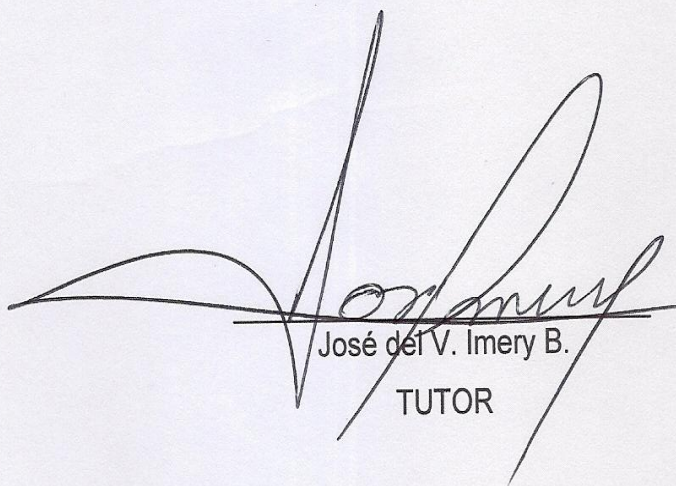
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



Amarilis A. Andrade G.

AUTORA



José del V. Imery B.

TUTOR