



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: EVALUACIÓN DE CONSORCIOS BACTERIANOS MEDIANTE
BIODIGESTIÓN DE DESECHOS INDUSTRIALES DE CINCO FRUTAS
PARA LA OBTENCIÓN DE BIOFERTILIZANTES EN LA EMPRESA
INALPEV**

AUTOR: RIVERA RUIZ, MARÍA ESTHER

DIRECTOR: DR. RUEDA ORTIZ, DARWIN ARTURO

SANGOLQUÍ

2018



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “*EVALUACIÓN DE CONSORCIOS BACTERIANOS MEDIANTE BIODIGESTIÓN DE DESECHOS INDUSTRIALES DE CINCO FRUTAS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOFERTILIZANTES EN LA EMPRESA INALPEV*”, fue realizado por la señorita *Rivera Ruiz María Esther*, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 19 de marzo del 2018

Darwin Arturo Rueda Ortiz Dr.

C.I: 0400688727



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Rivera Ruiz María Esther*, con cédula de identidad N° 171450203-4, declaro que este trabajo de titulación "*Evaluación de consorcios bacterianos mediante biodigestión de desechos industriales de cinco frutas para la obtención de biofertilizantes en la empresa INALPEV*", es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 19 de marzo del 2018

María Esther Rivera Ruiz

C.I. 050213871-2



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

AUTORIZACIÓN

*Yo, **Rivera Ruiz María Esther**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “**Evaluación de consorcios bacterianos mediante biodigestión de desechos industriales de cinco frutas para la obtención de biofertilizantes en la empresa INALPEV**”, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.*

Sangolquí, 19 de marzo del 2018

María Esther Rivera Ruiz

C.I. 050213871-2

DEDICATORIA

A mi Dios.

A mis padres, hijo y hermanos.

AGRADECIMIENTO

A Dios padre que con su misericordia y amor me ha permitido culminar esta etapa con éxito

A mis padres por darme la vida y sus enseñanzas de honestidad persevera en cualquier meta u objetivo de vida para ser mejor cada día

A mi hijo David por ser la inspiración de seguir día tras día y compartir mis éxitos mis alegrías, mis tristezas, siempre con su amor incondicional, cuidándome como yo lo hago.

A mis hermanas Ma. Rosario, Cecilia, Rosita, Francly, por apoyarme cuando más lo necesite compartiendo mis vivencias.

A Leonardo Román padre por estar apoyándome en mis inicios de mi carrera.

A mis amigos Katita, Mony, Dianita, Carito y todos los amigos que compartieron sus conocimientos sonrisas cada día en clase así como nuestras angustias.

A mi director de tesis Dr. Darwin Rueda con su apoyo incondicional e impulsándome a desarrollar y potencializar conocimientos más allá de lo esperado, potenciando al talento humano para la vida profesional y el propio emprendimiento.

Al Ing. Mauricio Galarza jefe del departamento de desarrollo agrícola de la empresa INALPEV por ayudarme en la parte logística para el desarrollo del proyecto.

Al Ing. Pablito Landázuri por su aporte científico y por estar pendiente en cada etapa de la investigación

Al Ing. Gabriel Larrea por su aporte científico técnico durante el desarrollo de la presente investigación. Dr. Jaime Villacis por guiarme en la parte biométrica.

Al Lic. Taco por ayudarme en la parte de laboratorio y Pamela Espín por brindarme los conocimientos en la parte de la Biotecnología

A mis maestros que impartieron sus conocimientos y me formaron para enfrentarme con los recursos no solo de conocimientos sino como ser humano para la vida profesional en especial al Ing. Norman Soria , Ing. Juan Tigrero y Dr. Juan Ortiz .

A la empresa INALPEV a sus accionistas y directivos por impulsar investigaciones de alto impacto de interés ambiental así como para el desarrollo de la propia empresa.

María Esther

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1	Justificación.....	2
1.2	El Problema	3
1.2.1	Los Efectos	3
1.2.2	Las Causas	3
1.3	Objetivos	4
1.4	Objetivo general	4
1.4.1	Objetivos específicos.....	4
1.5	Hipótesis	4

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1	Residuos orgánicos.....	5
2.1.1	Propiedades Biológicas	5
2.1.2	Desechos sólidos	5
2.1.3	Valorización de los desechos industriales de frutas	6
2.2	Compost.....	7
2.2.1	Definición	7
2.2.2	Características generales	7
2.2.3	Variables importantes en el manejo del compostaje	7

2.2.4	Sistemas de compostaje.....	11
2.2.5	Fases del proceso de compostaje.....	12
2.2.6	Aplicaciones	14
2.3	Biol	15
2.3.1	Concepto.....	15
2.3.2	Factores que intervienen en la fermentación del biol	15
2.3.3	Etapas de la biodigestión anaerobia	17
2.3.4	Composición del producto final (Biol).....	19
2.3.5	Beneficios	19
2.3.6	Calidad.....	19
2.3.7	Aplicación del biol	19
2.4	Biodigestores	20
2.4.1	Generalidades	20
2.4.2	Digestión anaeróbica	20
2.4.3	Tipos de biodigestores.....	21
2.5	Microorganismos en la biodigestión	22
2.5.1	Bacterias descomponedoras	22
2.5.2	Hongos descomponedores	23
2.5.3	Microorganismos en los productos comerciales	23
2.5.4	Consortios microbianos	25
2.5.5	Identificación bacteriana	26
2.6	Enzimas	27
2.6.1	Concepto.....	27
2.6.2	Características	28
2.6.3	Clasificación según procesos industriales	28
2.6.4	Función Enzimática	29
2.6.5	Enzimas Proteolíticas	29
2.6.6	Bromelina	30

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Ubicación del lugar de investigación	31
3.1.1	Ubicación Política	31

3.1.2	Ubicación Geográfica.....	31
3.1.3	Ubicación ecológica	32
3.2	Materiales	32
3.2.1	Laboratorio	32
3.2.2	Equipos	32
3.2.3	Reactivos	33
3.3	Métodos	33
3.3.1	Caracterización de la biomasa residual de cinco frutas.....	33
3.3.2	Obtención de consorcios microbianos.....	37
3.3.3	Pruebas de identificación bacteriana	41
3.3.4	Elaboración de compost	45
3.3.5	Elaboración del biol.....	46
3.3.6	Diseño experimental.....	48
3.3.7	Análisis estadístico	51

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Composición fisicoquímica de la biomasa residual de cinco frutas.....	52
4.1.1	Composición proximal características bromatológicos.....	52
4.1.2	Composición de macro y micro elementos	54
4.1.3	Concentración de C y N en base fresca y seca	55
4.2	Sub-productos de la biodigestión anaeróbica	58
4.2.1	Producción acumulada de biogás	59
4.2.2	Rendimiento líquido de la biodigestión anaerobia (biol)	61
4.2.3	Contenido de Ácido Indol Acético (AIA)	62
4.2.4	Recuento microbiano anaerobio totales en producción líquida (biol).....	65
4.2.5	Características fisicoquímicas de producto sólido (biosol).....	66
4.3	Concentración fisicoquímica del compost (biodigestión aerobia)	69
4.3.1	Recuento microbiano en el Compost.....	72
4.3.2	Temperatura alcanzada en el proceso de compostaje.....	73
4.3.3	Identificación y tipificación bacteriana	75
4.3.4	Estandarización de procesos.....	79

CAPÍTULO V**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1	Conclusiones	80
5.2	Recomendaciones	81
5.3	Bibliografía.....	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	<i>Parámetros ideales del Compostaje</i>	8
Tabla 2	<i>Relación C: N de algunos materiales orgánicos a utilizar</i>	8
Tabla 3	<i>Microorganismos utilizados en algunos de los productos microbianos comerciales para la biodigestión aeróbica y anaeróbica.</i>	24
Tabla 4	<i>Microorganismos primordiales en el compostaje</i>	25
Tabla 5	<i>Condiciones de crecimiento de consorcios microbianos en agitador incubador INNOVA.</i>	38
Tabla 6	<i>Formulados microbianos de las tres fases de crecimiento</i>	39
Tabla 7	<i>Concentraciones de melaza y peptona para masificación de consorcios microbianos</i>	40
Tabla 8	<i>Condiciones iniciales para el ingreso al termociclador</i>	44
Tabla 9	<i>Dosificación de la aplicación por tipo de fruta y acelerador de M.O de acuerdo con el peso, densidad y volumen.</i>	46
Tabla 10	<i>Formulación y porcentaje para la elaboración de material base para fermentación de bioles en biorreactores</i>	47
Tabla 11	<i>Análisis de varianza para determinación del mejor</i>	51
Tabla 12	<i>Promedio \pm error estándar de los componentes de la biomasa residual de cinco frutas: durazno (<i>Prunus persica</i>), guanábana (<i>Annona muricata</i>), mango (<i>Mangifera indica</i>), mora (<i>Rubus ulmifolius</i>) y piña (<i>Ananas comosus</i>)</i>	52
Tabla 13	<i>Promedio \pm error estándar de concentración de macro elementos de la biomasa residual de cinco frutas: durazno(<i>Prunus persica</i>), guanábana(<i>Annona muricata</i>), mango (<i>Mangifera indica</i>), mora(<i>Rubus ulmifolius</i>) y piña(<i>Ananas comosus</i>).</i>	54
Tabla 14	<i>Promedio \pm error estándar de concentración de micro elementos de la biomasa residual de cinco frutas: durazno(<i>Prunus persica</i>), guanábana(<i>Annona muricata</i>), mango (<i>Mangifera indica</i>), mora(<i>Rubus ulmifolius</i>) y piña(<i>Ananas comosus</i>).</i>	56
Tabla 15	<i>Promedio \pm error estándar de la producción a acumulada</i>	59
Tabla 16	<i>Promedio \pm error estándar de rendimiento del producto líquido</i>	61
Tabla 17	<i>Promedio \pm error estándar de la concentración del AIA del producto</i>	63
Tabla 18	<i>Promedio \pm error estándar de la concentración UFC del producto líquido(Biol)</i> 65	
Tabla 19	<i>Promedio \pm error estándar de los componentes bromatológicos del biosol de la biomasa residual de frutas</i>	67

Tabla 20	<i>Promedio \pm error estándar de los componentes del biosol con los aceleradores de M.O</i>	68
Tabla 21	<i>Promedio \pm error estándar de los componentes bromatológicos del compost con la biomasa residual de frutas.</i>	70
Tabla 22	<i>Promedio \pm error estándar de los componentes bromatológicos del compost con los aceleradores de M.O</i>	71
Tabla 23	<i>Promedio \pm error del concentración de UFC en las pilas de compostaje</i>	72
Tabla 24	<i>Bacterias identificadas en base a cada fruta.</i>	75
Tabla 25	<i>Identificación morfología, bioquímicas y análisis molecular</i>	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Proceso de transformación de la materia orgánica (MO)	11
Figura 2	Dimensiones de una pila para un pequeño agricultor.....	12
Figura 3	Temperatura, oxígeno y pH en el proceso de compostaje	12
Figura 4	Concentración óptima de microorganismos en un compost maduro.....	14
Figura 5	Morfología de las bacterias comunes en la biodigestión	22
Figura 6	Estructura de hongos comunes en la biodigestión.....	23
Figura 7	Interacción enzima sustrato	28
Figura 8	Mapa del sitio de ensayo experimental.....	31
Figura 9	Esquema de procesamiento de muestras de la biomasa residual de frutas	38
Figura 10	Cámara de electroforesis horizontal para geles	43
Figura 11	Croquis de la disposición experimental de compost y biol en campo.....	50
Figura 12	Promedio \pm error estándar de carbono en materia seca (M.S) y materia.....	57
Figura 13	Promedio \pm error estándar de nitrógeno en materia seca (M.S) y materia fresca (M.F) de la biomasa residual de cinco frutas.	57
Figura 14	Promedio \pm error estándar de C/N de la biomasa residual de cinco frutas.....	58
Figura 15	Promedio \pm error estándar de la producción de biogás.....	60
Figura 16	Promedio \pm error estándar del rendimiento líquido (Biol) de la interacción Acelerador de M.O y fruta.	62
Figura 17	Presencia de AIA en el biol.	63
Figura 18	Promedio \pm error estándar de la concentración del AIA	64
Figura 19	Promedio \pm error estándar de la concentración	64
Figura 20	Promedio \pm error estándar concentración microbiana anaerobia del biol.	66
Figura 21	Promedio \pm error de la concentración de UFC/g en las pilas de compostaje por tipo.....	73
Figura 22	Promedio \pm error estándar de la temperatura de los tratamientos del compostaje.	74
Figura 23	Fragmentos de PCR amplificados y visualizados en gel de agarosa.....	75
Figura 24	Diagrama de procesos desde la fase inicial hasta la obtención de productos.....	79

RESUMEN

En la provincia de Tungurahua, la empresa alimenticia INALPEV elabora jugos y pulpas de frutas, con una capacidad de procesamiento de 7200 T/año, se estima que el 30% es residuo. El presente estudio se enfocó al aprovechamiento de la biomasa residual cuyo objetivo principal fue “Evaluar consorcios bacterianos mediante biodigestión de desechos industriales de cinco frutas para la obtención de biofertilizantes en la empresa INALPEV”. El experimento contó con 90 unidades experimentales distribuidas con un DCA con 3 repeticiones; para los tratamientos se utilizó dos factores: Factor (1) tres tipos de aceleradores los cuales fueron consorcio bacteriano de frutas (CBF), consorcio bacteriano comercial (CBC) y la enzima bromelina (Enz); y Factor (2) cinco tipos de biomasa residual los cuales fueron: durazno, guanábana, mora, piña, mango; y una duración de 42 días para biol y 12 semanas para compost; la comparación de medias se hizo con LSD Fisher. Se midieron: la producción de biogás, rendimiento, en el biol concentraciones del AIA y UFC/ml, las características físico-químicas del biosol; y las características físico-químicas del compost. El CBF fue el mejor inóculo para acelerar el proceso de biodigestión aerobia y anaerobia, en concentración de 1.4×10^{10} UFC, con dosis de aplicación de $2L/m^3$ con todos los residuos de frutas. En el CBF se identificó a: *Pseudomona gessardii*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus altitudinis* y *Klebsiella variicola*; este resultado se debe a la acción proteolítica de las bacterias obteniendo porcentajes altos de aminoácidos, fitohormonas así como concentraciones de macro y micro elementos.

PALABRAS CLAVE

- **BIODIGESTIÓN**
- **CONSORCIO BACTERIANO**
- **BIOMASA RESIDUAL**
- **BIOFERTILIZANTES**

ABSTRACT

In the province of Tungurahua, the food company INALPEV produces juices and fruit pulps, with a processing capacity of 7200 Ton / year, it is estimated that 30% is waste. The present study focused on the use of residual biomass whose main objective was "Evaluate bacterial consortiums by biodigestion of industrial waste of five fruits to obtain biofertilizers in the company INALPEV". The experiment had 90 experimental units distributed with a DCA with 3 repetitions; for the treatments two factors were used: Factor (1) three types of accelerators which were bacterial fruit consortium (CBF), commercial bacterial consortium (CBC) and the enzyme bromelain (Enz); and Factor (2) five types of residual biomass which were: peach, soursop, blackberry, pineapple, mango; and a duration of 42 days for biol and 12 weeks for compost; the comparison of means was made with LSD Fisher. The following were measured: biogas production, yield, biological concentrations of AIA and CFU / ml, physical-chemical characteristics of biosol; and the physico-chemical characteristics of the compost. The CBF was the best inoculum to accelerate the aerobic and anaerobic biodigestion process, in a concentration of 1.4×10^{10} CFU, with an application rate of 2L / m³ with all fruit residues. In the CBF were identified: *Pseudomonas gessardii*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus altitudinis* and *Klebsiella variicola*; this result is due to the proteolytic action of the bacteria obtaining high percentages of amino acids, phytohormones as well as concentrations of macro and micro elements

KEYWORDS

- **BIO DIGESTION**
- **BACTERIAL CONSORTIUM**
- **RESIDUAL BIOMASS**
- **BIO FERTILIZERS**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En el último siglo el crecimiento económico se ha dado de forma exponencial junto a las grandes industrias y con ello el aumento en volumen de desechos orgánicos e inorgánicos que contaminan los ambientes naturales, siendo necesario el reciclaje con el fin de preservarlo, países pertenecientes a la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos) son responsables de aproximadamente la mitad de residuos a nivel mundial con un 44% del total, en América Latina y el Caribe se genera un total de 430.000 toneladas de desechos diarios (Banco Mundial., 2012)

La generación de residuos en Ecuador durante el 2012 fue de 406,8 kilogramo per cápita al año, lo que corresponde a la mitad de los residuos generados en Estados Unidos (828 kilogramo per cápita año). En comparación con Chile, Brasil, Perú y Colombia, Ecuador genera la mayor cantidad de residuos (INEC, 2014) Según información tomada del diario el universo, Ecuador produce un estimado de 9.365 toneladas diarias de basura, de ello el 58% de la basura son residuos orgánicos.

En la provincia de Tungurahua en el cantón Tisaleo, la empresa alimenticia INALPEV(Industria Alimenticia Pérez Vaca), elabora jugos y pulpas de frutas , con una capacidad de procesamiento de 1,5 toneladas por hora y 7200 toneladas al año (Pinto, 2017). El 30% del total de procesamiento es desecho, convirtiéndose en un problema crítico, para lo cual la empresa se encuentra gestionando, mediante el uso de alternativas biotecnológicas el tratamiento adecuado de los residuos generados en esta industria.

La descomposición aeróbica y anaeróbica de los desechos de origen orgánico, depende en gran medida de dos aspectos fundamentales: La fuente de materia prima y los microorganismos descomponedores, con fines de optimizar el tiempo en el proceso de la

biodigestión, diversos experimentos anteriores utilizan como inóculo consorcios microbiano aisladas de pilas de compostaje en la fase final (Jurado, López, & Moreno, 2015)

1.1 Justificación

El desarrollo de la industria alimenticia genera grandes cantidades de desechos, principalmente de origen orgánico, cuyo destino final son los vertederos municipales.

Contaminando el ambiente debido a la velocidad de su biodegradabilidad, produciendo gases como CH_4 y CO_2 además de lixiviados entre otros contaminantes. Estos residuos poseen aproximadamente el 75% de azúcares y hemicelulosa, el 9% de celulosa y el 5% de lignina, considerados como materia prima para la elaboración de productos innovadores ecológicamente (Mirabella, Castellani, & Sala, 2014).

Uno de los métodos más eficiente y sostenibles para reducir los efectos perjudiciales en el medio ambiente, es el tratamiento de desechos en condiciones anaeróbicas, obteniendo como producto final biol, biosol que son utilizado como fertilizantes orgánicos de alta calidad en la agricultura y también se obtiene el biogás que puede ser utilizado como fuente de energía (Ziganshin, Liebetrau, Pröter, & Kleins, 2013). Otro de los tratamientos es el compostaje de residuos en condiciones aeróbicas, obteniendo como producto final el compost utilizado como enmienda en suelo pobres y productivos para obtener adecuados rendimientos de cosecha, estos dos métodos generan beneficios económicos.

Diversas investigaciones a nivel mundial han desarrollado tecnologías y técnicas adecuadas en el tratamiento de residuos, para la obtención de productos que generen un beneficio económico y ambiental, logrando el máximo potencial para su reutilización en la industria: alimentaria humana, animal, farmacéutica, cosmética, química y en la agricultura (Ros, Pascual, Ayuso, & Morales, 2012)

El proyecto a nivel piloto permite establecer metodologías y procesos adecuados que serán aplicados a escala industrial en la empresa INALPEV así como también realizar un análisis de costo beneficio (Hosseini, Barrantes, Eskicioglu, & Dut, 2014).

1.2 El Problema

Incumplimiento a las normas de manejo de desechos sólidos de origen orgánico de la industrialización de jugos y pulpas de frutas, generando 7200 toneladas anuales de desecho aproximadamente, cuya eliminación sin tratamiento adecuado es fuente de contaminación ambiental.

1.2.1 Los Efectos

Los efectos encontrados en la investigación son de tipo ambiental, debido a la generación de desechos industriales orgánicos provenientes del procesamiento de las frutas, para la elaboración de jugos y pulpas sin ningún tratamiento previo, desencadenando la producción de lixiviados, contaminantes para el suelo y aguas subterráneas, emanación de gases como el CH₄ y CO₂ principalmente por la velocidad de descomposición que poseen las frutas. Costos adicionales para su eliminación cuyo destino final son los vertederos municipales.

1.2.2 Las Causas

Eliminación inadecuada de desechos orgánicos provenientes de la industrialización de la fruta para la elaboración de jugos y pulpas naturales.

Desconocimiento, poca innovación y bajo desarrollo en el área para la transformación de materia prima en productos orgánicos principalmente biofertilizantes.

Escasa investigación e inversión en proyectos de desarrollo para potenciar la utilización de los residuos orgánicos de la industrialización de las frutas para la elaboración de subproductos con potencial rédito económico en la industria agropecuaria.

1.3 Objetivos

1.4 Objetivo general

Evaluar consorcios bacterianos mediante biodigestión de desechos industriales de cinco frutas para la obtención de biofertilizantes en la empresa INALPEV

1.4.1 Objetivos específicos.

Caracterizar los desechos industriales de cinco frutas (durazno, guanábana, mora, piña y mango) mediante la técnica de absorción atómica y análisis bromatológico.

Determinar los mejores consorcios bacterianos para acelerar la biodigestión de los desechos de cinco frutas (durazno, guanábana, mora, piña y mango).

Estandarizar las técnicas del proceso de biodigestión de los desechos industriales de cinco frutas (durazno, guanábana, mora, piña y mango).

Determinar la calidad de los biofertilizantes mediante la técnica de absorción atómica y análisis bromatológicos.

1.5 Hipótesis

HIPÓTESIS ALTERNA (H_1): Los consorcios bacterianos aceleran los procesos de biodigestión del biol y compost.

HIPÓTESIS NULA (H_0): Los consorcios bacterianos no aceleran los procesos de biodigestión del biol y compost.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Residuos orgánicos

Los residuos sólidos orgánicos son restos que provienen de productos de origen orgánico (plantas, animales, macro y micro organismos) en su mayoría son biodegradables, su desintegración es de forma acelerada transformando en otro tipo de materia orgánica (Jaramillo, Henao, & Zapata, 2008). Estos residuos poseen componentes orgánicos principales de biomasa que pueden ser clasificados como celulosa, hemicelulosas y lignina.

2.1.1 Propiedades Biológicas

Los residuos orgánicos son constituyentes solubles en agua, tales como azúcares, féculas, aminoácidos y diversos ácidos orgánicos; hemicelulosa, un producto de condensación de azúcares con cinco y seis carbonos; celulosa, un producto de condensación de glucosa de azúcar con seis carbonos; grasas, aceites y ceras, que son ésteres de alcoholes y ácidos grasos de cadena larga; lignina, un material polímero presente en algunos productos de papel como periódicos; lignocelulosa, una combinación de lignina y celulosa; proteínas, que están formadas por cadenas de aminoácidos (Jaramillo, Henao, & Zapata, 2008)

2.1.2 Desechos sólidos

En este grupo se encuentran los residuos de origen industrial y municipal presentan una fuente de biomasa atractivo, debido a que el material ya se ha recogido adquiriendo un costo negativo debido a tarifas de residuos sólidos urbanos , dentro de estos residuos se encuentran los bienes duraderos de desecho, bienes no duraderos, envases y embalajes, restos de comida, recortes de jardín, y residuos inorgánicos diverso de fuentes residenciales, comerciales, e industriales (Demirbas, 2011).

2.1.3 Valorización de los desechos industriales de frutas

“Las frutas exóticas son ricas en compuestos bioactivos, fenoles, carotenoides, vitaminas y fibras y en la mayoría de los casos, estos componentes pueden ser encontrados en los residuos de los subproductos, con la misma o incluso mayor cantidad. Varias investigaciones se centraron en las tecnologías de recuperación y nuevos usos para estos tipos de residuos” (Mirabella, Castellani, & Sala, 2014).

Los residuos provenientes de la industrialización de jugos y pulpas de frutas pueden ser utilizados para la alimentación humana, animal, agrícola mediante la extracción de subproductos como aceites esenciales, fibras dietéticas, pectinas flavonoides con un proceso adecuados siguiendo las normas de calidad (Yepes, Montoya, & Orozco, 2008). Para la recuperación de los recursos existen tres tipos de tecnología biológica química y térmica:

2.1.3.1 Valoración biológica y química

Utilizando estas tecnologías se puede obtener subproductos de los residuos orgánicos en los estados sólidos líquidos y gaseosos como: Compostajes mediante la descomposición aeróbica como producto final un compost como enmienda del suelo; biodigestión anaeróbica obteniendo biol, biosol y gas; lombricultura utilizando a la lombriz californiana roja produciendo humus con cargas microbianas altas; pectinas; enzimas; aceites esenciales los mismos que pueden extraerse de : hoja, semillas, frutos y cortezas, raíces o de la madera; flavonoides y carotenoides ; fibra dietética principalmente de la piña (de consumo humano y animal) y la obtención de combustibles (Yepes, Montoya, & Orozco, 2008).

2.1.3.2 Valoración térmica

Esta técnica se basa en reducir el volumen y recuperación de energía, los procesos de conversión energéticos se produce mediante la degradación de moléculas orgánicas por la

acción del calor, de acuerdo a la demanda de oxígeno puede ser calderas o incineradores y los que no requieren oxígeno se denomina pirolisis y termólisis.

2.2 Compost

2.2.1 Definición

El compostaje de desechos orgánicos es un proceso biooxidativo involucra la mineralización y la humificación parcial de la materia orgánica, obteniendo un producto final estabilizado, libre de fitotoxicidad y patógenos, con ciertas propiedades húmicas que se denomina compost (Bernal, Albuquerque, & Moral, 2009).

2.2.2 Características generales

Las características químicas dependen fundamentalmente de la cantidad y calidad de los materiales utilizados, así como las condiciones ambientales durante el proceso de descomposición y su manejo, al finalizar el proceso de fermentación, el compost está prácticamente sin patógenos diferente del material original, de fácil manipulación, almacenado sin causar mal olor (Suquilanda, 2006).

2.2.3 Variables importantes en el manejo del compostaje

Las variables fisicoquímicas que deben ser consideradas son humedad, oxígeno, temperatura, pH, contenido en materia orgánica, contenido en nitrógeno y fósforo, relación C:N y actividad microbológica, este conjunto de variables permiten determinar la sucesión de etapas características del proceso de compostaje (Gutiérrez C. , 2013).

Estos parámetros deben ser estrictamente monitoreados en cada fase de la biodigestión, de acuerdo al rango ideal que se establece en base al tiempo y estado de la materia orgánica establecidos en diversos estudios.

Tabla 1
Parámetros ideales del Compostaje

Parámetro	Rango ideal al comienzo (2-5 días)	Rango ideal para compost en fase termofílica II (2-5 semanas)	Rango ideal de compost maduro (3-6 meses) 10:1
C:N	25:1 – 35:1	15/20	10:1 – 15:1
Humedad	50% - 60%	45%-55%	30% - 40%
Concentración de oxígeno	~10%	~10%	~10%
Tamaño de partícula	<25 cm	~15 cm	<1,6 cm
Ph	6,5 – 8,0	6,0-8,5	6,5 – 8,5
Temperatura	45 – 60°C	45°C-Temperatura ambiente	Temperatura ambiente
Densidad	250-400 kg/m ³	<700 kg/m ³	<700 kg/m ³
Materia orgánica BS	50%-70%	>20%	>20%
Nitrógeno Total BS	2,5-3%	1-2%	~1%

BS: Base seca

Fuente: (FAO, 2013)

2.2.3.1 Relación Carbono Nitrógeno

La relación C: N varía en función del material de partida y se obtiene la relación numérica al dividir el contenido de C (%C total) sobre el contenido de N total (%N total) de los materiales a compostar. Esta relación también varía a lo largo del proceso, siendo una reducción continua, desde 35:1 a 15:1 (FAO, 2013)

Tabla 2
Relación C: N de algunos materiales orgánicos a utilizar

MATERIALES	RELACIÓN C/N
Paja de cereales (trigo, cebada, arroz, etc.)	80/1
Hojas secas	80/1
Desecho de fruta	35/1

Fuente: (Suquilanda, 2006).

2.2.3.2 Humedad

La humedad es un parámetro fundamentalmente vinculado a los microorganismos, ya que, como todos los seres vivos, usan el agua como medio de transporte de los nutrientes y elementos energéticos a través de la membrana celular. La humedad óptima para el compost se dispone alrededor del 55%, aunque varía en base del estado físico y tamaño de las partículas. Si la humedad baja por debajo de 45%, disminuye la actividad microbiana y si la humedad es alta (>60%) el agua saturará los poros e interceptará la oxigenación del material (FAO, 2013). Durante la mayor parte de la fase activa del proceso, el contenido de humedad debe de mantenerse próximo al 45% para que el compost final pueda ser comercializado como enmienda orgánica, debe tener un contenido mínimo de humedad entre 30-40% (Gutiérrez C. , 2013).

2.2.3.3 Aireación

El compostaje es un proceso aerobio y se debe conservar una aireación adecuada para la respiración de los microorganismos, la aireación evita que el material se compacte, las necesidades alcanzan la mayor tasa de consumo durante la fase hemofílica, la saturación de oxígeno en el medio no debe bajar del 5%, siendo el nivel óptimo el 10%, un exceso de aireación provocaría el descenso de temperatura y una mayor pérdida de la humedad por evaporación, haciendo que el proceso de descomposición se detenga por falta de agua, el rango ideal de humedad esta entre 5% - 15% (FAO, 2013).

2.2.3.4 Temperatura

La temperatura dentro del proceso sirve como indicador, conforme empieza la actividad microbiana ésta se eleva hasta valores próximos de 55 y 60 °C, esta etapa se conoce con el nombre de termófila, y es fundamental para la eliminación de agentes patógenos y semillas de malezas, posteriormente en la etapa siguiente disminuye la temperatura entre los

30 – 35 °C y 40 – 45 °C, donde se bioestabiliza la materia orgánica (C:N cercano a 18), y finalmente la humificación (C:N menor a 12) donde se llegan a temperaturas mesófilas (Córdova, 2006).

2.2.3.5 pH

La importancia del pH radica en que condiciona las familias de microorganismos que actúan en cada etapa del proceso de compostaje, determina la solubilidad y disponibilidad de nutrientes (Gutiérrez C. , 2013). Un pH de 6,7 a 9,0 fundamenta la buena actividad microbiana durante el compostaje, los valores óptimos son entre 5,5 y 8,0 por lo general, el pH no es un factor clave para el compostaje ya que la mayoría de los materiales están dentro de este rango de pH , cabe destacar que este factor es muy relevante para el control de pérdidas de N por volatilización de amoníaco, que pueden ser particularmente alta a $\text{pH} > 7,5$ (Bernal, Albuquerque, & Moral, 2009).

2.2.3.6 Conductividad eléctrica

Indica la salinidad de un compost y aporta información sobre su aptitud para ser utilizado en suelos agrícolas, debiendo ser su conductividad no superior a 2 mS/cm, para no provocar toxicidad a las plantas. El proceso de compostaje se caracteriza por una progresiva disminución de la conductividad debido a la pérdida de sales por lixiviación (Gutiérrez C. , 2013).

2.2.3.7 Materia orgánica

La materia orgánica se considera a cualquier tipo de material de origen animal o vegetal que retorna al suelo después de un proceso de descomposición con la intervención principalmente de microorganismos estos materiales inician un proceso de mineralización, y cambian de su forma orgánica (seres vivos) a su forma inorgánica (minerales, solubles o insolubles). Estos minerales fluyen por la solución de suelo y finalmente son aprovechados

por las plantas y organismos, o estabilizados hasta convertirse en humus, mediante el proceso de humificación (FAO, 2013).

El contenido mínimo en materia orgánica del compost varía en función del origen del mismo, aproximadamente de un 40% en compost vegetal y un 35% en compost de estiércol. El contenido en materia orgánica de un compost es importante debido a que influye sobre sus propiedades físicas (Gutiérrez C. , 2013).

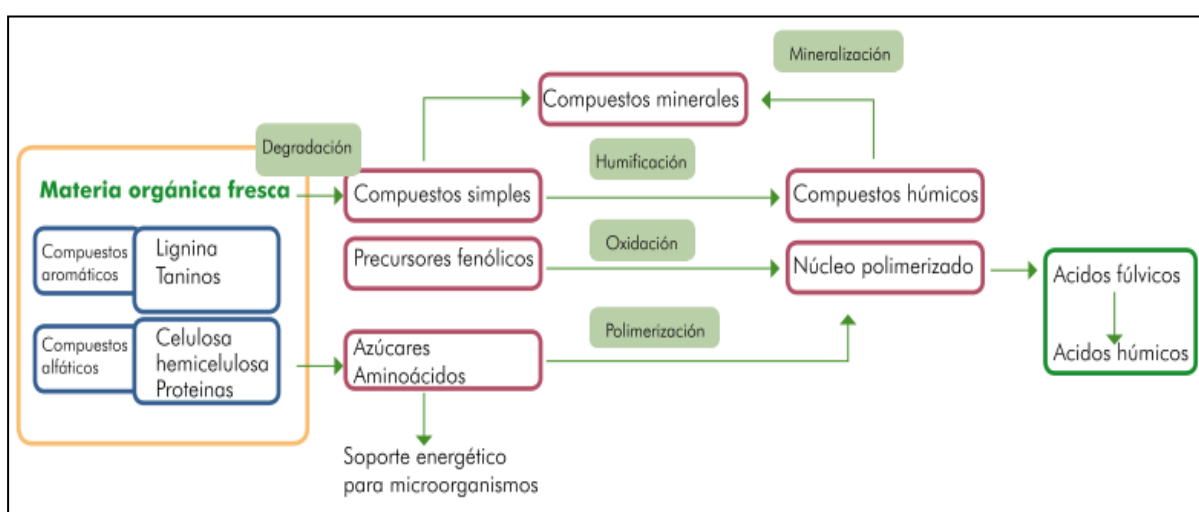


Figura 1 Proceso de transformación de la materia orgánica (MO)

Fuente: (FAO, 2013) Adaptado de Ribó 2004

2.2.4 Sistemas de compostaje

La selección del sistema de compostaje más adecuado depende de una amplia relación de criterios a evaluar entre los que se puede destacar, costes de inversión, superficie requerida, control de la aireación y de olores, el clima de la zona, dificultades constatadas y capacidad de tratamiento. Existen diferentes tipos de sistemas para la elaboración de pilas de compostaje la elección será de acuerdo al volumen y la logística que se maneje estos sistemas son: Sistemas abiertos, aeróbico, pilas o hileras con volteo, sistemas semicerrados y sistemas cerrados (Gutiérrez C. , 2013).

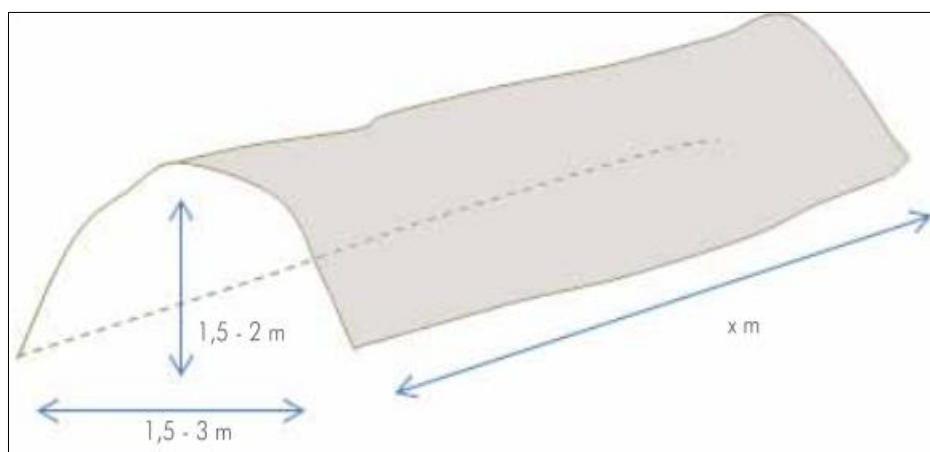


Figura 2 Dimensiones de una pila para un pequeño agricultor
Fuente: (FAO, 2013)

2.2.5 Fases del proceso de compostaje

Durante el proceso de formación del compost se registra tres fases muy marcadas que son: Mesófila, termófila y maduración.

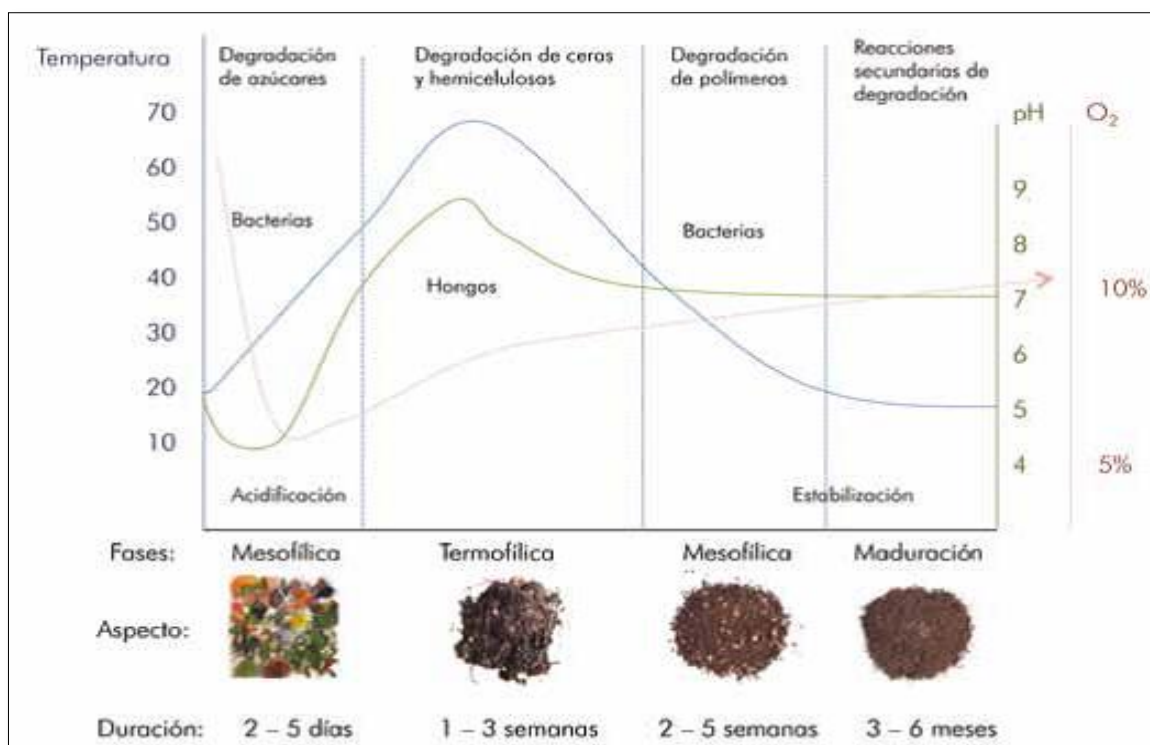


Figura 3 Temperatura, oxígeno y pH en el proceso de compostaje
Fuente: P. Román, (FAO, 2013)

2.2.5.1 Mesófila

Es la etapa más dinámica del proceso de compostaje, en la cual se produce incremento de la temperatura de 10°C a 40°C, en conjunto con la degradación de los compuestos orgánicos más simples y de fácil degradación (azúcares y aminoácidos) como consecuencia de la actuación de bacterias y hongos mesófilos y termotolerantes. A su vez, se produce una disminución del pH, debido a la descomposición de lípidos y glúcidos en ácidos orgánicos y las proteínas en aminoácidos (Gutiérrez C. , 2013).

2.2.5.2 Termófila

Se determina por el desarrollo de elevadas temperaturas (45-60°C) que permiten únicamente la propagación de bacterias termófilas, inhibiendo la actividad de bacterias mesófilas, hongos y levaduras. El decrecimiento de la actividad microbiana hace que el incremento de la temperatura no sea tan pronunciado como en la etapa anterior. La degradación de los ácidos obtenidos en la etapa anterior provoca el incremento del pH pasando desde 5,5 hasta 7,5, en esta etapa se alcanzan las mayores emisiones de olor generadas durante el proceso de compostaje (Gutiérrez C. , 2013).

2.2.5.3 Enfriamiento y maduración

Es la etapa donde se produce una disminución de la temperatura hasta temperatura ambiente, el material se encuentra más estable y humidificado, por lo que prolifera de nuevo la comunidad mesófilos de la fase inicial, hongos y actinomicetos capaces de degradar compuestos complejos. (Gutiérrez C. , 2013).

La madurez es el grado o nivel de integridad de compostaje e implica cualidades mejoradas resultantes de 'envejecimiento' o 'curado' de un producto. El compostaje de acuerdo a la Asociación del Reino Unido, define al compost maduro como “compost que no tenga un efecto negativo sobre la germinación de semillas o el crecimiento de plantas”, contenido MO

estable y ausencia de compuestos fitotóxicos y vegetales o animales patógenos (Bernal, Albuquerque, & Moral, 2009).

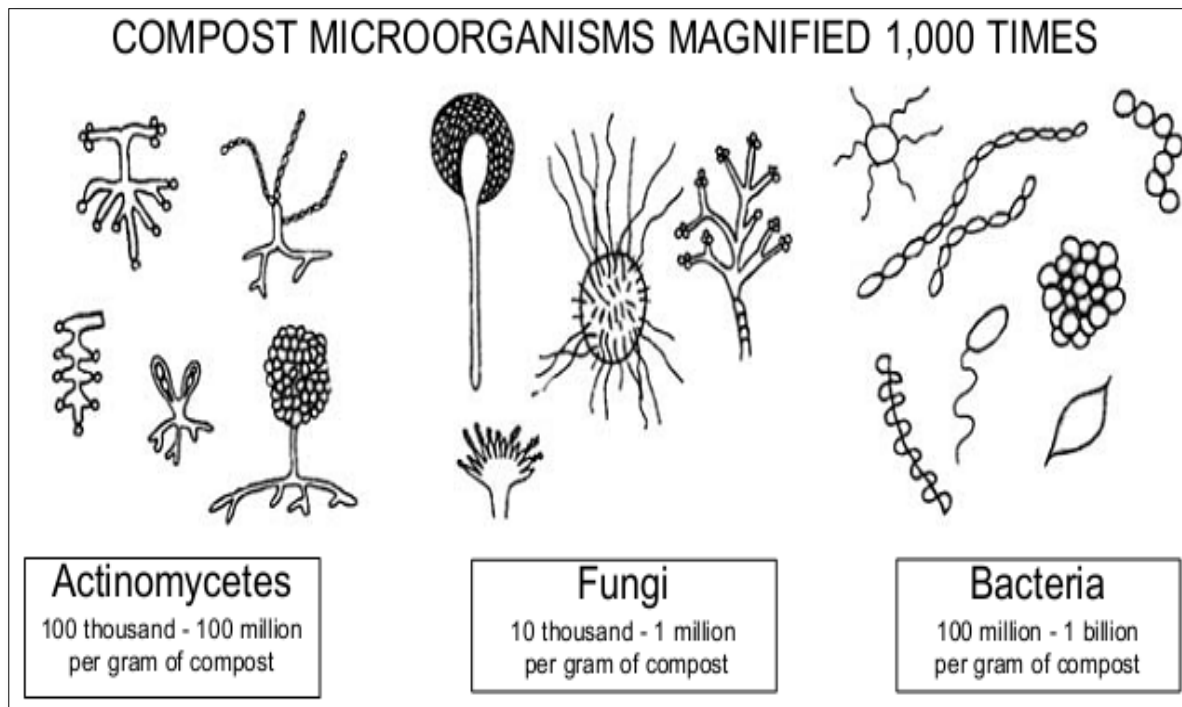


Figura 4 Concentración óptima de microorganismos en un compost maduro
Fuente: (Sterritt & Robbet, 1998)

2.2.6 Aplicaciones

El compost se puede aplicar semimaduro o ya maduro, el compost semimaduro tiene una alta actividad biológica y el porcentaje de nutrientes fácilmente asimilables por las plantas es mayor que en el compost maduro, al tener un pH no estable aún puede afectar negativamente a la germinación, no se usa para germinar semillas, ni en plantas delicadas. La aplicación en horticultura del compost semimaduro es normalmente una aplicación de 4 – 5 kg/m² en el terreno previamente labrado, en cultivos extensivos, la aplicación es de 7 – 10 T/ha de compost. El compost maduro se usa en gran medida para plántulas, se suele mezclar desde el 20%-50% con tierra y otros materiales como turba y cascarilla de arroz como preparación de sustrato (FAO, 2013).

2.3 Biol

2.3.1 Concepto

Es un abono líquido, proveniente de la fermentación anaerobia de residuos orgánicos y estiércol, rico en nitrógeno amoniacal, aminoácidos, vitaminas y minerales, provee de fitorreguladores a suelos de cultivo, potencia la germinación de las semillas, el enraizamiento, crecimiento y floración de las plantas. Aproximadamente el 90 % del material entrante en el biodigestor se transforma en biol, debido a la variación en las características de sus componentes se puede decir que cada biol es único, pero generalmente en el proceso se mantienen las proporciones de elementos como N, P, K, Mg se evidencia un bajo porcentaje de sólidos totales que van desde el 1 al 5% (Checa , 2015). Dentro de los ingredientes más comunes esta, rresiduos de origen orgánico, estiércol, melaza, leche, sales minerales, fosfato di Calcio y agua no potable.

2.3.2 Factores que intervienen en la fermentación del biol

Existen diversos factores cada uno con su importancia en las diferentes etapas del proceso de la biodigestión.

2.3.2.1 Material de carga

Se refiere a los residuos orgánicos que se van a degradar dentro del biodigestor, la fermentación va a producirse al colocar dos tipos de material de carga: el primer tipo debe ser fuente de nitrógeno, que ayuda en la formación de estructuras celulares, y el segundo debe tener alto contenido de carbono, que sirve como fuente de energía en la reacción (Checa , 2015) .

2.3.2.2 Relación Carbono Nitrógeno

La materia orgánica contiene carbono y nitrógeno en diferentes proporciones, esta relación nos indica la predominancia de cualquiera de ambos elementos. Los microorganismos se nutren de ellos permitiendo la fermentación metanogénica, por lo que es

importante que el biodigestor contenga un sustrato equilibrado entre fuentes de carbono y de nitrógeno, para una mejor degradación (Checa , 2015). Las relaciones de C : N en experimentos realizados para desechos orgánicos esta entre 15.6 y 17.2 ambos más bajos que los números (22-35) sugerido en la bibliografía para un funcionamiento estable del digestor la baja relación implicaba que contienen una gran cantidad de nitrógeno, principalmente en formas orgánicas, tales como proteínas (Lin, Zuo , & Gan, 2011).

2.3.2.3 Temperatura

Es un factor ambiental que debe controlarse para que el interior del biodigestor se mantenga en un rango de 30°C a 35°C. Esta temperatura da un medio ideal para la reproducción de los microorganismos, acelerando la degradación del material de carga y disminuyendo el tiempo de producción (Checa , 2015).

2.3.2.4 pH

Los sistemas anaeróbicos requieren un pH el rango de 6,5-7,5 para un óptimo desempeño, con el fin de mantener el pH de los reactores dentro del rango aceptable de 6.5 a 7.5, se utiliza enmiendas de alcalinidad en cada botella en forma de 2,000 mg / L de bicarbonato de sodio (pureza del 99,7%) y 2.000 mg / L de bicarbonato de potasio (pureza del 99,7% (Hosseini, Barrantes, Eskicioglu, & Dut, 2014).

2.3.2.5 Agitación

Es el proceso que homogeniza el contenido del biodigestor evitando que se acumulen sólo en ciertos sitios, así los microorganismos pueden desarrollarse uniformemente eliminando espacios muertos sin desarrollo bacteriano. La frecuencia de agitación es muy importante, pues si se lo realiza cada corto tiempo se puede impedir que se desarrolle normalmente la síntesis y formación de compuestos. Los métodos de agitación son muy variados y van desde movimientos repetitivos manuales hasta dispositivos que realizan una

mezcla muy eficiente del sustrato, dependiendo del tipo de biodigestor con el que se cuente (Checa , 2015).

2.3.2.6 Tiempo de retención

Es el tiempo que el sustrato se mantiene dentro del biodigestor degradándose hasta obtener el producto deseado. Puede variar dependiendo del diseño del biodigestor, la temperatura, humedad, agitación, el tamaño de las partículas y la calidad de la biomasa usada (Checa , 2015).

2.3.3 Etapas de la biodigestión anaerobia

El proceso de digestión anaeróbica se divide principalmente en cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Estas fases se desarrollan de manera consecutiva por diferentes tipos de microorganismos. Las bacterias participantes en cada etapa presentan distintas velocidades de crecimiento y su sensibilidad varía de acuerdo a los compuestos existentes en el medio como inhibidores (hidrógeno, amoníaco, ácido acético, etc.). Por consiguiente, cada fase tendrá diferentes velocidades de reacción dependiendo de las condiciones de operación del sustrato alimentado. Es así que el desarrollo global del sistema necesita alcanzar un equilibrio, para evitar la acumulación de los compuestos inhibidores como son los ácidos grasos volátiles, que ocasionan disminución del pH. Para alcanzar este equilibrio, es importante realizar la puesta en marcha del reactor paulatinamente (Huang, 2015) .

2.3.3.1 Primera etapa (Hidrólisis)

La materia orgánica del biodigestor es hidrolizada en componentes más simples y solubles gracias a la acción de enzimas, que van a descomponer los polímeros dando como producto ácidos carboxílicos, azúcares solubles, glicerol y aminoácidos. Esta producción de

ácidos hace que el pH baje, por lo que se puede adicionar bicarbonato de sodio o minerales para compensar la acidez (Checa , 2015).

2.3.3.2 Segunda etapa (Formación de ácidos)

Los productos resultantes de la hidrólisis serán metabolizados en el interior celular, a través de rutas como:

Metabolismo acidogénico

Los microorganismos formadores de ácido van a convertir los productos de la primera etapa en ácidos orgánicos, cuyas cantidades y proporciones dependerán del tipo de compuestos que tengamos en el sustrato, entre los más comunes tenemos la formación de etanol, hidrógeno, dióxido de carbono, ácido acético, láctico, fórmico, etc (Checa , 2015) .

Metabolismo acetilénico

El hidrógeno y el dióxido de carbono se transforman junto con los compuestos resultantes de la flora acidogénica, formando acetato por dos diferentes rutas: o A través de la fermentación de ácidos y alcoholes, proceso llamado des-hidrogenación acetogénica. Por medio de bacterias homoacetogénicas a partir de hidrógeno y dióxido de carbono. Estas clases de microorganismos transforman los productos de la hidrólisis, en sustratos aptos para la metano-génesis (Checa , 2015).

2.3.3.3 Tercera etapa metanogénesis

En la última etapa actúan bacterias metanogénicas en la formación de metano mediante dos vías: En la primera por fermentación del ácido acético más bacterias metanogénicas y la segunda por reducción del dióxido de carbono por hidrógeno. Así que, dos tercios del total de metano producido se derivan de la fermentación del ácido acético, formado en la segunda etapa y el tercio restante es resultado de la reducción del dióxido de carbono por el hidrógeno.

2.3.4 Composición del producto final (Biol)

De acuerdo a las características de la materia prima usada, el producto saliente representará un 90 % de biol y 10 % de biosol aproximadamente, además de contener compuestos nitrogenados y sales minerales en diferentes proporciones (Checa, 2015). El biol está constituida en su mayoría de sólidos disueltos (nutrientes solubles) y agua, conservando entre 0,5 a 1,5% de sólidos en suspensión (Suquilanda, 2006).

2.3.5 Beneficios

Permite un mejor intercambio catiónico en el suelo así como ampliar la cantidad de nutrientes disponibles. Ayuda a mantener la humedad y se forma un microclima adecuado para las plantas (Checa, 2015). Fuente orgánica de fitorreguladores, en pequeñas cantidades es capaz de promover actividades fisiológicas y estimular el desarrollo de las plantas como: enraizamientos (aumenta y fortalece la base radicular), acción foliar (amplía la base foliar), mejora la floración y activa el vigor y poder germinativo de las semillas (Suquilanda, 2006).

2.3.6 Calidad

La cantidad del producto podrá variar junto con la calidad del biol, que dependen del tipo de manejo que hayan tenido los residuos, sus características, asepsia, el tiempo de retención en el biodigestor y las condiciones ambientales en las que se encuentre. En climas cálidos generalmente el tiempo de retención mínimo es de 30 días, alcanzando una descomposición equilibrada de los materiales entrantes (Checa, 2015).

2.3.7 Aplicación del biol

Cuando el biol está listo no puede colocarse como abono directamente, si se lo hace se producirán reacciones adversas por la concentración de los componentes. Se lo debe mezclar junto con el agua de riego para ser aplicado en suelos desgastados preparándolos para la siembra, además de potenciar la germinación de las semillas y el enraizamiento. En

plantaciones se debe diluir el biol a razón de 1.5 a 2 litros en una mochila de 15 litros de capacidad, colocándose con un aspersor de manera foliar, es decir, sobre las hojas para fortalecer las etapas de crecimiento y evitar el ataque de plagas. El biosol que resultó como producto secundario se lo puede colocar alrededor de las plantas para reforzar los nutrientes del suelo. La frecuencia y concentración de las dosis dependen del estado, del tipo de plantación y de las características foliares (Checa , 2015).

2.4 Biodigestores

2.4.1 Generalidades

Son recipientes cerrados donde se degrada materia orgánica a través de microorganismos, que pueden presentar reacciones aeróbicas o anaeróbicas en base al tipo de fermentación requerida. Los biodigestores son equipos que se pueden implementar de muchas maneras y tamaños, su función es mantener en su interior las condiciones propicias de temperatura, humedad, oxigenación y pH, haciendo que la biomasa se digiera en compuestos orgánicos más simples que son fácilmente asimilables. La reacción en su interior genera gases durante todo el proceso, por lo que necesita una válvula y un reservorio de almacenamiento dependiendo del tipo de sistema que se use (Checa , 2015).

2.4.2 Digestión anaeróbica

Es un proceso de degradación bioquímico que es aplicado constantemente en tratamientos y recuperación de energía a partir de diferentes tipos de biomasa, especialmente desechos agroindustriales, este proceso se realiza naturalmente con la actividad de microorganismos que degradan la materia orgánica bajo condiciones idóneas en ausencia de oxígeno, como producto final de este proceso se obtiene biogás que contiene aproximadamente entre 30-40% de dióxido de carbono y entre 50-70% de metano. Las ventajas de someter de este proceso es la reducir en gran medida de malos olores, producir

energía renovable mediante la combustión del biogás y disminuir la emisión de gases de efecto invernadero (Huang, 2015)

2.4.3 Tipos de biodigestores

Los tipos de digestores varían de acuerdo a su estructura de funcionamiento siendo los más comunes los sistemas: continuo, semicontinuo y discontinuo los productos de la biodigestión son biol utilizado como producto fertilizante líquido foliar, biosol es parte sólida se utiliza como enmienda del para mejorar la calidad del suelo y biogás para generar energía.

2.4.3.1 Sistema Continuo

Este tipo de biodigestor tiene un flujo constante de sustrato activo en su interior, generalmente son sistemas modernos que usan equipos sofisticados para su alimentación, agitación, monitoreo, calefacción y enfriamiento para poder obtener una producción continua (Checa , 2015).

2.4.3.2 Sistema Semicontinuo

Son sistemas que resultan muy eficientes en la producción de biogás, pues el biodigestor se alimenta con sustrato al mismo tiempo que se descarga la misma cantidad de efluente, esto se realiza en periodos cortos de tiempo, manteniendo una cantidad de biomasa constante mientras la producción de biogás es continua. Por eso no suelen ser usados para obtención de abonos ya que el sustrato está activo todo el tiempo produciendo biogás (Checa , 2015).

2.4.3.3 Sistema Discontinuo

Se los llama también biodigestores de carga fija, pueden tener un sistema de agitación o no ya que se la puede realizar de forma manual y la carga de material se realiza una sola vez. Funciona cerrado herméticamente para evitar la presencia de oxígeno, en un lapso de 30 a 50

días finalizará la fermentación y su descarga se realizará cuando el sistema deje de emanar gas.

2.5 Microorganismos en la biodigestión

Los microorganismos realizar funciones importantes en cada etapa de la biodigestión, siendo de suma importancia las bacterias y hongos, por su especificidad enzimática para transformar un sustrato en un producto.

2.5.1 Bacterias descomponedoras

Las bacterias son las más numerosas en el proceso de compostaje, y constituyen entre el 80% y el 90% de los microorganismos existentes en el compost. Se trata de un grupo de gran variedad metabólica, que utilizan un extenso rango de enzimas que degradan químicamente una gran diversidad de compuestos orgánicos. La cuantificación de las bacterias aerobias totales representa, de alguna manera, un índice de actividad biológica (Laich, 2012)

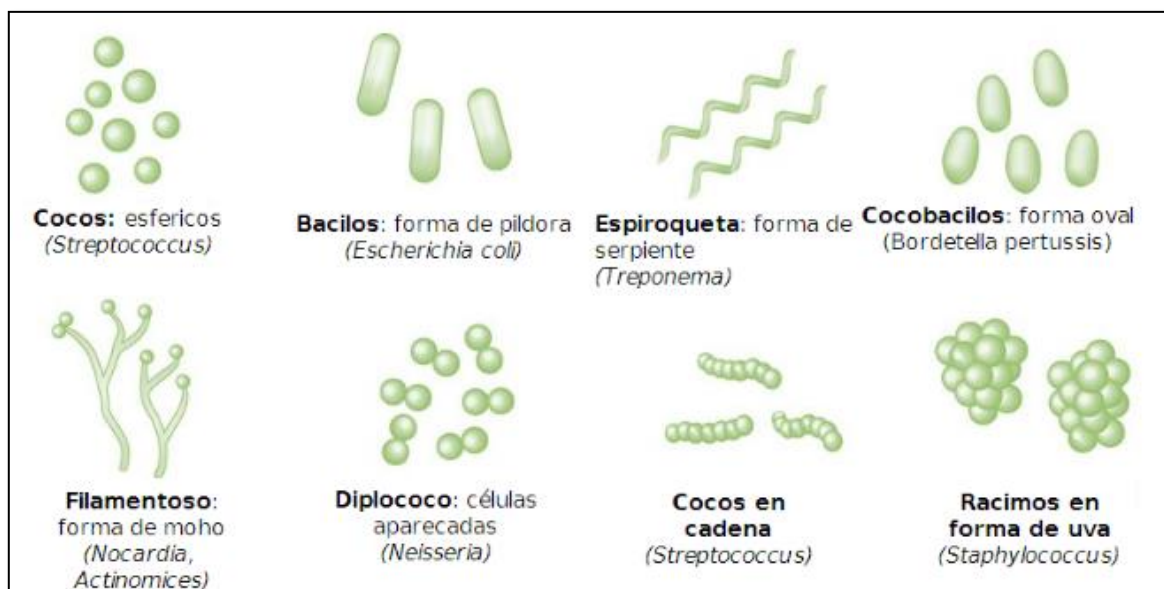


Figura 5 Morfología de las bacterias comunes en la biodigestión

Fuente: (Rosenthal & Tan, 2011).

2.5.2 Hongos descomponedores

Los hongos filamentosos constituyen un grupo muy amplio. Diferentes géneros han sido descritos durante el proceso de compostaje, participando en la degradación aeróbica de la materia orgánica debido a su alta capacidad lignocelulolítica (Laich, 2012)

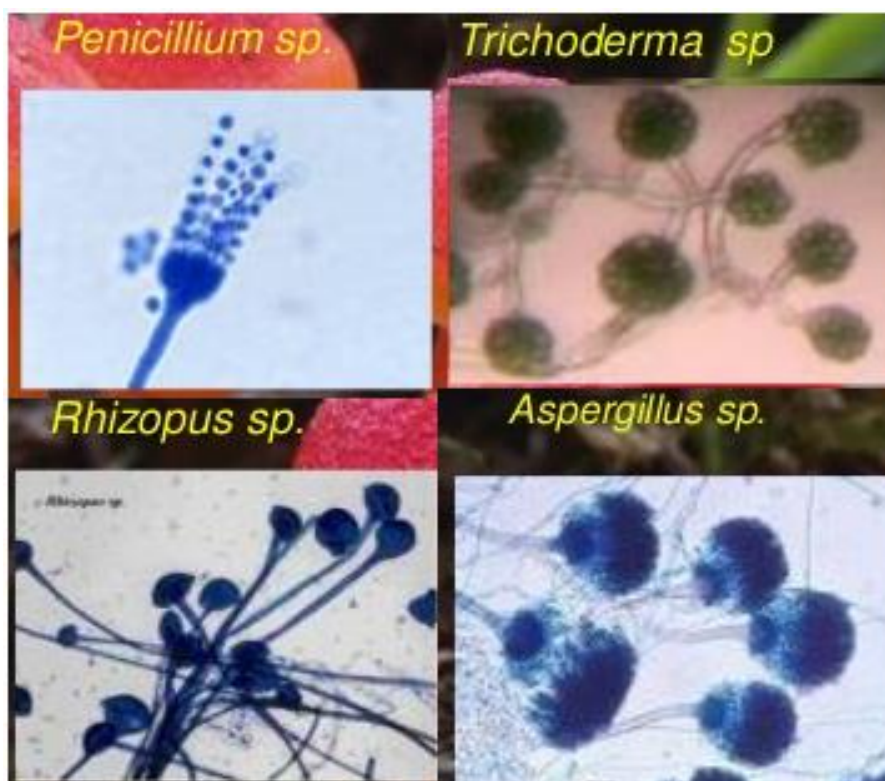


Figura 6 Estructura de hongos comunes en la biodigestión
Fuente: (Gallardo, Montoya, & Castellanos, 2014)

2.5.3 Microorganismos en los productos comerciales

Los microorganismos presentes en la biodigestión son de diversos géneros principalmente se los atribuye actividades descomponedores de materia orgánica como fuente de alimento, por lo que diversos productos se han desarrollado con esta base científica. Sobre todo en su gran mayoría a las bacterias dado a su actividad en el inicio y en la fase final de la biodigestión.

Tabla 3

Microorganismos utilizados en algunos de los productos microbianos comerciales para la biodigestión aeróbica y anaeróbica.

Grupo	Nombre científico Bacteria	Característica condición adecuada Gram.1
Bacteria		
	<i>Azotobacter</i>	aeróbica Gp
	<i>Bacillus spp.</i>	aeróbica Gp
	<i>Bacillus subtilis</i>	aeróbica Gp
	<i>Bacillus licheniformis</i>	aeróbica Gp
	<i>Bacillus megaterium</i>	aeróbica Gp
	<i>Bacillus polymyxa</i>	aeróbica Gp
	<i>Bacillus macerans</i>	aeróbica Gp
	<i>Pseudomonas putida</i>	aeróbica Gn
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	aeróbica Gn
	<i>Rhodospseudomonas sphaeroides</i>	aeróbica Gn
	<i>Streptococcus lactis</i>	aeróbica Gp
	<i>Streptococcus faecalis</i>	aeróbica Gp
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	facultativo Gp
	<i>Lactobacillus casei</i>	facultativo Gp
	<i>Colostridium</i>	anaeróbico Gp
Actinomicetes		
	<i>Streptomyces albus</i>	aeróbica Gp
	<i>Propionibacterium freudenreichi</i>	aeróbica Gp
Levaduras		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	aeróbico/anaeróbico
	<i>Candida utilis</i>	aeróbico/anaeróbico
Hongos		
	<i>Trichoderma viride</i>	Aeróbico
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Aeróbico
	<i>Mucor hiemalis</i>	Aeróbico

Fuente: (Méndez & Soto, 2003), según información elaborada por Picado, 2001

Tabla 4
Microorganismos primordiales en el compostaje

	Fase mesofílica	Fase mesofílica	Fase de maduración
Bacterias	<i>Bacillus brevis</i> , <i>Circulans</i> , <i>Subtilis</i> , <i>Licheniformis</i>	<i>B. Bacillus</i> <i>B. Stearothermophilus</i> <i>B.</i>	
Actinomicetes	<i>Thermophyllum</i>		
Hongos		<i>Absidia glauca</i> , <i>Mucor</i> , <i>Allescheria spp.</i> , <i>Trichoderma spp.</i> , <i>Penicillum spp.</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Verticillium tenerum</i>	<i>Nocardia</i> , sp. <i>Streptomyces sp.</i> , <i>Thermoactynomicetes</i>

Fuente: (Méndez & Soto, 2003).

2.5.4 Consorcios microbianos

2.5.4.1 Importancia

La microbiota indígena habitualmente lleva a cabo el compostaje con éxito, sin embargo el tiempo puede llegar a ser demasiado extenso para obtener el producto final, debido a que la velocidad del proceso está directamente relacionada con la proporción de microorganismos, por lo tanto la inoculación con microorganismos capaces de hacer compuestos fácilmente disponibles metabolizables, mejorar las propiedades de los productos finales acortando el tiempo para lograr la estabilidad (Jurado, López, & Moreno, 2015). En estudios anteriores se ha utilizado la inoculación de consorcio microbiano lignocelulolíticas con el hongo de podredumbre blanca como una estrategia más activa para mejorar potencialmente la velocidad de liberación de una amplia gama de enzimas hidrolíticas en particular, celulasas, xilanasas, proteasas, lipasas, y fosfatasas. Otras especies están involucradas en consorcio microbiano también capaz de romper todos los componentes de la M.O. de compostaje (Awasthi, Pandey, Bundela, & Khan, 2015).

Un consorcio microbiano puede componer diversos microorganismos un ejemplo de un consorcio microbiano es un cultivo puro de dos especies de hongos lignocelulolíticos: *Chrysosporium phanerochaete* , *Trichoderma viride* y una especie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* , mezclados entre sí. La selección de las cepas para formar un consorcio se la realiza sobre la base de la compatibilidad mutua para la actividad enzimática y el sustrato la degradación de la forma específica (Awasthi, Pandey, Bundela, & Khan, 2015).

2.5.5 Identificación bacteriana

La identificación bacteriana es una herramienta para aseverar el proceso generado dentro de la biodigestión y tomar medidas en base a la composición bacteriana para la generación de productos en base a sus procesos enzimáticos e inocuidad. Existe diferentes metodologías para la identificación bacteriana esta son: Morfológica y molecular

2.5.5.1 Morfológica

Los métodos convencionales de identificación bacteriana se realizan por medio de características fenotípicas, debido a que su realización y costo son más asequibles; la identificación fenotípica bacteriana se funda en las características visibles de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. El medio de cultivo sigue siendo el método diagnóstico de elección; reconoce el aislamiento del microorganismo participante, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos facilita la aplicación de marcadores (Bou, Fernández, García, Sáez, & Valdezate, 2011).

2.5.5.2 Molecular

La falta de concordancia entre las características visibles, morfológicas del aislamiento en estudio y las correspondientes a la cepa de la especie tipo, hacen que métodos fenotípicos

efectúen la identificación más probable y no definitiva por lo que los métodos genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios o alternativos se hacen necesarios para actividades de suma importancia.

PCR

La PCR es un proceso simple, altamente reproducible y exacto que facilita empezar con una pequeña cantidad de ADN y de amplificarlo de forma suficiente para realizar experimentos, se han desarrollado cantidad importantes de test diagnósticos, se ha utilizado en proyectos de genoma para mapaje y secuenciación de ADN y también está siendo utilizado en determinaciones forenses, paternidades, diagnóstico clínico entre otros (BIOTED)

ADNr 16S

Es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos, codificado por el gen 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se obtiene información filogenética y taxonómica de los procariontes. El ARNr se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla (BIOTED). Una gran variedad de genes han sido utilizados como dianas moleculares en las investigaciones taxonómicas o de filogenia en las distintos géneros y especies bacterianas, estableciendo que el análisis del ARNr 16S como marcador inicial y en varias situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa (Bou, Fernández, García, Sáez, & Valdezate, 2011).

2.6 Enzimas

2.6.1 Concepto

Las enzimas son catalizadores orgánicos producidos por microorganismos utilizados para acelerar las reacciones de producción de energía, comprenden el mayor y más

especializado grupo de moléculas de proteína del interior de la célula, su estructura es vulnerable a la temperatura y el pH (Rittmann & McCarty, 2001)

2.6.2 Características

Existen dos características de suma importancia que es la especificidad de la enzima, la misma que conduce la transformación de un producto químico a lo largo de una dirección deseada y la tasa de reacción que cataliza, es la velocidad de la reacción deseada que produce en su presencia (Rittmann & McCarty, 2001). Una reacción catalizada enzimáticamente sucede en un lugar determinado de la enzima, llamada sitio activo. En el sitio activo la molécula es fijada y en la que actúa la enzima denominada sustrato. Mediante la interacción de la enzima y sustrato (reactivo), forman un complejo intermediario, luego la descomposición del complejo intermediario para formar los productos y restablecer la enzima (Hernández, Alejo, Méndez, Cordova, & García, 2015)



Figura 7 Interacción enzima sustrato

Fuente: (Murray, Birdsall, Pizzorno, & Reilly, 2002)

2.6.3 Clasificación según procesos industriales

Las enzimas típicas usadas en varios procesos de interés desde el punto de vista industrial han sido muy difundidas y de aplicación continuamente en todos los procesos bioquímicos para obtener un producto específico.

Enzimas típicas usadas en procesos industriales

Clase	Enzimas Industriales
Oxidoreductasa	Peroxidasa, catalasa, glucosa oxidasa, lacasas
Transferasas	Fructosil-transferasa, glucosil-transferasas
Hidrolasas	Amilasas, celulasas, lipasas, pectinasas, proteasas, pululanasa
Liasas	Pectato-liasas, α -acetolactato decarboxilasa
Isomerasas	Glucosa isomerasa
Ligasas	No son usadas actualmente

2.6.4 Función Enzimática

La enzima o catalizador es una sustancia que aumenta la velocidad de una reacción química, sin verse alterada en el proceso integral. En gran parte los catalizadores biológicos son proteínas, denominadas enzimas. Usualmente todas las reacciones bioquímicas de los sistemas biológicos demandan de una cantidad de energía que permita su inicio. La función de un catalizador es la de reducir el requerimiento de energía inicial para que un proceso se lleve a cabo (Soria, 2008).

Muchas de las transformaciones que tiene la materia orgánica en el proceso de compostaje se realiza por enzimas hidrológicas para controlar la tasa de degradación de diferentes sustratos, la variación de las concentraciones como la amilasa, celulasa, proteasa, deshidrogenasa y xilanasas, fueron estudiados para entender los cambios en función a la degradabilidad utilizando como inoculante un consorcio microbiano con residuos de diferentes desechos orgánicos (Awasthi, Pandey, Bundela, & Khan, 2015).

2.6.5 Enzimas Proteolíticas

Las enzimas proteolíticas (o proteasas), son las enzimas que se caracterizan por digerir las proteínas. Incluyen a las proteasas pancreáticas quimotripsina y tripsina, la papaína (enzima de papaya), la bromelina (enzima de piña), proteasas fungales y la peptidasa de serratia (la enzima del "gusano de seda") (Murray, Birdsall, Pizzorno, & Reilly, 2002).

2.6.6 Bromelina

La bromelina es una enzima con acción proteolítica es decir rompe las moléculas proteicas mismas que pertenecen a las hidrolasas, permitiendo una eficiente asimilación de los aminoácidos que las forman. Descompone las proteínas similar a la pepsina, enzima que constituyen parte del jugo gástrico (Jiménez, 2009).

2.6.6.1 Aplicaciones de la enzima bromelina

Esta enzima es ampliamente utilizada en la industria de alimentos sobretodo, siendo de mayor interés y aplicación como ablandado de la carne, en la industria de las bebidas así como en el enfriamiento de la cerveza, en la actividad de productos de proteínas solubilizadas, en la producción de proteínas hidrolizadas entre otras aplicaciones. La biomasa residual de tallos de piña es materia prima para la obtención de la bromelina (Jiménez, 2009).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del lugar de investigación

La presente investigación se llevó a cabo en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE en las instalaciones de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA, en el laboratorio de Biotecnología.

3.1.1 Ubicación Política

Provincia: Pichincha

Cantón: Rumiñahui

Parroquia: San Fernando, Hacienda el Prado (IASA I)

3.1.2 Ubicación Geográfica

Longitud: 78° 24' 44"

Latitud: 0° 23' 20"

Altitud 2748 msnm

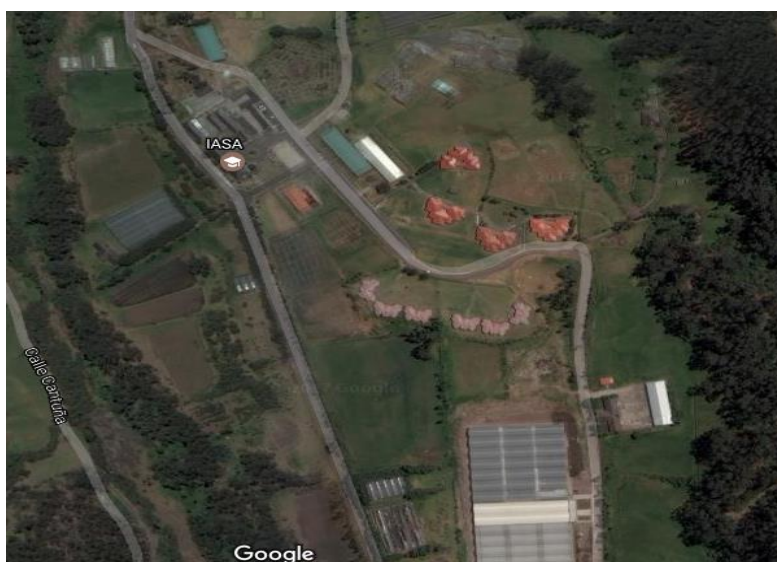


Figura 8 Mapa del sitio de ensayo experimental
Fuente: Hacienda el Prado. (Google Maps, 2017)

3.1.3 Ubicación ecológica

El proyecto de investigación está ubicado ecológicamente en base a los siguientes parámetros:

Precipitación media anual:	1285 mm/año
Temperatura media anual:	13.89 °C
Humedad relativa:	69.03 %
Piso altitudinal:	Montano bajo
Región latitudinal:	Templada
Zona de vida:	Bosque Húmedo
Clasificación Bioclimática:	Húmedo-Temperado
Provincia de Humedad:	Húmedo

Fuente: (Estación I & Meteorológica IASA, 2016).

3.2 Materiales

3.2.1 Laboratorio

Cristalería

Tubos de ensayo de 10 y 20 ml, vasos de precipitación (5, 50, 100 y 1000 ml), matraces, Erlenmeyer, pipetas (1, 10, 25 cm³), probetas (10, 30, 50, 100, 500 cm³), crisoles de porcelana, refrigerantes de serpentín, sifón Soxhlet, perlas de vidrio, soporte universal, balón de 250 ml, tubos Kjeldahl

3.2.2 Equipos

Balanza analítica (ADAM, máx.= 320g, d=1mg), balanza analítica (ADAM 360gr), cámara de flujo, centrifuga DYNAC, estufa, horno secador, molino de motor (partícula 1mm), mufla (Thermolyne 1500 °C), balanza analítica (ADAM 360gr), digestor (Inkjel M) con extracción de vapores, micro-Kjeldahl destilador (Velp-UDK), espectrofotometro (SpectroFlex

6600), extractor de gases, agitador magnético, absorción atómica (ASC -6100, AA-6800), termómetro, pH metro

3.2.3 Reactivos

Ácido clorhídrico, Sulfato de Amonio, Ácido Sulfúrico, Oxido de Lantano III, Alcohol potable al 96 %, Molibdato de Amonio, Hidróxido de Sodio, Ácido Bórico, Amonio hierro II Sulfato, Dicromato de Potasio, Peróxido de Hidrogeno, Molibdato de Aluminio, Vanadato de Amonio, tabletas de catalizador Kjeldalh (kjeltabs), indicador de mezcla de rojo de metilo y de azul de metileno, parafina sólida, agua destilada, agua peptonada, alcohol, medio peptonado, PCA (Agar peptona de caseína), PDA, caldo nutritivo, agua no potable, leche, sales minerales, fosfato di cálcico, desecho industrial de frutas, melaza, consorcios bacterianos.

3.3 Métodos

3.3.1 Caracterización de la biomasa residual de cinco frutas

3.3.1.1 Análisis Bromatológicos

Humedad y Materia seca (MS)

La muestra se sometió a la estufa durante 24 horas a 70-80°C para determinar su humedad y complemento (MS) mediante la siguiente fórmula.

$$\% \text{Humedad} = (M-m) * 100/M$$

M= masa inicial de la muestra en gramos (g)

m= masa inicial de la muestra en g seca

$$\% \text{MS} = 100 - \% \text{Humedad}$$

Materia Orgánica y Carbono

Para la determinación del porcentaje de la materia orgánica (M.O) se realizó por el método de calcinación, se pesó una muestra de 3 g previamente secada y molida se colocó en

crisoles de porcelana, se calcinó la muestra en una mufla a 450° C-500°C, durante 3 ó 4 horas y se pesó nuevamente. Se calculará la diferencia de peso entre las medidas antes y después de calcinar.

$$\% \text{Ceniza} = \frac{(P_1 - P_2)}{P - P_2} * 100$$

P_1 = Peso en g del crisol + ceniza

P_2 = Peso del crisol en vacío

P = Peso del crisol + muestra

El Space Sciences Laboratory (1996) recomienda utilizar un factor de corrección igual a 1.724, asumiendo que la materia orgánica tiene 58% de carbono orgánico. Se transformó el contenido de carbono orgánico a contenido de materia orgánica, en porcentaje (%MO), mediante la relación.

$$\text{a) } \% \text{M.O} = \% \text{C} * (1.724) \quad \text{y por despeje se obtendrá} \quad \text{b) } \% \text{C} = \frac{\% \text{M.O}}{1.724}$$

Nitrógeno (N)

Se pesó 1.5g de la muestra en trozo de papel parafina, y se colocó en los tubos de ensayos del micro Kjeldalh de digestión con $\frac{1}{4}$ de la tabla catalizadora de Kjeldalh posteriormente se agregó 12.5 ml de ácido sulfúrico concentrado, se calentó la muestra a 350 °C durante 2 horas, se enfrió hasta que alcance a los 40°C y se agregara 75 ml de agua destilada (AOAC, 2016). Para la destilación con 50ml de hidróxido de sodio y un tiempo de 6m 30s, en un matraz se colocó 30ml de ácido bórico más 2 gotas del colorante y se realizó la titulación añadiendo la solución 0.1 N de ácido clorhídrico, para la determinación del N se utilizó la siguiente ecuación.

$$\% \text{N} = \frac{0.014(V_1 - V_0)N}{m} * 100$$

$\% \text{N}$ = Porcentaje de Nitrógeno

V_1 = Volumen de HCl 0.1N

V_0 = Volumen de HCl blanco

N = Normalidad

Fibra

Se pesó una muestra de 3 g, se colocó la muestra en un erlenmeyer de 250 ml de ácido clorhídrico 1 N, se hirvió la muestra por 2 horas a 200°C, se lavó con agua destilada 200ml (filtrar), se colocó la muestra en otro erlenmeyer que contenga 100 ml de hidróxido de sodio 1N, se hirvió nuevamente por 2 horas 200°C. Previamente para el segundo filtrado en los embudos, se secó en la estufa a 80°C por 1 hora, se pesó en la balanza analítica, se lavó la muestra con agua destilada (200ml), se filtró, se secó y se pesó.

$$\% \text{ Fibra} = \frac{A - B}{C} * 100$$

A= Peso papel + muestra

B = Peso Papel

C=Peso muestra

Grasa

Para el análisis de grasa se pesó 3 g de la muestra previamente seca y molida, se introdujo en un dedal de celulosa y se lo colocó dentro del sifón del soxhlet al armar el sistema, se agregó 100 ml alcohol etílico (solvente) 96°, luego se añadió 20ml de solvente, se calentó el balón con 6 esferas de vidrio en el calentador a 350 ° C hasta que realice 4 sifonadas , se retiró el balón con la muestra, se evaporó en la estufa hasta que el líquido se observe viscoso y se pesó, para determinar el contenido de grasa se aplicó la siguiente fórmula.

$$a) \frac{\text{g grasa}}{\text{g muestra}} = \frac{\text{X g grasa}}{100 \text{ g muestra}}$$

$$b) \text{ Grasa} = \frac{B_2 - B_1}{m} * 100$$

B₁= Peso del balón inicial

B₂= Peso del balón + liquido viscoso

m = Peso de la muestra seca inicial

3.3.1.2 Absorción atómica (AA)

Procesamiento de la muestra

Para la técnica de AA se secó la muestra en la estufa a 60-80°C dependiendo del grado de caramelización de cada fruta durante 24 horas y se molió a un diámetro de partícula de 1 mm.

Calcinationes

Se pesó una muestra de 3 g en una capsula de crisol quemando en el calentador a 300°C y luego se calcinó en la mufla a 400°C durante 4 horas y se enfrió, se agregó de 1-2 ml de agua para humedecer las cenizas, se añadió 10ml de HCl 2mol/L y se calentó en crisoles hasta ebullición (Sadzawka, y otros, 2007)

Filtrar

Una vez enfriada la ceniza se filtró el contenido del crisol en el papel filtro, recogiendo el filtrado en un matraz aforado de 50 ml o 100 ml, se lavó y enrasó con agua y se procedió a determinar las concentraciones de macronutrientes (P, K, Mg, Ca) micronutrientes Fe, Cu, Zn (Sadzawka, y otros, 2007)

Calibrar

Con los filtrados de la muestra y los blancos de referencia, se usó un espectrofotometría de absorción atómica (EAA) con llama de aire-acetileno y se calibró con la serie de estándares de los elementos: P, K, Mg, Ca, Fe, Cu, Zn, leer la concentración de: P a 400 nm y 490 nm ; K a 766,5 nm; Mg a 285,2nm; Ca a 422,7 nm; Fe a 248,3 nm; Cu a 324,8nm; Zn a 213,9 nm (Sadzawka, y otros, 2007)

Cálculos

Se determinó macro y micronutrientes de cada una de las muestras de desecho de frutas con la siguiente fórmula.

$$\text{Elemento / (mg/kg)} = \frac{(a - b) \times V}{m}$$

Dónde:

a = mg/l del elemento en el filtrado de la muestra

b = mg/l promedio del elemento en los filtrados de los blancos.

V= Volumen final en ml de filtrado

m= Masa en g de muestra.

3.3.2 Obtención de consorcios microbianos

La materia prima para el aislamiento de las cepas microbianas se obtuvo de la biomasa residual del proceso de despulpado de frutas, para la obtención de pulpas y jugos de la empresa alimenticia INALPEV, estos residuos se procesaron a las 48 horas después. Los microorganismos se aislaron a partir de la biomasa residual de 5 frutas tomadas en tres fases iniciales, media y final de la biodigestión. Adicionalmente cada consorcio, se sometió a diseño y adaptación a condiciones extremas de biodigestión en la fase de laboratorio, finalmente se seleccionó los mejores consorcios bacterianos de acuerdo a sus capacidades enzimáticas catalizadoras para la descomposición de materia orgánica.

3.3.2.1 Aislamiento de consorcio microbiano

Se preparó caldo peptona para aislamiento de consorcios: 200 ml por cada 100 gr de residuo frutal (5 gr peptona, 5 gr dextrosa, 1 L agua destilada). Se pesó 100 gr de residuo frutal y se agregó en un frasco de 300 ml con 200 ml de caldo peptona, se selló, se colocó en el reactor INNOVA 40 a las condiciones de temperatura y agitación constante según la fase de crecimiento.

Tabla 5

Condiciones de crecimiento de consorcios microbianos en agitador incubador INNOVA.

	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO DE INCUBACIÓN EN REACTOR (Horas)	AGITACIÓN
FASE 1 (F1)	42 °C	24 h	100 rpm
FASE 2 (F2)	60 °C	24 h	100 rpm
FASE 3 (F3)	42 °C	24 h	100 rpm
	35 °C	24 h	100 rpm

Se colectó 20 ml del medio de cultivo de cada frasco por fruta, se obtuvo 60 ml de medio por Fase por fruta. Este proceso se lo realizó por triplicado para cada fruta obteniéndose un total de 18 frascos con muestras en proceso (Figura 9). Éste procedimiento se realizó para cada fase, obteniéndose al final 18 frascos de medio de (Consortios Madre). Se filtró en tela y papel filtro y se almacenó en refrigeración hasta su monitoreo.

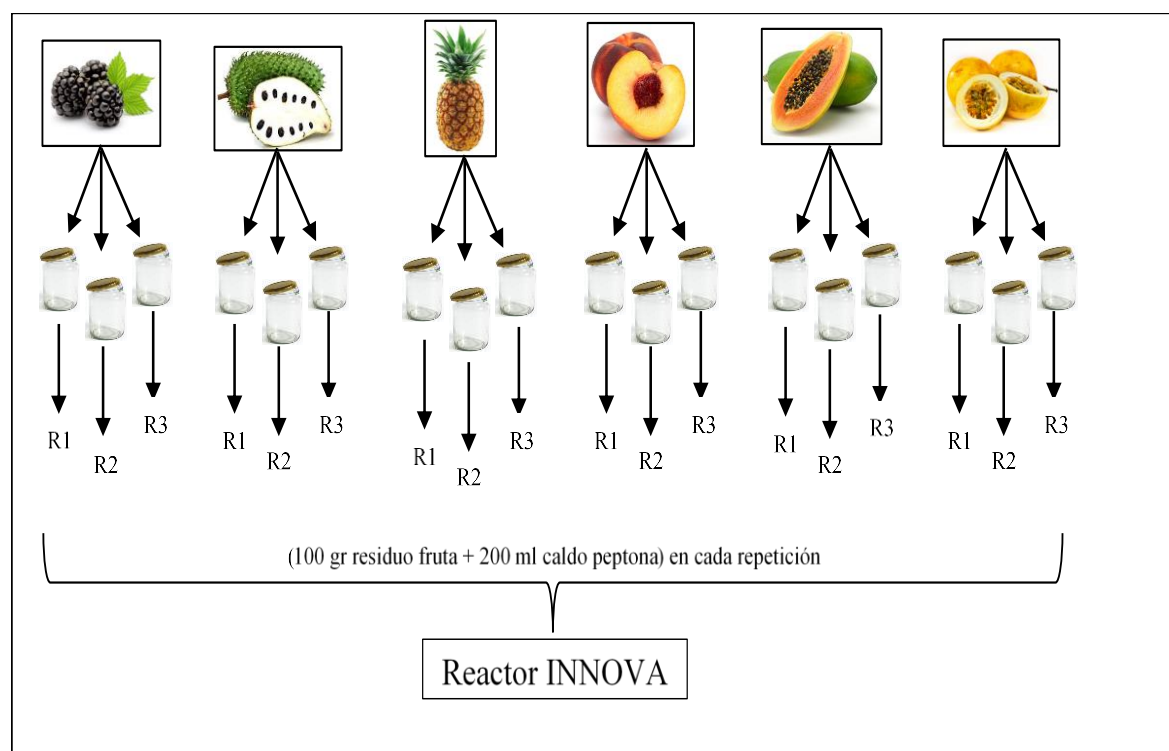


Figura 9 Esquema de procesamiento de muestras de la biomasa residual de frutas

3.3.2.2 Masificación de consorcios microbianos

Para la masificación del consorcio microbiano de frutas se realizó de acuerdo a un rango de escalados consecutivos, con pruebas de concentraciones eligiendo los más aptos para este fin.

Escalado a 1 litro de consorcios microbianos.

Se preparó los recipientes de plástico de 1 litro, se dispensó 780 ml de caldo peptona en cada recipiente y se inoculó con 20 ml de la solución “Consortio Madre”. Se homogenizó, se tomó una alícuota de 2 ml en una celda de espectrofotómetro para determinar la concentración microbiana con ayuda del valor de absorbancia obtenido en el equipo a 560nm y la escala de Mc Farland. Este proceso se realizó cada 24 horas durante tres días, para cada consorcio microbiano. Previo al escalado de los consorcios a gran escala, se desarrolló un ensayo para verificar el crecimiento microbiano bajo condiciones de aireación. Para ello, se elaboró los formulados frutales como se describe en la (Tabla 6)

Tabla 6

Formulados microbianos de las tres fases de crecimiento

Consortio	Contenido
MORA	200 ml Consortio Fase 1 + 200 ml Consortio Fase 2 + 200 ml Consortio Fase 3 + 200 ml de caldo peptona
GUANÁBANA	200 ml Consortio Fase 1 + 200 ml Consortio Fase 2 + 200 ml Consortio Fase 3 + 200 ml de caldo peptona
PAPAYA	200 ml Consortio Fase 1 + 200 ml Consortio Fase 2 + 200 ml Consortio Fase 3 + 200 ml de caldo peptona
MARACUYÁ	200 ml Consortio Fase 1 + 200 ml Consortio Fase 2 + 200 ml Consortio Fase 3 + 200 ml de caldo peptona
PIÑA	200 ml Consortio Fase 1 + 200 ml Consortio Fase 2 + 200 ml Consortio Fase 3 + 200 ml de caldo peptona
FRUTAL	120 ml Consortio MORA + 120 ml Consortio GNB + 120 ml Consortio PPYA + 120 ml Consortio MRCYA + 120 ml Consortio PÑA + 200 ml caldo peptona

Escalado a 5 litros de consorcios microbianos.

Para la masificación de los consorcios bacterianos se utilizó como medio alternativo a base de melaza pura al 10 % con un pH ajustado en 7 y se agregó el inóculo previamente preparado, se incubó a una temperatura de 50°C en agitación constante de 150 rpm (Aguero, 2009). En base a este dato se probó concentraciones de melaza en comparación con el medio peptona (Tabla 7), las concentraciones de los tres medios a evaluar para la masificación de consorcios microbianos fueron mediante burbujeo constante y a temperatura de 50°C.

Tabla 7

Concentraciones de melaza y peptona para masificación de consorcios microbianos

Tratamiento 1	Peptona al 5%	5 g/L Peptona, 5 g/L NaCl, 5 g/L Dextrosa, agua destilada (Pastor, 2006)
Tratamiento 2	Melaza al 10%	100 g/L Melaza de caña, agua destilada (Agüero, 2009)
Tratamiento 3	Melaza al 20%	200 g/L Melaza de caña, agua destilada (Agüero, 2009)

A cada tratamiento se agregó 1 Litro de consorcio microbiano (200 ml de consorcio de Mora, 200 ml consorcio guanábana, 200 ml consorcio piña, 200 ml consorcio mango, 200 ml consorcio durazno) y se aforó a 6 litros. Una vez listos los materiales se dispensaron las cantidades necesarias de medio de cultivo. Para cada tratamiento, se utilizó aireadores con doble salida de 2.5 W de potencia, y se aclimató en cámara con una estufa hasta lograr una temperatura en el seno del líquido de 47-50°C. Dicho parámetro fue monitoreado con termómetros de mercurio. Se determinó la curva de crecimiento microbiano a los cuatro días de iniciado el ensayo.

3.3.2.3 Elaboración de criomuestras del consorcio madre

Para la elaboración de crioviales se inoculó 700 microlitros de consorcio madre en 300 microlitros de glicerol al 50%, alcanzándose así una concentración final de 15%. Se

homogenizó en vórtex y almacenó en fundas ziploc previamente rotuladas (Microbiology, 2013)

3.3.3 Pruebas de identificación bacteriana

3.3.3.1 Aislamiento y purificación de microorganismos para identificación.

Para el proceso de aislamiento de microorganismos, se procedió a realizar siembras de los consorcios obtenidos por cada fase por fruta. Para ello, se preparó Tripteína Soya Agar (TSA) como medio de aislamiento de bacterias, y Papa Dextrosa Agar (PDA) para el aislamiento de los hongos y bacterias (INIAP, 2005). Se esterilizó los medios de cultivo en autoclave a 121°C por 15 minutos y se dispensó 20 ml por caja Petri. Se realizó diluciones seriadas de los consorcios por fruta y se sembró en los respectivos medios por estriado sucesivas veces (3-4 veces) hasta la obtención de cultivos puros.

3.3.3.2 Caracterización morfológica de microorganismos

El primer paso en el estudio de los microorganismos es realizar una correcta identificación de la especie con la que se está trabajando. Esta caracterización se basa en la descripción de la colonia (macroscópica) así como de las estructuras (microscópica) (INIAP, 2005) tamaños, textura, formas, pigmentos; Observación microscópica (tinciones): formas, agrupación, esporas, cápsula, flagelos (López-Hontangas, Castillo, & Salavert, 2006).

Descripción macroscópica de cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas se identificaron en primera instancia mediante tinción Gram siguiendo el protocolo de (Moyes, Reynolds, & Breakwell, 2009)

3.3.3.3 Identificación Molecular bacteriana

Para el aislamiento de bacterias se preparó medio PDA (Papa Dextrosa Agar) se dispensó aproximadamente 20 ml en cajas Petri previamente esterilizadas por 2 horas a 170°C en estufa de aire caliente (Baveja, 2009). De los consorcios bacterianos en medio líquido

reactivados, se tomó 100 uL, se dispensó en la superficie del medio sólido, se selló e incubó por 24 horas a 37°C (Aislamiento primario).

Una vez transcurrido el tiempo, se seleccionó las colonias con diferente morfología y se volvieron a sembrar por estriado en medio PDA (Aislamiento secundario) Este procedimiento se llevó a cabo sucesivas veces hasta que se obtuvo colonias aisladas y uniformes en un cuadrante del área de siembra. En total se obtuvieron 11 aislados bacterianos, los cuales serán identificados por biología molecular para determinar su género y especie. Una vez obtenidos los cultivos bacterianos puros, se trasladaron a las instalaciones del laboratorio Identificación Molecular (IDG) en, donde se procedió a realizar la extracción de ADN mediante técnicas moleculares.

a) Extracción de ADN

Elaboración de cultivo bacteriano líquido

A fin de obtener un pellet de bacterias se procedió con la siembra de cada aislado bacteriano en medios de cultivo líquidos, con caldo nutriente en un medio de uso general para el cultivo de bacterias no exigentes.

Se dispensó aproximadamente 1ml de medio de cultivo en microtubos de 1.5 ml de capacidad (marca Axygen). Con el asa bacteriana se tomó 1-2 colonias, se inoculó en el caldo nutriente, se agitó en vórtex y se incubó a 37°C por 24 horas. Dado que no se obtuvo crecimiento en todos cultivos a las 24 horas, se repitió el procedimiento en otro medio de cultivo con mayor riqueza nutricional denominado Caldo Luria-Bertani Miller.

Una vez transcurridas las horas de incubación, se procedió a centrifugar los tubos por 2 minutos a 10000 rpm para concentrar las bacterias en un pellet. Se extrajo el ADN a partir de las bacterias purificadas siguiendo el Protocolo de Extracción de ADN modificado de (Berrendero, 2008).

b) Electroforesis de ADN genómico

Con el fin de verificar la calidad y cantidad de ADN genómico obtenido en el proceso de extracción, se elaboró un gel de agarosa al 1% con 3 uL de Bromuro de Etidio/100 mL de solvente (TBE 1X) (S/N, 2017). Se armó la cámara (Figura 10) y se procedió a cargar los pocillos del gel con las muestras de ADN genómico. Para ello, se homgeniza con ayuda de una micropipeta 4 uL de ADN + 2 uL de BlueJuice

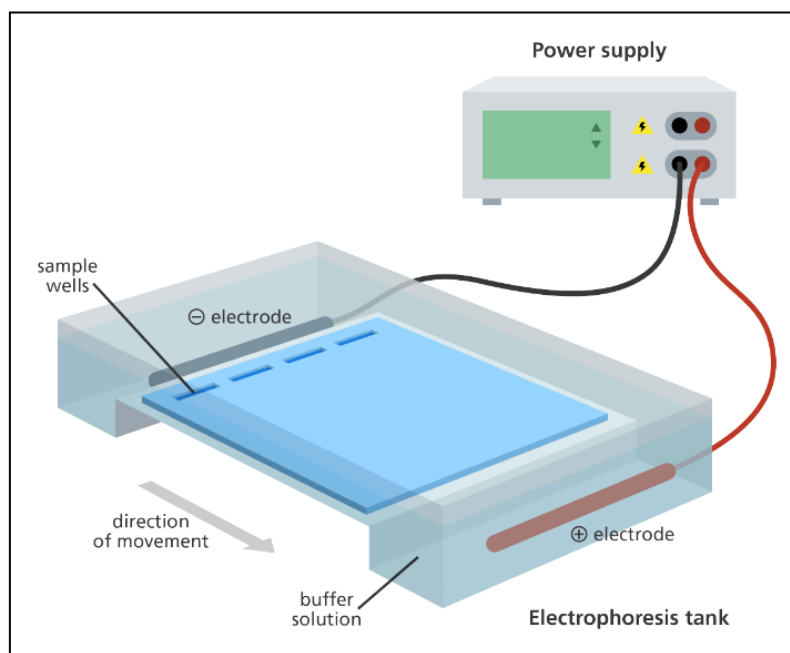


Figura 10 Cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa con sus implementos.

Una vez cargadas las muestras se inició la corrida del gel a 120 Voltios por 30 minutos, se visualizó en el transiluminador y se reportó los resultados como presencia o ausencia de banda. Aquellos que sí reportaron ADN en cantidad y calidad se los separó para la posterior amplificación del fragmento de ADN de interés.

c) Amplificación (PCR) del fragmento 16S rRNA.

Se realizó una amplificar el fragmento gen 16S del ADN genómico extraído fueron obtenidas del procedimiento con los primers secuencias: Primer F (27F) y primer R (1492R) en el cual

se utilizó de 25 µl que contenía Green GoTaq Master Mix 1X con los primers de tal contracción y el ADN 10, 50 ng genómico reacciones y se muestran a continuación. Una vez dispensado el volumen de la master mix en microtubos para PCR, se ingresaron en el termociclador con las condiciones indicadas en la (Tabla 8)

Tabla 8
Condiciones iniciales para el ingreso al termociclador

Ciclos	Temperatura	Tiempo
Inicial	94 °C	4 minutos
Desnaturación	94 °C	30 segundos
33ciclos	54 °C	15 segundos
	72 °C	45 segundos
Extensión Final	72 °C	5 minutos

Las reacciones fueron evaluadas por electroforesis de gel de agarosa junto con el marcador de peso molecular 1Kb, para medir el tamaño del fragmento. Los productos PCR fueron enviados a ser secuenciados mediante el método sange en “Macrogen” Corea “.

Las secuencias recibidas fueron limpiadas y evaluadas según su calidad, se alinearon las secuencias entre el forward y reverse para obtener la secuencias consenso de cada aislado. Estas secuencias fueron alineadas frente a la base de datos NCBI mediante el algoritmo BLAST en los cuales se eligen a los hits con más alta cobertura e identidad o similitud en los que se encuentran la especie.

3.3.3.4 Elaboración de criomuestras de los aislados bacterianos

Con los 11 aislados bacterianos se respaldó con la elaboración de crioviales para lo cual se inoculó 700 microlitros de cada aislado bacteriano en 300 microlitros de glicerol al 50%, alcanzándose así una concentración final de 15%. Se homogenizó en vórtex y almacenó en fundas ziploc previamente rotuladas (Microbiology, 2013)

3.3.4 Elaboración de compost

Para la elaboración del compost se utilizó el desecho o biomasa residual de 5, producto del proceso de industrialización de pulpas y jugos de la empresa alimenticia INALPEV, esta materia prima fue sometida a un proceso de tratamiento físico con una partícula de 30mm, se aplicará enmiendas para regular el pH con bicarbonato de sodio y bicarbonato de potasio, con una relación C: N de 25:1.

3.3.4.1 Elaboración de pila de compostaje

La simulación de pilas se realizó en recipientes (gavetas) de 45Kg de capacidad, con drenaje adaptado, se llevó el experimento a condiciones de temperatura de 30°C en área cuarentenaria de la institución, este proceso de biodigestión aeróbica durará 11 semanas (Jurado, López, & Moreno, 2015)

3.3.4.2 Inoculación bacteriana y enzimática

La inoculación se realizó al día 1, 7 y 14 de acuerdo a las indicaciones del producto comercial y elaborado, detalladas a continuación.

Para el consorcio bacteriano de frutas (CBF) con una concentración de 1.4×10^{10} UFC/ ml

$$\text{Dosis recomendada} = \frac{2 \text{ L CBF}}{1 \text{ m}^3 \text{ de biomasa residual}}$$

En cuanto a la enzima (bromelina), cuya concentración 500 mg/ml, mediante pruebas de degradabilidad de acuerdo a los resultados se estableció la siguiente dosis.

$$\text{Dosis recomendada} = \frac{44 \text{ g enzima}}{40 \text{ kg de biomasa residual}}$$

Finalmente para el consorcio bacteriano comercial (CBC) Compost Cat no especifica la concentración pero si la dosificación.

$$\text{Dosis recomendada} = \frac{500 \text{ ml de CBC en 20 L de agua}}{16 \text{ m}^3 \text{ de biomasa residual}}$$

Tabla 9

Dosificación de la aplicación por tipo de fruta y acelerador de M.O de acuerdo con el peso, densidad y volumen.

Fruta	Volumen de la biomasa residual (Kg/4 L)	Densidad	Peso total por fruta Kg/gav	Dosis de aplicación por tipo de acelerado		
				CBF (ml/gav)	Enz (g/gav)	CBC (ml/gav)
Piña	1.76	0.44	33.52	67.04	36.872	41.9
Durazno	3.93	0.98	31.44	62.88	34.58	39.3
Guanábana	1.65	0.88	18.24	36.48	20.06	22.8
Mango	2.72	0.68	19.06	38.12	20.97	23.8
Mora	2.35	0.84	16.451	32.30	18.09	20.5

gav; gavetas; M.O; Materia orgánica.

3.3.4.3 Cuantificación de microorganismos totales presentes en las pilas de compostaje

Para el recuento microbiano del compostaje, se realizó el muestreo de aproximadamente 100 gramos de composta por cada tratamiento al inicio del ensayo se realizó el muestreo a los cuatro días de la inoculación y posteriormente cada 30 días. En el laboratorio, se homogenizó las muestras, se pesó 10 gramos en frascos, se aforó con 90 ml de caldo peptona al 5% (5 gr peptona, 5 gr dextrosa, 5gr cloruro de sodio). Se incubó en el reactor INNOVA40 a 50°C, 150 rpm por 15 minutos y posteriormente se realizó diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2}) en caldo peptona esterilizado en tubos de ensayo de 10 ml de capacidad. Finalmente se determinó la concentración por espectrofotometría a 560 nm de longitud de onda con el caldo peptona como blanco.

3.3.5 Elaboración del biol

3.3.5.1 Elaboración del biodigestor

Se realizará un prototipo con capacidad de 4 L para todos los tratamientos y botellas con capacidad de 1000 ml que servirá para la medición de gases previamente medidos con la probeta para marcar los valores en ml exactos.

3.3.5.2 Formulación de dosis de ingredientes

Para la formulación de la mezcla se realizará cálculos previos, de acuerdo al volumen del digester con una capacidad de 4 L, el 70% de su capacidad será llenado con la mezcla de los ingredientes y el 30% es el espacio restante para la acumulación de gases, el recipiente se dividirá en un estimado de 1.2 L de espacio y 2.8 L de mezcla, esta digestión se llevará por un tiempo estimado de 40 días (Jurado, López, & Moreno, 2015). La relación de la mezcla con el agua será con una relación de 1:1 por lo tanto los cálculos serán en base a 1.4 L

Tabla 10

Formulación y porcentaje para la elaboración de material base para fermentación de bioles en biorreactores

Componentes	Cálculos 1,4L de en relación 1:1	
Desecho de fruta	60%	836.8 g
Melaza	31%	431.3 g
Leche	3%	43.1 ml
Sales minerales	4%	59.9 g
Fosfato di Calcio	2%	29.0 g
Acelerador	CBF(1.67 ml), Ez (0.920 g) y CBC (1.07 ml)	
Total	100%	1400.0

3.3.5.3 Calculo del rendimiento del biol

Una vez concluido el tiempo de retención de la biodigestión anaerobia, se procedió abrir a los de los biorreactores para separar la parte líquida de la parte sólida mediante filtración se tomó 500 ml del producto de los cuales se midieron en volumen la parte líquida (biol) y la parte solida (biosol) con la que se procedió a realizar análisis bromatológicos.

Higienización del biol

Una vez filtrado el producto líquido se procede a higienizar mediante la aplicación de temperaturas en cada etapa: Primera etapa a 45°C durante 24 horas y la segunda etapa a 60°C durante 24 horas se dejó enfriar para luego refrigerar para realizar las pruebas pertinentes.

3.3.5.4 Cuantificación de microorganismos totales presentes en los biorreactores

Para el conteo de los anaerobios se realizó empleando el Kit de anaerobios MCr y de acuerdo a la descripción del producto se procedió a realizar el medio líquido para las diluciones del biol, mediante la siguiente mezcla de 9 g NaCl y 1 ml Tween 80 en un litro de agua destilada, se agregó 9 ml de este medio en cada tubos de ensayo de 30 ml.

3.3.5.5 Concentración del AIA

Para medir la concentración del AIA se procedió a preparar el reactivo de Salkowski con 0.5M de FeCl₃ (1.35 g en 10ml H₂O), de este reactivo se tomó 2 ml para posteriormente mezclas en 49ml de agua y 49 ml de ácido perclórico. El producto biol se procedió a clarificar con una dilución de 10⁻³ para posteriormente tomar una alícuota de 1ml de dicha dilución y 2 ml del reactivo de Salkowski, se hizo reaccionar durante 1 hora con la ausencia total de luz para evitar la degradación del AIA, finalmente se procedió a leer con la ayuda del espectrofotómetro calibrado previamente a una absorbancia de 530 nm 10mm y encerando con el blanco respectivo.

Una vez obtenida el valor de la absorbancia se procedió a realizar el siguiente cálculo para determinar la concentración de AIA por ml del producto líquido de la biodigestor anaerobia (Biol) mediante la siguiente fórmula.

$$\text{Concentración AIA} = \frac{Y - 0.002}{0.0009}$$

Y: Valor de la absorbancia

3.3.6 Diseño experimental.

3.3.6.1 Factores

Tipo de acelerador de M.O: CBF, Enz y CBC.

Tipo de sustrato: Residuo o biomasa de 5 frutas

3.3.6.2 Tratamientos a comparar

Para el análisis estadístico se realizó en base a modelos lineales generales y mixtos, la comparación de tratamientos se hizo con LSD Fisher

Se comprobó: CBF, Enz y CBC con la biomasa residual de durazno, guanábana, piña, mora y mango.

3.3.6.3 Tipo de diseño.

✓ Estructura de parcelas (EP)

El diseño a emplearse fue un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo bifactorial 3*5 con 3 repeticiones.

✓ Estructura de tratamientos (ET)

Factor 1: Consorcio bacteriano de frutas (C_1), Consorcio bacteriano comercial (C_2) y Enzima (C_3)

Factor 2: Cinco frutas; F_1 (Gb=guanábana), F_2 (Mo=mora), F_3 (Pñ=piña), F_4 (Mg=Mango), F_5 (Dz=durazno)

✓ Número de repeticiones

Las repeticiones son tres

3.3.6.4 Modelo matemático

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + C_j + SC_{ij} + e_{ij}$$

Y_{ijk} = Concentración de elementos bromatológicos

μ = Media general

B_i = Efecto del i-ésimo sustrato

A_j = Efecto del j-ésimo consorcio bacteriano

F_k = Efecto de la interacción S*C

e_{ij} = Error experimental

3.3.6.5 Características de las Unidades Experimentales.

Se utilizó recipientes abiertos con capacidad de 1 m³ aproximado.

Biol a nivel laboratorio

Se utilizó recipientes cerrados herméticamente con capacidad de 4 L con dos adaptaciones para agitación y medidor de gases.

3.3.6.6 Croquis del diseño



Figura 11 Croquis de la disposición experimental de compost y biol en campo

Donde los tratamientos son:

T1= C₁ F₁

T6= C₂ F₁

T11= C₃ F₁

T2= C₁ F₂

T7= C₂ F₂

T12= C₃ F₂

T3= C₁ F₃

T8= C₂ F₃

T13= C₃ F₂

T4= C₁ F₄

T9= C₂ F₄

T14= C₃ F₂

T5= C₁ F₅

T10= C₂ F₅

T15= C₃ F₂

3.3.6.7 Métodos específicos de manejo del experimento

Variables evaluadas

Compost

Durante el proceso de compostaje se midió: pH al inicio del experimento y de forma periódica cada 4 días; porcentaje de humedad de cada uno de los tratamientos; M.O; macro y micronutrientes, relación C/N al inicio y al final del experimento

Biol

En el proceso de biodigestión anaerobia se midió: pH al inicio del experimento y de forma periódica cada 8 días; biol gas cada día durante 10 días y cada 3 días hasta el día 21 (Hosseini, Barrantes, Eskicioglu, & Dut, 2014) y cada 5 días hasta su finalización; macro y micronutrientes, conductividad; rendimiento al final del experimento, fitohormonas al final del experimento.

3.3.7 Análisis estadístico

Se realizó pruebas de medias para los sustratos (cinco tipos de desecho industrial de fruta), consorcio bacteriano (un consorcio extraído del desecho de frutas y dos comerciales) y la evaluación sustrato por consorcio bacteriano.

3.3.7.1 Esquema de análisis de varianza

Tabla 11

Análisis de varianza para determinación del Mejor consorcio bacteriano para acelerar los procesos de biodigestión del compost de los desecho industriales de 5 frutas.

Fuentes de Variación (F.V.)	Grados de libertad (gl)
Total	44
Tratamientos	(14)
Sustrato	4
Consortios bacteriano	2
S * A	8
Error	30

3.3.7.2 Coeficiente de variación

$$C.V = \frac{S}{X} * 100$$

S= Desviación estándar

X = Promedio general

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Composición fisicoquímica de la biomasa residual de cinco frutas

4.1.1 Composición proximal características bromatológicas

En la tabla 12 se detalla la composición Físico-química de la biomasa residual de cinco frutas, en los componentes de las variables evaluadas se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$).

Tabla 12

*Promedio \pm error estándar de los componentes de la biomasa residual de cinco frutas: durazno (*Prunus persica*), guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*), mora (*Rubus ulmifolius*) y piña (*Ananas comosus*)*

Componentes (%)	Biomasa residual de frutas					p-Valor
	Durazno	Guanábana	Mango	Mora	Piña	
Humedad	87.77 \pm 0.22 b	48.20 \pm 0.16 d	77.40 \pm 1.00 c	46.19 \pm 0.42 e	89.09 \pm 0.15 a	<0.0001
M.S	12.23 \pm 0.22 d	51.80 \pm 0.16 b	22.60 \pm 1.00 c	53.81 \pm 0.42 a	10.90 \pm 0.15 e	<0.0001
Ceniza	5.52 \pm 0.32 a	1.79 \pm 0.18 c	3.48 \pm 0.05 b	2.06 \pm 0.06 c	6.00 \pm 0.06 a	<0.0001
M.O	94.48 \pm 0.32 c	98.21 \pm 0.18 a	96.52 \pm 0.05 b	97.94 \pm 0.06 a	94.00 \pm 0.06 c	<0.0001
Proteína	6.68 \pm 0.61 c	14.01 \pm 0.71 a	5.21 \pm 0.66 c	10.36 \pm 0.38 b	6.05 \pm 0.92 c	<0.0001
Grasa	14.95 \pm 20 c	37.95 \pm 2.65 a	17.93 \pm 1.46 bc	21.36 \pm 0.99 b	14.31 \pm 1.03 c	<0.0001
Fibra	18.93 \pm 0.59 b	36.8 \pm 6.12 a	13.2 \pm 0.93 c	50.33 \pm 1.22 a	19.98 \pm 2.04 b	<0.0001
pH	3.66 \pm 0.10 d	5.07 \pm 0.12 b	3.66 \pm 0.04 d	4.68 \pm 0.10 c	6.47 \pm 0.10 a	<0.0001

M.S: Materia seca; **M.O:** Materia orgánica, **p-valor:** Valor de probabilidad; **n=3**

Con relación a la variable humedad, la biomasa residual de la piña registró el valor más alto con un 89.09 \pm 0.15 %. Este valor concuerda con los datos obtenidos por (Tejada, y otros, 2010), quienes encontraron un 84.07% de humedad en el estudio de caracterización de la cascara de piña. La (FAO, 2013) recomienda que al inicio de la composta se tenga un balance adecuado de humedad entre el 50%- 60%, por lo que fue necesario la adición de materia seca en casi todos los tratamientos excepto en la guanábana, cuya biomasa residual presentó el valor más bajo de humedad (48.20 \pm 0.16 %).

En cuanto a la variable materia seca, en la figura 16 se muestran los valores de humedad total, la materia seca es inversamente proporcional al contenido de humedad; la mora presentó el mayor porcentaje de materia seca ($53.81 \pm 0.42\%$) y en la piña se registró el valor más bajo ($10.90 \pm 0.15\%$).

Con relación a la variable ceniza, la piña presentó el máximo valor de $6.00 \pm 0.06\%$ y la mora un valor mínimo de $2.06 \pm 0.06\%$, (López, Wingching, & Rojas, 2014). Reportan el 5.2% de ceniza en la cáscara de piña coincidiendo con obtenido en esta presente investigación. Esta variable es muy importante ya que con ella se determinó la cantidad de minerales que posee la biomasa residual, siendo inversamente proporcional a la cantidad de materia orgánica.

En la presente investigación la variable materia orgánica en se registró en todas las frutas un valor superior al 90%, con un porcentaje máximo de $98.21 \pm 0.18\%$ en la guanábana y un mínimo de $94.00 \pm 0.06\%$ en la piña. La materia orgánica representa, aproximadamente, el 5% en el volumen de un suelo ideal. A pesar de ser un porcentaje relativamente pequeño, su presencia es altamente importante en el crecimiento de las plantas. Con respecto a la variable proteína, en el mango se registró un valor mínimo de $5.21 \pm 0.66\%$ y en la guanábana un valor máximo de $14.01 \pm 0.71\%$, estos valores coincide con lo señalado de acuerdo a (Vit, Santiago, & Pérez, 2014), quienes reportan un 14,77% de proteína en el estudio proximal de la semilla de guanábana. La guanábana contiene también el mayor porcentaje de grasa con un 37.95%, dato importante para el contenido de ácidos grasos insaturados según (Dorado, Hurtado, & Martínez, 2016), quienes presentan un 64% de contenido en aceites provenientes de la semilla de guanábana.

En el estudio realizado por (García, Vilorio, Belén, & Moreno, 2003), para la caracterización de los residuos industriales de mora obtuvieron el 28.40% de fibra cruda

valor inferior a los encontrados en la biomasa residual de la mora en la presente investigación con un valor de $50.33 \pm 1.22\%$ de fibra. La semilla de mora posee fibras insolubles con alto contenido de celulosa y lignina.

El pH de las frutas en general tiende a ser ácido, en la biomasa residual de las cinco frutas en el presente estudio se encontró la mayor acidez en el durazno y mango con valores de 3.66 ± 0.10 y 3.66 ± 0.04 respectivamente y una mínima de acidez en la piña de 6.47 ± 0.10 , resultados que coinciden con (Lin, Zuo, & Gan, 2011), quienes reportaron en un estudio de biodigestión anaerobia con desechos orgánicos municipales un pH de 4.24 en residuos de frutas y vegetales; y un pH de 3.25 en residuos típicos de frutas, dato importante para el proceso de bio-digestión aerobia (compost) y anaerobia (biol).

4.1.2 Composición de macro y micro elementos

La concentración de macronutrientes y micronutrientes de la biomasa residual de cinco frutas se detalla en la tabla 13.

Tabla 13

*Promedio \pm error estándar de concentración de macro elementos de la biomasa residual de cinco frutas: durazno (*Prunus persica*), guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*), mora (*Rubus ulmifolius*) y piña (*Ananas comosus*).*

Componentes (%)	Biomasa residual de frutas					p-Valor
	Durazno	Guanábana	Mango	Mora	Piña	
Macro elementos						
N	1.07 ± 0.01 c	2.24 ± 0.12 a	2.24 ± 0.12 c	1.66 ± 0.06 b	0.97 ± 0.15 c	<0.0001
P	0.15 ± 0.02 b	0.19 ± 0.04 ab	0.10 ± 0.04 b	0.26 ± 0.02 a	0.13 ± 0.05 b	0.0223
K	1.24 ± 0.03 a	1.11 ± 0.04 a	1.17 ± 0.07 a	1.11 ± 0.07 a	1.20 ± 0.06 a	0.2479
Mg	0.26 ± 0.04 b	0.38 ± 0.01 a	0.39 ± 0.02 a	0.38 ± 0.02 a	0.35 ± 0.02 ab	0.0832
Ca	0.24 ± 0.23 a	0.30 ± 0.19 a	0.47 ± 0.08 a	0.43 ± 0.14 a	0.38 ± 0.11 a	0.8302
Micro elementos						
Fe (mg/kg)	32.90 ± 7.29 a	47.54 ± 7.11 a	27.29 ± 13.69 a	37.19 ± 1.22 a	45.31 ± 3.25 a	0.1573
Cu (mg/kg)	-	3.06 ± 1.57	1.76 ± 1.32	0.23 ± 0.23	1.21 ± 1.21	
Zn (mg/kg)	5.08 ± 2.24 c	20.61 ± 6.01 ab	7.78 ± 1.42 bc	28.11 ± 1.96 a	12.10 ± 2.64 bc	<0.0001

p-valor: Valor de probabilidad; **n=3**

Para la variable nitrógeno (N) se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$), el mayor porcentaje se presentó en la guanábana con un valor de 2.24 ± 0.12 %. (Vit, Santiago, & Pérez, 2014), reportaron el 2.36 % de N en la semilla de guanábana coincidiendo con lo obtenido en esta investigación; para la variable P se encontró diferencia estadísticamente significativas ($p = 0.0223$), con un valor máximo de 0.26 ± 0.02 % en la biomasa residual de la mora, similar a lo reportado en (Mora, 2015), quien registró el 0.20% de P en el residuo de la industrialización de jugos y pulpas de mora.

Para las variables K, Mg y Ca no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la biomasa residual de las cinco frutas ($p > 0.05$). En el presente estudio los valores registrados son superiores a los reportados en investigaciones similares (Mora, 2015) y (Gutiérrez, Rojas, Dormond, Poore, & Wing, 2003). Con relación a la concentración de micronutrientes de la biomasa residual de cinco frutas, no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.1573$) para la variable hierro (Fe).

Se registró Cu en la biomasa residual de las cuatro frutas excepto en el durazno $n=3$, para la variable Zn se encontró diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.0001$), con un valor máximo de 28.11 ± 1.96 mg/kg en la mora, superior a los encontrados por (Mora, 2015).

4.1.3 Concentración de C y N en base fresca y seca

En la tabla 14 se registra la concentración diferencial del porcentaje de C y N y su relación en base seca y fresca.

Tabla 14

*Promedio ± error estándar de concentración de micro elementos de la biomasa residual de cinco frutas: durazno (*Prunus persica*), guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*), mora (*Rubus ulmifolius*) y piña (*Ananas comosus*).*

Componentes (%)	Biomasa residual de frutas					p-Valor
	Durazno	Guanabana	Mango	Mora	Piña	
C (MS)	54.81 ± 0.18 c	56.97 ± 0.11 a	55.99 ± 0.03 b	56.81 ± 0.03 a	54.52 ± 0.03 c	<0.0001
C (MF)	6.70 ± 0.14 d	29.51 ± 0.04 b	12.65 ± 0.57 c	30.57 ± 0.24 a	5.95 ± 0.08 e	<0.0001
N (MF)	0.13 ± 0.02 d	1.16 ± 0.06 a	0.19 ± 0.02 c	0.89 ± 0.03 b	0.10 ± 0.02 d	<0.0001
N (MS)	1.07 ± 0.01 c	2.24 ± 0.12 a	0.83 ± 0.10 c	1.66 ± 0.06 b	0.97 ± 0.15 c	<0.0001
C/N (M.S)	52.16 ± 4.91 a	25.54 ± 1.33 c	69.18 ± 7.89 a	34.37 ± 1.25 b	59.68 ± 10.78 a	<0.0001

Piña; **p-valor**: Valor de probabilidad; **n=3**; **MS**: Materia seca; **MF**: Materia fresca

Para la variable C en base seca se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$), con una máxima de 56.97 ± 0.11 % en la guanábana y una mínima de 54.52 ± 0.03 % en la piña, este valor es similar al descrito por el SSL (1996), donde señala que la materia orgánica tiene 58% de carbono orgánico. El promedio de la relación C/N de la biomasa residual de las cinco frutas en base seca, se encontró diferencias estadísticas significativas entre la biomasa residual ($p < 0.0001$), el mayor porcentaje se encontró en mango con 69.18 ± 7.89 % y el mínimo en guanábana con 25.54 ± 1.33 %.

En las figuras 12 y 13 se observan las diferencias de carbono y nitrógeno en base seca y en base fresca de la biomasa residual de cinco frutas, se evidencia que la relación es inversamente proporcional a la cantidad de humedad, es decir a mayor humedad menor concentración de C y N. La guanábana y la mora presentaron los valores mayores tanto para el carbono y nitrógeno, siendo la biomasa residual de estas dos frutas la más adecuada para la biodigestión aerobia (compost) no así la piña que es deficiente para este proceso.

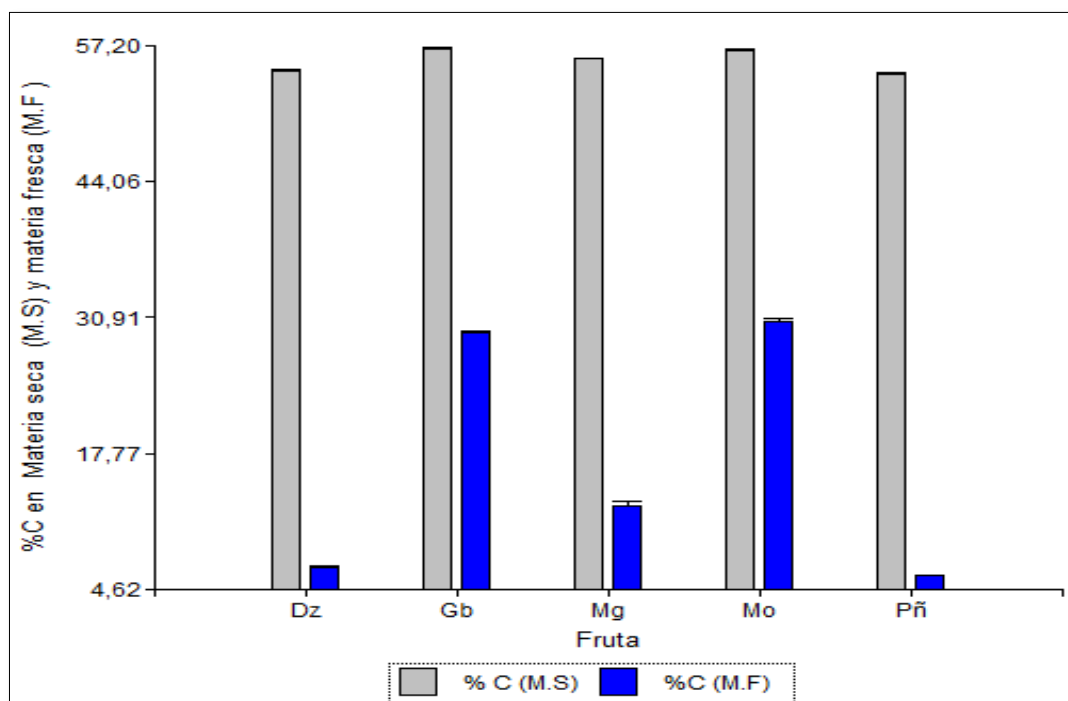


Figura 12 Promedio \pm error estándar de carbono en materia seca (M.S) y materia fresca (M.F) de la biomasa residual de cinco frutas.

Dz: Durazno; **Gb:** Guanábana; **Mg:** Mango; **Pñ:** Piña; **Mo:** Mora

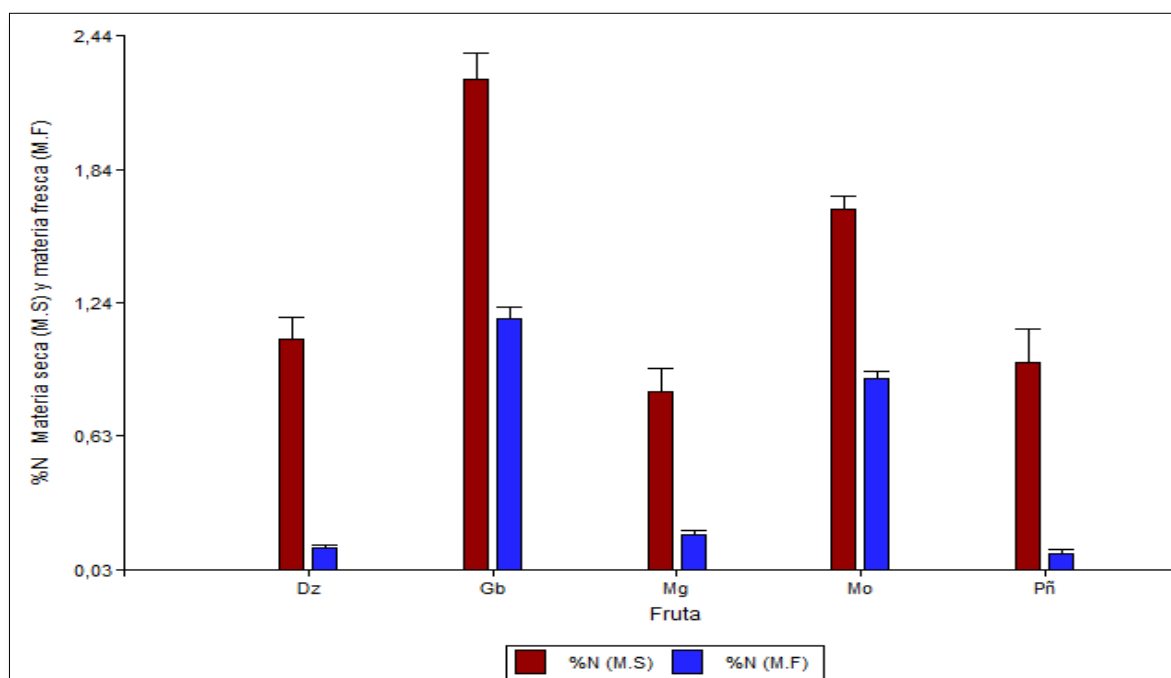


Figura 13 Promedio \pm error estándar de nitrógeno en materia seca (M.S) y materia fresca (M.F) de la biomasa residual de cinco frutas.

Dz: Durazno; **Gb:** Guanábana; **Mg:** Mango; **Pñ:** Piña; **Mo:** Mora

En la figura 14 se detalla la relación C:N en la cual se puede observar que solo la guanábana cumple con este parámetro, estos datos coinciden con los obtenidos por (Dorado, Hurtado, & Martínez, 2016), quienes indican que la relación C/N en frutas en general es de 34.8, lo señalado indica que hay que incluir materia seca como fuente de C para lograr la estabilidad y obtener un buen proceso en el compostaje.

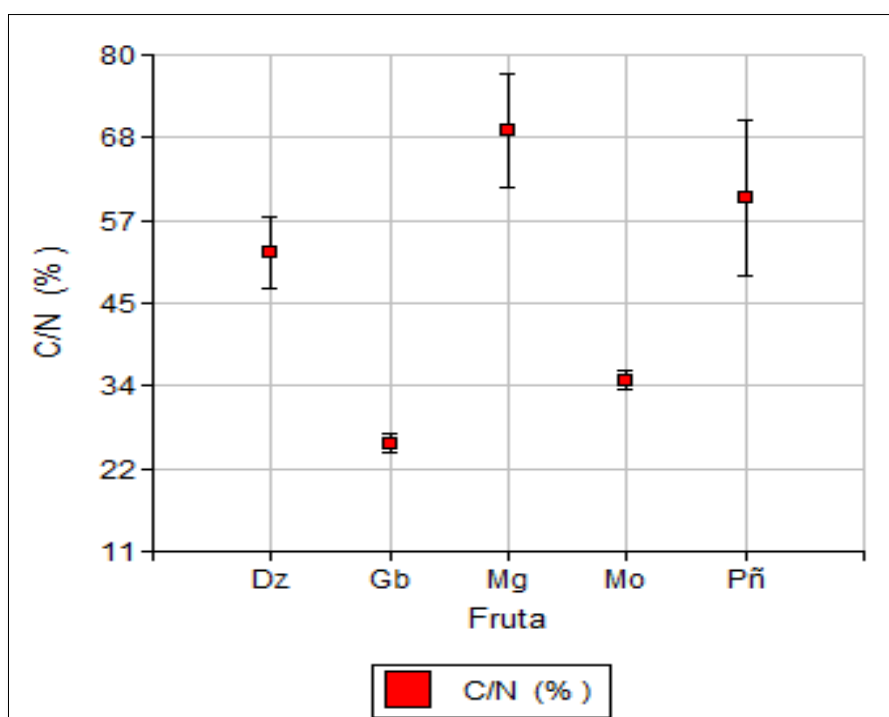


Figura 14 Promedio \pm error estándar de C/N de la biomasa residual de cinco frutas

Dz: Durazno; **Gb:** Guanábana; **Mg:** Mango; **Pñ:** Piña; **Mo:** Mora

4.2 Sub-productos de la biodigestión anaeróbica

Como sub-productos generados en el proceso de la biodigestión anaerobia se obtuvieron: biogás, biol (líquido) y biosol (sedimento), estos tres sub-productos son de suma importancia desde el punto de vista energético y nutricional. Al realizar los análisis bromatológicos y recuento bacteriano se obtuvieron los siguientes resultados:

4.2.1 Producción acumulada de biogás

En la tabla 15 se detalla la producción acumulada de biogás obtenido durante todo el proceso de la bio-digestión anaerobia. Existe interacción para la variable producción de biogás, entre los factores tipo de biomasa residual y tipo de acelerador de descomposición de M.O ($p < 0.0001$)

Tabla 15
Promedio \pm error estándar de la producción a cumulada de biogás por tratamiento

Tratamiento		(Biogas ml/gSV)
Acelerador	Fruta	
CBF	Guanábana	196.58 \pm 28.27 def
CBF	Durazno	366.75 \pm 15.05 a
CBF	Piña	193.83 \pm 33.40 ef
CBF	Mora	242.92 \pm 45.40 cdef
CBF	Mango	230.92 \pm 31.60 cdef
Enz	Guanábana	262.42 \pm 31.57 bcde
Enz	Durazno	305.83 \pm 5.16 abc
Enz	Piña	208.92 \pm 29.52 def
Enz	Mora	207.42 \pm 33.71 def
Enz	Mango	174.42 \pm 37.17 f
CBC	Guanábana	164.00 \pm 29.02 f
CBC	Durazno	246.08 \pm 31.84 cde
CBC	Piña	309.25 \pm 7.70 ab
CBC	Mora	304.92 \pm 9.91 abc
CBC	Mango	269.25 \pm 12.45 abcd
P-valor		<0.0001

p-valor: Valor de probabilidad; **CBF:** Consorcio bacteriano de frutas; **CBC:** Consorcio bacteriano comercial; **Enz:** Enzima; **n=3;** **gSV:** Gramos de solidos volátiles; **Dz:** Durazno; **Gb:** Guanábana; **Mg:** Mango; **Pñ:** Piña; **Mo:** Mora

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.0001$), el mejor tratamiento para la mayor producción de biogás fue con el consorcio bacteriano de frutas y la biomasa residual de durazno (CBF-Dz), con un valor de 366.75 ± 15.05 ml/gSV. Este valor es similar al obtenido por (López A. , 2017), quien obtuvo $319.17 \pm$

33.63 ml/gSV, mediante la aplicación de un consorcio bacteriano con la microalga *Chlorella sp.* y residuos orgánicos.

En la figura 15 se observa que la mayor producción de biogás se obtuvo durante los primeros 20 días en todos los tratamientos y su estabilización hasta los 42 días posteriores.

En China (Lin, Zuo , & Gan, 2011), obtuvo resultados similares al trabajar con residuos vegetales y de frutas mediante la biodigestión anaerobia, se logró un tipo de gas metano estable cuyo contenido esta entre el 50% - 65% aproximadamente.

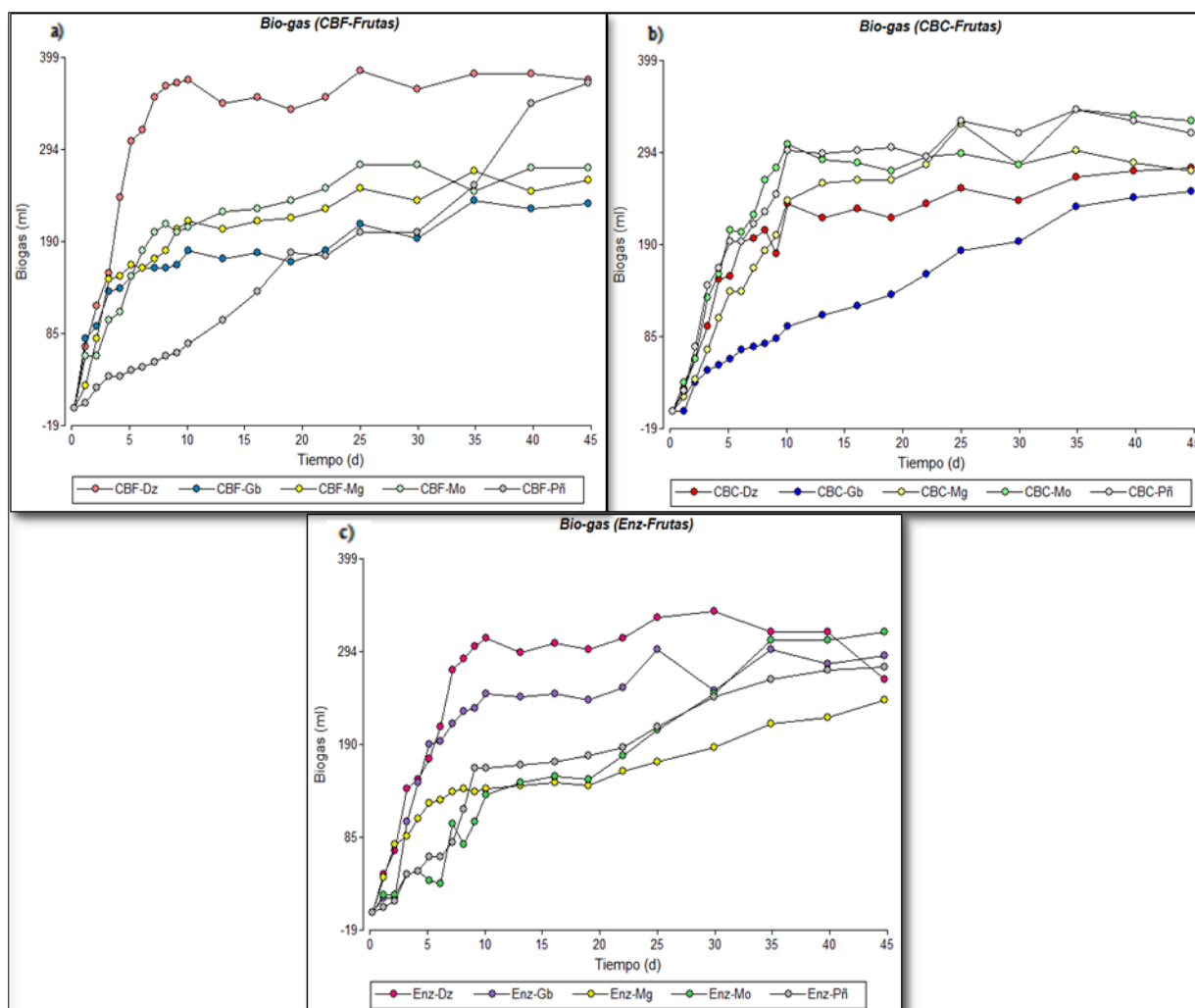


Figura 15 Figura D Promedio \pm error estándar de la producción de biogás
a) Consorcio bacteriano frutas vs tipo de frutas, **b)** Consorcio bacteriano comercial vs tipo de frutas y **c)** Enzima bromelina vs tipo de frutas. **Dz:** Durazno; **Gb:** Guanábana; **Mg:** Mango; **Pñ:** Piña; p-valor: Valor de probabilidad; n=3; **CBF:** Consorcio bacteriano de frutas; **CBC:** Consorcio bacteriano comercial; **Enz:** Enzima

4.2.2 Rendimiento líquido de la biodigestión anaerobia (biol)

En la tabla 16 y figura 16 se detalla el rendimiento líquido (biol) producto de la biodigestión, para esta variable se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p=0.0009$), el máximo rendimiento se obtuvo con el tratamiento CBF-Pñ con un valor de $89.67 \pm 2.34\%$, seguido del tratamiento enzimático y la biomasa residual de piña (Enz -Pñ). Este resultado se debió a la hidrólisis efectiva de los consorcios bacterianos propios de las frutas, al igual que la acción proteolítica de la enzima bromelina, según (Jiménez, 2009).

. El menor rendimiento se obtuvo con el tratamiento CBF-Gb con $40.67 \pm 2.34\%$.

Tabla 16

Promedio \pm error estándar de rendimiento del producto líquido de la biodigestión anaerobia (Biol)

Tratamiento		Rendimiento líquido (%)
Acelerador	Fruta	
CBF	Guanábana	40.67 ± 2.34 f
CBF	Durazno	82.67 ± 2.34 bc
CBF	Piña	89.67 ± 2.34 a
CBF	Mora	66.67 ± 2.34 d
CBF	Mango	86.00 ± 2.34 ab
Enz	Guanábana	49.00 ± 1.96 e
Enz	Durazno	78.67 ± 1.96 c
Enz	Piña	89.33 ± 1.96 a
Enz	Mora	68.67 ± 1.96 d
Enz	Mango	83.67 ± 1.96 abc
CBC	Guanábana	47.33 ± 2.78 ef
CBC	Durazno	70.67 ± 2.78 d
CBC	Piña	84.67 ± 2.78 abc
CBC	Mora	53.33 ± 2.78 e
CBC	Mango	65.33 ± 2.78 d
P-valor		0.0009

p-valor: Valor de probabilidad; **CBF:** Consorcio bacteriano de frutas; **CBC:** Consorcio bacteriano comercial; **Enz:** Enzima; **n=3**

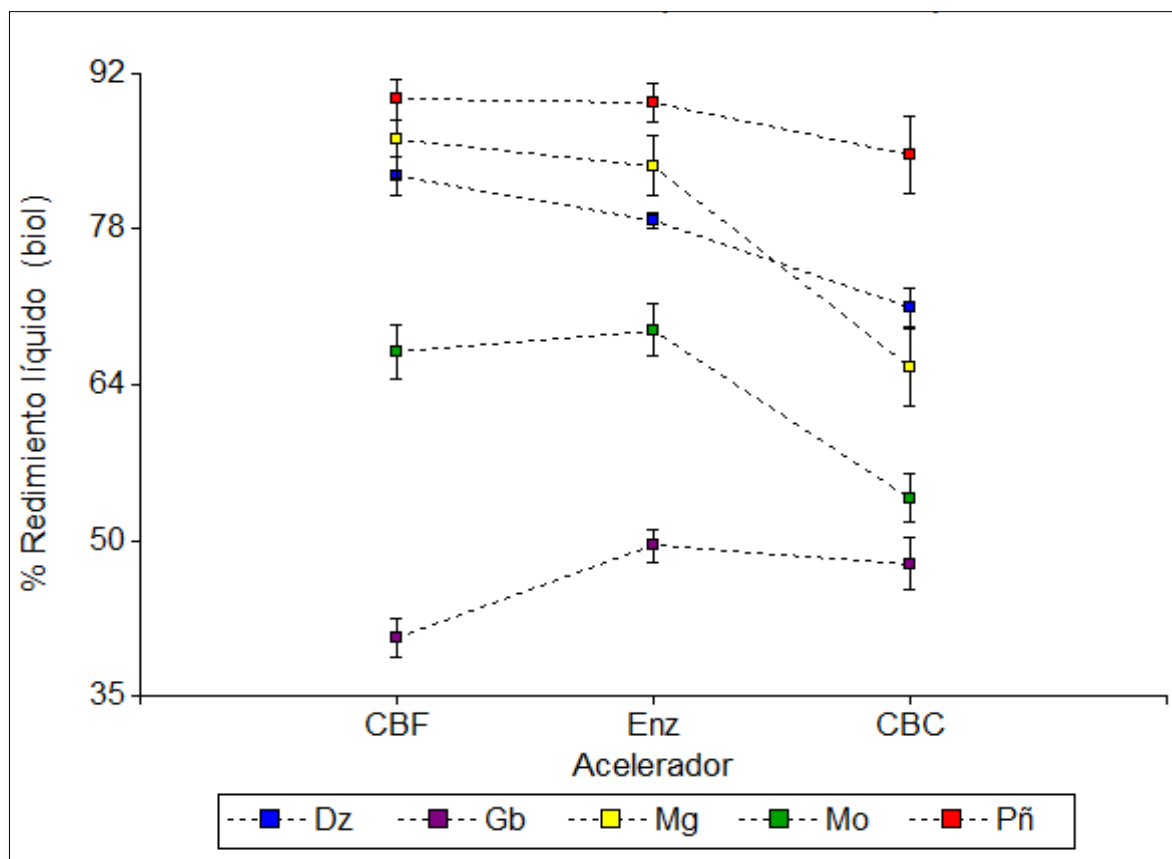


Figura 16 Promedio \pm error estándar del rendimiento líquido (Biol) de la interacción Acelerador de M.O y fruta.

Dz: Durazno; **Gb:** Guanábana; **Mg:** Mango; **Pñ:** Piña; **p-valor:** Valor de probabilidad; **n=3;** **CBF:** Consorcio bacteriano de frutas; **CBC:** Consorcio bacteriano comercial; **Enz:** Enzima.

4.2.3 Contenido de Ácido Indol Acético (AIA)

En la tabla 17 se detalla la concentración del AIA (Ácido Indol Acético) de todos los tratamientos, para esta variable no existió interacción entre los factores y no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p=0.0892$), la concentración más alta fue de 41.85 ± 5.21 mg/ml y la más baja fue de 14.82 ± 6.65 mg/ml, siendo superiores a los resultados obtenidos por (Lara, Oviedo, & Alemán, 2011), quienes lograron un valor de 44.276 mg/L (ppm) de AIA con la bacteria *Azotobacter spp.*

Tabla 17

Promedio \pm error estándar de la concentración del AIA del Producto líquido (Biol)

Tratamiento	Fruta	AIA (mg/ml) en dilución 10^{-3}
CBF	Guanábana	27.78 \pm 6.65 ab
CBF	Durazno	14.82 \pm 6.65 b
CBF	Piña	33.33 \pm 6.65 ab
CBF	Mora	35.93 \pm 6.65 ab
CBF	Mango	32.22 \pm 6.65 ab
Ez	Guanábana	41.85 \pm 5.21 a
Ez	Durazno	30.74 \pm 5.21 ab
Ez	Piña	20.74 \pm 5.21 b
Ez	Mora	34.45 \pm 5.21 ab
Ez	Mango	18.89 \pm 5.21 b
CBC	Guanábana	27.04 \pm 9.96 ab
CBC	Durazno	17.04 \pm 9.96 b
CBC	Piña	38.15 \pm 9.96 ab
CBC	Mora	21.48 \pm 9.96 b
CBC	Mango	31.48 \pm 9.96 ab

P-valor 0.0892

p-valor: Valor de probabilidad; **CBF:** Consorcio bacteriano de frutas; **CBC:** Consorcio bacteriano comercial; **Enz:** Enzima; **n=3** ; **AIA:** Ácido Indol Acético

En la figura 17 se observa la presencia de AIA en todos los tratamientos a una dilución 10^{-3}

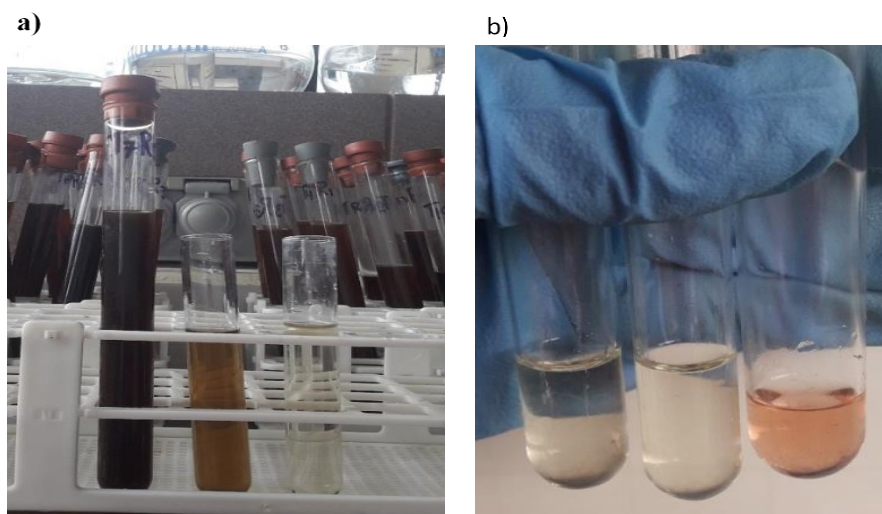


Figura 17 Presencia de AIA en el biol
 a) muestras del biol con una dilución de 10^{-3} , b) presencia de AIA

En las figuras 18 y 19 se determina la concentración de AIA en base a cada factor de los tratamientos con su respectiva media, moda y error estándar mediante el cual no se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) para el factor acelerador y para el factor tipos de biomasa residual.

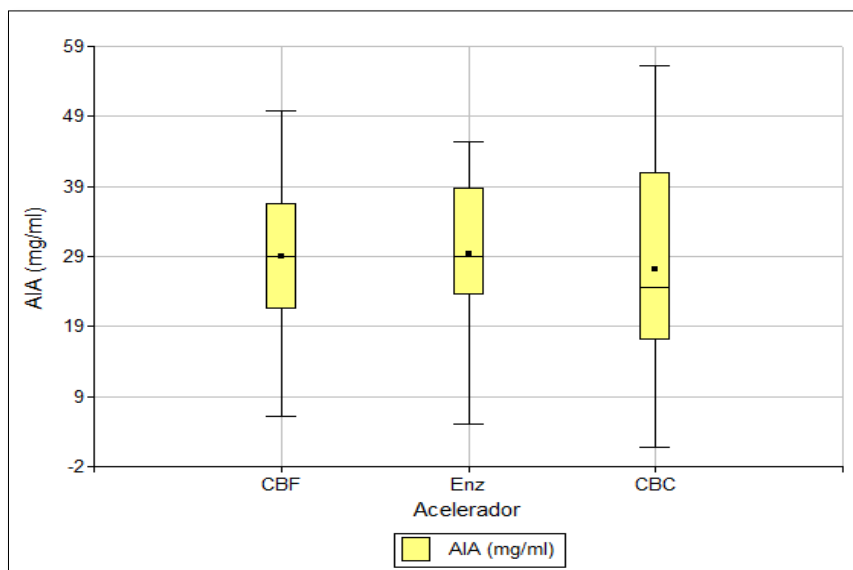


Figura 18 Promedio \pm error estándar de la concentración del AIA del biol en base al factor acelerador.

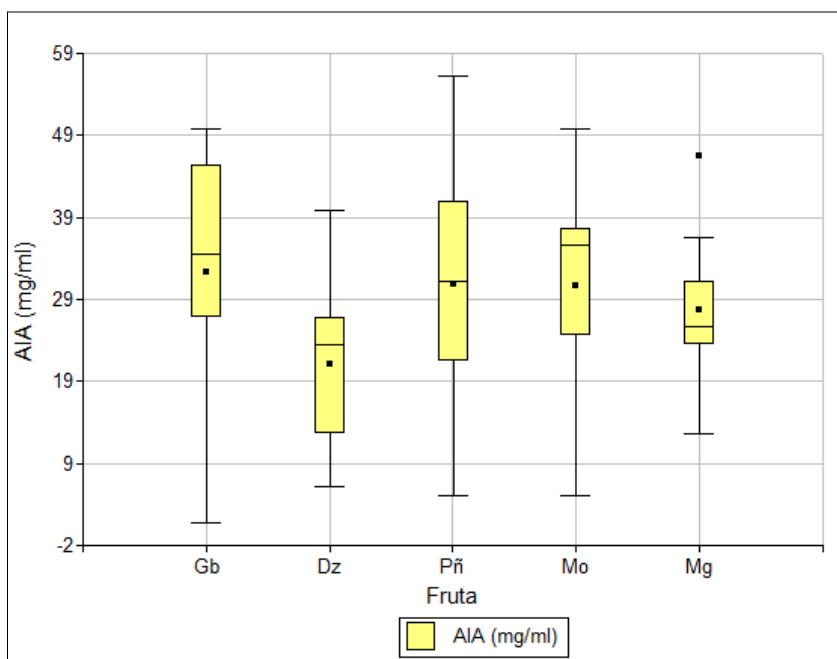


Figura 19 Promedio \pm error estándar de la concentración del AIA del biol en base al factor biomasa residual de 5 frutas

4.2.4 Recuento microbiano anaerobio totales en producción líquida (biol)

En la tabla 18 se registró el recuento microbiano del biol de todos los tratamientos, para analizar los datos se normalizó con $(\sqrt{x+1})$. En todos los tratamientos no encontró interacción entre los factores. Para la variable del recuento microbiano no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p=0.3130$), sin embargo numéricamente la mayor concentración de colonias anaerobias se obtuvo el tratamiento Consorcio bacteriano de frutas y la guanábana (CBF-Gb) con un valor de 165.96 ± 55.50 UFC/ml.

Tabla 18

Promedio \pm error estándar de la concentración UFC del producto líquido (Biol)

Tratamiento		Anaerobios UFC/ml $(\bar{X} - 1)^2$
Acelerador	Fruta	
CBF	Guanábana	165.96 \pm 55.50 a
CBF	Durazno	41.06 \pm 55.50 ab
CBF	Piña	6.44 \pm 55.50 ab
CBF	Mora	9.16 \pm 55.50 ab
CBF	Mango	23.66 \pm 55.50 ab
Ez	Guanábana	97.24 \pm 86.06 a
Ez	Durazno	20.98 \pm 125.06 ab
Ez	Piña	4.85 \pm 125.06 ab
Ez	Mora	4.16 \pm 125.06 ab
Ez	Mango	16.11 \pm 125.06 ab
CBC	Guanábana	10.99 \pm 5.07 ab
CBC	Durazno	26.05 \pm 5.07 ab
CBC	Piña	2.05 \pm 5.07 b
CBC	Mora	5.69 \pm 5.07 ab
CBC	Mango	25.79 \pm 5.07 ab
P-valor		0.3130

Dz: Durazno; **Gb:** Guanábana; **Mg:** Mango; **Pñ:** Piña; **p-valor:** Valor de probabilidad; **CBF:** Consorcio bacteriano de frutas; **CBC:** Consorcio bacteriano comercial; **Enz:** Enzima; **n=3;** **UFC:** Unidades formadoras de colonias; **\bar{X} :** media

En la Figura 20 se observa el crecimiento microbiano de acuerdo a los factores acelerador microbiano y tipo de biomasa residual, los aceleradores que tuvieron mayor crecimiento bacteriano fueron los consorcio bacteriano fruta (CBF) y enzima (bromelina), en conjunto con la biomasa residual de la guanábana debido al balance adecuado de la relación C:N.

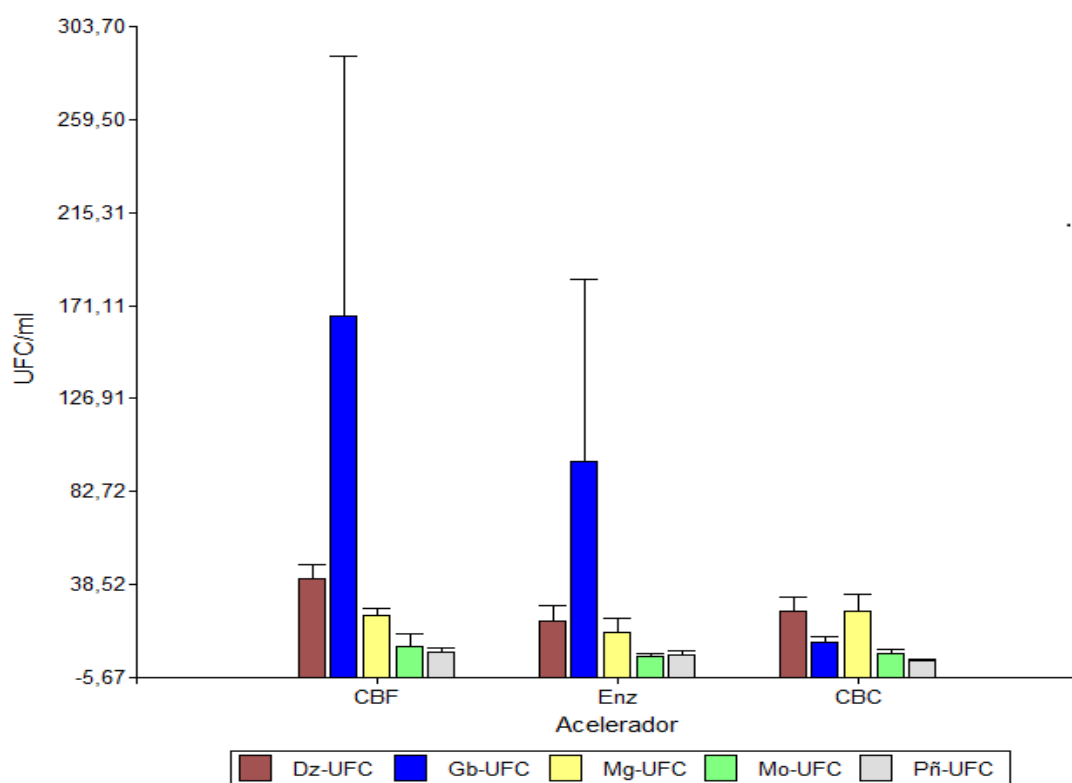


Figura 20 Promedio \pm error estándar concentración microbiana anaerobia del biol
Dz: Durazno; **Gb:** Guanábana; **Mg:** Mango; **Pñ:** Piña; **CBF:** Consorcio Bacteriano de frutas; **CBC:** Consorcio bacteriano comercial; **Enz:** Enzima; **n=3;** **UFC:** Unidades formadoras de colonias.

4.2.5 Características fisicoquímicas de producto sólido (biosol)

A los 42 días de tratamiento de los residuos sólidos se obtuvo el biosol mediante filtración y secamiento a 80°C en estufa. Al realizar los análisis bromatológicos y de acuerdo al análisis estadístico para la presencia de los diferentes componentes en el producto sólido (biosol), se determinó que no existe interacción entre los factores de los tratamientos ($p > 0.05$), pero si se encontró diferencias estadísticamente significativas para cada factor.

a) Componentes del biosol en base al factor tipo de biomasa residual

En la tabla 19 se muestran los resultados del análisis bromatológico, en todas las variables se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En el durazno se registró la mayor humedad (78.92 ± 0.84 %); en la mora se determinó el mayor contenido de materia seca (69.18 ± 1.24 %); el máximo contenido de ceniza (37.67 ± 2.08 %) se obtuvo en mango y en guanábana se registró el máximo porcentaje de M.O (91.00 ± 0.19 %).

En cuanto a macro elementos el mayor porcentaje se obtuvo para:

C, N y K en la guanábana; P, Mg y Ca se encontraron en durazno. Para las variables de los micronutrientes se presentan los más altas concentraciones de Fe y Zn en durazno y Cu en piña.

Tabla 19

Promedio \pm error estándar de los componentes bromatológicos del biosol de la biomasa residual de frutas

Componentes (%)	Biomasa residual de frutas					
	Durazno	Guanábana	Mango	Mora	Piña	p-Valor
Humedad	78.92 ± 0.84 a	35.37 ± 1.08 c	30.82 ± 1.12 d	74.08 ± 0.86 b	72.75 ± 0.86 b	< 0.0001
M.S	21.08 ± 0.77 d	64.63 ± 1.18 b	69.18 ± 1.24 a	25.92 ± 0.79 n c	27.25 ± 0.79 c	< 0.0001
Ceniza	34.35 ± 1.51 a	9.00 ± 0.19 c	10.13 ± 0.21 b	37.67 ± 2.08 a	34.52 ± 1.56 a	< 0.0001
M.O	65.65 ± 1.50 c	91.00 ± 0.19 a	89.87 ± 0.21 b	62.33 ± 2.03 c	65.48 ± 1.57 c	< 0.0001
Macroelementos						
C	38.08 ± 0.87 c	52.79 ± 0.11 a	52.13 ± 0.12 b	36.15 ± 1.17 c	37.98 ± 0.91 c	< 0.0001
N	1.23 ± 0.04 a	1.38 ± 0.04 a	1.33 ± 0.05 ab	1.01 ± 0.04 c	0.64 ± 0.03 d	< 0.0001
P	1.19 ± 0.12 a	1.00 ± 0.08 a	1.14 ± 0.12 a	0.76 ± 0.04 b	0.65 ± 0.03 c	< 0.0001
K	1.84 ± 0.28 ab	2.37 ± 0.24 a	1.71 ± 0.30 ab	1.13 ± 0.36 b	1.33 ± 0.34 b	0.0448
Mg	0.80 ± 0.05 a	0.81 ± 0.05 a	0.72 ± 0.04 a	0.51 ± 0.03 b	0.48 ± 0.03 b	< 0.0001
Ca	1.87 ± 0.19 a	1.57 ± 0.10 a	1.56 ± 0.11 a	1.27 ± 0.07 b	1.18 ± 0.05 b	0.006
Microelementos						
Fe (mg/kg)	337.21 ± 20.48 a	165.73 ± 5.99 c	140.86 ± 4.96 d	293.80 ± 14.49 ab	267.08 ± 11.62 b	< 0.0001
Cu (mg/kg)	8.89 ± 1.93 b		0.66 ± 0.60 c	8.66 ± 1.55 b	25.24 ± 5.51 a	< 0.0001
Zn (mg/kg)	99.15 ± 7.60 a	24.84 ± 1.04 d	37.25 ± 1.45 c	66.07 ± 3.12 b	59.14 ± 2.60 b	< 0.0001

p-valor: Valor de probabilidad; **M.S:** Materia sea; **M.O:** Materia orgánica; **n=3**

La mayor concentración de macro y micronutrientes en el biosol tienen una relación con una deficiente hidrolización, mediante este parámetro permite que los nutrientes se liberen al producto líquido biol. La biomasa residual de mora y guanábana son las más adecuadas para obtener un biosol de buena calidad, mientras que para la obtención del biol las mejores biomásas fueron durazno y piña por su efectiva hidrolización y acción proteolítica con la que se concentran el mayor porcentaje de aminoácidos así como su concentración de macro y micro elementos en el biol.

b) Componentes del biosol en base al factor acelerador de M.O

En la tabla 20 se detalla los componentes de todas las variables del sub-producto biosol. Se presenta diferencias estadísticamente significativas en cuanto al factor acelerador para las variables humedad y Cu con un $\alpha < 0.05$, mientras que las demás variables no presentan diferencias significativas con un $\alpha > 0.05$.

Tabla 20

Promedio \pm error estándar de los componentes del biosol con los aceleradores de M.O

Componente	Acelerador			p-Valor
	CBF	Enz	CBC	
Humedad (%)	56.70 \pm 0.732 b	58.44 \pm 0.99 ab	60.02 \pm 0.40 a	0.0013
M seca (%)	43.30 \pm 0.47 a	41,56 \pm 1.16 ab	39.98 \pm 0.41 b	< 0.0001
Ceniza (%)	24.49 \pm 1.26 a	25.79 \pm 1.06 a	25.11 \pm 0.77 a	0.7285
M.O (%)	75.51 \pm 1.21 a	74.21 \pm 0.97 a	74.89 \pm 0.90 a	0.6988
Macroelementos				
C (%)	43.80 \pm 0.70 a	43.04 \pm 0.56 a	43.44 \pm 0.52 a	0.699
N (%)	1.17 \pm 0.04 a	1.12 \pm 0.02 a	1.06 \pm 0.04 a	0.1435
P (%)	1.05 \pm 0.08 a	0.96 \pm 0.06 ab	0.84 \pm 0.05 b	0.94
K (%)	1.67 \pm 0.249 a	1.86 \pm 0.24 a	1.49 \pm 0.17 a	0.4532
Mg (%)	0.70 \pm 0.03 a	0.67 \pm 0.03 a	0.62 \pm 0.04 a	0.237
Ca (%)	1.64 \pm 0.12 a	1.46 \pm 0.06 a	1.37 \pm 0.07 a	0.237
Microelementos				
Fe (mg/kg)	245.90 \pm 11.83 a	244.58 \pm 11.76 a	232.33 \pm 4.32 a	0.3988
Cu (mg/kg)	4.66 \pm 0.46 b	11.02 \pm 2.90 a	10.39 \pm 2.20 a	0.0097
Zn (mg/kg)	58.35 \pm 3.36 a	58.05 \pm 2.96 a	55.47 \pm 2.80 a	0.7498

CBF: Consorcio bacteriano de frutas; **CBC:** Consorcio bacteriano comercial; **Enz:** Enzima; **p-valor:** Valor de probabilidad; **M.S:** Materia seca; **M.O:** Materia orgánica; **n=3**

Los mayores porcentaje se obtuvieron: Para la variable humedad el mayor porcentaje fue de $(60.02 \pm 0.40\%)$ con el acelerador CBC, para M.S se obtuvo con un porcentaje de $43.30 \pm 0.47\%$ con el acelerador CBF; para las variables ceniza y M.O no existe diferencias estadísticamente significativas ($p=0.7285$) y ($p=0.6988$) respectivamente, cuyos valores máximos numéricamente para la ceniza es de 25.79 ± 1.06 con la enzima (bromelina) y para M.O $75.51 \pm 1.21\%$ con el acelerador CBF.

De acuerdo a los resultados para las variables macro elementos no existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos con $\alpha>0.05$. Se reportando su valor máximo numéricamente en C, N, P, Mg y Ca con el acelerador CBF; Para la variable K se obtuvo con la enzima bromelina.

Con relación al contenido de micro-elemento, para las variables Fe y Zn se obtuvo la mayor concentración con el consorcio bacteriano frutas (CBF) y la mayor para Cu se obtuvo con la enzima bromelina.

4.3 Concentración fisicoquímica del compost (biodigestión aerobia)

Para la presencia de componentes en el compost no se encontró interacción entre los factores de los tratamientos: tipo de acelerador de materia orgánica y tipo de biomasa residual de las frutas con ($p>0.05$), pero si existen diferencias estadísticamente significativas de forma individual.

a) Componentes del compost en base al factor biomasa residual de frutas

En la tabla 21 se detalla los componentes del factor frutas, para estas variables se encontraron diferencias estadísticamente significativas con los valores máximos correspondientes a : Humedad de $69.03 \pm 1.36 \%$, con la biomasa de mango; M.S en la guanábana con $69.17 \pm 1.36 \%$; ceniza con 56.80 ± 1.77 en la piña; M.O en guanábana con

97.02±1.77%, seguido de la mora con 65.75±1.36%, las dos biomasa residuales son de origen de semilla este resultado coincide con el análisis realizado con la materia solida biosol.

En cuanto a macro nutrientes existen diferencias estadísticamente significativas con valores máximos de C en la guanábana; N en durazno y guanábana; P en mora, guanábana y durazno con porcentajes similares; para K y Mg no se encontraron diferencias estadísticamente significativas; para Ca se encontró en el durazno, mora, mango y piña; valores reportados tabla 14. Para los componentes de las variables micro elementos se registra las concentraciones más altas de: Fe y Zn en la guanábana.

Tabla 21

Promedio ± error estándar de los componentes bromatológicos del compost con la biomasa residual de frutas.

Componente	Biomasa residual de frutas					p-Valor
	Durazno	Guanábana	Mango	Mora	Piña	
Humedad (%)	55.99 ± 1.36 c	30.8 ± 1.36 d a	34.25±1.36 d	69.03 ± 1.36 a	61.19 ± 1.36 b	< 0.0001
M.S (%)	44.01 ± 1.36 b	69.17± 1.36 a	65.75±1.36 a	30.97 ± 1.36 d	38.81 ± 1.36 c	< 0.0001
Ceniza (%)	30.10 ± 1.77 b	2.98 ± 1.77 c	4.86 ± 1.77 c	33.90 ± 1.77 b	56.80 ± 1.77 a	< 0.0001
M.O (%)	69.90 ± 1.77 b	97.02±1.77 a	95.14±1.77 a	66.10 ± 1.77 b	43.20 ± 1.77 c	< 0.0001
Macroelementos						
C (%)	40.55 ± 1.03 b	56.27± 1.03 a	55.19 ± 1.03 a	38.34 ± 1.03b	25.06 ± 1.03 c	< 0.0001
N (%)	1.37 ± 0.10 a	1.87 ± 0.10 a	1.75 ± 0.10 a	1.41 ± 0.10 b	1.22 ± 0.10 b	<0.0001
N (g/kg)	18.67 ± 0.97 a	18.58±0.97 a	17.47±0.97 a	14.12 ± 0.97 b	12.19± 0.97 b	<0.0001
P (%)	0.31 ± 0.02 a	0.32 ± 0.02 a	0.34 ± 0.02 a	0.23 ± 0.02 b	0.08 ± 0.02 c	< 0.0001
P (g/kg)	3.09 ± 0.23 a	3.23 ± 0.23 a	3.34 ± 0.23 a	2.32 ± 0.23 b	0.85 ± 0.23 c	< 0.0001
K (%)	1.78 ± 0.16 a	1.56 ± 0.16 a	1.34 ± 0.16 a	1.67 ± 0.16 a	1.44 ± 0.16 a	0.3544
K (g/kg)	17.82 ± 1.63 a	15.59±1.63 a	13.44±1.63 a	16.69 ± 1.63 a	14.41 ± 1.63 a	0.3572
Mg (%)	0.61 ± 0.06 a	0.61 ± 0.06 a	0.67 ± 0.06 a	0.66 ± 0.06 a	0.53 ± 0.06 a	0.5345
Mg (g/kg)	6.12 ± 0.61 a	6.06 ± 0.61 a	6.73 ± 0.61 a	6.60 ± 0.61 a	5.34 ± 0.61 a	0.533
Ca (%)	1.56 ± 0.15 a	0.22 ± 0.15 b	1.22 ± 0.15 a	1.46 ± 0.15 a	1.31 ± 0.15 a	< 0.0001
Ca (g/kg)	15.61 ± 1.48 a	2.18 ± 1.48 b	12.21±1.48 a	14.63 ± 1.48 a	13.17 ± 1.48 a	< 0.0001
Microelementos						
Fe (mg/kg)	242.14±22.43a	140.09±22.43a	65.26±22.43 c	185.82±22.43ab	22.90±22.43 c	< 0.0001
Zn (mg/kg)	9.55 ± 1.28 cd	26.19 ± 1.28 a	21.19 ± 1.28 b	10.57 ± 1.28 c	6.74 ± 1.28 d	< 0.0001

p-valor: Valor de probabilidad; **M.S:** Materia sea; **M.O:** Materia orgánica; **n=3**

b) Componentes del producto compost en base al factor acelerador de materia orgánica

En la tabla 22 se detalla el análisis estadístico del factor acelerador de materia orgánica, en donde no se presentó diferencias estadísticamente significativas para todas las variables en este estudio con un $\alpha > 0.05$. Los resultados obtenidos indican el cual se puede utilizar cualquiera de los tres aceleradores de materia orgánica para el proceso del compostaje con la misma eficiencia.

Tabla 22

Promedio \pm error estándar de los componentes bromatológicos del compost con los aceleradores de M.O

Componente	Acelerador			p-Valor
	CBF	Ez	CBC	
Humedad (%)	51.01 \pm 0.88 a	49.77 \pm 1.33 a	50.01 \pm 0.88 a	0.6437
M seca (%)	48.99 \pm 0.88 a	50.23 \pm 1.33 a	49.99 \pm 0.88 a	0.6437
Ceniza (%)	26.42 \pm 1.95 a	24.76 \pm 0.89 a	26.01 \pm 1.02 a	0.5729
M.O (%)	73.58 \pm 1.95 a	75.24 \pm 0.89 a	73.99 \pm 1.02 a	0.5729
Macroelementos				
C (%)	42.68 \pm 1.13 a	43.64 \pm 0.52 a	42.92 \pm 0.59 a	0.5729
N (%)	1.58 \pm 0.11 ab	1.56 \pm 0.04 b	1.72 \pm 0.06 a	0.0981
N (g/kg)	15.82 \pm 1.10 ab	15.62 \pm 0.38 b	17.16 \pm 0.57 a	0.0951
P (%)	0.26 \pm 0.03 a	0.26 \pm 0.01 a	0.24 \pm 0.01 a	0.4322
P (g/kg)	2.62 \pm 0.27 a	2.64 \pm 0.07 a	2.44 \pm 0.14 a	0.4712
K (%)	1.56 \pm 0.14 a	1.58 \pm 0.12 a	1.54 \pm 0.12 a	0.9705
K (g/kg)	15.63 \pm 1.43 a	15.77 \pm 1.17 a	15.36 \pm 1.17 a	0.9692
Mg (%)	0.62 \pm 0.06	0.61 \pm 0.04 a	0.061 \pm 0.05 a	0.9911
Mg (g/kg)	6.23 \pm 0.55 a	6.15 \pm 0.39 a	6.14 \pm 0.47 a	0.9907
Ca (%)	1.24 \pm 0.13 a	1.17 \pm 0.11 a	1.05 \pm 0.11 a	0.4692
Ca (g/kg)	12.45 \pm 1.28 a	11.76 \pm 1.09 a	10.46 \pm 1.06 a	0.4665
Microelementos				
Fe (mg/kg)	129.96 \pm 20.12 a	150.44 \pm 18.68 a	113.32 \pm 12.32 a	0.2612
Zn (mg/kg)	14.85 \pm 0.59 a	16.47 \pm 1.24 a	13.22 \pm 1.02 a	0.1385

CBF: Consorcio bacteriano de frutas; **CBC:** Consorcio bacteriano comercial; **Enz:** Enzima; **p-valor:** Valor de probabilidad; **M.S:** Materia sea; **M.O:** Materia orgánica; **n=3**

4.3.1 Recuento microbiano en el Compost

En la tabla 23 se detalla el recuento microbiano del compost de todos los tratamientos, para realizar el análisis estadístico los datos se normalizaron con (Ln). En todos los tratamientos no se encontró interacción entre los factores con un $\alpha > 0.05$. Se determinó diferencias estadísticamente significativas para cada factor.

Tabla 23
Promedio \pm error del concentración de UFC en las pilas de compostaje

Acelerador	Recuento microbiano UFC/g (Inv. Ln)
CBF	23.89 \pm 0.09 a
Enz	23.58 \pm 0.09 b
CBC	23.57 \pm 0.09 b
p-valor	0.0293
Fruta	
Guanábana	24.61 \pm 0.12a
Piña	23.82 \pm 0.12 b
Durazno	23.38 \pm 0.12 c
Mango	23.31 \pm 0.12 c
Mora	23.27 \pm 0.12 c
p-valor	< 0.0001
Día	
4	24.71 \pm 0.08 a
30	24.01 \pm 0.05 b
60	22.32 \pm 0.13 c
p-valor	< 0.0001

CBF: Consorcio bacteriano de frutas; **CBC:** Consorcio bacteriano comercial; **Enz:** Enzima; **p-valor:** Valor de probabilidad; **n=3**

El mayor crecimiento microbiano se obtuvo con el consorcio bacteriano de frutas (CBF) con 23.89 \pm 0.09 UFC/g; la biomasa residual que presentó el mayor crecimiento microbiano fue guanábana con 24.61 \pm 0.12 UFC/g y en cuanto al tiempo la mayor

concentración microbiana se obtuvo en el día 4 después de la inoculación para el factor acelerador de descomposición de materia orgánica y para el tipo de biomasa residual de frutas como se observa en la figura 21

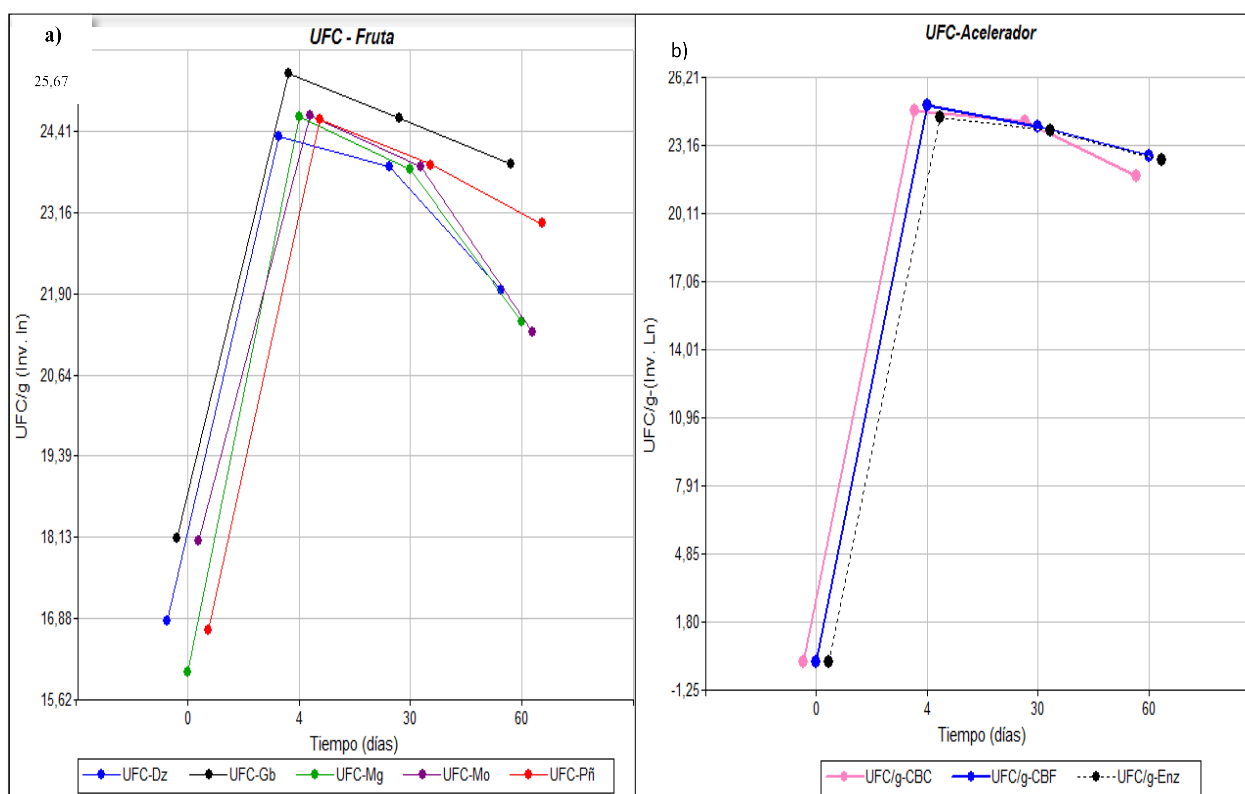


Figura 21 Promedio \pm error de la concentración de UFC/g en las pilas de compostaje por tipo de acelerador y tipo de biomasa residual.

Dz: Durazno; **Gb:** Guanábana; **Mg:** Mango; **Pñ:** Piña; **CBF:** Consortio bacteriano de frutas; **CBC:** Consortio bacteriano comercial; **Enz:** Enzima

4.3.2 Temperatura alcanzada en el proceso de compostaje

Para el análisis de la variable temperatura se encontró diferencias estadísticamente significativas entre la interacción de los factores ($p=0.0097$). El mejor tratamiento para alcanzar temperaturas superiores a los 50°C hasta 60°C fue con el consorcio bacteriano de frutas y la biomasa residual de la guanábana (CBF-Gb), en los días 20 y 30 dato que se aprecia en la figura 22

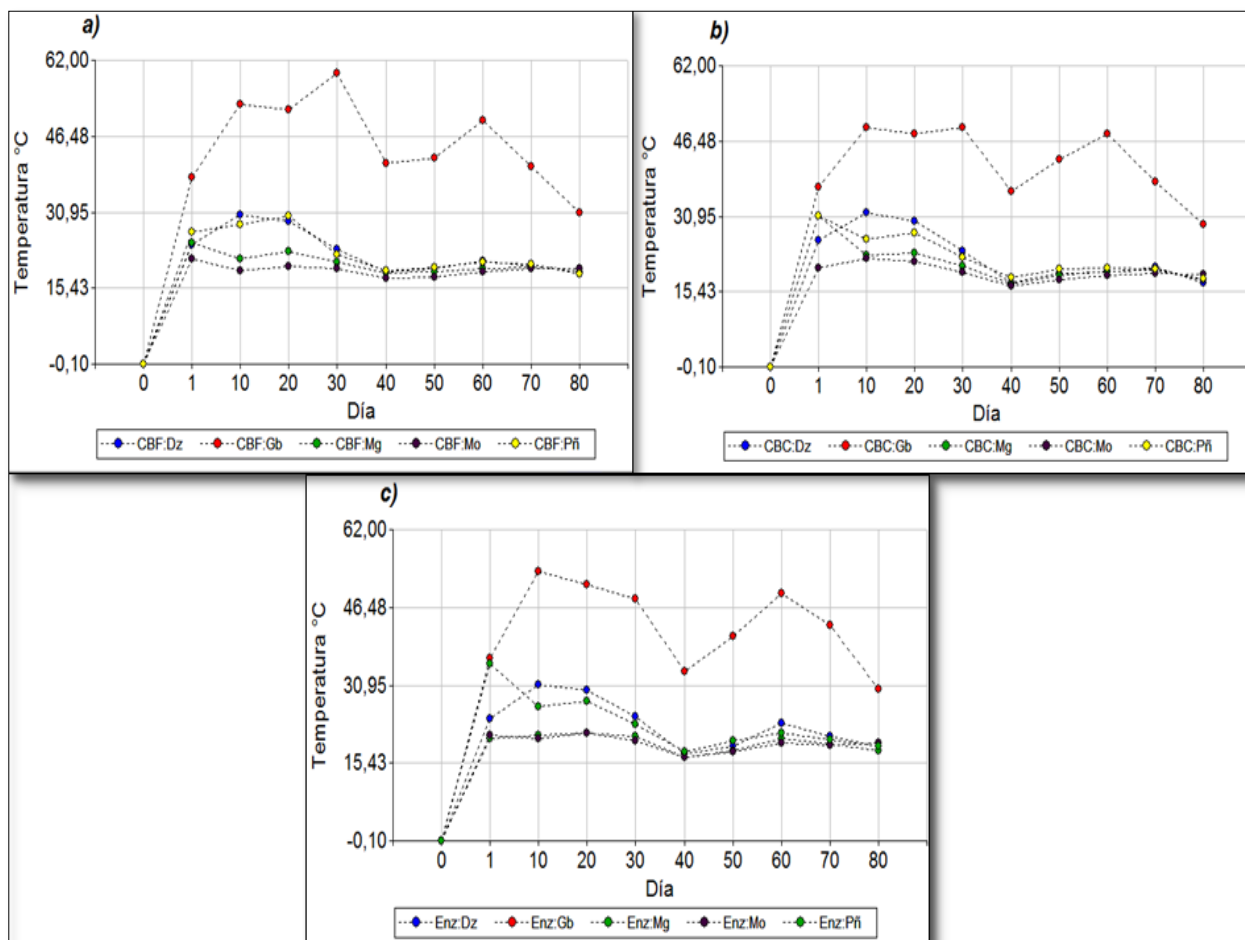


Figura 22 Promedio \pm error estándar de la temperatura de los tratamientos del compostaje. **a)** Consorcio bacteriano frutas y tipo de frutas, **b)** Consorcio bacteriano comercial y tipo de frutas y **c)** Enzima bromelina y tipo de frutas. **Dz:** Durazno; **Gb:** Guanábana; **Mg:** Mango; **Pñ:** Piña; **CBF:** Consorcio bacteriano de frutas; **CBC:** Consorcio bacteriano comercial; **Enz:** Enzima; **n=3**

En la figura anterior se aprecia que los tres aceleradores de descomposición de materia orgánica CBF, Enz y CBC en conjunto con la biomasa residual de guanábana obtuvieron las temperaturas superiores a los 55°C en la fase termófila, esto se debe al balance adecuado en la relación C/N que posee la guanábana. En la literatura se estima la relación C/N de frutas en general con algunas mezclas de residuos vegetales entre el 25-30% al inicio de la composta según (Jurado, López, & Moreno, 2015), sin embargo no hay

reportes de la relación C/N para la biomasa residual de frutas de forma individual específicamente. Identificaron microbiana de la biomasa residual de frutas.

4.3.3 Identificación y tipificación bacteriana

En la figura 23 se observa la electroforesis de fragmentos de ADN de los 11 aislados bacterianos más el marcador de peso molecular.

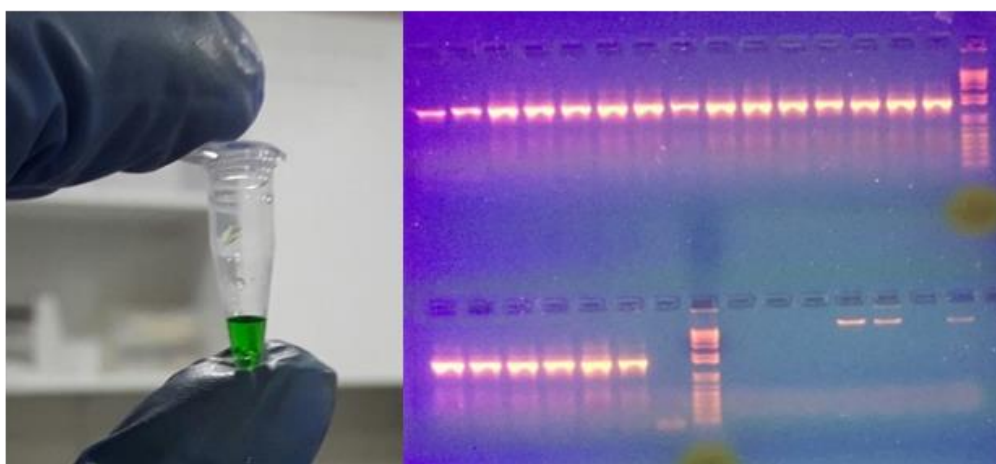


Figura 23 Fragmentos de PCR amplificados y visualizados en gel de agarosa al 1% visto en el transiluminador una vez concluido el tiempo de corrida.

En la tabla 24 se muestra el número de bacterias encontradas en una misma fruta siendo la papaya la fruta en donde se encontró la mayoría de bacterias.

Tabla 24

Bacterias identificadas en base a cada fruta.

Fruta	Moleculares Fragmento del gen 16S rRNA
	<u><i>Pseudomonas gessardii</i></u>
	<u><i>Bacillus licheniformis</i></u>
Papaya	<u><i>Bacillus subtilis</i></u>
	<u><i>Bacillus altitudinis</i></u>
	<u><i>Klebsiella variicola</i></u>
Guanábana	<u><i>Bacillus licheniformis</i></u>
Durazno	<u><i>Bacillus subtilis</i></u>
Maracuyá	<u><i>Bacillus altitudinis</i></u>
Piña	<u><i>Bacillus subtilis</i></u>
Maracuyá	<u><i>Bacillus licheniformis</i></u>
	<u><i>Bacillus subtilis</i></u>
Mora	<u><i>Bacillus licheniformis</i></u>
Mango	<u><i>Bacillus licheniformis</i></u>

En la tabla 25 se muestran las pruebas de identificación en base a criterios de: morfología de la colonia, pruebas bioquímicas y análisis molecular. Según estos criterios se identificaron y tipificaron 11 especies asociadas a las 8 frutas.

Es importante aclarar que las especies identificadas también son de uso potencial para biorremediación de aguas, suelos y algunas especies son biocontroladoras.

Tabla 25*Identificación morfología, bioquímicas y análisis molecular*

Aislado Bacteriano	Fruta	PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN		
		Fenotípico	Bioquímicas positivas para	Moleculares Fragmento del gen 16S rRNA
A0	Papaya	Gram (-), forma de bacilos, fluorescente, colonias brillantes, de tonalidad beige, confluentes, de borde continuo.	Oxidasa, catalasa, Esterasas, Almidón, indol, lisina, oagulasa , desaminasa , L-glutamato, fibrinolisisina negativa	<u><i>Pseudomonas gessardii</i> strain FJAT-hcl-13</u> KY653096.1
A2	Guanábana , Papaya	Gram (+), forma bacilos, colonias brillantes de forma de líquenes en las rocas, de tonalidad beige, confluentes, de borde continuo ondulado.	Arginina, dihidrolas, beta-galactosidasa , D- fructosa , galactosa, almidón, glucógeno, lactosa , D-manosa maltosa, ribosa, sorbitol, sacarosa.	<u><i>Bacillus licheniformis</i> strain DCM</u> KY886239.1
A3	Mora, Durazno, Piña, Papaya	Gram (+), forma bacilos, de forma de barras, de tonalidad beige cuando envejece tonalidad rojiza, confluentes, de borde continuo ligeramente curvo.	Beta-galactosidasa, catalasa, hidrólisis de almidón, citrato, nitrato, caseína, manosa, glicerol, fructosa, maltosa, rafinosa, ribosa, sorbitol, y manito.	<i>Bacillus subtilis</i> strain AT1 GU097200.1
A4	Mora, Piña	Gram (+), forma bacilos, de forma de barras, de tonalidad beige, confluentes, de borde continuo ligeramente curvo.	Catalasa, hidrólisis de almidón, citrato, caseína, glucosa, manosa, glicerol, glucógeno salicina, D-xilosa, fructosa, maltosa, rafinosa, ribosa, sorbitol	<u><i>Bacillus subtilis</i> strain AT1</u> GU097200.1
A5	Maracuyá, Papaya	Gram (+), forma bacilos, colonias circulares lisas, forma de barras, de tonalidad blanca, confluentes delgados, de borde continuo rectos.	Oxidasa, catalasa, lisina, beta-galactosidasa, almidón, gelatina a partir de glucosa, D-manitol, 8 D-xilosa.	<u><i>Bacillus altitudinis</i> strain G61</u> KX344017.1
A7	Piña	Gram (+), forma bacilos, de forma de barras, de tonalidad beige, confluentes anchos, de borde continuo ligeramente curvo.	Beta-galactosidasa, catalasa, hidrólisis de almidón, nitrato a nitrito,, glucosa, manosa, glicerol, glucógeno, celobiosa, maltosa, rafinosa, ribosa, sorbitol, sacarosa	<u><i>Bacillus subtilis</i> strain AT1</u>

→ Continua

A9	Mora, Maracuyá, Guanábana , Mango	Gram (+), forma bacilos, colonias brillantes de forma de líquenes en las rocas, de tonalidad rojiza, no confluentes, de borde continuo ondulado.	Arginina, dihidrolas, beta-galactosidasa, D- fructosa, galactosa, glicerol, almidón, N-acetil-D-glucosamina, glucógeno, lactosa, maltosa, ribosa, sorbitol.	<u>Bacillus licheniformis strain IPU2</u> KY457761.1
A11	Mora	Gram (+), forma bacilos, de forma de barras, de tonalidad beige, confluentes, de borde continuo ligeramente curvo.	Catalasa, hidrólisis de almidón, citrato, caseína, glucosa, manosa, glicerol, D-xilosa, celobiosa, meso-inositol, maltosa, rafinosa, ribosa, sorbitol.	<u>Bacillus subtilis strain AT1</u> GU097200.1
A12	Papaya	Gram (+), forma bacilos, de forma de barras, de tonalidad beige, confluentes, de borde continuo ligeramente curvo.	Catalasa, hidrólisis de almidón, citrato, reducción de nitrato a nitrito, caseína, glucosa, manosa, glicerol, glucógeno, D-xilosa, celobiosa, fructosa, meso-inositol, maltosa, rafinosa, ribosa, sorbitol, sacarosa, manitol.	<u>Bacillus subtilis strain AT1</u> GU097200.1
A13	Mango	Gram (+), forma bacilos, colonias brillantes de forma de líquenes en las rocas, de tonalidad beige, confluentes circulares, de borde circular.	Arginina, dihidrolas, beta-galactosidasa, fenilalanina, tirosina, D- fructosa, galactosa, glicerol, almidón, N-acetil-D-glucosamina, glucógeno, lactosa, maltosa, ribosa, sorbitol, sacarosa.	<u>Bacillus licheniformis strain PAL05</u> KC437094.1
A14	Papaya	Gram (-), bacilos, con forma de bastón colonias brillantes, de tonalidad beige claro, confluentes, de borde continuo, no móvil y cubierta por una cápsula de polisacárido (capa mucosa).	Catalasa, reducción de nitrato, celobiosa, manitol, melibiosa, maltosa, D-manosa, rafinosa. Resultados negativos para: oxidasa, arginina dihidrolasa, hidrólisis de gelatina, lipasa.	<u>Klebsiella variicola</u> KJ806399.1

A: aislado

4.3.4 Estandarización de procesos

En la figura 24 se detalla el flujo de procesos desde la fase inicial de recepción de la biomasa residual de frutas, su proceso hasta la obtención de los productos finales, según el flujo se detalla a continuación.

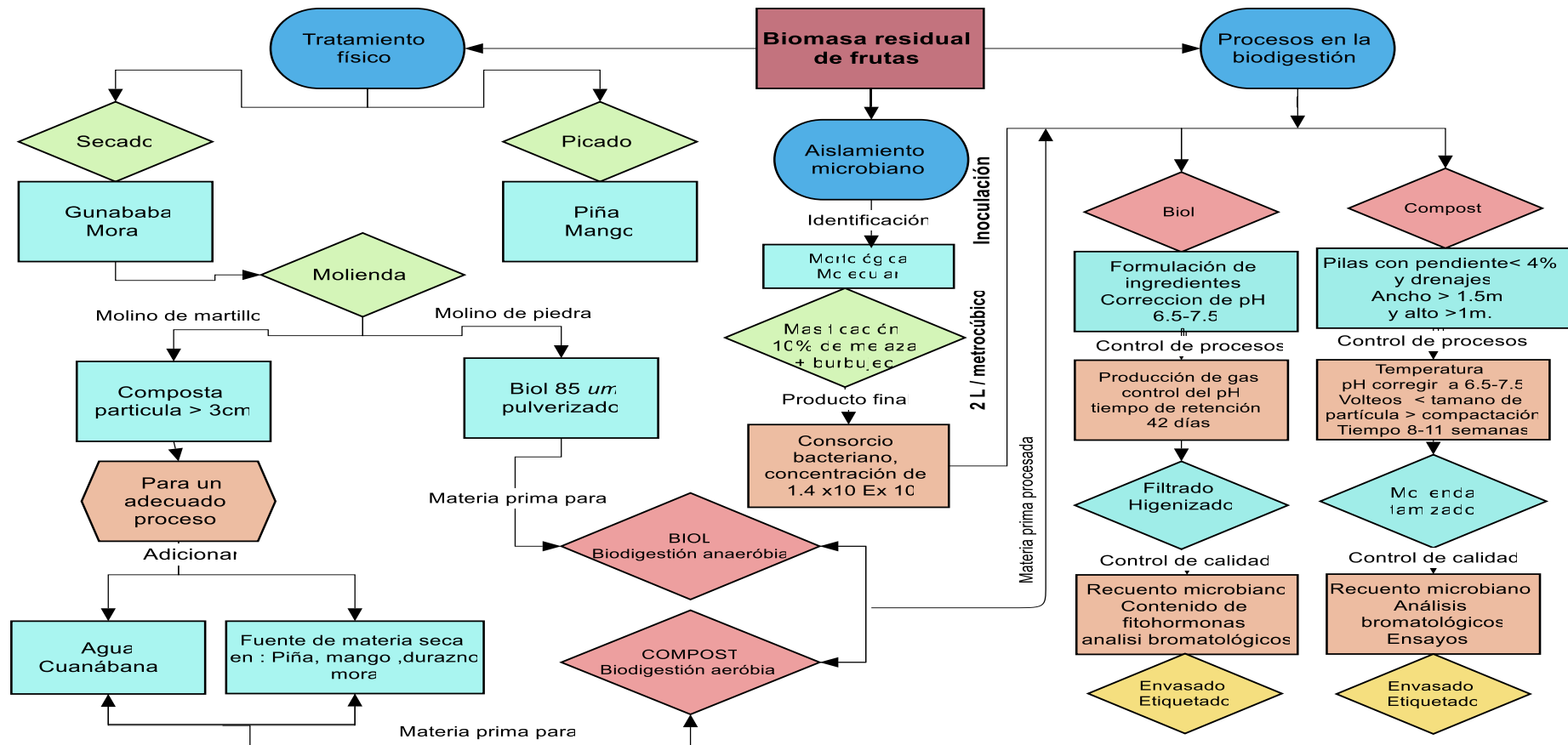


Figura 24 Diagrama de procesos desde la fase inicial hasta la obtención de productos

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El mejor consorcio bacteriano para biodigestión de desechos industriales de frutas y obtención de biofertilizantes fue el consorcio obtenido a partir del desecho de frutas, seguido del consorcio bacteriano comercial y el tratamiento enzimático.

Se caracterizó los desechos industriales de cinco frutas (durazno, guanábana, mora, piña y mango) mediante la técnica de absorción atómica y análisis bromatológico, se registró altas concentraciones de macro y micronutrientes, ceniza, proteína, grasa, materia seca y fibra, sobretodo la guanábana con alto contenido proteína 14.01% y grasa 37,95% parámetros importantes para su comercialización, estos valores superan en concentración a los obtenidos convencionalmente ya que la empresa INALPEV maneja procesos más eficientes en el despulpado.

El consorcio bacteriano de frutas fue el mejor inóculo para acelerar el proceso de biodigestión aerobia y anaerobia en concentración de 1.4×10^{10} UFC y con dosis de aplicación de 2L/m³. En este consorcio se identificó a: *Pseudomona gessardii*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus altitudinis* y *Klebsiella variicola*, tipificadas e identificadas morfológica, bioquímica y molecularmente.

La estandarización del proceso de biodigestión se logró en base a los parámetros: obtención de granulometría adecuada de la biomasa residual, corrección de parámetros físico-químicos de la materia prima, incorporación del inóculo bacteriano, volteo de pilas de compost, control de fases de descomposición, cosecha y control de calidad de los subproductos finales.

Al aplicar las técnicas de absorción atómica y bromatología se determinó que en todos los subproductos de la biodigestión se registró altas concentraciones de: macro y micronutrientes, fitohormonas y biomasa bacteriana, valores que superan a los estándares de calidad internacional, debido a la abundante concentración y calidad de nutrientes contenidos en las frutas y a la eficiencia enzimática bacteriana.

5.2 Recomendaciones

Por el contenido de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y hormonas en el desecho de frutas se recomienda que la empresa INALPEV utilice esta materia prima en la preparación y formulación de biofertilizantes, biocompost y biol.

Se recomienda realizar ensayos a nivel industrial con el fin de desarrollar la logística adecuada y establecer costos de producción. Debido a la alta eficiencia y especificidad en el proceso de biodigestión, se recomienda utilizar consorcios bacterianos extraídos de la biomasa residual de frutas.

Por los antecedentes asociados al alto potencial de las bacterias identificadas, es importante realizar estudios complementarios sobre control biológico y biorremediación de suelos.

Se recomienda realizar ensayos de campo, para complementar los resultados obtenidos en esta investigación, para determinar la eficiencia de los biofertilizantes sobre los parámetros productivos de plantas de interés comercial.

5.3 Bibliografía

- Aguero, A. (2009). Producción de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter* , *Bacillus* y *Pseudomonas*); en medio líquido a base de melaza , para su aplicación en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum spp*) en azucarera El Viejo. *Guanacaste, Costa Rica*.
- Amaro, H., Guedes, A., & Malcata, F. (2011). *Advances and prospectives un using microalgae to produce biodiesel*. *Applied Energy*, 88(10): 3402-3410.
- Aparcana, S. (2008). *Estudio sobre el Valor Fertilizante de los Productos del Proceso "Fermentación Anaeróbica" para Producción de Biogás*. Lima, Perú.
- ASPE. (2010). *Primer censo Porcino*. Obtenido de Asociación de porcicultores del Ecuador: <http://www.aspe.org.ec/index.php/informacion/estadisticas/censo>
- Awasthi, M., Pandey, A., Bundela, P., & Khan, J. (2015). *Co-composting of organic fraction of municipal solid waste mixed with different bulking waste: Characterization of physicochemical parameters and microbial enzymatic dynamic*. *Bioresource Technology*, 182, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.104>.
- Banco Mundial. (2012). *Informe sobre el desarrollo mundial igualdad de genero*. Washington, DC.: <http://siteresources.worldbank.org/INTWDR2012/Resources/7778105-1299699968583/7786210-1315936231894/Overview-Spanish.pdf>.
- Baveja, C. (2009). *Textbook of Microbiology. Sterilizing Glassware and Instruments. Nueva Delhi. Editorial Arya. Quinta edición. Disponible en: <<https://msu.edu/course/css/451/LabSkills/Sterilizing%20Glassware%20and%20Instruments.pdf>>*.
- Bayer. (2016). *Pond Plus*. Obtenido de Bayer: <http://www.sanidadanimal.bayer.com.mx/es/abc-productos/acuacultura/pond-plus/index.php>
- Becker, E. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. En A. Richmond, *Handbook of microalgal culture* (págs. 312-351).
- Bernal, M., Albuquerque, J. A., & Moral, R. (2009). *Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment*. *Bioresource Technology*, 100(22), 5444–5453. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.027>.

- Berrendero. (2008). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 447-470.
- BIOTED. (s.f.). *PCR gen 16S ARNr bacteriano*. Retrieved from <http://bioted.es/protocolos/PCR-GEN-16S-ARNr-BACTERIANO.pdf>.
- Botero, R., & Preston, T. (1987). *Biodigestor de bajo costo para la producción de combustible y fertilizante a partir de excretas*.
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., & Valdezate, S. (2011). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). *Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products*. *Renew. Sust. Energ*, 14(2): 557-577.
- Buschmann, A. (2001). *Impacto Ambiental de la acuicultura, el estado de la investigación en Chile y el mundo*. Osorno, Osorno, Chile.
- Cendales, E. (2011). *Producción de biogás mediante la codigestión anaeróbica de la mezcla de residuos cítricos y estiércol bovino para su utilización como fuente de energía renovable*. Bogotá, Colombia.
- Checa , M. (2015). *Obtención de biol a partir de desechos orgánicos generados por la Empresa Pública Municipal Mercado de Productores Agrícolas “San Pedro de Riobamba*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4871>: [Recuperado el 09/06/2017].
- Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus sp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales*. Bogotá, Colombia.
- De la Torre Chauvin, E. (2009). *Índices de calidad de agua. Contaminación Hídrica y su control* (págs. 1-22). Quito.
- Demirbas, A. (2011). *Waste management, waste resource facilities and waste conversion processes. Energy Conversion and Management*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890410004279>.

- Demirel, B., & Scherer, P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: A review. *Revista Environ*, 7: 173-190.
- Departamento de Energía de los Estados Unidos. (2011). World crude oil prices. Whashington, Estados Unidos.
- Dorado, D., Hurtado, A., & Martínez, H. (2016). Extracción con CO₂ Supercrítico de Aceite de Semillas de Guanábana (*Annona muricata*). *Cinética, Perfil de Ácidos Grasos y Esteroles. Información Tecnológica*, 27(5), 37–48. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642>.
- Dorado, D., Hurtado, A., & Martínez, H. (2016). Extracción con CO₂ Supercrítico de Aceite de Semillas de Guanábana (*Annona muricata*). *Cinética, Perfil de Ácidos Grasos y Esteroles. Información Tecnológica*, 27(5), 37–48. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642>.
- Estación I, & Meteorológica IASA. (2016). *Datos meteriologicos IASA I*.
- FAO. (1997). *Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los recursos Hídricos*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: <http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s00.htm#Contents>
- FAO. (2002). *Agricultura mundial hacia los años 2015/2030*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: <http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s00.htm#TopPfPage>
- FAO. (2011). Manual de biogás. Santiago de Chile, Chile.
- FAO. (2013). *Manual de compostaje del agricultor*. Experiencias en América Latina. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i3388s.pdf>.
- Fermoso, F., Beltran, C., Jimenez, A., Fernández, M. J., Rincón, B., Borja, R., y otros. (2016). Screening of biomethane production potential from dominant microalgae. *Journal of Environmental Science anda Health, Part A*, 1-6.
- Fernández, L., Montoya, J., Oropeza, A., & Badillo, A. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai, Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, 101-115.
- Frigon, J., Matteau-Lebrun, F., Hamani, R., McGinn, P., O'Leary, S., & Guiot, S. (2013). Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. *Appl. Energy*, 108: 100-107.

- Fukumoto, J. (1943). "Studies on the production of bacterial amylase. I. Isolation of bacteria secreting potent amylases and their distribution". *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan (in Japanese)*, 19: 487-503.
- Gallardo, A., Montoya, M., & Castellanos, S. (2014). Aislamiento de hongos de diferentes fuentes. . Retrieved from <https://es.slideshare.net/joselinericci/30415779-2752eq7todehongosdediferentesfuentes>.
- García, D., Vilorio, A., Belén, D., & Moreno, M. (2003). Características físicoquímicas y composición de ácidos grasos del aceite crudo extraído de residuos de mora (*Rubus glaucus* Benth). *Grasas Y Aceites*, 54, 259–263. <https://doi.org/10.3989/gya.2003.v5>.
- Garza, M., Almaguer, V., Rivera, J., & Loredó, J. (2010). Bioingeniería aplicada a una columna empacada con *Chlorella* sp. Inmovilizada para la remoción de metales pesados. *Ciencia UNAL*, 13(2): 174-177.
- Gutiérrez, C. (2013). Determinación y control de olores en la gestión de residuos orgánicos. *Universidad de Córdoba*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10396/11811>.
- Gutiérrez, F., Rojas, A., Dormond, H., Poore, M., & Wing, R. (2003). CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES Y FERMENTATIVAS DE MEZCLAS ENSILADAS DE DESECHOS DE PIÑA Y AVÍCOLAS 1. *Agronomía Costarricense*, 27(1), 79–89. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/436/>.
- Hernández, I., Alejo, K., Méndez, L. G., Cordova, A., & García, A. (2015). *ESTUDIO CINÉTICO ENZIMÁTICO DE LA HIDROLASA A PARTIR DE CÍTRICOS ENZYMATIC KINETIC STUDY HYDROLASE FROM CITRUS*. .
- Hosseini, E., Barrantes, M., Eskicioglu, C., & Dut. (2014). Mesophilic batch anaerobic co-digestion of fruit-juice industrial waste and municipal waste sludge. *Bioresource Technology*, 152, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.066>.
- Huang, T. (2015). Huang, T. (2015). Estudio de la dependencia de la temperatura en la digestión anaeróbica de desechos de fruta. . *USFQ*. Retrieved from <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/5236%0A>, 82.
- INEC. (2014). *Información Ambiental en hogares*. http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Hogares_2014/Documento_tecnico_Modulo_Ambiental_Hogares_2014.pdf.

- INEN. (1981). *Norma INEN 543. Determinacion de proteina cruda para alimentos de animales*. Obtenido de <http://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0543.1981.pdf>
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Florez, J., Barrios, F., & Zapata, C. (2012). Propagación de la microalga *Chlorella* sp., en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. Cartagena, Colombia.
- INIAP. (2005). *Manual de laboratorio para microorganismos de control biológico. Laboratorio de Protección Vegetal. Estación Experimental Santo Domingo. Ecuador. 87 pp.*
- Jaramillo, G., Henao, L., & Zapata, M. (2008). APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS EN COLOMBIA. *Universidad de Antioquia. Retrieved from <http://tesis.udea.edu.co/bitstream/10495/45/1/AprovechamientoRSOUenColombia.pdf>.*
- Jiménez, I. (2009). Enzimas vegetales proteasas, aplicadas para el ablandamiento de carne (bromelina ficina, y papaína. *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO” MÉXICO Retrieved from <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/>.*
- Jiménez, I. (2009). Enzimas vegetales proteasas, aplicadas para el ablandamiento de carne (bromelina ficina, y papaína). *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO” MÉXICO. Retrieved from <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/>.*
- Jinn-Chyi, W., & His-Hua, W. (2002). Fermentation products and carbon balance of spoilage *Bacillus cereus*. *Journal of food and drug analysis*, 10(1): 5.
- Jurado, M., López, M., & Moreno, J. (2015). Bioresource Technology Enhanced turnover of organic matter fractions by microbial stimulation during lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology <https://doi.org/10.1016/j.biortech>*, 15–24.
- Khan, J. (2011). Biodegradation of Azo Dye by Moderately Halotolerant *Bacillus megaterium* and Study of Enzyme Azoreductase Involved in Degradation. *Advanced Biotech*, 10: 21-27.
- Laich, F. (2012). Microorganismos en el compos y el té de compost. . *Canarias. Retrieved from http://www.agrolanzarote.com/sites/default/files/Agrolanzarote/01Actualidad/documentos/f_laich_-_microorganismos_del_compost_y_del_te_-_lanzarote_2012.pdf.*

- Lara, C., Oviedo, L., & Alemán, A. (2011). Strain Native With Potential in the Acetic Acid Production Indol To Improve the Agriculture. . *Biología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 9(1), 17–23.
- Lin, J., Zuo, J., & Gan, L. (2011). Effects of mixture ratio on anaerobic co-digestion with fruit and vegetable waste and food waste of China. *Journal of Environmental Sciences*, 23(8), 1403–1408. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60572-4](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60572-4).
- López, A. (2017). OBTENCIÓN DE BIOGÁS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE UN CONSORCIO BACTERIANO CON LA MICROALGA *Chlorella* sp. Y RESIDUOS ORGÁNICOS DE LA HACIENDA EL PRADO. . *Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Carrera de Ingeniería Agropecuaria*.
- López, M., Wingching, R., & Rojas, A. (2014). META-ANÁLISIS DE LOS SUBPRODUCTOS DE PIÑA (*Ananas comosus*) PARA LA ALIMENTACIÓN ANIMAL. *ALIMENTACIÓN ANIMAL* 1, 25(2), 383–392. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/437/43731480016.pdf>.
- López-Hontangas, J., Castillo, F., & Salavert, M. (2006). *Técnicas de identificación*. . Retrieved from <http://media.axon.es/pdf/65248.pdf>.
- MAGAP. (2013). Estudio de cadenas pecuarias de Ecuador. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Mariscal, G. (2002). *Efecto del programa de alimentación sobre el contenido de nutrimentos en las excretas porcinas*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: <http://www.fao.org/wairdocs/lead/c6372s08.htm>
- Méndez, G., & Soto, G. (2003). *TALLER DE ABONOS ORGÁNICOS*. Costa Rica. Retrieved from <http://www.cia.ucr.ac.cr/pdf/Memorias/Memoria Taller Abonos Orgánicos.pdf>.
- Miah, M., Tada, C., Yang, Y., & Sawayama, S. (2005). *Aerobic thermophilic bacteria enhance biogas production*. *Waste Management*, 7: 48-54.
- Microbiology, D. (2013). *General standard protocol for preparing glycerol stocks for long term storage at -80 ° C*. Department of Microbiology. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034>.Preparation.
- Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. (2014). *Current options for the valorization of food manufacturing waste*. *Journal of Cleaner Production* <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.051>, 65, 28–41.
- Mora, V. (2015). Evaluación de los desechos de mora . Retrieved from <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/2886/1/38149.pdf>.

- Moyes, Reynolds, R., & Breakwell, J. (2009). *Differential Staining of Bacteria: Gram Stain. Current protocols in microbiology. Appendix 3. Appendix 3C. 10.1002/9780471729259.mca03cs15.*
- Murray, M., Birdsall, T., Pizzorno, J., & Reilly, P. (2002). *Enzimas Proteolíticas ~ Complementos Onco Naturales. Métodos naturales* (p. 297). Retrieved from https://books.google.es/books?id=w2PKw5JFAvgC&pg=PA21&hl=es&source=gbs_.
- Mussnug, J., Klassen, V., SchÜter, A., & Kruse, O. (2010). *Microalgae as substrates dor fermentative biogas production in a combined biorefinery concept.* Journal Biotechnol, 150: 51-56.
- Pachacama, L. (2016). *Evaluación de la remoción de contaminantes de un efluente porcino mediante la utilización de las microalgas Chlorella sp. y Synechocystis salina, a nivel de laboratorio.* Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- Pastrana, Y. (2012). *Aislamiento de la bacteria (B. licheniformis).* Obtenido de Universidad de Córdoba: <http://es.scribd.com/doc/00266773/Aislamiento-de-Bacillus-Licheniformis-Revision-Bibliografica>
- Pinto, W. (31 de Mayo de 2017). *Abre planta para procesamiento de frutas en Tisaleo. Noticias UNIVERSO.*
- Pontón, R. (2010). *Diseño de un sistema para la obtención de biol mediante los residuos sólidos orgánicos generados en el cantón Joya de los Sachas.* Riobamba, Chimborazo, Ecuador.
- Priest, F. (1993). *Systematics and Ecology of Bacillus.* In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, editors. *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics.* Washington D.C., Estados Unidos.
- PROYECTO JICA-CENAIM. (1997). *Manual de Técnicas para Nutrición Acuícola.* Fundación CENAIM-ESPOL.
- Ramos, L. (2014). *Producción de Biogás a partir de biomasa de la microalga Scenedesmus sp. procedende de diferentes procesos.* Madrid, España.
- Rey, L. (2014). *Obtención de biogás a partir de codigestión anaerobia de microalgasy fangos de EDAR.* Barcelona, España.
- Rittmann, B., & McCarty, P. (2001). *BIOTECNOLOGÍA DEL MEDIO AMBIENTE Principios y aplicaciones.* España: Fareso, S.A.

- Rivas, O., Faith, M., & Guillén, R. (2010). *Biodigestores: factores químicos, físicos y biológicos relacionados con su productividad*. Tecnología en Marcha, 39-46.
- Robalino, H. (2011). *Evaluación de la actividad biológica y nutricional del Biol en diferentes formulaciones y la respuesta a su aplicación en cultivo de arroz (Oriza sativa) y maíz (Zea mays)*, en Guayas. Guayaquil, Guayas, Ecuador.
- Rodríguez, J., El Atrach, K., Rumbos, E., & Delepiani, A. (1997). *Resultados experimentales sobre la producción de biogas a traves de la bora y el estiércol de ganado*. Agronomía Trop, 47(4): 441-455.
- Ros, M., Pascual, J., Ayuso, M., & Morales, A. (2012). *Salidas valorizables de los residuos y subproductos orgánicos de la industria de los transformados de frutas y hortaliza*. CEBAS-CSIC, CTC Y <http://www.agrowa>.
- Rosenthal, & Tan. (2011). *Microorganismos y su morfología microscópica*. Retrieved July 16, 2017, from <https://produccionindustrialdealimentos2.jimdo.com/5-2-figura-2-ejemplos-de-microorganismos-y-su-morfología-microscópica/>.
- Ruiz, J. (1966). *Agricultura orgánica: una opción sustentable para el agro mexicano*. Chapingo, México.
- Sadzawka, A., Carrasco, M., Demanet, R., Flores, H., Grez, R., Mora, M., y otros. (2007). *Métodos de análisis de tejidos vegetales*.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., & Roessler, P. (1998). *A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae*.
- Soria, C. (2008). *Enzima*. Retrieved February 25, 2018, from <https://es.slideshare.net/csoria/enzimas-presentation-625435>.
- Stephanopoulos, G., Fischer, C., & Marcguschamer, K. (2008). *Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production*. Metabolic Engineering, 10(6): 295-304.
- Sterritt, & Robbet, M. (1998). *Compost-microorganisms*. Retrieved from <http://clevercomposting.com/nitrogen-carbon-compost/compost-microorganisms/>.
- Suquilanda, V. (2006). *Agricultura Orgánica Alternativas Tecnológicas del Futuro*. Quito-Ecuador: Abya-Yala.
- Tejada, L., Tejada, C., Villabona, Á., Alvear, M., Castillo, C., Zuniga, H., y otros. (2010). *Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña*. Educacioneningenieria.org, 120-125. Retrieved from <http://www.educacioneningenieria.org/index.php/edi/article/view/104>.

- Trinidad, A. (2007). *Aboons orgánicos*. Texcoco, México.
- Tuerson, S., Wongwilaiwalin, S., Verawat, C., Leethochawalit, M., Nopharatana, A., Techkarnjanaruk, S., y otros. (2013). *Enhancement of biogas production from swinw manure by lignocellulolytic microbial consortium*. *Bioresource Technology*, 579-586.
- TULAS. (2015). *Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce*. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Varnero, M., & Arellano, J. (1990). *Aprovechamiento racional de deschos orgánicos*. Chile: Ministerio de Agricultura (FIA).
- Vit, P., Santiago, B., & Pérez, E. (2014). *Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata**. L. INTERCIENCIA , 39, 350–353. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/339/33930879008.pdf>.
- Wiliams, P., & Laurens, L. (2010). *Mircoalgae as biodiesel & biomass feddstocks: Review & analysis of biochemistry, energetics & economics*. *Energy environ*, 3: 554-590.
- Yepes, S., Montoya, L., & Orozco, F. (2008). *Valorización de residuos agroindustriales - frutas- en Medellín y el sur del Valle de Aburrá, Colombia*. *Fac.Nal.Agr.Medellin*, 61(1), 4422–4431, from: <http://www.scielo.org.co/pdf>.
- Ziganshin, A., Liebetau, J., Pröter, J., & Kleins. (2013). *Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(11), 5161–5174.