



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE BIOMASA MICROBIANA CON BAJO CONTENIDO DE CALCIO, A PARTIR DE UN SISTEMA DE TRATAMIENTO AERÓBICO DE NEJAYOTE"

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO
p r e s e n t a

HILDA ELIZABETH CALDERÓN VILLAGÓMEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



México, D. F.

1 9 9 0



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

		Pag
I.	INTRODUCCION	1
I.1	PROBLEMATICA	2
I.2	OBJETIVOS	4
I.2.1	OBJETIVOS GENERALES	4
I.2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	5
II.	GENERALIDADES SOBRE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES	6
II.1	REACTOR BIOLÓGICO ROTATORIO (RBR)	10
II.1.1	CARACTERÍSTICAS DEL RBR	10
II.1.2	CARACTERÍSTICAS DE LA BIOMASA MICROBIANA	11
II.1.2.1	Patrón de aminoácidos	11
II.1.2.2	Precipitación de las sales inorgánicas	17
III.	MÉTODOS Y MATERIALES	20
III.1	ESTABLECIMIENTO DEL RÉGIMEN PERMANENTE	23
III.2	ACONDICIONAMIENTO DE LA BIOMASA COLECTADA	24
III.3	ANÁLISIS QUÍMICOS DE LA BIOMASA	24
III.4	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE LA BIOMASA	25
III.5	PRUEBAS BIOLÓGICAS CON LA BIOMASA	25
III.6	PRUEBAS HISTOPATOLÓGICAS	27
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	28
IV.1	DETERMINACIONES QUÍMICAS	28
IV.2	DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS	30
IV.3	COMPARACION DE LOS PATRONES DE AMINOCIDOS DE BIOMASAS MICROBIANAS CON LOS ESTANDARES DE LA FAO Y DEL HUEVO	32
IV.4	EVALUACION PRELIMINAR DE LA BIOMASA CON BAJO CONTENIDO EN CALCIO EN RATAS DE LABORATORIO	39
IV.5	PRUEBAS HISTOPATOLÓGICAS	44

	Pag
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
V.1 CONCLUSIONES	46
V.2 RECOMENDACIONES	47
AGRADECIMIENTOS	48
BIBLIOGRAFIA	49
APENDICE A	53
APENDICE B	56

1. INTRODUCCION

El abastecimiento de agua en los asentamientos humanos, especialmente los más poblados, tales como la Ciudad de México y otras ciudades del país, es un problema que se acentúa considerablemente conforme la población, la industria y los servicios aumentan, dado que el agua es un bien indispensable en todos los sectores.

Toda industria grande o pequeña genera efluentes líquidos que varían en composición y volumen, dependiendo de la industria y proceso del cual provienen, que causan alteraciones en las características fisicoquímicas y biológicas del cuerpo receptor, sea éste sólido o líquido.

A nivel nacional, el 80% de la contaminación del agua proviene de la industria (SARH, 1984, en Pedroza-Islas, 1985). En el caso específico de la industria alimentaria, también se generan aguas de desecho contaminantes. Normalmente contienen cantidades considerables de materia orgánica biodegradable que hace que éstas puedan ser tratadas eficientemente por métodos biológicos. En general, su composición química es similar a la del alimento que se procesa, lo que permite una recirculación o reaprovechamiento de esos "desechos" produciendo una nueva materia prima para otro proceso o uso.

Entre las industrias de mayor importancia para México, dada su orientación de consumo, es la industria de la transformación del maíz constituida básicamente por establecimientos que procesan el grano mediante su molienda y/o nixtamalización para la obtención de insumos y bienes de consumo directo. El maíz es el principal cultivo nacional, representando aproximadamente el 23% del valor de la producción agrícola total. Es una de las actividades con mayor peso en el producto nacional bruto; absorbe el 45% de la superficie total destinada a la agricultura y genera ocupación para el 13% de la población económicamente activa (CONAIN, 1976, en Pedroza - Islas, 1985).

Esta industria se encuentra orientada a tres tipos de actividad: Elaboración y molienda de nixtamal (molinos urbanos y rurales), fabricación de harina precocida para tortillas (plantas procesadoras de maíz por métodos alcalinos) y fabricación de derivados del maíz que no involucran una cocción alcalina y que se subdivide en molienda húmeda (almidones, glucosas, etc.) y molienda seca (fabricación de hojuelas preparadas, frituras, botanas, etc.).

Actualmente, el consumo humano de maíz se realiza preferentemente a través de tortilla elaborado con nixtamal y harina, representando el 64.2% de la oferta comercial del grano, que en 1986 se estimó en 10.1 millones de toneladas (INEGI-SECOFI-SPP, 1988).

Los orígenes de todas las palabras usadas en el proceso de nixtamalización tradicional del maíz provienen del idioma náhuatl (Estrada y col, 1986). "Nixtamal" viene de "Nextli" = cenizas de cal y de "Tamalli" = maíz cocido, "Nejayote" viene de "Naxtli" = cenizas de cal, "Ayoj" = caldo o cosa aguada y "Atl" = agua. El proceso de nixtamalización se lleva a cabo de diversas formas, dependiendo de la cantidad y calidad o tipo de maíz que se desee nixtamalizar. Antiguamente el proceso se llevaba a cabo en grandes ollas o recipientes de barro ("nixcōmitl") y el producto se molía en el "metate". En la actualidad, este proceso se lleva a cabo en pequeños molinos para su consumo diario o en grandes plantas, para producir harinas precocidas estables.

La nixtamalización tradicional o precolombina puede describirse como una lixiviación en donde el grano integral de maíz es sometido a una cocción con agua e hidróxido de calcio, la cual se realiza a temperaturas que varían entre los 80 y 100°C y se lleva a cabo de la siguiente manera: 1) Limpieza del grano, 2) Nixtamalización, que consiste en la adición de agua de 2 a 4 veces el peso del maíz, calentar hasta ebullición, agregar de 0.5 a 1.5 % del peso del maíz de cal viva (hidróxido de calcio), agitando para obtener la lechada y mantenerlo a una temperatura entre 80 y 90°C durante 40 - 50 minutos, después de lo cual se deja reposar durante 14 horas sin calentamiento, en este tiempo el grano absorbe agua modificándose los carbohidratos y matrices proteicas de los almidones del endospermo. Por último, el grano es sometido a dos lavados con agua fresca, obteniendo así, por un lado, el grano que será sometido a una molienda en húmedo para obtener la masa y, por otro, el agua residual llamada nejayote.

Una descripción más detallada sobre los cambios que ocurren en la composición del maíz durante la nixtamalización pueden encontrarse en los trabajos realizados por Katz y col. (1974, en Pedroza, 1985).

1.1 PROBLEMÁTICA

La industrialización del proceso de nixtamalización es prácticamente reciente. Sin embargo, las variaciones comparando el proceso industrial con el precolombino son mínimas y únicamente involucran cambios en las condiciones de cocción (cantidad de agua y de cal) y reducciones en tiempo (de cocción y reposo), dando consumos menores de energía y agua, aunque las aguas residuales generadas son más concentradas en material orgánico e inorgánico, están a mayor temperatura cuando son arrojadas y tienen un pH bastante mayor.

Estas generalmente se desochan, vertiéndose a los drenajes, cuando éstos existen, o arrojándose directamente al entorno. Como ya se dijo, se conocen como nejayote, que significa agua de cal o caldo de cal. Su caudal es de aproximadamente dos a cinco unidades del volumen de grano cocido, dependiendo del proceso y tamaño del establecimiento que lo realiza.

El nejayote contiene altas concentraciones de materia orgánica en suspensión y disuelta (entre 5 y 50 g/l) y sale del proceso a muy alta temperatura (60 a 80°C) y con un pH cercano al límite máximo de alcalinidad (10 a 14). Dichas características hacen que los efluentes de molinos de nixtamal y de fábricas de harina de maíz nixtamalizado sean consideradas como altamente contaminantes. El nejayote presenta en solución o en suspensión pigmentos carotenoides, que son responsables de la coloración amarilla, hemicelulosos, carbohidratos solubles, proteínas y cal. Estos componentes, dada su alta concentración, constituyen los contaminantes de este tipo de agua de desecho.

De acuerdo a la información obtenida en 1986, la industria tradicional del maíz estaba integrada por 12,390 molinos, 10,642 tortilleras y 9,659 molino-tortilleras, distribuidos en todo el país. El 52.8 % del total de establecimientos estaban ubicados en el Distrito Federal, Área metropolitana de la Cuenca de México y los estados de Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Puebla y Veracruz. Esto, aunado a otras ramas industriales y asentamientos humanos, representa un problema para el abastecimiento de agua de estas zonas por el gran uso que se da de este recurso, así como para la disposición de sus efluentes en suelos y cuerpos hidráulicos naturales, alterando su ciclo biológico normal.

En forma general, el ciclo biológico del material biodegradable arrojado a cuerpos hidráulicos naturales se lleva a cabo por: bacterias (conversión de los compuestos orgánicos solubles en células bacterianas y compuestos inorgánicos) y algas (usan los compuestos inorgánicos para formar nuevas células). Las algas y bacterias, a su vez, son alimento para protozoarios, rotíferos y, finalmente, nemátodos y crustáceos, siendo éstos últimos consumidos por especies pequeñas de peces que son consumidos por peces mayores los cuales sirven de alimento para el hombre. Este, junto con la industria y animales en general, generan desechos líquidos que son vertidos a los cuerpos hidráulicos donde las bacterias metabolizan la materia orgánica y el ciclo se repite.

Los requerimientos de nutrientes (C,N,P) se basan comúnmente en la relación de la cantidad de carbono, de nitrógeno y de fósforo contenido en los medios de cultivo. Generalmente, el carbono se mide como una función de la demanda bioquímica de oxígeno en cinco días a 20°C y, para las aguas de desecho, se considera esa relación como la $DBO_5:N:P$. Una relación de $DBO_5:N:P$ de 100:5:1 se considera óptima para las funciones metabólicas celulares de las bacterias que metabolizan esa materia orgánica biodegradable. La deficiencia de alguno de los elementos de esta relación tiene efectos negativos sobre el crecimiento de la población microbiana (Benefield y Randall, 1980; Winkler, 1981; González, 1983, en Pedroza, 1985).

La materia orgánica insoluble de las aguas residuales puede separarse fácilmente por clarificación o sedimentación y la soluble puede ser metabolizada por microorganismos aerobios o

anaerobios a través de un sistema que se conoce como tratamiento secundario de aguas residuales. Cuando el tratamiento secundario es aerobio, la biomasa generada, conocida como proteína unicelular de desechos (PUCD), puede usarse como complemento proteínico para piensos y alimentos balanceados. Como el agua residual de la cocción y lavado del maíz contiene cantidades considerables de calcio, durante la formación del CO_2 por el metabolismo microbiano, éstas se precipitan como carbonato de calcio quedando ocluidas en la biomasa final. Es posible obtener proteína microbiana con bajo contenido en sales de calcio, mediante la previa precipitación en el nejayote. Esto permite el uso de la biomasa para alimentar animales que no asimilan de manera adecuada una dieta con un alto contenido de calcio. Esta alternativa brinda una perspectiva deseable al tratamiento de los efluentes en sí ya que permite tener ganancias adicionales que pueden hacer que el sistema de tratamiento sea rentable desde el punto de vista económico (Navarrete y col, 1989).

Cabe mencionar que, en los estudios previos realizados sobre el acondicionamiento de la biomasa obtenida del tratamiento aerobio del nejayote (Alvarez y col, 1985), se encontró que al someterla a tres diferentes métodos de secado (dos sistemas intermitentes, secado por charolas en una estufa a baja temperatura y liofilización y un sistema de secado continuo, secado por aspersión) no hubo diferencias significativas entre las características químicas de la biomasa con respecto de los procesos pero sí se encontraron diferencias entre las características físicas, especialmente con respecto a olor y color. Esto indica que el proceso continuo de secado por aspersión, que es el más eficaz de los tres estudiados desde el punto de vista de ingeniería, puede usarse para secar la biomasa obtenida en el laboratorio ya que la apariencia general es mejor y su valor nutritivo, desde el punto de vista químico, es similar al de los otros sistemas de secado.

La determinación del patrón de aminoácidos de la biomasa obtenida del reactor biológico rotatorio resultó similar al presentado por los estándares de la FAO (Pedroza y Durán, 1985). Naturalmente, debido a la presencia de cal en el nejayote, el contenido en material inorgánico o cenizas es considerable (54.35 %).

Sobre esta base teórica se inserta el presente trabajo de investigación, con los objetivos que a continuación se bosquejan.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVOS GENERALES

Consecuentemente con los objetivos generales del proyecto global, del que este trabajo de investigación forma parte, los cuales fueron el estudio de un sistema de tratamiento de aguas residuales de molinos de nixtamal, considerando como un valor agregado del proceso de tratamiento la obtención de biomasa

microbiana generada en un sistema de tratamiento aerobio de nejayote, se llevara a cabo su evaluación biológica para definir su calidad nutricional como fuente no convencional de proteína para animales monogástricos.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Dentro de los objetivos específicos de este trabajo se tiene la evaluación de biomasa obtenida a partir de nejayote pretratado para reducir substancialmente la cantidad de calcio disuelto y, por ende, la cantidad de sales de calcio ocluidas en la biomasa microbiana que pudieran afectar la calidad de su proteína y su asimilación por parte de los animales de prueba.

Para alcanzar estos objetivos se trazaron las siguientes metas:

- 1.2.1 Diseño de un sistema de precipitación de calcio
- 1.2.2 Determinación de la composición química de la biomasa microbiana con bajo contenido en calcio
- 1.2.3 Identificación de la presencia de posibles microorganismos enteropatógenos como: Salmonella sp., Bacillus cereus y Staphylococcus aureus.
- 1.2.4 Determinación de la presencia de posibles sustancias tóxicas, en particular aflatoxinas y ácidos nucleicos.
- 1.2.5 Realización de pruebas "in vivo" en ratas de laboratorio (Evaluación preliminar de la relación de eficiencia proteica)
- 1.2.6 Evaluación, mediante pruebas histopatológicas, del efecto de la biomasa microbiana en los órganos internos de las ratas de laboratorio estudiadas.

En los siguientes capítulos se presentan los principios en los que se basó el estudio, los materiales y métodos empleados, los resultados obtenidos, las conclusiones y recomendaciones que pueden derivarse de ellos.

11. GENERALIDADES SOBRE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Actualmente se cuenta con métodos para el tratamiento de aguas contaminadas que, en forma general, constan de:

1.- Tratamiento primario (químico/físico)

Consiste en la eliminación del material en suspensión de diferentes tamaños y densidades, así como de los que sedimentan o flotan más fácilmente. Para lograrlo se emplean métodos tales como la sedimentación, flotación, filtración, etc. Este proceso, aunque no efectúa ningún tipo de eliminación de material contaminante disuelto en el agua, se evita que posteriormente interfiera en la degradación biológica de este material disuelto.

2.- Tratamiento secundario (biológico)

Resultan ser los menos costosos y casi siempre implican sistemas aerobios, aunque recientemente, con el advenimiento de los sistemas anaerobios de alta tasa, va empezando a usarse estos también. Los métodos empleados para este tipo de tratamiento son diversos e involucran la intervención de microorganismos como bacterias, algas, hongos, protozoarios, etc., los cuales se encargan de transformar el material orgánico disuelto de fácil biodegradación a sólidos biológicos sedimentables y gases (Pedroza, 1985). Dentro de los procesos aerobios se encuentran las lagunas de estabilización, los lodos activados, los filtros percoladores, los discos biológicos, etc.

3.- Tratamiento terciario (químico/físico)

Son aplicados cuando se desea obtener agua de mejor calidad que la lograda en los tratamientos secundarios convencionales, ya que eliminan el material no biodegradable.

En la actualidad se pueden encontrar una variedad de tratamientos terciarios más sofisticados, a los que se define como tratamientos avanzados de aguas residuales (conocidos con sus siglas en inglés, AWT, advanced water treatment). El tratamiento terciario permite la remoción de material orgánico no biodegradable o de difícil biodegradación, la eliminación de microorganismos presentes no sedimentables o floculados y la eliminación de la coloración del agua provocada por humatos y otras sustancias químicas. Entre estos procesos se encuentra la absorción, el intercambio iónico y la coagulación.

Entre los métodos individuales se encuentran:

- a) Operaciones unitarias físicas: cribado, sedimentación, mezclada, flotación, floculación, filtración, etc.

- b) Procesos unitarios químicos: reacción entre contaminantes y reactivos químicos o reacciones químicas para remover los contaminantes o convertirlos en otros productos de más fácil manejo como: precipitación, adsorción, desinfección, etc.
- c) Procesos unitarios biológicos: remoción de contaminantes mediante la actividad biológica aerobia, anaerobia o facultativa. Sus aplicaciones se dan principalmente para la: 1) remoción de materia orgánica de tipo carbonáceo en aguas de desecho, medida como DBO_5 , como carbón orgánico total (COT) o como demanda química de oxígeno (DQO), 2) nitrificación, 3) desnitrificación y 4) estabilización.

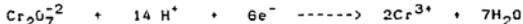
Para caracterizar un efluente se tienen parámetros indicativos de la calidad y condiciones del mismo. Entre los más comunes se encuentran:

- DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO_5^{20})

Proporciona una medida del oxígeno empleado por las bacterias durante la oxidación del material orgánico contenido en una muestra de agua residual. Esta prueba se basa en la premisa de que todo el material orgánico biodegradable es oxidado a CO_2 y H_2O , usando oxígeno molecular como aceptor de electrones. De aquí que sea una medida directa de los requerimientos de oxígeno y una medida indirecta de la contaminación por materia orgánica biodegradable. Los números 20 y 5 se refieren, respectivamente, a la temperatura en grados centígrados y al tiempo en días de incubación de la muestra (APHA, 1980).

- DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO)

Esta prueba se basa en el principio de que la mayoría de los compuestos químicos, orgánicos e inorgánicos son oxidados a CO_2 , SO_2 , H_2O , NO_2 , etc. por un agente fuertemente oxidante como el dicromato de potasio, bajo condiciones ácidas. La materia orgánica e inorgánica es oxidada y el ión dicromato amarillo, es consumido y reemplazado por el ión crómico de color verde. Se adiciona sulfato de plata como catalizador:



Se titula el dicromato remanente con una solución valorada de sulfato ferroso amoniacal $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en presencia de ferroína (monohidrato de fenantroína en solución acuosa) como indicador. El punto final de la titulación corresponde a un color café rojizo debido a la formación de un complejo de fierro-fenantroína (APHA, 1980).

- SÓLIDOS (S)

La definición usual de sólidos se refiere a la materia remanente después de que una solución acuosa ha sido sometida a evaporación y secado. Uno de los principales objetivos de efectuar la determinación de sólidos en aguas residuales es obtener una medida de la cantidad de materia orgánica presente. La prueba de sólidos es completada con la combustión en la cual la materia orgánica es convertida a CO_2 y H_2O a temperatura controlada para prevenir pérdidas de sustancias inorgánicas. La pérdida en peso después de la combustión es interpretada en términos de materia orgánica o sólidos volátiles (APHA, 1980).

- NITROGENO KJELDAHL (NK)

Es la determinación de la cantidad total de nitrógeno orgánico contenido en una muestra, sin diferenciar el tipo de compuesto al que pertenece. El nitrógeno esencial para el crecimiento de los microorganismos constituye con el fósforo y el carbono uno de los nutrientes de mayor importancia.

- TEMPERATURA (T)

Parámetro físico muy importante por su efecto en los microorganismos. Promueve por un lado, la actividad microbiana sobre la materia orgánica presente y ocasiona, por otro lado la disminución del contenido de oxígeno disuelto. Por ello, es conveniente su control.

- OXIGENO DISUELTO (OD)

Es la cantidad de oxígeno expresada como concentración de oxígeno molecular que se encuentra disuelto en una solución acuosa. Una concentración mayor a 1.5 mg O_2 /l asegura el desarrollo de los microorganismos aerobios.

- pH

Término empleado de manera internacional para medir la intensidad de la condición ácida o alcalina de una solución. Es una forma de expresar la concentración de iones hidrógeno o, dicho de una manera más precisa, es una expresión de la actividad de los iones hidrógeno.

- CONDUCTIVIDAD

Es una medida de la capacidad de una solución para permitir el paso de una corriente eléctrica y es independiente de la temperatura, del número y de las especies iónicas presentes en la solución.

- ALCALINIDAD

La alcalinidad se define como la capacidad de una solución acuosa para neutralizar ácidos. Se debe a la presencia de hidroxilos, carbonatos y bicarbonatos. Se supone comúnmente que los bicarbonatos representan la forma principal de alcalinidad, ya que estos se forman en cantidades considerables a partir del CO_2 generado por los microorganismos.

- TURBIEDAD

Propiedad óptica de una solución acuosa que causa que la luz sea desviada o absorbida en lugar de ser transmitida en línea recta a través de la muestra. Es causada por la presencia de materia suspendida o coloidal.

El tratamiento biológico de las aguas de desecho tiene, como objetivos generales, coagular y remover los sólidos no sedimentables y estabilizar la materia orgánica.

Dentro de los sistemas aerobios y anaerobios de tratamiento, en el proyecto global del cual este trabajo de investigación forma parte, se estudiaron un sistema de lodos activados (Durán y Hartmann, 1980), una cascada de reactores empacados en serie tanto aerobios como anaerobios (Hartman y Durán, 1981; Civit et al., 1984) y también un sistema aerobio de biodiscos a nivel laboratorio y planta piloto (Durán, 1982; Escárcega y Pulido, 1986; Pedroza y Durán, 1985, 1987; Montesinos y Durán, 1988). Se concluyó que este último sistema es uno de los más eficientes al tener el sistema una población microbiológica heterogénea (bacterias, hongos, protozoarios, levaduras, etc.) y adherida a un medio inerte, en el que se localizan microorganismos especializados en la degradación del material orgánico que no ha sido degradado en etapas anteriores por lo que su efectividad en el tratamiento es elevada. El sistema presenta, además, otras ventajas técnicas, como su fácil operación, mantenimiento y supervisión mínimos y bajo consumo de energía.

Por ello, a continuación se presentan, en forma sumaria, las características y comportamiento del reactor y las características de la biomasa generada durante el tratamiento aerobio de las aguas residuales carbonáceas como el nejayote.

11.1 REACTOR BIOLÓGICO ROTATORIO (RBR)

11.1.1 CARACTERÍSTICAS DEL RBR

El RBR consiste de una serie de discos o de tambores fabricados de materiales duros, ligeros y que presentan una gran área superficial montados sobre un eje (flecha) y, en el caso de discos, espaciados de 1 a 2 cm entre cada uno. Algunos de estos materiales son madera, aluminio, acero inoxidable, polietileno, poliestireno, acrílico, plástico en general, etc.

Aproximadamente el 40% del área superficial está sumergida en el agua de desecho y el 60% restante está en contacto con el aire del ambiente. La flecha que soporta a los discos gira a diferentes velocidades rotacionales, dependiendo del tamaño del tanque y, principalmente, de la cantidad de oxígeno disuelto en el seno del líquido. La rotación se logra con un motor eléctrico o con aire. La rotación proporciona una fuente continua de nutrientes y oxígeno para las bacterias que se encuentran adheridas a la superficie de los discos (Metcalf-Eddy, 1972; en Andere, 1987).

Se ha comprobado que, en los RBR, también la biomasa suspendida, además de la adherida a las paredes de los compartimentos, coadyuva en el tratamiento o degradación de materia orgánica disuelta presente (Escárcega y Pulido, 1986).

Estudios realizados sobre el desarrollo de la biopelícula en este sistema (RBR), han llevado a dividirlo en tres fases: inducción, acumulación y estabilización (Trulear, 1982; en Norouzian y Deloya, 1984):

Fase de inducción. Esta fase comprende la adsorción orgánica seguida del transporte y adhesión de las bacterias sobre la superficie.

Fase de acumulación. Durante esta fase hay un aumento logarítmico de la población de bacterias con una tasa de acumulación casi constante.

Fase " Plateau ". En esta fase la película biológica desprendida y la producida se encuentran en equilibrio dinámico. El mantenimiento de la estructura de la biopelícula depende de la difusión del sustrato orgánico y oxígeno disuelto al interior de la película biológica y de la difusión de los productos del metabolismo hacia la fase acuosa que mantienen la cohesión de la biomasa (Trulear y Characterlis, 1982; en Norouzian y Deloya, 1984).

Una descripción más detallada sobre el reactor biológico rotatorio se encuentra en los trabajos realizados por Durán (1982), Alvarez y col., (1986), Escárcega y Pulido (1986), Montesinos y Durán (1986) y Luna-Pabelló (1987).

11.1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA BIOMASA MICROBIANA

11.1.2.1 Patrón de aminoácidos

La composición de aminoácidos de una proteína determina su valor como fuente de nitrógeno para el mantenimiento y crecimiento de los seres vivos. El análisis del contenido de aminoácidos da la información sobre el valor del potencial nutricio de la proteína aunque no siempre refleja correctamente la disponibilidad fisiológica de sus aminoácidos, particularmente si ha sido tratada térmicamente.

Otro aspecto a considerar en la utilización de proteínas microbianas como fuente nitrogenada es la digestibilidad, que en el caso de microorganismos se ve afectada negativamente por la presencia de la pared celular (Kihlberg, 1973; en Valderrama, 1989).

Para tener una idea más cercana del valor nutritivo de las proteínas es conveniente hacer una comparación de su contenido de aminoácidos con los estándares establecidos. En el Cuadro 11-1 se presenta una comparación del contenido de aminoácidos de los estándares de la FAO y del huevo entero, así como el de la biomasa obtenida del tratamiento aerobio del mejayote (Pedroza y Durán, 1985).

Los alimentos no tradicionales ricos en proteínas deben pasar por pruebas de inocuidad realizadas en animales de laboratorio y, si es posible, de granja. Esto se debe a que en la materia prima o en algún paso del método de elaboración hasta la obtención del producto final, es posible encontrar la presencia de alguna sustancia tóxica. Existen normas internacionales de la Organización de las Naciones Unidas para que los nuevos materiales proteicos sean aceptados.

Estas normas contemplan la realización de pruebas de toxicidad a corto, mediano y largo plazo en animales de laboratorio, con el objeto de observar crecimiento y posibles problemas cancerígenos y teratológicos. El Cuadro 11-2 resume las pruebas que se deben hacer a alimentos proteicos no tradicionales (Larreaga, 1976; en Valderrama, 1989). Estas se inician con la evaluación de la proteína contenida en estos alimentos no convencionales, mediante pruebas biológicas, primero en animales experimentales (generalmente ratas Wistar) y, cuando es necesario, en humanos voluntarios.

CUADRO II-1

ANALISIS COMPARATIVO DE AMINOACIDOS EN DIFERENTES FUENTES DE PROTEINA (g/100g prot) (Pedroza y Durán, 1985)

AMINOACIDO	ESTANDAR FAO(1)	HUEVO ENTERO(2)	CULTIVO MIXTO EN NEJAYOTE(3)
Isoleucina	4.2	6.7	3.8
Leucina	4.8	8.9	6.2
Lisina	4.2	6.5	5.7
Fenilalanina	2.8	6.8	8.5
+Metionina	2.2	3.2	2.0
Treonina	2.8	5.1	4.5
Triptofano	1.4	1.6	1.7
Valina	4.2	7.3	5.0
Tirosina	2.8	4.2	3.9

- * Perdido durante la hidrólisis analítica
- 1 Senz, 1972
 - 2 Kihlberg, 1972
 - 3 Pedroza y Durán, 1985

CUADRO II-2

PRUEBAS BIOLÓGICAS DE INOCUIDAD PARA PROTEINAS DE ORIGEN MICROBIANO (LARREAGA, 1976)

Toxicidad aguda a 6 semanas en ratas, gallinas y cerdos (25 % de la proteína de la dieta)

Toxicidad semicrónica a 90 días en ratas, gallinas y cerdos (5, 10 y 15 % de proteína de la dieta)

Toxicidad crónica 1 a 2 años en ratas, gallinas y cerdos

Carcinomas a 1 y 2 años en ratas, en ratones a 9 y 18 meses

Pruebas de multiplicación a 2 años en ratas, gallinas y cerdos (observaciones teratológicas y mutagénicas).

La toxicidad de las diferentes biomásas microbianas depende de su origen. Así se tiene que, para la biomasa obtenida del crecimiento en petróleo y derivados, es común encontrar compuestos aromáticos policíclicos (3,4-benzopireno, 1,2,5,6-dibenzantraceno o metilclorantano), que son conocidos como agentes carcinogénicos.

La presencia de pequeñas cantidades de D-aminoácidos puede tener implicaciones negativas debido a la posibilidad de estar incluidos en algunos polipeptidos (por ejemplo en antibióticos polipeptídicos elaborados por ciertos microorganismos) causando problemas sobre el animal que ingiere esta biomasa por la eliminación de la flora bacteriana intestinal con la consecuente mala absorción de algunas vitaminas. Este tipo de aminoácidos también puede estar presente como componente de la pared celular haciendo que la disponibilidad de los aminoácidos disminuya y al no ser absorbidos generan problemas de flatulencia y diarreas por fermentación en el intestino (Casey, 1963; en Valderrama, 1989).

La presencia de otros agentes tóxicos, como las aflatoxinas, es importante, pues no es posible eliminarlas completamente, aun mediante el tratamiento térmico de la biomasa (Wilson, 1973; en Valderrama, 1989).

El problema más frecuente de toxicidad en biomasa microbianas se debe a la presencia de altas concentraciones de ácidos nucleicos. Una alta concentración es característica de una velocidad de crecimiento rápida de las células. Comparando con un alimento convencional y uno no convencional, los microorganismos tienen entre 8 y 25 g de ácidos nucleicos por cada 100 g de proteína, en tanto que el hígado contiene abajo de 4 g de ácidos nucleicos por cada 100 g de proteína. El problema se presenta porque los ácidos nucleicos son despolimerizados por el jugo pancreático y convertidos a nucleósidos por las enzimas intestinales durante la absorción. Las bases púricas guanina y adenina son metabolizadas a ácido úrico con lo que se incrementa su contenido en plasma y orina. La alta concentración en plasma (dada su baja solubilidad) hace que se precipite como ureato predisponiendo al animal a la enfermedad llamada "gota" (Kihberg, 1972; en Valderrama, 1989).

La mayoría de los métodos de bioensayo para determinar la calidad de una proteína se basan en mediciones directas o indirectas de la retención de nitrógeno en el organismo. Estos pueden ser divididos en dos grupos:

a) Métodos de crecimiento como: Relación de eficiencia proteica (REP), Relación neta de proteína (RNP).

b) Métodos de balance de nitrógeno: Digestibilidad aparente (DA), Digestibilidad verdadera (DV), Utilización neta de la proteína (UNP) y Valor biológico (VB).

A continuación se detallan estas metodologías:

RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA (REP)

La determinación del REP o PER como se le conoce por sus siglas en inglés (Protein Efficiency Ratio) (Campbell, 1963), fue propuesto por Osborne en 1919 y está definido como el método que determina la ganancia en peso del animal por gramo de proteína

consumida. Se ha encontrado que la edad inicial del animal, el nivel de proteína de la dieta, el tiempo de experimentación, la raza de los animales, el sexo y su estado general de salud influyen en los resultados. El método parte del hecho de que la proteína ingerida no es para mantenimiento sino para crecimiento. Por ello, las pruebas se realizan con un nivel de proteína del 10 %, para asegurarse de que parte de la proteína no se destina a otro uso que no sea de producción de tejidos. El método también supone que el incremento del peso corporal puede ser no sólo debido a la síntesis de proteína, sino a la deposición de grasa y otros nutrientes en los tejidos del animal. Por lo tanto, las proteínas que no promueven crecimiento no pueden ser evaluadas por este método.

RELACION NETA DE LA PROTEINA (RNP)

Este método es una modificación al método de la REP. Se trabaja con dos grupos de cuatro animales cada uno. Un grupo es alimentado con la proteína de prueba con un nivel de 10 % y el otro grupo es alimentado con una dieta libre de nitrógeno. Al término de siete o diez días de alimentación los animales son pesados y se cuantifica la proteína ingerida:

$$RNP = (A - B) / C$$

- A = Ganancia en peso del grupo alimentado con la proteína de prueba.
- B = Pérdida del peso del grupo alimentado con dieta libre de nitrógeno.
- C = Peso de proteína consumida

Esta expresión mide la proteína usada para crecimiento y para mantenimiento. El uso de este método no es muy común debido a que la diferencia entre la REP y la RNP no es significativa.

DIGESTIBILIDAD AFARENTE (DA)

La digestibilidad de una proteína depende de un número de factores que incluyen: (a) la naturaleza de la proteína en sí misma, (b) la cantidad de proteína que se ha suministrado durante un tiempo dado, (c) cualquier tratamiento por calor o cualquier otra manipulación a la que haya sido sometida la proteína, (d) la naturaleza del resto de la ración y (e) factores biológicos, tales como la especie, estado general de salud y la edad del animal en cuestión. Existen al menos tres factores que determinan el efecto de calor sobre la digestibilidad y estos factores son: 1) si el calor es húmedo o seco, 2) duración del tiempo de calentamiento y 3) temperatura alcanzada. Usualmente pero no invariablemente, el tratamiento con calor húmedo de una proteína es menos destructivo que el calor seco. Con tiempos de calor prolongados a temperaturas altas y elevadas la digestibilidad de una proteína tiende a disminuir.

La digestibilidad aparente se define como aquella porción del alimento o nutrimento consumido que no es excretado en las heces y el cual es, por tanto, absorbido por el animal. La digestibilidad aparente es comúnmente expresada como un porcentaje en términos de coeficiente de digestibilidad.

En la determinación de la digestibilidad aparente se emplea un marcador indigerible, que es el óxido crómico (Schorch, 1950 en Valderrama, 1989). El óxido crómico (Cr_2O_3) se administra en forma de polvo en proporción del 1% en relación al peso de las dietas, las cuales adquieren al final un color verde claro. La digestibilidad de la proteína se calcula en base a las determinaciones de óxido crómico y proteína en las dietas y heces.

$$\text{Digestibilidad aparente de la proteína} = \frac{(\text{N alimento} - \text{N heces}) \times 100}{\text{N alimento}}$$

DIGESTIBILIDAD VERDADERA

No todas las heces representan residuos de alimento no digerido. Parte del material fecal está compuesto por enzimas y otras sustancias secretadas dentro del intestino y no absorbidas, por ejemplo el material celular de descomposición del mismo intestino y bacterias intestinales:

$$\text{Digestibilidad verdadera} = \frac{(\text{N alimento} - (\text{N fecal} - \text{N fecal met.})) \times 100}{\text{N alimento}}$$

Si un animal es alimentado con una dieta libre de nitrógeno, la excreción de nitrógeno es continua en las heces. Puesto que este nitrógeno es derivado del cuerpo y no directamente del alimento se conoce así: el nitrógeno fecal metabólico.

UTILIZACION NETA DE LA PROTEINA

Este método mide el cambio de nitrógeno corporal y proporciona datos que dan un criterio más amplio para calificar a una proteína. La utilización neta de la proteína consiste en medir la proporción de las proteínas ingeridas que son incorporadas al organismo y determina la relación entre la cantidad de nitrógeno retenido y la cantidad de nitrógeno ingerido en forma porcentual:

$$\text{UNP} = \frac{\text{N retenido (g)} \times 100}{\text{N ingerido (g)}}$$

N retenido = N total de rata prob. - N total rata blanco

$$\text{N ingerido} = \frac{\text{g de dieta} \times \% \text{ de N en dieta}}{100}$$

El procedimiento consiste en medir el nitrógeno que se ha depositado en las heces del animal por el consumo de la dieta en estudio, con un 10 % de proteína por 10 días y es necesario corregir por el nitrógeno endógeno que se mide en otro grupo que consume una dieta libre de nitrógeno.

Este método no es recomendable para efectuar análisis de rutina ya que la determinación de nitrógeno en las heces del animal toma demasiado tiempo y además resulta tedioso el hecho de tener que secar, moler y homogenizar el cuerpo de una rata entera. Por ello, se ha propuesto usar la pierna trasera del animal con el objeto de simplificar la metodología analítica, con respecto de tiempo, esfuerzo y costos. Lo anterior se basa en que la pierna trasera es representativa del contenido de nitrógeno del resto del cuerpo del animal (Sotola et al., 1978).

VALOR BIOLÓGICO

El valor biológico de una proteína se define como el porcentaje de nitrógeno absorbido retenido en el cuerpo del animal. El concepto de valor biológico fue introducido por Thomas en 1909 y redefinido por Mitchelson en 1955. Es estimado a partir de las mediciones de nitrógeno ingerido, fecal, metabólico, urinario y endógeno. Todo esto puede expresarse en la siguiente ecuación:

$$VB = \frac{N \text{ Ing.} - (N \text{ fecal} - N \text{ met.}) - (N \text{ urinario} - N \text{ endogeno}) \times 100}{N \text{ Ing.} - (N \text{ fecal} - N \text{ metab.})}$$

Este método ha sido fuertemente criticado debido al enorme trabajo que se debe realizar para cada una de las determinaciones.

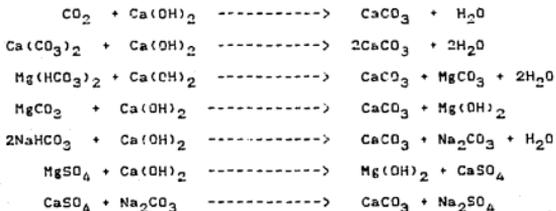
11.1.2.2 Precipitación de las sales inorgánicas

Al realizar pruebas biológicas "in vivo" con la biomasa microbiana proveniente del tratamiento biológico del nejayote en reactores de biodiscos, empleando animales monogástricos (ratas Wistar de laboratorio), estos presentaron gastritis hemorrágica severa. Esto hizo suponer que, entre otros posibles factores, el exceso de cal presente en las aguas tratadas que queda ocluida en los flocúlos de biomasa, debido a la precipitación del catión calcio en forma de carbonatos, provoca un efecto abrasivo, causando el deterioro de la mucosa gástrica de los animales de experimentación, además de inhibir la actividad enzimática de los jugos gástricos, disminuyendo así la digestibilidad del alimento y, consecuentemente, la absorción intestinal de los nutrimentos. De aquí que la ganancia en peso haya sido negativa (Valderrama, 1989).

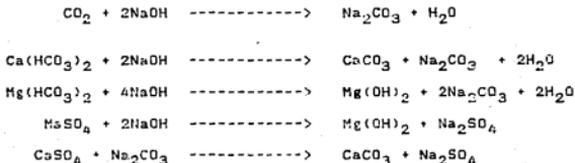
Debido a que la mayor parte del material inorgánico presente en los abastecimientos de agua es causada por la presencia en solución de compuestos de calcio y magnesio, a los bicarbonatos de calcio y magnesio se les designa como "dureza carbonatada" y a los sulfatos de calcio y magnesio (o cloruros y nitratos) como "dureza no carbonatada". El proceso de "ablandamiento" o suavización consiste en remover una parte de dichas sales del agua para reducir la dureza a un nivel determinado. El método más utilizado para este objetivo es el conocido como "proceso calc-carbonato de sodio". En el siguiente apartado se hace una breve descripción de este proceso ya que se aplicó para eliminar el exceso de sales de calcio del nejayote.

- PROCESO CAL CARBONATO DE SODIO

Las reacciones químicas que se llevan a cabo en este proceso de suavización son las siguientes:

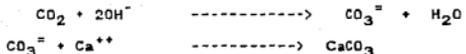


Un método opcional en el proceso de "cal-carbonato de sodio" es aquel que utiliza sosa cáustica en sustitución del carbonato de sodio. Las reacciones de la sosa con la dureza de carbonatos y no carbonatos son las siguientes:

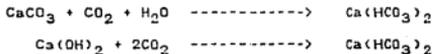


Las tres primeras ecuaciones muestran la remoción de CO_2 libre presente en el agua y la remoción de dureza por carbonatos formando una cantidad equivalente de carbonato de sodio el cual reacciona con la dureza de no carbonatos. La adición de la sosa cumple una doble función al precipitar ambas durezas (carbonatos y no carbonatos), por lo que no sólo puede sustituir al carbonato de sodio sino también a una parte o toda de la cal empleado en este método.

Cuando es necesario remover magnesio se utiliza un exceso de cal por lo que el agua blanda contiene iones calcio e hidroxilo en una concentración alta, de tal forma que el exceso de iones de calcio contradice la propuesta de ablandamiento y los iones hidroxilo dan como resultado alcalinidad por hidroxilo. Ambos iones son reducidos por la adición de dióxido de carbono, tratamiento conocido como recarbonatación:



Debe cuidarse la adición de dióxido de carbono para prevenir la caída del pH por_ abajo de 9.5. De otra manera, cantidades importantes de $\text{CO}_3^{=}$ pueden convertirse a HCO_3^- y el exceso de calcio no se precipitará formando CaCO_3 como se desea.



La recarbonatación debe estar seguida por un periodo de floculación para permitir el contacto con el material precipitado y apresurar la reacción.

Con estas bases, en el próximo capítulo se presentan el diseño experimental realizado y los materiales y métodos usados.

111. METODOS Y MATERIALES

El agua residual de la nixtamalización, nejayote, se obtuvo de un molino comercial a pequeña escala. Esto se recolectaba una vez por semana y se mantenía almacenado a baja temperatura (en cuarto frío) a 4° C hasta un día antes de su empleo.

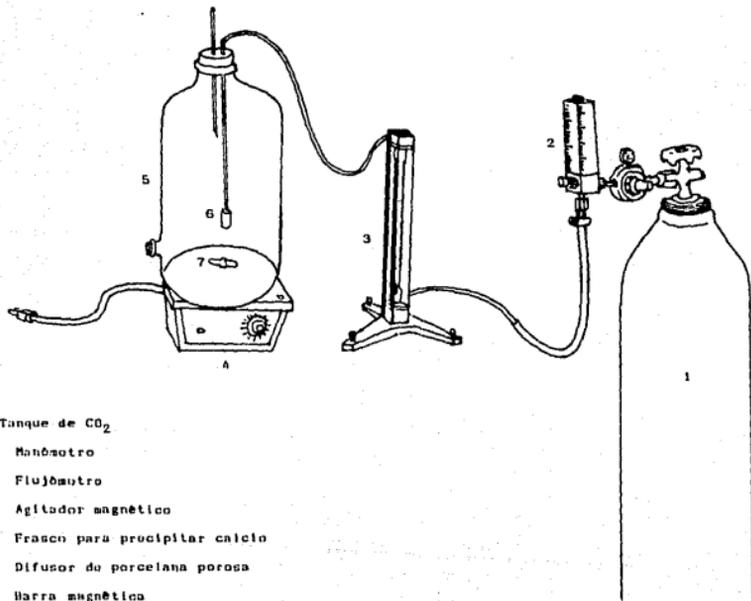
De los parámetros existentes para indicar la calidad del agua se utilizaron en la caracterización del nejayote los siguientes: Demanda química de oxígeno, nitrógeno Kjeldahl y sólidos totales. El contenido de calcio se cuantificó por determinación volumétrica con EDTA. La alcalinidad se determinó por una valoración potenciométrica (APHA, 1960). Las lecturas de pH fueron tomadas mediante un potenciómetro marca PRESTOTEK (EUA), de acuerdo al manual de operación.

Para eliminar el calcio se llevó a cabo un tratamiento fisicoquímico (Navarrete y col, 1989). En este proceso por lotos, similar al empleado en el ablandamiento de aguas naturales duras, se adicionó NaOH y CO₂ para obtener la máxima remoción de calcio. Esto se realizó agregando al nejayote contenido en el reactor un volumen conocido de NaOH (solución preparada al 50 %) y dosificando CO₂ gaseoso. Este sistema posee capacidad para tratar un total de 0.007 m³ de agua residual en un tiempo aproximado de 5 h. Consta de un frasco cuyo volumen total es de 8 litros, provisto de una salida de gases en la parte superior, una plancha de agitación Cole-Parmer modelo 4802-00 con barra magnética para asegurar un mezclado completo dentro del reactor y un tanque de alimentación de CO₂ de 68.5 kg de capacidad. El llenado y vaciado del reactor se hizo de forma manual. La introducción de CO₂ al líquido a tratar se realizó mediante un difusor de porcelana porosa con el fin de permitir una mayor área de contacto entre las burbujas del gas y el líquido. La presión se midió por medio de un manómetro marca Harris modelo No. 25 y el gasto con un rotámetro marca ROTA, interconectados por mangueras (Fig. 111-1).

El porcentaje de remoción de calcio más satisfactorio se logró con las siguientes condiciones de trabajo: 5920 mg/L de NaOH y 3.6 L de CO₂ (P = 45 Kg/cm² y T = 22°C), en un volumen de trabajo de 0.007 m³. La remoción alcanzada fue de 98.48 %. Es importante mencionar que el porcentaje de remoción de calcio es menor si el nejayote se trata cuando aún tiene el pH y alcalinidad originales. Es necesario mantenerlo en almacenamiento para que, con los cambios ocurridos por la presencia de bacterias anaerobias, los valores de pH y alcalinidad disminuyan a valores entre 6.82-5.02 y 2616-1544 mg/L, respectivamente.

Se observó también que la concentración inicial de calcio es inversamente proporcional al porcentaje de remoción de este ión, bajo las mismas condiciones de trabajo. Un estudio más detallado sobre el sistema de precipitación de calcio en nejayote se encuentra en el trabajo realizado por Navarrete y col., (1989).

Fig. III - 1 SISTEMA DE PRECIPITACION DE CALCIO



1. Tanque de CO₂
2. Manómetro
3. Flujoámetro
4. Agitador magnético
5. Frasco para precipitar calcio
6. Difusor de porcelana porosa
7. Barra magnética

Este nejayote pretratado fué empleado para la obtención de biomasa microbiana con bajo contenido en calcio a partir de su tratamiento aerobio en un RBR.

El nejayote sometido al tratamiento de remoción de calcio de acuerdo a las condiciones antes citadas, se centrifugó durante 15 min a 3500 rpm y a 4°C en una centrifuga Cryofuge 6-6 refrigerada marca Heraeus Christ, RFA., se almacenó en garrafones de plástico y se le determinó la cantidad de materia orgánica soluble, medida como Demanda Química de Oxígeno (DQO), para posteriormente alimentarlo al Reactor Biológico Rotatorio (RBR) de laboratorio.

El reactor biológico rotatorio empleado en la presente investigación posee una capacidad para tratar 243 litros de aguas residuales (nejayote) en un tiempo de retención hidráulico de 70 horas.

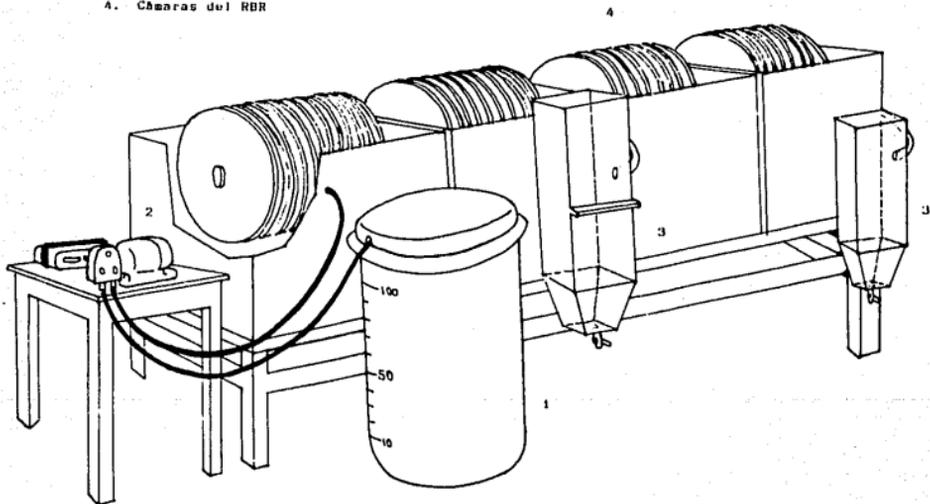
Consta de cuatro cámaras de acero inoxidable, las dos primeras alimentadas con nejayote con tratamiento previo para precipitar el calcio y las dos siguientes alimentadas con nejayote sin tratamiento previo. Cada par de cámaras se encuentran intercomunicadas entre sí en la parte superior. Para el primer par se tiene un tanque de alimentación de 110 litros y para el segundo uno de 70 litros. La salida de cada par de cámaras vierte el efluente en sedimentadores secundarios de acrílico de 15 litros (Fig. 111-2).

Cada cámara contiene un tren de discos con veinticuatro unidades ensambadas en una flecha central, la cual se apoya en los extremos de la cámara. Esto permite el giro del conjunto de los discos y la flecha, con ayuda de un motor pequeño marca Groschopp de 220 volts (RFA). Los discos son de 50 cm de diámetro y de 0.4 cm de grosor. Están hechos de cloruro de polivinilo y aproximadamente el 40 % de su área se encuentra sumergida en el agua a tratar.

El nejayote contenido en el tanque de alimentación está diluido convenientemente a una carga orgánica permanente de 5000 mg O_2/L (medidos como DQO). Pasa a la primera cámara (cámara 1) por medio de una bomba peristáltica, la cual además dosifica de manera constante el volumen que entra. La siguiente cámara se va llenando con el agua tratada de la cámara anterior, siendo finalmente colectada en el sedimentador secundario, en donde el efluente tratado es separado de la biomasa. La biomasa sedimentada es colectada en el fondo del sedimentador y el líquido sobrenadante sale por la parte superior. De la misma manera se encuentra montado el sistema para el nejayote sin tratamiento previo (cámaras 3 y 4).

Fig. 11 - 2 REACTOR BIOLÓGICO ROTATORIO (RBR)

1. Tanque de alimentación
2. Bomba peristáltica (dosificadora)
3. Sedimentador secundario
4. Cámaras del RBR



III.1 ESTABLECIMIENTO DEL REGIMEN PERMANENTE

Para iniciar el funcionamiento del sistema de tratamiento y formar la película biológica activa, se proporcionó a cada cámara un volumen específico de lodos aerados obtenidos de otro reactor de biodiscos alimentando con líquidos residuales por tratar en forma intermitente, logrando así un desarrollo más rápido de la película biológica activa. Se evitó el flujo continuo (incorporación de más líquido) al sistema durante una semana facilitando así el desarrollo de la fase de inducción.

Durante la segunda fase o fase de acumulación se mantuvo al sistema en condiciones de operación constante: carga orgánica de 5000 mg O₂/L (medidas como DQO); velocidad de rotación, 15 rpm y flujo de aguas residuales, 3 L/h. Se registraron rutinariamente conductividad con un conductímetro Presto - Tek (EUA), modelo DP-05; temperatura y pH del licor mediante un multímetro Poly-Pras, modelo PA-22 (EUA), de acuerdo con los manuales de operación.

Para estimar la fase de estabilización o de régimen permanente se prosiguió de la siguiente forma:

- 1) Considerar de manera subjetiva, que la película biológica adherida a los discos se encuentra distribuida homogéneamente y con grosor o espesor constante y que, además, presenta resistencia al desprendimiento por contacto.
- 2) Realizar un análisis preliminar de demanda química de oxígeno (DQO), ya que su aplicación sistemática permite conocer el porcentaje de remoción de materia orgánica disuelta después de que las aguas residuales han permanecido dentro del sistema de tratamiento.
- 3) Mantener constante la carga orgánica suministrada al sistema. Para que esta variable permanezca constante se toman muestras del licor mezclado (líquido por tratar) proveniente de cada una de las etapas que componen el sistema, se determina la carga orgánica soluble que presentan, registrando los datos obtenidos. Después de cuatro o cinco días, se repite el análisis y si los resultados son semejantes (menos de $\pm 10\%$ de variación), se puede pensar que el sistema ha alcanzado la estabilidad esperada.

Durante esta fase se realizaron registros fisicoquímicos in situ de conductividad, temperatura y pH. Se incorporó el de oxígeno disuelto (con el mismo multímetro), con una frecuencia de tres veces por semana.

Los análisis de demanda química de oxígeno se realizaron con una frecuencia de dos a tres veces por semana, previa toma y centrifugación de muestra, de acuerdo con el método aprobado por la APHA (1980). La técnica se describe en el Apéndice A.

III.2 ACÓNDCIONAMIENTO DE LA BIOMASA COLECTADA

La biomasa generada del sistema ya estable y colectada en el sedimentador secundario se centrifugó durante 15 min a 3500 rpm y a 4°C en una centrifuga 6-6 refrigerada marca Heraeus Christ (RFA). Se seca lo más rápido posible para evitar condiciones de anaerobiosis que puedan deteriorar la calidad nutritiva por efecto de la proteólisis y que se generen olores desagradables. Siendo el costo un factor importante en el proceso de secado y, puesto que hubo semejanza en cuanto a composición química general (aminogramas) de las biomásas secadas por los métodos de liofilización y estufa a baja temperatura, se optó por utilizar la estufa ya que es el método menos costoso de los propuestos. Posteriormente, la biomasa seca fue tratada térmicamente a 121°C durante 90 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente para luego incubarla a 23°C durante 24 horas con el objeto de permitir el crecimiento de los microorganismos que no fueron eliminados (principalmente esporas). Pasado este tiempo se dió un segundo tratamiento térmico en las condiciones antes señaladas para eliminar a los microorganismos que se hubieran desarrollado durante el período de incubación y garantizar su inocuidad.

III.3 ANALISIS QUIMICOS DE LA BIOMASA

- Análisis proximal

Se siguieron las técnicas establecidas por la AOAC (1980) para obtener el análisis proximal de la biomasa.

- Digestibilidad "in vitro"

Se determinó usando pepsina y HCl al 10 % midiendo el contenido de proteína por microkjeldahl (AOAC, 1980) (Apéndice B).

- Determinación de calcio

Se estimó por una titulación permanganométrica, según la AOAC (1980). (Apéndice B)

- Determinación de fósforo

La cuantificación fue realizada via ceniza húmeda y posterior determinación colorimétrica (AOAC, 1980). La curva estándar de fósforo se encuentra en el Apéndice B.

- Determinación de aflatoxinas y ácidos nucleicos

Las aflatoxinas se determinaron por extracción, purificación e identificación mediante cromatografía en capa fina y los ácidos nucleicos mediante ruptura mecánica de la pared celular y extracción con disolventes. Los métodos se encuentran descritos en el Apéndice B.

III.4 ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE LA BIOMASA

Con el objeto de determinar la presencia de microorganismos patógenos se realizaron análisis específicos para microorganismos patógenos (o enterotoxigénicos) tales como: Salmonella sp., Bacillus cereus y Staphylococcus aureus, así como cuenta total de hongos y levaduras. Para tal efecto se siguieron las técnicas de Garza, C. et al., 1983. Los análisis se realizaron en la biomasa antes del primer tratamiento térmico y después del segundo, para verificar que no hubiera presencia de microorganismos patógenos que afectaran negativamente los resultados de las pruebas biológicas.

La importancia de tales determinaciones radica en el hecho de que los microorganismos citados pueden generar toxinas que al ser ingeridas por los animales de experimentación les podrían causar trastornos graves, dependiendo de la concentración a la que se encontraran. La descripción de las técnicas se encuentra en el Apéndice B.

III.5 PRUEBAS BIOLÓGICAS CON LA BIOMASA

Evaluación preliminar de la biomasa con bajo contenido en calcio

Se llevó a cabo en ratas de raza Wistar del bioterio de la Facultad de Química de la UNAM, manejando dos lotes, cada uno con 6 ratas (3 hembras y 3 machos), de 21 días de nacidas recién destetadas, con un peso promedio de 48.5 g a 62.5 g en hembras y de 49.5 g a 68.0 g en machos. El alimento consumido se pesó diariamente y los animales de experimentación fueron pesados cada tercer día procurando que fuera a la misma hora. Se siguió la metodología de la ADAC para la determinación de la REP (ADAC, 1980). En el cuadro III - 1 y III - 2 se presenta la información referente a la preparación de las dietas y el cuadro III - 3 muestra la distribución de las ratas para la evaluación preliminar.

PREPARACION DE DIETAS PARA EVALUACION PRELIMINAR

COMPONENTE	DIETA PURIFICADA %	DIETA PROBLEMA %
Caseína	10	--
Biomasa	--	10
Aceite de maíz *	5	5
Fibra cruda **	5	5
Fte. 1a. y 2a. (sac., glu.)	10	10
Mezcla de mín. AIN 76	4	--
Mezcla de mín. para biomasa	--	3
Mezcla de vit. AIN 76	1	1
Almidón de maíz	65	66

- * Ajustado para que en la dieta se tenga 5 % de grasa
- ** Ajustado para que en la dieta se tenga 2 % de fibra cruda

En el cuadro anterior se muestra la composición teórica de la dieta purificada y de la dieta problema.

CUADRO III - 2

ANALISIS BROMATOLOGICO DE DIETA PURIFICADA Y BIOMASA PREPARADAS

	DIETA PURIFICADA	DIETA CON BIOMASA
Materia seca %	90.33	92.59
Humedad %	9.67	7.41
Proteína cruda (N x 6.25) %	9.10	11.30
Extracto etereo %	0.90	1.0
Cenizas %	2.96	6.0
Fibra cruda %	0.95	4.23
Carbohidratos %	76.52	70.06

Composición real de las dietas empleadas en la evaluación preliminar.

Las dietas se prepararon con base en los requerimientos necesarios para obtener una dieta isoproteica e isocalórica que proporciona los requerimientos y las cantidades apropiadas para el buen desarrollo y funcionamiento del organismo del animal. Se trabajó con un porcentaje de proteína del 10 %, de acuerdo a lo propuesto por Osborne, Mendel y Ferry 1919 (en Valdeirama, 1989).

DISTRIBUCION DE LAS RATAS PARA EVALUACION PRELIMINAR

C A S E I N A		B I O M A S A	
Macho	52.0 g	Hembra	53.5 g
Macho	62.5 g	Hembra	60.5 g
Macho	56.5 g	Hembra	59.0 g
Macho	66.0 g	Hembra	48.5 g
Macho	56.5 g	Hembra	68.0 g
Macho	49.5 g	Hembra	54.5 g

La diferencia en la suma de los pesos en columnas es de ± 5 g

III.6 PRUEBAS HISTOPATOLÓGICAS

Las pruebas histopatológicas que se realizaron a los animales de prueba incluyeron el estudio de cortes finos de tejido hepático, pulmonar y renal, así como en tejido del bazo. Estos fueron realizados por los Doctores Mateos y Peña siguiendo la metodología establecida por el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM (Mateos, 1990).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

En la presente investigación se tomaron como punto de partida los resultados presentados por Valderrama (1989). Por consiguiente, en lo sucesivo se dará esta discusión como una comparación de ambos trabajos.

A continuación se presenta la discusión y los resultados obtenidos.

IV.1 DETERMINACIONES QUIMICAS

Se llevó a cabo el análisis bromatológico de las biomásas con y sin calcio. Los resultados se presentan en el Cuadro IV-1.

CUADRO IV-1

Características, g/100 g (b.s.)	BIOMASA	
	con calcio	sin calcio
Proteína cruda (N x 6.25)	20.62	24.88
Extracto etéreo	1.87	8.55
Cenizas	39.07	15.15
Fibra cruda	3.87	3.75
Carbohidratos (por diferencia)	34.66	47.67

De acuerdo al trabajo realizado por Valderrama (1989) en el cual se encontró un contenido de proteína en la biomasa (sin tratamiento) de 16.71 % (b.s.) y en el presente trabajo se encontró un contenido promedio de 24.88 % (b.s) para la biomasa con tratamiento y de 20.62 % (b.s) para la biomasa sin tratamiento. Esto puede atribuirse al hecho de que el contenido proteico de la biomasa va decreciendo conforme se incrementa el número de etapas del sistema RBR (Pedroza, 1985; Durán, 1987). Para este estudio se tomó la biomasa de las dos primeras cámaras de cada sistema y para el de Valderrama, la de las primeras cuatro etapas y, por ello, tiene mayor contenido proteico.

En el caso de la biomasa con bajo contenido en calcio ya no se presenta tan elevado el contenido de materia inorgánica cuantificada como porcentaje de cenizas y, dado que el nejayote empleado fue sometido a un tratamiento previo antes de ser alimentado al reactor, la posibilidad de que durante la formación del floculo que se integra por la producción de mucilago de los microorganismos, los cristales de calcio se ocluyan en él es mucho menor, lo que hace que el contenido de cenizas disminuya considerablemente y que la proporción de los otros componentes aumente en relación.

En lo que se refiere al contenido de fibra cruda de 4.62 %, 3.87% y 3.75 % (Valderrama, 1989, biomasa con calcio y biomasa sin calcio respectivamente) se observa que no hay una diferencia muy marcada entre el porcentaje encontrado en cada una de las muestras, si se comparan con otras biomazas de origen microbiano cuyo contenido fluctúa entre 0.44 y 0.6 %. Es debido a que en el licor de tratamiento se arrastran celulosas y hemicelulosas, provenientes de la hidrólisis del pericarpio del maíz, y estos forman parte del sedimento recolectado al final del tratamiento.

El contenido de grasa 1.35 %, 1.87 % y 0.55 % (Valderrama, 1989, biomasa con calcio y biomasa sin calcio, respectivamente) presenta una variación sobre todo comparando el encontrado en la biomasa sin calcio y las otras dos, esto puede ser debido al pretratamiento que se le dió para bajar el contenido de sales inorgánicas. Comparado con el contenido de grasa de otras biomazas (2% en bacterias, hasta 12 - 14 % en algas) el determinado en la biomasa a partir de nejayote se encuentra en estos intervalos. (Jones, 1974 en Valderrama, 1989).

En el Cuadro IV-2 se tienen los datos de contenido de minerales de la biomasa con y sin calcio, así como la digestibilidad "in vitro" obtenida para ambas biomazas.

CUADRO IV-2

CONTENIDO DE MINERALES, DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" Y RELACION CALCIO/FOSFORO DE LA BIOMASA MICROBIANA

Parámetro, g	BIOMASA	
	con calcio	sin calcio
Calcio, mg/100 mg	8.70	1.073
Fósforo mg/g muestra	4.38	6.840
Sodio mg/g muestra	-----	3.397
Cobre mg/g muestra	-----	2.907
Calcio/fósforo	19.86	1.568
Digestibilidad "in vitro"	38.32	46.00

La cuantificación de la digestibilidad "in vitro" de la biomasa con tratamiento previo comparada con la biomasa sin tratamiento previo presentó un ligero incremento. Sin embargo, comparada con algunos alimentos convencionales como huevo, trigo, arroz y pescado que presentan una digestibilidad "in vitro" de 97, 89, 84 y 97 %, respectivamente, es aproximadamente un 50 % menor.

En biomazas provenientes de microorganismos, el problema de la baja digestibilidad se puede deber a:

- Que la pared celular de los microorganismos se caracteriza por tener una gran rigidez ya que los tejidos que tienen función de protección (pared celular), tienden a ser menos digeribles.

- Manipulaciones que se hayan hecho antes de ser evaluada, como son el tratamiento térmico, tiempo de exposición y tipo de calor empleado, ya que pueden ocurrir cambios químicos creando resistencia al ataque de enzimas (en este caso pepsina).

En este caso particular de la biomasa microbiana, el factor limitante ya no sería el alto contenido de calcio que anteriormente se pensó que inhibía la actividad de la pepsina sobre la biomasa. Dado que el incremento en la digestibilidad no es muy notable en la biomasa con tratamiento se piensa que los puntos arriba mencionados y sobre todo los dos primeros podrían influir de manera directa en el bajo porcentaje de digestibilidad en la biomasa.

En este estudio no se realizaron determinaciones de digestibilidad aparente ya que requieren de la evaluación de la proteína en heces de las ratas y para evaluarla mediante ratas de laboratorio hay que restar el nitrógeno endógeno, el nitrógeno correspondiente a la descomposición intestinal, el nitrógeno eliminado en orina, así como el correspondiente a la flora intestinal. Todo ello implica costo de reactivos y otros insumos y como se sabía desde el inicio del experimento el dato de la digestibilidad "in vitro" no se consideró prudente llevar a cabo este análisis. (Método en apéndice B).

IV.2 DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

En el Cuadro IV-3 se presentan los resultados de las determinaciones microbiológicas realizadas antes y después del tratamiento térmico.

La posible presencia de microorganismos patógenos en la biomasa es por contaminación ambiental como partículas de polvo o por el aire que circula por tratarse de un sistema abierto o contaminación de origen humano por manejo del mejayote y biomasa. Otro punto importante es la temperatura de cada de secado (60°C) y el prolongado tiempo de exposición los cuales son favorables para la esporulación de microorganismos como Bacillus cereus.

CUADRO IV-3

MICROORGANISMOS PATOGENOS EN LA BIOMASA MICROBIANA ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO TERMICO

Experimento	microorganismos/g de biomasa
Antes del tratamiento	
<u>Salmonella sp</u>	negativo
<u>Bacillus cereus</u>	negativo
<u>Staphylococcus aureus</u>	negativo
Cuenta total de hongos y levaduras	33.2 x 10 ⁷
Después del tratamiento	
<u>Salmonella sp</u>	negativo
<u>Bacillus cereus</u>	negativo
<u>Staphylococcus aureus</u>	negativo
Cuenta total de hongos y levaduras	negativo

El análisis microbiológico realizado después del segundo tratamiento térmico muestra que se eliminaron los microorganismos patógenos que pudieran afectar la salud de los animales de experimentación. No obstante, no se descarta la posibilidad de que se encuentren toxinas que no se eliminen durante los tratamientos térmicos.

El Cuadro IV-4 presenta los resultados obtenidos para las determinaciones de aflatoxinas y ácidos nucleicos en la biomasa microbiana.

CUADRO IV-4

AFLATOXINAS Y ACIDOS NUCLEICOS DE LA BIOMASA MICROBIANA

Tóxico	Concentración, mg/100 g
Aflatoxinas	-----
Acidos nucleicos	7 - 8

Se ha reportado que el problema más frecuente de toxicidad en biomasa microbiana se debe a la presencia de altas concentraciones de ácidos nucleicos, característica de una velocidad de crecimiento rápida de las células. El contenido de ácidos nucleicos en los microorganismos se encuentra entre 8 - 25 g de ácidos nucleicos por cada 100 g de proteína. (Kihlberg, 1972 en Valderrama, 1989). De acuerdo a lo anterior la concentración de ácidos nucleicos presente en la biomasa está dentro de los límites antes mencionados, y la salud de los animales sujetos a investigación no se vio afectada por estos factores.

IV.3 COMPARACION DE LOS PATRONES DE AMINOACIDOS DE BIOMASAS MICROBIANAS CON LOS ESTANDARES DE LA FAO Y DEL HUEVO

Para tener una idea más cercana del valor nutritivo de las proteínas es conveniente hacer una comparación de su contenido de aminoácidos con los estándares establecidos. En la Figura IV-5 se presenta una comparación del contenido de aminoácidos de los estándares de la FAO y del huevo entero con las biomasa con y sin calcio.

CUADRO IV -5

ANALISIS COMPARATIVO DE AMINOACIDOS EN DIFERENTES FUENTES DE PROTEINA UNICELULAR (CON DIFERENTES SUSTRATOS).

AMINOACIDO g/100 g prot.	PROTEINAS DE REFERENCIA		CULTIVO MIXTO DE NEJAYOTE (3) C/C	CULTIVO MIXTO DE NEJAYOTE (4) S/C
	ESTANDAR FAO (1)	HUEVO ENTERO (2)		
Isoleucina	4.2	6.7	3.0	6.3
Leucina	4.8	8.9	5.1	10.7
Lisina	4.2	6.5	6.6	7.3
Fenilalanina	2.8	8.8	4.5	8.1
+Metionina	2.2	3.2	1.1	2.0
Treonina	2.8	5.1	4.3	8.3
Triptofano	1.4	1.6	1.7	no fue det
Valina	4.2	7.3	4.6	9.6
Tirosina	2.9	4.2	2.7	4.9

+ Perdido durante la hidrólisis

1. Senz, 1972

2. Kihlberg, 1972

3,4 Durán de Bazúa, 1989

En las figuras IV - 1 a IV - 9 se representa el contenido de aminoácidos de los estándares de la FAO y del HUEVO así como los de la biomasa con calcio y biomasa sin calcio.

En lo que se refiere al contenido de aminoácidos de la biomasa sin calcio se observa un ligero aumento, comparado con el de la biomasa con calcio, pero ello se debe a la disminución en el contenido de calcio inicial, lo que hace que otros componentes aumenten en forma proporcional. Si se comparan ahora los gráficos de los aminogramas de la biomasa sin calcio con los estándares (FAO, HUEVO) se observa que son parecidos pero, que la proporción que se guarda entre cada uno de ellos no es similar, y si el valor de una proteína está dado por la secuencia de aminoácidos y la relación que existe entre ellos, el valor nutritivo de la biomasa se ve afectado al presentarse un estado de competencia dado que al encontrarse un aminoácido en mayor proporción con respecto a otro se impide que sean asimilados de forma conveniente, lo anterior se puede observar sobre todo en el contenido de Leucina, Treonina y Valina, al encontrarse en mayor proporción comparados con los estándares.

Debido a la baja digestibilidad de la biomasa lo anterior no llegó a repercutir en la salud de los animales de experimentación.

COMPARACION DE AMINOACIDOS.

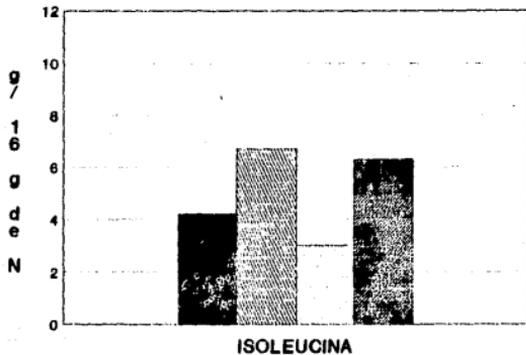


FIG. IV-1

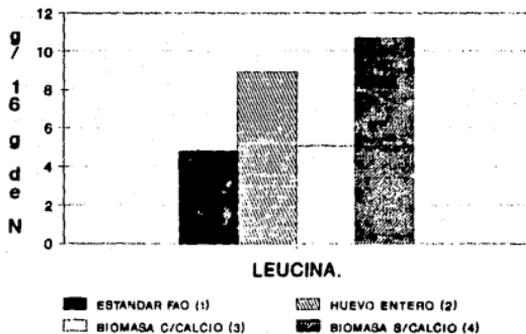


FIG. IV-2

COMPARACION DE AMINOACIDOS.

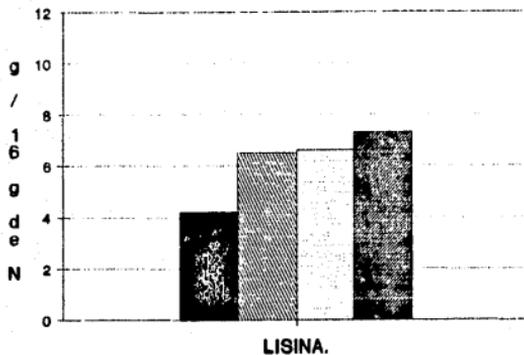
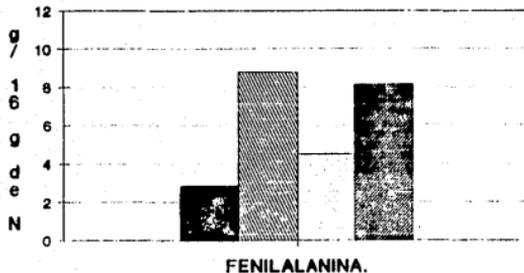


FIG. IV-3



ESTANDAR FAO (1)
 HUEVO ENTERO (2)

BIOMASA C/CALCIO (3)
 BIOMASA S/CALCIO (4)

FIG. IV-4

COMPARACION DE AMINOACIDOS.

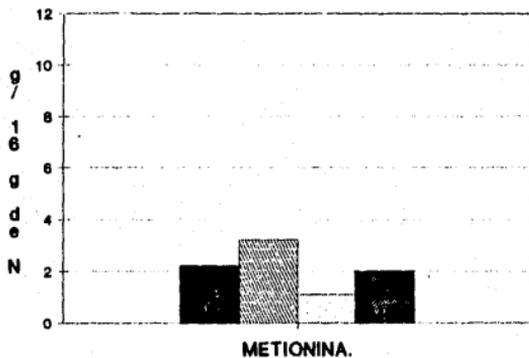


FIG. IV-5

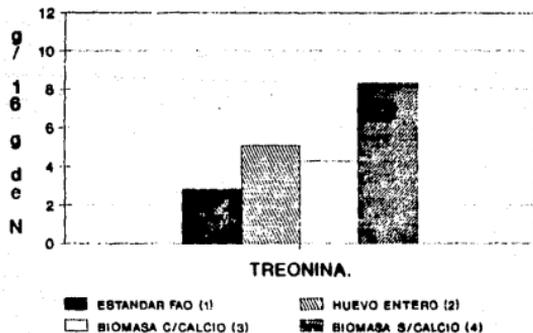


FIG. IV-6

COMPARACION DE AMINOACIDOS.

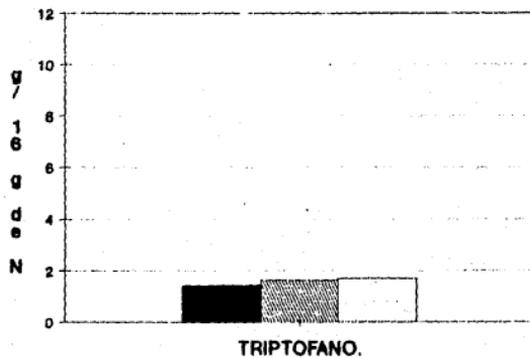


FIG. IV-7

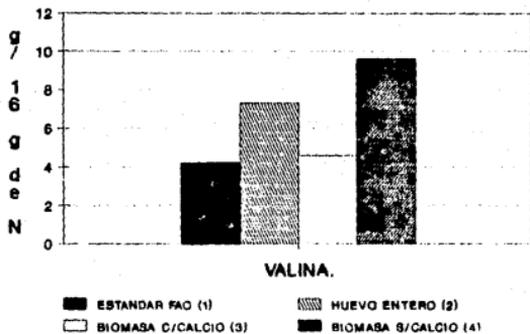


FIG. IV-8

COMPARACION DE AMINOACIDOS.

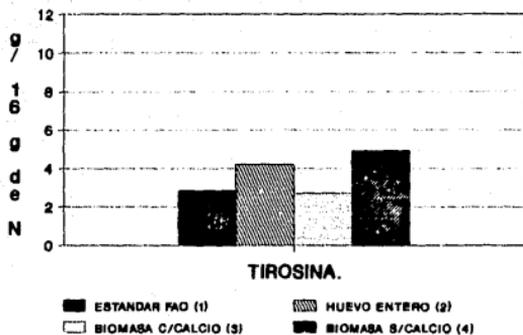


FIG. IV-9

IV.4 EVALUACION PRELIMINAR DE LA BIOMASA CON BAJO CONTENIDO EN CALCIO EN RATAS DE LABORATORIO

Las condiciones ambientales del bioterio fueron: temperatura 15 - 19.5° C, humedad relativa 20 - 70 %, iluminación 12 h y oscuridad 12 h.

De las pruebas realizadas con las ratas se observó que las alimentadas con biomasa tenían un decremento en su peso corporal. No se alcanzó a terminar el periodo de 28 días indicado por la metodología ya que todas fallecieron antes de este lapso. El Cuadro IV-6 presenta los datos obtenidos.

CUADRO IV-6

PROMEDIO DE PESO GANADO, ALIMENTO INGERIDO Y RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA (REP) DE LAS RATAS ALIMENTADAS CON BIOMASA MICROBIANA Y CASEINA (NIVEL DE PROTEINA DEL 10 %)

Dieta		Peso ganado (g)	Alim. Ing. (g)	REP _{exp.}
(1) BIOMASA MICROBIANA	H y M	8.90	77.16	- 1.55
	H (3)	8.16	54.80	- 1.68
	M (3)	9.60	99.50	- 1.43
(2) CASEINA	H y M	59.67	243.09	2.45
	H (3)	51.67	231.50	2.23
	M (3)	67.67	254.67	2.66

(1) De los 6 animales de experimentación solo 3 resistieron más de 14 días (18 días en total), el resto murió en el transcurso del experimento.

(2) Todos los animales de este lote se sacrificaron al morir el último de los alimentados con biomasa, esto ocurrió a los 16 días de iniciar el experimento.

H - Hembras, M - Machos

El comportamiento de los animales durante el tiempo de experimentación se puede ver en las figuras IV - 10 a IV - 16. Los registros correspondientes se encuentran en el Apéndice B.

RATAS ALIMENTADAS CON DIETA TESTIGO.

CASEINA 10%

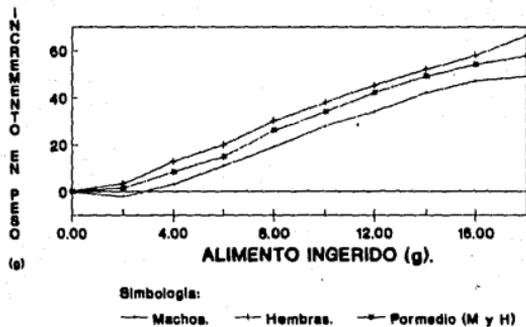


FIG. IV-10

RATAS ALIMENTADAS CON BIOMASA MICROBIANA
RATA 'A'

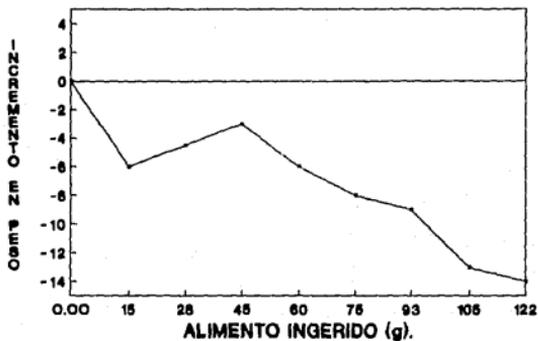


FIG. IV-11

RATA 'B'

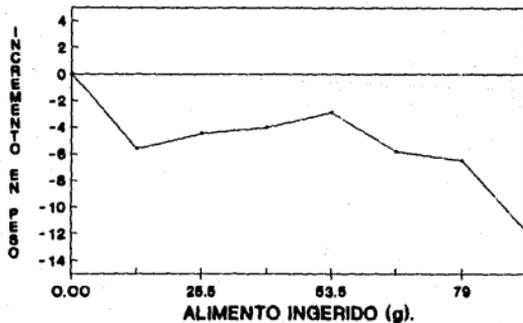


FIG. IV-12

RATAS ALIMENTADAS CON BIOMASA MICROBIANA
RATA 'C'

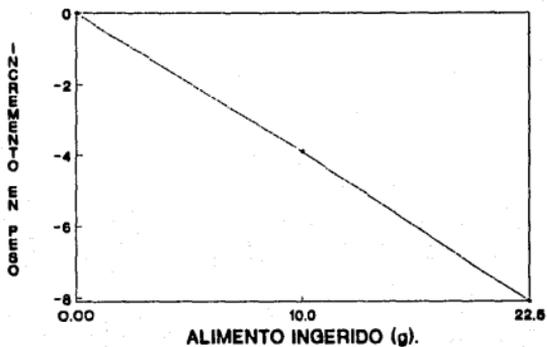


FIG. IV-13

RATA 'D'

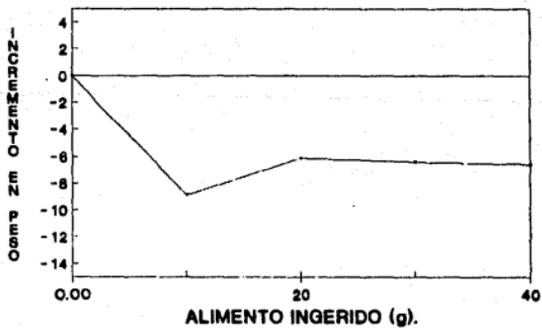


FIG. IV-14

RATAS ALIMENTADAS CON BIOMASA MICROBIANA
RATA 'E'

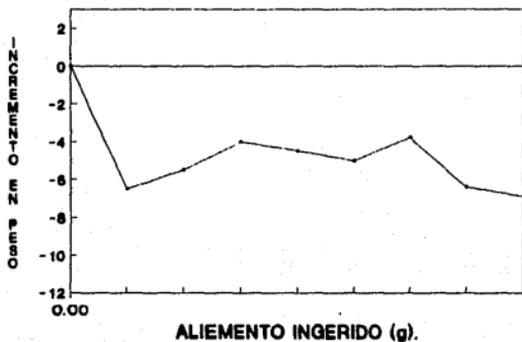


FIG. IV-15

RATA 'F'

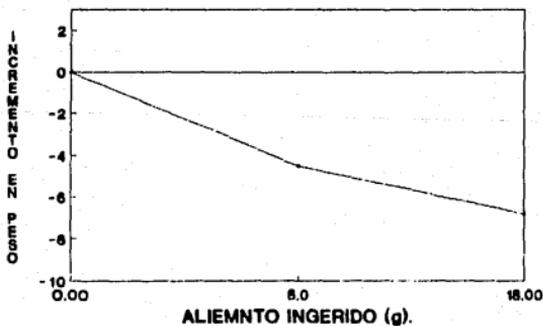


FIG. IV-16

Se observó que la presentación del alimento no fué la más adecuada, dado que un alimento en polvo es un factor que puede desencadenar una serie de trastornos a nivel de tracto respiratorio en roedores. Generalmente se recomienda el uso de alimentos comprimidos que sean tidos por los animales de laboratorio para evitar estos problemas.

De acuerdo con la bibliografía, un huésped común del tracto respiratorio de ratas de laboratorio es el Mycoplasma pulmonis. Generalmente no genera problemas de salud si las ratas están sujetas a condiciones normales; pero si hay algún factor no común, puede manifestarse como un patógeno. En este caso, la presencia de un polvo en el tracto respiratorio es uno de estos factores.

IV.5 PRUEBAS HISTOPATOLÓGICAS

Los hallazgos más importantes fueron en tejido de pulmones, hígado, riñón y bazo y consistieron en procesos inflamatorios y cambios autolíticos.

En pulmones se observó dilatación de bronquiolos, dilatación alveolar, presencia de fibrina y edema, congestión de septos alveolares, material extraño de apariencia cristalina, acúmulos de neutrófilos y macrófagos en alvéolos y vías aéreas, atelectasia, hiperplasia linfóide perivascular y peribronquial.

Todas estas lesiones son comunes en ratas con neumonía enzótica y complicaciones bacterianas.

En hígado se observó una ligera vacuolación y congestión, presencia de hematoïdina y cambios autolíticos.

En riñón se observaron solamente cambios autolíticos.

En bazo se observó una depresión linfóide.

Los cambios encontrados en hígado, riñones y bazo no son concluyentes por lo avanzado de los cambios autolíticos y por artificios de la fijación de los órganos.

Fué notable la diferencia en peso y tamaño del lote experimental con respecto del lote control (alimentado con caseína) y el estado de desnutrición evidenciado por falta de reservas de grasa subcutánea, abdominal, periurinal y pericardiaca, además de la pobre masa muscular y falta de desarrollo de los órganos.

Estudios realizados por Fernández y col., (1985 a, b) y Simek y cols., (1986) [en Galván (1986)] demuestran que ocurre una disminución del peso corporal en ratas sujetas a desnutrición dado que hay un decremento del peso en algunos órganos internos

como el cerebro, hígado, riñones y tejido glandular como la hipófisis, los suprarenales, los ovarios, los testículos y las vesículas seminales y un retraso en el crecimiento corporal.

Si la desnutrición es aplicada a partir del nacimiento en la rata, se reduce el incremento normal del contenido de DNA cerebral total, así como el número de células cerebrales. Esto persiste aún si se aplica la rehabilitación nutricional. Por el contrario, la desnutrición posterior al destete de la rata ocasiona la reducción en la producción de DNA de proteínas reversible por rehabilitación nutricional. (Winick y col., 1970; en Galván, 1988).

Como se mencionaba, de acuerdo a lo encontrado en literatura referente a enfermedades en ratas de laboratorio (Bubos, 1958; Cassell, 1979; Baker, 1990), el Mycoplasma pulmonis es un habitante del tracto respiratorio superior de ratas sin que la enfermedad se manifieste bajo condiciones normales de los animales de experimentación. Sin embargo, bajo ciertas condiciones la enfermedad se manifiesta y provoca inflamación purulenta en cualquier sitio a lo largo del tracto respiratorio, desde las narinas hasta los alvéolos.

Los principales signos clínicos de la micoplasmosis murina respiratoria (MMR) son los estornudos, presencia de porfirinas en narinas y manos, postura encorvado, malestar y ruidos respiratorios.

Las lesiones histopatológicas varían en severidad de acuerdo a la etapa del proceso infeccioso, la hiperplasia linfóide peribronquiolar representa un estadio temprano de la infección y la bronquiectasia caracteriza el estadio final del proceso infeccioso, siendo la MMR la enfermedad infecciosa más problemática encontrada en el uso de ratas para la investigación biomédica.

Por otro lado, comparando el contenido de sodio que aporta la biomasa en la dieta (0.15 %) con el requerido, de acuerdo a Van Hoosier (1977), se tiene 3 veces más de este catión en la dieta con biomasa. El contenido de calcio que aporta la biomasa es de 0.49 % ya en la dieta que es adecuado a los requerimientos propuestos por Van Hoosier (0.5 %). En cuanto al contenido de cobre la biomasa aporta 1.3 g/Kg de dieta, el cual se encuentra también en nivel superior al propuesto por Van Hoosier (5 mg/Kg de dieta).

Lo anterior parece que no afectó de manera determinante en la salud de los animales de experimentación ya que en los exámenes histopatológicos realizados en los diferentes órganos no se encontraron alteraciones producidas por los metales señalados con anterioridad.

En el próximo capítulo se presentan las conclusiones y las recomendaciones derivadas de este estudio.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V.1 CONCLUSIONES

Con base en este estudio sobre el aprovechamiento de la biomasa microbiana como fuente proteica para uso en la alimentación de animales monogástricos se puede concluir lo siguiente:

1. El análisis microbiológico realizado en la biomasa microbiana después de los tratamientos térmicos indica que no hubo efecto negativo sobre los animales de experimentación por microorganismos patógenos en la biomasa.

2. Las determinaciones de aflatoxinas y Acidos nucleicos descartan la posibilidad de la toxicidad de la biomasa, debido a que en el primer caso no se detectó ninguna toxina y, en el segundo, su concentración se encuentra dentro de los límites que se consideran inocuos.

3. El alto contenido de calcio no tiene un efecto notable en la asimilación de la biomasa, tanto en el estudio anterior (Valderrama, 1989) como en este, no obstante las características de la pared celular de la biomasa la hacen inaccesible como complemento alimenticio para animales monogástricos.

4. La presentación del alimento (polvo) influyó de manera determinante en la salud de los animales de experimentación ya que desencadenó trastornos a nivel de tracto respiratorio dado que el Mycoplasma pulmonis es un habitante del tracto respiratorio superior de ratas que se manifestó produciendo inflamaciones purulentas.

5. La baja asimilación de la proteína se reflejó claramente en los resultados obtenidos en la evaluación biológica preliminar, ya que, a pesar de que dicha proteína cuenta con un patrón de aminoácidos bueno y el consumo de alimento fue alto, los animales disminuyeron de peso. Por ello se piensa que, con los resultados obtenidos en este estudio, la biomasa microbiana sin ningún acondicionamiento previo no puede utilizarse como complemento alimenticio para animales monogástricos.

V.2 RECOMENDACIONES

1. Someter a la biomasa a un proceso de ruptura de pared celular para favorecer su disponibilidad antes de proceder a realizar pruebas de digestibilidad "in vitro" y de ensayos biológicos.

2. Además, es conveniente introducir algún otro parámetro de control durante el periodo de prueba con las ratas, además del registro de ganancia en peso y alimento consumido, para verificar el efecto de la biomasa sobre la salud de los animales de experimentación.

3. Si se trabaja con ratas de laboratorio, la presentación del alimento debe de ser en forma compacta (comercialmente conocida como "PELLETS").

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Doctora Carmen Durán de Bazúa por el tiempo dedicado en la estructuración y desarrollo del presente trabajo.

Al jurado por el tiempo empleado en la revisión.

Al Doctor Atonatiu Gómez por su apoyo y orientación.

Asimismo, se agradece el apoyo científico de la M. en C. Ruth Pedroza Islas, de la Universidad Iberoamericana, del Biol. Víctor Manuel Luna Pabello, del I.Q. Hipólito Lucero Sánchez, de la Facultad de Química de la UNAM y de los demás colegas que coadyuvaron para que este trabajo se desarrollara de manera adecuada.

Se agradece en forma especial a los doctores Mateos y Peña, de las Facultades de Medicina Veterinaria y Zootecnia y de Química, respectivamente, por la realización de los estudios histopatológicos.

Este trabajo forma parte de un proyecto financiado por el Conacyt México con las Claves PCCBBNA-020395 y P122CC0863707, por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP) por el gobierno de la República Federal de Alemania (BMFT).

B I B L I O G R A F I A

- Abrams, J.T. 1974. NUTRICION ANIMAL Y DIETETICA VETERINARIA 4a. ed. Ed. Acrilibs. Zaragoza, España. Pp.159-180,191-205.
- Alvarez, A.; Escobrega, C.; Lucario, E.S.; Pulido, R. y Durán de Baza, C. 1985. SECADO DE BIOMASA MICROBIANA OBTENIDA DEL TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA PARA EL USO EN ALIMENTOS BALANCEADOS Presentado en el XVI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1-4 octubre. México, D.F. pp. 4-7
- Andere-Mendiola, G. 1987. TRATAMIENTO BIOLÓGICO AEROBIO DE AGUAS DE DESECHO EN UN MOLINO DE NIXTAMAL EN UN REACTOR DE DISCOS ROTATORIO. Tesis profesional Facultad de Química UNAM. México D.F. pp. 164.
- A.O.A.C. 1980. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 20 th ed. Washington, D.C. EUA. pp. 769.
- APHA. 1980. STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. American Public Health Association. Washington, D.C., EUA.
- Baker, H.J., Lindsey, J.R., Cassell, G.H. 1990. LA RATA DE LABORATORIO: ENFERMEDADES. Audiovisual elaborado por la Escuela de Medicina y Odontología de la Universidad de Alabama, Birmingham. EUA. pp.11.
- Bubos, René. 1956. BACTERIAL AND MYCOTIC INFECTIONS OF MAN. Ed. J.B. Lippincott Company. 3rd. edition. Cap. 29. P. 563.
- Campbell, J.H. 1963. METHODS FOR DETERMINATION OF PER AND NPU. EVALUATION OF PROTEIN QUALITY. National Academic of Science. National Research Council. Washington. D.C. Publication.
- Cassell, G. H. 1979. MYCOTIC AND RICKETTSIAL DISEASES. IN THE LABORATORY RAT, BIOLOGY AND DISEASES. Vol. 1. Cap. 10. Editores Henry J. Baker, J. Russell Lindsey, Steven H. Weisbroth. American College of Laboratory Animals Medicine Series. Academic Press. Nueva York, EUA. pp. 243-259.
- Coates, E. M. 1970. THE STERILIZATION OF LABORATORY ANIMAL DIETS. In NUTRITION AND DISEASE IN EXPERIMENTAL ANIMALS. Cap. 5 Tavernor, W.D. Ed. Londres, Inglaterra. pp. 38-48.
- CONTROL OF DIETS IN LABORATORY ANIMALS EXPERIMENTATION. 1978. A Report of the COMMITTEE ON LABORATORY ANIMAL RESOURCES NATIONAL RESEARCH COUNCIL. National Academy of Sciences. Washington, D.C. EUA.

- Durán, C. 1902. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. Versión en español de la disertación doctoral. Pub. Facultad de Química, UNAM. México D.F. pp. 112
- Dye, J.F. y Tuepker J.L. 1971. WATER QUALITY AND TREATMENT. Cap. 9: In "A HANDBOOK OF PUBLIC WATER SUPPLIES". Preparado por "the American Water Works Association, Inc.". 3a. ed. Mc Graw Hill Book Co. Nueva York, EUA.
- Escárrega, C. y Pulido, R. 1986. MODELO CINETICO PARA UN REACTOR BIOLÓGICO ROTATORIO USADO EN EL TRATAMIENTO AEROBIO DE EFLUENTES. Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Estrada, O.C.; Herrera, M.L. y Lara, A.V. 1986. HARINA DE MAIZ NIXTAMALIZADA, ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL PROCESO TRADICIONAL Y EL PROCESO DE EXTRUSION. Tesis profesional. Escuela de Química, Universidad La Salle, México D.F.
- Flores-Mancilla, E. 1989. ALIMENTACION EN ANIMALES DE LABORATORIO. Instituto de Fisiología Celular. UNAM. México, D.F. pp 21 . .
- Galván, A. J. 1986. EFECTO DE LA DESNUTRICION PROTEINICA SOBRE EL NUCLEO SUPRAQUIASMATICO : UN ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO EN RATAS CEPA SPRAGUE - DAWLEY. Tesis profesional, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México D.F.
- Garza, C. et al 1983. MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA SANITARIA. 1a. ed. Ed. IPN. México, D.F.
- Gómez, A. 1990. Enfermedades en ratas de laboratorio. Comunicación personal. Bioterio, Facultad de Química UNAM.
- INEGI-SECOFI-SPP. 1986. ABASTO Y COMERCIALIZACION DE PRODUCTOS BASICOS. MAIZ. Sistema de Vigilancia Alimentaria y Nutricional. México D.F. pp. 56
- Lane-Peter, W. 1970. THE FORMULATION OF LABORATORY ANIMAL DIETS-SOME PRACTICAL CONSIDERATIONS. In "Nutrition and Disease in experimental animals". Cap. 7. Ed. W.D. Tavernor. Londres, Inglaterra. Pp. 64-71.
- Lane-Peter, P. 1971. THE LABORATORY ANIMAL - PRINCIPLES AND PRACTICE -. Academic Press. Londres, Inglaterra.
- Luna-Pabello, V.M. 1987. ESTUDIO DE LOS PROTOZOARIOS CILIADOS PRESENTES EN UN SISTEMA DE TRATAMIENTO POR MEDIO DE BIODISCOS. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. pp. 86

- Mucino, R. 1989. EFECTO DEL ENDURECIMIENTO ACELERADO SOBRE EL CONTENIDO DE LOS IONES Ca, Mg Y ACIDO FITICO EN FRIJOL. Tesis profesional Facultad de Química, UNAM. México, D.F. pp 82.
- MANUAL DE AGUAS PARA USOS INDUSTRIALES. 1976. 3a. ed. Ed. Limusa. American Society for Testing and Materials. Philadelphia, Pennsylvania. EUA.
- Montesinos, M.A. y Durán, C. 1986. ESTUDIO DINAMICO DE UN REACTOR BIOLÓGICO EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEINA MICROBIANA. Presentado en el XVII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1-4 octubre. Cholula, Pue. México.
- Monroy, O. y Viniegra, G. 1981. BIOTECNOLOGIA PARA EL APROVECHAMIENTO DE LOS DESPERDICIOS ORGANICOS. Cap. 3. Editor. Quintero, R. Ed. Limusa. México, D.F. pp. 177-187.
- NATIONAL COLLEGE OF FOOD TECHNOLOGY. 1982. Aislamiento e identificación de bacterias patógenas. Universidad de Reading. Inglaterra.
- Navarrete, R., Osorio, I. y Durán, C. 1989. Informe interno de trabajo. NEXA-89-02. Pub. Fac. Química, UNAM. México D.F.
- Norouzian, M. y Deloya, M.M. 1984. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA UNIDAD DE BIODISCOS ESTRUCTURALMENTE MODIFICADA. Pub. Inst. de Ingeniería. UNAM. México, D.F. pp. 119
- NUTRIENT REQUIREMENTS OF LABORATORY ANIMALS. 3rd. revised edition, 1978 number 10. NUTRIENT REQUIREMENTS OF DOMESTIC ANIMALS. The National Research Council.
- Pedroza-Islas, R. 1985. ESTUDIO DE LA DEGRADACION BIOLÓGICA AEROBIA DE LOS EFLUENTES DE LA NIXTAMALIZACION. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. México, D.F. pp. 163.
- Pedroza, R. y Durán, C. 1985. PRODUCCION DE PROTEINA UNICELULAR DE DESECHOS (PUDC) A PARTIR DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIALIZACION DEL MAIZ PARA CONSUMO HUMANO. Tecnol. Aliment. (Mex.), 20(6):3-10.
- Pedroza, R. y Durán, C. 1987. RBC CHARACTERISTIC FOR NEJAYOTE AEROBIC TREATMENT. Environmental Technology Letters, 8: 579-588.
- Pérez-Gil, F. 1980. Enfermedades respiratorias en animales de laboratorio. Comunicación personal. Instituto de Enfermedades Respiratorias.
- Porrás, E. 1990. Manejo de ratas de laboratorio. Comunicación personal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.

- Rivera-Brechu, M.E. y Torreblanca, R.A. 1985. ESTUDIO SOBRE LA CALIDAD DEL MAIZ QUE SE UTILIZA EN LOS MOLINOS PARA NIXTAMAL EN EL DISTRITO FEDERAL. Tecnol. Aliment. (Méx.), 20(1):21-25.
- Rogers, A. E. 1979. NUTRITION. In "THE LABORATORY RAT, BIOLOGY AND DISEASES. Vol. 1. Cap. 6. Editores Henry J. Baker, J. Russell Lindsey, Steven H. Weisbroth. American College of Laboratory Animal Medicine Series. Academic Press. Nueva York, EUA. pp. 123 - 129.
- Sotelo, A., and Lucas, B., 1978. DETERMINATION OF NET PROTEIN UTILIZATION USING WHOLE CARCASS, HIND LEG OR LIVER OF THE RAT AND ITS RELATIONSHIP WITH PROTEIN EFFICIENCY RATIO DETERMINATION. J. of Nutrition 108(1).
- Tejada de Hernández, I. 1983. MANUAL DE LABORATORIO PARA ANALISIS DE INGREDIENTES UTILIZADOS EN LA ALIMENTACION ANIMAL. Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C. 1a. edición. México D.F.
- Valderrama, S.B. 1989. ESTUDIOS QUIMICOS Y BIOLOGICOS DE LA BIOMASA MICROBIANA GENERADA EN UN SISTEMA AEROBIO DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. Tesis profesional Facultad de Química, UNAM. Mexico D.F. pp. 85.
- Van Hoosier, Jr. 1977. La rata de laboratorio, Series coordinadas por G.L. Van Hoosier, Jr. American College of Laboratory Animal Medicine and Washington State University College of Veterinary Medicine. Seattle, EUA.
- Williams, D.R. 1970. Cap. 6. QUALITY CONTROL OF EXPERIMENTAL ANIMAL FEEDING STUFFS. In "NUTRITION AND DISEASE IN EXPERIMENTAL ANIMALS". Editor W.D. Tavernor. Londres, Inglaterra. Pp. 72-79.

A P E N D I C E A

DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO)

MÉTODO VOLUMÉTRICO DE REFLUJO CON DICROMATO DE POTASIO (APHA, 1980)

Esta prueba se basa en el principio de que la mayoría de los compuestos químicos, orgánicos e inorgánicos son oxidados a CO_2 , SO_2 , H_2O , NO_2 , etc., por un agente fuertemente oxidante como el dicromato de potasio, bajo condiciones ácidas. La materia orgánica e inorgánica es oxidada y el ión dicromato amarillo, es consumido y reemplazado por el ión crómico de color verde. Se adiciona sulfato de plata como catalizador:



Se titula el dicromato remanente con una solución valorada de sulfato ferroso amoniacal $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en presencia de ferroína (monohidrato de fenantrolina en solución acuosa) como indicador. El punto final de la titulación corresponde a un color café rojizo debido a la formación de un complejo de ferro-fenantrolina.

INTERFERENCIAS

Las sustancias inorgánicas como los iones ferroso, sulfato, sulfito y tiosulfato se oxidan bajo ciertas condiciones y crean una DQO inorgánica, la cual interfiere cuando se estima el contenido del agua residual.

El ión cloruro interfiere, pero se evita al agregar sulfato mercurico.

Nota: Mediante esta prueba no es posible conocer el tipo de compuestos orgánicos presentes, ni diferenciar entre material biodegradable y sustancias tóxicas, por lo cual sólo constituye un análisis para la determinación de carbono orgánico total.

REACTIVOS

Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 0.25 N
 Sulfato de plata (Ag_2SO_4) cristales
 Sulfato de plata-ac. sulfúrico conc. ($\text{Ag}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$)
 Disolver 22 g de sulfato de plata en 4 kg de ac. sulfúrico conc.
 Guardar en lco. ámbar.
 Acido sulfúrico conc. (H_2SO_4)
 Solución de ferroína como indicador
 Sulfato ferroso amoniacal ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.05 N
 Sulfato de mercurio (HgSO_4)

PROCEDIMIENTO

Tratamiento de la muestra

- 1.- Centrifugar las muestras por analizar (3,600 rpm a 5°C durante 15 min)
- 2.- Poner en el recipiente de reflujo:
 - 10 ml de muestra diluida (con agua destilada) en proporciones 1:50 para muestras concentradas y 5:50 para aquellas provenientes del sistema de tratamiento. En la preparación del blanco (testigo) se utilizan 10 ml de agua destilada.
 - 0.2 g de $HgSO_4$
 - 5 ml de $K_2Cr_2O_7$ 0.25 N
- 3.- Colocar el refrigerante y añadir lentamente 15 ml de sol. de $Ag_2SO_4 - H_2SO_4$.

Reflujo:

- 4.- Colocar los recipientes de reflujo en la parrilla eléctrica, manteniéndolos en reflujo durante dos horas.

Al concluir el reflujo, el dicromato remanente se titula con sulfato ferroso amoniacal 0.05 N empleando ferroína como indicador, el punto final es el cambio de coloración de azul verdoso a café rojizo.

Nota: Después de concluir el reflujo lavar los refrigerantes con 40 ml de agua destilada.

CALCULOS

$$\text{mg DQO} / l = (a - b) N 8000 / \text{ml mtra.} (f)$$

donde:

a = Volumen de sulfato ferroso amoniacal gastado en el blanco
b = Volumen de sulfato ferroso amoniacal gastado en la muestra
N = Normalidad del sulfato ferroso amoniacal
f = Fracción volumétrica decimal de la muestra inicial en la solución de la cual se tomó la alícuota de 10 ml para la determinación

Normalidad del sulfato ferroso amoniacal (FAS)

En un matraz se coloca:

- 10 ml de dicromato de potasio 0.05 N
- 40 ml de agua destilada
- 10 ml de ac. sulfúrico conc. (enfriando constantemente)
- 2 gotas de ferroína como indicador. Agitar.

Valorar con sulfato ferroso amoniacal 0.05 N, hasta vire del indicador de azul a café rojizo.

Operaciones:

$$N_{FAS} = \frac{\text{ml de dicromato de potasio 0.05 N} \times \text{Normalidad del mismo}}{\text{ml del FAS empleados}}$$

$$N_{FAS} = \frac{10 \times 0.05}{\text{ml FAS empleados}}$$

NITROGENO KJELDAHL

Es la determinación de la cantidad total de nitrógeno orgánico contenido en una muestra, sin diferenciar el tipo de compuesto al que pertenece. El nitrógeno esencial para el crecimiento de los microorganismos constituye con el fósforo y el carbono uno de los nutrientes de mayor importancia.

La proteína cruda es un dato obtenido a partir del nitrógeno total de la muestra; suponiendo que las proteínas tienen un contenido invariable de 16 % de nitrógeno el factor que resulta de $100 / 16 = 6.25$. La excepción son las proteínas que provienen de la leche donde el factor es de 6.38 y las del trigo con factor de 5.7.

FUNDAMENTO:

Las proteínas y demás materia orgánica son oxidadas por el ac. sulfúrico; el nitrógeno que se encuentra en forma orgánica se fija como sulfato de amonio. Al hacer reaccionar esta sal con una base fuerte se desprende amoníaco que se destila, y se recibe en un volumen conocido de ácido valorado. Por titulación del ácido no neutralizado se calcula la cantidad de amoníaco desprendido y así, la cantidad de nitrógeno de la muestra. El porcentaje de nitrógeno multiplicado por el factor 6.25 da el porcentaje de proteína cruda. (AOAC, 1980).

A P E N D I C E B

MÉTODOS PARA DETERMINACIONES QUÍMICAS

Preparación de solución madre

La muestra (biomasa bajo contenido en calcio) se inclina a 550°C las cenizas que se obtienen se digieren con 5 gotas de ácido nítrico y 40 ml de ácido clorhídrico concentrado, se filtra en un matraz aforado de 100 ml (de esta solución se puede tomar muestra para la determinación de casi todos los minerales).

Determinación de calcio

Tomar 5 ml de la solución madre en un vaso de precipitado de 150 ml, agregar 45 ml de agua y calentar hasta ebullición, agregar 40 ml de oxalato de amonio al 4% y mantener en calentamiento hasta ebullición, agregar 2-4 gotas de rojo de metilo (indicador), neutralizar con unas gotas de hidróxido de amonio 1:1 hasta un vire amarillo, tapar el vaso con un vidrio de reloj y dejar precipitar durante 24 horas.

Después de esto se filtra la solución en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con papel filtro No. 1, se enjuaga con un promedio de 400 ml de agua destilada o hasta que el papel no presente coloración amarilla, enjuagar por último con hidróxido de amonio 1:50 y después con agua destilada, desechar el líquido. Al papel filtro se le coloca en un vaso de precipitado y se le agrega una solución caliente de 40 ml de ácido sulfúrico 1:10 y 60 ml de agua y se procede a titular con permanganato de potasio 0.1 N hasta un ligero vire rosa.

Cálculos:

$$\% \text{ Ca} = \frac{(\text{ml de } \text{KMnO}_4 \text{ en muestra} - \text{ml blanco}) \cdot \text{N } \text{KMnO}_4 \cdot (\text{eq. Ca.}) \cdot 100}{\text{gramos de muestra en alícuota}}$$

En el caso particular de este trabajo se tiene lo siguiente:

Miliequivalentes de calcio	= 0.02
Gasto de KMnO_4 blanco	= 0.06
Gasto de KMnO_4 muestra	= 2.20
Normalidad del KMnO_4	= 0.10
Gramos de mtra. en alíc.	= 0.43857
Gramos de mtra. para sol. madre	= 8.7714

Determinación de cobre

Se llevó a cabo por absorción atómica en un aparato Perkin Elmer.

$$\begin{aligned} \text{Lectura obtenida} &= X \\ Y \text{ ppm de Cu} &= (X) (100) \end{aligned}$$

Para obtener los mg de cobre / gramo de muestra se procede de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} X(100) &= Y \text{ ppm de Cu (mg de Cu / l)} = Y' \text{ mg de Cu / ml} \\ Z \text{ g de biom / 100 ml} &= Z' \text{ g biom. / ml} \\ Y' \text{ mg de Cu / Z' g de biom.} &= W \text{ mg Cu / g biom.} \end{aligned}$$

En el caso particular de este trabajo se tiene lo siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Lectura obtenida} &= 2.55 \\ \text{ppm de Cu} &= \text{lec. por } 100 \end{aligned}$$

Para obtener los mg de cobre/gramo de muestra se procede de la siguiente manera :

$$\begin{aligned} 2.55(100) &= 255 \text{ ppm de Cu (mg/l)} = 0.255 \text{ mg de Cu / ml} \\ 8.7714 \text{ g biom/100 ml} &= 0.08714 \text{ g biom/ml} \\ 0.255 \text{ mg Cu / 0.08714 g biom} &= 2.907 \text{ mg Cu / g biom} \end{aligned}$$

Determinación de sodio

Se llevó a cabo por espectrofotometría de flama.

$$\begin{aligned} \text{Lectura obtenida} &= X \\ Y \text{ ppm de Na} &= (X) (100) \end{aligned}$$

Para obtener los mg de sodio / gramo de muestra se procede de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} X(100) &= Y \text{ ppm de Na (mg de Na / l)} = Y' \text{ mg de Na / ml} \\ Z \text{ g de biom / 100 ml} &= Z' \text{ g biom. / ml} \\ Y' \text{ mg de Na / Z' g de biom.} &= W \text{ mg Na / g biom.} \end{aligned}$$

En el caso particular de este trabajo se tiene lo siguiente :

Lectura obtenida = 2.98

ppm de Na = lect. x 100

2.98(100) = 298 mg Na / l = 0.298 mg Na / ml

8.7714 g biom/100 ml = 0.08714 g biom/ml

0.298 mg Na / 0.08714 g biom = 3.397 mg Na / g biom.

Determinación de fósforo

Tomar 5 ml de la solución madre en un matraz aforado de 100 ml, agregar 5 ml de reactivo para fósforo, 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado y se lleva al aforo con agua destilada, se deja reposar durante 10 min. Tomar lectura en un espectrofotómetro a 400 nm.

Reactivo para fósforo

20 g de molibdato de amonio, 1 g de metavanadato de amonio, 160 ml de ácido clorhídrico conc. Mezclar perfectamente y llevar a un litro.

Solución "stock" de fósforo: 0.8788 g K_2HPO_4 / 100 ml

Solución tipo: Alicuota de 5 ml de la solución "stock" en 200 ml

Curva: 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, ... ml de la solución tipo, agregar 5 ml del reactivo para fósforo, 0.5 ml de HCl conc. para cada muestra, aforar a 25 ml dejar reaccionar durante 10 min y leer a 400 nm.

CALCULOS

$(0.8788 \text{ g } K_2HPO_4 / 100 \text{ ml})(5 \text{ ml} / 200) = 0.0002197 \text{ g/ml } K_2HPO_4$
 $= 0.2197 \text{ mg/ml(sol.tipo) }$

Considerando que: 0.8788 g de K_2HPO_4 contienen 0.39457 g de fósforo, entonces tomando en cuenta las diluciones para preparar la solución tipo se tiene 0.09864 mg / ml de fósforo en ésta.

Para el caso particular de este trabajo se tiene lo siguiente:

CUADRO B -1

CURVA PATRON

F O S F O R O

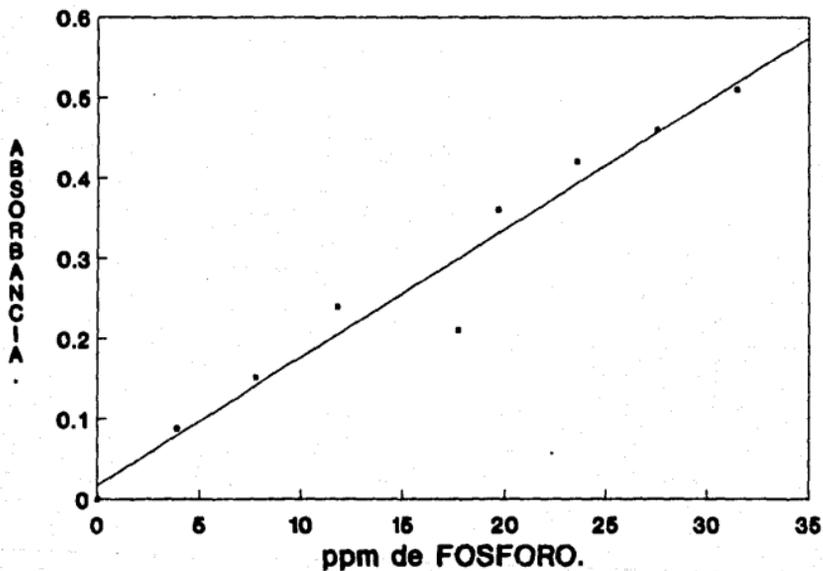
mi. sol. tipo	mg	mg / ml	ABS (y)00	ppm Fósforo (x)
0	0.00000	0.000000	0.000	0.00
1	0.09864	0.003949	0.098	3.90
2	0.19728	0.007891	0.152	7.80
3	0.29592	0.011836	0.240	11.80
4	0.39456	0.015782	0.210	17.70
5	0.49320	0.019728	0.360	19.70
6	0.59184	0.023673	0.420	23.60
7	0.69048	0.027619	0.460	27.60
8	0.78912	0.031564	0.510	31.50

Interpolando en la curva patrón la absorbancia del problema (0.55) se encontraron 30.00 ppm de fósforo.

Para determinar los mg de fósforo / mg de muestra se procede de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 (8.7714 \text{ g mtra./100 ml})(5 \text{ ml/100 ml}) &= 0.0043857 \text{ g mtra./ml} \\
 &= 4385.7 \text{ mg mtra./ l} \\
 \text{entonces: } 30.0 \text{ mg de P /4335.7 mg mtra} &= 0.0068404 \text{ mg P /mg mtra} \\
 &= 6.8404 \text{ mg P / g mtra}
 \end{aligned}$$

CURVA PATRON DE FOSFORO.



Digestibilidad "in vitro" (Método de Akbson y Stahmann)

En un vaso de precipitados de 600 ml colocar un gramo de muestra problema y digerirla de la siguiente manera: añadir 430 ml de agua, 0.5 g de pepsina y 16 ml de HCl al 10 %, agitar perfectamente y colocar en una estufa a 38 - 40°C durante 16 h, agitando de vez en cuando. Transcurrido este tiempo, añadirle 11 ml de HCl al 10 %, agitar y dejar a la misma temperatura durante 8 h, pasadas las cuales se añaden otros 11 ml de HCl al 10 %, agitar y dejar nuevamente durante 16 h en reposo, transcurridas las cuales añadir 11 ml de HCl al 10 % y dejar por último durante 8 h más a 38 - 40°C. Pasadas las últimas 8 h enfriar el vaso y su contenido, filtrar, lavar con agua caliente el vaso y el residuo en el filtro. Determinar las proteínas por macrokjeldahl y las proteínas totales por microkjeldahl.

- Determinación de proteínas por microkjeldahl

Reactivos: Ac. sulfúrico conc., óxido de mercurio, sulfato de potasio, ácido bórico con indicadores (+), hidróxido de sodio 1:1. Indicador A: 100 mg de fenoltaleína aforados a 100 ml con etanol. Indicador B: 33 mg de verde de bromocresol y 66 mg de rojo de metilo aforados a 100 ml con etanol.

(+) Se pesan 5 g de ácido bórico y se colocan en matraz aforado de 1 L, se adiciona agua hasta disolver y a continuación se agregan 35 ml de indicador A y 10 ml de indicador B. Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido o base según se requiera y aforar a un litro con agua.

Determinación:

Pesar de 50 a 100 mg de muestra en un pedazo pequeño de papel delgado, envolver bien para que no se seque la muestra e introducir en el matraz de microkjeldahl; añadir un gramo de sulfato de potasio, 40 mg de óxido mercurico, 3 ml de ac. sulfúrico conc. y unas perlas de vidrio. Colocar el matraz en el digestor y calentarlo hasta la total destrucción de la materia orgánica, es decir, hasta que el contenido del matraz esté completamente claro y no contenga residuos de materia orgánica. Dejar enfriar, disolver el residuo en la menor cantidad de agua posible (5 - 10 ml), pasar esto al matraz de destilación, enjuagar el matraz dos veces con la mínima cantidad de agua posible y añadir estos lavados al aparato de destilación. A la salida del condensador del destilador colocar un vaso de precipitados de 250 ml que contenga 50 ml de ac. bórico. Se añaden 20 ml de NaOH 1:1 a la copa de adición del microdestilador y con mucho cuidado se abre la llave de adición del microdestilador para poder liberar el amoníaco de la mezcla de reacción. Continuar la destilación hasta obtener 50 ml del destilado, por último retirar el vaso del dispositivo y abrir la

llave de succión, sacar el residuo de la mezcla de reacción. Pasar el contenido del vaso a un matraz Erlenmeyer y titular con una solución valorada de HCl 0.01 N, hasta el virar del color verde a rojo fresa. Hacer un blanco utilizando un pedazo de papel igual al que se usó para la muestra procediendo de la misma manera. La determinación de proteínas por macrokjeldahl se hace igual que para el análisis proximal.

DIGESTIBILIDAD APARENTE DE LA PROTEINA USANDO Cr_2O_3 COMO MARCADOR EN LAS DIETAS (Schurch et al., 1950 en Mucino, M. 1959).

La recuperación del Cr_2O_3 se realiza a través de la recolección de heces 5 días antes de que finalice la prueba.

PAN DE CROMO

Se mezclan 30 g de Cr_2O_3 con 70 g de almidón y 40 ml de agua destilada. La masa se extiende sobre una hoja de papel aluminio y se seca a 90°C durante 8 horas. El pan de cromo ya seco se muele y tamiza (malla 40).

La concentración de pan de cromo en las dietas es del 1 %.

DIGESTIBILIDAD APARENTE (D.A.)

Mezcla digestora - Disolver 2.0 g de molibdato de sodio en 30 ml de agua, añadir lentamente 30 ml de H_2SO_4 conc. con enfriamiento constante en un baño de hielo, cuando se haya enfriado añadir 40 ml de HClO₄ (ácido perclórico) al 70 %. Almacenar la solución en un frasco ámbar no más de dos semanas.

Pesar 15 mg de Cr_2O_3 para la solución estándar; 150 mg de heces de las dietas en estudio; 100 mg de las heces de las dietas de control y 1.0 g de las dietas. Colocar las muestras en matraces microkjeldahl (hacer un duplicado por cada muestra), agregar 2 ml de HNO_3 conc. (solamente en dietas agregar 3.0 ml). Digerir hasta que se hayan eliminado todos los gases de nitrógeno; hasta sequedad total. Enfriar y agregar para heces y dietas 3 y 5 ml de la mezcla digestora respectivamente. Poner el digestor a mediana temperatura y esperar a que el color verde del óxido crómico pase a color naranja (dicromato). Esperar 20 min. de ebullición, enfriar y aforar a 100 ml con H_2SO_4 1.1 M únicamente para la solución estándar, para las muestras de heces y dietas aforar a 25 ml con H_2SO_4 1.1 M. Leer a 440 nm contra un blanco de agua destilada. Determinar el % de Cr_2O_3 mediante la siguiente ecuación:

$$\% Cr_2O_3 = \frac{\text{Abs. muestra} \cdot 15 \text{ mg } Cr_2O_3 \cdot 25 \text{ ml}}{\text{Abs. estándar} \cdot 100 \text{ ml} \cdot \text{g de muestra}} \cdot 100$$

Posteriormente con estos datos, % de Cr_2O_3 y % Nitrogeno en dietas y heces, se calcula el % de digestibilidad Aparente de cada dieta con la ecuación de Edwars y Gillis (1953).

$$\% \text{ D.A.} = 100 - (100 \cdot \frac{\% \text{ N en heces} \cdot \% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ dieta}}{\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces} \cdot \% \text{ N en dieta}})$$

DETERMINACION DE ACIDOS NUCLEICOS

- Aislamiento de DNA

Material y equipo:

Mortero con pistilo, dos vasos de precipitados de 250 ml, tres pipetas graduadas de 1 ml y tres de cinco ml, dos pipetas pasteur, cuatro tubos de centrifuga de 50 ml, un embudo de filtración, una gradilla, 10 tubos de ensaye de 20 x 20, un trozo de gasa, un matrâz con tapón esmerilado y una centrifuga.

Reactivos:

a) solución amortiguadora de SAS; Tris 0.01 M, Sacarosa 0.3 M, Cloruro de magnesio 0.005 M, b) Solución amortiguadora de TRIS 0.4 M a pH = 5, c) lauril sulfato de sodio al 4 %, d) E.D.T.A. salino pH = 8; E.D.T.A. 0.1 M, NaCl 0.15 M, e) solución amortiguadora de CSC; citrato de sodio 0.15 M, NaCl 1.5 M, f) solución amortiguadora de dsc; dilución de la solución amortiguadora CSC 1:1000. g) etanol frío. h) mezcla de Sevag; cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), i) hielo seco, j) NaCl 4M.

Determinación:

Antes de empezar, colocar dos vasos de precipitados con 50 ml de etanol cada uno en el congelador. Pesar 1 g de muestra, y molerla con un trocito de hielo seco en un mortero hasta homogenizar el material y quede finamente molido, pasar la muestra a un vaso de precipitados y agregar un trocito de hielo seco y 20 ml de la solución amortiguadora SAS, dejar congelar por 10 min y descongelar a chorro de agua. Pasar el homogenizado por una gasa doble y exprimir, centrifugar el filtrado por 5 min a 3000 rpm, desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 5 ml de solución amortiguadora TRIS pH 5, añadir 5 ml de lauril sulfato de sodio y homogenizar con la varilla de vidrio, añadir un ml de solución amortiguadora CSC y homogenizar. Verter el contenido del tubo, muy lentamente a un vaso de precipitados que contenga 50 ml de etanol frío. En este paso el DNA precipitado por el alcohol, asciende como una nata blanca, pasar la nata a un matrâz y redisolverlo con 20 ml de solución amortiguadora "dsc", ayudando

a la disolución con una varilla de vidrio. Adicionar 5 ml de NaCl 4 M y añadir igual volumen de mezcla de Sevag y agitar severamente por 8 min. Centrifugar por 5 min a 3000 rpm, en este caso se obtienen tres fases: en la superior el DNA, en la media la proteína y en la inferior la mezcla de Sevag. Finalmente, separar con pipeta la capa superior y verterla lentamente a un vaso de precipitados que contenga 50 ml de etanol frío, en este paso el DNA libre de proteína asciende nuevamente, sacar el DNA con una varilla de vidrio, eliminar el alcohol presionando ligeramente contra la pared del vaso. Pesar.

- Aislamiento de RNA

Reactivos:

Solución buffer de fosfatos 1 M y pH = 7, Solución de E.D.T.A. 100 mM, Solución de fenol al 90 %, Cloroformo, Acetato de potasio 1.5 M y pH = 5, etanol absoluto, solución etanol:agua 3:1, éter.

Determinación:

Homogeneizar la muestra previamente pesada, en un mortero con 15 ml de solución amortiguadora ("buffer") de fosfatos y 1.6 ml de E.D.T.A 100 mM, filtrar el homogenizado a través de gasa y exprimir, mezclar el filtrado con 7.5 ml de fenol al 90 % y 7.5 ml de cloroformo un minuto a temperatura ambiente, enseguida enfriar la suspensión en baño de hielo por 5 min y romper la emulsión por centrifugación a no menos de 2500 rpm durante 15 min. Separar la fase acuosa (superior) que contiene el RNA, para quitar las proteínas, agitar con una varilla de vidrio la fase orgánica que quedó en el tubo de centrifuga y volver a centrifugar para obtener más fase acuosa, medir el volumen total de la fase acuosa y agregar un décimo de dicho volumen de acetato de potasio. Precipitar el RNA agregando dos veces el volumen de la fase acuosa de etanol absoluto y enfriar la solución 5 min en hielo y centrifugar 5 min a 2500 rpm. Lavar el precipitado con 5 ml de etanol-agua y volver a centrifugar por 2 min a 2500 rpm, finalmente lavar con 5 ml de éter y centrifugar por 2 min dejar secar y pesar.

DETERMINACION DE AFLATOXINAS

Extracción:

Se muele y homogeneiza la muestra (5 g) y se coloca en un matraz de 500 ml, se adicionan 25 ml de agua destilada, tierra de diatomeas y 250 ml de cloroformo, se agita perfectamente durante 30 min., pasado este tiempo se filtra en papel Whatmann # 4. El filtrado se coloca en un matraz bola de 500 ml para su evaporación en el rotavapor a 60°C con vacío, hasta obtener 10 ml.

Purificación:

Los 10 ml de muestra extraída se adicionan a una columna de gel de sílice (60-200 mallas).

Columna:

La columna de vidrio de 30 cm de altura y 2.5 cm de diámetro se acopla con un poco de lana de vidrio en el fondo como soporte y se adicionan 5 g de sulfato de sodio anhidro. Posteriormente se llena de cloroformo y en seguida se añaden 10 g de gel de sílice (60-200 mallas) resuspendiendo en cloroformo. Se empieza a eluir y el mismo tiempo se adicionan cloroformo con el fin de lavar las paredes de la columna y empacar la misma. Por último se adicionan 15 g de sulfato de sodio y se eluye el cloroformo hasta casi el nivel de sulfato. Se adicionan los 10 ml de muestra concentrada y se lava a la máxima velocidad de elución, primero con 150 ml de hexano seguido de 150 ml de éter etílico, ambas fracciones se desechan. Las aflatoxinas se eluyen con 150 ml de etanol:cloroformo (3:97). Esta fracción se colecta hasta que la elución termine, se concentra hasta sequedad y, resuspendiendo en 2 ml de cloroformo y transfiriendo a un frasco vial. El contenido del frasco vial se evapora hasta sequedad con nitrógeno gaseoso. Las aflatoxinas se resuspenden cuantitativamente con 500 µl de cloroformo o benceno-acetonitrilo (98-2) para posterior análisis de cromatografía en capa fina.

Determinación:

La determinación se efectúa en placas de gel de sílice en capa fina.

Preparación de placas:

Se resuspenden 30 g de gel de sílice (Kieselgel, Merck) en 65 ml de agua destilada en un matríz de tapon de rosca se agita y aplica a placas de vidrio de 20 x 20 con espesor de 0.25 mm empleándose un aplicador de gel para placas. Se deja secar a temperatura ambiente durante 15 min y se activa en un horno a 110°C por una hora.

Aplicación del extracto al cromatograma:

En una placa para cromatografía en capa fina, preparada como se indicó anteriormente, se trazan líneas paralelas imaginarias separadas por dos cm de distancia. Antes de aplicar la muestra se identifica cada división con el número de la muestra y el tipo de estándar que se aplicó en ella. La longitud entre el punto de aplicación y el frente del solvente debe ser de 17 cm. Las muestras se aplican cuantitativamente con ayuda de microjeringa, en una zona circular no mayor de 0.5 cm de diámetro. El extracto del problema y la solución estándar (aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂) se aplican alternadamente en las placas. Las cantidades aplicadas generalmente son de 5, 10 y 15 µl respectivamente. Una vez hecha la aplicación, la placa se deja desarrollar en una cámara cuyos solventes son cloroformo:acetona:agua (85:15:1.5) para la separación de las aflatoxinas. Una vez secadas las placas se observan en una cámara oscura con luz ultravioleta de onda corta y larga. En el sitio donde se encuentran aflatoxinas la placa fluoresce, azul y/o verde al incidir la luz ultravioleta. Si el R_f de las manchas de los estándares y los R_f de las manchas del problema coinciden, la muestra se considera positiva.

$$R_f = \frac{\text{frente del soluto}}{\text{frente del solvente}}$$

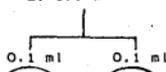
DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

Aislamiento de Bacillus cereus

10 g Biomasa -----> 240 ml agua
peptonada 0.1 %
(agitación 15 min)



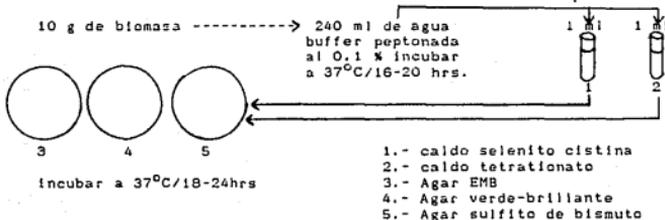
9 ml
agua peptonada
al 0.1 %



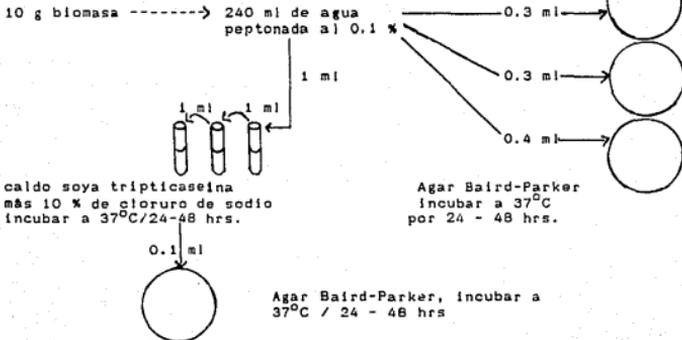
Agar EG

incubar a 30°C
durante 18 - 24 h

Aislamiento de Salmonella sp.



Aislamiento de Staphylococcus aureus.



CUADRO B -2

MEZCLA DE VITAMINAS AIN 76
(Nutrient Requirements of Laboratory Animals)
(1 % en dieta)

TIPO DE VITAMINA	CONTENIDO
A	0.090
D 3	0.300
B 12	0.600
E	0.090
B 1	0.009
B 2	0.006
Niacina	0.009
Pantotenato de Ca	0.030
Piridoxina (B 6)	0.006
Inositol	0.300
Colina 25%	1.200 (50% 0.6 g)
K	0.150
Antioxidante BHT	0.180

CUADRO B - 3

MEZCLA DE MINERALES AIN 76
(Nutrients Requirements of Laboratory Animals)
(para 1 kg de dieta)

NUTRIENTE	CANTIDAD, g
Carbohidratos	5.72
KCl	10.86
MgSO ₄	4.5
KH ₂ PO ₄	3.03
FeSO ₄ 7H ₂ O	1.64
MnSO ₄ H ₂ O	0.019
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.010
ZnO	0.030
CoSO ₄ 7H ₂ O	0.020
KI	1.20

Esta mezcla de sales cuando se adiciona en un 4 % en peso de la dieta proporciona esas cantidades de minerales.

Lo arriba mencionado es la mezcla empleada de minerales y vitaminas para preparar la dieta testigo (caseina 10 %) y la dieta problema (biomasa 10 % de prot.).

REQUERIMIENTOS NUTRICIOS PARA RATAS DE LABORATORIO*

NUTRIENTE	CANTIDAD EN DIETA (a)	NUTRIENTE	CANTIDAD EN DIETA (a)
<u>Proteina</u>	12.0 %	<u>Grasa (b)</u>	5.0 %
<u>L aminoacidos</u>			
Arginina	0.6 %	Metionina(c)	0.6 %
Asparagina	0.4 %	Fenilalanina(d)	
Acido glutámico	4.0 %	Tirosina	0.8 %
Histidina	0.3 %	Prolina	0.4 %
Leucina	0.75 %	Valina	0.6 %
Licina	0.7 %	No esenciales	0.59 %
<u>MINERALES</u>			
Calcio	0.5 %	Manganeso	50.0 mg/kg
Cloruros	0.05 %	Fosforo	0.4 %
Cromo	0.3 mg/kg	Potasio	0.18 %
Cobre	5.0 mg/kg	Selenio	0.1 mg/kg
Fluoruro	1.0 mg/kg	Sodio	0.05 %
Iodo	0.15 mg/kg	Sulfuros	0.03 %
Hierro	35.0 mg/kg	Zinc	12.0 mg/kg
Magnesio	400.0 mg/kg		
<u>VITAMINAS</u>			
A	4000.0 Uf/kg	Niacina	20.0 mg/kg
D	1000.0 Uf/kg	Pantotenato Ca	8.0 mg/kg
E	30.0 Uf/kg	Riboflavina	3.0 mg/kg
K 1	50.0 Ug/kg	Tiamina	4.0 mg/kg
Colina	0.1 %	Vitamina B 6	6.0 mg/kg
Acido folico	1.0 mg/kg	Vitamina B 12	50.0 Ug/kg

(a) Adecuado para crecimiento, gestación y lactancia; con base en 90 % de materia seca.

(b) Acido linoleico, se requiere 0.6 % para machos y 0.3 % para hembras.

(c) De un tercio a un medio puede suplirse con L - cistina.

(d) De un tercio a un medio puede suplirse con L - tirosina.

(e) Mezcla de glicina, L-alanina y L-serina.

* De acuerdo con Van Hoosier (1977), estos son los requerimientos nutricios de la rata de laboratorio.

El comportamiento de los animales durante el experimento se muestra en las siguientes tablas:

LOTE TESTIGO ALIMENTO: 10 % PROT. PTE. CASEINA

Rata No. 1 Macho 52 g

A L I M E N T O						
Tiempo días	Peso g	Increm. en g	Inicial g	final g	ingerido g	acumulativo g
0	52.0	----	10.0	----	----	----
1	----	----	10.0	0.5	9.5	9.5
2	55.0	3.0	20.0	0.0	10.0	19.5
3	----	----	15.0	8.0	12.0	31.5
4	65.0	13.0	15.0	2.0	13.0	44.5
5	----	----	15.0	3.0	12.0	56.5
6	75.0	23.0	20.0	1.0	14.0	70.5
7	----	----	20.0	7.0	13.0	83.5
8	83.0	31.0	20.0	7.0	13.0	96.5
9	----	----	20.0	6.0	14.0	110.5
10	91.0	39.0	20.0	6.0	14.0	124.5
11	----	----	20.0	7.0	13.0	137.7
12	98.0	46.0	20.0	6.0	14.0	151.5
13	----	----	25.0	3.0	17.0	168.5
14	106.0	54.0	25.0	7.0	18.0	186.5
15	----	----	20.0	11.0	14.0	200.5
16	112.0	60.0	25.0	4.0	16.0	216.5
17	----	----	25.0	6.0	19.0	235.5
18	120.0	68.0	----	9.0	16.0	251.5

PER exp. = ganancia en peso / g de prot. consumida

$$= 68 / 25.15 = 2.7$$

Rata No. 2 Hembra 62.5 g

A L I M E N T O

Tiempo días	peso g	incred. en g	inicial g	final g	Ingerido g	acumulativo g
0	62.5	----	10.0	----	----	----
1	----	----	10.0	0.5	9.5	9
2	61.5	-1.0	20.0	2.0	8.0	17.5
3	----	----	15.0	7.0	13.0	30.5
4	70.0	7.5	15.0	2.5	12.5	43.0
5	----	----	20.0	0.0	15.0	58.0
6	81.0	18.5	15.0	5.0	10.0	68.0
7	----	----	20.0	0.0	15.0	83.0
8	92.0	29.5	25.0	2.0	18.0	101.0
9	----	----	25.0	6.0	19.0	120.0
10	104.0	41.5	25.0	6.0	17.0	137.0
11	----	----	25.0	7.0	18.0	155.0
12	111.0	48.5	25.0	7.0	18.0	173.0
13	----	----	25.0	7.0	18.0	191.0
14	118.0	55.5	25.0	8.0	17.0	208.0
15	----	----	25.0	8.0	17.0	225.0
16	125.6	62.5	25.0	6.0	19.0	244.0
17	----	----	25.0	6.5	18.5	262.5
18	132.0	69.5	----	6.0	19.0	281.5

PER = 2.47

Rata No. 3 Macho 56.5 g

A L I M E N T O

Tiempo dias	Peso g	increm. en g	inicial g	final g	ingerido s	acumulativo g
0	56.5	----	10.0	----	----	----
1	----	----	10.0	0.5	9.5	9.5
2	59.5	3.0	20.0	0.0	10.0	19.5
3	----	----	15.0	8.0	12.0	31.5
4	59.0	12.5	15.0	3.0	12.0	43.5
5	----	----	15.0	6.0	11.0	54.5
6	74.0	17.5	15.0	3.0	12.0	66.5
7	----	----	20.0	4.5	10.5	77.0
8	81.0	24.5	15.0	9.0	11.0	88.0
9	----	----	15.0	4.0	11.0	99.0
10	96.0	29.5	15.0	2.0	13.0	112.0
11	----	----	20.0	3.0	12.0	124.0
12	91.0	34.5	20.0	7.0	13.0	137.0
13	----	----	25.0	4.0	16.0	153.0
14	96.0	39.5	20.0	13.0	12.0	165.0
15	----	----	15.0	9.0	11.0	176.0
16	100.0	43.5	20.0	8.0	7.0	183.0
17	----	----	20.0	4.0	16.0	199.0
18	109.0	52.5	----	3.0	17.0	216.0

PER exp. = 2.43

Rata No. 4 Hembra 53.5 g

A L I M E N T O

Tiempo días	peso g	incred. en g	inicial g	final g	ingerido g	acumulativo g
0	53.5	----	10.0	----	----	----
1	----	----	10.0	0.5	9.5	9.5
2	52.5	-1.0	15.0	2.5	7.5	17.0
3	----	----	15.0	6.0	9.0	26.0
4	58.0	4.5	15.0	7.0	8.0	34.0
5	----	----	15.0	5.0	10.0	44.0
6	68.0	14.5	20.0	2.0	13.0	57.0
7	----	----	15.0	6.0	12.0	69.0
8	76.0	22.5	15.0	3.0	12.0	81.0
9	----	----	20.0	1.0	14.0	95.0
10	83.0	29.5	20.0	7.5	12.5	107.5
11	----	----	20.0	6.0	14.0	121.5
12	91.0	37.5	20.0	6.0	14.0	135.5
13	----	----	25.0	2.0	18.0	153.5
14	97.0	43.5	20.0	10.0	15.0	168.5
15	----	----	20.0	5.0	15.0	183.5
16	101.0	47.5	20.0	5.0	15.0	198.5
17	----	----	20.0	7.0	13.0	211.5
18	104.0	50.5	----	7.0	13.0	224.5

PER exp. = 2.25

Rata No. 5 Macho 60.5 g

A L I M E N T O

Tiempo dias	peso g	incred. en g	inicial g	final g	ingerido g	acumulativo g
0	60.5	----	10.0	----	----	----
1	----	----	10.0	0.5	9.5	9.5
2	64.0	3.5	20.0	0.0	10.0	19.5
3	----	----	15.0	7.5	12.5	32.0
4	74.0	13.5	15.0	2.0	13.0	45.0
5	----	----	15.0	2.0	13.0	58.0
6	82.0	21.5	20.0	0.0	15.0	73.0
7	----	----	25.0	1.0	19.0	92.0
8	99.0	38.5	25.0	7.0	18.0	110.0
9	----	----	20.0	7.5	17.7	127.5
10	107.0	46.5	25.0	3.0	17.0	144.5
11	----	----	25.0	7.0	18.0	162.5
12	116.0	55.5	25.0	6.0	19.0	181.5
13	----	----	25.0	7.0	18.0	199.5
14	122.0	61.5	20.0	7.0	18.0	217.5
15	----	----	25.0	0.0	20.0	237.5
16	132.0	71.5	25.0	4.0	21.0	258.5
17	----	----	25.0	4.0	21.0	279.5
18	143.0	82.5	----	8.0	17.0	296.5

PER exp. = 2.78

Rata No. 6 Hembra 59.0 g

A L I M E N T O

Tiempo dias	peso g	increm. en g	inicial g	final g	ingerido g	acumulativo g
0	59.0	----	10.0	----	----	----
1	----	----	10.0	1.0	9.0	9.0
2	57.5	-1.5	15.0	2.0	8.0	17.0
3	----	----	15.0	7.0	8.0	25.0
4	59.5	0.5	15.0	8.0	7.0	32.0
5	----	----	15.0	6.5	8.5	40.5
6	64.0	5.0	15.0	5.0	10.0	50.5
7	----	----	15.0	4.0	11.0	61.5
8	70.0	11.0	15.0	5.0	10.0	71.5
9	----	----	15.0	3.0	12.0	83.5
10	79.0	20.0	20.0	4.0	11.0	94.5
11	----	----	20.0	8.0	12.0	106.5
12	80.0	21.0	20.0	10.0	10.0	116.5
13	----	----	20.0	8.0	12.0	128.5
14	90.0	31.0	20.0	7.0	13.0	141.5
15	----	----	20.0	9.0	11.0	152.5
16	94.0	35.0	20.0	7.0	13.0	165.5
17	----	----	20.0	9.0	11.0	176.5
18	94.0	35.0	----	8.0	12.0	188.5

PER exp. = 1.856

LOTE PROBLEMA 10 % DE PROTEINA FTE. BIOMASA

Rata A Macho 66 g

A L I M E N T O

Tiempo días	peso g	incred. en g	inicial g	final g	ingerido g	acumulativo g
0	65.0	----	10.0	----	----	----
1	----	----	10.0	4.5	5.5	5.5
2	60.0	-6.0	15.0	4.0	6.0	11.5
3	----	----	15.0	9.0	6.0	17.5
4	61.5	-4.5	15.0	6.5	8.5	26.0
5	----	----	15.0	6.0	9.0	35.0
6	63.0	-3.0	20.0	6.0	9.0	44.0
7	----	----	15.0	11.0	9.0	53.0
8	60.0	-6.0	15.0	8.0	7.0	60.0
9	----	----	15.0	7.0	8.0	68.0
10	58.0	-8.0	20.0	7.0	8.0	76.0
11	----	----	20.0	11.0	9.0	85.0
12	57.0	-9.0	20.0	12.0	8.0	93.0
13	----	----	20.0	12.0	8.0	101.0
14	53.0	-13.0	20.0	14.0	6.0	107.0
15	----	----	20.0	13.0	7.0	114.0
16	52.0	-14.0	20.0	12.0	8.0	122.0
17	----	----	----	13.0	7.0	129.0

PER exp. = - 1.085

Rata B Hembra 56.5 g

A L I M E N T O

Tiempo dias	peso g	incred. g	inicial g	final g	ingerido g	acumulativo g
0	56.5	----	10.0	----	----	----
1	----	----	10.0	3.0	7.0	7.0
2	51.0	-5.5	15.0	3.5	6.5	13.5
3	----	----	15.0	9.0	6.0	19.5
4	52.0	-4.5	15.0	9.0	6.0	25.5
5	----	----	15.0	9.0	6.0	31.5
6	52.5	-4.0	20.0	7.0	8.0	39.5
7	----	----	15.0	13.0	7.0	46.5
8	54.0	-2.5	15.0	8.0	7.0	53.5
9	----	----	15.0	7.0	8.0	61.5
10	51.0	-5.5	20.0	8.0	7.0	68.5
11	----	----	20.0	14.0	6.0	74.0
12	50.0	-6.5	20.0	15.0	5.0	79.0
13	----	----	20.0	14.0	6.0	85.0
14	45.0	-11.5	----	16.0	4.0	89.0

PER exp. = - 1.284

Rata C Macho 49.5 g

A L I M E N T O.

Tiempo dias	peso g	incred. en g	inicial g	final g	ingerido g	acumulativo g
0	49.5	----	10.0	----	----	----
1	----	----	10.0	7.0	3.0	3.0
2	45.5	-4.0	15.0	4.0	7.0	10.0
3	----	----	15.0	8.0	7.0	17.0
4	41.5	-8.0	15.0	9.5	5.5	22.5
5	----	----	----	8.0	7.0	29.5

PER exp. = -2.71

Rata D Hembra 48.5 g

A L I M E N T O

Tiempo dias	peso g	incred. en g	inicial g	final g	ingerido g	acumulativo g
0	48.5	----	10.0	----	----	----
1	----	----	10.0	5.0	5.0	5.0
2	40.0	-8.5	15.0	6.0	4.0	9.0
3	----	----	15.0	11.0	4.0	13.0
4	42.5	-6.0	15.0	8.0	7.0	20.0
5	----	----	15.0	9.0	6.0	26.0
6	42.0	-6.5	20.0	8.0	7.0	33.0
7	----	----	15.0	12.0	8.0	41.0
8	42.0	-6.5	----	8.0	7.0	48.0

PER exp. = - 1.35

Rata E Macho 68.0 g

A L I M E N T O.

Tiempo dias	peso g	incred. en g	inicial g	final g	ingerido g	acumulativo g
0	68.0	----	10.0	----	----	----
1	----	----	10.0	4.0	6.0	6.0
2	62.0	-6.0	15.0	5.0	5.0	11.0
3	----	----	15.0	9.0	6.0	17.0
4	62.5	-5.5	15.0	8.0	7.0	24.0
5	----	----	15.0	7.0	8.0	32.0
6	64.0	-4.0	20.0	6.0	9.0	41.0
7	----	----	15.0	11.0	9.0	50.0
8	63.5	-4.5	15.0	5.0	10.0	60.0
9	----	----	20.0	3.0	12.0	72.0
10	63.0	-5.0	15.0	11.0	9.0	81.0
11	----	----	15.0	6.0	9.0	90.0
12	64.0	-4.0	20.0	6.0	9.0	99.0
13	----	----	20.0	10.0	10.0	109.0
14	61.5	-6.5	20.0	12.0	8.0	117.0
15	----	----	20.0	12.0	8.0	125.0
16	61.0	-7.0	20.0	11.0	9.0	134.0
17	----	----	----	14.0	6.0	140.0

PER exp. = -0.5

Rata F Hembra 54.5 g

A L I M E N T O

Tiempo dias	peso g	incred. en g	inicial g	final g	ingerido g	acumulativo g
0	54.5	----	10.0	----	----	----
1	----	----	10.0	5.0	5.0	5.0
2	50.0	-4.5	15.0	7.0	3.0	8.0
3	----	----	15.0	10.0	5.0	13.0
4	48.0	-6.5	15.0	9.0	6.0	19.0
5	----	----	15.0	9.0	6.0	25.0
6	----	----	----	13.0	2.0	27.0

PER exp. - 2.4