

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE PESQUERÍA



“ELABORACIÓN DE BIOFERTILIZANTE LÍQUIDO UTILIZANDO
SUBPRODUCTOS DEL PROCESAMIENTO DE TRUCHA (*Oncorhynchus
mykiss*)”

Presentado por:

MARCO ANTONIO FLOREZ JALIXTO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO PESQUERO

LIMA-PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE PESQUERÍA

“ELABORACIÓN DE BIOFERTILIZANTE LÍQUIDO UTILIZANDO
SUBPRODUCTOS DEL PROCESAMIENTO DE TRUCHA (*Oncorhynchus
mykiss*)”

Tesis para optar el título de Ingeniero Pesquero

Presentada por:

MARCO ANTONIO FLOREZ JALIXTO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado

Dra. Fabiola Olivares Ponce
Presidente

Dr. Guillermo Aguirre Yato
Miembro

Ing. Domingo Sánchez Amado
Miembro

Mg.Sc. David Roldán Acero
Asesor

Blgo. Juan Juscamaita Morales
Co-asesor

Lima – Perú 2017

“Cuéntame y lo olvidaré. Enséñame y lo recordaré. Déjame hacerlo y lo entenderé”

CONFUCIO

AGRADECIMIENTOS

Al Mg.Sc. David Roldán, asesor del siguiente trabajo de investigación, por su apoyo en la realización, revisión y presentación del siguiente trabajo, gracias por sus consejos y ayuda brindada.

Al Blgo. Juan Juscamaita, co-asesor, por acogerme en su grupo de tesis molineros en el Laboratorio de Biorremediación, por su amistad y ayudarme a complementar los conocimientos requeridos para la elaboración del siguiente trabajo de investigación.

A mi madre Aurelia Jalixto y mi padre Nicolás Florez por su apoyo económico al inicio y término de mi formación académica y profesional.

Al Ministerio de Educación por el financiamiento (CONVENIO MINEDU-UNALM) para la elaboración de la tesis de pre grado, a la Dra Sandra de la Unidad de Investigación de la Facultad de Pesquería por su apoyo.

A todas las personas que me acompañaron durante la elaboración del siguiente trabajo de investigación: Belinda F., Fiorella C., Ricardo H., Ernesto A., Jorge R., Alfredo G., Ricardo A., Karina P., Marel, Norma N., Samanta R., Fiorella V., Giancarlo A., José, Kei K., Leticia F., Nataly Jem, Macarena M.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

SUMMARY

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1	LA TRUCHA	4
2.1.1	Descripción taxonómica.....	4
2.1.2	Características generales	5
2.2	PROCESAMIENTO DE TRUCHA.....	7
2.3	SUBPRODUCTOS DE LA PESCA	8
2.3.1	Definición.....	8
2.3.2	Subproductos del procesamiento de pescado	8
2.3.3	Composición físico química de los subproductos de trucha	9
2.3.4	Rendimiento de los subproductos de trucha.....	10
2.4	FERTILIZANTES.....	11
2.4.1	Químicos	11
2.4.2	Biofertilizantes	12
2.5	HIDROLIZADO PROTEICO DE PESCADO	13
2.6	BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	16
2.7	FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA.....	17
2.8	NUTRICIÓN DE LA PLANTA	19
2.8.1	Nitrógeno (N).....	19
2.8.2	Fósforo (P).....	20
2.8.3	Potasio (K).....	21

2.8.4	Micronutrientes	23
2.8.5	Asimilación de aminoácidos por las plantas	25
2.9	PRUEBA DE GERMINACIÓN	26
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN	28
3.2	MATERIA PRIMA	28
3.3	MATERIALES Y EQUIPOS.....	28
3.3.1	Insumos	28
3.3.2	Reactivos químicos	29
3.3.3	Materiales.....	29
3.3.4	Equipos.....	29
3.4	PARTE EXPERIMENTAL.....	30
3.4.1	Flujo experimental de proceso	30
3.4.2	Diseño experimental	32
3.4.3	Experimento 1: Determinación de concentración de proteasa	35
3.4.4	Experimento 2: Determinación de temperatura de hidrólisis.....	35
3.4.5	Experimento 3: Determinación de una proporción vísceras:agua.....	36
3.4.6	Experimento 4: Determinación de proporciones de melaza y Bio lac en la fermentación homoláctica.....	36
3.4.7	Experimento 5: Determinación de fitotoxicidad aguda del biofertilizante líquido	37
3.5	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	38
3.5.3	Composición química proximal de las vísceras de trucha	38
3.5.4	Análisis físico químicos	39
3.5.5	Análisis microbiológicos.....	40
3.6	MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	41

IV.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	43
4.1	MATERIA PRIMA	43
4.1.1	Determinación de pH	43
4.1.2	Composición química.....	43
4.2	PARTE EXPERIMENTAL.....	44
4.2.1	Primer experimento: Determinación de concentración de proteasa.....	44
4.2.2	Segundo experimento: Determinación de temperatura de hidrólisis	46
4.2.3	Tercer experimento: Determinación de una proporción de vísceras:agua	48
4.2.4	Cuarto experimento: Determinación de proporciones de melaza y Bio-Lac	50
3.5.6	Quinto experimento: Determinación de fitotoxicidad aguda del biofertilizante líquido	54
4.3	CARACTERIZACIÓN DEL BIOFERTILIZANTE	58
4.3.1	Análisis físico químico.....	58
4.3.2	Composición de aminoácidos del biofertilizante	62
4.3.3	Análisis microbiológico	65
4.3.4	Análisis de metales pesados presentes en el biofertilizante	67
V.	CONCLUSIONES	70
VI.	RECOMENDACIONES	72
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	73
VIII.	ANEXOS.....	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Coloración característica de la trucha	5
Tabla 2: Composición física y rendimiento de la trucha	10
Tabla 3: Diseño estadístico para la fermentación homoláctica	42
Tabla 4: Composición química de las vísceras de trucha.....	44
Tabla 5: Porcentaje de Péptidos solubles en tres concentraciones de proteasa.....	45
Tabla 6: Porcentaje de Péptidos solubles en tres temperaturas de hidrólisis.....	46
Tabla 7: Porcentaje de péptidos solubles en tres proporciones de víscera: agua	48
Tabla 8: Valores de pH en el quinto día de la fermentación homoláctica de vísceras hidrolizadas de trucha.....	54
Tabla 9: Valores de pH y conductividad eléctrica (CE) para diferentes concentraciones de biofertilizante.....	55
Tabla 10: Número de semillas germinadas, elongación de radícula, PGR, CRR e IG	56
Tabla 11: Análisis físico químico del fertilizante de vísceras de trucha	59
Tabla 12: Análisis físico químico de fertilizantes partir de recursos hidrobiológicos	60
Tabla 13: Aminoácidos en el biofertilizante de vísceras de trucha y otros fertilizantes	63
Tabla 14: Análisis microbiológico del biofertilizante	65
Tabla 15: Análisis de metales pesados presentes en el biofertilizante	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Coloración característica de la trucha	4
Figura 2: Países productores de trucha en 2012 (TM).....	6
Figura 3: Venta interna de recursos hidrobiológicos procedentes de la acuicultura	7
Figura 4: Clasificación de proteasas según el enlace que cortan.....	15
Figura 5: Síntomas de deficiencia de N, P y K en plantas de maíz	23
Figura 6: Morfología de una semilla y plántula de lechuga (Lactuca sativa).....	27
Figura 7: Flujograma experimental para la elaboración de un Biofertilizante líquido de víscheras de trucha	31
Figura 8: Esquema experimental de las 3 etapas para la elaboración de un Biofertilizante líquido de víscheras de trucha	33
Figura 9: Incremento de péptidos solubles para tres concentraciones de proteasa	46
Figura 10: Comportamiento del pH e índice de acidez titulable durante la fermentación homoláctica de las víscheras hidrolizadas de trucha.....	51
Figura 11: Comparación del índice de germinación y diluciones del biofertilizante.....	57

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Análisis sensorial y evaluación en ensilado biológico de pescado	89
Anexo 2: Análisis estadístico en la primera etapa (hidrólisis enzimática)	90
Anexo 3: Análisis estadístico en la segunda etapa (fermentación homoláctica)	92
Anexo 4: Interpretación de pH y CE en abonos foliares	93
Anexo 5: Esquema general del procedimiento de prueba de toxicidad con semillas de lechuga	94
Anexo 6: Longitud de Radícula (mm) y porcentaje de germinación en semillas de lechuga luego de 120 horas	95
Anexo 7: Criterio de interpretación de fitotoxicidad a partir de IG	96

RESUMEN

El tratamiento primario de la trucha (*Oncorhynchus mikiss*) cultivada genera gran cantidad de subproductos en las operaciones de eviscerado, los cuales se caracterizan por su valor bajo o inexistente. El objetivo de la investigación fue elaborar un biofertilizante líquido utilizando subproductos de trucha y caracterizar el producto obtenido física y químicamente. El flujo de proceso fue el siguiente: recepción de vísceras de trucha - molido - mezclado - hidrólisis enzimática con proteasa a 0,33 % (p/v) y 60 °C - inactivado a 85 °C por 20 minutos - colado - mezclado de 10 % (p/p) melaza, 10 % (p/p) de Bio lac y 80 % de hidrolizado - incubado a 40 °C por 5 días - colado - envasado. El contenido de nitrógeno, fósforo y potasio fue de 12057 mg/L, 953 mg/L, 4230 mg/L respectivamente. Mientras el contenido total de aminoácidos y proteína fue de 3,8 g/100 g y 6,2 g/100 g respectivamente. El biofertilizante no contuvo coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.* Luego se realizó una prueba de toxicidad en semillas de lechuga y se determinó el índice de germinación evaluando las concentraciones de biofertilizante: 100 %, 10 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 % y 0,001 %. Las concentraciones de 0,1 a 0,001 % estuvieron libres de sustancias tóxicas.

Palabras clave: Hidrólisis enzimática, Fermentación homoláctica, Biofertilizante, Subproductos de pescado, Trucha.

SUMMARY

The primary treatment of farmed trout (*Oncorhynchus mikiss*) generates a large quantity of by-products in gutting operations, which are characterized by their low or non-existent value. The aim of this research was to develop a liquid biofertilizer using trout byproducts and characterize the product obtained physicochemically. The process flow was: trout viscera - ground - mixed - enzymatic hydrolysis with protease at 0.33% (w / v) and 60 ° C - inactivated at 85 ° C for 20 minutes - filtrated – mixed 10% (w / w) molasses, 10% (w / w) Bio lac and 80% hydrolyzate - incubated at 40 ° C for 5 days - filtrated. Nitrogen, phosphorus and potassium content was 12057 mg / L, 953 mg / L, 4230 mg / L respectively. While total amino acid and protein content was 3.8 g / 100 g and 6.2 g / 100 g respectively. The biofertilizer did not contain total coliforms, coliforms fecal, *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella sp.* Then, a toxicity test was performed on lettuce seeds and germination index was determined by evaluating the concentrations of biofertilizer: 100%, 10%, 1%, 0.1%, 0.01% and 0.001%. Concentrations of 0.1 to 0.001% were free of toxic substances.

Key words: Enzymatic hydrolysis, Homolactic fermentation, Biofertilizer, Fish by products, trout.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más grandes que enfrenta nuestra industria pesquera y acuícola es el inadecuado manejo de los residuos orgánicos, que están conformados por vísceras, piel, cola, cabeza, espinazos, entre otros, así como descartes procedentes de los desembarcaderos pesqueros artesanales. Estos residuos son considerados subproductos de la pesca y de sus procesos de transformación; y gran parte de ellos son desechados sin aprovechamiento alguno. FAO (2014) estima que, a escala mundial, se elaboran 70 millones de toneladas de pescado por fileteado, congelación, enlatado o curado. Estos procesos generan subproductos y desechos. Por ejemplo, en la industria del fileteado de pescado el producto obtenido suele suponer entre un 30 a 50 %. Además, la acuicultura proporciona más de una cuarta parte del suministro de pescado del mundo por ello la FAO espera se aproxime un 50 % para el año 2030 (FAO, 2000).

En el Perú, el cultivo de trucha (*Oncorhynchus mikiss*) se da en 17 departamentos, siendo principalmente extraída por los departamentos de Huancavelica, Junín y Puno. En 2012 la extracción de trucha representó 41,45 % de toda la extracción de los recursos hidrobiológicos de origen acuícola en el país. En 2014 se comercializó 31 401,10 TM como fresco y 1 851 TM como productos congelados. En ese mismo año la trucha representó el 88,68 % en la venta de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad acuícola (PRODUCE, 2014).

En 2012 se exportó 8 976 kg de trucha congelada exceptuando hígados, huevas y lechas, incrementándose a 17 641 kg en el 2013. Mientras la exportación de filetes congelados en 2012 fue de 208 838 kg y se incrementó a 279 228 kg en 2013 (ADEX, 2014). En 2014 la exportación de trucha representó el 5,74 % del total de exportación de recursos hidrobiológicos procedentes de la acuicultura (PRODUCE, 2014).

La Comisión Nacional de Medio Ambiente de Chile (1999), citado por Martínez (2003) menciona que la pérdida en el eviscerado y corte de cabeza sobre una tonelada de materia prima, en la elaboración de congelado de especies salmónidas es de 100 kg/TM y 70 kg/TM respectivamente.

La generación de subproductos de pescado se caracteriza por tener un valor comercial bajo o inexistente, por lo que son descartados al no haber tecnologías de reaprovechamiento y ocasionando problemas ambientales. Por ejemplo, Valdez y Vargas (2015) señalan que, en la Piscifactoría Peña, ubicada en Cajamarca, se procesa normalmente de 2 a 3 veces por semana una cantidad de 450 kg trucha/día, donde los subproductos generados principalmente son vísceras. Estos subproductos generalmente son desechados sin aprovechamiento alguno. Fernández y Gutiérrez (2002) indican que el proceso de congelado y tratamiento primario de trucha fresca generan residuos sólidos que afectan al medio ambiente, debido a que son dispuestos en excavaciones en el suelo, que imitan a un relleno sanitario, pasando a ser un foco de proliferación de vectores, además de arrastre de carga hacia las aguas subterráneas y/o cuerpos hídricos cercanos ocasionadas en zonas de altas precipitaciones. Esto además ocasiona la contaminación de los medios receptores como el agua, suelo y el aire con gases del efecto invernadero (CH₄ y CO₂).

Algunos subproductos de pescado son reutilizados para producción de harina de pescado. Sin embargo, este proceso es costoso y el valor requerido para el secado ocasiona que el producto disminuya su digestibilidad (Yamamoto *et al.*, 2005, citado por Kim *et al.*, 2010). Además de que nuevos desechos pueden ser generados (Yano *et al.*, 2008, citado por Kim *et al.*, 2010). Por lo tanto, nuevas técnicas de fermentación biológica han sido propuestas para el procesamiento de subproductos y desechos de pescado, los cuales se caracterizan por su bajo costo. Los residuos orgánicos contienen componentes que son capaces de promover el crecimiento de las plantas (Day y Katterman, 1992, citados por Kim *et al.*, 2010).

Según INEI (2014) el volumen total de importación de fertilizantes químicos en el 2012 fue de 882 426 toneladas mostrando un incremento hacia el 2013 de 905 798 toneladas. Se sabe que la degradación de los suelos en el mundo ha crecido, y con ello la pérdida de

fertilidad, eutrofización y lixiviación de fuentes hídricas subterráneas producto del empleo excesivo de fertilizantes químicos.

Proexpansión (2014) señala que el abono orgánico (agrupa los abonos y fertilizantes orgánicos) es un producto importante ya que es uno de los que hace posible la existencia del sistema de productos orgánicos. De las seis empresas que exportaron abono orgánico en 2013, la principal fue Sprind S.A.C., y cuatro exportadores fueron personas naturales. El 85 % del valor de las exportaciones de abono orgánico tiene como destino Estados Unidos, país que es el mercado con el mayor crecimiento para el abono orgánico peruano (más de 45 %). Además de que es categorizado como producto en crecimiento

La producción orgánica puede ser rentable a una escala pequeña e incluso para modelos de gestión empresarial como las asociaciones de pequeños productores o cooperativas de las zonas de menores recursos del país (Proexpansión, 2014).

El trabajo de investigación tuvo como objetivos la elaboración de un biofertilizante líquido utilizando los subproductos del procesamiento de trucha (*Oncorhynchus mykiss*), determinar un flujo de procesamiento y parámetros de trabajo para su elaboración, caracterizar físico químicamente el producto obtenido principalmente el contenido de macro y microelementos, realizar un bioensayo de toxicidad para evaluar la presencia de sustancias tóxicas que inhiban la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) y determinar la presencia de microorganismos patógenos y metales pesados, tomando en cuenta los límites máximos permisibles propuestos por el Real Decreto 506/2013 de España para fertilizantes elaborados a partir de materias primas de origen vegetal o animal.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 LA TRUCHA

Camacho *et al.* (2000) señalan que la trucha, también llamada trucha arco iris, cuyo nombre científico es *Oncorhynchus mykiss*, es un pez que pertenece al grupo de los salmónidos originarios de América del Norte. Esta especie fue introducida de los Estados Unidos al Perú hace más de 75 años y está adaptada totalmente a nuestras aguas, presenta muy buenas cualidades para el cultivo en pequeña y gran escala, sobre todo por haberse definido totalmente la tecnología de su reproducción, alimentación y manejo en todo el periodo de su desarrollo biológico.

El nombre de trucha arco iris deriva de la peculiar coloración que posee (Figura 1), la misma que varía en función del medio, la talla, del sexo, del tipo de alimentación y del grado de maduración sexual (Camacho *et al.*, 2000).



Figura 1: Coloración característica de la trucha

2.1.1 Descripción taxonómica

En la tabla 1 se presenta la clasificación taxonómica de la trucha de acuerdo a Camacho *et al.* (2000).

Tabla 1: Coloración característica de la trucha

Reino	Animalia
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Piscis
Clase	Osteichthyes
Subclase	Actinopterygii
Orden	Salmoniformes
Familia	Salmonidae
Genero	Oncorhynchus
Especie	mykiss
Nombre científico	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Nombre común	Trucha Trucha arco iris Trucha arcoíris

2.1.2 Características generales

Esta especie se caracteriza por tener el cuerpo cubierto con finas escamas y de forma fusiforme (forma de huso), ligeramente aplanada lateralmente. Posee una banda lateral rosada iridiscente que se hace más vistosa en la época de la reproducción. La denominación de trucha arco iris se debe a la presencia de una franja de colores de diferentes tonalidades, con predominio de una franja rojiza sobre la línea lateral en ambos lados del cuerpo. Se distingue de otras especies por presentar una aleta adiposa en la parte posterior del dorso (Mendoza y Palomino, 2004).

La trucha ha sido cultivada durante más de un siglo y se ha sido introducida en países de todo el mundo. Gran parte de la acuicultura de la trucha se desarrolló con el fin de almacenar y reaprovisionar las aguas naturales para mejorar las poblaciones de peces para

apoyar la pesca recreativa. En la figura 2 se presenta los países que fueron los mayores productores de trucha (TM) en 2012 (FAO 2014b, citado por Engle *et al.*, 2017).

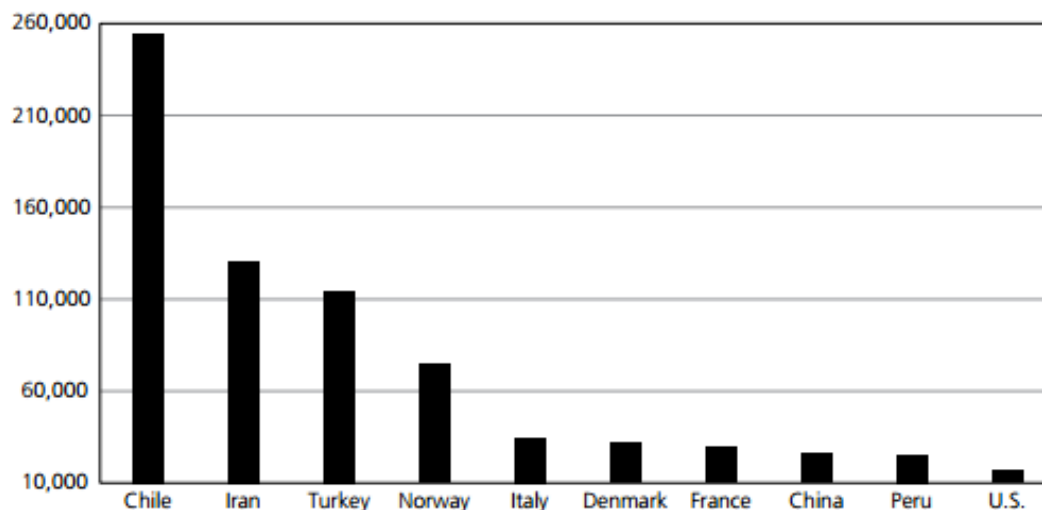


Figura 2: Países productores de trucha en 2012 (TM)

Se observa en la figura 2 que Chile fue el país de mayor producción de trucha en el 2012 con 254 353 TM; mientras que Perú se encuentra como el noveno país productor de trucha, superando a EE.UU. (FAO, 2014b, citado por Engle *et al.*, 2017).

En el Perú, la trucha es la especie dulceacuícola más importante, especialmente en las zonas altoandinas (FAO, 2012). Fue la primera especie en ser cultivada en el Perú a mediados del siglo pasado a partir de la introducción de ovas importadas. La producción el año 2011 fue de 20 900 TM de las cuales se destinó al consumo interno 17 400 TM y el resto al mercado externo, siendo los principales países de destino Alemania, Portugal y Canadá. El monto total de las exportaciones fue de 8,800 millones de USD (Ruiz, 2012).

El cultivo de trucha principalmente se realiza mediante la importación de ovas embrionadas por los países de EE UU., Dinamarca, Inglaterra y Chile con un total de 174 703 millares en el 2014 (PRODUCE, 2014). La cosecha y posterior comercialización de la trucha se realiza a partir de los 26 cm de talla y entre 250 a 350 g de peso unitario (FONDEPES, 2014).

En la figura 3 se presenta la venta interna de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad de acuicultura. La venta interna de trucha fue de 31 315,43 TM en el 2014 y representó el 85,68 % del total de la venta interna de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad acuícola. Además, su extracción fue llevada a cabo principalmente por los departamentos de Puno, Junín y Huancavelica en las cantidades de 27 183, 1 615 y 721 TM respectivamente y destinado para fresco (PRODUCE, 2014).

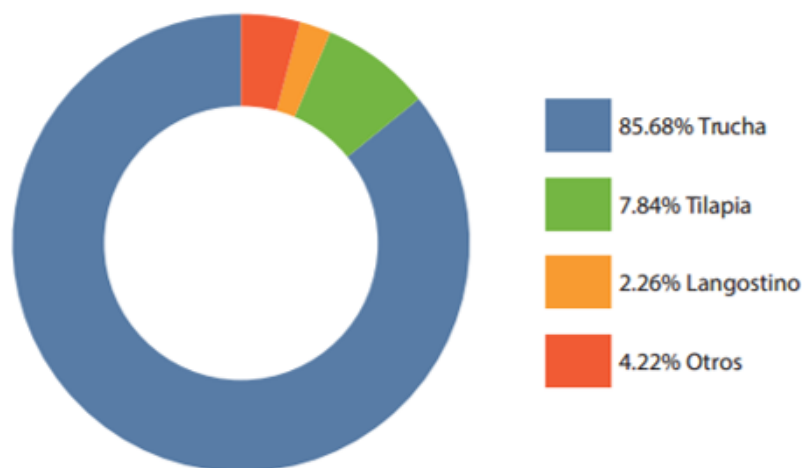


Figura 3: Venta interna de recursos hidrobiológicos procedentes de la acuicultura

2.2 PROCESAMIENTO DE TRUCHA

La trucha es comercializada de diferentes formas de presentación que generan remanentes de procesamiento o subproductos (Fiori *et al.*, 2012). Según Fuentealba (2004) los productos identificados en base a trucha (*Oncorhynchus mykiss*), son :

- Trucha congelada, trucha eviscerada deshuesada, filetes empacados al vacío interfoliados en cajas,
- Trucha fresca entera refrigerada, trucha eviscerada deshuesada y corte mariposa.
- Trucha ahumada, filete ahumado en caliente o filete ahumado en frío.

El procesamiento depende de la línea de elaboración, es decir si es congelado o fresco-refrigerado y de la forma de presentación del producto ya sea entero, sin cabeza o productos con valor agregado (Fuentealba, 2004).

2.3 SUBPRODUCTOS DE LA PESCA

2.3.1 Definición

Windsor y Barlow (1984) definen a los subproductos del pescado como, aquellos productos de las materias primas que, por razón de especie, tamaño, calidad o disponibilidad de procesos de elaboración, no resultan adecuados para el consumo directo por el hombre.

Los subproductos o también denominados coproductos del pescado corresponden a las partes que son removidas de éste antes que llegue al consumidor final, con el fin de mejorar la calidad, reducir el peso de embarque para su transporte, o incrementar el valor del producto principal del pescado, el músculo. Se le llama coproductos a la sangre, vísceras, cabeza, espinas, piel, belly, aletas y cola del pescado (Ramírez, 2007a, citado por Cavieres, 2010).

2.3.2 Subproductos del procesamiento de pescado

El procesamiento de pescado requiere la remoción de huesos, piel, cabeza y víscera (subproductos), que representa aproximadamente el 60 a 70 g/100 g del peso del pescado (Bozoglu *et al.*, 2009, citado por Albuizio *et al.*, 2011). El fileteado comercial de especies como bacalao, salmón, tilapia, besugo y abadejo tienen rendimientos aproximadamente de 60 a 70 % de subproductos y de 30 % a 40 % de filetes del peso de un pescado entero (Torres *et al.*, 2007, citado por Chen *et al.*, 2007).

Martínez (2003) menciona que para especies salmónidas las pérdidas en peso corresponden al 28 % para los productos congelados, para conserva en trozo (incluye esqueleto y piel) a 38 % y para la conserva de pescado desmenuzado un 60 %. Estas pérdidas porcentuales, no son otra cosa que los residuos primarios generados en estas líneas productivas; los cuales están constituidos de un 60 % por residuos sólidos y el 40 % restante son transportados por aguas residuales.

Para la elaboración de una tonelada de pescado como producto congelado, la carga residual de sólidos totales evacuada corresponde a 135,2 kg/ton de materia prima, mientras que la pérdida real de materia prima (carga neta) de este proceso productivo a través del efluente residual es de 80,17 kg/ton de materia prima. Por lo tanto, en el procesamiento de una tonelada de pescado (materia prima inicial) para la obtención de fresco-refrigerado o congelado se tiene una pérdida total del 27,86 %, en donde el 17 % es residuo sólido y el 10,86 % restante corresponde a material evacuado en las aguas residuales. Mientras que, en la elaboración de conservas, el pescado descamado es seleccionado de acuerdo a la calidad (consistencia de la carne), ya sea para elaborar conservas de pescado en trozo o pescado desmenuzado. En esta selección, los de mejor calidad (82,5 %) siguen directamente a trozado y el de menor consistencia (17,5 %) a cocción para ser posteriormente desmenuzado (Martínez, 2003).

2.3.3 Composición físico química de los subproductos de trucha

La mejor especie de pescado produce solamente alrededor del 50 % de materiales comestibles en forma de filetes o músculo de pescado. El resto, esqueleto, cabeza y demás desechos posee un contenido en proteína casi tan alto como el del propio filete y en cambio no suele consumirse (Windsor y Barlow, 1984).

La cabeza, espina y cola de trucha poseen una composición química similar: 70 % humedad, 15 % proteína y 11 % de grasa. Los Intestinos contienen un alto contenido lipídico correspondiente a un 35 %, un bajo contenido de humedad cercana a 56 % y un contenido de proteína cerca del 8 % (Kotzamanis *et al.*, 2001). Teniendo una relación de eficiencia proteica y relación proteína neta igual a la del pescado del cual procede (Karmas, 1985, citado por Fuentealba, 2004).

En el procesamiento de la trucha, las vísceras son extraídas para evitar su descomposición y terminan siendo dispuestas en fuentes hídricas o a orillas de estas. Las vísceras de pescado de agua dulce constituyen entre el 5 y 11 % del peso corporal. Su composición química promedio es 67 % agua, 10% proteína, 14 % extracto etéreo y 3 % minerales (Mahendrakar, 1995, citado por Bermúdez *et al.*, 1999). Otros subproductos como las agallas, las escamas y los huesos no se convierten en un problema directo debido

a que estos residuos acompañan al pescado hasta que éste es comercializado (Martínez, 2003).

2.3.4 Rendimiento de los subproductos de trucha

El rendimiento de los subproductos de trucha está conformado por: vísceras (8 %), Cabeza (12 %), esquelón (3,1 %) y piel (1,2 %) (SERNAPESCA 2009, citado por Cavieres, 2010).

El fileteo mecánico de 100 kg de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) tiene rendimientos de 40 kg de filetes y 60 kg de subproductos, los cuales están constituidos aproximadamente de 20 kg de carne y un poco de aceite de pescado (Torres *et al.*, 2007, citado por Chen *et al.*, 2007).

En la tabla 2 se reporta la composición física y los rendimientos de la trucha de acuerdo a su procesamiento (Vilca, 1999).

Tabla 2: Composición física y rendimiento de la trucha

Composición	Rendimiento (%)	
	Eviscerado	Fileteado
Física		
Cabeza	-	9,2
Agallas	2,6	2,6
Vísceras	6,9	6,9
Hígado	3,4	3,4
Gónadas	0,4	0,4
Espinazo y cola	-	6,2
Aletas	-	2,2
Orejetas	-	2,3
Sangre y otros	2,2	2,2
Parte comestible	84,5	64,6

2.4 FERTILIZANTES

2.4.1 Químicos

Las materias primas para su producción provienen principalmente de yacimientos mineros (fuentes irrenovables). Tienen elevada concentración de nutrientes y baja humedad. Cuando se agregan más nutrientes de los que las plantas necesitan, se convierte en tóxico para los cultivos y produciendo la infertilidad de suelo en desequilibrio, además como los nutrientes se encuentran en estado soluble, son fácilmente lixiviados contaminando los cuerpos de agua (Cubero y Vieira, 1999).

El uso indiscriminado de agroquímicos, provoca un decrecimiento en la fertilidad de los suelos, disminuye su carga bacteriana e interfiere en el aprovechamiento de nutrientes de forma natural lo que obliga a que la planta los absorba forzosamente, además, cuando estos fertilizantes se utilizan en mayor cantidad del que pueda absorber la planta puede causar un severo problema de contaminación (Tompkins, 2002, citado por Jiménez, 2012).

Los cultivos no suelen aprovechar más del 50 % del nitrógeno de los fertilizantes inorgánicos, por lo que gran parte del mismo se pierde por lixiviación (NRC, 1989).

La mayoría de los insumos químicos han provocado el deterioro del suelo y por ende la desaparición de los controladores naturales de plagas. Éstos han provocado a su vez la pérdida de la fertilidad del suelo, la disminución de la productividad de cosechas y en efecto se ha tenido un impacto negativo en la dinámica ecológica de los agro-ecosistemas (Gliessman, 2000).

El exceso en la fertilización mineral fosfórica produce grandes incrementos en el contenido de fósforo en el suelo. Esta acumulación de fósforo podría llegar a saturar la capacidad de retención del suelo, facilitando así el lavado de los fosfatos y las pérdidas por escorrentía. Así como también el aumento de las sales solubles a concentraciones que

pueden ser tóxicas para las plantas o que pueden deteriorar la estructura del suelo (Ribo, 2004).

2.4.2 Biofertilizantes

Un biofertilizante es un producto elaborado a partir de microorganismos benéficos (Bacterias y Hongos), que viven asociados o en simbiosis con las plantas, que ayudan a su proceso natural de nutrición, y además regeneran el suelo (Ramírez *et al.*, 2010). Su uso logra reducir las dosis de fertilización mineral recomendados a los cultivos y establecer un equilibrio biológico en los suelos. Además de poseer capacidad para suplementar o movilizar nutrientes con un mínimo uso de recursos no renovables; también tiene como ventaja que los procesos microbianos sean rápidos y pueden aplicarse para solucionar problemas locales específicos, así como también reducir los problemas económicos y ecológicos que se derivan de la aplicación indiscriminada de los fertilizantes industriales (Ágreda, 2014).

Los biofertilizantes son el resultado de la descomposición de animales y vegetales en ausencia de oxígeno, conteniendo nutrientes que son asimilados fácilmente por las plantas (INIA, 2005, citado por Jiménez, 2012). Generalmente para elaborar bioferlizantes se mezcla agua junto con una fuente de nitrógeno como estiércol o desechos de verduras, una fuente de energía como melaza de caña y una fuente de microorganismos (levaduras, leche, suero etc) responsables de la transformación de los materiales orgánicos (Restrepo, 2001, citado por Criollo *et al.*, 2011). Su utilización permite disminuir los insumos químicos y reducir el impacto ambiental desfavorable, permitiendo obtener ahorros económicos, mejorar la salud general de las plantas y regenerar paulatinamente las características físicas, químicas y biológicas de los suelos (Peralta, 2010).

Existen 2 tipos de fertilizantes biológicos según la forma de su utilización. Aplicándose unos al suelo y otros directamente a las hojas de las plantas (CLADES, 1998a, citado por Córdor, 2010).

La gran ventaja de los biofertilizantes sean estos solidos o líquidos es que no poseen mal

olor y no atraen a las moscas (Mc Caskey, 1990 citado por Soria *et al.*, 2001).

La agricultura orgánica no es solo compostas, sino también de la elaboración de fermentaciones, en la que se descomponen aeróbicamente residuos orgánicos, por medio de poblaciones de microorganismos que existen en los mismos residuos, esta descomposición es controlada, dando como resultado un material parcialmente estable que continuará su ciclo de descomposición, pero más lentamente. Las fermentaciones por lactobacilos son muy limpias y puede ser usado como inóculo para bocashi, agua miel, etc (Félix *et al.*, 2008). La presencia de bacterias, mohos, levaduras y mesofilos viables permiten el procesamiento y conversión de compuestos orgánicos en biofertilizantes que contienen sustancias simples como minerales que cuando se suministra a las plantas contribuyen a su desarrollo fisiológico normal (Gallardo y Timana, 2002, citados por Criollo *et al.*, 2011). Además, la eficiencia de los biofertilizante depende de la materia prima usada (residuos, desechos o subproductos animales y vegetales), el tipo de fermentación y los microorganismos implicados (Ngampimol y Kunathigan, 2008, citados por Criollo *et al.*, 2011).

Dentro de los biofertilizantes, destacan aquellos producidos en base a aminoácidos. Los aminoácidos actúan como estimuladores del metabolismo y se incorporan en las vías metabólicas, estimulando la síntesis de proteínas y mejora el transporte y almacenamiento de nitrógeno, siendo asimilado por las plantas como nitrato y amonio (Rickli y Peres, 2016).

2.5 HIDROLIZADO PROTEICO DE PESCADO

La hidrólisis proteica consiste en la escisión de enlaces peptídicos para obtener aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular, consumiendo una molécula de agua para cada enlace roto (Rutherford y Gilani, 2009, citado por Villamil *et al.*, 2017).

La hidrólisis es un proceso de separación de la grasa y los nutrientes en la materia orgánica (Bossio, 2007). En la hidrólisis enzimática no se utilizan temperaturas elevadas, pH enérgicos ni cualquier otro tratamiento que origine alteraciones considerables en la

composición inicial del pescado (Pastoriza *et al.*, 1982). La licuefacción del tejido del pescado trae como ventaja la no destrucción de aminoácidos, conservando el valor nutritivo de las proteínas (Diniz y Martín, 1999, citados por Furlan y Oetterer, 2002. El producto final es de mayor digestibilidad que la proteína no tratada (Bouchez y Azzi, 1991).

La primera aplicación de los hidrolizados de proteínas de pescado fue como fuente de nitrógeno amínico para los medios de crecimiento de microorganismos, donde se demostró que los hidrolizados elaborados por enzimas permiten mejor crecimiento bacteriano que los hidrolizados químicos (Gildberg, 1994, citado por Madueño, 2014). Además, están formados por péptidos de diferentes tamaños, originado de la hidrólisis enzimática de proteínas, en el cual se emplea como fuente proteica el pescado. Siendo catalizado por enzimas (Belén *et al.*, 2007, citado por Zamora, 2013). De esta manera se consigue el aislamiento de proteínas de desechos de pescado.

El principio de la hidrólisis enzimática consiste en que las proteasas cortan las conexiones peptídicas entre 2 aminoácidos adyacentes en la secuencia primaria de una proteína, generando al menos así 2 péptidos. La hidrólisis de las conexiones peptídicas genera la liberación de protones H^+ , lo cual induce a la acidificación del medio. Principio válido para procesos de hidrólisis que se desarrollan a valores de pH superiores a 6,5; para que el grado de disociación de los iones $R-N^+H_3$ sea suficiente. Cuando el pH es inferior, la reacción se invierte y serán los iones HO^- los que se liberan (Ravallec-Plé, 2000, citado por Dumay, 2006).

Las enzimas se utilizan con la finalidad de incrementar el valor y la disponibilidad de las proteínas, aumentando la recuperación de hidrolizados de proteínas provenientes de huesos o pescado. En el pescado, la mayor parte del aceite está asociado con proteínas, de forma que la adición de proteasa incrementa el rendimiento de aceite y de grasas (Wiseman, 1991).

La vía enzimática ha mostrado ventajas al minimizar el desarrollo de reacciones secundarias, manteniendo el valor nutricional del producto (Zamora, 2013). La acción

enzimática sobre la proteína de pescado es inicialmente superficial. Actualmente se encuentran disponibles muchas proteasas comerciales, las cuales pueden ser clasificadas por su origen, ya sea este animal, vegetal, bacteriano o fúngico. Los preparados enzimáticos normalmente se venden en estado líquido o como polvos (Benítez *et al.*, 2008).

El 59 % de enzimas industrialmente importantes empleadas son proteolíticas y comprenden: tripsinas (3 %), cuajos (10 %), ácido (3 %), proteasas neutras (12 %), alcalina (6 %), proteasas alcalinas (25 %). Y el 30 % son carbohidrasas (Godfrey y Reichelt, 1983, citados por Wiseman, 1991). Las proteasas usadas en la hidrólisis enzimática permiten la recuperación de proteínas de la sangre, vísceras y huesos provenientes mataderos, en la decoloración de la hemoglobina y el procesamiento de los desechos de pescados (Ward, 1983, citado por Wiseman, 1991).

Las proteasas se clasifican en endoproteasas o exoproteasas, según corten los enlaces peptídicos del interior de la cadena aminoacídica o los enlaces de los extremos amino y carboxilo terminal (Vioque y Millán, 2005). Las endopeptidasas rompen los enlaces peptídicos al interior de la proteína generando péptidos pequeños, pero muy pocos aminoácidos libres (Suarez, 2010). En la figura 4, cuya fuente es de Vioque y Millán (2005) se detalla esta clasificación.

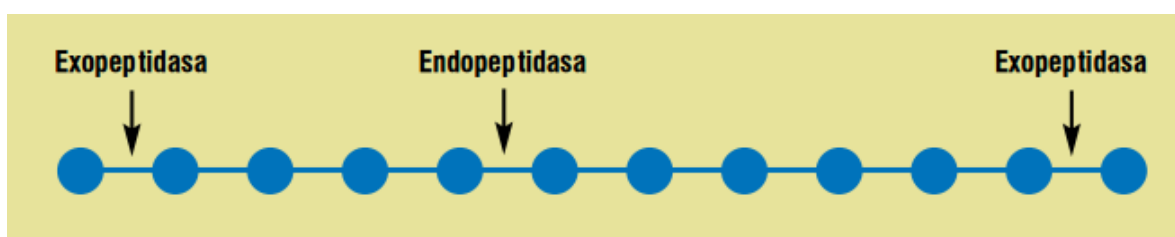


Figura 4: Clasificación de proteasas según el enlace que cortan

Las endopeptidasas escinden dentro de la molécula de proteína dando lugar a péptidos relativamente grandes, mientras que las exopeptidasas cortan aminoácidos del final de la molécula de proteína, dando lugar a una combinación de aminoácidos, así como también de péptidos pequeños y grandes (Samaranayaka y Li-Chan *et al.*, 2011, citados por Madueño, 2014).

2.6 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas son Gram positivas, catalasa negativa, no son formadoras de esporas, son inmóviles, anaerobia (Bossio, 2007). Su temperatura de crecimiento se encuentra en un rango comprendido entre 20 °C a 45 °C. La mayor parte obtienen su energía solo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables produciendo ácido láctico como producto principal o único de su metabolismo, por lo cual su desarrollo está restringido a ambientes ricos en azúcares (Leveau y Bouix, 2000, citados por Madigan *et al.*, 2004).

Su metabolismo es fermentador, son nutricionalmente muy exigentes por lo cual son difíciles de cultivar, aun cuando se emplean medios muy ricos. Su hábitat son los vegetales en descomposición (CSIC, 2006, citado por Peña, 2008). Los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y otros, destacan por sus requerimientos vitamínicos complejos, muchos más amplios que los humanos. Las principales vitaminas requeridas por los microorganismos son tiamina (vitamina B1), biotina, piridoxina (vitamina B6) y piridoxina (vitamina B12) (Madigan *et al.*, 2004).

La mayoría de especies son homofermentadoras. Los lactobacilos son generalmente más resistentes a las condiciones ácidas que otras bacterias lácticas, siendo capaces de crecer hasta valores de pH de 4. Ésta resistencia al pH les permite seguir creciendo durante fermentaciones lácticas naturales. Las bacterias lácticas son las responsables siempre de terminar la inmensa mayoría de las fermentaciones lácticas. Y no son patógenos (Madigan *et al.*, 2004).

Las bacterias ácido lácticas y algunos de sus metabolitos son considerados como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA de EEUU (Hugas, 1998, citado por Mora y García, 2007).

Todas las bacterias son consideradas como anaerobias aerotolerantes, y al contrario de las anaerobias estrictas, no son sensibles al oxígeno, por lo que pueden crecer tanto en ausencia o presencia de él. Además, son muy exigentes en su nutrición al requerir una

gran cantidad de factores nutritivos como aminoácidos, bases nitrogenadas, algunas vitaminas principalmente del grupo B y fuentes de carbono (Madigan *et al.*, 2014).

Las bacterias ácido lácticas pueden también producir sustancias que neutralicen los efectos adversos de un microorganismo al modificar su metabolismo, sin necesidad de destruirlo, pero sí disminuyendo su población (Rodríguez, 1994). El ácido láctico combate los microorganismos perjudiciales y acelera la descomposición de materia orgánica (Díaz y León, 2014).

2.7 FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA

Las bacterias ácido lácticas poseen gran capacidad fermentativa, produciendo cantidades significativas de ácidos orgánicos (ácido acético, fórmico y láctico) a partir de carbohidratos simples (Rodríguez, 1994).

La melaza de caña de azúcar es el producto residual de la fabricación o refinación del azúcar de caña, de los cuales no se puede extraer más azúcar por medios físicos, comercializado en forma de fluido espeso (COVENIN 1880-83, 1983). Está conformado por: sacarosa (31 % p/v), glucosa (9,5 % p/v), fructosa (10 %) y nitrógeno (0,95 %) y es un sustrato completo para la producción de ácido láctico (Dumbrepatil *et al.*, 2008; Patil *et al.*, 2006; Wee *et al.*, 2006b; Bhatta y Srivastava 2008; Pessôa de França *et al.*, 2009, citados por García *et al.*, 2010).

Nutricionalmente presenta un alto contenido de azúcares, vitaminas del grupo B, además de abundantes minerales. En cuanto a carbohidratos presenta 48,3 % de azúcares totales; de los cuales 11,5 % son azúcares reductores, 35,9 % es sacarosa, 5,6 % es fructuosa y 2,6 % es glucosa. Tiene una cantidad de proteína bruta de 4,3 %, Vitamina B 8 de 3 ppm, ácido fólico 0,04 ppm, inositol 6 000 ppm, vitamina B 12 de 2,5 ppm, tiamina de 1,8 ppm y colina con 700 ppm (Pereyra y Perla, 2011).

Sirven como fuente de energía para los microorganismos, los cuales tienen la función de descomponer la materia orgánica y se encargan de proveer boro, calcio y otros nutrientes (Salgado y Núñez, 2010, citado por Jiménez, 2012).

La fermentación no solo es un proceso que produce energía, sino un medio de obtener productos naturales que son de utilidad para el consumo humano. Los productos de la fermentación más frecuentes son etanol, ácido láctico, y una extensa variedad de otros ácidos y alcoholes, así como compuestos gaseosos, dependiendo del organismo particular (Madigan *et al.*, 2004).

La fermentación anaerobia es un proceso complejo en el cual se producen varias reacciones y en donde se presentan una gran cantidad de bacterias y ocurre la solubilización de la materia orgánica, actuando en ella bacterias celulíticas, conformada por polímeros, es hidrolizada a compuestos solubles, es decir, monómeros (Quispe, 2013).

Durante el manejo anaerobio de la fermentación láctica se realizan cambios en los residuos, provocado por la descomposición de sustancias orgánicas de estructuras polimerizadas a configuraciones más simples, pudiendo ser inmediatamente metabolizadas por microorganismos propios del suelo, como también ser utilizados en forma directa por las plantas (Fassbender, 1975).

Las bacterias homofermentadoras usualmente metabolizan la glucosa por la vía Embden-Meyerhof, dando como resultado dos moléculas de ácido láctico de cada molécula de glucosa con un rendimiento mayor a $0,9 \text{ gg}^{-1}$ (Hofvendahl y Hagerdal, 2000, citados por García *et al.*, 2010). Mientras las bacterias heterofermentadoras producen alrededor 50 % ácido láctico, 25 % ácido acético y alcohol etílico y 25 % dióxido de carbono (Sanjeev *et al.*, 2013).

La elección de un microorganismo depende del carbohidrato a ser fermentado: *Lactobacillus delbreuckii* ssp. *delbreuckii* fermentan la sacarosa; *Lactobacillus delbreuckii* ssp. *bulgaricusus* a la lactosa; *Lactobacillus helveticus* es capaz de fermentar

lactosa y galactosa; *Lactobacillus amylophylus* y *Lactobacillus amylovirus* fermentan almidón; *Lactobacillus lactis* puede fermentar glucosa, sacarosa y galactosa, *Lactobacillus pentosus* puede fermentar licores ricos en sulfitos (Okafor 2007, citado por García *et al.*, 2010).

Los residuos orgánicos pueden tener bacterias patogénicas de diferentes especies como la *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium sp.*, coliformes fecales y enterobacterias. La fermentación anaerobia, disminuye o elimina la presencia de estos microorganismos (Estrada, 2004, citado por Quispe, 2013).

2.8 NUTRICIÓN DE LA PLANTA

La mayoría de los compuestos orgánicos en las plantas contienen carbón, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo. Además, hay importantes elementos en las células como calcio, potasio y fósforo, los cuales juegan un importante rol en el crecimiento. También se encuentra en pequeñas cantidades (menores a 0,001 %) micronutrientes como boro, cobre, zinc, manganeso, hierro y otros, los cuales también son requeridos para el normal funcionamiento de las plantas (Sobirov *et al.*, 2015).

2.8.1 Nitrógeno (N)

Es el elemento que facilita un crecimiento rápido y coloración verde oscura. Forma parte de muchos compuestos importantes, incluyendo la proteína y la clorofila, un pigmento verde oscuro (Plaster, 2000). Entre el 97 al 99 % del nitrógeno del suelo se encuentra en la materia orgánica, que es el almacén de nitrógeno del suelo (Plaster, 2000).

El principal papel de nitrógeno es ser constituyente de la clorofila, el protoplasma, la proteína y los ácidos nucleicos. Además de aumentar el crecimiento y desarrollo de todos los tejidos vivos (Suquilanda, 2006). El efecto de la aplicación de fertilizantes en la producción de biomasa, determina que la distribución del contenido de N en varios órganos del maíz sigue el orden de hojas > grano > tallo (Hu *et al.*, 2010, citado por Aguirre y Alegre, 2015).

Un contenido de proteína alto ocasiona que la planta sea una fuente mejor de forraje, alimentación y nutrición humana. Cuando la planta tiene nitrógeno en una cantidad amplia, usa el agua de forma óptima. Sin embargo, un contenido demasiado alto de nitrógeno en la planta, ocasiona que no crezca adecuadamente. Un crecimiento demasiado rápido retarda la madurez, así como también la maduración de muchas cosechas. Así mismo el nitrógeno en exceso estropea el sabor de muchas cosechas hortícolas. Se encarga más del crecimiento vegetativo, es decir el que está relacionado a los tallos y hojas, más que el crecimiento de desarrollo de flores y frutas. Es por ello que este elemento es más importante para cosechas derivadas de su vegetación (Plaster, 2000).

La deficiencia del nitrógeno implica hojas amarillentas o de color verde claro y un crecimiento lento, tallos delgados y flores de color opaco (Arévalo y Castellano, 2009).

2.8.2 Fósforo (P)

Es el elemento que estimula el crecimiento, pero en menor medida que el nitrógeno. Forma parte del material genético, como es el caso de cromosomas y genes. Lo cual está relacionado e implica la reproducción de la planta y la división celular. También forma parte de la transferencia de energía, incluyendo la captura de energía de la luz por la fotosíntesis, y también el transporte en las raíces para la absorción de nutrientes (Plaster, 2000).

Entre el 25 a un 90 % de fósforo en el suelo reside en la materia orgánica. Se caracteriza por promover el crecimiento temprano de la raíz (Plaster, 2000).

Entre las funciones del P se tiene: la formación, desarrollo y fortalecimiento de las raíces. Permite un rápido y vigoroso comienzo a las plantas, es decir las ayuda a afianzarse al suelo (Suquilanda, 2006). También mejora la eficacia de captura del nitrógeno por las plantas, así como también ayudarlas a usar eficientemente el agua. Además, reduce el riesgo de contaminación del agua de la tierra debido a la lixiviación del nitrato (Plaster, 2000).

El efecto de la aplicación de fertilizantes en la producción de biomasa, determina que la distribución del contenido de fósforo en varios órganos del maíz sigue el orden de grano > hojas > tallos (Hu *et al.* 2010, citado por Aguirre y Alegre, 2015). Si bien el nitrógeno ayuda al crecimiento vegetativo; el fosforo ayuda a la floración y fructificación. Siendo más importante para cosechas de las que se usan la parte de la flor, como es el caso de flores, frutas o semillas (Plaster, 2000).

El principal síntoma de la deficiencia de P es un crecimiento retardado. Además de la aparición de color púrpura-naranja en las hojas viejas, las hojas jóvenes son verde oscuro (Arévalo y Castellano, 2009).

2.8.3 Potasio (K)

El potasio es esencial para la formación de azúcares y almidón, además contribuyente al desarrollo de las raíces y al incremento del tamaño y calidad de la fruta. Además de aumentar la resistencia a enfermedades provocadas por algas, hongos y briofitas. Los cultivos de mayores requerimientos son los frutales y tubérculos (Medina, 1989, citado por Núñez, 2016).

Los iones de potasio llevan una carga positiva y es por esto que son absorbidos en los coloides del suelo. Este elemento al ser retenido en la arcilla u otros coloides, es móvil en suelos de textura fina. La mayoría de la captura se produce por difusión en la planta (Plaster, 2000).

El potasio es responsable de más de 48 funciones distintas en las plantas, como regulador del cierre de estomas de las hojas en las células oclusivas y también como principal activador de la síntesis de carbohidratos (Núñez, 2016). Además, actúa equilibrando los efectos del nitrógeno. Una planta que tenga un buen suministro de este elemento transpirará menos, lo cual mejora la manera de empleo del agua (Plaster, 2000).

Las plantas consumen más potasio que cualquier otro nutriente, exceptuando el nitrógeno. Los compuestos no orgánicos de la planta contienen potasio. Este elemento también cubre

diversas funciones reguladoras, activa las necesidades de enzimas en la formación de la proteína, almidón, celulosa y lignina. Además, se encarga de regular la apertura y cierre del estoma de la hoja, los cuales dejan pasar el oxígeno, el dióxido de carbono y vapor de agua. Es por esto último que está implicado en el intercambio de gas necesario para la fotosíntesis y la transpiración. Un exceso en la absorción de potasio puede inhibir la absorción de calcio o magnesio (Plaster, 2000).

El efecto de la aplicación de fertilizantes en la producción de biomasa determinó que la distribución del contenido de K en varios órganos del maíz sigue el orden de tallo > hojas > grano (Hu *et al.* 2010, citado por Aguirre y Alegre, 2015).

La carencia de este elemento ocasiona que las hojas viejas presenten un color amarillo intenso en la punta y sus márgenes, puede ocasionar que el tejido se seque (Arévalo y Castellano, 2009). Burton (1986), Gruner (1983) y Venegas (2001), citados por Núñez (2016) añaden los siguientes efectos en la deficiencia de nutrición potásica:

- La maduración de los tubérculos se da tardíamente y la calidad para la cocción se caracteriza por ser aguachenta.
- Presencia de contenidos considerables de azúcares reductores como la fructuosa y glucosa, los cuales influyen en la conservación de la cosecha.
- Incremento de compuestos nitrogenados solubles como los oxifenoles y hierro.
- Disminución en el contenido de ácido cítrico, que genera condiciones para que surjan coloraciones oscuras (manchas) en el alimento.

En la figura 5, tomada de García (2013) se muestra los síntomas de la deficiencia en hojas de elementos esenciales, especialmente de los macroelementos N, P y K.



Figura 5: Síntomas de deficiencia de N, P y K en plantas de maíz

2.8.4 Micronutrientes

El hierro forma parte de muchas enzimas y está asociado con las síntesis de proteína cloroplástica y su contribución en la formación de la molécula de clorofila, así como también de los demás compuestos que intervienen en esta reacción. La ausencia de hierro implica que no se llegue a formar el complejo clorofilolipoprotéico. Y como consecuencia el cloroplasto no es capaz de intervenir en el proceso fotosintético (Padilla, 2007).

Un síntoma de la deficiencia de hierro es el amarillamiento intervenal en las hojas jóvenes. Bajo deficiencias severas, la hoja entera, primero se torna amarilla y finalmente blanca (Arévalo y Castellano, 2009).

El cobre es importante como coenzima, necesario para activar diversas enzimas vegetales y se halla implicado en la formación de clorofila (Gostincar, 1998). También es

componente de varias sustancias como hormonas, que permiten el desarrollo de la planta (Arévalo y Castellano, 2009). Otra función que cumple es la participación en reacciones redox ligado enzimáticamente a oxidasas terminales y reaccionando directamente con oxígeno molecular.

Su deficiencia implica un crecimiento retardado en las hojas jóvenes y puntos de crecimiento, muerte de los meristemos apicales. Así como también que las hojas jóvenes pueden presentar puntos blancos o desteñidos (puntos terminales) (Arévalo y Castellano, 2009).

El zinc junto con el boro cumple un papel importante en la formación de los frutos y el transporte de electrones (Arévalo y Castellano, 2009). Además, es catalizador y regulador del metabolismo vegetal y participa en la formación de auxinas de crecimiento (Gostincar, 1998). Este elemento es necesario para la producción de clorofila y carbohidratos. Además de ayudar a la síntesis de los sistemas enzimáticos (Suquilanda, 2006).

La deficiencia de zinc ocasiona amarillamiento en el área intervenal de las hojas, tornándose verde pálido. Además, ocasiona alargamiento de hojas (Arévalo y Castellano, 2009).

El manganeso es absorbido como Mn^{2+} y translocado de las raíces al tallo por el xilema como un catión divalente libre. Participa en las metaloproteínas donde actúa como componente estructural, sitio activo, o simplemente como un sistema redox (Pía y Vinegra, 2007, citados por Jiménez, 2012). Este elemento cumple las siguientes funciones en la planta: transporte de electrones, germinación de polen y crecimiento del tubo de polen (Arévalo y Castellano, 2009).

Las deficiencias del manganeso son similares a las de Fe y Zn. Es decir, ocurre el amarillamiento de los márgenes de las hojas y puede tornarse color violeta (Arévalo y Castellano, 2009).

El boro está relacionado al metabolismo de carbohidratos en la síntesis de la pared celular (Arévalo y Castellano, 2009). Este elemento es importante para mejorar el rendimiento y está relacionado con la actividad de los meristemas, especialmente el apical e interviene en la fertilidad. También participa en la síntesis de proteínas y de membranas permeables (Pía y Vinegra, 2007, citados por Jiménez, 2012).

La deficiencia del boro implica que las hojas se tornen de color verde pálido con un tinte bronceado. Así como también el enrollamiento de hojas jóvenes, muerte de los puntos de crecimiento y deformación de la caída de las flores y frutos (Arévalo y Castellano, 2009).

2.8.5 Asimilación de aminoácidos por las plantas

Muchas plantas tienen transportadores para la absorción de formas orgánicas de nitrógeno, particularmente aminoácidos (Soldal y Nissen, 1978; Jones y Darrah, 1994, citados por Kim *et al.*, 2010). Investigaciones recientes han demostrado que los aminoácidos pueden ser una fuente importante de N vegetal en un ecosistema natural limitado en nutrientes (Reeve *et al.*, 2008, citados por Kim *et al.*, 2010).

Disponer de una disolución que contenga un elevado contenido en aminoácidos libre, permite aportar a la planta la fuente directa para que esta sintetice las proteínas (Espasa, 1983, citado por Vega, 2014).

Las plantas únicamente pueden utilizar los L-aminoácidos libres. En las proteínas de los animales y plantas existen sólo aminoácidos de configuración L. Se ha determinado que los aminoácidos libres y péptidos de muy bajo peso molecular son absorbidos directamente por la planta vía foliar y/o radicular (Gomis, 1987; Niculcar, 1999, citados por Vega, 2014). También es importante suministrar aminoácidos de importancia biológica, tales como la glicina, alanina, ácido glutámico y prolina (Espasa, 1983, citado por Vega, 2014). Los aminoácidos son una parte esencial de la fracción activa de la materia orgánica en un fertilizante. Su composición puede usarse como medio de evaluación de la bioconversión, ya que el crecimiento de las plantas depende en última

instancia de la disponibilidad de un equilibrio adecuado de aminoácidos (Gwon y Kim, 2012).

2.9 PRUEBA DE GERMINACIÓN

Muchos biofertilizantes se caracterizan por tener un pH bajo y un contenido considerable de sales minerales. Es por ello que es necesario verificar si se genera efectos desfavorables en plantas (García, 2008; Peralta, 2010; Diaz y León, 2014 y Cárdenas, 2014).

La salinidad afecta casi todos los aspectos de la fisiología y la bioquímica de las plantas, así como la reducción del rendimiento del cultivo de manera significativa. Es por ello que la salinidad es la más grave amenaza para la agricultura (Parida y Das, 2005, Munns y Tester, 2008, citados por Al-Maskri *et al.*, 2010). Los cultivos que son más sensibles a las sales son el maíz, la cebolla, los cítricos, la lechuga y las judías (Taiz y Zeiger, 2006, citados por Peralta, 2010).

Las semillas se encuentran latentes (secas o deshidratadas) y pueden mantenerse en condiciones adversas sin perder su viabilidad. Cuando se presentan las condiciones favorables sufren cambios rápidos (en ocasiones inmediatos) en su metabolismo, transporte de nutrientes y división celular (Mayer y Polsakoff-Mayer, 1982, citados por Rodríguez *et al.*, 2014). Y autores como Peralta (2010), Díaz y León (2014), Cárdenas (2014) entre otros obtuvieron buenos resultados en el bioensayo de toxicidad usando semillas de *Lactuca sativa*, variedad Duett. Debido a que la lechuga es sensible a la salinidad y valores de pH bajos (Cárdenas, 2014). Además, la lechuga se cultiva en casi todos los países durante todo el año, al aire libre o bajo invernaderos (Bautista, 2004, citado por Sernaqué y López, 2012).

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición), cuya finalidad es evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas de éstos, en el proceso de germinación de semillas y en el desarrollo de plántulas durante los primeros días de crecimiento (Bagur-González *et al.*, 2011, citado por Rodríguez *et al.*, 2014). Durante el período de

germinación, la presencia de una sustancia tóxica puede interferir en la supervivencia y el desarrollo normal de la planta. Es por ello que para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo. Por lo tanto, la germinación es una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. En la figura 6 se presenta la morfología de la semilla y la plántula de lechuga (*Lactuca sativa*) tomada de Sobrero y Ronco (2008).

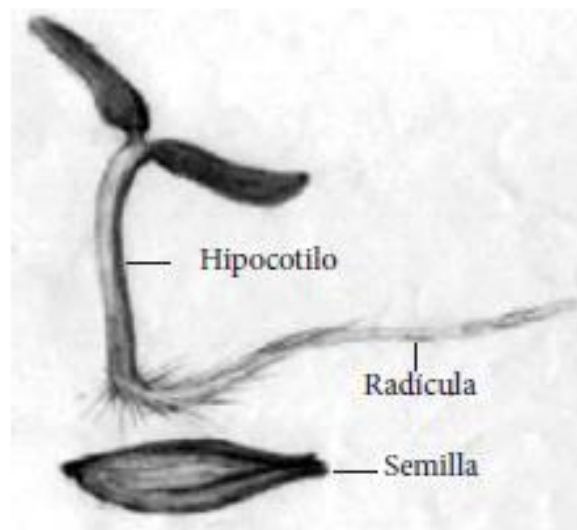


Figura 6: Morfología de una semilla y plántula de lechuga (*Lactuca sativa*)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Ingeniería de la Facultad de Pesquería y el Laboratorio de Biorremediación de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2 MATERIA PRIMA

Los subproductos (estómago, intestino, hígado, corazón, sangre y gónadas) utilizados fueron derivados del eviscerado de la trucha, proceso realizado en piscigranjas comunales de Canta - Lima. Las vísceras al estado fresco fueron colocadas dentro de un cooler, refrigeradas con gelpacks y transportadas al Laboratorio de Ingeniería de la Facultad de Pesquería donde fueron decepcionadas e inmediatamente congeladas.

3.3 MATERIALES Y EQUIPOS

3.3.1 Insumos

- Proteasa comercial Protex 6L.
- Cultivo de bacterias lácticas Bio Lac conformado por los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y otros, proporcionados por el laboratorio de Biorremediación de la Facultad de ciencias.
- Melaza de caña de azúcar.
- Semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) variedad Duet

3.3.2 Reactivos químicos

- Solución de NaOH al 20 %
- Solución de NaOH 0.1 N.
- Solución buffer pH 7.01, Hanna Buffer solution HI 7004, rango $\pm 0,01$ pH.
- Solución buffer pH 4.01, Hanna Buffer solution HI 7007, rango $\pm 0,01$ pH.
- Solución de calibración de C.E. 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$, Hanna Instruments.

3.3.3 Materiales

- Pipeta graduada de 10 mL.
- Pipeta volumétrica de 1 mL.
- Matraces Erlenmeyer de 500 mL.
- Probeta de 250 mL.
- Bagueta.
- Baldes de plástico de 1 L.
- Papel aluminio.
- Bureta de 30 mL.
- Placas Petri
- Fiolas de 50 mL.
- Papel filtro Whatman N° 40.
- Papel milimetrado.
- Pinzas.
- Beaker de 250 mL.
- Pipeta de Pasteur.

3.3.4 Equipos

- Estufa; Memmert 854 Schwabach. S/M (40 °C – 140 °C).
- Baño maría con agitation Water Bath *Shaker*
- Potenciómetro digital; Hanna HI 8424 (rango -2 a 16 pH).

- Conductímetro digital; Hanna instruments, HI 9033 Multi-range, rango 0 a 200 mS/cm, resolución 0,01 mS/cm.
- Refractómetro; Sugar Refractometer model RHB.
- Balanza de 20 kg, marca TORREY, modelo: L-PCR-40T, con precisión de $\pm 0,5$ g.
- Centrifuga Biolab Modelo JX C104.
- Procesadora de alimentos Oster gourmet collection.

3.4 PARTE EXPERIMENTAL

3.4.1 Flujo experimental de proceso

El flujo experimental para la elaboración del biofertilizante se muestra en la figura 7 y fue elaborado considerando los procedimientos seguidos por Chávez, (1980), Bossio (2007), Peña (2008) y Cárdenas (2014).

Una breve descripción del flujo experimental es la siguiente:

Recepción de materia prima: se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de la UNALM. Las vísceras de trucha fueron retiradas del congelador, las cuales estuvieron almacenadas a -18 °C, se descongelaron las vísceras hasta alcanzar una temperatura de 14 °C y se determinó el peso total.

Molido: las vísceras de trucha descongeladas y luego fueron molidas utilizando una procesadora de alimentos con la finalidad uniformizar el tamaño de las partículas sólidas, hasta obtener una masa homogénea.

Mezclado: se colocaron 200 g de vísceras de trucha molidas en un matraz erlenmeyer e inmediatamente se adicionó agua, luego se mezcló por 1 minuto, se añadió la enzima proteolítica Protex 6L y se mezcló nuevamente.

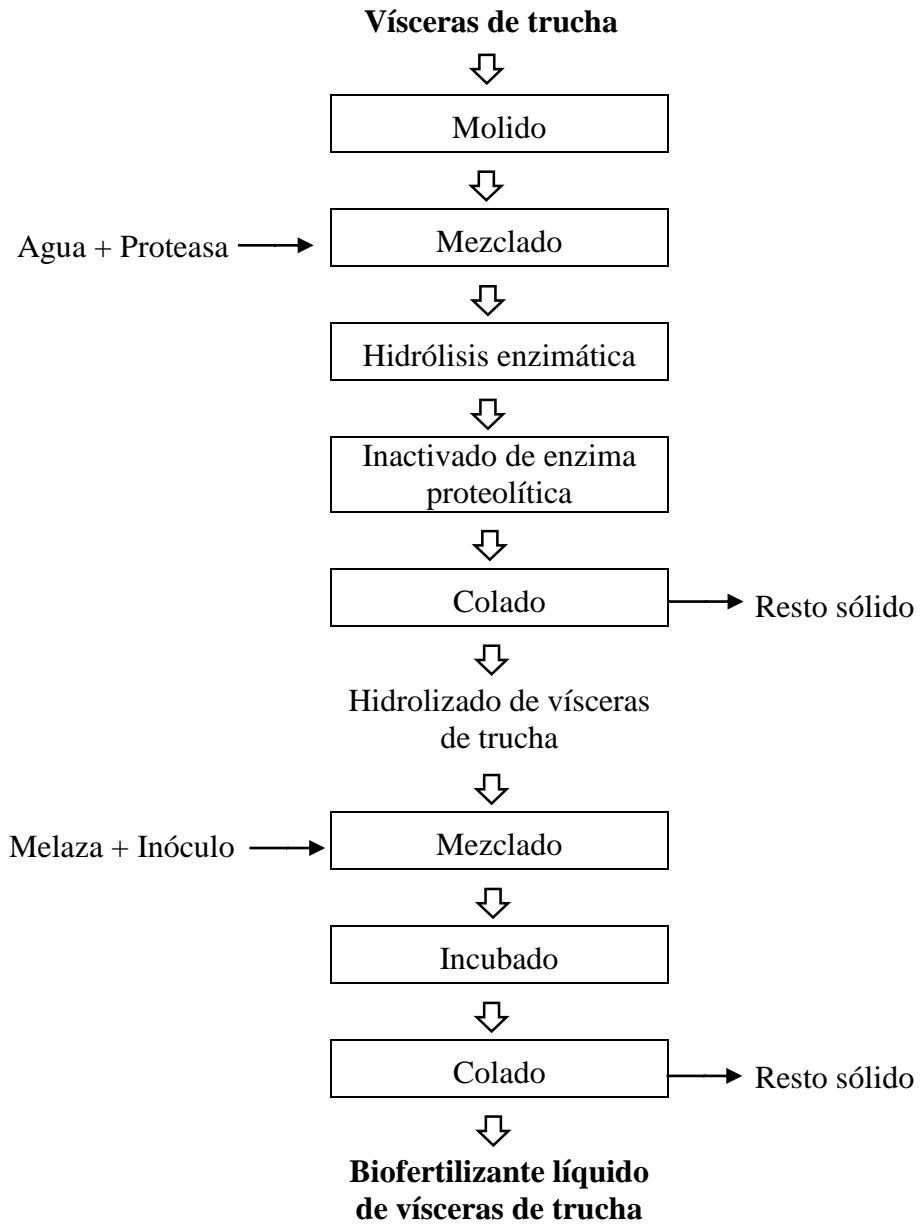


Figura 7: Flujograma experimental para la elaboración de un Biofertilizante líquido de vísceras de trucha

Hidrólisis enzimática proteolítica: se colocaron los matraces dentro de un baño maría, según condiciones de trabajo de la enzima, como temperatura y concentración, se realizó la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha por un tiempo de cuatro horas, tiempo en el cual se alcanzó el mayor porcentaje de solubilidad de péptidos

Inactivado de enzima: mediante un proceso de pasteurización a 80 °C durante quince minutos.

Colado: con la finalidad de eliminar restos sólidos no hidrolizados.

Las vísceras hidrolizadas coladas fueron utilizadas como sustrato para la elaboración del Biofertilizante.

Mezclado: en un balde de plástico, se mezcló el hidrolizado de vísceras de trucha con la melaza de caña de azúcar como fuente de carbono e inóculo, luego se cerró herméticamente.

Incubado: la muestra fue incubada a una temperatura controlada de 40 °C durante cinco días. Durante este tiempo se midió el pH hasta alcanzar un valor cercano a 4.

Colado: el producto obtenido fue colado usando un colador de plástico, la fase líquida corresponde al biofertilizante.

Envasado: el biofertilizante fue envasado en botellas de 500 mL y almacenado en condiciones ambientales.

3.4.2 Diseño experimental

El trabajo de investigación constó de cinco experimentos realizados en tres etapas, que son presentados en la figura 8:

Primera Etapa		
Hidrólisis enzimática	Experimento 1: Determinación de concentración de proteasa	Tratamiento 1 (H ₁)
		Tratamiento 2 (H ₂)
		Tratamiento 3 (H ₃)
	Experimento 2: Determinación de temperatura de hidrólisis	Tratamiento 4 (H ₄)
		Tratamiento 5 (H ₅)
		Tratamiento 6 (H ₆)
	Experimento 3: Determinación de una proporción vísceras:agua	Tratamiento 7 (H ₇)
		Tratamiento 8 (H ₈)
		Tratamiento 9 (H ₉)
Segunda Etapa		
Fermentación homoláctica	Experimento 4: Determinación de proporciones de melaza y Bio lac para la fermentación	Doce tratamientos (T ₁ al T ₁₂)
Tercera Etapa		
Bioensayo	Experimento 5: Determinación de fitotoxicidad aguda del biofertilizante líquido	

Figura 8: Esquema experimental de las 3 etapas para la elaboración de un Biofertilizante líquido de vísceras de trucha

Primera etapa: Elaboración del hidrolizado de vísceras de trucha

La primera etapa constó de 3 experimentos donde la variable respuesta involucrada fue el porcentaje de solubilidad de péptidos en los subproductos de la trucha. Para ello se usó el método empleado por Peña (2008) quien utilizó una curva de calibración con peptona (Criterion Dehydrated Culture Media), cuya ecuación lineal fue dada por: $Y=1,0268X + 0,6058$. En donde el contenido de péptidos solubles (p/v) se encuentra en eje de las abscisas y la lectura del Índice de solubilidad de peptonas usando refractómetro en el eje de las

ordenadas. Vásquez *et al.* (2004a) menciona que las peptonas comerciales provienen principalmente de caseína, soya, gelatina y carne. Además, Vásquez *et al.* (2008), citando a Aspino *et al.* (2005) y Horn *et al.* (2005) añaden que las peptonas provenientes de vísceras de pescado obtuvieron buenos resultados en las mismas aplicaciones de peptonas tradicionales. Los experimentos fueron:

Experimento 1: Determinación de concentración de proteasa

Experimento 2: Determinación de temperatura de hidrólisis

Experimento 3: Determinación de una proporción vísceras:agua

Segunda etapa: Elaboración del biofertilizante de subproductos de trucha

La segunda etapa se basó en la metodología utilizada por Bossio (2007), García (2008), Peña (2008), Díaz y León (2014), Cárdenas (2014) y Salvador y Sánchez (2015) quienes usaron como sustrato: hidrolizado de residuos de pescado, residuos de pescado sin hidrolizar, hidrolizado de pota, biofouling del lavado de linternas de concha de abanico, hidrolizado de vísceras de pollo y residuos de trucha respectivamente. Y utilizaron como inóculo el consorcio microbiano Bio lac, el cual también se utilizó para este experimento.

Experimento 4: Determinación de proporciones de melaza y Bio lac para la fermentación.

Tercera etapa: Bioensayo en semillas de lechuga

Elaborado el biofertilizante, se realizó un bioensayo de fitotoxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) variedad Duett siguiendo la metodología propuesta por Sobrero y Ronco (2008). El IG es la variable que integra diferentes grados de fitotoxicidad y representa un indicador robusto para describir el potencial fitotóxico de un material orgánico (Varnero *et al.*, 2007).

Experimento 5: Determinación de fitotoxicidad aguda del biofertilizante líquido

3.4.3 Experimento 1: Determinación de concentración de proteasa

Para determinar la concentración de proteasa se pesó y colocó 200 g de vísceras de trucha molidas en un matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad y se mantuvo constante los siguientes parámetros: proporción vísceras:agua igual a 1, se ajustó a un pH de 9, la temperatura fue de 60 °C con una duración de 4 horas. Los tratamientos fueron 3 concentraciones de proteasa comercial Protex 6L con 3 repeticiones para cada tratamiento.

Tratamiento 1 (H₁): muestra homogénea de vísceras + agua + 0,33 % proteasa.

Tratamiento 2 (H₂): muestra homogénea de vísceras + agua + 0,5 % proteasa.

Tratamiento 3 (H₃): muestra homogénea de vísceras + agua + 0,66 % proteasa.

La respuesta fue el porcentaje de solubilidad de péptidos en la mezcla conformado por subproductos de la trucha y agua.

3.4.4 Experimento 2: Determinación de temperatura de hidrólisis

Se pesó y colocó 200 g de vísceras de trucha molidas en un matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad, la proporción vísceras y agua fue igual a 1, se ajustó el pH a 9, se usó la concentración de proteasa con mejores resultados del experimento anterior y la hidrólisis tuvo una duración de 4 horas. Los tratamientos con 3 repeticiones fueron:

Tratamiento 4 (H₄): 50 °C.

Tratamiento 5 (H₅): 60 °C.

Tratamiento 6 (H₆): 70 °C.

La respuesta fue el porcentaje de solubilidad de péptidos en la mezcla conformado por vísceras de la trucha y agua.

3.4.5 Experimento 3: Determinación de una proporción vísceras:agua

Se pesó y colocó 200 g de vísceras de trucha molidas en un matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad. Se trabajó a un pH ajustado de 9, la mejor concentración de proteasa del primer experimento, con la mejor temperatura de hidrólisis del experimento anterior y con 4 horas de duración. Se usaron 3 proporciones como tratamientos con 3 repeticiones para cada tratamiento.

Tratamiento 7 (H₇): proporción vísceras y agua en la relación 1:1

Tratamiento 8 (H₈): proporción vísceras y agua en la relación 1,33:1

Tratamiento 9 (H₉): proporción vísceras y agua en la relación 2:1

La respuesta fue el porcentaje de solubilidad de péptidos en la mezcla conformado por vísceras de la trucha y agua.

3.4.6 Experimento 4: Determinación de proporciones de melaza y Bio lac en la fermentación homoláctica

El hidrolizado enzimático de vísceras de trucha fue usado como sustrato para el proceso de fermentación homoláctica, para ello se mezcló con melaza de caña de azúcar: 5 % (p/p), 10 % (p/p), 15 % (p/p) y 20 % (p/p) e inóculo de bacterias ácido lácticas: 5 % (p/p), 10 % (p/p) y 15 % (p/p), siendo completado el 100 % con hidrolizado enzimático. Luego se incubó a una temperatura de 40 °C que permite la aceleración de procesos proteolíticos y fermentativos, la condición anaerobia se logró cubriendo la superficie de la mezcla y paredes con láminas de plástico. De esta manera, según Bertoia (2004), la ausencia de oxígeno permite el desarrollo de las bacterias ácido lácticas mediante la conversión de azúcares en ácido láctico.

Se usaron 12 tratamientos (4x3) donde cada tratamiento corresponde a la cantidad de Bio Lac (factor 1) y melaza (factor 2) que se usaron en el mezclado. Se realizó 3 repeticiones por tratamiento.

La variable respuesta fue el valor de pH luego de 5 días de incubación. La finalidad del experimento fue determinar la cantidad mínima de inóculo de bacterias ácido lácticas (Bio Lac) y de la fuente de carbohidratos (melaza) (ambos en % del volumen del hidrolizado) aprovechando la mayor cantidad sustrato (hidrolizado de vísceras de trucha) con las cuales se consigue el menor valor de pH en la elaboración del biofertilizante líquido.

3.4.7 Experimento 5: Determinación de fitotoxicidad aguda del biofertilizante líquido

Se utilizaron las diluciones logarítmicas (100, 10, 1, 0,1, 0,01) del biofertilizante y agua destilada esterilizada como control con la finalidad de establecer un intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 0 y 100 %. En la prueba de germinación se utilizaron las siguientes seis concentraciones: 100 %, 10 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 % y 0,001 %. Las condiciones bajo las que se llevó a cabo el bioensayo fueron las recomendadas por Sobrero y Ronco (2008):

- Temperatura, 22 ± 2 °C
- Mantenimiento de las placas en oscuridad.
- Duración del bioensayo, 120 horas

Se usaron en total 420 semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) variedad Duett, y se colocaron 20 semillas por placa Petri. Previamente se colocó y mojó papel filtro con 5 mL de dilución usando una pipeta. Todos los materiales empleados en esta prueba fueron esterilizados para evitar contaminación externa. Para la medición de las radículas e hipocótilos se utilizó papel milimetrado. Así, para la medición de la elongación de la radícula se consideró desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocótilo) hasta el ápice radicular (Peralta, 2010, Cárdenas 2014).

Para el cálculo del índice de germinación (IG) se siguió la metodología seguida por Tiquia (2000) y citada por Varnero *et al.* (2007), donde previamente se calculó el porcentaje de germinación relativo (PGR) y el crecimiento de radícula relativo (CRR) para cada

tratamiento que fue comparado con el control. Los cálculos de PGR, CRR e IG fueron los siguientes:

$$PGR = \frac{N^{\circ} \text{ de semillas germinadas en la dilucion}}{N^{\circ} \text{ de semillas germinadas en el control}} \times 100$$

$$CRR = \frac{\text{Elongacion de radícula en la dilución}}{\text{Elongacion de radícula en el control}} \times 100$$

$$IG = \frac{PGR \times CRR}{100}$$

La interpretación de los resultados de IG obtenidos, así como también la clasificación de su fitotoxicidad pueden observarse en el Anexo 7.

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.3 Composición química proximal de las vísceras de trucha

- Humedad: Por el método de evaporación (AOAC 934.01, 2012).
- Grasa: Mediante el método de hidrólisis acida (AOAC 954.02, 2012).
- Proteína: Mediante el método de microkjeldahl se obtiene el contenido de nitrógeno total y la proteína se estima del cálculo de $N_{\text{Total}} \times 6.25$ (AOAC 984.13, 2012).
- Cenizas totales: mediante el método gravimétrico (AOAC 942.05, 2012).
- Carbohidratos: Por diferencia de pesos.

3.5.4 Análisis físico químicos

pH: la medida de la concentración de iones hidronio se determinó introduciendo el electrodo de vidrio del potenciómetro, la medición se realizó de manera directa en la muestra (García, 2008).

Índice de Acidez titulable: Se adaptó la metodología empleada por Berenz (1997) y El-Ajnaf (2009). Se tomó una alícuota de 1,5 mL de muestra y se diluye hasta 15 mL añadiendo agua destilada, seguido de ello se centrifuga a 4 000 rpm por un tiempo de 30 minutos y se titula con NaOH 0,1 N, hasta que el pH se aproxime a $8,1 \pm 0,2$. El porcentaje de ácido láctico se calcula mediante la siguiente formula:

$$AT(\%) = \frac{G \times N}{m} \times 0,09 \times 100$$

Donde:

G= Gasto de NaOH (mL)

N= Normalidad de NaOH

m= peso de la muestra (g)

0,09= Constante para acidez láctica o factor de conversación para el número de gramos de ácido láctico en la muestra.

Conductividad eléctrica (CE): la medida de la capacidad de una solución acuosa para transmitir una corriente eléctrica se realizó midiendo de manera directa, introduciendo el electrodo del conductímetro en la muestra (García, 2008).

Macroelementos

- Nitrógeno total: mediante el método de microkjeldahl (AOAC 977. 02, 1990).
- Fósforo total: mediante método de color amarillo del Vanadomolibdato (APHA, 1992).

- Potasio, Calcio y Magnesio: mediante el método de lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica (APHA, 1992).

Microelementos

- Boro: mediante método del espectrofotómetro (APHA, 1992).
- Cobre, hierro, manganeso y zinc: mediante método de calcinación y extracción con ácido y lectura con un equipo de absorción atómica (APHA, 1992).

Contenido de aminoácidos

- Contenido de aminoácidos (g de aminoácido/100 g muestra): se realizó mediante la metodología Analytical Biochemistry 136, 65-74 (1984).
- Triptófano (g triptófano/100 g muestra): se realizó mediante la metodología LMCTL – 006F (2001).

Metales Pesados

- Plomo (Pb), Cadmio (Cd) y Cromo (Cr): mediante el método de lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica (APHA, 1992).

3.5.5 Análisis microbiológicos

- Recuento de *Lactobacillus* sp. (UFC/mL): en medio Agar MRS incubado en condiciones anaeróbicas a 30 °C por 5 días, según metodología ICMSF (2000).
- Recuento de mohos y levaduras (UFC/mL): en medio Agar OGY, se incubaba a 20 – 24 °C por 3 a 7 días, mediante la metodología ICMSF (2000).
- Recuento de aerobios mesófilos viables (UFC/mL): en medio Agar Plate Count, se incubaba a 30 °C por 48 horas, según metodología de ICMSF (2000).
- Enumeración de coliformes totales (NMP/mL): en medio Caldo bilis verde brillante se incubaba a 37 °C por 24 a 48 horas, mediante la metodología ICMSF (2000).

- Enumeración de coliformes fecales (NMP/mL): en medio Caldo lactosa bilis verde brillante se incubó a 45 °C por 24 a 48 horas, mediante la metodología ICMSF (2000).
- Enumeración de *Escherichia coli* (NMP/mL): en medio Caldo Brilla Fluorocult se incubó a 45 °C por 48 horas, mediante la metodología ICMSF (2000).
- Enumeración de *Staphylococcus aureus* (NMP/mL): mediante la metodología ICMSF (2000).
- Enumeración de *Pseudomonas* sp. (NMP/mL): mediante la metodología APHA (1992).
- Detección de *Salmonella* sp. en 25 g: mediante la metodología ICMSF (2000).

3.6 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para la primera etapa como método estadístico se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) para los 3 experimentos con 3 repeticiones para cada tratamiento y previamente se comprobó la distribución normal de los términos de error aleatorio, mediante una prueba de Shapiro Wilks modificado y la homogeneidad de varianzas dentro de cada tratamiento, mediante una prueba de Levene (Balzarini *et al.*, 2011). Se evaluó el análisis de varianza (ANVA) y se determinó la existencia o no de diferencias entre las medias de los tratamientos. Para los tratamientos que presentaron diferencias significativas a un nivel de significancia de 5 % se eligió el tratamiento que presentó un mayor incremento en el porcentaje de solubilidad de péptidos mediante una prueba de comparación de medias LSD Fisher.

Para la segunda etapa el método estadístico fue un DCA con arreglo factorial con 3 repeticiones donde previamente se comprobó la normalidad de los errores y la homogeneidad de varianza mediante las pruebas de Shapiro Wilks modificado y Levene respectivamente. (Balzarini *et al.*, 2011). Luego se verificó si existe interacción o no entre los factores (melaza y Bio Lac) y finalmente se evaluó el ANVA para determinar si existe al menos un tratamiento diferente a un nivel de significancia de 5 % y al observar la existencia al menos un tratamiento distinto a los demás se realizó una prueba comparativa de medias LSD Fisher y se eligió el tratamiento con el menor valor de pH al quinto día.

El diseño estadístico para la fermentación homoláctica se presenta en la tabla 3.

Tabla 3: Diseño estadístico para la fermentación homoláctica

		Melaza											
		5 %			10 %			15 %			20 %		
Bio Lac	5%	T ₁	T1	T1	T4	T4	T4	T7	T7	T7	T10	T10	T10
	10%	T2	T2	T2	T5	T5	T5	T8	T8	T8	T11	T11	T11
	15%	T3	T3	T3	T6	T6	T6	T9	T9	T9	T12	T12	T ₁₂

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 MATERIA PRIMA

4.1.1 Determinación de pH

El pH de las vísceras de trucha fue de 6. Este valor es cercano al pH de las vísceras de carpa, según lo reportado por Amit *et al.* (2010), de 6,1. Mientras Barrios y Guía (2014) determinaron el pH del músculo de la trucha, el cual fue de 6,31. Por otro lado, Bechtel (2003) reportó el pH de las vísceras de abadejo de Alaska, bacalao y salmón, cuyos valores estuvieron dentro de un rango de 6,96 a 7,1. Según Fraser y Sumar (1998), se encuentran muchas enzimas proteolíticas en el tracto intestinal de muchos peces, muchas de estas enzimas tienen una actividad que es dependiente del pH, por lo tanto, a un pH neutro o ligeramente alcalino habrá una alta actividad. Al respecto, Bayliss (1996) señala que el músculo del pescado tiene una reserva de glicógeno baja y el óxido de trimetilamina es eficiente para amortiguar la acidez, de manera que el pH al final del rigor sea de 6,4-6,8. Los cambios estacionales, desove, ciclo de alimentación, grado de esfuerzo durante la captura, etc. afectan las condiciones post mortem del pescado. Por lo tanto, el deterioro del pescado se ve influenciado a un valor de pH mayor de 7, debido a que es un valor óptimo para la actividad microbiana y enzimática.

4.1.2 Composición química

En la tabla 4 se presenta la composición química de proteína, lípidos, humedad y cenizas de las vísceras de trucha, contenido conformado por 12,2 %, 24,2 %, 62 % y 1,6 % respectivamente. Taheri *et al.* (2012) determinaron la composición química de vísceras de trucha (*Oncorhynchus mikiss*) conformada 15 % de proteína, 13 % de lípidos, 71,65 % de humedad y 2,73 % de cenizas.

Tabla 4: Composición química de las vísceras de trucha

Componentes	Proximal (g/100g víscera)
Humedad	62
Lípidos	24,2
Proteína	12,2
Cenizas	1,6
Carbohidratos	0

Mientras He *et al.* (2011) determinaron la composición de vísceras de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) cuyo contenido de proteína, lípidos, humedad y cenizas fue de 10,73 %, 27,19 %, 61,24 % y 1,3 % respectivamente. Ovissipour *et al.* (2009) determinaron la composición proximal de vísceras de esturión persa (*Acipenser persicus*) conformada por 15,48 % proteínas, 15,68 % lípidos, 39 % humedad y 5 % ceniza y Bechtel (2003) determinó el contenido proximal de las vísceras de abadejo de Alaska, bacalao y salmón, los cuales presentaron un contenido de proteína de 13 a 15.3 % y un contenido de grasa de 2 a 19,1 %.

Huss (1995), citado por Villamil *et al.* (2017) menciona que las vísceras de pescado poseen un alto contenido de proteínas y lípidos cuya composición depende de la especie, la estacionalidad, la edad, el sexo, la ingesta de nutrientes y otros factores.

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 Primer experimento: Determinación de concentración de proteasa

En la tabla 5 se presenta la equivalencia del porcentaje de péptidos solubles a partir de la lectura del índice de solubilidad de peptonas con el refractómetro.

Tabla 5: Porcentaje de Péptidos solubles en tres concentraciones de proteasa

Tiempo en horas	Enzima % (p/v)								
	H ₁ (0,33%)			H ₂ (0,5%)			H ₃ (0,66%)		
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
0	10,60	10,60	10,60	10,60	10,60	10,60	10,90	10,90	10,90
1	10,61	11,39	11,58	10,61	11,10	11,10	10,61	11,10	11,10
2	10,61	11,58	11,88	10,61	11,39	11,58	10,61	11,58	11,58
3	11,10	11,83	11,88	10,90	11,58	11,83	10,65	11,58	11,58
4	11,39	11,88	12,07	11,10	11,65	11,92	10,90	11,88	11,58

Las concentraciones de proteasa fueron menores a 1 % (p/v). Al respecto, Bourgeois y Le Roux (1986) indican que la velocidad de hidrólisis, como toda reacción enzimática, es proporcional a la concentración de la enzima, sin embargo, es a partir de cierta concentración que se puede efectuar una autodigestión de la proteasa provocando un efecto antagonista. Por tal motivo en la práctica, con frecuencia se trata de no sobrepasar una relación enzima-sustrato superior a 1 %. Rebeca *et al.* (1991) emplearon tres enzimas proteolíticas de origen bacteriano en un rango de concentraciones de 0 a 1 % para la hidrólisis de *Mugil cephalus*.

En la figura 8 se observa que, de los 3 tratamientos, la concentración 0,33 % (p/v) de proteasa presenta una mayor variación en el incremento del porcentaje de solubilidad péptidos después de 4 horas de hidrólisis. Peña (2008) y Omote (2012) realizaron una hidrólisis enzimática de pota (*Dosidicus gigas*) y obtuvieron mayor incremento de péptidos solubles a una concentración de proteasa de 0,5 % (p/v) y 0,7 % (p/v) respectivamente. Bourgeois y Le Roux (1986) mencionan que existe una relación proporcional entre la reacción enzimática y la concentración de la enzima. Sin embargo, según el análisis estadístico (ver Anexo 2) y la figura 9 se observó lo contrario. Lo cual puede deberse al sustrato y su composición química (ver tabla 5). Además, la concentración 0,33 % (p/v) obtenida en este primer experimento es menor a lo reportado por Patel (2014) quien elaboró un hidrolizado enzimático a partir de subproductos de perca del Nilo (*Lates niloticus*) y obtuvo como rango óptimo de 0,5 a 1 % de concentración con las enzimas Alcalasa, Protex 30 L y bromelina. Mientras que Taghiof *et al.* (2010) elaboraron un hidrolizado de vísceras de beluga (*Huso hosu*) usando alcalasa a una concentración de 1 %. Por otro lado, Hoyle y Merrit (1994) en la hidrólisis de arenque (*Clupea harengus*) emplearon alcalasa y papaína en una concentración de 0,5 % (p/p). El análisis de varianza (ANVA) (ver Anexo 2) se observó que no existen diferencias

significativas entre el porcentaje de péptidos solubles, es decir son iguales a un nivel de significancia de 5 %. Por lo tanto, se eligió la concentración de la proteasa Protex 6L de 0,33 % (p/v).

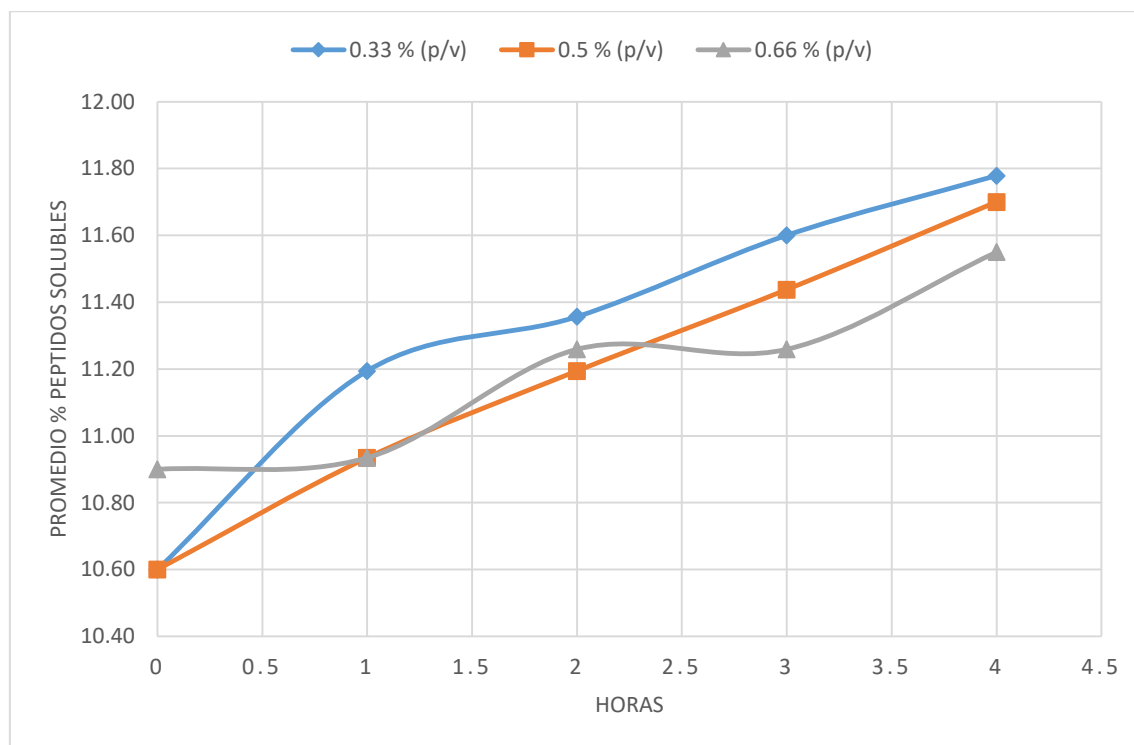


Figura 9: Incremento de péptidos solubles para tres concentraciones de proteasa

4.2.2 Segundo experimento: Determinación de temperatura de hidrólisis

En la tabla 6 se presentan los porcentajes de péptidos solubles para las tres temperaturas de la hidrólisis enzimática.

Omote (2012) trabajó con temperaturas de 50 °C, 60 °C y 70 °C, obteniendo un mayor incremento de péptidos solubles a 60 °C. Scribd (2007), citado por Peña (2008) añade que las enzimas tienen un correcto funcionamiento cuando éstas trabajan a su temperatura óptima, funcionando cerca al 100 %. Cuando la hidrólisis se trabaja por debajo de la temperatura óptima, la actividad enzimática decrece debido a que se reduce la movilidad de la molécula. Por otra parte, Kristinsson y Rasco (2000), indican que valores extremos

Tabla 6: Porcentaje de Péptidos solubles en tres temperaturas de hidrólisis

Tiempo en horas	Temperatura								
	H ₄ (50 °C)			H ₅ (60 °C)			H ₆ (70 °C)		
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
0	11	11,3	10,76	10,6	10,6	10,6	12	11,8	12
1	11,10	11,3	10,76	10,61	11,39	10,90	12	11,88	12,27
2	11,49	11,39	11,10	10,61	11,58	10,90	12,54	12,56	12,56
3	11,49	11,58	11,10	11,10	11,83	11,39	12,90	12,70	12,85
4	11,68	11,58	11,34	11,39	11,88	11,65	12,95	12,85	12,95

de temperatura tienen efecto perjudicial sobre las proteínas y péptidos. Mientras que Wiseman (1991) menciona que la estabilidad de la enzima se ve influenciada por la temperatura, en una forma similar a la desnaturalización. Solomon *et al.* (1996) añade que valores elevados también afecta la conformación molecular de la enzima, ya que se altera con el desdoblamiento de su estructura secundaria y terciaria, siendo común que la inactivación sea irreversible. Mientras Badui (2006) añade que la inactivación térmica ocasiona que la proteína pierda su capacidad catalítica. Además, Kristinsson *et al.* (2013) señalan que, durante el proceso de hidrólisis enzimática, las condiciones de la reacción pueden ser bastante severas debido a valores de temperatura y pH elevados. Debido a que, bajo esas condiciones, los ácidos grasos y los pro-oxidantes interactúan y la oxidación se desarrolla rápidamente teniendo un efecto negativo sobre la calidad del producto final, calidad organoléptica y valor nutricional.

Taghiouf *et al.* (2010) en la hidrólisis de vísceras de beluga determinaron la temperatura óptima a 50 °C. Mientras Ovissipour *et al.* (2009) obtuvieron buenos resultados en la hidrólisis de vísceras de esturión persa (*Acipenser persicus*) a 55 °C usando alcalasa. Además, Hoyle y Merrit (1994) quienes también usaron alcalasa realizaron la hidrólisis a una temperatura de 60 a 65 °C.

El ANVA para las temperaturas de hidrólisis 50 °C, 60 °C y 70 °C (ver Anexo 2) se observó que existe por lo menos un tratamiento diferente y mediante una prueba comparativa de medias LSD Fisher, se observó que existen diferencias significativas entre la temperatura de 50 °C respecto a las temperaturas de 60 °C y 70 °C, además entre estas 2 últimas

temperaturas no existen diferencias significativas respecto a sus medias. Por lo tanto, se eligió la temperatura de 60 °C como parámetro de trabajo, debido a que presentó una mayor media en el incremento de péptidos solubles durante la hidrólisis, además este valor coincide con la temperatura óptima de la enzima Protex 6 L reportada por Guadix (2001).

4.2.3 Tercer experimento: Determinación de una proporción de vísceras:agua

En la tabla 7 se presentan los porcentajes de péptidos solubles para las proporciones vísceras:agua 1:1, 1,33:1 y 2:1.

Tabla 7: Porcentaje de péptidos solubles en tres proporciones de víscera: agua

Tiempo en Horas	Proporción o ratio								
	H ₇ (1:1)			H ₈ (1,33:1)			H ₉ (2:1)		
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃
0	10,6	10,90	10,80	12,56	12,07	12,07	14	13,3	13,3
1	10,61	11,39	10,90	13,53	12,85	13,04	15	13,63	14
2	10,61	11,58	10,90	14,02	13,04	13,04	15,48	14,21	14,31
3	11,10	11,83	11,39	14,02	13,34	13,34	15,7	14,60	14,51
4	11,39	11,88	11,58	14,02	13,53	13,53	15,7	14,90	14,99

La proporción de agua añadida para la reacción de hidrólisis es de gran importancia, ya que según Rutherford y Gilani (2009), citados por Villamil *et al.* (2017), en la hidrólisis se consume una molécula de agua por cada enlace peptídico roto. Además, Mutilangi *et al.* (1996), citado por Pires y Batista (2013) señalan que la hidrólisis modifica la capacidad de las proteínas para absorber y unirse a las moléculas de agua.

Kristinsson y Rasco (2000) indican que, la hidrólisis de enlaces peptídicos permite incrementar el número de grupos ionizables (NH³⁺ y COO⁻), con un incremento en la hidrofobicidad y carga neta, y disminución del peso molecular de la cadena de polipéptidos. Además, Tahergorabi *et al.* (2014) mencionan que, a medida que las proteínas asumen una carga neta positiva o negativa, inician gradualmente interacciones electrostáticas con el agua (es decir, interacciones proteína-agua) y que debido al aumento de las interacciones proteína-

agua, las interacciones proteínas-proteínas hidrofóbicas disminuye. Por lo tanto, a medida que las moléculas de las proteínas se convierten más polares, mayor cantidad de agua se asocia alrededor de la superficie de la proteína y éstas se vuelven más solubles. Mientras, de Castro y Sato (2014), citados por Villamil *et al.* (2017) señalan que, un prolongado tiempo de hidrólisis produce proteínas y péptidos con bajo peso molecular, generando mayor exposición de grupos ionizables y polares sobre la superficie de la proteína y que mejora su capacidad para formar enlaces de hidrógeno con agua. Por otro lado, Kristinsson y Rasco (2000) mencionan que la alta producción de rendimiento del hidrolizado proteico de pescado fue asociado con su alta solubilidad en agua, debido a que el hidrolizado con bajo peso molecular tiene más oportunidades para formar enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua y grupos polares hidrofílicos de aminoácidos, incrementando así su solubilidad. Por lo tanto, para unirse eficazmente a moléculas de agua, los péptidos tienen que tener la capacidad de formar enlaces de hidrógeno entre sus grupos laterales de aminoácidos polares hidrofílicos y las moléculas de agua.

En la reacción de hidrólisis enzimática de pescado, Kalidas *et al.* (2006), citado por Suarez (2010) y también Benjaku y Morrissey (1997) emplearon la proporción 1:1 de pescado y agua. Del mismo modo en hidrólisis de subproductos de carpa y perca del Nilo, Bhaskar *et al.* (2008) y Patel (2014) utilizaron una proporción 1:1 de subproductos y agua para la reacción. Peña (2008) y Omote (2012) en la hidrólisis de pota, a una proporción 1:1 de materia prima y agua, obtuvieron incremento considerable de péptidos solubles. Por otro lado, Aranda (2012) determinó que la proporción 2:1 de materia prima y agua fue la mejor para obtener mayor aceite crudo en una hidrólisis enzimática de anchoveta. Mientras que Taheri *et al.* (2012) utilizaron una proporción de vísceras de trucha junto a subproductos de pollo y agua de 1:2 y que luego fueron homogenizados para proseguir su hidrólisis enzimática.

En el ANVA (ver Anexo 2) se observó que existen diferencias en las medias de los 3 tratamientos y mediante la prueba de comparación de medias (LSD Fisher), se observó que existen diferencias significativas en cada uno de los 3 tratamientos. Por lo tanto, se decidió tomar como parámetro de trabajo emplear la proporción 2:1 de vísceras y agua, debido presentó una mayor media en el incremento de péptidos solubles.

Luego de realizar el primer, segundo y tercer experimento. Los parámetros para la obtención de un hidrolizado enzimático fueron los siguientes: concentración de proteasa Protex 6 L a 0,33 % (p/v), pH 9, temperatura de 60 °C, vísceras y agua en la proporción 2:1 y una duración de 4 horas.

4.2.4 Cuarto experimento: Determinación de proporciones de melaza y Bio-Lac

En la fermentación láctica de pescado y sus subproductos tenemos que Hasan (2003) realizó una fermentación láctica en caballa (*Rastreliger brachysoma*) a 30 °C, usando como inóculo *Lactobacillus plantarum* y empleó la proporción: 80 % pescado picado, 15 % melaza y 5 % *L. plantarum*. Obteniendo la misma proporción usando como inóculo *Lactobacillus pentosus*. Mientras que usando como inóculo un líquido fermentado de brote de bambú utilizó la proporción: 70 % pescado picado, 15 % melaza y 15 % inóculo. Esta última proporción es igual a lo reportado por García (2008), quien obtuvo buenos resultados en fermentación homoláctica de residuos de pescado usando como inóculo Bio lac con la diferencia que utilizó una temperatura de 40 °C.

Respecto a la fermentación láctica de subproductos de pescado Berenz (1997) utilizó como inóculo *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* obtuvo un ensilado de residuos de pescado utilizando las siguientes proporciones: 86 % residuos de pescado cocido y molido, 3 % inóculo, 10 % melaza, 1 % sacarosa. También usó la proporción: 82.5 % residuos de pescado cocido y molido, 10 % inóculo y 7,5 % sacarosa. Mientras que Martínez (2003) en la fermentación láctica de vísceras de coporo (*Prochilodus mariae*), bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) y cajaro (*Phractocephalus hemiliopterus*) empleó 78,75 % de vísceras de pescado, 15 % de melaza y 5 % de inóculo (lactobacilo + estreptococo).

En la figura 10 se presenta el comportamiento de los valores de pH e índice de acidez titulable para los tratamientos T₅ (10 % melaza y 10 % Bio Lac), T₉ (15 % melaza y 15 % Bio Lac) y T₁₂ (20 % melaza y 15 % Bio Lac) desde el primer día hasta el décimo día de incubación.

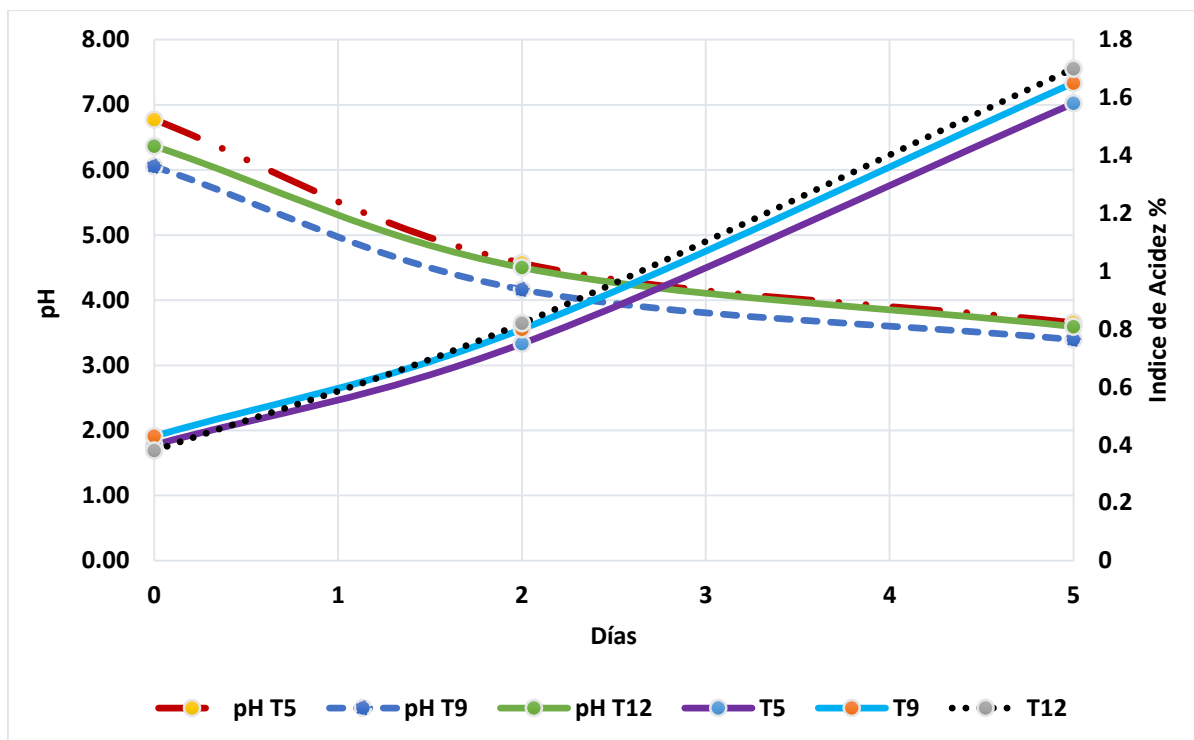


Figura 10: Comportamiento del pH e índice de acidez titulable durante la fermentación homoláctica de las vísceras hidrolizadas de trucha

En la figura 10 se observa el descenso de pH para los 3 mejores tratamientos. Es así que el pH en el quinto día para el T₅ fue de 3,66, mientras que para el T₉ fue de 3,4 y para el T₁₂ fue de 3,6. Berenz (1997) reportó un valor de pH cercano a 4 para el cuarto día. De igual manera Hasan (2003) reportó un valor de pH de 3,94 para el cuarto día y se mantiene igual hasta el séptimo día. Mientras Martínez (2003) obtuvo un pH cercano a 4,5 para el quinto día. De igual manera Spanopoulos *et al.* (2010) obtuvieron un pH alrededor de 4,5 para el cuarto día en la fermentación de desechos del fileteado de tilapia con *Lactobacillus casei* a 3 % (v/p) y 15 % de melaza y además añaden que otros autores han reportado que ensilados elaborados a partir de subproductos de pescado alcanzan la estabilidad a un pH alrededor de 4,5.

Sastro *et al.* (2013) señalan que en los sistemas de fermentación microbiana la disminución del pH es debido a la adición de una fuente de carbono y se encuentra asociada con la producción ácidos orgánicos por microorganismos como bacterias lácticas.

Zhuang *et al.* (1996), citados por Dao y Kim (2011) señalan que la conservación a largo plazo de los fertilizantes líquidos es necesaria para alcanzar un valor más alto. Por lo tanto, es importante mantener la calidad de un fertilizante líquido durante el período que se encuentre en circulación. En general, un pH más bajo indica una menor probabilidad de que los microorganismos crezcan y ocasionen deterioro. Entre los métodos para retardar el deterioro, la adición de ácidos orgánicos es eficaz debido a sus efectos bacteriostáticos. Tal es el caso de Ahmed y Mahendrakar (1996) quienes realizaron la fermentación de vísceras de pescado usando 10 % melaza y 0,5 % de ácido propiónico y registraron un pH de 4 al segundo día, valor que decreció lentamente hasta el octavo día con un valor cercano a 3,5. El descenso fue más rápido y brusco debido al ácido orgánico utilizado.

En la figura 10 también se observa el leve incremento en el índice de acidez titulable para los tratamientos T₅, T₉ y T₁₂ con valores alrededor de 1,6 a 1,8 para el quinto día. Ahmed *et al.* (1996) encontraron que la disminución en el pH esta correlacionada con el crecimiento de bacterias ácido lácticas presentes en el ensilado y productoras de ácido láctico en el proceso de fermentación láctica.

Sandine (1979) citado por Berenz (1997) señala que los cambios en la acidez se producen por las concentraciones de inóculo e incluso sin añadir inóculo, ello sucede debido a que los microorganismos que se encuentran de forma natural en vísceras de pescado, insumos, manipuleo, etc, son también productores de acidez. Es importante señalar que Carvajal (1997), citado por Peña (2008) quien elaboró un ensilado a partir de residuos de pescado, menciona lo crucial que es adicionar una fuente de carbohidratos, dado que el pescado presenta un bajo contenido de azúcares.

Martínez (2003) determinó un índice de acidez titulable (utilizando vísceras como sustrato) cercano a 1,5 % para el quinto día. Mientras que Spanopoulos *et al.* (2010) obtuvieron una acidez en el cuarto día cercano a 1 % y 2 % empleando 12 % y 15 % de melaza respectivamente. En el presente trabajo se obtuvo un valor similar a lo reportado por Martínez.

En cuanto a la evaluación física y organoléptica se emplearon las tablas de calidad de ensilado propuesta por Bertullo (1989) y parámetros de análisis sensorial empleada por

Holguín *et al.* (2009) (ver Anexo 1). Donde el olor para T₅, T₉ y T₁₂ fue dulce con suave olor a aceite de pescado, el color fue amarronado y la consistencia fue líquida. Al respecto, Sastro *et al.* (2013) señalan que el olor típico en la fermentación es influenciado por el contenido de la fuente de carbono. Mientras que los tratamientos cuyo contenido de melaza fue de 5 % presentaron mayor formación de gas, lo cual generó un olor fuerte, además, la presencia de fracciones de gas en el sistema de fermentación es ocasionada por la disminución del contenido de nitrógeno.

En la tabla 8 se presenta las mediciones de pH en el quinto día de fermentación homoláctica. El proceso de fermentación tuvo una duración total de 10 días donde se verificó la estabilidad del producto.

En la tabla 8 se observa que para el quinto día de incubado el tratamiento con 5 % de melaza y 5 % de Bio Lac (T₁) presentó el mayor valor de pH promedio, el cual fue de 3,91 seguido del tratamiento con 5 % de melaza y 10 % de Bio Lac (T₄) con un valor de pH promedio de 3,87. Los demás tratamientos presentaron una variación de 0,36 comparando el mayor siguiente con el menor.

El ANVA para la fermentación homoláctica luego de transcurrido cinco días (ver Anexo 3), indicó que no existe interacción entre los factores: Melaza y Bio Lac. Sin embargo, existe el efecto de la proporción de melaza añadida, así como también de la proporción de Bio Lac. Por lo tanto, ambos factores fueron analizados por separado. La prueba comparativa de medias (LSD Fisher) para la cantidad de melaza presentó diferencias significativas entre las proporciones 5 %, 10 % y 15 %, además de no haber diferencias entre las proporciones de 15 % y 20 %, así como también entre el 20 % y 10 %. Al respecto, García (2008) indica que utilizando proporciones de melaza al 10 o 15 % se

Tabla 8: Valores de pH en el quinto día de la fermentación homoláctica de vísceras hidrolizadas de trucha

Tratamiento	Factor 1	Factor 2	R ₁	R ₂	R ₃	pH Promedio
	% (p/p) Melaza	% (p/p) Bio Lac	pH	pH	pH	
T ₁	5	5	3,91	3,92	3,9	3,91
T ₂	10	5	3,76	3,87	3,64	3,76
T ₃	15	5	3,60	3,74	3,45	3,60
T ₄	5	10	3,87	3,74	4	3,87
T ₅	10	10	3,66	3,66	3,65	3,66
T ₆	15	10	3,55	3,67	3,43	3,55
T ₇	5	15	3,69	3,82	3,55	3,69
T ₈	10	15	3,59	3,7	3,47	3,59
T ₉	15	15	3,40	3,49	3,3	3,4
T ₁₀	20	5	3,64	3,75	3,53	3,64
T ₁₁	20	10	3,64	3,63	3,65	3,64
T ₁₂	20	15	3,60	3,94	3,33	3,62

obtiene un olor más suave, además de que se garantiza la producción de ácido láctico añadiendo al menos 10 %. Mientras que para la proporción de inóculo de bacterias ácido lácticas (Bio Lac), no se encontraron diferencias significativas para las proporciones de 10 % y 15 %. Peña (2008) determinó que utilizando proporciones de 10 % y 15 % de Bio Lac y 10 % de melaza se obtienen a valores de pH bajos y buenos resultados en estabilidad en corto tiempo. Por lo tanto, se eligieron como parámetros de trabajo la proporción de 10 % (p/p) de melaza y 10 % (p/p) de inóculo en la operación de mezclado, debido que la finalidad fue emplear la mayor cantidad de subproducto.

3.5.6 Quinto experimento: Determinación de fitotoxicidad aguda del biofertilizante líquido

Finalizado el bioensayo se registró la totalidad de germinación de semillas, donde se observó que el biofertilizante al 100 % y diluido al 10 % no ocurrió germinación debido al pH bajo de 3,9 y 4,02 respectivamente y una conductividad eléctrica de 24,2 dS/m y 0,8 dS/m.

En la tabla 9 se presentan los valores de pH y conductividad eléctrica (CE) para cada una de las diluciones y el control.

Tabla 9: Valores de pH y conductividad eléctrica (CE) para diferentes concentraciones de biofertilizante

Dilución (%)	pH	CE (dS/m)
Control	6,5	0,07
0,001	6	0,084
0,01	6	0,084
0,1	4,7	0,09
1	4,3	0,18
10	4,02	0,8
100	3,9	24,2

García (2008) realizó una prueba de fitotoxicidad en residuos de pescado fermentados homolácticamente en semillas de maíz y encontró que a medida que la dilución es aumentada del fertilizante, se incrementa el pH, mientras que la CE disminuye. Este comportamiento se observa en la tabla 16. El pH del biofertilizante de vísceras de trucha fue de 3,9 al 100 % y llega a un pH de 6 cuando es diluido en la relación biofertilizante:agua de 1:1000. Al respecto, Gostincar (1998) menciona que el pH óptimo de las plantas varía según el tipo de cultivo, pero generalmente oscila entre 6 y 7,5. Padilla (2007) añade que la disponibilidad máxima para la mayoría de nutrientes se da en este rango. Mientras Alvarado *et al.* (2001) señalan que el rango de pH para el sistema de crecimiento de lechugas es aceptable de 5,6 a 6, siendo 5,8 considerado como óptimo. Además, cabe indicar que Arnon y Johnson (1942) determinaron que el crecimiento óptimo de la lechuga se da a pH 6. Es por ello que las diluciones de 0,001 % y 0,01 % se encuentran dentro del rango aceptable con un pH de 5,9 y 5,64 respectivamente.

Respecto a la conductividad eléctrica en la tabla 16 se observa que el biofertilizante obtenido presenta una CE de 24 dS/m, valor considerado como muy fuertemente salino (ver Anexo 4). Bechtel (2003) reportó una C.E promedio de 7,8 dS/m para las vísceras de salmón,

abadejo y bacalao. Padilla (2007) señala que una CE alta se debe a la presencia de sales solubles, que consisten principalmente de cloruros y sulfatos de Na, Ca y Mg con cantidades menores de bicarbonatos, nitratos y boratos de K y a veces de Li. Además, añade que conforme se produce el incremento de las sales en el suelo, se hace más difícil para las raíces de las plantas absorber agua. Además de que muchos cultivos sensitivos a las sales presentan síntomas de insuficiencia hídrica con sus hojas recogidas y también existe un progresivo decrecimiento en su desarrollo.

La CE para las diluciones de 10 a 0,001 % presentan un valor menor a 1 dS/m. Al respecto De Pascale y Barbieri (1995) citados por Al-Maskri *et al.* (2010) categorizan la lechuga como moderadamente tolerable a la sal y mencionan además que niveles de salinidad superiores a 2 dS/m y 2.6 dS/m reduce el rendimiento de la lechuga y el crecimiento de las plantas respectivamente.

En la tabla 10 se presenta los resultados obtenidos de: porcentaje de germinación relativo de semillas (PGR), el crecimiento relativo de la radícula (CRR) y el índice de germinación (IG) para semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) variedad Duett.

Tabla 10: Número de semillas germinadas, elongación de radícula, PGR, CRR e IG

	Promedio N° semillas germinadas	PGR (%)	Elongación de radícula (mm)	CRR (%)	IG (%)
Control	20,00	-	17,59	-	-
0,001%	19,66	98,33	23,84	135,56	133,16
0,01%	20,00	100,00	23,60	134,13	134,13
0,1%	20,00	100,00	22,71	129,10	129,10
1%	19,66	98,33	11,04	62,76	61,77
10%	0	0	0	0	0
100%	0	0	0	0	0

Paradelo *et al.* (2008) menciona que el crecimiento de la radícula es el parámetro más sensitivo usado para calcular el índice de germinación. Las diluciones 0,001 % y 0,01% presentan un pH y C.E. aceptables para el crecimiento, valores corroborados en los resultados presentados. Además, en la tabla 10 se observa que los mayores valores promedio

de elongación de radícula con 23,84 mm y 23,6 mm, CRR de 135,54 % y 134,13 % además de IG de 133,16 % y 134,13 % corresponden a las diluciones de 0,001 % y 0,01 % respectivamente. Zucconi *et al.* (1981), citado por Varnero *et al.* (2007) señalan que un IG mayor a 80 % indica la ausencia de sustancias fitotóxicas o que se encuentran en muy baja concentración. Se observa además que la dilución a 0,1 % con un IG de 129,1 % también se encuentra libre de sustancias que afecten la germinación de semillas. Mientras que la dilución al 1 % presento un IG de 61,77 % e indica la presencia moderada de sustancias fitotóxicas. En la figura 10 se ilustra las comparaciones de IG para todas las diluciones realizadas.

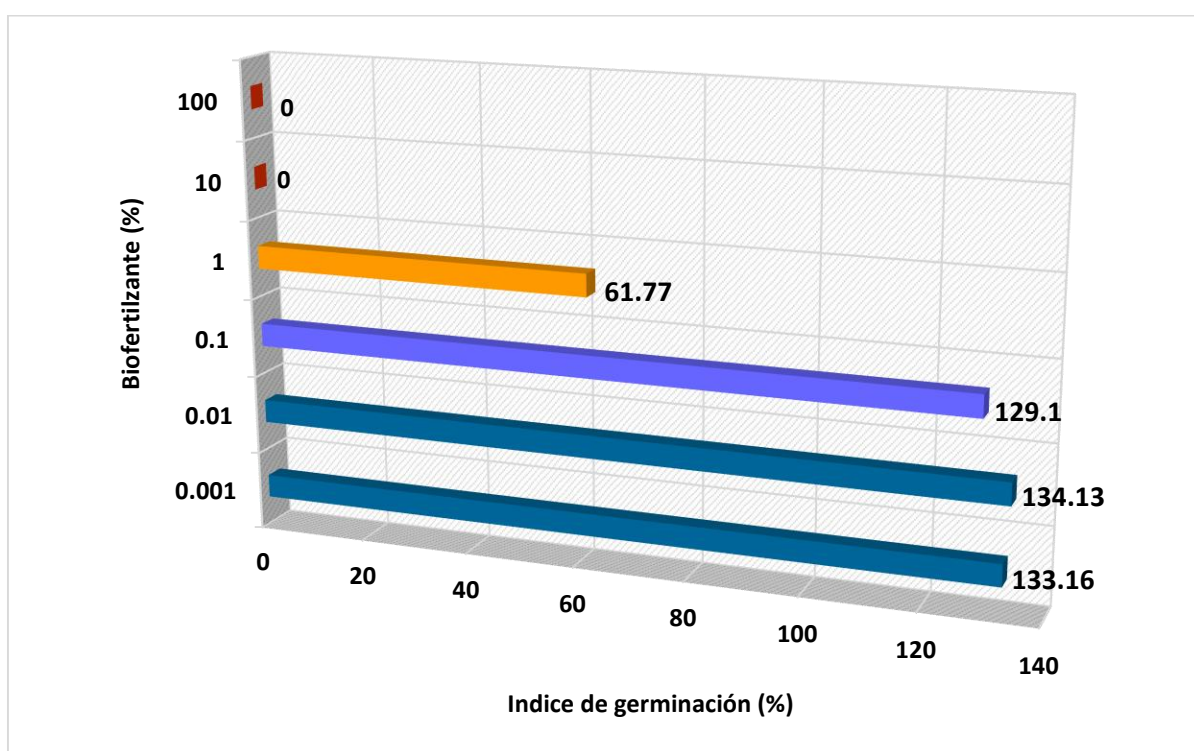


Figura 11: Comparación del índice de germinación y diluciones del biofertilizante

En la comparación del IG para cada dilución del biofertilizante, se observó que el IG es similar de 0,1 a 0,001 %, por lo tanto, diluyendo a una concentración 0,1 % del Biofertilizante, no se presentaron componentes tóxicos que inhiban el desarrollo en la germinación de semillas de lechuga.

Kim *et al.* (2010) elaboraron un fertilizante líquido a partir de residuos de pescado y realizaron una prueba de fitotoxicidad en *Lepidium sativum* donde la dilución del fertilizante aumentada en 500 veces obtuvo un IG aproximado de 60 %, la dilución aumentada a 1000 veces (0,001 %) obtuvo un IG cercano a 80 % y dos fertilizantes líquidos comerciales para horticultura de Corea del Sur obtuvieron un IG aproximado de 60 % y 80 % a una dilución de 0,001 %. Mientras Jung y Kim (2016) elaboraron un biofertilizante a partir de efluentes del procesamiento de caballa y realizaron un ensayo de fitotoxicidad en semillas de frijol rojo donde a una dilución de 0,01 % y 0,001 % veces se obtuvo un IG cercano a 90 % y 120 % respectivamente.

Cárdenas (2014) elaboró un fertilizante a partir de vísceras de pollo y realizó un ensayo de fitotoxicidad en semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) donde para la dilución de 1 %, 0,1 % y 0,01 % obtuvieron un IG de 93 %, 121 % y 129 % respectivamente.

4.3 CARACTERIZACIÓN DEL BIOFERTILIZANTE

4.3.1 Análisis físico químico

Los resultados de la composición físico química del biofertilizante líquido es mostrado en la tabla 11.

En la tabla 11 el valor de pH y C.E. fue de 4,01 y 21,1 dS/m respectivamente y se encuentran clasificados según De la Rosa (2012) como “extremadamente ácido” y “muy fuertemente salino” (Ver Anexo 4). Ito (2006); Segura (2002), citados por Criollo *et al.* (2011) señalan que cuando el pH permanece cercano a 4,2, la fermentación tiende a estabilizar la solubilidad de los elementos nutricionales de la planta, permitiendo una mejor disponibilidad de los nutrientes.

En la tabla 11 también se reportó 200,47 g/L de sólidos en suspensión y 130,84 g/L de materia orgánica en suspensión. Peña (2008) menciona que la materia orgánica (M. O.) no puede liberar el nitrógeno (N), fósforo (P), azufre (S) y micronutrientes en forma química para que la planta pueda absorberlos. Herrera (2000) añade que es mediante los

Tabla 11: Análisis físico químico del fertilizante de vísceras de trucha

Parámetros	Biofertilizante
pH	4,01
Conductividad eléctrica CE (dS/m)	21,1
sólidos en suspensión (g/L)	200,47
Materia orgánica en suspensión (g/L)	130,84
Nitrógeno total (mg/L)	12057
Fosforo total (mg/L)	953
Potasio total (mg/L)	4230
Calcio total (mg/L)	663
Magnesio total (mg/L)	550
Sodio total (mg/L)	2817
Hierro (mg/L)	52,00
Cobre (mg/L)	25,17
Zinc (mg/L)	48,08
Manganeso (mg/L)	1,47
Boro (mg/L)	2,59

procesos de inmovilización (asimilación de elementos minerales por la biomasa microbiana) y mineralización (conversión de las formas N, P, S entre otros a sus formas inorgánicas) que la M. O. libera estos nutrientes y sirve de pegamento para arcillas y su aglomeración, los cuales dejan espacios libres en el suelo, lo que permite el intercambio de gases y retiene los elementos (Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^{+1} , NH^{+4} , Mn^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} entre otros) para las plantas.

En la tabla 12 se comparó el resultado del análisis físico químico registrado en la tabla 11 con otros fertilizantes orgánicos líquidos obtenidos a partir de diferentes recursos hidrobiológicos, así como también de sus subproductos.

Tabla 12: Análisis físico químico de fertilizantes partir de recursos hidrobiológicos

Parámetros	Fuente de fertilizante líquido										
	Pota ⁽¹⁾	Residuos de pescado ⁽²⁾	Residuos de pescado ⁽³⁾	Biol de residuos de trucha ⁽⁴⁾	<i>Ulva reticulata</i> ⁽⁵⁾	Subproductos de pescado ⁽⁶⁾	Caldo fermentado residuos de pescado ⁽⁷⁾	Comercial			vísceras de trucha ⁽¹⁰⁾
								1 ⁽⁸⁾	2 ⁽⁸⁾	3 ⁽⁹⁾	
pH	4,3	3,6	4,35	6,18	7,02	4,2	-	-	-	3,9	4,01
C.E. (dS/m)	20,4	16,5	23,7	22,83	-	19	-	-	-	-	21,1
Sólidos en suspensión (g/L)	216,98	172,71	-	-	-	-	-	-	-	-	200,47
M.O. en suspensión (g/L)	186,28	148,42	-	24,07	-	-	-	-	-	-	130,84
N total (mg/L)	16800	9485	20000	3222	-	10000	15700	48300	38000	0,07	12057
P total (mg/L)	1222	310	3600	399,94	-	3900	3100	28600	28300	3,22	953
K total (mg/L)	8160	3296	7800	1322,49	175,2	3700	4500	21000	30400	7,67	4230
Ca total (mg/L)	1520	1672	7300	5045,83	158,52	1400	-	-	-	1,67	663
Mg total (mg/L)	864	696	1300	248,41	108,25	5200	-	-	-	597	550
Na total (mg/L)	2280	1072	2100	416,25	295,08	-	-	-	-	-	2817
Fe (mg/L)	64,8	30	41,1	-	5,22	50,51	-	-	-	5,54	52
Cu(mg/L)	6,4	2,25	3,3	-	1,25	0,61	-	3,24	2,24	-	25,17
Zn (mg/L)	16,8	4,2	4,9	-	1,25	5,66	1,72	4,39	3,51	-	48,08
Mn (mg/L)	2,4	2,4	1,78	-	-	2,81	-	-	-	3,29	1,47
B (mg/L)	132,9	21	9,05	-	-	-	-	-	-	-	2,59

(1) Fertilizante de pota hidrolizada (Peña 2008). (2) Biofertilizante de residuos hidrolizados de pescado (Bossio, 2007). (3) Fertilizante de residuos de pescado sin hidrolizar (García, 2008). (4) Biol de residuos de trucha mediante una digestión anaerobia (Salvador y Sánchez, 2015). (5) Fertilizante líquido de *Ulva reticulata* (Selvam y Sivakumar, 2013). (6) Fertilizante líquido de subproductos de pescado de la familia *Clupeidae* (Aranganathan y Rajasree, 2016). (7) Fertilizante líquido a partir de caldo fermentado de residuos de pescado (Kim *et al.*, 2010). (8) Fertilizante líquido comercial para la horticultura en Corea del sur (Kim *et al.*, 2010). (9) Fertilizante líquido comercial en Indonesia (Sastro *et al.*, 2013). (10) Biofertilizante de vísceras de trucha evaluado al décimo día.

En la tabla 12 se observa que los macronutrientes N, P y K del biofertilizante de vísceras de trucha fueron de 12 057 mg/L, 953 mg/L y 4 230 mg/L respectivamente, estos valores fueron mayores a los reportados por Bossio (2007) pero menores a los reportados por Peña (2008). Por otra parte, Hwang *et al.* (2015) mencionan que las concentraciones de N, P y K de los fertilizantes líquidos comerciales tienen un valor alrededor de 1000 a 2000 mg/L.

Respecto al contenido de micronutrientes se observó que el contenido de Cu y Zn fueron de 25,17 mg/L y 48,08 mg/L respectivamente y fueron mayores que los valores reportados por Bossio (2007) y Peña (2008). El contenido de Fe fue de 52 mg/L, este valor es mayor que el fertilizante obtenido por Bossio (2007) y ligeramente menor que el de Peña (2008). García (2008) reportó un contenido mayor de macro y micronutrientes en la fermentación homoláctica de residuos de pescado, donde se empleó mayor cantidad de subproductos y obtuvo mayor rendimiento al no agregar agua a diferencia de los tres fertilizantes antes mencionados, los cuales fueron elaborados por una hidrólisis enzimática seguido de una fermentación homoláctica. Molina (2002), citado por Criollo *et al.* (2011) indica que el pH influencia la solubilidad de los productos y la disponibilidad de nutrientes para ser absorbidos y que con valores de pH ligeramente ácidos hay una mayor disponibilidad de elementos como N, P, S, Cu, Zn y Fe, mientras que cuando las condiciones son moderadas o básicas, los precipitados son difíciles de absorber.

Salvador y Sánchez (2015) elaboraron un biol, el cual se obtuvo a partir de la digestión anaerobia a partir de residuos de trucha. Y presentó un contenido de macronutrientes menor a los demás fertilizantes. Sin embargo, presentó un contenido de Ca de 5 045 mg/L el cual fue mayor a lo reportado por Bossio (2007), Peña (2008) y al biofertilizante de vísceras de trucha. Ello se debió a que los subproductos usados por Salvador y Sánchez (2015) están conformados por vísceras, cabeza, esquelón y piel, los cuales son una gran fuente de calcio.

Así mismo, se observó que el biofertilizante obtenido presentó mayor contenido de micronutrientes que el fertilizante líquido de *Ulva reticulata*. Al respecto Selvam y Sivakumar (2013) realizaron una prueba con dicho fertilizante en lenteja negra (*Vigna mungo*), para ello sembraron las semillas en el suelo y se añadió una concentración de 2 % del fertilizante líquido, el cual fue aplicado como un spray foliar. Además, señalan que con

una concentración de 2 % se maximiza el crecimiento y rendimiento de *V. mungo*, así como también se incrementa el número de estomas en la hoja.

El biofertilizante de vísceras de trucha obtuvo un contenido de N y K mayor a lo reportado por Aranganathan y Rajasree (2016) quienes elaboraron un fertilizante líquido a partir de subproductos de pescado de la familia *Clupeidae* y cuyo contenido de N y K fue de 10000 mg/L y 3700 mg/kg respectivamente (tabla 19). Sin embargo, el contenido de P con 3 900 mg/kg fue mayor que el biofertilizante obtenido. Por otra parte, Kim *et al.* 2010 obtuvieron un fertilizante líquido a partir de la fermentación de un caldo de residuos de pescado cuyo contenido de N, P y K fue de 15700 mg/L, 3100 mg/L y 4500 mg/kg respectivamente (tabla 19). Estos valores fueron mayores a los obtenidos en el biofertilizante de vísceras de trucha. Los mismos autores también reportaron el contenido de N, P y K de 2 fertilizantes líquidos comerciales para la horticultura que son vendidos en Corea del Sur. Dichos valores fueron mayores al resto de fertilizantes elaborados a partir de diferentes subproductos y residuos de recursos hidrobiológicos. Sin embargo, el biofertilizante obtenido presentó un contenido de macronutrientes (con excepción del Mg) mayor que el fertilizante líquido comercializado en Malasia que fue reportado por Sastro *et al.* 2013.

4.3.2 Composición de aminoácidos del biofertilizante

En la tabla 13 se compara la composición y contenido de aminoácidos (g/100 g) entre el biofertilizante vísceras de trucha y diferentes fertilizantes comerciales.

Hayes y Flower (2013), citados por Villamil *et al.* (2017) mencionan que los diferentes músculos y tejidos de pescado están compuestos por proteínas estructurales, miofibrilares y sarcoplásmicas que contienen todos los aminoácidos esenciales, entre los que predominan la lisina, fenilalanina y valina. La presencia de estos 3 aminoácidos es corroborada en la tabla 20 junto a otros 13 aminoácidos.

Tabla 13: Aminoácidos en el biofertilizante de vísceras de trucha y otros fertilizantes

Aminoácido (g/100 g)	Fuente de fertilizante líquido							
	Caldo fermentado de residuos de pescado ⁽¹⁾	Comercial 1 ⁽²⁾	Comercial 2 ⁽²⁾	Residuos harina de pescado ⁽³⁾	Stimplex- G ⁽⁴⁾	Vitamar Excel ⁽⁵⁾	Goémar ⁽⁶⁾	Vísceras de trucha ⁽⁷⁾
Ácido aspártico	0,49	0,9	0,58	1,21	0,88	0,53	0,31	0,22
Treonina	0,21	0,23	0,21	0,24	-	-	0,18	0,17
Serina	0,21	0,21	0,23	0,21	-	0,27	0,18	0,24
Acido glutámico	0,78	2,96	0,89	0,98	1,16	0,71	1,29	0,35
Prolina	0,5	0,09	0,61	1,94	0,79	0,25	0,19	-
Glicina	1,06	0,31	1,25	1,38	0,88	0,3	0,25	0,09
Alanina	0,7	1	0,98	0,66	0,71	0,34	0,31	0,4
Valina	0,17	0,39	0,24	0,24	0,62	0,27	0,19	0,19
Isoleucina	0,15	0,28	0,13	0,2	0,37	0,26	0,14	0,15
Leucina	0,27	0,42	0,26	0,31	-	0,38	0,28	0,36
Tirosina	0,07	0,17	0,05	0,38	0,42	-	0,1	0,11
Fenilalanina	0,18	0,22	0,18	0,91	0,56	-	0,19	0,15
Histidina	0,2	0,28	0,25	0,9	-	-	0,07	0,07
Lisina	0,39	1,54	0,53	2,04	0,25	0,3	0,15	0,31
Arginina	0,31	0,23	0,35	0,18	-	0,22	0,22	0,8
Cisteína	0,06	-	0,04	0,15	-	-	0,04	-
Metionina	0,06	-	0,01	0,61	0,25	0,11	0,05	0,11
Triptófano	0,02	-	0,02	-	-	-	0,016	0,08

(1) Fertilizante líquido de caldo fermentado de residuos de pescado (Kim *et al.*, 2010). (2) Fertilizante líquido comercial para la horticultura en Corea del sur (Kim *et al.*, 2010). (3) Fertilizante líquido a partir de biodegradación aerobia de efluentes de harina de pescado (Kim *et al.*, 2007). (4) Fertilizante de extracto de macroalgas (Química Suiza Industrial del Perú S.A., 2012, citado por Layten, 2015). (5) Fertilizante de extracto hidrolizado de algas marinas (Aris Industrial, 2012, citado por Layten, 2015). (6) Fertilizante foliar a base de macroalgas (Augier y Santimone, 1978). (7) Biofertilizante a partir de vísceras de trucha.

En la tabla 13 se observa que el contenido total de aminoácidos producidos en esta investigación fue de 3,8 g/100g de muestra y está conformado por 17 aminoácidos a excepción de cisteína. Mientras Kim *et al.* (2010) y Gwon y Kim (2012) obtuvieron 5,71 g/100 g y 5,9 g/100 g de muestra respectivamente. Además, Augier y Santimone (1978) y Layten (2015) reportaron el contenido total de aminoácidos para los fertilizantes comerciales a base de macroalgas: Goémar, Simplex G y Vitamar cuyos valores fueron de 4,1 g/100 g, 6,8 g/100 g y 3,9 g/100 g respectivamente. Mientras Kim *et al.* (2010) señalan que los fertilizantes líquidos para la horticultura tienen un contenido total de aminoácidos de 9,2 g/100 g y 6,81 g/100 g. Todos estos fertilizantes orgánicos presentaron un contenido de aminoácidos menor a 10 g/100 g. Siendo el biofertilizante obtenido en esta investigación el que reportó un menor contenido y cercano al fertilizante Vitamar Excel y Goémar.

He *et al.* (2012), citados por Jung y Kim (2016) indican que aminoácidos como histidina, tirosina, metionina y cisteína poseen actividad antioxidante. Además, Virtanen *et al.* (2007), citados por Jung y Kim (2016) mencionan que aminoácidos hidrofóbicos, incluyendo valina, leucina, fenilalanina y triptófano exhiben gran potencial antioxidante. Respecto al triptófano Augier y Santimone (1978) mencionan que su presencia (incluso en pequeña cantidad) es considerado como un precursor del ácido indol-3-acético, hormona de crecimiento bien conocida en las plantas. Yang y Hoffman (1984); Smith (1985); Franco (2004), citados por Vega (2014) señalan que aminoácidos como metionina y lisina son conocidos como precursores de la síntesis de poliamidas e intervienen en la regulación de procesos fisiológicos fundamentales, desde la germinación y senescencia floral hasta la maduración del fruto. Mientras Reyes, 2004, citado por Vega (2014) menciona que los aminoácidos aplicados en mezcla con algunos nutrientes, aumenta su eficiencia. La glicina y ácidos glutámico son conocidos por ser agentes quelante muy eficaces y además penetran más fácilmente en las células de la planta (Priya Chemicals, 2014, citado por Vega).

Frassetto *et al.* (2010), citados por Rickli y Peres (2016) mencionan que los aminoácidos actúan como estimuladores del metabolismo, y se incorporan rápidamente en las vías metabólicas, estimulando la síntesis de proteínas, mejoran el transporte y almacenamiento de nitrógeno, siendo asimilado por las plantas en forma de nitrato (NO_3^-) y de amonio (NH_4^+). Además, Dotta *et al.* (2008); Xavier Goulart (2008); Frassetto *et al.* (2010), citados por Rickli y Peres (2016) mencionan que estudios relacionados con el uso de

aminoácidos presentes en biofertilizantes muestran que cuando se aplica vía foliar o radicular a través de la promoción de enraizamiento, son responsables del desarrollo adecuado de la planta.

4.3.3 Análisis microbiológico

Se realizó un análisis microbiológico con la finalidad de comprobar la presencia de coliformes totales y fecales, *E. coli*, aerobios mesófilos y termófilos, *Salmonella* sp, *Pseudomonas* sp y *Staphylococcus aureus*. Además, se determinó la cantidad de *Lactobacillus*, mohos y levaduras. Los resultados son presentados en la tabla 21.

En la tabla 14 se observa la ausencia de coliformes totales y fecales, *E. coli*. Al respecto Leroi (2010) menciona que los procesos de eviscerado y fileteado del pescado puede haber una contaminación posterior debido a manipulaciones de operarios. También se reporta la ausencia de *Staphylococcus* sp. y *Pseudomonas* sp. en el biofertilizante obtenido.

Tabla 14: Análisis microbiológico del biofertilizante

Análisis microbiológico	Resultados
Recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC/mL)	$1,5 \times 10^7$
Recuento de mohos y levaduras (UFC/mL)	$5,9 \times 10^3$
Recuento de aerobios mesófilos (UFC/mL)	$5,6 \times 10^6$
Recuento de aerobios termófilos (UFC/mL)	$1,5 \times 10^5$
Enumeración <i>Staphylococcus aureus</i> (NMP/mL)	< 3
Enumeración de coliformes totales (NMP/mL)	< 3
Enumeración de coliformes fecales (NMP/mL)	< 3
Enumeración de <i>Escherichia coli</i> (NMP/mL)	< 3
Enumeración de <i>Pseudomonas</i> sp. (NMP/mL)	< 3
Detección de <i>Salmonella</i> sp. en 25 mL	Ausencia

Nota: Los valores < 3 indica ausencia de microorganismos

Ahmed y Mahendrakar (1996) reportan que la población microbiana (UFC/g víscera) en vísceras de pescado de aguadulce, la cual está conformada por: coliformes ($1,7 \times 10^7$), *E. coli* ($2,3 \times 10^6$), *Staphylococcus* sp. ($1,4 \times 10^7$), enterococos ($5,9 \times 10^7$), bacterias ácido lácticas ($8,5 \times 10^6$) y mohos junto con levaduras ($2,3 \times 10^6$). Amit *et al.* (2010) mencionan que gran número de microorganismos asociados con las vísceras de pescado de agua dulce decrecen durante la fermentación exceptuando los mohos y levaduras, lo cual es corroborado en la tabla 14. Además, añade que la reducción del pH en la fermentación láctica de subproductos de pescado implica la utilización de azúcar y la posterior producción de ácidos orgánicos que ayuda a prevenir el crecimiento de organismos causantes de la descomposición y degradación de las proteínas presentes en los subproductos empleados. Esto es confirmado por García (2008) quien añade que el ácido láctico genera los cambios de pH hacia la acidez originando condiciones que inhiben el desarrollo de bacterias putrefactivas y patógenas.

Respecto al recuento de bacterias ácido lácticas para el décimo día. En la tabla 14 se registró $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Al respecto Berenz (1997) reportó un recuento de $4,5 \times 10^9$ UFC/g al segundo día y decrece a $3,5 \times 10^8$ UFC/g transcurrido el tercer mes. Mientras Hasan (2003) reportó $1,9 \times 10^{10}$, 6×10^9 y $4,6 \times 10^7$ bacteria/g en el séptimo día, décimo quinto día y primer mes respectivamente. García (2008) presentó un recuento de $2,9 \times 10^5$ UFC/mL y $3,2 \times 10^6$ UFC/mL en el quinto y treintavo día respectivamente. Sastro *et al.* (2013) señalan que un fertilizante líquido elaborado mediante fermentación biológica contiene $8,7 \times 10^6$ UFC/mL de *Lactobacillus* sp. y un pH de 3.9. Al respecto Ito (2006), citado por Criollo *et al.* (2011) indica que la correlación entre el *Lactobacillus* sp. y el pH es importante, debido a que ocasiona la disminución del pH por la producción de ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta.

Siuta (2001) menciona que los productos probióticos deben contener al menos 1×10^6 UFC/mL para que de esta manera ejerza un impacto favorable en el huésped y debe mantener esta concentración durante toda la vida útil del producto. En la tabla 14 se observa que el producto obtenido supera dicho límite. Por ello se le puede denominar como producto probiótico. Y se podría considerar su aplicación en la alimentación animal.

Respecto al recuento de mohos y levaduras se registró $5,9 \times 10^3$ UFC/mL. Mientras que Sastro *et al.* (2013) indican que un fertilizante líquido elaborado mediante fermentación biológica

contiene $8,5 \times 10^6$ UFC/mL de levaduras. Faid *et al.*, 1994, citados por Kim *et al.* (2010) indican que la importancia de las levaduras y bacterias lácticas empleadas en la fermentación de residuos de pescado radica en la remoción de los olores fuertes a pescado. García (2008) menciona que es común encontrar presentes mohos y levaduras junto a las bacterias ácido lácticas, siendo responsables del olor característico a malta. Peña (2008) añade que la presencia de formación de gas puede deberse a las levaduras, los cuales son uno de los microorganismos más abundante en la melaza. Al respecto Sanjeev *et al.* (2013) menciona que las bacterias lácticas crecen en el rango de pH de 3,2 a 10,5, mientras los mohos tienen un rango de pH de 0 a 11 y las levaduras crecen a un pH de 1,5 a 8,5.

Finalmente se reportó $5,6 \times 10^6$ UFC/mL de aerobio mesófilos. Mientras que García (2008) reportó un recuento de $3,3 \times 10^4$ UFC/mL y $1,0 \times 10^5$ UFC/mL, Además añade que dichas bacterias son capaces de desarrollarse a 30 °C en condiciones aeróbicas. DIGESA (2003) indica los microorganismos aerobios mesófilos están relacionados con la vida útil y se permite hasta 5×10^5 UFC/mL de aerobios mesófilos para productos hidrobiológicos, no debiendo ser mayor a 10^6 UFC/mL.

El Real Decreto 506/2013 de España señala que el límite máximo de microorganismos para productos fertilizantes de origen orgánico no debe superar los siguientes niveles máximos de microorganismos: *Salmonella* debe estar ausente en 25 g de producto elaborado y *Escherichia coli* menor a 1000 NMP/g producto elaborado. En la tabla 14 se corroboró la ausencia de dichos microorganismos.

4.3.4 Análisis de metales pesados presentes en el biofertilizante

Paradelo *et al.* (2008) menciona que los vegetales asimilan Hg, Pb, Cd, Zn y Cu y los acumulan en partes comestibles a diferentes concentraciones. Debido a ello el Real Decreto 506/2013 de España señala que los productos fertilizantes elaborados con materias primas de origen animal no deben exceder los LMP (mg/kg) de metales pesados, límites que son presentados en la tabla 15, además se presentan los LMP (mg/kg) para compost según la normativa estadounidense, los LMP (mg/L) de la Ley Japonesa de control de fertilizantes y los valores de metales pesados (mg/L) en el biofertilizante obtenido.

Tabla 15: Análisis de metales pesados presentes en el biofertilizante

Metales pesados (mg/kg)	España ⁽¹⁾			USA ⁽²⁾		Japón ⁽³⁾	Biofertilizante ⁽⁴⁾
	Fertilizante (líquido)			Compost		Fertilizantes	
	Clase A	Clase B	Clase C	Tipo A	Tipo B		
Pb	45	150	200	150	500	100	0.6
Cd	0,7	2	3	3	20	5	0.16
Cr	70	250	300	210		500	2,29

(1) Real Decreto 506/2013. (2) Interim Guidelines for Compost Quality – W A State Dept of Ecology. 1994. (3) Ley Japonesa para control de fertilizantes (Hwang *et al.*, 2015). (4) Biofertilizante de vísceras de trucha.

En la tabla 15 se observa que las concentraciones de Pb, Cd y Cr en el biofertilizante obtenido se encontraron por debajo de los LMP del Real decreto Español y se encuentra en la clase A. También los valores obtenidos fueron menores a los LMP para compost según la normativa estadounidense y a la normativa propuesta por la Ley Japonesa de control de fertilizantes.

Cartaya *et al.* (2008) mencionan que los metales pesados no afectan el crecimiento de las plantas por una disminución significativa del potencial osmótico del sustrato, sino por su propia toxicidad. Un exceso de metales pesados o de sus quelatos solubles puede inducir una serie de alteraciones bioquímicas y fisiológicas, entre las que se encuentra la inhibición del crecimiento de la raíz.

Kim *et al.* (2010) reportaron 0,26 mg/kg de Cr y ausencia de Pb y Cd. Además, señalan que el contenido de metales pesados como Pb, Cd y Cr en 2 fertilizantes líquidos comerciales de Corea del Sur contienen 0,63mg/kg y 0,31 mg/kg de Pb, además de 0,08 mg/kg y 0,03 mg/kg de Cd y 3.54 mg/kg y 3.44 mg/kg de Cr. Estos valores fueron cercanos a los resultados obtenidos.

Dentro de las aplicaciones del biofertilizante, Nhut *et al.* (2006), citados por Dao y Kim (2011) mencionan que la hidroponía es una técnica de cultivo de plantas que proporciona un medio conveniente de estudiar la absorción de nutrientes por las plantas; además, el método está libre de variaciones confusas o incontrolables en el suministro de nutrientes del suelo.

Así también Nhut *et al.* (2004); Resh (1993), citados por Dao y Kim (2011) añaden que la hidroponía se puede utilizar para evaluar la viabilidad de los fertilizantes líquidos. En la actualidad, la hidroponía se considera como una técnica prometedora no sólo para los experimentos de fisiología vegetal, sino también para la producción comercial.

V. CONCLUSIONES

1. Se pudo elaborar un biofertilizante líquido con vísceras de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) mediante una hidrólisis enzimática seguido de una fermentación homoláctica.
2. El flujo de proceso para la elaboración del biofertilizante de vísceras de trucha fue: vísceras de trucha - molido - mezclado - hidrólisis enzimática - inactivado - colado - hidrolizado enzimático - mezclado de melaza y Bio lac - incubado - colado - envasado.
3. Para la etapa de hidrólisis enzimática los parámetros propuestos fueron: proporción vísceras:agua de 2:1, ajuste de pH a 9, 0,33 % (p/v) de proteasa, 60 °C por 4 horas. Para la fermentación las proporciones empleadas fueron de 10 % (p/p) de melaza, 10 % (p/p) Bio lac y 80 % hidrolizado, incubado a 40 °C por 5 días.
4. El biofertilizante diluido a una concentración de 0,1 % obtuvo un IG de 129,1 % y no presenta sustancias tóxicas.
5. La composición físico química del biofertilizante a 4,01 y C.E. 21,1 dS/m fue de 12057 mg/L de N, 953 mg/L de P, 4230 mg/L de K, Fe 52 mg/L de Fe, 25,17 mg/L de Cu, 48,08 mg/L de Zn, 147 mg/L de Mn y 2,59 mg/L de B.
6. El contenido total de aminoácidos y proteína en el biofertilizante fue de 3,8 g/100g y 6,2 g/100 g de muestra, respectivamente.

7. El biofertilizante estuvo compuesto por 16 aminoácidos a excepción de cisteína y prolina.
8. En el biofertilizante no se encontró Coliformes totales, fecales, *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.*
9. El contenido de Pb, Cd y Cr fue menor al Límite máximo permisible según el Real Decreto 506/2013 de España para fertilizantes líquidos.

VI. RECOMENDACIONES

- Emplear otros subproductos de la trucha como cabezas y esquelón con la finalidad de incrementar el contenido de algunos macronutrientes como N y Ca.
- Utilizar otros recursos hidrobiológicos provenientes de la acuicultura tales como la tilapia, paiche, paco, gamitana, etc. Así como también la generación de subproductos provenientes de su procesamiento según su tipo de comercialización.
- Utilizar hidróxido de potasio KOH en lugar de NaOH, en la hidrólisis enzimática, debido a que el NaOH incrementa el contenido de sales, además el KOH incrementará el contenido de K en el fertilizante.
- Se recomienda mezclar el hidrolizado enzimático de pescado o de sus subproductos con extractos de macroalgas antes de realizarse la fermentación láctica, debido a que la macroalga tiene un alto contenido de yodo y potasio entre otros compuestos.
- Realizar ensayos de fertilización foliar del biofertilizante a partir de subproductos de pescado como fuente de suplemento de micronutrientes junto con fertilización mineral.
- Evaluar el efecto de aditivos naturales antimicóticos que prolonguen la vida útil en el biofertilizante de subproductos de pescado.
- Escalar la producción de biofertilizante con la finalidad de realizar una producción piloto.

VII. BIBLIOGRAFÍA

ADEX, 2014. Ranking de productos – Exportaciones.

Aguirre, G; Alegre, J. 2015. Uso de fuentes no convencionales de nitrógeno en la fertilización del maíz (*Zea mays* L .), en Cañete (Perú). I : Rendimiento y extracción de N , P y K. *Ecología Aplicada* 14 (2): 157-162.

Agreda, EV. 2014. Efecto del biofertilizante mixto *Azotobacter chroococcum-Rhizobium etli* sobre el crecimiento de *Oryza sativa* var. NIR en condiciones de laboratorio. Tesis Blgo Microbiólogo. Trujillo, Perú. Universidad Nacional de Trujillo. 75 p.

Ahmed, J; Ramesh, B; Mahendrakar, N. 1996. Changes in microbial population during fermentation of tropical freshwater fish viscera. *Journal of Applied Bacteriology* 80: 153–1.

Al-Maskri, A; Al-Kharusi, L; Al-Miqbali, H. 2010. Effects of salinity stress on growth of lettuce (*Lactuca sativa*) under closed-recycle nutrient film technique. *International Journal of Agriculture and Biology* 12: 377-380.

Alvarado, D; Chávez, F; Wilhelmina, KA. 2001. Lechugas hidrónicas. Seminario de Agro Negocios. Lima, Perú. Universidad del Pacífico. 96 p.

Alayón, P; Yfran, MM; Chabbal, MD; Mazza, SM; Rodríguez, VA; Martínez, GC. (2015). Efecto de inyecciones nutritivas al tronco en la productividad de naranja valencia. *Cultivos Tropicales* 36 (2): 142-147.

Albuzio, A; Durigon, V; Provenzano, MR. 2011. Anaerobic digestion of trout by-products. *Waste and Biomass Valorization* 2 (2): 127–131.

- Amit, KR; Swapna, HC; Bhaskar, N; Halami, PM; Sachindra, NM. 2010. Effect of fermentation ensilaging on recovery of oil from fresh water fish viscera. *Enzyme and Microbial Technology* 46: 9–13.
- AOAC. 1995. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemist. 13a ed. Washington, DC.
- Aranda, DM. 2012. Extracción y caracterización del aceite crudo obtenido de un hidrolizado enzimático de residuos frescos de anchoveta (*Engraulis ringens*). Tesis Ing. Pesquero. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 94p.
- Aranganathan, L; Rajasree, SR. 2016. Bioconversion of marine trash fish (MTF) to organic liquid fertilizer for effective solid waste management and its efficacy on Tomato growth. *Management of Environmental Quality: An International Journal* 27 (1): 93-103.
- Arévalo, G; Castellano, M. 2009. Manual de fertilizantes y enmiendas. Programa para la Agricultura Sostenible en Laderas de América Central. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras. 57p.
- Arnon, DI; Fratzke, WE; Johnson, CM. 1942. Hydrogen ion concentration in relation to absorption of inorganic nutrients by higher plants. *Plant Physiology* 17 (4): 515–24.
- Augier, H; Santimone, M. 1978. Composition en azote total, en protéines et en acides aminés protéiques de fertilisant foliaire «Goémar», à base d'algues marines. *Botanica Marina* 21: 337-341.
- Badui, S. 2006. Química de los alimentos. Cuarta edición. México. Pearson Educación de México, Naucalpan de Juárez, Edo. de México. 736 p.
- Bayliss, P. 1996. Chemistry in the kitchen: fish and fish products. *Nutrition & Food Science* 96 (1): 41-43.

- Balzarini, M; Di Renzo, J; Tablada, M; Gonzalez, L; Bruno, C; Córdoba, M., Robledo, W; Casanoves, F. 2011. Introducción a la bioestadística: aplicaciones con Infostat en agronomía. Córdoba, Argentina, Brujas. 383 p.
- Bhaskar, N; Benila, T; Radha, C; Lalitha, RG. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology* 99: 335-343.
- Barrios, VM; Guía ST., 2014. Determinación de los parámetros tecnológicos para la elaboración de un embutido ahumado tipo chorizo a partir de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) con Diseño y Construcción de una maquina mezcladora para Chorizo. Tesis Ing. Ind. Alimentarias. Arequipa-Perú. Universidad Católica de Santa María. 332 p.
- Bechtel, PJ. 2003. Properties of different fish processing by-products from pollock, cod and salmon. *Journal of Food Processing and Preservation* 27: 101–116.
- Benitez, R; Ibarz, A; Pagan, J. 2008. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquím. clín. latinoam* 42 (2): 227-236.
- Berenz, Z. 1997. XIII Curso Internacional Tecnología de Procesamiento de Productos Pesqueros. Callao (Perú): Instituto Tecnológico Pesquero del Perú.
- Bermúdez, J. E; Rodriguez, JH; Ocampo, A; Peñuela, L. 1999. Ensilaje de vísceras de pescado (*Piaractus brachyponum*) como fuente de proteína para la alimentación de cerdos de engorde en una dieta con aceite crudo de palma (*Elaeis guineensis* - *Elaeis oleifera*). *Livestock Research for Rural Development* 11 (2). Consultado 24 feb 2016. Disponible en : <http://www.fao.org/livestock/agap/frg/lrrd/lrrd11/2/ocam112.htm>
- Bossio, FA. 2007. Obtención de un biofertilizante basado en residuos de pescado y roca fosfatada. Tesis Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 68 p.

- Bouchez, P; Azzi, D. 1991. Biotechnology: Use of hydrolytic enzymes in preprocessing of feedstuffs. Nutritional Strategies and Aquaculture waste. Proceedings of the 1st International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste. C. B. Cowey y C. Y. Cho (eds.): 91-101. University of Guelph. Ontario, Canadá.
- Bourgeois, CM. y Le Roux, P. 1986. Proteínas animales: extractos, concentrados y aislados en la alimentación humana. Mexico D. F. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V.
- Camacho, BE; Moreno, M; Rodríguez, M; Luna Romo, C; Vásquez, M. 2000. Guía para el cultivo de trucha. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México D.F. 135 p.
- Cárdenas, JM. 2014. Obtención de biocombustible y abonos orgánicos a partir de vísceras de pollo. Tesis Ing. Ambiental. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 151 p.
- Cartaya, O; Marrero, O; Reynaldo, I; Peniche, C. 2008. Adsorción de iones [Cu.sup.2+] por quitosana y su aplicación al suelo para la protección de las plantas ante la toxicidad del metal. Cultivos Tropicales 29 (3): 81 p.
- Cavieres, CL. 2010. Determinación de la pérdida de calidad funcional, química, sensorial y microbiológica del belly de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) durante su conservación en refrigeración. Tesis Ing. en Alimentos. Santiago, Chile. Universidad de Chile. 393 p.
- Chávez, S. 1980. Elaboración de un hidrolizado de pescado por métodos químico y enzimático. Tesis Ing. Pesquero. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 80 p.
- Chen, YC; Tou, JC; Jaczynski, J. 2007. Amino acid, fatty acid, and mineral profiles of materials recovered from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing by-products using isoelectric solubilization/precipitation. Journal of Food Science 72(9): 528-536 p.

- Cóndor, P. 2010. Influencia de la metodología campesino a campesino, en la adopción de abono líquido o biol en comunidades del Alto Cunas, región Junín. Tesis Mag. Sc. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 151 p.
- COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales) 1880. 1983. Alimentos para animales: Melaza de caña. FONDONORMA. Venezuela. 10 p.
- Criollo, H; Lagos, T; Piarpuezan, E; Pérez, R. 2011. The effect of three liquid bio-fertilizers in the production of lettuce (*Lactuca sativa L.*) and cabbage (*Brassica oleracea L. var. capitata*). *Agronomía Colombiana* 29 (3):415-421.
- Cubero, D; Vieira, MJ. 1999. Abonos verdes y fertilizantes químicos. ¿Son compatibles con la agricultura? XI Congreso Nacional Agronómico/III Congreso Nacional de suelos. Consultado 19 jul 2016. Disponible en: http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_xi/a50-6907-III_061.pdf
- Dao, VT; Kim, JK. 2011. Scaled-up bioconversion of fish waste to liquid fertilizer using a 5 L ribbon-type reactor. *Journal of Environmental Management* 92 (10): 2441–2446.
- De la Rosa, J. 2012. Análisis físico químico de fertilizante orgánico (biol) producido por biodigestores a partir de estiércol de ganado. Memoria de residencia profesional Ingeniería en Agronomía. Xocoyucan, México. Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. 36p.
- Díaz, MC; León, FE. 2014. Aprovechamiento del biofouling obtenido del proceso de lavado de linternas de cultivo de *Argopecten purpuratus* en la elaboración de un biofertilizante. Tesis Ing, Ambiental. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 135 p.
- Dumay, J. 2006. Extraction de lipides en voie aqueuse par bioreacteur enzymatique combine à l'ultrafiltration: application a la valorisation de co-produits de poisson (*Sardina pilchardus*). Thèse de Doctorat. Nantes, France. Universite de Nantes. 318 p.

- Engle, CR; Quagrainie, KK; Dey, MM. 2017. Chapter 5. Seafood market channels. *Seafood and Aquaculture Marketing Handbook, Second Edition. Aquaculture Marketing Handbook*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2011. *Desarrollo de la acuicultura. 5. Uso de peces salvajes como alimento en acuicultura. FAO Orientaciones técnicas para la pesca responsable n.º 5, supl. 5.* Roma. 79 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2012. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA)*. Consultado 14 feb 2016. Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/sofia/es>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2014. *El estado mundial de la pesca y acuicultura.* Roma. 253 p.
- Fassbender H. 1975: *Química de suelos*. Ed. Instituto Interamericano de ciencias agrícolas. Turrialba, Costa Rica. 398 p.
- Fraser, O; Sumar, S. 1998. *Compositional changes and spoilage in fish - an introduction.* *Nutrition and Food Science* 98 (5): 275-279.
- Félix, JA; Sañudo, RR; Rojo, GR., Martínez, R; Olalde, V. 2008. *Importancia de los abonos orgánicos.* *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible* 4 (1): 57 p.
- Fernández, G; Gutierrez, C. 2002. *Diagnóstico ambiental y medidas de mitigación de impactos ambientales de la Empresa Piscifactoría de Los Andes S.A. Ciclo Optativo de Profesionalización en Gestión de Calidad y Auditoría Ambiental.* Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 142 p.
- FONDEPES, Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. 2014. *Manual de crianza de trucha en ambientes convencionales.* Primera Edición. Lima, Perú. 88p.

- Frazier, WC; Westhoff, DC. 1993. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza – España.
- Fuentealba, MA. 2004. Estudio de Alternativas de Elaboración de Productos con mayor valor Comercial a partir de Desechos Sólidos Orgánicos de la Industria Salmonera de la Décima Región. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. 122 p.
- Furlan, EF; Oetterer M. 2002. Hidrolizado proteico de pescado. Revista de Ciencia & Tecnología. Vol. 10 (19): 79-89.
- García, LA. 2008. Uso de bacterias probióticas en el ensilado de residuos de pescado. Tesis Blgo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 142 p.
- García, CA; Arrázola, GA; Durango, AM. 2010. Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. Temas Agrarios 15 (2): 9-26.
- García F; Jawiarczyk N; Gonzalez CV; Fernandez JM; Acién Fernandez FG. 2012. Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteína, carbohidratos y lípidos. Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal 3 (2): 147-161.
- García, G; A. 2013. Fertilización en el cultivo de maíz blanco amiláceo. Guía técnica. Agrobanco. Calca, Cuzco. 18p.
- Gliessmann, SR. 2000. Agroecology: Ecological Processes in Sustainable Agriculture. CRC/Lewis Publishers. Boca Ratón, Florida.
- Gostincar, J. 1998. Biblioteca de la agricultura. Suelos, abonos y materia orgánica. Los frutales.
- Guadix, AM. 2001. Producción de reactores de membrana de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas para nutrición enteral. Tesis Doctoral. Granada, España. Universidad de Granada. 244 p.

- Gwon, BG; Kim, JK. 2012. Feasibility study on production of liquid fertilizer in a 1 m³ reactor using fishmeal wastewater for commercialization. *Environ Eng Res* 17: 3-8.
- Hasan, B. 2003. Fermentation of Fish Silage using *Lactobacillus pentosus*. *Journal Natur Indonesia* 6 (1): 11-15.
- He, S; Franco, C; Zhang, W. 2011. Characterisation of processing wastes of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*) harvested in Australia. *International Journal of Food Science and Technology* 46 (9): 1898–1904.
- Heinrikson RL; Meredith SC. 1984. Amino acid analysis by reverse-phase highperformance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal Biochem* 136: 65–74.
- Herrera, A. 2000. Verdades y mitos sobre la materia orgánica y los abonos orgánicos.
- Holguín, MS; Caicedo, LA; Veloza, LC. 2009. Estabilidad de almacenamiento de ensilados biológicos a partir de residuos de pescado inoculados con bacterias ácido lácticas. *Rev.Med. Vet. Zoot.* 56: 95-104.
- Hoyle, NT; Merritt, JH. (1994), Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science* 59: 76–79.
- Hwang, IH; Aoyama, H; Abe, N; Matsuo, T; Matsuto, T. 2015. Subcritical hydrothermal treatment for the recovery of liquid fertilizer from scallop entrails. *Environ Technol.* 36 (1-4): 11-8.
- INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). 2015. Perú: Anuario de Estadísticas Ambientales 2014. 574 p.
- Jiménez, J. 2012. Elaboración de abono orgánico líquido fermentado (biol), a partir de vísceras de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), de los criaderos piscícolas de la parroquia de Tufiño. Tesis de grado. Tulcán, Ecuador. Universidad Politécnica Estatal del Carchi. 130 p.

- Jung, HY; Kim, JK. 2016. Eco-friendly waste management of mackerel wastewater and enhancement of its reutilization value. *International Biodeterioration and Biodegradation* 111: 1-13.
- Karmas, E. 1985. Unusual use unusable fish. *Food- Engineering* 57 (1).
- Kim, JK; Dao, VT; Kong, IS; Lee, HH. 2010. Identification and characterization of microorganisms from earthworm viscera for the conversion of fish wastes into liquid fertilizer. *Bioresource Technology* 101 (14): 5131–5136.
- Kotzamanis, Y; Alexis, M; Andriopoulou, A; Castritsi-Cathariou, I; Fotis, G. 2001. Utilization of waste material resulting from trout processing in gilthead bream (*Sparus aurata L.*). *Aquaculture Research* 32: 288-295.
- Kristinsson, HG; Lanier, TC; Halldorsdottir, SH; Geirsdottir, M; Jae W; Park, JP. 2013. *Surimi and Surimi Seafood, Third Edition.* 169 -192.
- Kristinsson, HG; Rasco, BA. 2000b. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40: 43–81.
- Layten, CN. 2015. Efecto de extractos de algas marinas en el rendimiento y calidad de alcachofa (*Cynara scolymus L.*) cv. Lorca. Tesis Ing. Agrónomo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 78 p.
- Leroi, F. 2010. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology* 27: 698-709.
- Madigan, MT; Martinko, JM; Parker, J; 2004. *Brock: Biología de los microorganismos.* 10a ed. Ed. Prentice Hall. Madrid, España. 1096 p.
- Madueño, CT. 2014. Obtención de péptidos con capacidad antioxidante mediante hidrólisis enzimática del licor de cocción de las conservas de anchoveta (*Engraulis ringens*). Tesis Ing. Pesquero. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 79p.

- Manzanares, J; Calvache, M.1999. Exportación de Nutrientes en el Cultivo de Rosas Bajo Invernadero. I Curso internacional de Manejo de Agua y Fertilización en Cultivos Intensivos. (3 jun – 28 jul. 1999. Quito, Ec.). Memorias. Quito, Grupo Clínica Agrícola.
- Martínez, R. 2003. Producción de un ensilado biológico a partir de vísceras de pescado de las especies *Prochilodus mariae* (coporo), *Pseudoplatystoma fasciatum* (bagre rayado) y *Phractocephalus hemiliopterus* (cajaro). Tesis Ing. Ambiental. Arauca, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 83 p.
- Mendoza, R; Palomino, A. 2004. Manual de Cultivo de Trucha arco Iris en Jaulas. Gerencia de Acuicultura Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero FONDEPES. Lima, Perú. 120 p.
- Mora, N; García, A. 2007. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis Lic. Química de Alimentos. Pachuca de Soto, México. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 113 p.
- National Research Council. 1989. Alternative agriculture. Committee on the role of alternative farming methods in modern production agriculture. Board on Agriculture National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C.
- Núñez, P. 2016. Fuentes y dosis de fertilización potásica en el crecimiento, tuberización y calidad de fritura de la papa (*Solanum tuberosum L.*) variedad Única. Tesis Ing. Agrónomo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 97p.
- Omote, JR. 2012. Evaluación del proceso de hidrólisis en el musculo de pota (*Dosidicus gigas*) con alcalasa. Tesis Ing. Pesquero. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 87p.
- Ovissipour, M; Abedian, A; Motamedzadegan, A; Rasco, B; Safari, R; Shahiri, H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. Food Chemistry 115 (1): 238–242.

- Padilla, W. 2007. Fertilización de Suelos y Nutrición Vegetal. Quito, EC. Grupo Clínica Agrícola.
- Paradelo, R; Moldes, AB; Rodríguez, M; Barral, MT. 2008. Relación entre metales pesados y fitotoxicidad en composts. Ciencia y Tecnología Alimentaria 6 (2): 143-151.
- Pastoriza, L; Sampedro, G; López-Benito, M. 1982. El problema del sabor amargo en los hidrolizados enzimáticos de proteína de pescado. Inf. Técn. Inv. Pesq. 93. Consultado 10 ene. Disponible en: http://digital.csic.es/bitstream/10261/91665/1/Sabor_amargo_hidrolizados.pdf
- Peña, N. 2008. Utilización de residuos de pota (*Dosidicus gigas*), para la obtención de un fertilizante orgánico líquido. Tesis Ing. Pesquero. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 108 p.
- Peralta, RL. 2010. Determinación de parámetros óptimos en la producción de fast biol usando las excretas del ganado lechero del establo de la UNALM. Trabajo de Investigación (Biólogo). Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 120 p.
- Pereyra, A; Perla, J. 2011. Producción y evaluación de abono orgánico con B-Lac en un biodigestor artesanal de uso doméstico. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 102 p.
- Pláster, E. 2000. La ciencia del suelo y su manejo. Ed Paraninfo. Madrid. España. 419 p.
- PRODUCE (Ministerio de la Producción). 2012. Anuario estadístico Pesquero y Acuícola 2012. 178 p.
- PRODUCE (Ministerio de la Producción). 2014. Anuario estadístico Pesquero y Acuícola 2012. 196 p.
- Proexpansión, 2014. Productos orgánicos de exportación.

- Quispe, G. 2013. Desarrollo de bioinsumos (bioles y compost) para la producción sostenible de cultivos con pequeños agricultores en los Andes centrales. Tesis Mag. Sc. Lima Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 159 p.
- Ramírez, JL., Trejo, D; Lara, L. 2010. La mercadotecnia en la producción de biofertilizante de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana. Revista Ciencia Administrativa. Vol 2. 48-56 p.
- Rebeca, BD., Peña-Vera, MT; Díaz-Castañeda, M. 1991. Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases yield and nutritional value. Journal of Food Science 56 (2): 309–314.
- Ribo, M. 2004. Balance de macronutrientes y materia orgánica en el suelo de agrosistemas hortícolas con manejo integrado ecológico. Tesis Doctoral. Valencia, España. Universidad de Valencia. 185 p.
- Rickli, L; Peres, FSB. 2016. Uso de biofertilizantes à base de aminoácidos na produção de mudas de *Eucalyptus dunnii*. Pesq. flor. bras., Colombo 36 (87) 211-218.
- Rodríguez, ML. 1994. Bacterias productoras de ácido láctico: Efectos sobre el crecimiento y la flora intestinal de pollos, gazapos y lechones. Tesis Doctoral. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid. 193 p.
- Rodríguez, AJ; Robles, CA; Ruiz, RA; López, E; Sedeño, JE. y Rodríguez, A. 2014. Índices de germinación y elongación radical de *Lactuca sativa* en el biomonitoreo de calidad de agua del río Chalma. Rev. Int. Contam. Ambie. 30 (2): 307-316.
- Ruiz, L. 2012. Estado de la acuicultura en el Perú. Revista AquiTIC 37: 99-106.
- Salvador, MM; Sanchez, Z. del C. 2015. Evaluación de biogás y biol en un biodigestor tipo batch utilizando residuos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratado con Bio Lac. Trabajo de Titulación (Ing. Pesquero). Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 78 p.

- Sanjeev K. Soni; Raman Soni; Chetna Janveja 2013. Production of Fermented Foods in Biotechnology in Agriculture and Food Processing (eds Parmjit S. Panesar, Satwinder S. Marwaha). CRC Press. 219 -278 p.
- Sastro, Y; Bakrie, B; Sudolar, NR. 2013. The effect of fermentation method, microbes inoculation and carbon source proportion on the quality of organic fertilizer made from liquid wastes of chicken slaughterhouse. Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture. 38 (4): 257-263.
- Selvam, GG; Sivakumar, K. 2013. Effect of foliar spray from seaweed liquid fertilizer of *Ulva reticulata* (Forsk.) on *Vigna mungo* L. and their elemental composition using SEM - energy dispersive spectroscopic analysis. Asian Pacific Journal of Reproduction 2 (2): 119–125.
- Sernaqué, F; López, J. 2012. Evaluación de tres tipos de fertilizantes en *Lactuca sativa* (lechuga). Ciencia y Desarrollo 15 (2): 57-62.
- Siuta, C. 2001. Improving probiotic survival rates. Food technology 55: 36-42.
- Sobrero, MC; Ronco, A. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. 71-79. En: Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas, G. Castillo, Ed., Ottawa, Canadá.
- Solomon, EP; Berg, LR; Martín, DW; Villece, C. 1996. Biología de Villece. Tercera Edición. Interamericana Mc Graw Hill, Mexico. 147 p.
- Soria MJ; Ferrara-Cerrato R; Etchevers J; Alcántar G; Trinidad J; Borges L; Pereyra G. 2001. Producción de biofertilizantes mediante biodigestión de excreta líquida de cerdo. Terra 19 (4): 353-362.

- Spanopoulos, M; Ponce, JT; Barba, G; Ruelas, JR; Tiznado, MR; Hernandez, C; Shirai, K. 2010. Producción de ensilados biológicos a partir de desechos de pescado, del ahumado de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y del fileteado de tilapia (*Oreochromis sp*), para la alimentación de especies acuícolas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9 (2): 167-178.
- Suarez, DC. 2010. Obtención de hidrolizado de proteína de pescado a partir de tilapia roja (*Oreochromis sp.*). Trabajo final para optar al título de Especialista en Ciencia y Tecnología de alimentos. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 49 p.
- Suquilanda, M. 2006. Agricultura orgánica alternativa tecnológica del futuro. Quito, Ecuador: Fundación para el desarrollo Agropecuario. Ecuador. 653 p.
- Taghiof, GMR; Ovissipor, MR. 2010. Production of hydrolyzed protein from viscera of beluga *Huso huso* by Alcalase enzyme. *Journal of Fisheries* 4 (1): 89-97.
- Taheri, A; Anvar, SAA; Ahari, H; Fogliano, V. 2012. Comparison the functional properties of protein hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 12 (1) 154-169.
- Tahergorabi, R; Matak, KE; Jaczynski, J. 2015. Fish protein isolate: Development of functional foods with nutraceutical ingredients, *Journal of Functional Foods* 18: 746-756.
- Valdez, CE; Vargas, MA. 2015. Evaluación de ciclo de vida en el cultivo de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) en la empresa Piscifactoría Peña SAC. Tesis Ciclo optativo de profesionalización de Calidad y Auditoria Ambiental. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 159 p.
- Varnero, M; Rojas, C; Orellana, R. 2007. Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. *Revista de Ciencia del suelo y nutrición vegetal* 7 (1): 28-37.
- Vázquez, JA; González, MP; Murado, MA. 2004a. Peptones from autohydrolysed fish viscera for nisin and pediocin production. *Journal of Biotechnology* 112 (3): 299–311.

- Vázquez, JA; Docasal, SF; Prieto, MA; González, MP; Murado, MA. 2008. Growth and metabolic features of lactic acid bacteria in media with hydrolysed fish viscera. An approach to bio-silage of fishing by-products. *Bioresource Technology* 99 (14): 6246–6257.
- Vega, LP. 2014. Reaprovechamiento del residuo queratinoso del proceso de pelambre como fuente de aminoácidos por hidrólisis alcalina con hidróxido de calcio. Tesis Ing. Ambiental. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 107 p.
- Vilca, VA. 2000. Propuesta de un plan HACCP para trucha ahumada envasada al vacío para el Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca (PELT). Tesis Ing. Pesquero. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 132 p.
- Villamil, O; Váquiro, H; Solanilla, JF. 2017. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chemistry* 224: 160-171.
- Vioque, J; Millán, F. 2005. Los hidrolizados proteicos en alimentación: suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Consultado 05 ene 2016. Disponible en: http://digital.csic.es/bitstream/10261/5750/1/IG_AGROCSIC_2.pdf
- Wescott, H. 1994. Interim Guidelines for Compost Quality. Washington State Department of Ecology. 84 p.
- Windsor, M; Barlow, S. 1984. Introducción a los subproductos de pesquería. Editorial Acribia, Zaragoza. España. 204 p.
- Wiseman A. 1991. Manual de biotecnología de los enzimas. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España. 444 p.
- Zamora, YP. 2013. Evaluación de tres niveles de hidrolizado proteico de pescado en la fase preinicio sobre la respuesta productiva de pollos de carne. Tesis Ing. Zootecnista. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 82 p

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Análisis sensorial y evaluación en ensilado biológico de pescado

Parámetros de análisis sensorial para ensilado biológico de pescado (Holguín *et al.*, 2009)

Color	Aroma	Consistencia
1: ámbar oscuro	1: agradable: pescado y melaza	1: pastosa
2: ámbar claro	2: ligeramente alcohólico	2: blanda
3: amarillento	3: desagradable	3: semilíquida
	4: putrefacto	

Evaluación física de la calidad del ensilado (Bertullo, 1989)

Atributo	Bueno	Regular	Inaceptable
Olor	Acido suave Amarronado grisáceo	Picante penetrante Amarronado o grisáceo claro- oscuro	Pútrido rechazable Gris oscuro negruzco
Color	claro		
Consistencia	Líquido	Líquido pastoso o licuado	Pastoso

Anexo 2: Análisis estadístico en la primera etapa (hidrólisis enzimática)

Análisis de varianza de la variación del porcentaje de péptidos solubles para tres concentraciones de proteasa (Primer experimento)

FV	SC	gl	CM	F	p value
Modelo	0,42	2	0,21	1,53	0,2908
Tratamiento	0,42	2	0,21	1,53	0,2908
Error	0,82	6	0,14		
Total	1,23	8			

Dado que el p value es mayor a 0,05. Se concluye que no existen diferencias significativas entre las tres concentraciones de proteasa, a un nivel de significancia del 5 %.

Análisis de varianza de la variación del porcentaje de péptidos solubles para tres temperaturas de hidrólisis (Segundo experimento)

F.V.	SC	gl	CM	F	p value
Modelo	0,58	2	0,29	7,9	0,0209
Tratamiento	0,58	2	0,29	7,9	0,0209
Error	0,22	6	0,04		
Total	0,81	8			

Dado que el p value es menor a 0,05. Se concluye que existe al menos un tratamiento diferente, a un nivel de significancia del 5 %. Por lo tanto, se realizó una prueba comparativa de medias.

Prueba LSD Fisher para tres temperaturas de hidrólisis

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
50	0,43	3	0,11	A
70	0,92	3	0,11	B
60	1,02	3	0,11	B

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferente ($p <= 0,05$)

Análisis de varianza de la variación del porcentaje de péptidos solubles para tres proporciones vísceras: agua (Tercer experimento)

F.V.	SC	gl	CM	F	p value
Modelo	0,97	2	0,48	80,01	<0,0001
Tratamiento	0,97	2	0,48	80,01	<0,0001
Error	0,04	6	0,01		
Total	1	8			

Dado que el p value es menor a 0,05. Se concluye que existe al menos un tratamiento diferente, a un nivel de significancia del 5 %. Por lo tanto, se realizó una prueba comparativa de medias.

Prueba LSD Fisher para los tratamientos de proporción vísceras: agua

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
1:1	0,88	3	0,04	A
1.33:1	1,46	3	0,04	B
2:1	1,65	3	0,04	C

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferente ($p \leq 0.05$)

Anexo 3: Análisis estadístico en la segunda etapa (fermentación homoláctica)

Análisis de varianza del valor de pH en el quinto día para los tratamientos de melaza y Bio lac

F.V	SC	gl	CM	F	p value
Modelo	0,64	11	0,06	2,94	0,0131
Melaza	0,44	3	0,15	7,41	0,0011
Bio lac	0,16	2	0,08	4,11	0,0291
Melaza*Bio lac	0,04	6	0,01	0,32	0,9216
Error	0,47	24	0,02		
Total	1,11	35			

Dado que el p value es mayor a 0,05. Se concluye que no existe interacción entre los factores: melaza y Bio Lac. Por lo tanto, deben ser evaluados por separado, y en ambos casos el p value es menor a 0,05. Por lo tanto, se realizó una prueba comparativa de medias.

Prueba de LSD Fisher para los factores melaza y Bio Lac

Melaza	Media	n	E.E.	Diferencias. Significativas		
15%	3,51	9	0,05	A		
20%	3,63	9	0,05	A	B	
10%	3,67	9	0,05		B	
5%	3,82	9	0,05			C
Bio Lac	Media	n	E.E.	Diferencias. Significativas		
15%	3,57	12	0,04	A		
10%	3,68	12	0,04	A		B
5%	3,73	12	0,04			B

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferente ($p \leq 0,05$)

Anexo 4: Interpretación de pH y CE en abonos foliares

Interpretaciones de pH en abonos foliares (De la Rosa ,2012)

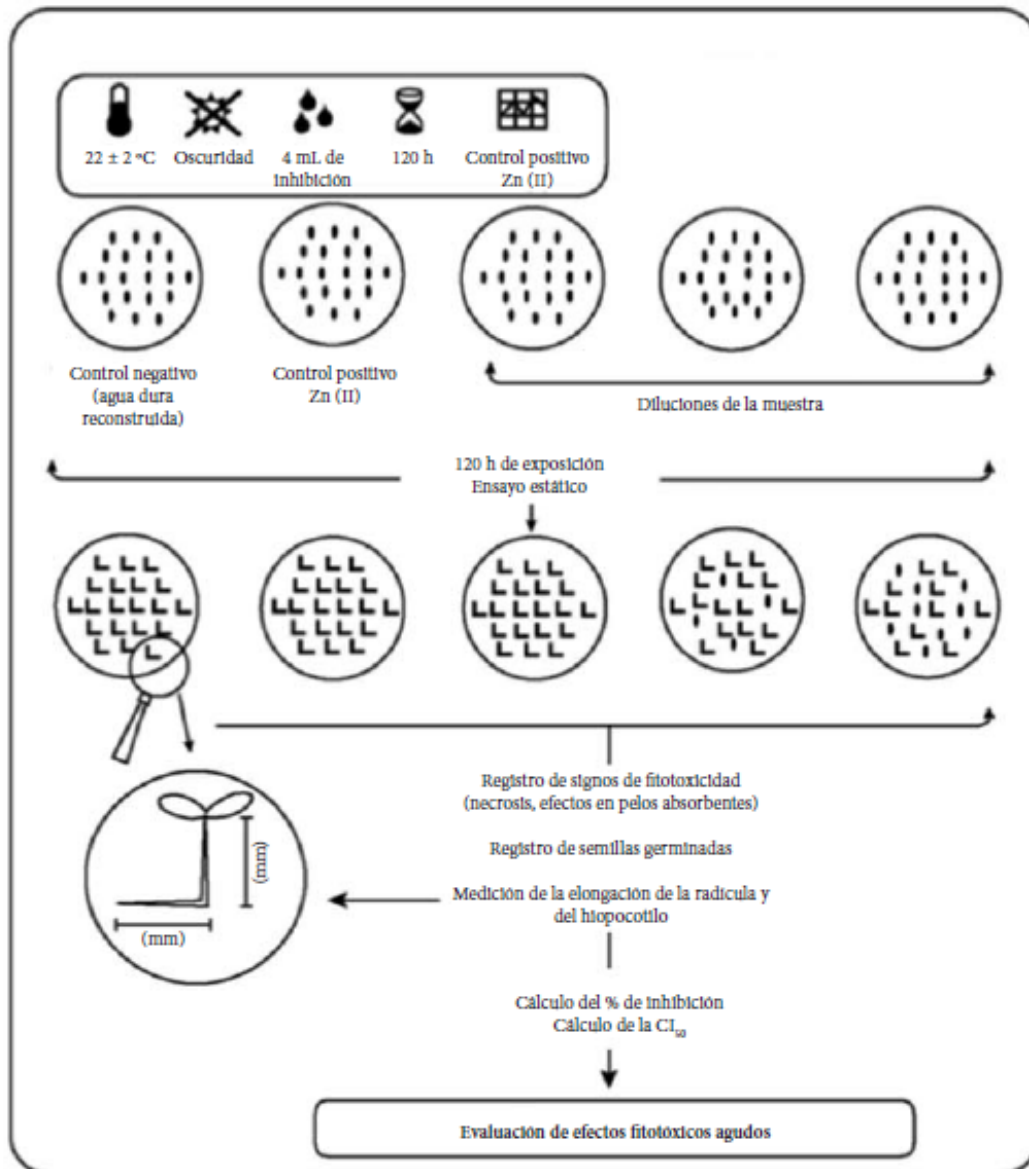
Valor pH	Interpretación
<4,5	Extremadamente ácido
4,5-5,0	Muy fuertemente ácido
5,1-5,5	Fuertemente ácido
5,6-6,0	Medianamente ácido
6,1-6,5	Ligeramente ácido
6,6-7,3	Neutro
7,4-7,8	Medianamente básico
7,9-8,4	Moderadamente básico
8,5-9,0	Ligeramente alcalino
9,1-10,0	Alcalino
>10,0	Fuertemente alcalino

Interpretaciones de conductividad eléctrica en abonos foliares (De la Rosa ,2012)

CE (dS/m)	Efecto
<1	Efectos despreciables de salinidad
1,1-2,0	Muy ligeramente salino
2,1-4,0	Moderadamente salino
4,1-8,0	Suelo salino
8,1-16,0	Fuertemente salino
>16,0	Muy fuertemente salino

Anexo 5: Esquema general del procedimiento de prueba de toxicidad con semillas de lechuga

Metodología según Sobrero y Ronco (2008)



Anexo 6: Longitud de Radícula (mm) y porcentaje de germinación en semillas de lechuga luego de 120 horas

N° Plántulas	Blanco			1 %			0,1 %			0,01 %			0,01 %		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	22	16	18	-	10	10	18	24	20	20	28	26	28	19.5	28.5
2	21	18	19.5	8	10	11	26	19	30	17	25.5	25.5	22	20	30
3	22	15.5	20	7	10	11	24	20	11	23.5	25	26	32	16.5	27
4	21	17	18	13	12	10	25	21.5	24	20	16.5	27	29.5	21	22
5	16	16	22.5	8	13	8	20	22.5	31	39	27	25	26	22	22.5
6	25	12.5	17	9	11	9	21	30	30	23	25.5	27.5	15	19	25
7	26	11	20	10	15	11	23	27	29	27	25	30	30	19	32
8	20	17	20	7	13	10	23	22	18	19	22	23	23	15	28
9	24	18.5	20	8	16	8	20	27	15	24.5	19.5	26	30	23	22
10	17.5	15	17	8	12	9	24	25	21	22.5	26.5	28	24	22	24
11	18.5	15	20	14	10	11	20	20	25	17	25	30	24.5	21	23
12	23	10	18.5	11	12	12	21.5	26	27	20	17	27	28	25	18
13	12.5	15	17	13	11	12	21.5	20	27	26	27	23	28.5	25	22
14	13	15	14	15	12	11	27	23	28	21.5	25.5	20	16	26	27
15	20	14	18	11	10	12	21	21	26	21.5	20	22	31	22	21
16	17	13	21	18	13	13	25	24.5	11	13	24	23	23.5	21	24.5
17	20	15.5	18	9	11	9	19	20	30	17.5	22	27	25	23	22
18	16	10	10	12	13	15	21	24	25	21	22	30	27	20	30
19	20	15	24	12	14	11	16	18	18	21	22	26	20	24	20
20	16.5	15	18	6	13	9	15	27	24	22	23	20	-	27	23
Promedio	19.55	14.70	18.53	10.47	12.05	10.60	21.55	23.08	23.50	21.80	23.40	25.60	25.42	21.55	24.58
Desv. Estándar	3.69	2.38	2.95	3.17	1.73	1.73	3.17	3.23	6.21	5.20	3.25	2.99	4.80	3.00	3.70
Coef. Variación(%)	18.88	16.16	15.92	30.25	14.37	16.31	14.69	14.01	26.43	23.85	13.91	11.69	18.80	14.10	15.20
Germinación (%)	100	100	100	95	100	90	100	100	100	90	90	100	95	100	100

Anexo 7: Criterio de interpretación de fitotoxicidad a partir de IG

Porcentaje de germinación relativo de semillas (PGR), crecimiento relativo de la radícula (CRR) e índice de germinación (IG)

	1 %			0,1 %			0,01 %			0,001 %		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
PGR	95	100	100	100	100	100	100	100	100	95	100	100
CRR	59,5	68,5	60,3	122,5	131,2	133,6	123,9	133	145,5	144,5	122,5	139,7
IG	56,6	68,5	60,3	122,5	131,2	133,6	123,9	133	145,5	137,3	122,5	139,7

Criterio de interpretación de fitotoxicidad a partir de IG (Zucconi *et al.*, 1981, citado por Varnero *et al.*, 2007)

Valores de IG	Interpretación
≥ 80 %	No hay sustancias fitotóxicas o en muy baja concentración.
Entre 50 y 80 %	Presencia moderada de sustancias fitotóxicas.
≤ 50 %	Fuerte presencia de sustancias fitotóxicas.