

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“ELABORACIÓN DE BIOFERTILIZANTE A PARTIR DEL EFLUENTE
DE TARWI (*Lupinus mutabilis*) PROVENIENTE DEL PROCESO
DE DESAMARGADO MEDIANTE FERMENTACIÓN LÁCTICA”**

Presentada por:

EVELYN MILAGROS YURIVILCA CRUZATT

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Lima – Perú

2023

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)

Document Information

| | | | |
|--------------------------|--|----------------------------|--|
| Analyzed document | Tesis_Evelyn Milagros Yurivilca Cruzatt Final.pdf (D156770499) | | |
| Submitted | 2023-01-24 03:44:00 | | |
| Submitted by | Juan Gabriel | | |
| Submitter email | jjm@lamolina.edu.pe | Juan G. Juscamaita Morales | |
| Similarity | 12% | | |
| Analysis address | jjm.unalm@analysis.arkund.com | | |

Sources included in the report

| | | | |
|-----------|--|---|----|
| W | URL: https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/3740 Fetched: 2022-07-09 02:39:59 |  | 7 |
| SA | TESIS FINAL ORTEGA SILVA.pdf Document TESIS FINAL ORTEGA SILVA.pdf (D148721098) |  | 3 |
| SA | anteproyecto luis ruiz.docx Document anteproyecto luis ruiz.docx (D14552625) |  | 7 |
| SA | BORRADOR DEL INFORME DE TESIS BAYLOR CORREGIDO1.pdf Document BORRADOR DEL INFORME DE TESIS BAYLOR CORREGIDO1.pdf (D117492709) |  | 7 |
| W | URL: https://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/731 Fetched: 2023-01-24 03:45:00 |  | 1 |
| SA | Borrador_proyecto_final.docx Document Borrador_proyecto_final.docx (D129364995) |  | 6 |
| SA | ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO DE LOS ALCALOIDES DEL TARWI (Lupinus.pdf) Document ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO DE LOS ALCALOIDES DEL TARWI (Lupinus.pdf (D95804577) |  | 5 |
| W | URL: http://fadvamerica.org/wp-content/uploads/2017/04/TARWI-espanol.pdf Fetched: 2023-01-24 03:47:00 |  | 2 |
| SA | Universidad Nacional Agraria La Molina / TAREA XENOBIOTICO DEL TARWI FINAL.pdf Document TAREA XENOBIOTICO DEL TARWI FINAL.pdf (D142272698) Submitted by: pgp@lamolina.edu.pe Receiver: pgp.unalm@analysis.arkund.com |  | 11 |
| SA | Jheykob Muñoz Trabajo de grado Jheykob Muñoz Alcocer.pdf Document Jheykob Muñoz Trabajo de grado Jheykob Muñoz Alcocer.pdf (D150700844) |  | 1 |
| SA | BASTIDAS XIMENA EXTRACCIÓN ALCALOIDES LUPINO.docx Document BASTIDAS XIMENA EXTRACCIÓN ALCALOIDES LUPINO.docx (D133838317) |  | 2 |
| SA | EVALUACION DEL EFECTO DEL MACERADO A BASE DE-JOHNATAN PULLOPAXI.docx Document EVALUACION DEL EFECTO DEL MACERADO A BASE DE-JOHNATAN PULLOPAXI.docx (D143798863) |  | 4 |
| W | URL: http://academica-e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/3454/577423.pdf?sequence=1 Fetched: 2023-01-24 03:44:00 |  | 12 |

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ELABORACIÓN DE BIOFERTILIZANTE A PARTIR DEL EFLUENTE
DE TARWI (*Lupinus mutabilis*) PROVENIENTE DEL PROCESO
DE DESAMARGADO MEDIANTE FERMENTACIÓN LÁCTICA”**

Presentada por:

EVELYN MILAGROS YURIVILCA CRUZATT

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Ph.D. Alfredo Salomón Rodríguez Delfín
PRESIDENTE

Mg. Sc. Patricia Angélica Moreno Díaz De Saco
MIEMBRO

Blgo. Roberto Raúl Ramos Chaupin
MIEMBRO

Blgo. Juan Gabriel Juscamaita Morales
ASESOR

DEDICATORIA

Quiero dedicársela a Dios, porque sin Él no hubiera podido soportar las dificultades que me puso la vida, siempre fue mi roca donde sostenerme y, ponerme a las personas adecuadas en el camino.

A mis padres Lucy y Manuel, y a mi querido hermano Alex que siempre me dieron su apoyo, paciencia y fuerza en todo momento

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres y mi hermano que sin su apoyo no hubiera podido culminar este proyecto, por su aliento para seguir adelante.
- A mi tía Elena y su esposo Freddy, a mi tía Albina por sus buenos consejos para no rendirme y no desesperarme frente a la adversidad, que siempre estuvieron ahí para escucharme.
- Al profesor Juan Juscamaita, quien confió en mí para realizar este trabajo, por sus consejos, dedicación y por su tiempo, y motivándome siempre para continuar y no rendirme. Agradecerle infinitamente su apoyo y asesoría durante la ejecución del proyecto, muchas gracias.
- A Franz y Evelyn, dos amigos con una larga amistad de casi diez años, desde que estábamos en el camino para poder ingresar, que confiaron en mí para formar parte de este proyecto, con los cuales tuve el gusto de trabajar con ellos y agradecerles su paciencia y por sus buenos consejos.
- A mis amigas Sandy y Nats que siempre me brindaron su apoyo emocional, brindándome su tiempo y dándome ánimos cuando a veces no me salía las cosas como esperaba.
- A la profesora Patricia Moreno por su apoyo.
- Al profesor Roberto Ramos y Alfredo Rodríguez por sus consejos, paciencia y tiempo.
- A los chicos del laboratorio de Biorremediación: Renzo, Tadeo, Nidia, Jimmy por hacer un ambiente agradable de trabajo, mientras nos acompañábamos durante la ejecución de nuestras respectivas tesis.
- A los chicos que me apoyaron durante la ejecución de la tesis: Franklin, Yesenia, Deyanira, Caroline y Martín que colaboraron conmigo, fueron de gran ayuda.
- A todos aquellos que también me apoyaron de alguna u otra forma, gracias.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| RESUMEN | ix |
| ABSTRACT | x |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. OBJETIVO GENERAL | 4 |
| 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 4 |
| 1.3. HIPÓTESIS | 4 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 5 |
| 2.1 MARCO NORMATIVO | 5 |
| 2.2 Chocho (<i>Lupinus mutabilis</i>) | 7 |
| 2.2.1 Descripción botánica | 8 |
| 2.2.2 Propiedades | 9 |
| 2.3 Proceso de desamargado | 10 |
| 2.3.1 Proceso de desamargado tradicional | 12 |
| 2.3.2 Proceso de desamargado industrial | 12 |
| 2.3.3 Efluente de proceso de desamargado | 15 |
| 2.4 Alcaloides | 16 |
| 2.4.1 Alcaloides Quinolizidínicos | 17 |
| 2.4.2 Toxicidad por alcaloides en el Tarwi | 19 |
| 2.5 Bioplaguicida | 20 |
| 2.5.1 Potencial de los alcaloides para bioplaguicida | 21 |
| 2.6 Nutrición de las plantas | 21 |
| 2.6.1 Fertilizantes | 23 |
| 2.6.2 Fertilizantes minerales o químicos | 23 |
| 2.6.3 Fertilizantes orgánicos | 25 |
| 2.6.4 Fertilizantes foliares | 26 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.7 | Biofertilizante | 27 |
| 2.7.1 | Abono orgánico acelerado o biofermentos..... | 28 |
| 2.7.2 | Bacterias ácido lácticas | 28 |
| 2.7.3 | Fermentación ácido láctica..... | 34 |
| 2.7.4 | Consortio microbiano Bio-lac (B-lac)..... | 34 |
| 2.7.5 | Aplicaciones de las bacterias ácido láctica..... | 35 |
| 2.8 | Melaza de caña de azúcar | 37 |
| 2.9 | Ensayo de fitotoxicidad con semillas de lechuga | 38 |
| III. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 40 |
| 3.1 | Lugar y periodo de ejecución | 40 |
| 3.2 | Materiales | 40 |
| 3.3 | Metodología de la investigación | 42 |
| 3.3.1 | Metodología para el análisis de pH y acidez titulable de los tratamientos (Escala laboratorio)..... | 43 |
| 3.3.2 | Selección del mejor tratamiento | 48 |
| 3.3.3 | Evaluación nematocida del biofertilizante Tarwifer | 52 |
| IV. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 54 |
| 4.1 | EVALUACIÓN DEL PROCESO DE ACIDIFICACIÓN DE LA FERMENTACIÓN | 54 |
| 4.1.1. | Análisis de pH y porcentaje de acidez titulable en Fase de Laboratorio ... | 54 |
| 4.1.2. | Análisis de pH y acidez | 54 |
| 4.1.3. | Selección del mejor tratamiento..... | 61 |
| 4.1.4. | ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA FASE PILOTO | 62 |
| 4.2 | CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL ABONO LÍQUIDO..... | 65 |
| 4.2.1. | Macronutrientes y micronutrientes..... | 65 |
| 4.3 | ENSAYO DE FITOTOXICIDAD DEL TARWIFER..... | 68 |
| 4.4 | Análisis cualitativo de alcaloides mediante prueba de Dragendorff | 70 |
| 4.5 | Análisis de la capacidad nematocida del producto “Ch” (Tarwifer) | 71 |
| V. | CONCLUSIONES | 73 |

| | |
|---------------------------|----|
| VI. RECOMENDACIONES | 74 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 75 |
| VIII. ANEXOS..... | 85 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Normativa Nacional e Internacional..... | 5 |
| Tabla 2: Contenido porcentual de los principales alcoides de <i>Lupinus mutabilis</i> | 20 |
| Tabla 3: Macro y micronutrientes importantes en la nutrición vegetal | 22 |
| Tabla 4: Bacterias ácido lácticas homo y heterofermentativas y su configuración. | 33 |
| Tabla 5: Recuento de UFC | 35 |
| Tabla 6: Bacterias ácido lácticas en la elaboración de productos lácteos | 36 |
| Tabla 7: Utilización de las principales bacterias lácticas | 37 |
| Tabla 8: Contenido nutricional de melaza de caña | 38 |
| Tabla 9: Parámetros organolépticos..... | 44 |
| Tabla 10: Proporción para los tratamientos..... | 44 |
| Tabla 11: Composición de los tratamientos | 45 |
| Tabla 12. Criterios para la selección del mejor tratamiento..... | 48 |
| Tabla 13: Concentración de los tratamientos | 53 |
| Tabla 14: Valores de pH de los componentes | 54 |
| Tabla 15: Resultado de pH del control..... | 55 |
| Tabla 16 Valores promedio de pH de los tratamientos (biofermentos) | 56 |
| Tabla 17: Valores promedio de porcentaje de acidez de los tratamientos (biofermentos)..... | 58 |
| Tabla 18: pH de los tratamientos sin melaza (Bloque B-E)..... | 59 |
| Tabla 19: Evolución del porcentaje (%) de acidez de los tratamientos sin melaza (Bloque B-E)..... | 60 |
| Tabla 20: Evolución de pH..... | 60 |
| Tabla 21: Evolución de porcentaje de acidez | 60 |
| Tabla 22: Selección del mejor tratamiento..... | 62 |
| Tabla 23: Contenido de Macro y Micronutrientes del Tarwi-fer..... | 65 |
| Tabla 24: Tabla comparativo nutricional con otros biofertilizantes | 66 |
| Tabla 25: Resultado de análisis Microbiológico del Tarwifer | 68 |

| | |
|--|----|
| Tabla 26: Resultado pH, CE de las diluciones de Tarwifer | 68 |
| Tabla 27: Características de los tratamientos de los ensayos de fitotoxicidad..... | 69 |
| Tabla 28: Índice de Germinación | 70 |
| Tabla 29: Caracterización cualitativa de alcaloide mediante reactivo de Dragendorf..... | 71 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Semillas de Tarwi..... | 8 |
| Figura 2. Lupinus tauri a nivel del Lago Titicaca, Puno 3815 m.s.n.m | 8 |
| Figura 3. Flores e inflorescencia de Tarwi | 9 |
| Figura 4. Proceso de desamargado de Tarwi..... | 15 |
| Figura 5. Estructura de alcaloides de Lupinus spp. | 18 |
| Figura 6. Comparación de la evolución de consumo agrícola de N, P ₂ O ₆ Y K ₂ O en fertilizantes | 24 |
| Figura 7. Modelo general del mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos. | 31 |
| Figura 8. Rutas metabólicas para la fermentación de glucosa en bacterias ácido lácticas. A (Ruta homofermentativa) B (Ruta heterofermentativa)..... | 33 |
| Figura 9. Estructuras isoméricas del ácido láctico | 34 |
| Figura 10. Muestra de Tarwi después de remojo (Lupinus mutabilis)..... | 42 |
| Figura 11. Subproducto: Desamargado de tarwi (Lupinus mutabilis)..... | 42 |
| Figura 12. Flujograma para llevar a cabo el proceso..... | 43 |
| Figura 13. Elaboración de los tratamientos a escala laboratorio | 46 |
| Figura 14: Evolución de pH..... | 46 |
| Figura 15. Evolución de porcentaje de acidez | 47 |
| Figura 16 Preparación a escala reactor del tratamiento seleccionado | 49 |
| Figura 17. Evolución de pH hasta el 5to día | 56 |
| Figura 18. Comparación múltiple de pH | 57 |
| Figura 19. Evolución del porcentaje de acidez al quinto día..... | 58 |
| Figura 20. Comparación múltiple del porcentaje de ácido láctico | 59 |
| Figura 21. Evolución del pH y porcentaje de acidez del tratamiento seleccionado (escala piloto) | 62 |
| Figura 22. Evolución del tratamiento seleccionado a escala piloto (temperatura ambiente) | 63 |

| | |
|---|----|
| Figura 23. Estabilidad de pH y porcentaje de acidez de la escala piloto hasta el día treinta | 63 |
| Figura 24. Estabilidad del pH y porcentaje de acidez a escala piloto a temperatura ambiente hasta el día treinta | 64 |
| Figura 25. Recuento de Bacterias ácido lácticas vs mohos y levaduras | 67 |
| Figura. 26. Porcentajes relativos de PGG, CRR e IG de las diluciones | 70 |
| Figura. 27. Porcentaje de mortandad de J2 de Meloidogyne incognita expuestos durante 48 horas en los productos y 48 horas en el agua..... | 71 |
| Figura 28. J2 de Meloidogyne después de 48 horas en el producto "Ch" a 2.5%, 1% y 0.5% | 72 |
| Figura 29. Ciclo de vida de Meloidogine incognita..... | 96 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Distribución de porcentaje de los tratamientos | 86 |
| Anexo 2. Resultados en extenso | 87 |
| Anexo 3. Análisis Estadístico | 90 |
| Anexo 4. Evaluación porcentaje de acidez..... | 91 |
| Anexo 5. Resultados del ensayo de fitotoxicidad | 92 |
| Anexo 6. Caracterización fisicoquímica y microbiológica del tarwifer | 94 |
| Anexo 7. Meloidogyne incognita Fase J2 | 96 |
| Anexo 8. Resultados de efecto nematicida del tarwifer | 97 |
| Anexo 9. Datos adicionales para costo-beneficio | 98 |
| Anexo 10. Registro fotográfico | 99 |

RESUMEN

La presente investigación logró obtener un biofertilizante líquido a partir de efluente proveniente del desarmagado de chocho o tarwi (*Lupinus mutabilis*) mediante la fermentación homoláctica, usando la melaza como sustrato y el consorcio microbiano Bio-lac. Este proceso se desarrolló en dos etapas. En la primera etapa se llevó a cabo la fermentación homoláctica a escala laboratorio, bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) durante cinco días. Se realizó diecinueve tratamientos de los cuales solo se consideró doce. Otros indicadores que se tomaron en consideración fueron el olor, color, presencia de mohos y levadura. El análisis estadístico comprendió un análisis de varianza y la prueba de Tukey tomando como valores los promedios de pH y porcentaje de acidez, el análisis costo-beneficio también se tomó en cuenta. En base a estos resultados se hizo la selección del mejor tratamiento (T9) para llevarlo a escala piloto. En la segunda etapa se realizó la fermentación láctica al tratamiento seleccionado, en un reactor con capacidad de 20L y durante cinco días seguidos se evaluaron el pH y porcentaje de acidez. Previamente también se realizó una prueba fisicoquímica y microbiológica del efluente de tarwi para ver el efecto del Bio-lac y melaza durante el proceso homofermentativo, se tomaron dos muestras para la evaluación fisicoquímica en LASPAF y microbiológica en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso”. Culminado el proceso se obtuvo un biofertilizante líquido y con muy poca sedimentación. Se evaluó la calidad del biofertilizante (Tarwifer) y se comprobó su alto contenido nutricional, estable, inocuo y con potencial comercial. También se evaluó la fitotoxicidad del biofertilizante en semillas de lechuga siendo las concentraciones 1/100 y 100/100 nocivas, mientras la concentración 0.1/100 fue ideal para las plántulas. Su capacidad de nematicida se evaluó sobre *Meloidogyne incognita* para prueba de mortandad en J2 y se comprobó la presencia de alcaloides mediante revelado de Dragendorff.

Palabras clave: biofertilizante, tarwi, fermentación homoláctica, efluente de desamargado de tarwi

ABSTRACT

The investigation obtained a liquid biofertilizer from tarwi effluent (*Lupinus mutabilis*) by homolactic fermentation, using cane molasses as a substratum and microbial consortium (Bio-lac). This process was developed in two phases. In the first one the homolactic fermentation was carried out on a laboratory scale, under a Completely Randomized Design (DCA) for five days. Nineteen treatments were worked with, but only twelve were considered. Other indicators taken into consideration were smell, colour and presence of mold and yeast. The statistical analysis covered an analysis of variability and the Tukey test taken as data the average pH and acidity percentage; it was also considered the cost-benefit analysis. From these results the best treatment was selected (T9) to take it to pilot scale. In the second phase the lactic fermentation was carried out to the selected treatment in a reactor with 20L capacity and during five following days the pH and the acidity percentage were evaluated.

Previously, a physicochemical and microbiological test was also taken from tarwi effluent to see the effect of the Bio-lac and cane molasses by homofermentative process, two samples were taken for the physicochemical evaluation in LASPAF and microbiological one “Marino Tabusso” laboratory. At the end of the process a liquid biofertilizer was obtained and with little sedimentation. The quality of the biofertilizer (Tarwifer) was tested and its high nutritional value, stability, safety and trading power were checked. It was also examined the phytotoxicity of the biofertilizer in lettuce seeds with its harmful concentrations 1/100 and 100/100, while the concentration 0.1/100 was ideal for seedlings. Its capacity of nematicide was inspected over *Meloidogyne incognita* for a mortality test in J2 and the presence of alkaloids was confirmed by Dragendorff test.

Keywords: biofertilizer, tarwi, homolactic fermentation, tarwi effluent.

I. INTRODUCCIÓN

El tarwi (*Lupinus mutabilis*) es una leguminosa oriunda de los Andes Sudamericanos y del Mediterráneo, estas semillas pasan por un proceso de desamargado y cocimiento para fines alimenticios y como uso medicinal, también es promisoria y puede crecer en suelos pobres. Tradicionalmente es considerado de gran valor nutritivo por su alto contenido de proteínas (38.9 por ciento) y alcaloides (3.5 a 4.2 por ciento) y debido a esto no se permite su consumo directo, por lo cual debe eliminarse previamente antes de consumirse. (Huaman, 2015)

En su forma cruda el grano de tarwi es amargo debido a su alto contenido de esparteína, lupinina, lupanidina, entre otros alcaloides y debido a eso no es posible su consumo, ya que también presenta efectos tóxicos en el sistema nervioso central y periférico, similar a un síndrome anticolinérgico, (Salazar, 2015). Por esta razón se recomienda el uso alimentario de la semilla desamargada, por lo que las semillas pasan por un proceso de desamargado para su consumo, por ejemplo para fines de consumo familiar, se remoja un promedio de tres kilogramos de grano de tarwi en un recipiente con capacidad de 18 litros aproximadamente (lata o balde) durante 12 horas, y luego se procede a hervir en esa misma agua de remojo, obteniendo el agua color marfil que es de sabor muy amargo, con olor fuerte a tarwi crudo, este líquido luego se enfría y es depositado en botellas para ser utilizado como repelente. (Garay, 2015) Debido al inconveniente de los alcaloides se usa el proceso de desamargado para la extracción de alcaloides, el cual consiste en obtener semillas aptas para el consumo humano, con un 0.02% de alcaloides. (Quispe, 2015)

Este efluente generado en el proceso de desamargado, que es el agua donde los alcaloides están contenidos, el cual es descartado al ambiente sin tratar, es usado por pequeños agricultores para combatir las garrapatas en el ganado ovino y en camélidos, también se utiliza como regulador de crecimiento o fertilizantes en los cultivos de maíz, trigo, soja y papa. Se ha demostrado que los alcaloides derivados de la putrescina se incrementan notablemente durante la germinación de algunas plantas como la cebada, sobre todo

cuando se encuentran en suelos deficientes de potasio, en estado de floración también es usado como abono verde y por su contenido de alcaloides se siembra a menudo como cerco vivo para evitar el daño que causarían los animales. Por su carga de alcaloides también es usado como laxante por los agricultores para combatir a los parásitos intestinales de su ganado. (Rodríguez, 2009)

El proceso de remoción de los alcaloides por lixiviación en agua (método acuoso) es el que se utiliza tanto a nivel casero o comercial (Suca, 2016) con el objetivo de transferir compuesto amargos a un fluido portador como el agua y la carga indiscriminada de este efluente puede causar daños ambientales tanto a corto o largo plazo. (Villacreces, 2011) Se recomienda el uso de la semilla desamargada para consumo, debido a que los alcaloides presentes en el tarwi son la esparteína y la lupanina que presentan efectos farmacológicos y también efectos tóxicos en el sistema nervioso central y periférico. (Salazar, 2015)

Este efluente es usado por los agricultores como bioplaguicida como alternativa frente a los pesticidas tradicionales que causan problemas ambientales que afecta a la agricultura, ya que los plaguicidas no solo afectan a la plaga objetivo, sino también organismos no deseados, como insectos benéficos y demás vegetación; el uso indiscriminado no solo causa daños para la salud, sino también la disminución del rendimientos debido a las plagas entre un 20 a 30 por ciento en la mayoría de los cultivos, a pesar del incremento substancial de los plaguicidas (cerca de 500 mil toneladas de ingredientes activo a nivel mundial), siendo este un síntoma de la crisis ambiental que afecta a la agricultura. (García-Gutiérrez *et al.*, 2012)

Otro de los retos de la agricultura es el uso de fertilizantes, ya que, si bien promueve el crecimiento y la producción de los cultivos, pero su uso desmedido es responsable de grandes problemas ambientales como emisión y producción de gases invernadero, daños a la capa de ozono, problemas de acidificación y contaminación del suelo y agua, el cual provoca problemas de eutrofización. (De La Torre y Cañas, 2014)

Entonces, frente a esta problemática en la agricultura, es necesario encontrar una alternativa ecoamigable, como incorporar abono orgánico que mejora las propiedades químicas, aumenta el contenido de macronutrientes como N, P, K y micronutrientes, mejorando la actividad del suelo, actúa como soporte y alimento de los microorganismos, la población microbiana es un indicador de la fertilidad del suelo, se prevé la utilización

del compost como abono orgánico para mejorar las características del suelo y proveer de nutrientes suficientes a los cultivos, su empleo en la agricultura tiene gran importancia como mejorador del medio ambiente. (Naranjo, 2013)

Entre los biofertilizantes, existe uno que corresponde al uso de inoculantes microbianos, que son componentes promisorios para complementar la nutrición de las plantas, debido a que optimiza la toma de nutrientes, que resulta una herramienta excelente para el manejo integrado, pues garantiza la sostenibilidad de la producción agrícola. (Antonio *et al.*, 2014)

Para la obtención del abono líquido por fermentación láctica de residuos sólidos agroindustriales y residuos de otras industrias se emplea un consorcio microbiano (Bio-Lac) cuyas bacterias aceleran la degradación del residuo orgánico para producir ácido láctico mientras se eliminan otras bacterias y patógenos (procedentes del residuo) debido al grado de acidez alcanzado. (Herrera, 2017) El Bio-Lac contiene bacterias benéficas como del género *Lactobacillus*, que neutralizan los malos olores, aceleran la descomposición de la materia orgánica y lo convierte en abonos orgánicos, que al ser usados mejoran las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, lo cual favorece el crecimiento y desarrollo de los cultivos, mejorando la producción del forraje y su valor nutricional. (Moreno, 2019) La fermentación homoláctica se presenta como alternativa de aprovechamiento y transformación de materia orgánica, que va ganando mayor interés por su versatilidad y breve duración (cinco días).

En esta presente investigación, conforme a lo expuesto se trabajó con el efluente proveniente del proceso de desamargado, para transformarlo mediante la fermentación homoláctica con el consorcio microbiano de bacterias ácido lácticas (Bio-Lac) usando melaza como fuente nutritiva y aprovechando que el efluente es usado como bioplaguicida por los agricultores, se obtuvo un biofertilizante con capacidad biocida líquido llamado “tarwifer” con capacidad de controlar plagas ya que contrarresta, neutraliza y ejerce control sobre ellas. Los biofertilizantes actúan estimulando el desarrollo de sus hojas, raíz y la fructificación a la vez que nutre a las plantas (Quiñones, 2012)

1.1. OBJETIVO GENERAL

- El objetivo de este proyecto es la obtención de un biofertilizante a partir del efluente de tarwi (*Lupinus mutabilis*) que se genera durante el proceso de desamargado mediante fermentación láctica con el consorcio microbiano de bacterias ácido lácticas (B-Lac)

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la evolución del pH y acidez titulable de las muestras de laboratorio con diferentes concentraciones de melaza y biolac (consorcio microbiano ácido láctico) con el efluente de tarwi para seleccionar la mejor combinación para su escalamiento.
- Analizar las características fisicoquímicas (análisis de materia orgánica) y microbiológico del biofertilizante/bioplaguicida
- Evaluar fitotoxicidad del biofertilizante/bioplaguicida en semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).
- Evaluar el efecto del biofertilizante/bioplaguicida en huevos de nematodos *Meloidogyne incognita* en la fase J2
- Determinar costo de producción y rentabilidad económica.

1.3. HIPÓTESIS

“La fermentación láctica transforma al efluente de tarwi en biofertilizante con capacidad bioplaguicida”

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 MARCO NORMATIVO

En este trabajo se consideraron las normas afines o relacionadas al tema, ya que en la actualidad no existe regulación nacional respecto a productos fertilizantes que incluyan requisitos, parámetros, procedimientos, parámetros, etc. Las normativas son agrupadas en la Tabla 1, ya sea su alcance a nivel nacional e internacional.

Tabla 1. Normativa Nacional e Internacional

| Nombre | Numero | Objeto |
|---|-----------------------------------|---|
| Normativas Nacionales | | |
| Ley de gestión integral de residuos sólidos | Decreto Legislativo N°1278 | Establecer derechos, obligaciones, atribuciones y responsabilidades de la sociedad en su conjunto, con la finalidad de propender hacia la maximización constante de la eficiencia en el uso de los materiales y asegurar una gestión y manejo de los residuos sólidos económica, sanitaria y ambientalmente adecuada, con sujeción a las obligaciones, principios y lineamientos de este Decreto Legislativo. |
| Reglamento de la Ley de gestión integral de residuos sólidos | Decreto supremo N° 014-2017 MINAM | Reglamentar el Decreto Legislativo N° 1278, Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos, a fin de asegurar la maximización constante de la eficiencia en el uso de materiales, y regular la gestión y manejo de residuos sólidos, que comprende la minimización de la generación de residuos sólidos en la fuente, la valorización material y energética de los residuos sólidos, la adecuada disposición final de los mismos y la sostenibilidad de los servicios de limpieza pública. |
| Reglamento de manejo de residuos sólidos del sector agrario | Decreto Supremo N° 016-2012-AG | Regular la gestión y manejo de los residuos sólidos generados en el Sector Agrario, en forma sanitaria y ambientalmente adecuada, con sujeción a los principios de prevención y minimización de riesgos ambientales, así como la protección de la salud y el bienestar de la persona humana, contribuyendo al desarrollo sostenible del país. |

Continuación...

| | | |
|--|--|---|
| Ley de promoción de la producción orgánica o ecológica | Ley N° 29196 | Promover el desarrollo sostenible y competitivo de la producción orgánica o ecológica del Perú |
| Reglamento Técnico para los productos orgánicos | Decreto Supremo N°044-2006-AG | Definir y normar la producción, transformación, etiquetado, certificación y comercialización de los productos denominados ORGÁNICO, ECOLÓGICO, BIOLÓGICO, así como todas sus inflexiones y derivaciones, las que de aquí en adelante se denominarán de forma genérica PRODUCTOS ORGÁNICOS. Las disposiciones del presente Reglamento Técnico, para efectos de la comercialización de los productos como orgánicos, deben ser cumplidas de manera obligatoria por todos los agentes de la producción, transformación, etiquetado, certificación y comercialización de dichos productos. |
| Normativas Intencionales | | |
| Real decreto sobre productos fertilizante | Real Decreto 506/2013 | Establecer la normativa básica en materia de productos fertilizantes y las normas necesarias de coordinación de las comunidades autónomas |
| Productos para la industria agrícola. Productos orgánicos usados como abonos o fertilizantes y enmiendas de suelo | Norma técnica Colombia 5167 | Establecer los requisitos que deben cumplir y los ensayos a los cuales deben ser sometidos los productos orgánicos usados como abonos o fertilizantes y como enmiendas de suelo. |
| Plaguicidas y fertilizantes Normativa canadiense para fertilizantes | Ley 21349 Chile LEY DE FERTILIZANTES (RSC, 1985, C. F-10) (MODIFICADA HASTA EL 15 DE ENERO DE 2019) | Establece normas sobre composición, etiquetado y comercialización de fertilizantes y bioestimulantes En la notificación de Canadá a la OMC de conformidad con el artículo 63.2 del Acuerdo sobre los ADPIC se establece lo siguiente: 'La Ley sobre los Fertilizantes confiere al Gobernador en Consejo la facultad de dictar los reglamentos necesarios para la aplicación del párrafo 3 del artículo 39 del Acuerdo sobre los ADPIC |
| Residuos de pesticidas permitidos en | La EPA regula la importación y exportación de productos | Las disposiciones federales en materia de plaguicidas son básicamente responsabilidad de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) conforme a la Ley Federal sobre Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas de 1947 |

Continuación...

| | | |
|--------------------------|------------------------------------|---|
| productos básicos | plaguicidas en los Estados Unidos. | (Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act, FIFRA), reformada por la Ley Federal Ambiental de Control de los Plaguicidas (Federal Environmental Pesticide Control Act) de 1972 (Código, título 7, secs. 136-136 Asimismo, el Programa de Agricultura Sustentable con Insumos Reducidos (LISA) impulsa la investigación de técnicas agrícolas que reduzcan la dependencia de los insumos químicos y la contaminación causada por las sustancias químicas agrícolas. El Departamento de Agricultura administra, además, diversos programas destinados a abordar especies exóticas o extranjeras de plantas, bacterias y otras plagas que podrían dañar la agricultura interna. |
|--------------------------|------------------------------------|---|

2.2 Chocho (*Lupinus mutabilis*)

El chocho o el tarwi es una semilla leguminosa oriunda de los Andes Sudamericanos, se ubica desde los 1500 hasta los 3850 metros de altitud, encontrándose en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y Argentina, donde el poblador andino lo conoce y lo incorpora a su dieta, como grano desamargado, desde hace más de 500 años A.C. En la actualidad muchos pueblos ocupan uno de los primeros lugares entre los alimentos nativos con elevado contenido de proteínas y aceites a nivel mundial. (Garay, 2015) Esta semilla posee un gran valor nutritivo, sus granos están constituidos por proteínas y aceites en más de la mitad de su peso, sus estudios realizados en más de 300 genotipos diferentes muestran que la proteína varía de 41 % a 51% y el aceite de 14% a 24%. (Gross *et al.*, 1988 citado por (Garay, 2015)

Por su alto contenido de proteínas, que es mayor al de la soja, lo hace una planta de interés para la nutrición humana y animal, su consumo puede ser en cremas, guisos, postres; ayuda a los niños en crecimiento y desarrollo cerebral, debido a la presencia de calcio y aminoácidos; para su cultivo requiere entre 350-800 mm de precipitación anual, siendo cultivados excesivamente en zonas secas, es susceptible al exceso de humedad, moderadamente susceptible a la sequía durante la floración y envainado, no tolera las heladas en la fase de formación del racimo y madurez, aunque algunos ecotipos cultivados a la orilla del lago Titicaca, presentan una mayor resistencia al frío, prefiere suelos francos y franco-arenosos, con balance adecuado de nutrientes, buen drenaje, y pH que oscila entre 5 y 7. (Rodríguez, 2009)



Figura 1. Semillas de Tarwi
FUENTE: (Rodríguez 2009)

En los Andes peruanos las especies silvestres de *Lupinus* se puede encontrar hasta los 4500 m.s.n.m., aunque su mayor distribución está en los niveles inferiores, entre los 2000 y 3500 m.s.n.m., ya que, en las diferentes expediciones botánicas, se ha encontrado que específicamente existe una alta concentración de Lupinos en la sierra sur, en los departamentos de Arequipa, Moquegua, Cusco y Puno. (Tapia, 2015)



Figura 2. *Lupinus tauri* a nivel del Lago Titicaca, Puno 3815 m.s.n.m
FUENTE: (Tapia 2015)

Según Jacobsen y Mujica, (2006) el centro de origen del *Lupinus mutabilis* es debatible siendo el más probable entre los Andes del norte de Perú y sur de Ecuador y en cuanto a las condiciones climáticas para su cultivo, la planta es susceptible al exceso de humedad y moderadamente a la sequía, en estadios tempranos no tolera las heladas, requiere de 350 a 850 mm de precipitación pluvial. (Arias, 2015)

2.2.1 Descripción botánica

El chocho presenta una raíz pivotante y robusta, que puede llegar a medir 2 metros, la raíz presenta nódulos simbióticos con bacterias del género *Rhizobium* que fijan nitrógeno atmosférico a la planta. La altura del tallo varía entre 0.5 a 2.8 metros alcanzando un

promedio de 1.80 metro, de forma cilíndrica y textura leñosa, con ramificación en V y un color que varía de verde a gris-castaño, esto según el grado leñoso. Presenta hojas palmeadas y digitadas, con 5 a 12 foliolos oblongo lanceolados y delgados, con pequeñas hojas estipulares en la base del peciolo, cuyo color varía entre verde y morado según el contenido de antocianina de la planta, (Aranda y Bocanegra, 2018)

Presenta inflorescencia racimosa terminal con varios verticilos florales, mayor en longitud en el eje principal que disminuye en las laterales, con cinco flores cada uno, con colores que varían por las antocianinas y flavonas que contengan la planta, que va desde el color azul, morado, purpura, celeste y rosado, hasta el amarillo, crema y blanco; el fruto es una legumbre pubescente, indehiscente en las cultivadas y con cierta dehiscencia en las semi cultivadas y silvestres. La vaina es alargada de 5 a 12 centímetros, según el número de semilla que puede contener hasta 9 semillas. (Aranda y Bocanegra, 2018)



Figura 3. Flores e inflorescencia de Tarwi
FUENTE: (Rodríguez 2009)

2.2.2 Propiedades

Se sabe que el tarwi o chocho es rico en proteínas y grasas, motivo por el cual se promueve su consumo de esta leguminosa, con contenido proteico es incluso superior a la soya en algunos casos el 50%, con contenido de grasa similar a esta, con estudios en más de 300 genotipos diferentes muestran que la proteína varía de 41% a 51%. (Suca, 2016)

El nivel de lisina en el *Lupinus* alcanza 3.7%, pero carece de aminoácidos sulfurados como la metionina y cisteína esenciales para síntesis de queratina, también presenta menor cantidad de inhibidores de tripsina, taninos, fitatos y saponinas que la soya. (Arias, 2015)

El *Lupinus* se presenta en variedades de dietas, que es usado por el saber popular, como el cebiche, picante de chocho, pepián de chocho, jugo de chocho combinado con papaya,

mazamorra de chocho combinado con naranja, también se mezcla con frutas, siendo ideal para aprovechar al máximo los minerales que presenta el *Lupinus* (Hierro con limón o naranja, ayuda a la formación de hemoglobina). Desde el punto de vista nutricional ha sido muy estudiado, bromatológico, e incluso los alcaloides han sido identificados por cromatografía gaseosa por diferentes investigadores; su contenido de proteínas (38.9%), grasa (17.1%), calorías (411cal/100g) y alcaloides (3.5%-4.2%) el cual no permite su consumo directo, por el cual deben eliminarse. (Salazar, 2015)

Las proteínas aisladas y concentradas de Lupino muestran propiedades físicas y funcionales comparables a las de la soya, así como la absorción de agua y aceite; capacidad emulsionante, actividad y estabilidad, capacidad de espuma y estabilidad, solidificación son propiedades de las proteínas aisladas de *Lupinus*. (Carvajal-Larenas *et al.*, 2016)

Según (Jacobsen *et al.* 2006) para las zonas más altas la especie más adecuada es el tarwi o el chocho, que fija nitrógeno y extrae fósforo y otros nutrientes del suelo, el tarwi también es utilizado por los agricultores para consumo humano, pero en pequeñas cantidades; su uso como abono verde era desconocido. Desde el punto de vista agroecológico, el chocho acumula grandes cantidades de nitrógeno, entre 400 y 900 kilogramos por hectárea (Kg. /ha) provenientes de su mayor parte de la fijación biológica de nitrógeno atmosférico. Por otra parte, el requerimiento de fosforo en el cultivo esta entre 30 y 60 Kg. /ha, lo que refleja una alta eficiencia para tomar nutrientes en suelos que tienen baja capacidad de abastecimiento de minerales. (Aranda y Bocanegra, 2018)

2.3 Proceso de desamargado

Se mencionó la importancia de *Lupinus mutabilis* por su alto contenido de proteínas y aceites, que son nutrientes que lo colocan en un plano comparable a la soya, pero el grano amargo debido a la presencia de alcaloides quinolizidínicos contiene un promedio de 42% de proteína, en base seca; sin embargo, el proceso de desamargado (eliminación de alcaloides), permite concentrar aún más el contenido de este nutriente, registrando valores de hasta 51% en base seca. Sánchez *et al.*, 2004 citado por (Aranda y Bocanegra, 2018)

Lo que ha limitado el consumo de esta leguminosa es su alto contenido en alcaloides, ya que sus semillas poseen en su estructura alcaloides quinolizídicos, el cual es responsable de su sabor amargo, estas sustancias están presentes en *Lupinus* porque tienen la función de proteger a la planta en el medio e impiden que la semilla sin tratamiento pueda ser

aprovechada para su consumo, son 70 tipos de alcaloides que están presentes en el tarwi, siendo los grupos lupanina y esparteína los que más destacan. (Rodríguez, 2009)

Para eliminar la presencia de estos alcaloides, se han realizado investigaciones con el propósito de eliminar estas sustancias, principalmente con un enfoque agronómico y en segundo plano con enfoque industrial; para el caso de *Lupinus mutabilis*, el mejoramiento agrícola no ha tenido grandes repercusiones ya que esto ha provocado la pérdida de sus característica de resistencia, en la actualidad el lupino andino se detoxifica mediante sucesivos lavados con agua que eliminan estas sustancias, hasta niveles que permiten su consumo. (Ortega-David *et al.*, 2010)

Sobre el proceso de desamargado de tarwi está incluido una etapa inicial de remojo de los granos que puede llegar a durar 20 horas para que este sea hidratado completamente y permita extraer los alcaloides en etapas posteriores, luego continua una etapa de cocción cuya duración varía entre 0.5 y 6 horas, que tiene como objetivo inactivar las enzimas germinativas y deterioradoras (lipasa, lipooxigenasa) del grano, disminuir la carga microbiana superficial, reducir la pérdida de proteínas debido a su coagulación e incrementar la lixiviación de los alcaloides mediante el aumento de la permeabilidad de las pared celular. (Gutiérrez *et al.*, 2016)

El proceso de desamargado del grano de chocho presenta las siguientes ventajas y desventajas:

A. Ventajas:

- Destrucción de la viabilidad de las semillas y de las enzimas indeseables como las lipasas, responsable de la autooxidación de las grasas, a través de la cocción.
- Destrucción de sustancias organolépticas indeseables y principios anti nutritivos, como los inhibidores de proteasas, la hemaglutininas y el ácido cianhídrico (HCN).
- Eliminación de los oligosacáridos que se encuentran en diversas leguminosas y que producen flatulencia, a través del proceso de lavados. (Jacobsen *et al.*, 2006 citado por (Aranda y Bocanegra, 2018)

B. Desventajas:

- Prolongado tiempo de proceso para eliminar los alcaloides.
- Pérdida de nutrientes como los carbohidratos y algunos minerales.

- Falta de control de calidad en el proceso total y cuestionable sanidad del grano obtenido, debido principalmente a la calidad de agua empleada en el lavado de grano. (Jacobsen *et al* 2006 citado por (Aranda y Bocanegra, 2018)

2.3.1 Proceso de desamargado tradicional

En los países andinos el desamargado tradicional comprende la selección manual del grano, la hidratación, según Caicedo *et al.*, (2001) cocción y el lavado de grano. La hidratación se realiza durante 24 horas y generalmente se realiza en agua de acequias, vertientes y en muy pocos casos se utiliza agua potable, la cocción se realiza en cocinas de leña o gas durante una hora. El lavado se realiza en agua corriente de acequias o vertientes durante cuatro o cinco días, el tiempo involucrado en el desamargado artesanal incluye un periodo de cinco a siete días. (Aranda y Bocanegra, 2018)

La cocción puede ir también entre 2 a 3 horas y luego se deja correr en aguas, a veces colocándolo en un envase o ya sea en un riachuelo o sequía, dejando correr el agua constantemente y removiéndolo periódicamente la semilla, durante aproximadamente dos semanas. (Salazar, 2015)

En lugares como Ecuador el proceso se realiza de forma artesanal, dejando al grano en remojo de 18 a 24 horas, y luego se cocina durante 1 o 2 horas para lavarlo en agua corriente de río o vertiente por 4 a 6 días. (Villacreces, 2011)

2.3.2 Proceso de desamargado industrial

A nivel comercial también se aplica el proceso acuoso para el desamargado de tarwi, pero a nivel industrial se busca reducir el tiempo del proceso, comparado con el proceso tradicional. El desamargado industrial también se lleva el proceso de selección, clasificación y limpieza con zarandas, hidratación durante doce horas; cocción en cilindros con llave de salida para permitir el flujo de agua, secar al sol o mediante corrientes de aire caliente, almacenaje y empacado. (Garay, 2015) El tratamiento de desamargado es aplicado cuando el contenido de alcaloides supera los 4.2 g/100 g. Como este proceso no es tan eficiente ya que tiene una duración de cinco días, consume aproximadamente 63 Kg de agua por Kg de grano y genera alta pérdidas de sólidos (0.27 Kg/kg. de materia seca); es aceptado como ventajoso su uso debido a que previene el despojo de productos químicos al ambiente y cambios en las características de calidad del producto como ocurre con los otros procesos de desamargado. (Gutiérrez *et al.*, 2016)

Según Chávez y Untied, (1979); Jacobson y Mujica, (2006) teniendo en cuenta que la mayor parte del consumo de Lupino en Perú es la del Lupino desamargado como semillas y harina, esto se debe a su accesible procesamiento, bajo costo y presencia en el mercado, por lo que se puede afirmar que el desamargado resulta el mejor método de eliminación de alcaloides más accesible tanto para el consumidor convencional y mercado empresarial, ahora la técnica de desamargado acuoso no produce niveles de alcaloides ínfimos como el mejoramiento genético o aislador proteicos según Glorio (1990) revisa el remanente que queda después del desamargado, niveles por debajo del 0.02% (bh), serian eliminados a través de la vía digestiva y urinaria, no observándose efectos nocivos, el método de desamargado es una técnica que se basa netamente en tres etapas básicas: remojo, cocción y lavado. (Quispe, 2015)

a. Remojo

Este proceso también es conocido como hidratación, que consiste en el contacto de la semilla con el agua a temperatura ambiente por un tiempo determinado con la finalidad de acondicionar la semilla de lupino, este proceso permite la hidratación de los tejidos del grano y de esta forma facilitar la salida de los alcaloides, este proceso se puede llevar de dos maneras, en agua estacionaria o en agua de circulación, cuando el remojo es en agua estacionaria se considera parámetros de control básico, como relación materia prima: agua y tiempo. En algunos estudios se reportan para el remojo diversas proporciones de materia prima y agua (1:2.5, 1:4, 1:5 y 1:6) y tiempos variables (0, 12, 18, 24 y 48 horas). En el tipo de remojo circulatorio los parámetros son el caudal y el tiempo, sin embargo, este tipo de hidratación no es muy utilizado por la poca viabilidad de su aplicación debido a que no es reproducible y posee tecnología costosa. (Quispe, 2015)

El proceso de hidratación es fundamental antes de la cocción, donde el grano absorbe agua y duplica su peso, se realiza en tanques de hidratación una vez que el agua potable alcanza los 40°C, se disponen las fundas conteniendo 4.5 kg de grano por un tiempo de 14 horas; el contenido de granos hidratados al cabo de 16 horas de remojo en agua a 40°C debe ser al menos del 95%. (Aranda y Bocanegra, 2018)

b. Cocción

La cocción consiste en hervir el grano en cierta cantidad de agua por un tiempo determinado, este proceso del desamargado es clave, donde se realizan muchas

reacciones bioquímicas ventajosas como: destrucción del poder germinativo, enzimático y microbiano que causan la descomposición de los alimentos y desintegración de las células de alcaloides facilitando su extracción según (Meneses *et al.*, 1996), los parámetros de control básicos en la cocción son: relación materia prima: agua (mp:agua) y tiempo de cocción. Los tiempos de cocción son variables, existen registros desde 5, 30, 40, 45 y 50 minutos o tiempos mayores de 1hr, 1.5 hr. y 2hrs. (Quispe, 2015)

En el proceso de cocción algunos se suele usar cal, ya que se señala que la presencia de cal permeabiliza la cáscara y facilitando la salida del alcaloide, ya que se afirma que la adición de sales o ácidos mejora la salida de los alcaloides y aumenta la pérdida de proteínas ya que las proteínas del *Lupinus* tiene un pI de 4.5 aumentando su solubilidad y se pierde, pero a pesar que presenta ventajas sobre los alcaloides, se reporta que los nutrientes como la proteína disminuyen por la adición de cal. (Quispe, 2015)

El chocho hidratado se dispone de ollas con capacidad de 300 kg, donde se procede a cocinar por un lapso de 45 minutos, al cabo de este tiempo el grano debe estar blando listo para la siguiente etapa. (Aranda y Bocanegra, 2018)

En la cocción se aplica la agitación constante aplicando el método sistematizado Reactor Air lift, en otros métodos se podrá realizar agitación en forma periódica. (Quispe, 2015)

c. Lavado

El proceso de lavado o extracción es la etapa final del proceso de desamargado del lupino, donde el grano cocido permanece el agua en reposo con cambios de agua en forma periódica, o con el agua en circulación, durante un tiempo a temperatura ambiente, según la FAO (1982) y Meneses *et al.*, (1996) con el proceso de lavado se completa la salida de alcaloides por solubilización durante el tiempo de su permanencia, cuando el lavado es con el agua en circulación se debería trabajar con el control de caudal y tiempo, sin embargo, no hay un control respecto al caudal porque a veces es realizado en ríos, o no es reportado en los estudios lo que no permite una reproducción del proceso, el tiempo puede variar desde 15 horas, 3, 4 o 10 días, una extracción en sistema si permite el control de caudal, un ejemplo lo muestra el biorreactor Air lift con un caudal de 1.4 Lt/min por 13 horas; el lavado con agua de reposo los controles básicos son: proporción materia prima, como el agua, tiempo de cambio de agua y tiempo total de lavado, cuyo tiempo varía desde 12 horas hasta (1-10 días) haciendo cambios de agua cada 2,6 y 24 horas. (Quispe, 2015)

Este proceso según Caicedo, *et al* (2001) consiste en mantener el agua en contacto con el grano, donde se controla el calentamiento, cloración y agitación del agua, se realizan tres lavados hasta obtener el grano de chocho desamargado listo para el consumo; un parámetro a controlar es la temperatura (40°C) de lavado por 1 hora después de realizado el cambio, el cual se realiza cada ocho horas en el día y a las 16 horas al día siguiente; la cloración del agua en esta etapa es de vital importancia para la obtención de un producto aceptable para el consumo humano, con un bajo contenido de microorganismos, se recomienda una dosificación de 7.5 g de hipoclorito de calcio (CaClO₂) por 2500 litros de agua, la cloración se realiza en el primer y segundo lavado. (Aranda y Bocanegra, 2018)

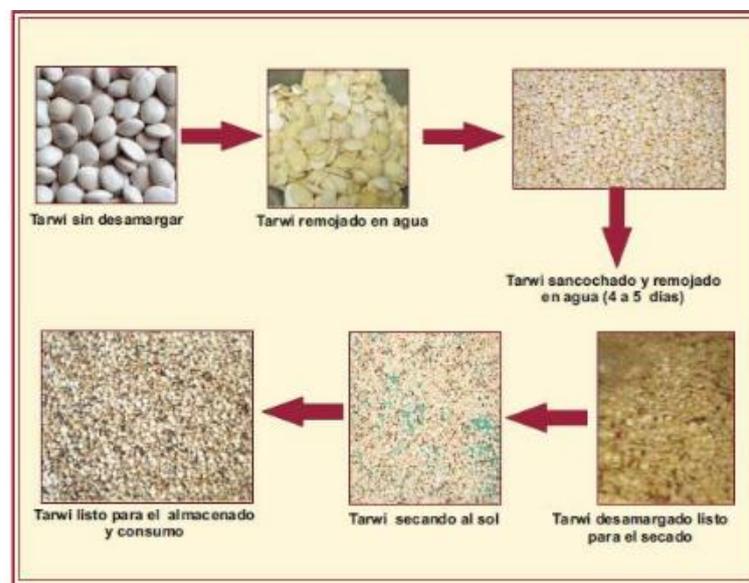


Figura 4. Proceso de desamargado de Tarwi
FUENTE: (Garay 2015)

2.3.3 Efluente de proceso de desamargado

Tanto en la manera tradicional o industrial el desamargado tiene la misma finalidad que es reducir la cantidad de alcaloides de la semilla mediante el agua. En zonas de Ecuador, donde también hay consumo de tarwi y se lleva el proceso de desamargado; muchas de las procesadoras lavan, remojan, hidratan y desamargan el grano en agua proveniente de acequias o en agua que llega a las viviendas a través de tuberías, pero sin tratamiento alguno de potabilización. A nivel industrial la producción del tarwi presenta dificultades por el grado de contaminación ambiental por la liberación de los alcaloides. (Villacreces, 2011) En Perú se cultivan aproximadamente 10000 a 12000 has, siendo la Libertad (3.228 has), Cuzco (1931has) y Puno (1497) los mayores productores; muchas familias emplean este método de desamargado para su consumo, empleando un aproximado de 18 litros de agua para 3 kg de

chocho durante 12 horas, para luego proceder a cocer los granos cambiando el agua dos veces cada 30 minutos y para eliminar el sabor amargo del tarwi después de la cocción, se escurre se enfría y sumerge bajo agua en movimiento (lago, río o en manantial) por 2 a 3 días, también es llevado a cabo por familias citadinas, poniendo el tarwi cocido en recipientes de 18 litros de capacidad empleando agua potable de uso doméstico. (Holguin, 2018) Tanto en ambos métodos como se describió anteriormente se hace empleo de una considerable cantidad de agua y según Jarrín (2003) la utilización de los métodos artesanales o tecnificados se basan en la transferencia de compuestos amargos a un fluido portador como el agua y la descarga indiscriminada de este efluente puede causar daños ambientales a corto o a largo plazo. (Villacreces, 2011)

El producto líquido del desamargado es utilizado por pequeños agricultores para combatir a las garrapatas en el ganado ovino y en camélidos sudamericanos, asimismo como regulador del crecimiento o fertilizante en los cultivos de maíz, soya, trigo y papa. (Salazar, 2015) El líquido de color amarillo marfil con sabor muy amargo y con olor fuerte a tarwi crudo, el cual se deja enfriar, también es almacenado en botellas para ser utilizado como repelente de plagas. (Holguin, 2018)

2.4 Alcaloides

En el siglo XIX se lograron verdaderos adelantos en la farmacología, con el sucesivo aporte de remedios procedentes de plantas, este avance había sido precedido por los trabajos del sueco Carl Scheele, quien logro aislar los ácidos orgánicos de las plantas, y el joven boticario Friedrich Wilhelm Serturmer (1783-1841) que con sus audaces y llamativos experimentos descubrió en 1816 el principio más importante del opio de la amapola, la morfina cuyos cristales dieron lugar al “principium somniferum” (que Gay-Lussac llamaría luego “morfina”, por el Dios griego Morfeo) que Osler llamo “La medicina de Dios”, porque revoluciono la lucha contra el dolor; al igual que otros compuestos orgánicos obtenidos de las plantas, fue llamado “alcaloide”, término acuñado por Wilhelm Meissner y se aplicó a los compuestos de origen vegetal con propiedades alcalinas, y que recuerdan la reacción de los minerales con carácter básico. (Rodriguez, 2009)

Este grupo de biomoléculas se caracterizan por contener nitrógeno en su estructura, el cual dentro del metabolismo normal de las plantas no se transformaban totalmente en proteína vegetal, sino que continúa su circulación en la savia o se fija en algunas partes de la planta, por lo que pueden combinarse con moléculas de azufre formando heterósidos cianogénicos;

los alcaloides derivados del tropano contienen en su estructura moléculas con átomos de nitrógeno secundario, terciario y cuaternario que le confiere alta toxicidad, actuando como fitoalexinas o evitando la interacción planta-insecto, los alcaloides aporfinos y acetogénicos annonáceas, han mostrado fuerte toxicidad contra larvas de crustáceos de mar como *Artemia salina* y del mosquito *Aedes aegypti*, vector de la fiebre amarilla. (Huaman, 2015)

La leguminosa andina *Lupinus mutabilis* “tarwi” a parte de las bondades nutritivas que contienen sus semillas, presentan sustancias antinutritivas que limitan su uso directo en la alimentación humana y animal, una de esas sustancias se encuentran los alcaloides, que confieren al grano, hojas, tallos de la planta un carácter tóxico y sabor amargo, en el tarwi los alcaloides son de tipo quinolizidínicos y se distribuyen en la planta particularmente en las ramas y semillas. (Huaman, 2015)

Alrededor de setenta diferentes tipos de alcaloides se han reportado en *Lupinus*, de los cuales cerca de veintiocho son de bases libres (soluble en solventes orgánicos) y los alcaloides restantes son sales, los alcaloides son compuestos amargos y tóxicos que pueden ser estructuralmente muy similares a las moléculas de sabor dulce, es de acuerdo que hay 25 receptores acoplados a la proteína G humana median la percepción del sabor dulce, también es posible encontrar mecanismos alternativos que median el sabor amargo; por ejemplo, los compuestos amargos lipofílicos y las sales amargas pueden activar señales intracelulares, el principal alcaloide reportado en *Lupinus* es la lupanina ($C_{15}H_{24}N_2O$), para el contenido total de alcaloides se usaron técnicas como cromatografía de gases (GC), Cromatografía líquida de alta performance (HPLC), cromatografía líquida de gases por capilaridad, mientras la identidad de los alcaloides ha sido determinado por cromatografía líquida de gases (GLC), (GLC) capilar-espectrometría de masas, GC y espectrometría de masas y GC cromatografía en capa fina. (Carvajal-Larenas *et al.*, 2016)

2.4.1 Alcaloides Quinolizidínicos

En el género *Lupinus* los alcaloides quinolizidínicos se sintetizan en los cloroplastos de las hojas y son transportados vía floema a otros órganos de la planta para su almacenamiento en tejido epidérmico y subepidérmico de hojas tallos y principalmente semillas; los alcaloides quinolizidínicos poseen un heterociclo nitrogenado bicíclico, quinolizidina y se encuentra tanto en los alcaloides indólicos como en los que derivan del metabolismo de la tirosina, pero las quinolizidínicas auténticas son aquellas que se derivan de la lisina, y se pueden dividir en bicíclicas como lupanina, tricíclicas como la cisticina o tetracíclicas como la

esparteína, con más de 150 especies de *Lupinus* son conocidos en la naturaleza, los alcaloides quinolizidínicos están ampliamente distribuidos entre las leguminosas *Lotoideas*, siendo los lupinos los más ricos en este tipo de alcaloides. (Rodríguez, 2009)

En estudios mediante procesos químicos analíticos se ha podido definir claramente que la semilla de *Lupinus* tiene una gran cantidad de alcaloides quinolizidínicos que varía de 0.02% a 4.45% y dichos alcaloides reportados son la Lupanina, Esparteína, 13-OH-Lupanina, 4 OH-Lupanina, Isolupanina, entre otros componentes secundarios como Esteroides, Saponinas; la esparteína y la Lupanina (Fig. 5) son algunos de los alcaloides quinolizidínicos del *Lupinus*, que dan lugar a efectos farmacológicos, pero también a efectos tóxicos en el sistema nervioso central y periféricos, similar a un síndrome anticolinérgico, por esta razón se recomienda el uso alimentario de la semilla desamargada. (Salazar, 2015)

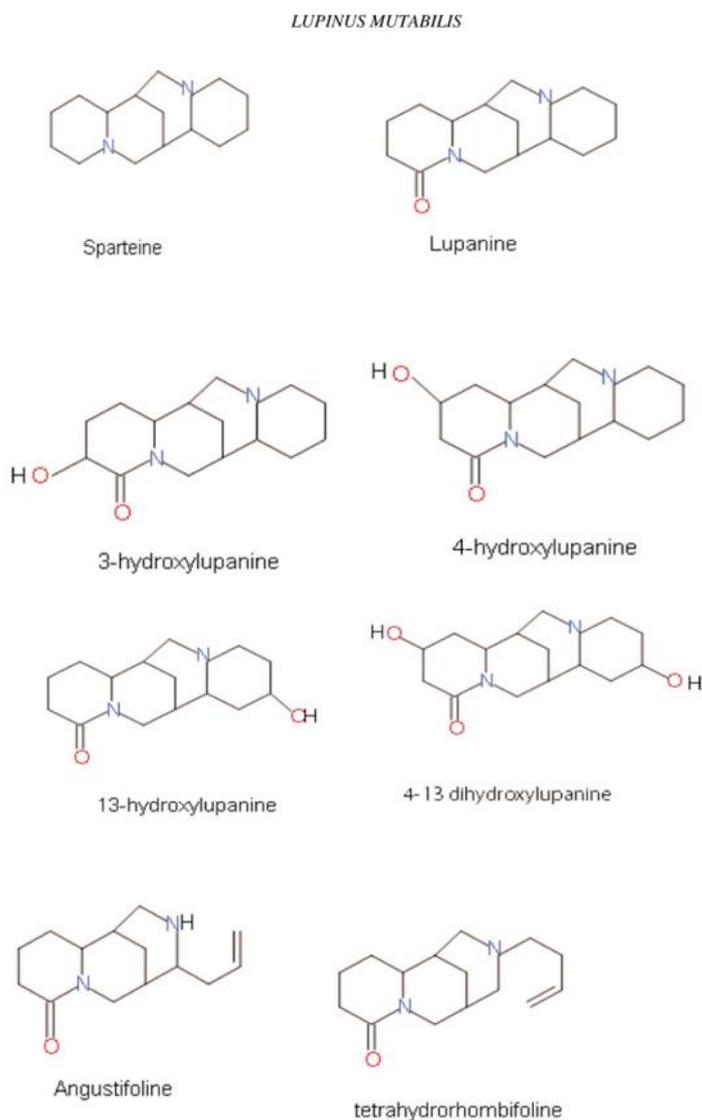


Figura 5. Estructura de alcaloides de *Lupinus spp.*
FUENTE: (Carvajal-Larenas *et al.* 2016)

2.4.2 Toxicidad por alcaloides en el Tarwi

Se ha mencionado que debido a la presencia de alcaloides el consumo de tarwi se ha visto limitado su consumo, motivo por el cual tiene que pasar por el proceso de desamargado para su consumo, sobre todo por la presencia de lupanina y esparteína.

La composición de alcaloides está sujeta a variaciones, la lupanina constituye el principal alcaloide de la semilla amarga del tarwi, tal composición puede variar radicalmente en las formas semidulces, lo cual tiene importancia en fitomejoramiento. (Zare y Paulino, 2015)

Mediante estudios se logró comprobar que la Lupanina es más activa y su acción farmacológica es inmediata en comparación con la Esparteína, debido a que la Lupanina se difunde más rápidamente a través de las membranas biológicas, y la duración de su actividad es más corta que la Esparteína; esto demuestra que dichos alcaloides puros o en forma de sales (Clorhidratos y Sulfatos) administrados en dosis altas actúan como tóxicos, pero cuando se administran en dosis moderadas actúan como medicamento. (Salazar, 2015)

En la Tabla 2 se presenta la composición porcentual de los alcaloides de *Lupinus mutabilis*. La composición de alcaloides quinolizidínicos en el tarwi son lupanina (46%), esparteína (14%), 13-hidroxilupanina (10%) y otros compuestos que biogénicamente derivan de la lisina y que posee en su estructura una o dos quinolizidinas; la toxicidad de estos compuestos ha sido demostrada a dosis muy altas tanto en animales como en seres humanos, las dosis comprendidas entre 11 a 25 mg/Kg de peso corporal en niños y dosis de 25 a 46 mg/Kg de peso corporal en adultos producen graves intoxicaciones, los síntomas de envenenamiento son midriasis, calambres, cianosis, parálisis respiratoria, violentos dolores estomacales, vómitos e incluso coma; además hay investigaciones, que confirman que el hombre puede consumir hasta 2.5 Kg de semilla de Lupino, con un contenido total de alcaloides menor al 0.1% por día, sin sufrir daño alguno, pero con una concentración del 0.1% se siente aun claramente el sabor de los principios amargos. (Zirena, 2014)

La toxicidad de los alcaloides no solo afecta a los humanos sino también a animales como se mencionó, los efectos de los alcaloides quinolizidínicos varía entre diferentes especies de animales como a los peces en general y en especial las truchas *Salmo gairdnerii* muestran una elevada sensibilidad a estos compuestos, en el caso de lupanina fue comprobada en ensayos sobre *Artemia salina*, *Bacillus megaterium* y embrión de pollo, entre sus

propiedades toxicológicas de los alcaloides del chocho o tarwi, también es su capacidad para inhibir la germinación de varias semillas. (Rodríguez, 2009)

Tabla 2: Contenido porcentual de los principales alcaloides de *Lupinus mutabilis*

| Alcaloides | %Alcaloides/Alcaloides totales |
|-----------------------|---------------------------------------|
| Esparteina | 2.0-31.9 |
| Lupanina | 36.8-74.2 |
| 4-OH-Lupanina | 2.9-21.5 |
| 13-OH Lupanina | 4.2-21.5 |

FUENTE: (Zirena 2014)

2.5 Bioplaguicida

Los biopesticidas son derivados de materiales naturales como animales, plantas, microorganismo y minerales, los bioplaguicidas son altamente específicos contra las plagas objetivo y por lo general representan poco o ningún riesgo para las personas o el medio ambiente; a diferencia de los pesticidas tradicionales que son materiales sintéticos, que no solo afectan a la plaga objetivo, sino también a organismos no deseados, como insectos benéficos, la vegetación circundante y la vida silvestre, pero con los bioinsecticidas, pueden haber inconvenientes en cuanto a su uso, por ejemplo pueden ser dañinos para otros organismos que no son el objetivo, o si se trata de un organismo biorregulador, este elimine a otro que es importante de la cadena trófica de un ecosistema, lo que causaría problemas en la población de los individuos que se alimentan del insecto plaga que se está tratando de regular, por eso se debe tener cuidado cuando se quiere utilizar algún bioinsecticida o introducir algún organismo para este fin. (García-Gutiérrez *et al.*, 2012)

Los bioplaguicidas son eficaces en el control de plagas agrícolas, sin causar daños ambientales o empeorar el daño al medio ambiente, tanto su investigación así como su desarrollo en el campo se enfocan en mitigar la contaminación ambiental causada por residuos de plaguicidas químicos, aunque por su naturaleza biológica también promueven el desarrollo sustentable de la agricultura y gradualmente empezara a reemplazar a una cantidad de plaguicidas químicos.(Leng *et al.*, 2011)

El uso del bioplaguicida se ha planteado en la agroecología como práctica segura para minimizar el uso de plaguicidas y fertilizantes de origen químicos, se busca reemplazar los químicos con productos biológicos y promueve el uso de prácticas adaptadas a los ambientes locales, de esta forma estimular las interacciones biológicas benéficas entre diferentes

plantas y especies que favorezcan la fertilidad y salud de los suelos; también se plantea su uso como una alternativa viable y sostenible para el control de plagas en los cultivos, debido a que estos bioproductos no dejan residuos tóxicos y por lo general son específicos hacia su blanco biológico, reduciendo el riesgo de desarrollar resistencia en las plagas. (Bautista *et al.*, 2018)

2.5.1 Potencial de los alcaloides para bioplaguicida

Los alcaloides quinolizidínicos son un grupo importante de compuestos naturales que se concentran principalmente en tallos y semillas de plantas del género *Lupinus*, estos metabolitos secundarios son un mecanismo de defensa contra microorganismos fitopatógenos, herbívoros y contra otras especies de plantas que causan competencia; por esta razón muchos agricultores utilizan esta propiedad para el control de plagas, ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales, en virtud de los efectos que estos han encontrado en conejos, áfidos, abejas, escarabajos (en insectos), nematodos, caracoles y gusanos, la utilización de los alcaloides como agentes fungicidas, insecticidas, bactericidas y nematocidas, se fundamenta en su actividad inhibidora de la síntesis de proteínas, del RNA transmisor, depresores del sistema nervioso central, oxiotóxicos, antiarrítmicos e hipoglicemiantes, (Huaman, 2015) también es un excelente repelente para controlar pulgones, trips y pulguilla saltona de la papa (*Epitrix subcrinita*), así como el gorgojo de los Andes en el cultivo de papa (*Premnotripes solani*) (Holguin, 2018)

Mediante la microquímica se ha permitido mostrar en forma general, que los alcaloides son localizados en los tejidos periféricos de los diferentes órganos de las plantas, es decir el recubrimiento de las semillas, corteza de tallo, raíz o fruto y en la epidermis de la hoja; esto nos permite pensar que los alcaloides cumplen una importante función como la de proteger a la planta, por su sabor amargo de estos, del ataque de insectos. (Rodríguez, 2009) Los alcaloides también pueden servir de reguladores del crecimiento, se ha demostrado que los alcaloides derivados de la putrescina se incrementan notablemente durante la germinación de algunas plantas como la cebada, cuando se encuentran en suelos deficientes de potasio. (Rodríguez, 2009)

2.6 Nutrición de las plantas

La nutrición mineral de las plantas ha sido uno de los factores más estudiados con relación a la susceptibilidad y resistencia de las plantas a plagas, concentraciones elevadas de

nitrógeno y bajas concentraciones de potasio aumentan la susceptibilidad de las plantas a los agentes nocivos. (González *et al.*, 2015) La nutrición vegetal de las plantas es uno de los factores más importantes, ya que de este depende el incremento de la producción y rendimiento agrícola, cuyo objetivo principal es el mantener o aumentar la productividad de determinado cultivo para satisfacer la demanda de alimentos y materias primas en el mundo. (Carrión, 2018)

En las plantas el agua cumple múltiples funciones, las células deben tener contacto directo o indirecto con el agua, ya que casi todas las reacciones químicas celulares tienen lugar a un medio acuoso, para que un tejido funcione normalmente requiere estar saturado con agua, manteniendo las células turgentes; todas las sustancias que penetran en las células vegetales deben estar disueltas, ya que en las soluciones se efectúa el intercambio de sustancias nutritivas entre células, órganos y tejidos; el agua como componente del citoplasma vivo, participa en el metabolismo y en todos los procesos bioquímicos, una disminución del contenido hídrico va acompañado por una pérdida de turgencia, marchitamiento y una disminución del alargamiento celular, se cierran los estomas, se reduce la fotosíntesis, la respiración y se interfieren varios procesos metabólicos básicos, lo que ocasiona la desorganización del protoplasma y la muerte de muchos organismos. (Perez, 2017)

Las plantas necesitan algo más que nutrientes para un adecuado desarrollo, habría que definir los elementos químicos que necesitan las plantas; ya que, a diferencia de los animales, las plantas son capaces de tomar elementos químicos o sustancias minerales muy sencillas (iones) para transformarlos en moléculas orgánicas complejas (biomasa) utilizando para ello la energía del sol (fotosíntesis), se requiere actualmente 17 elementos químicos que son esenciales para las plantas en general. (Orús Pueyo *et al.*, 2011)(Tabla 3)

Tabla 3: Macro y micronutrientes importantes en la nutrición vegetal

| Grupo | Elementos | Presencia % (Porcentaje sobre peso seco) | Fuente |
|-----------------|-------------------|--|----------------------|
| Macroelementos | C, H, O | 90-95% | Aire y agua de suelo |
| | N, P, K | 2 al 5 % | Suelo |
| | Ca, Mg, S | 0.5 al 2% | Suelo |
| Micronutrientes | Fe, Cu, Mn, B, Zn | Menos del 0.1% | Suelo |
| | Cl, Mo, Ni | Se duda que el Ni sea esencial para todas las especies | |
| | Co, Si, Na | Solo esencial para algunas especies | |

FUENTE: (Orús Pueyo *et al.* 2011)

2.6.1 Fertilizantes

Los fertilizantes de uso agrícola son materiales orgánicos o inorgánicos, de origen natural como yacimientos minerales o manufacturados en procesos químicos, los cuales tienen como objetivo suministrar a las plantas uno o varios de los elementos nutricionales requeridos para su crecimiento; para que un producto sea considerado como fertilizante es indispensable que sea soluble y químicamente disponible para la planta, debido a que de los 18 elementos nutricionales considerados como esenciales para la planta, 15 de ellos son tomados en solución como iones. La forma química en la cual la planta absorbe todos los nutrientes necesarios para su correcto desarrollo es la misma independiente del material de origen, es decir, no importa si provienen de procesos de mineralización de rocas, descomposición de materiales orgánicos, o fertilizantes minerales, la definición correcta es el de “fertilizantes materiales y no químicos o artificiales”, de esta forma el P y K proceden de yacimientos naturales y el N de la síntesis de nitrógeno atmosférico (Pérez, 2014)

El uso adecuado de los fertilizantes es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la agricultura en la actualidad, si bien los fertilizantes promueven el crecimiento y la producción de los cultivos, en exceso son responsables de graves problemas ambientales como la emisión de gases invernadero, daños a la capa de ozono, como la acidificación y contaminación del suelo y subsecuente de las aguas, lo que causa problemas de eutrofización, lo que ha contribuido con la reducción de la biodiversidad y al malfuncionamiento de los ecosistemas agrícolas, los fertilizantes también representan el mayor coste asociado a la producción de muchos cultivos, lo que aumentara a medida que disminuyan los recursos para la síntesis de fertilizantes. (De La Torre y Cañas, 2014)

Si bien los fertilizantes químicos favorecen el rendimiento en el aumento de las cosechas, pero con el tiempo del uso disminuía la capa orgánica del suelo, los fertilizantes orgánicos se han considerado por diferentes autores un elemento productivo para mitigar el efecto desgaste generado por el uso productivo del suelo. (Corlay *et al.*, 2011)

2.6.2 Fertilizantes minerales o químicos

La fertilización mineral está constituida por compuestos inorgánicos, este tipo de fertilización pretende lograr un aumento en la productividad del sistema agrícola suministrando a las plantas algunos de los elementos esenciales que necesitan mediante productos químicos de síntesis. (Ancín, 2011)

Los fertilizantes nos permiten restituir a los suelos los elementos nutritivos que las plantas extraen, o que los suelos pierden por lavado, retrogradación y erosión, poniendo a disposición de los cultivos los nutrientes que precisan cada momento; los ensayos a largo plazo demuestran claramente la acción de los fertilizantes sobre la productividad de los cultivos (ver Figura 6). Sin embargo, para conseguir su máxima eficiencia, la fertilización debe formar parte de un conjunto integrado de prácticas, los elementos nutritivos que principalmente son aportados por estas técnicas son el Nitrógeno, Fosforo y Potasio. (Vega, 2017)

Los efectos del nitrógeno tienen mayor efecto en el crecimiento, rendimiento y calidad de cultivo que cualquier otro nutriente, pero su uso excesivo puede ser un derroche económico y dar lugar a problemas. (Ancín, 2011)

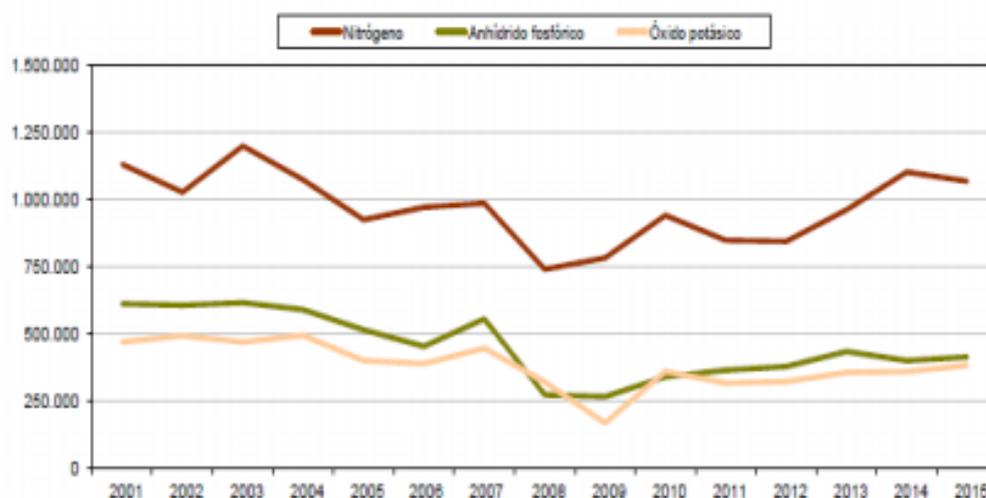


Figura 6. Comparación de la evolución de consumo agrícola de N, P₂O₆ Y K₂O en fertilizantes
FUENTE: (Vega 2017)

Entonces para que se produzca la agricultura con eficiencia y de un alto rendimiento va depender de los fertilizantes nitrogenados, por eso el nitrógeno es considerado el nutriente más importante para la producción vegetal debido a las cantidades requeridas por los cultivos y a la frecuencia con que se observan deficiencias en suelos agrícolas, a su vez es un elemento altamente móvil y por ello se desplaza fácilmente por los distintos compartimentos ambientales: suelo, agua y atmosfera, por lo que el diagnostico de las necesidades de nitrógeno de los cultivos para alcanzar el máximo rendimiento debe estar sujeto a criterios no solo económicos sino de prevención de la contaminación ambiental y su repercusión sobre la salud. (Vega, 2017)

También existen fertilizantes simples y compuestos; los simples contienen únicamente, uno de los tres elementos: Los nitrogenados (Urea, composición es 46-0-0 y sulfato de amonio 20.5-0-0), los fosfatados que son superfosfato de calcio simple (0-20-0), superfosfato de calcio triple (0-46-0) y los potásicos, que son cloruro de potasio (0-0-60) y sulfato de potasio (0-0-50); Entre los más usados son DAP: (18-46-0), Triple (17:17-17-17), nitrato de amonio: (33-03-00), MAP: (11-52-0). Su uso normalmente se basa en mezclas de diferentes fertilizantes, que podría ser sulfato de amonio con superfosfato simple, urea con superfosfato simple y nitrato de amonio con superfosfato simple o triple. (Larqué *et al.*, 2017)

2.6.3 Fertilizantes orgánicos

Para la producción de alimentos en un mundo globalizado requiere la mayor eficacia, además en ajustarse a las leyes de inocuidad para lograr la aceptación de productos logren la aceptación de los mercados nacionales y mundiales; debido a que los sistemas de agricultura convencional están basados en la aplicación de abonos minerales solubles y en muchos casos no se tienen en cuenta los mecanismos de absorción de la planta, los equilibrios existentes entre esta y el suelo, ni los bloqueos o sinergias entre los nutrientes; debido a que las plantas sintetizan sus elementos a partir de elementos químicos que toman del aire, agua y suelo, existen 60 elementos químicos constituyentes de las plantas, de los cuales 16 son esenciales. (González *et al.*, 2015)

También es llamado abono orgánico, que viene a ser residuo animal y/o vegetal más o menos transformado, que posee una cierta riqueza en materia orgánica y que por lo general también contiene elementos esenciales para las plantas. El uso de estos fertilizantes está sujeto a muchas más consideraciones que la de los fertilizantes minerales, se debe tener en cuenta que su materia orgánica podrá alterar el complejo de cambio y la estructura del suelo, así como las propiedades que se derivan de esta última. El otro aspecto a considerar es que su composición es muy irregular, el factor que más influye en ella es el origen del material. (Ancín, 2011)

La utilización correcta de abonos orgánicas está sujeta a muchas consideraciones que la de los fertilizantes minerales, dada su complejidad constitutiva, debe tenerse en cuenta que su materia orgánica podrá alterar el complejo de cambio y la estructura del suelo, así como las propiedades que se derivan de esta última. (Ancín, 2011)

Pero los fertilizantes orgánicos también presenta desventajas, la principal es la baja tasa de asimilación, ya que llevan a cabo todo un proceso para llegar a manifestar sus efectos, pero

la ventaja es que tiene menos efectos secundarios en el caso de excederse en su uso y contiene una mayor cantidad de macro y micro nutrientes, lo que proporciona mayor cantidad de nutrientes a los cultivos, por otro lado mantienen los nutrientes del suelo, también retienen una mayor cantidad de humedad tan necesaria para el desarrollo adecuado de las plantas, de este modo los fertilizantes orgánicos reconstituyen los niveles de materia orgánica del suelo y con esto se incrementa la capacidad para retención de nutrientes minerales que se les aplican, mejorando su estructura y textura, la capacidad de retención de agua a diferencia de los fertilizantes inorgánicos que solo aportan los nutrientes que se necesitan para solucionar el problema de forma inmediata. (García, 2011)

2.6.4 Fertilizantes foliares

La fertilización foliar consiste en la aplicación de una solución con nutrientes directamente al follaje de las plantas para corregir deficiencias específicas de nutrientes en el mismo periodo de desarrollo de cultivo, o también para ayudar a complementar la fertilización realizada en el suelo. El método de la fertilización foliar es considerada como una herramienta importante para el manejo sostenible y productivo de los cultivos, para poder optimizar el tratamiento por vida foliar, hay que tomar en cuenta los principios químicos, físicos, biológicos y ambientales que rigen la absorción y utilización de los nutrientes aplicados mediante aspersiones; aunque el uso de fertilizantes foliares es recomendable cuando las condiciones del suelo limitan la disponibilidad de nutrientes aplicados al suelo, en caso donde haya condiciones que conduzcan a altas pérdidas de nutrientes aplicados al suelo, y cuando interactúan las etapas del crecimiento al cultivo, la demanda interna de la planta y las condiciones ambientales para limitar la entrega de nutrientes a órganos críticos de la planta. (Fernández *et al.*, 2015)

Si bien la aplicación de abonos foliares tiene como finalidad complementar la nutrición de los cultivos, de la misma forma para corregir deficiencias nutricionales en las plantas; si bien fisiológicamente todos los nutrientes minerales pueden ser absorbidos por vía foliar, ya sea con mayor o menor velocidad, teóricamente podría la planta ser satisfecha completamente por vía foliar, pero en la práctica no es posible por su alto costo por el número de aplicaciones, con los fertilizantes foliares no se pretende reemplazar la fertilización del suelo, ya que el abastecimiento de los principales nutrientes como el N, P y K es más efectivo y económico por la fertilización el suelo, pero con la aplicación foliar ha demostrado ser un excelente método para abastecer los requerimientos de los nutrientes secundarios como Ca, Mg y S y los micronutrientes (Zn, Fe, Cu, Mn, Bo y Mo); la nutrición foliar es útil durante

los estados de crecimiento, cuando disminuye la velocidad de fotosíntesis y ocurre una baja absorción de nutrientes vía raíces, en función de ayudar a la translocación de nutrientes hacia la semilla, fruto, tubérculo o crecimiento vegetativo. (Aceves *et al.*, 2020)

2.7 Biofertilizante

Las raíces del término biofertilizante provienen de las palabras biológico y fertilizante, por lo que hace referencia a un fertilizante biológico, el cual contiene microorganismos vivos que mejoran el estatus nutricional de las plantas, mientras que los productos orgánicos como estiércol, residuos de cosecha, composta y vermicomposta que también son agregados al suelo para favorecer su nutrición no son considerados como biofertilizantes sino como fertilizantes orgánicos; los biofertilizantes que también son conocidos como bioinoculantes, inoculantes microbianos o inoculantes en el suelo, son productos agrobiotecnológicos que contienen microorganismos vivos o latentes (bacterias u hongos, solo o combinados) los cuales son agregados a los cultivos agrícolas para estimular su crecimiento y productividad. (Aguado-Santacruz, 2012)

La fertilización biológica se basa en la utilización de insumos naturales (abonos, estiércol animal y microorganismos como hongos, bacterias) para mejorar la fijación de nutrientes en la rizófora, producir estimulantes de crecimiento para las plantas, mejorar la estabilidad del suelo, facilitar el control biológico, biodegradar sustancias, reciclar nutrientes, favorecer la simbiosis micorrizal, desarrollar procesos de biorremediación en suelos contaminados con sustancias tóxicas, xenobióticos, recalcitrantes; con el uso de biofertilizantes se permite mejorar la productividad por área cultivada en corto tiempo, consumir menores cantidades de energía, mitigar la contaminación del suelo y el agua, incrementar la fertilidad del suelo y favorecer el antagonismo y control biológico de organismos fitopatógenos, con esto el agricultor se va beneficiar económicamente debido al efecto de los menores costos asociados al proceso de fertilización y obtención de mayores rendimientos en los cultivos, con la aplicación de fertilizantes biológicos trae consigo beneficios desde perspectivas económica-social y ambiental. (Sebastián *et al.*, 2010)

Los biofertilizantes surgen como una panacea para la agricultura orgánica y sostenible, con esto se busca implementar el número de microorganismos beneficiosos en el suelo con respaldo científico para lograr la sostenibilidad en la agricultura. (Afanador, 2017)

2.7.1 Abono orgánico acelerado o biofermentos

Los abonos tienen organismos vivos que ayudan a mejorar la nutrición del suelo, sin embargo, en su composición, viven también organismos patógenos; los biofertilizantes se producen de manera controlada y libre de otros organismos contaminantes, contienen únicamente microorganismos benéficos para la nutrición de la planta, los fertilizantes funcionan mediante una relación estrecha entre organismos de diferente especie, en este caso, de una planta y un hongo o bacteria. (Larqué *et al.*, 2017)

El uso de los líquidos fermentados o biofermentos se ha venido popularizando como abonos foliares, lo que permitiría la sustitución de algunos de los abonos químicos sintéticos; los biofermentos son productos del proceso de fermentación de materiales orgánicos por medio de una intensa actividad microbiológica, los cuales son transformados en minerales, vitaminas, aminoácidos, ácidos orgánicos que servirán para la nutrición de las plantas, otro beneficio es que disminuye la incidencia de las plagas y enfermedades en los cultivos, esto se debe a la riqueza de los microorganismos presentes en ellos, al ser aplicados sobre la superficies de las plantas, tienen una reacción de competencia con los microorganismos que atacan los cultivos. (Chavez y Guzman, 2009); también en la producción de alimentos como lactobacilos y levaduras, constituyen una de las principales alternativas de las familias productoras orgánicas por su facilidad de elaboración y sus efectos positivos en la nutrición de las plantas y el suelo, los biofermentos son conocidos también como bioles, son abonos líquidos ricos en energía y en equilibrio mineral. (Rodríguez *et al.*, 2017)

El biofertilizante acelerado es producto de la descomposición anaeróbica de la materia orgánica, la cual es transformada por fermentación láctica, de su forma compleja a las más simples por acción del bioprotector (Bio-Lac) compuesto principalmente por bacterias del género *Lactobacillus*, que se encargan de transformar la materia orgánica en sustancias húmicas y en aminoácidos, vitaminas, giberelinas, y minerales complejos; la producción de los biofertilizantes acelerados, se realiza en un ambiente anaerobio a una temperatura promedio de 40°C, por un periodo de 5 días y la cosecha se hace mediante un filtrado, se obtendrá un abono líquido con ausencia relativa de enteropatógenos. (Moreno 2019)

2.7.2 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación; pertenecen a un grupo de bacterias fisiológicamente uniforme, de pared Gram Positiva, anaerobia facultativa, catalasa negativa, y no formadores de esporas, otra de sus

características es que no son móviles, microaerofílicos o aerotolerantes, oxidasa y bencidina negativas, carecen de citocromos, no reducen de nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. (Carmen *et al.*, 2011) En la tecnología de producción de alimentos tienen como función en la formación del sabor ácido, inhibición de organismos patógenos, gelificación de la leche, reducción del contenido de lactosa, formación de aroma, producción de gas requerida para la formación de “ojos” en los quesos y también han sido muy utilizados como probióticos; sus géneros más importantes son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* son los principales miembros de las bacterias ácido lácticas, siendo *Lactobacillus* el más grande de este género. (Parra-Huertas, 2010) La función de las bacterias ácido lácticas y otros microorganismos responsables de las transformaciones alimenticias fueron desconocidos y el éxito de estas operaciones alimentarias estaba sometido a errores y aciertos. (Sáenz, 2008) En la Tabla 2 se puede visualizar la diversidad de Bacterias ácidos lácticos homós y heterofermentativas. Así como, la configuración del ácido láctico producido.

Las bacterias ácido lácticas tienen como función producir ácido láctico del azúcar y de otros hidratos de carbono que producen las bacterias fotosintéticas y la levadura; el ácido láctico actúa como una fuente esterilizadora, ya que inhibe a los microorganismos dañinos y fomenta una rápida descomposición del material orgánico. (Naranjo, 2013) Según Mora y García, 2007 este mecanismo de inhibición de las bacterias ácido lácticas se basa en la disminución del pH, aumentando la proporción de ácidos orgánicos en su forma no disociada, los cuales se disocian en el citoplasma desestabilizando su membrana, el pH ácido causa la desnaturalización de las proteínas y la desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de la célula, pero las bacterias ácido lácticas pueden desarrollarse a pH relativamente bajos, esto debido a que poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y protones al exterior celular. (Buchelli, 2014)

Son microorganismos con requerimientos nutricionales exigentes, al necesitar una gran variedad de sales minerales, vitaminas y aminoácidos, su cultivo sintético es a menudo complejo y muestra un crecimiento escaso, debido en parte a que estas exigencias nutricionales responden a necesidades específicas de cada cepa. (López Seijas, 2017) Las bacterias ácido lácticas que se utilizan para la producción de ácido láctico se busca que sean preferiblemente termófilas, que fermenten rápido y completamente los sustratos baratos, con

adición mínima de nutrientes nitrogenados, que crezcan en valores bajo de pH, que presentan poca producción de biomasa y una despreciable cantidad de subproductos; los géneros más estudiados para este tipo de producción son *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. (García *et al.*, 2010)

En cuanto a su temperatura óptima de crecimiento, se pueden establecer dos grupos de especies:

- Especies mesófilas: cuya temperatura óptima está comprendida en el intervalo de 22 a 34°C, en este se incluye la mayoría de especies de todos los géneros. (Ruiz Pérez, 2010)
- Especies termófilas: con una temperatura óptima entre los 37°C y los 45°C, en este se incluyen algunas especies del género *Lactobacillus*, como *L. bavaricus*, que se utiliza en la fabricación de yogurt, y en algunas del género *Streptococcus* como *S. thermophilus*. (Ruiz Pérez, 2010)

Con respecto a su tolerancia al oxígeno, que aunque por su definición son microaerófilas, es decir solo van a crecer bien con bajas presiones parciales de oxígeno, son generalmente aerotolerantes y la mayoría crecen mejor en atmosferas que contengan entre un 5 y un 10% de CO₂, algunas especies como *L. ruminis* y *L. vitulinus* que viven en el intestino de los animales son anaerobias estrictas. (Ruiz Pérez, 2010)

Las bacterias ácido lácticas presentan gran potencial biotecnológico, son capaces de producir metabolitos con actividad antimicrobiana que exhiben mecanismos inespecíficos (diacetoilo, ácidos orgánicos y peróxido de hidrogeno) o específicos como el caso de las bacteriocinas, que son moléculas antimicrobianas de naturaleza peptídica, con un origen genético diverso, suelen presentar modificaciones postraduccionales y pueden funcionar como una estrategia competitiva contra otros microorganismos. (Parada *et al.*, 2017) Las bacteriocinas generalmente poseen un estrecho espectro antibacterial, así algunas bacteriocinas de BAL pueden inhibir el crecimiento de Gram-positivas patogénicas y bacterias dañinas como también levaduras y especies Gram-negativas; las aplicaciones alimenticias de bacteriocinas son una alternativa para satisfacer el crecimiento de consumidores por la demanda de alimentos que son higiénicamente puros. (Parra-Huertas, 2010) La síntesis de bacteriocinas se produce, generalmente, cuando las bacterias que las sintetizan se encuentran en situaciones de estrés; como es habitual en las rutas metabólicas de los microorganismos, la síntesis de las bacteriocinas también depende del ecosistema, pH, potencial de óxido-reducción, cantidad de nutrientes, fase de crecimiento, temperatura y oxígeno disponible.

(Agudelo *et al.*, 2015) La producción de las bacteriocinas depende del crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora, estando correlacionada a la biomasa obtenida con la cantidad de bacteriocina producida.

La mayoría de las bacteriocinas actúan sobre la membrana de células sensibles, desestabilizando y permeabilizando mediante la formación de canales o poros iónicos, que van a dar salida a compuestos como fosfato, potasio, aminoácidos, ATP, disminuyendo la síntesis de macromoléculas y por consecuencia la muerte celular, (Chávez *et al.*, 2013) La estructura de las bacteriocinas, α -hélice o β -laminar, de dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica, explicaría la formación de poros a partir del mecanismo que según el cual la naturaleza anfótera de la molécula permitiría la formación de oligómeros que atraviesan la membrana; en consecuencia se observa en general una pérdida de iones K^+ , ATP y, en algunos casos aminoácidos y moléculas pequeñas, como se muestra en la Figura 7, la pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida de potencial de membrana, consumo de las reservas energéticas celulares, descenso de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, originando finalmente la muerte celular. (Martin, 2002)

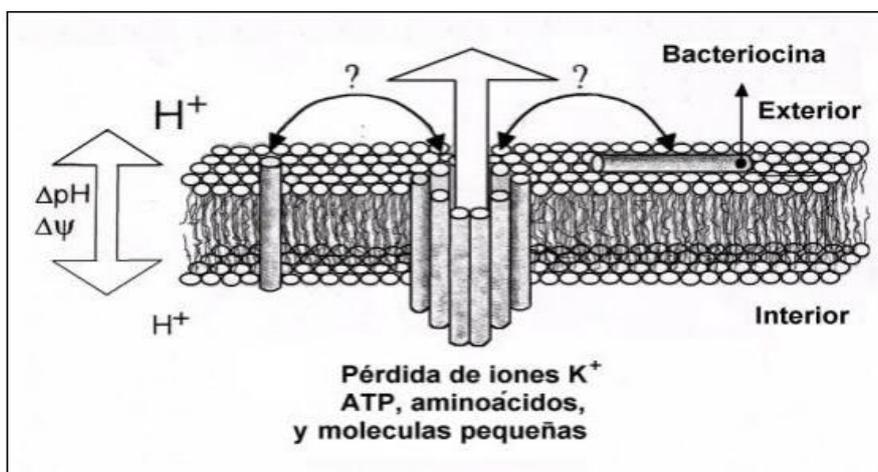


Figura 7. Modelo general del mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos.
FUENTE:(Martin, 2002)

Según sus características bioquímicas, se clasifican en homofermentativas, cuyo único producto final de fermentación es el ácido láctico y en heterofermentativas, aquellas que producen además de ácido láctico, etanol, acetato y CO_2 .(Agudelo *et al.*, 2015) su tipo de metabolismo es propio de cada especie, la cual también sirve como criterio para poder identificarlo; en el metabolismo homoláctico emplea la ruta de Embden-Meyerjorf para obtener un balance global de dos moles de ácido láctico (D o L dependiendo de la especie) y 2 ATPs por mol de glucosa consumida, en esta ruta se divide en dos fases, la primera

incluye todas las reacciones de la glucólisis que conducen a la formación de piruvato y $\text{NADH}+\text{H}^+$; y en la segunda, el piruvato es reducido a ácido láctico tomando los protones del $\text{NADH}+\text{H}^+$ generado anteriormente. El metabolismo homoláctico es empleado por la mayor parte de las bacterias lácticas a excepción de *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* y algunos *Lactobacillus*. (López Seijas, 2017)

En el caso de la fermentación heterofermentativa, las bacterias que emplean este metabolismo no tienen fructosa-difosfato-aldolasa, pero tiene fosfoacetolasa y por lo tanto degradan la glucosa por la vía llamada de pentosas fosfatos o de las hexosas fosfatos, a partir de las hexosas producen cantidades equimolares de ácido láctico, ácido acético, etanol, y dióxido de carbono (CO_2), y degradan las pentosas para obtener ácido acético y ácido láctico. (Ramírez, 2005) En la fermentación heterofermentativa tras la entrada de la molécula de glucosa en el interior celular, esta es fosforilada una vez y oxidada dos veces hasta dar lugar a ribulosa-5-fosfato que puede ser epimerizada bien a ribosa-5-fosfato, componente de biomoléculas tan importantes como el ATP, CoA, ADN o ARN, o bien a xilulosa-5-fosfato; la enzima xilulosa-5-P-fosfoquetolasa cataliza la rotura de esta última molécula en acetil-fosfato y gliceraldehído 3 fosfato; a continuación, la ruta sigue dos vías: por un lado el gliceraldehído-3-fosfato seguirá la misma ruta que en el metabolismo homoláctico, para dar lugar a ácido láctico, mientras que el acetil-fosfato sufre, o bien sucesivas reducciones para dar lugar a etanol o intervención de una molécula de ADP para dar lugar al ATP y acetato, en función de las condiciones del medio en que se encuentre el organismo. (López Seijas, 2017)

El rendimiento energético de ambas rutas es también claramente diferente, las bacterias homofermentadoras son capaces de extraer doble cantidad de energía de la fermentación de la glucosa que la que genera la ruta heterofermentativa, del mismo modo que la cantidad de ácidos producida es mayor en la ruta homofermentativa que en la heterofermentativa. (Ruiz Pérez 2010) Lo mencionado anteriormente se puede evidenciar en la Figura 8:

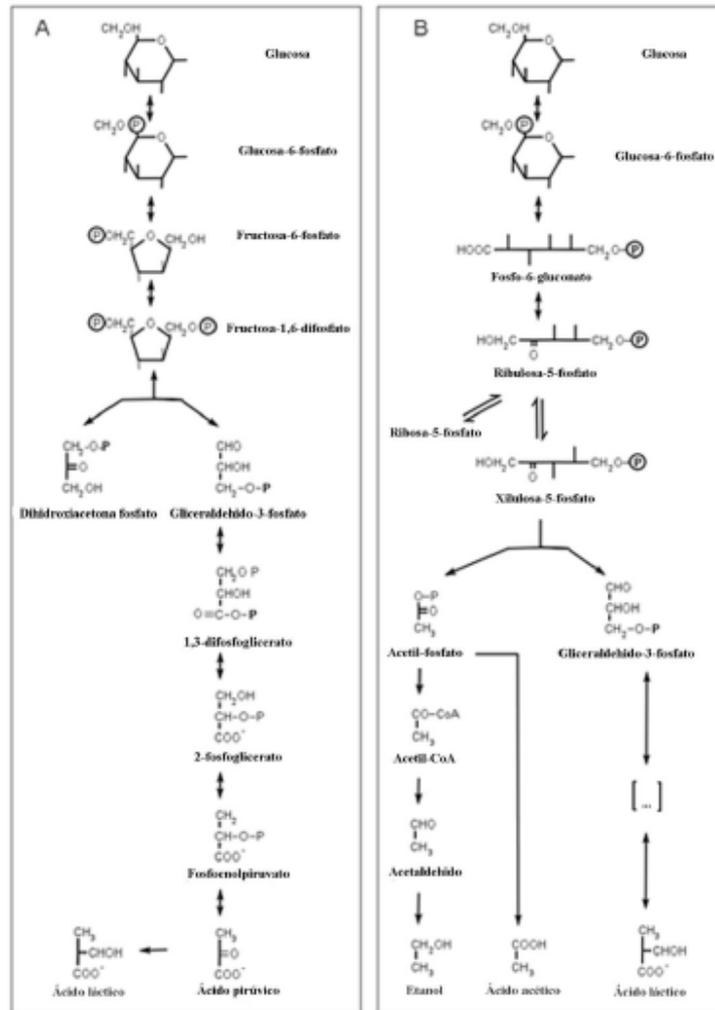


Figura 8. Rutas metabólicas para la fermentación de glucosa en bacterias ácido lácticas. A (Ruta homofermentativa) B (Ruta heterofermentativa)

Tabla 4: Bacterias ácido lácticas *homo* y *heterofermentativas* y su configuración.

| Género y Especie | Homofermentativo | Heterofermentativo | Configuración ácido láctico |
|----------------------------------|------------------|--------------------|-----------------------------|
| <i>Lactobacillus</i> | | | |
| <i>L. delbrueckii</i> | + | - | D (-) |
| <i>L. Lactis</i> | + | - | D (-) |
| <i>L. bulgaricus</i> | + | - | D (-) |
| <i>L. casei</i> | + | - | L (+) |
| <i>L. plantarum</i> | + | - | DL |
| <i>L. cuervatus</i> | + | - | DL |
| <i>L. brevis</i> | - | + | DL |
| <i>L. fermentum</i> | - | + | DL |
| <i>Sporolactobacillus</i> | | | |
| <i>S. inulinus</i> | + | - | D(-) |
| <i>Streptococcus</i> | | | |
| <i>S. cremoris</i> | + | - | L (+) |
| <i>S. lactis</i> | + | - | L (+) |
| <i>Leuconostoc</i> | | | |
| <i>L. mesenteroides</i> | - | + | D (-) |

FUENTE (Garcia *et al.* 2010)

2.7.3 Fermentación ácido láctica

La fermentación reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y produce diversas moléculas orgánicas de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana, como ácido láctico, acético y propiónico. (Ramirez, 2005) Los ácidos ejercen su efecto antimicrobiano en interferencia con el mantenimiento del potencial de membrana celular, inhibiendo el transporte activo, reduciendo el pH intracelular e inhibiendo una variedad de funciones metabólicas; es por eso que tienen una amplia acción inhibiendo tanto a bacterias Gram positivas como Gram negativas, así como también levaduras y mohos. (Sáenz, 2008)

El ácido láctico se denomina ácido 2-hidroxi-propanoico y está formado por los grupos funcionales alcohol y carboxilo, conformando un carbono asimétrico que le confiere su actividad óptica; existen dos isómeros ópticos, como se observa en la Fig. 9 el D (-) láctico y el L (+) láctico y una forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L (+) y D (-) es perjudicial al metabolismo humano y puede generar acidosis y descalcificación. El ácido L (+) láctico es clasificado por la FDA como una sustancia GRAS, generalmente seguro para uso aditivo alimenticio. (García *et al.*, 2010)



Figura 9. Estructuras isoméricas del ácido láctico

2.7.4 Consorcio microbiano Bio-lac (B-lac)

El consorcio de bacterias Biolac (B-Lac) está elaborada por cepas seleccionadas de bacterias probióticas del género *Lactobacillus*. (Gucciones, 2009 citado por (Buchelli, 2014)) Su composición se puede observar en la Tabla 5.

Los mohos, coliformes totales y fecales están ausentes en este consorcio; los *Lactobacillus* inhiben el crecimiento de cualquier microorganismo patógeno mediante la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, bacteriocinas y el pH ácido (alrededor de 3.5) por efecto de la alta concentración de ácidos orgánicos. (Leiva Trujillo, 2018)

Las levaduras están presentes en este consorcio pero no son perjudiciales, y se encargan de la fermentación de azúcares produciendo alcohol o ácido láctico (García 2008 citado por (Buchelli 2014)). El Biolac también contiene bacterias mesófilas variables (3.3×10^4 UFC/ml) capaces de desarrollarse en ambientes a 30°C , las cuales toleran ambientes con pH ácido, a diferencia del resto bacterias, además son mesófitas, aunque son capaces de vivir en un rango de 5°C a 45°C , generalmente su temperatura óptima es de 25°C a 35°C (Martin, 2002 citado por Quiñones, 2012)

Tabla 5: Recuento de UFC

| Análisis Microbiológico | Unidad | Valor |
|---|---------------|-------------------|
| Recuento de <i>Lactobacillus sp</i> | UFC/ml | 7×10^7 |
| Recuento de levaduras | UFC/ml | 2.5×10^5 |
| Recuento de mohos | UFC/ml | <10 |
| Recuento de bacterias mesófilas viables | UFC/ml | 3.3×10^4 |
| Recuento de coliformes totales | NMP/ml | <3 |
| Recuento de coliformes fecales | NMP/ml | <3 |

Los valores < 3 y < 10 indican ausencia de microorganismos

NMP: Número más probable; UFC: Unidades Formadoras de Colonia

FUENTE: (Leiva Trujillo 2018) tomado de Garcia (2008)

2.7.5 Aplicaciones de las bacterias ácido láctica

El desarrollo de estos microorganismos ácido lácticos, y la ausencia de patógenos o alterantes, contribuyen favorablemente en la preservación de los alimentos permitiendo reducir el uso de conservantes químicos y suavizar los tratamientos a los que se someten los alimentos procesados, sin que esto afecte su calidad y seguridad. (Agudelo *et al.*, 2015)

La fermentación de la leche para la elaboración de diversos productos es una práctica muy antigua, la cual seguramente se originó sin intención durante el almacenamiento del alimento; cuando las fermentaciones son realizadas se producen metabolitos como el ácido láctico, etanol, bacteriocinas y muchos otros compuestos que conservan la leche y le imparten características organolépticas distintivas. Existe una variedad de leches fermentadas, en las que interviene un gran número de especies de BAL y algunas levaduras, una de las aplicaciones más conocidas es el yogurt, siendo incluso más consumido que la leche en algunos países. (Carmen *et al.*, 2011)

Tabla 6: Bacterias ácido lácticas en la elaboración de productos lácteos

| Productos | Bacterias principales | Usos |
|-------------------------------------|--|--|
| Yogurt | <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> | Provee sabor, gusto suave y delicado y promueve la cuajada, mejora la digestión, absorción, contribuye a promover la salud |
| Bebidas fermentadas a base de leche | <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Lactobacillus herveticus</i> | Adiciona sabor, contribuye a promover la salud |
| Quesos | <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetilactis</i> | Promueve el cuajado, provee aroma y sabor |
| Mantequilla madurada | <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetilactis</i> | Promueve moderado sabor agrio y aroma |
| Crema acida | <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Leuconostoc cremoris</i> <i>Streptococcus lactis spp</i> , <i>diacetylactis</i> | Promover sabor característico (pequeñas cantidades de acetaldehído y grandes cantidades de diacético) |
| Yakult | <i>Lactobacillus casei</i> | Promueve moderado sabor agrio y aroma. Contribuye a promover la salud |

FUENTE: (Carmen *et al.* 2011)

También se ha visto su aplicación en ensilaje, que es un método de conservación para la mayoría de los forrajes usados en la alimentación del ganado, el cual está basado en la fermentación ácido láctica en estado sólido bajo condiciones anaeróbicas, por este medio de este proceso las BAL nativas presentes en el forraje, o bien acondicionadas como cultivo iniciador, convierten los azúcares solubles en ácidos orgánicos entre los que predomina el ácido láctico. (Carmen *et al.*, 2011) Como resultado el pH disminuye y el forraje es preservado, las BAL que se utilizan como inoculantes son empleadas como aditivos de ensilaje para mejorar la eficiencia en la preservación; entre las BAL las más utilizadas frecuentemente son las especies homofermentativas como *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* y *Pediococcus*, estas son utilizadas por su eficiente utilización de carbohidratos hidrosolubles de las cosechas, la producción intensiva del ácido láctico y

descenso rápido en pH. (Parra-Huertas, 2010) En la Tabla 7 se muestra las principales especies y aplicaciones.

Tabla 7: Utilización de las principales bacterias lácticas

| Genero | Principales especies y aplicaciones |
|------------------------|---|
| <i>Streptococcus</i> | <i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> . Mantequilla, queso, yogurt. <i>S. thermophilus</i> . Yogurt, queso |
| <i>Pediococcus</i> | <i>P. cerevisiae</i> . Cerveza, carne procesada. <i>P. halophilus</i> . Salsa de soya |
| <i>Leuconostoc</i> | <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. citrovorum</i> . Alimentos fermentados, producción de dextran |
| <i>Lactobacillus</i> | <i>L. bulgaricus</i> . Yogurt, bebidas fermentadas a base de leche. <i>L. helveticus</i> . Queso, yogurt, bebidas a base de leche fermentada. <i>L. acidophilus</i> . Yogurt, bebidas a base de leche fermentada, preparación de <i>Lactobacillus</i> . <i>L. casei</i> . Quesos, leche refinada, bebidas a base de leche fermentada, preparación de <i>Lactobacillus</i> . <i>L. plantarum</i> . Diversos alimentos fermentados, ensilajes. <i>L. fermenti</i> , <i>L. brevis</i> . Productos fermentados |
| <i>Bifidobacterium</i> | <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. adolescents</i> . Leche fermentada, preparación de bacterias lácticas. El intestino de infantes y adultos. <i>B. thermophilum</i> , <i>B. Pseudolongum</i> . El intestino de animales |

FUENTE: (Carmen *et al.* 2011)

2.8 Melaza de caña de azúcar

La melaza de caña de azúcar, miel o melaza “blackstrap” es un líquido denso, viscoso de color oscuro y que contiene sales y otros compuestos solubles en álcali, es un producto final de la fabricación o refinación de la sacarosa, glucosa y fructosa procedente de la caña de azúcar, además contienen sustancias no fermentables y melanoidinas (a base de nitrógeno), derivados a partir de la condensación del azúcar y amino compuestos; este subproducto es comúnmente destinado para la producción de alimentos concentrados de animales y como suplemento alimenticio. (Ossa *et al.*, 2010) La denominación melaza se aplica al efluente final obtenido en la preparación del azúcar mediante la cristalización repetida, el proceso de evaporación y cristalización es usualmente repetido tres veces hasta el punto en el cual el azúcar invertido y la alta viscosidad de las melazas ya no permitan una cristalización adicional de la sacarosa, además de la sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa los cuales son

fermentables, las melazas también contienen sustancias reductoras no fermentables como se observa en la Tabla 8. (Fajardo y Sarmiento, 2014) Las melazas de caña de azúcar son ligeramente acidas, pH de 5.5 a 6.5, su bajo pH se debe a la presencia de ácidos alifáticos y al bajo pH en que se hace la clarificación; también posee alrededor de 14 a 25% de hidratos de carbono como azúcar invertido por proceso de fabricación, el cual no tiene efecto significativo en la formación de estas si se mantienen los valores normales de sales solubles, pero carece de rafinosa. (Valencia y Zapata, 2014)

Tabla 8: Contenido nutricional de melaza de caña

| COMPONENTES | CONSTITUYENTES | CONTENIDO (p/p) |
|--------------------------|---|-----------------|
| Componentes mayores | Materia seca | 78% |
| | Proteínas | 3% |
| | Sacarosa | 60-63% p/p |
| | Azúcares reductores | 3-5% p/p |
| | Sustancias disueltas (diferentes azúcares) | 4-8% p/p |
| | Agua | 16% |
| | Grasas | 0.40% |
| | Cenizas | 9% |
| | Contenido de minerales | Calcio |
| Magnesio | | 0.35 % |
| Fosforo | | 0.08 % |
| Potasio | | 3.67 % |
| Contenido de aminoácidos | Glicina | 0.10 % |
| | Leucina | 0.01 % |
| | Lisina | 0.01 % |
| | Treonina | 0.06 % |
| | Valina | 0.02 % |
| Contenidos de Vitaminas | Colina | 600 ppm |
| | Niacina | 48.86 ppm |
| | Ácido Pantoténico | 42.90 ppm |
| | Piridoxina | 44 ppm |
| | Riboflavina | 4.40 ppm |
| | Tiamina | 0.88 ppm |

FUENTE: Tellez y Yepez citados por (Fajardo y Sarmiento 2014)

2.9 Ensayo de fitotoxicidad con semillas de lechuga

Los bioensayos con plantas están siendo considerados, de manera creciente, para el diagnóstico ecotoxicológico, ya que constituyen una excelente herramienta en la evaluación del riesgo ambiental; representan una metodología ventajosa al brindar información acerca de alguna sustancia que resulte tóxica en el medio, es decir, algún agente que pueda producir un efecto adverso en el sistema biológico, dañar su estructura o función, o producir la muerte. (Pentreath *et al.*, 2015)

Los ensayos de toxicidad basados en la germinación de semillas y la elongación radical pueden realizarse con diversas especies que incluyen plantas de importancia económica, que son de fácil acceso y que, además, germinan y crecen rápidamente; la aplicación de la prueba se suele realizar como ensayo único de toxicidad o a través de una batería de pruebas como bioindicadores. (Rodríguez Romero *et al.*, 2014) En ensayo ecotoxicológico con semillas es recomendable, ya que presenta algunas ventajas sobre otros ensayos porque permite usar cuantitativamente el crecimiento de la raíz, el ensayo de la germinación y elongación de la radícula se realiza con los constituyentes solubles del agua (aguas superficiales, aguas subterráneas, suelos, sedimentos y lixiviados), teniendo en cuenta, para el resultado, la cantidad de semillas germinadas y la media del crecimiento de la raíz. (Pentreath *et al.*, 2015) En el bioensayo con semillas de *Latuca sativa* se evalúan los efectos fitotóxicos de un compuesto puro o de una mezcla compleja en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de la plántula durante los primeros días de crecimiento, durante el periodo de germinación ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir en su sobrevivencia y desarrollo normal de la planta, por lo tanto es una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. (Sobrero, 2017)

A fin de determinar la fitotoxicidad se calculará el IG (Índice de Germinación) que integra el % relativo de germinación (PGR) y el crecimiento relativo de las raíces (CRR). (Pentreath *et al.* 2015)

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

$$PGR = \frac{\text{Numero de semillas germinadas en la muestra}}{\text{Numero de semillas germinadas en el control}} \times 100$$

$$CRR = \frac{\text{Elongación de radículas en la muestra}}{\text{Elongación de radículas en el control}} \times 100$$

Con el Índice de Germinación (IG), integrando el porcentaje relativo de germinación y el crecimiento relativo de raíces, lo que permite establecer tres niveles de fitotoxicidad. Zucconi *et al* citado por (Varnero *et al.*, 2007)

IG ≥ 80% No hay sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración (baja fitotoxicidad)

50 ≤ IG ≤ 80 % Presencia moderada de sustancias fitotóxicas (moderada fitotoxicidad)

IG ≤ 50 % Fuerte presencia de sustancias fitotóxicas (alta fitotoxicidad)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar y periodo de ejecución

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental-Biorremediación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina, durante los meses de abril y octubre del 2019. En estas instalaciones se elaboró un biofertilizante a partir del efluente proveniente del proceso de desamargado del proyecto de investigación “Investigación Biotecnológica de la Cadena Productiva del Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) mediante la innovación fitotécnica de 30 ecotipos, procesamiento integral del grano y validación de métodos de análisis cualitativo y cuantitativo de alcaloides y proteínas”, para la comercialización del chocho o tarwi que se desarrolló en las instalaciones del INDAA.

3.2 Materiales

El material principal en esta investigación fue el efluente de tarwi, al cual se le hicieron varios tratamientos en distintas proporciones con melaza (residuo industrial) y consorcio microbiano ácido láctico Bio-lac (producto biotecnológico) para el proceso de fermentación. Los materiales, demás equipos y reactivos estuvieron a disposición en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental-Biorremediación.

a. Insumos

- Efluente del proceso de desamargado de tarwi
- Consorcio microbiano ácido láctico (Bio-lac) NOGA FER PERU SAC
- Melaza
- Semillas de lechuga (*Latuca sativa*) variedad “Tasna”

b. Materiales

- Vasijas de 1 Kg con tapa
- Bidones de plástico de 20 L
- Bolsas de plástico de 5 L
- Solución buffer de pH 7.01 HANNA Instruments HI 7007

- Solución buffer de pH 4.01 HANNA Instruments HI 7007
- Bureta de vidrio de 25 ml
- Soluciones de hidróxido de sodio a 0.05 N, 1L
- Probeta de 50 ml
- Vasos precipitados (100 ml)
- Tubos Falcon de 50 ml
- Tubos Corning de 30 ml
- Guantes quirúrgicos talla S
- Papel toalla
- Agua de mesa
- Etiquetas autoadhesivas
- Marcadores indelebles
- Micropipetas de 100 uL (Marca CAPP)
- Tubos de ensayo
- Pipetas de vidrio de 1 ml
- Papel filtro
- Placas Petri de 10 cm de diámetro
- Pinzas
- Papel toalla
- Pipetas de 5 ml
- Probetas de 50 ml
- Vasos precipitados de 100 ml

c. Equipos

- Estufa eléctrica
- Potenciómetro (HANNA Instruments modelo HI8424)
- Secadora manual (Marca Oster)
- Balanza electrónica de capacidad de 20 Kg (Marca HENKEL)
- Balanza de precisión de 200 g. (Electronic Escalé)
- Conductímetro (HANNA INSTRUMENTS)
- Agitador magnético (HYTREL HTR 8068)
- Barra magnética
- Soporte universal

d. Reactivos

- Hidróxido de sodio (NaOH) solido (JT BAKER)
- Reactivo de Dragendorf reagent spray solution (JT BAKER)
- Agua de mesa
- Ácido clorhídrico (HCl) al 36.5-38% (JT BAKER)

3.3 Metodología de la investigación

La recolección del efluente se realizó en dos tiempos:

1era fecha: Recolección de efluente en dos bidones de 20 L, como se observa en la Figura 11 (Tratamientos a nivel laboratorio)

2 da fecha: La segunda colecta se hizo al mes siguiente de la primera fecha, en dos bidones de 20 L. (Réplica del mejor tratamiento)

En la Figura 10 se puede observar a las semillas de tarwi luego de ser remojado, como parte del proceso de desamargado para finalmente obtener el subproducto que se observa en la Figura 11.



Figura 10. Muestra de Tarwi después de remojo (*Lupinus mutabilis*)



Figura 11. Subproducto: Desamargado de tarwi (*Lupinus mutabilis*)

- **Primera etapa: Fermentación a escala laboratorio de abono líquido**

Durante esta etapa se evaluó los criterios para seleccionar al mejor tratamiento con las mezclas adecuadas del efluente con melaza y Bio-lac. Un criterio importante fue la evolución de pH y acidez, que son los indicadores de la fermentación homoláctica, también se evaluó las propiedades organolépticas, presencia de mohos y levaduras. Una finalizada esta etapa se procesó los datos tomando en cuenta los criterios establecidos. En la Figura 12 se muestra el flujograma para el procedimiento.

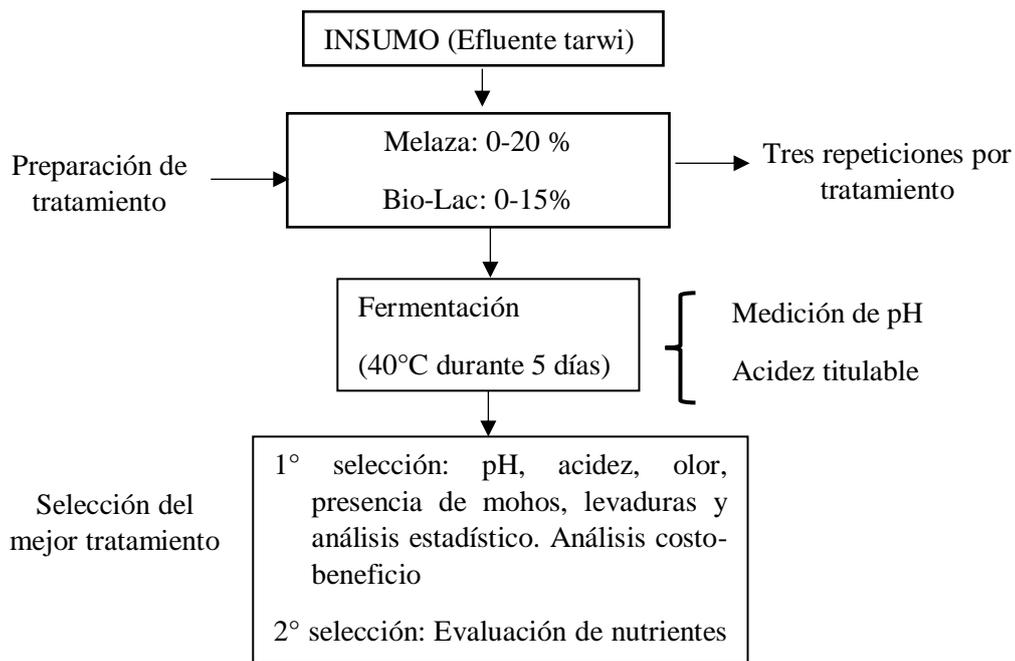


Figura 12. Flujograma para llevar a cabo el proceso

3.3.1 Metodología para el análisis de pH y acidez titulable de los tratamientos (Escala laboratorio)

A. Acondicionamiento de los insumos para los tratamientos

En el acondicionamiento se adecuó los insumos para conocer la proporción de la mezcla adecuada y que presente mejores condiciones iniciales. En la Tabla 9 se observa los criterios establecidos para la clasificación de los tratamientos según sus propiedades organolépticas.

Tabla 9: Parámetros organolépticos

| Propiedad Organoléptica | Calificación | |
|-------------------------|--------------|-------------------------------|
| | Aceptable | No aceptable |
| Olor | Moderado | Fétido, putrefacto |
| Consistencia | Líquida | Semilíquida, sedimentación |
| Color | Oscuro | Clara |

B. Preparación de los tratamientos

Se hizo un cálculo de las proporciones de las mezclas para determinar la cantidad exacta de los insumos en cada tratamiento. Esto se generó con la combinación de cuatro niveles de Bio-lac y cinco de melaza, las cuales se observan en Tabla 10.

Tabla 10: Proporción para los tratamientos

| | | MELAZA | | | | |
|---------|-----|----------|---------|---------|---------|---------|
| | | 0% | 5% | 10% | 15% | 20% |
| BIO-LAC | 0% | E (100%) | E (95%) | E (90%) | E (85%) | E (80%) |
| | 5% | E (95%) | E (90%) | E (85%) | E (80%) | E (75%) |
| | 10% | E (90%) | E (85%) | E (80%) | E (75%) | E (70%) |
| | 15% | E (85%) | E (80%) | E (75%) | E (70%) | E (65%) |

Luego de haber calculado las proporciones en porcentajes para cada insumo, se procedió a pesar en una balanza a los insumos. La composición de los tratamientos se observa en la Tabla 11.

Se obtuvo esta composición luego de los cálculos:

Tabla 11: Composición de los tratamientos

| | Tratamientos | | | Peso Final (g) de los tratamientos |
|---------------------|--------------|--------|----------|---------------------------------------|
| | Bio-lac | Melaza | Efluente | |
| T0 (Control) | 0 | 0 | 600 | 600 |
| T1 | 30 | 0 | 570 | 600 |
| T2 | 60 | 0 | 540 | 600 |
| T3 | 90 | 0 | 510 | 600 |
| T4 | 0 | 30 | 570 | 600 |
| T5 | 30 | 30 | 540 | 600 |
| T6 | 60 | 30 | 510 | 600 |
| T7 | 90 | 30 | 480 | 600 |
| T9 | 30 | 60 | 510 | 600 |
| T10 | 60 | 60 | 480 | 600 |
| T11 | 90 | 60 | 450 | 600 |
| T13 | 30 | 90 | 480 | 600 |
| T14 | 60 | 90 | 450 | 600 |
| T15 | 90 | 90 | 420 | 600 |
| T17 | 30 | 120 | 450 | 600 |
| T18 | 60 | 120 | 420 | 600 |
| T19 | 90 | 120 | 390 | 600 |

Se trabajaron diecinueve tratamientos cada uno con tres repeticiones y un tratamiento control (T0) que solo contaba con efluente solo sin tratar.

En la Figura 13 se observa cómo se acondicionaron los tratamientos, estos fueron envasados en vasijas de plástico con capacidad de 1 Kg. Cada insumo se pesó en una balanza con capacidad de 2000 g. ya que el peso de cada tratamiento fue de 600 g. al cual se le cubrió con bolsa de plástico y se selló con sus respectivas tapas para darle condiciones anaeróbicas, previamente se homogenizo la mezcla con una bagueta. Todos estos tratamientos fueron incubados en una estufa a 40°C durante 30 días. La mezcla final se denominó “Tarwifer” (efluente con melaza y consorcio microbiano ácido láctico)

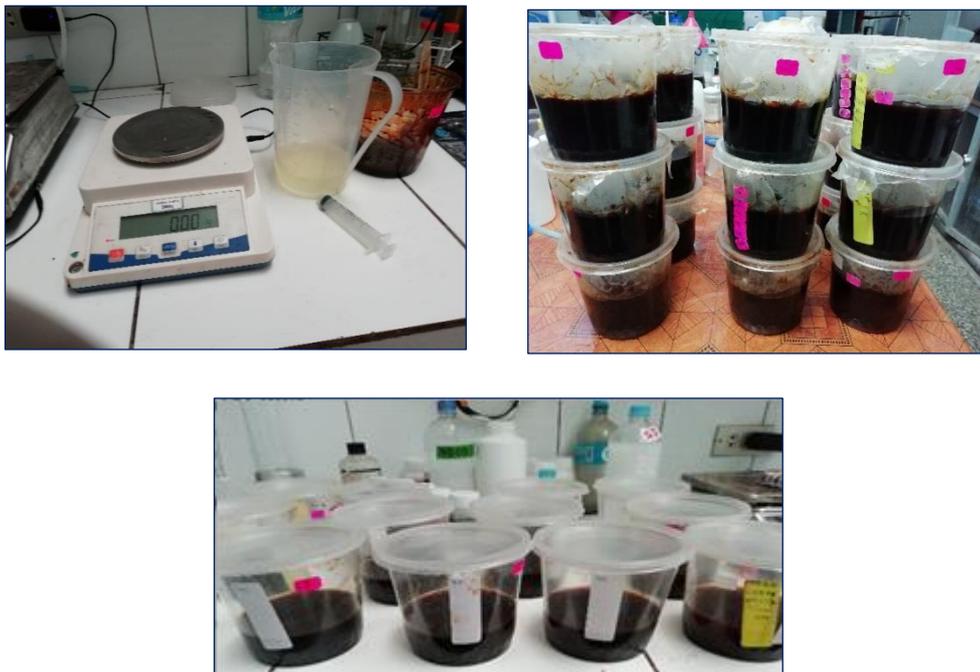


Figura 13. Elaboración de los tratamientos a escala laboratorio

C. Evaluación de pH

Durante cinco días se evaluó la evolución del pH, incluido el primer día que se realizó el tratamiento tomando el dato como día cero. Se evaluó los cinco días de forma continua, luego el décimo día, vigésimo día y finalmente el trigésimo día. Esta evaluación de pH se realizó para seleccionar el mejor tratamiento, el cual cumpla con un pH adecuado (por debajo de cuatro)

El pH se midió con el potenciómetro (HANNA Instruments modelo HI HI8424) y se calibró el potenciómetro con dos buffers, el primero con un buffer 4.01 y el segundo con un buffer 7.01, la medición se realizó por inmersión del electrodo en la muestra, como se observa en la Figura 14.



Figura 14: Evolución de pH

D. Evaluación de porcentaje de acidez

El porcentaje de acidez titulable de las muestras se determinó mediante el método estandarizado 942.15 de la AOAC (2000).

Para esta medición se diluyeron 1 gramo de muestra (para el cual se usó una balanza analítica para pesar) en 50 mL de agua destilada, pero como las muestras poseen color (Figura 15) no se le agregó fenolftaleína, ya que no se podía observar cuando viraba de color, entonces se introdujo el potenciómetro hasta que llegue a un pH de 8.1 ± 0.2 para ser titulado con (NaOH) de 0.05 N, ya que a este pH el indicador vira al color magenta o rojo grosella. Los datos se reemplazan en la siguiente fórmula:

$$\%acidez\ titulable: \frac{G \times N \times f}{m} \times 100$$

Donde:

G= Gasto de NaOH (ml)

N=Normalidad de NaOH

m: Masa de la muestra (gramos)

f: Factor de conversión para ácido láctico equivalente a 0.09



Figura 15. Evolución de porcentaje de acidez

3.3.2 Selección del mejor tratamiento

Para la selección del tratamiento se consideró aspectos como el consumo del residuo (el que tenga mayor proporción del efluente), la estabilidad del pH, el tratamiento que posea mejor equilibrio entre pH y acidez. Los criterios para la selección del mejor tratamiento se establecen en la Tabla 12.

También se tomó en cuenta si hay presencia de capas de mohos y levaduras, la evolución de sus propiedades organolépticas, ya que un olor fétido es indicativo de la carga microbiana patógena como el caso de los Coliformes, *Salmonella*, *Yersinia*, *Stapylococcus*, etc., que afectan el proceso fermentativo, en cambio olores agradables y aromáticos son indicativos de la alta concentración de ácidos orgánicos, y de aromatizantes sintetizados por bacterias lácticas. (Robalino, 2011)

Otro indicador a considerar fue el color ya que las muestras oscuras retienen más radiación solar, controlando la termorregulación y la eficiencia fotosintética en las plantas cuando se le aplique vía foliar o radicular. (Quiñones, 2012)

Tabla 12. Criterios para la selección del mejor tratamiento

| Parámetro | Calificación | |
|---|---|--|
| | Aceptable | Inaceptable |
| | Primera Selección | |
| pH (Día 5) | pH < 4 | pH > 4 |
| Olor | Agradable | Desagradable |
| Presencia de microorganismos como mohos o levaduras | Ausencia | Presencia |
| Análisis Estadístico | $\alpha \geq 0.05$ Se rechaza hipótesis nula | $\alpha \leq 0.05$ Se acepta hipótesis nula |

A. Análisis Estadístico

El pH y la acidez se midieron de forma seguida a los 57 biofermentos durante cinco días, incluido los tratamientos que contenían Biolac-efluente (B-E) o Melaza-efluente (M-E) para ver el comportamiento del efluente con Bio-lac o melaza. Para el análisis no se consideró el control, ni las duplas que contenían B-E y M-E, ya que este alteraba los parámetros. Se analizó mediante un análisis de varianza (ANOVA), bajo un diseño completo al azar (DCA)

con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Con nivel de significancia de 5% y se empleó el software R.

Segunda etapa: Fermentación a escala piloto

Para la réplica a escala piloto se escogió el mejor tratamiento que resulto de la primera etapa, previamente se hizo una evaluación fisicoquímica del efluente de tarwi y también una caracterización cualitativa de los alcaloides, el cual se comparó con el producto final obtenido del bioreactor, su efecto fitotóxico fue evaluado en semillas de *Latuca sativa* y en nematodos.

Para la escala piloto se escogió el tratamiento T9, el cual contenía 85% de efluente, 10% de melaza y 5% de Biolac. En la Figura 16 se observa los insumos que se utilizó para la preparación a escala reactor, los cuales fueron pesadas en una balanza electrónica con capacidad de 20 Kg, ya que en la escala piloto se produjo 20 litros de “tarwifer”

La fase piloto se realizó a 40°C y también una réplica a temperatura ambiente como un control de la escala piloto. También se evaluó la evolución de pH y porcentaje de acidez durante cinco días después.



Figura 16 Preparación a escala reactor del tratamiento seleccionado

3.3.3 Evaluación de las características iniciales de los insumos

Estas evaluaciones se realizaron para saber sus condiciones iniciales del efluente y compararlo con el producto final “tarwifer”.

A. Análisis Físicoquímico

El efluente de chocho sin tratar fue enviado al Laboratorio de Análisis de Suelos, Agua y Fertilizantes (LASPAF) de la Facultad de Agronomía de la UNALM. Se envió 1 Litro de muestra para conocer las características físicas, composición nutricional (N, P, K, CaO, MgO, Na, Fe, Cu, Zn, Mn, B) y de metales pesados (Pb, Cd y Cr)

B. Caracterización cualitativa de alcaloides

Para la caracterización cualitativa con Dragendorff las muestras deberán ser acidificadas, ya que los alcaloides tienen que estar en medio ácidos para que se dé la reacción y puedan ser revelados con el reactivo de Dragendorff. (García Carvajal y Espinosa-Andrews 2017)

En la técnica de revelado con Dragendorff la formación de precipitados y cambios de color indican la presencia o ausencia de alcaloides en la muestra. (Gutiérrez-Pineda *et al.* 2020). Con una micropipeta se tomó 10 uL de cada tubo y se concentró la muestra sobre papel filtro y se realizó un secado para que luego se haga el revelado con el reactivo de Dragendorff. (Ver imágenes Anexo N°9)

La reacción de Dragendorff es positiva si después del secado se forma un marco medio marrón alrededor de la muestra.

3.3.4 Análisis de pH y acidez titulable de la réplica del mejor tratamiento (escala piloto)

Se evaluó del mismo modo que de los ensayos a escala laboratorio, el pH se midió de forma directa con un potenciómetro calibrando este con un buffer de 4.01 y 7.07, durante 5 días.

Para medir la acidez, también se midió durante 5 días, de la misma forma en la que se midió en la fase laboratorio descrito en el acápite 3.3.1 (D)

3.3.5 Evaluación de la calidad del biofertilizante a escala piloto

A. Análisis Físicoquímico

Al finalizar la etapa piloto, se mandó a realizar el análisis físicoquímico de la mezcla final “Tarwifer” (efluente con consorcio microbiano ácido láctico y melaza) y el efluente de chocho sin ningún tratamiento para poder conocer las características físicas, composición

nutricional (N, P, K, CaO, MgO, Na, Fe, Cu, Zn, Mn, B) y de metales pesados (Pb, Cd y Cr) en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Agua y Fertilizantes (LASPAF) de la Facultad de Agronomía de la UNALM.

B. Análisis Microbiológico

También se mandó a realizar el análisis microbiológico del producto de la mezcla final “Tarwifer” de la fase piloto. Este análisis se realizó en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnológica “Marino Tabusso” del departamento de Biología de la UNALM.

Se evaluó el recuento de mohos y levaduras, junto con el recuento de bacterias ácido láctica, enumeración de coliformes totales y fecales.

C. Análisis en Nematodos

Este análisis se evaluó en *Meloidogyne incognita* en fase J2, para confirmar su actividad nematicida del “Tarwifer”.

D. Análisis Costo-Beneficio

Este análisis también se tomó como criterio para poder saber cuál de los tratamientos es económicamente viable para poder llevarlo a escala y que no sea muy costoso.

E. Inocuidad

Esto se hizo para verificar su calidad, como cualidad para que no cause daño a la vida humana, tanto en su cantidad de materiales pesados y que la concentración de coliformes esté debajo del límite permisible establecido.

3.3.6 Evaluación fitotóxica del biofertilizante

a. Preparación de diluciones

Las diluciones que se realizaron son: 0:100 (control), 0.001:100, 0.01:100, 1:100, 10:100, 100:100 (producto concentrado sin diluir) y el control se preparó con agua de mesa (marca Cielo), las diluciones también se hicieron con el agua de mesa. También se tomó el pH de las diluciones y del control.

También se midió la conductividad de las soluciones y el control con un conductímetro.

b. Desarrollo de la prueba de fitotoxicidad

Se colocó en una placa Petri, con papel toalla al cual se le añadió 4 mL de cada dilución, el cual tuvo tres repeticiones. En cada placa se colocó 20 semillas con una pinza con un espacio moderado entre las semillas para permitir la elongación de las raíces. Cada placa fue tapada de forma cuidadosa y se colocó dentro de una bolsa negra para darle oscuridad y que no pierda humedad, esta prueba se evaluó después de cinco días (120 horas).

Se realizó 3 repeticiones, en total se necesitó 21 placas.

Para determinar la fitotoxicidad se calculó el índice de germinación (IG) que integra el porcentaje relativo de germinación (PGR) y el crecimiento relativo de las raíces. (Pentreath *et al.*, 2015)

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

$$PGR = \frac{\text{Numero de semillas germinadas en la muestra}}{\text{Numero de semillas germinadas en el control}} \times 100$$

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

3.3.3. Evaluación nematicida del biofertilizante Tarwifer

Se realizó una prueba *in vitro* en *Meloidogyne incognita* para prueba de mortandad en J2. Para esta prueba se usaron masas mucilaginosas de la especie mencionada expuestas en agua destilada durante tres días para la obtención de Juveniles 2, en movimiento activo. Las pruebas se realizaron con el nematodo del género *Meloidogyne*, ya que esta especie es de tipo de endoparásito sedentario, que al emerger del huevo los juveniles invaden las raíces de sus hospederos e inducen la formación de células gigantes que utilizan para su alimentación, en los cultivos de tomate penetra las raíces y migra hacia el tejido vascular donde produce una serie de cambios fisiológicos y morfológicos que impiden la absorción de agua y nutrientes esenciales para su desarrollo normal. (Salazar-Antón y Guzmán-Hernández, 2014) (Ver imagen de la fase J2 en el Anexo)

Se colectaron 20 J2 para cada repetición de los tratamientos. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones y se evaluaron siete tratamientos. Cada repetición fue instalada en un pocillo de una placa de cultivo celular.

Tabla 13: Concentración de los tratamientos

| Tratamiento | Producto | Concentración |
|--------------------|-----------------|----------------------|
| T0 | Agua | - |
| T1 | Ch | 2.5 % |
| T2 | Ch | 1 |
| T3 | Ch | 0.5% |

Luego de 48 horas de ser sumergidos en la solución-tratamiento correspondiente, se contabilizo el número de J2 móviles e inmóviles (la movilidad será el criterio a evaluar para probar el efecto nematicida). Posteriormente todos los J2 fueron colectados (pescados) y llevados a nuevos pocillos con agua destilada, donde esperaron 48 horas más para ser evaluados en su movilidad. Si los J2 inicialmente estuvieron inmóviles y luego sumergidos en agua destilada, si reactivan su movimiento, significa que el producto a prueba es un nemastático, caso contrario se le considera un nematicida.

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA), se realizó un ANVA y una prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia del 0.05% usando el software infoStat.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVALUACIÓN DEL PROCESO DE ACIDIFICACIÓN DE LA FERMENTACIÓN

4.1.1. Análisis de pH y porcentaje de acidez titulable en Fase de Laboratorio

En esta etapa se analizaron los resultados de los tratamientos para seleccionar el mejor tratamiento.

4.1.2. Análisis de pH y acidez

Tabla 14: Valores de pH de los componentes

| | Componente | pH |
|---------------------|----------------|------|
| Tratamiento | Melaza | 4.84 |
| | Bio-Lac | 3.77 |
| Unidad Experimental | Efluente tarwi | 4.89 |

En la Tabla 14 se observa los valores de pH iniciales de los insumos. Como se observa el pH que se obtiene de la melaza es ligeramente ácido 4.84, encontrándose fuera de su rango que es de 5.5 y 6.5 según Swan y Karalazos, citado por (Fajardo y Sarmiento, 2014), esta ligera acidez puede atribuirse a la presencia de ácidos alifáticos y al bajo pH de la clarificación, aunque el pH de las melazas suelen cambiar con la temperatura y depende también de la naturaleza y de la cantidad de material estabilizador de pH que posea.

El valor del pH del consorcio microbiano Bio-Lac es 3.77 por debajo de 4, esto debido a las BAL (bacterias ácido lácticas) ya que desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación, esta propiedad de acidificar es la que inhibe el crecimiento de esporas, porque producen ácido láctico como el principal metabolito. (Parra-Huertas, 2010) Estos microorganismos producen sustancias antimicrobianas como el ácido acético y el ácido láctico, que resulta luego de la fermentación de carbohidratos presente en los medios de cultivo, lo que provoca una caída de pH lo cual le otorga el carácter ácido de este consorcio (Agudelo *et al.*, 2015) Gracias también a la presencia de ácido láctico es que puede preservar sus propiedades organolépticas como el olor y el color.

En el caso del efluente se observa que posee un pH 4.89, ya que al pasar el proceso de remojo los alcaloides se quedan en el agua, estos compuestos tienen propiedades alcalinas debido a la presencia de nitrógeno básico formado por lo general núcleos heterocíclicos, de forma libre son insolubles en agua. (Fernandez, 2017)

- Análisis de pH del tratamiento control (T0)

En la Tabla 15 observamos en los resultados del tratamiento control (T0), el efluente conforme pasa los días se van alcalinizando. Como se cita en el párrafo anterior debido a sus propiedades alcalinas va aumentando el pH ya que en el agua de forma libre es insoluble, alcanzando un pH de 6.62 en el día cinco, incluso sus propiedades organolépticas se ven afectadas ya que presentan un olor fétido.

Tabla 15: Resultado de pH del control

| Tratamiento | B-LAC | Melaza | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------|-------|--------|------|------|------|------|------|------|
| | 0% | 0% | 4.89 | 4.90 | 4.96 | 5.35 | 6.03 | 6.62 |

Fue un total de veinte tratamientos, incluido el control (T0), de los diecinueve tratamientos se trabajó un bloque de melaza con fluente (M-E) y Biolac con efluente, (B-E) para ver el comportamiento del efluente, y cómo influye el pH y el porcentaje de acidez. (Resultados de todos los tratamientos incluidos los controles en el anexo N°2) Para el análisis estadístico solo se consideraron doce tratamientos los cuales figuran en la Tabla. 16, ya que los demás tratamientos eran los bloques (M-E) y (B-E) y alteraban los parámetros estadísticos.

- Análisis de los resultados de pH de los tratamientos

En la Tabla. 16 se observa el proceso de acidificación, al inicio los resultados variaban mucho, hasta lograr cierta tendencia a un descenso de pH conforme avanzaba el tiempo. En la fase laboratorio se tomó en cuenta los valores de los primeros cinco días. De estos tratamientos hasta el día cinco los mejores resultados de pH fueron los tratamientos T9 y T19 presentando los más bajos niveles de pH con 3.17 y 3.47 respectivamente, manteniéndose debajo del pH 4, y más estable hasta el día 30 (anexo) y en la Figura 17 se observa la tendencia a mantener el pH por debajo de 4. Su comportamiento se confirma con base estadística mediante la prueba de comparación múltiple (prueba de Tukey) aplicado al quinto día, el nivel más bajo se observó con el tratamiento que usa 10% de melaza con 5% de Biolac, mientras que el otro tratamiento T19 que también mostró diferencia significativa

uso 20% de melaza y 15% de Biolac, hasta el día 30, el T9 fue el que más tuvo tendencia a mantener el pH bajo como se observa en el análisis estadístico (fig. 18).

Tabla 16 Valores promedio de pH de los tratamientos (biofermentos)

| Tratamiento Notación | Tiempo (días) | | | | | |
|-------------------------|---------------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| T5 | 4.59 | 4.51 | 3.75 | 3.76 | 3.28 | 3.31 |
| T6 | 4.34 | 4.27 | 3.83 | 3.62 | 3.16 | 3.28 |
| T7 | 4.18 | 4.09 | 3.77 | 3.67 | 3.32 | 3.27 |
| T9 | 4.56 | 4.53 | 3.57 | 3.52 | 3.27 | 3.17 |
| T10 | 4.33 | 4.32 | 3.95 | 3.7 | 3.26 | 3.29 |
| T11 | 4.18 | 4.17 | 4.02 | 3.63 | 3.26 | 3.34 |
| T13 | 4.58 | 4.57 | 4.04 | 3.73 | 3.23 | 3.29 |
| T14 | 4.38 | 4.38 | 3.75 | 3.51 | 3.16 | 3.32 |
| T15 | 4.25 | 4.25 | 4.08 | 3.87 | 3.45 | 3.41 |
| T17 | 4.58 | 4.61 | 3.85 | 3.7 | 3.39 | 3.45 |
| T18 | 4.42 | 4.43 | 3.99 | 3.72 | 3.37 | 3.39 |
| T19 | 4.25 | 4.27 | 4.13 | 3.75 | 3.39 | 3.47 |

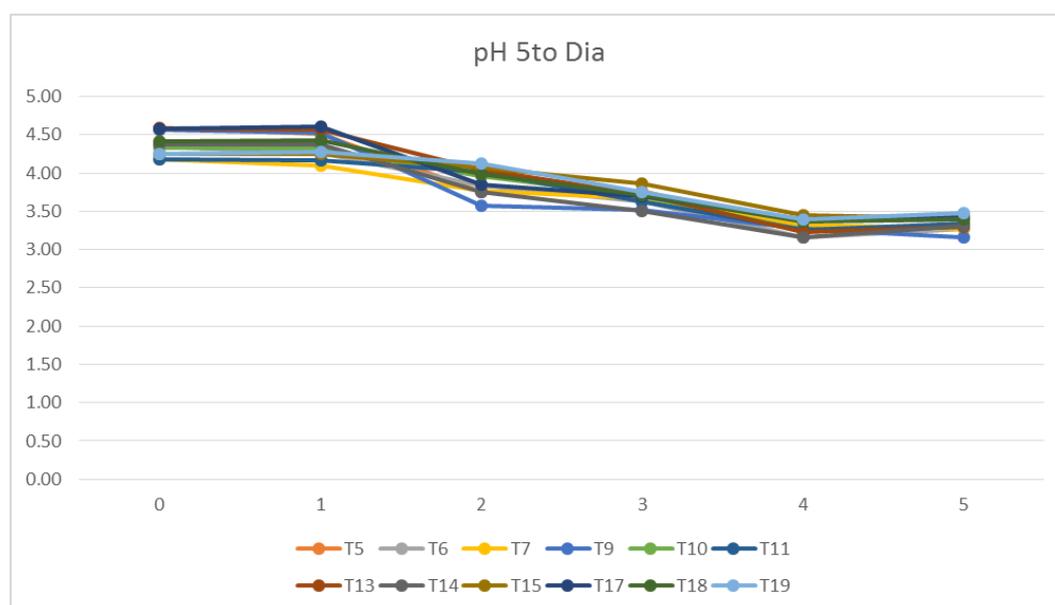


Figura 17. Evolución de pH hasta el 5to día

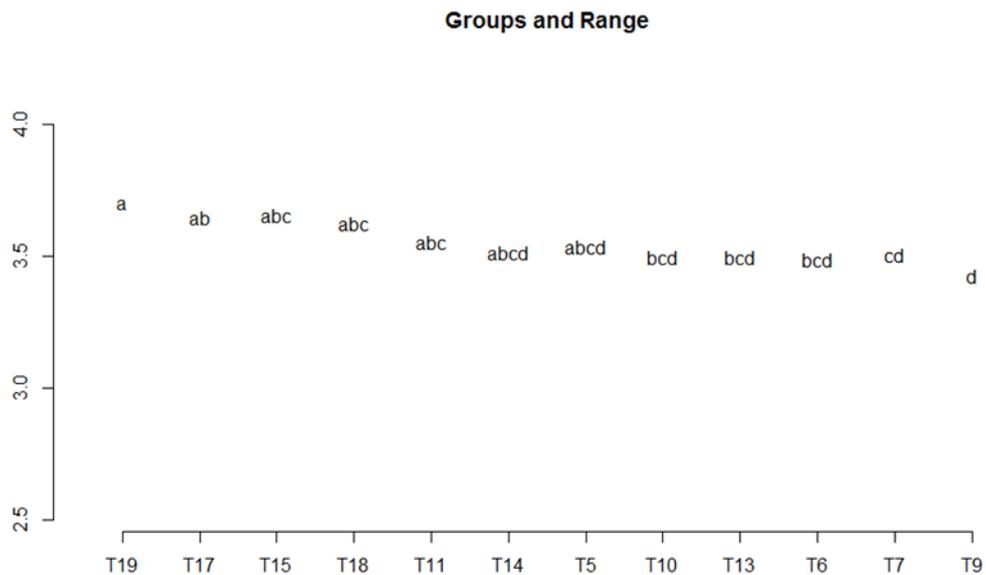


Figura 18. Comparación múltiple de pH

Respecto al porcentaje de ácido láctico durante los primeros cinco días se registró que iban subiendo, quedando en un rango de dos a tres por ciento, a nivel grafico (ver Figura 19.) no se observó mucha diferencia. Pero en el análisis estadístico si se observó diferencias significativas en el quinto día. Mediante la prueba de comparación múltiple usando el análisis de Tukey, el T11 y T17 son los que presentan diferencias significativas, en el caso del primero compuesto por 10 por ciento de melaza, al igual que el T9 el cual tuvo la diferencia significativa de pH, debido a eso comparte similitud con el T11 (ver Figura 20 y Tabla 9), en el caso del T17 posee 20 por ciento de melaza, pero posee menor porcentaje de acidez que el T11. Aunque todos los datos arrojan porcentaje de acidez por encima del 1%.

- Análisis del porcentaje de acidez de los tratamientos

Durante los primeros cinco días se pudo observar un descenso en el nivel de pH conforme se da un aumento en el porcentaje de acidez, (Tabla 17), y esto se debería al uso de la melaza como fuente de carbono y energía, lo cual permitió el crecimiento y desarrollo de bacterias lácticas, y esto tuvo precisamente que como consecuencia el descenso de pH hasta el punto en que el ácido láctico producido inhibió el crecimiento de las propias bacterias lácticas (Soni *et al.*, 2013) por lo que se puede deducir que las bacterias ácido lácticas consumieron azúcares solubles, las cuales son la fuente principal la melaza.

Tabla 17: Valores promedio de porcentaje de acidez de los tratamientos (biofermentos)

| Tratamiento | Tiempo (días) | | | | | | |
|-------------|---------------|------|------|------|------|------|------|
| | Notación | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| T5 | | 0.59 | 0.57 | 0.92 | 1.10 | 1.85 | 2.24 |
| T6 | | 0.77 | 0.63 | 0.90 | 1.37 | 2.40 | 2.75 |
| T7 | | 0.98 | 0.83 | 0.68 | 1.34 | 2.36 | 2.52 |
| T9 | | 0.50 | 0.53 | 0.77 | 1.43 | 2.22 | 2.7 |
| T10 | | 0.62 | 0.69 | 0.53 | 1.56 | 2.72 | 2.88 |
| T11 | | 0.72 | 0.80 | 0.56 | 1.77 | 2.75 | 3.09 |
| T13 | | 0.63 | 0.56 | 0.48 | 1.65 | 2.90 | 2.76 |
| T14 | | 0.68 | 0.65 | 0.80 | 1.98 | 2.90 | 2.54 |
| T15 | | 0.80 | 0.68 | 0.48 | 1.14 | 2.49 | 2.34 |
| T17 | | 0.56 | 0.63 | 0.60 | 1.64 | 2.66 | 1.79 |
| T18 | | 0.71 | 0.68 | 0.62 | 1.85 | 2.69 | 2.16 |
| T19 | | 0.81 | 0.89 | 0.53 | 2.01 | 2.67 | 2.27 |

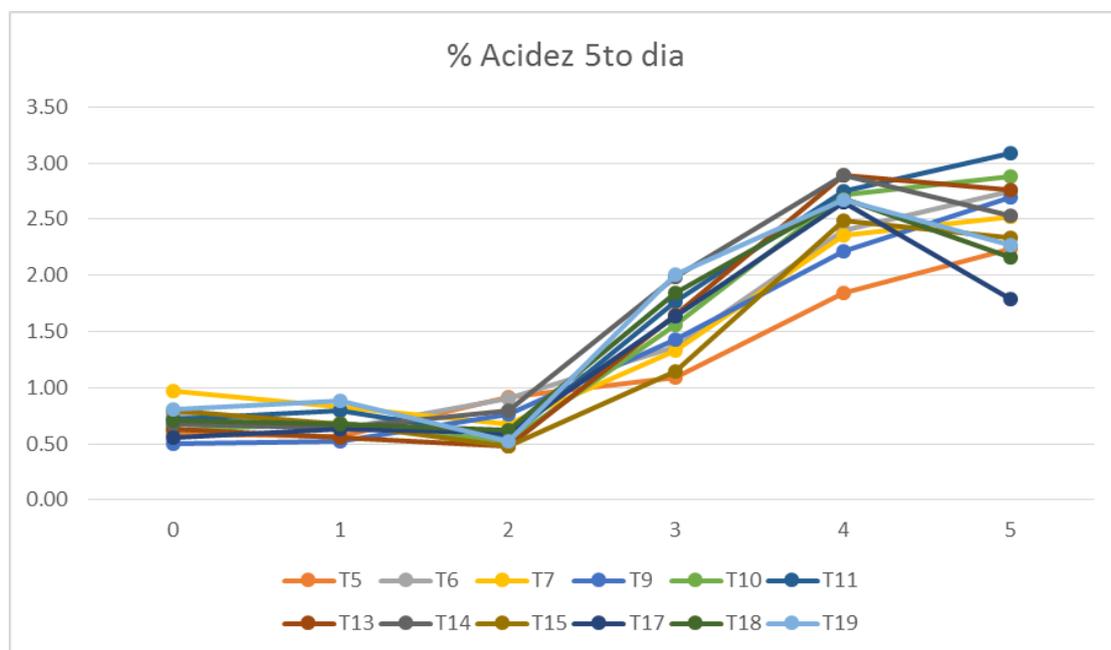


Figura 19. Evolución del porcentaje de acidez al quinto día

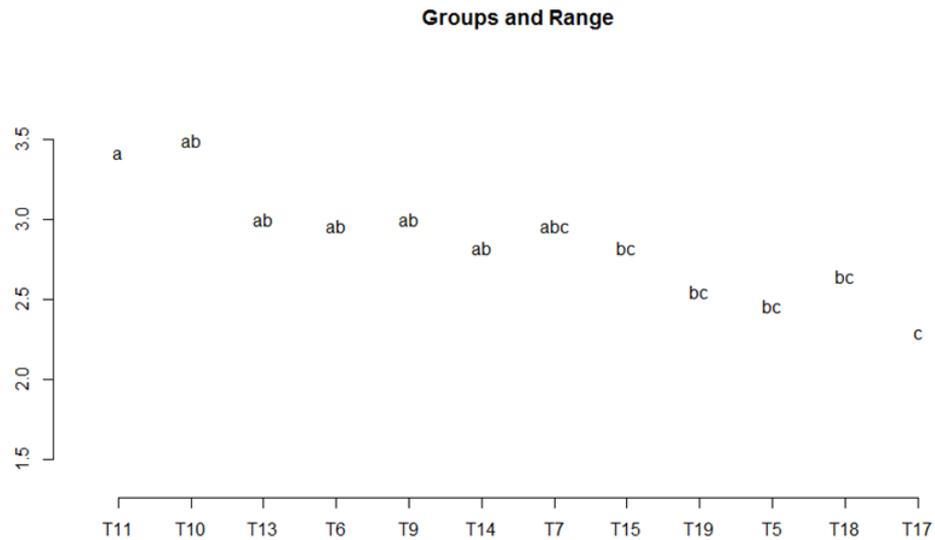


Figura 20. Comparación múltiple del porcentaje de ácido láctico

Según los gráficos mostrados en la Figura 19 se observa que existe una correspondencia entre los parámetros de pH y porcentaje de ácido láctico. La tendencia decreciente de pH es correspondiente al nivel creciente de porcentaje de acidez, si nos fijamos eso corresponde en los tratamientos T9 y T11. Así, en los primeros cinco días hubo un rápido ascenso de porcentaje de acidez y disminución del nivel de pH.

En el caso de los tratamientos que no incluían melaza como el caso de T1, T2 y T3 se observaba ligero aumento de pH, pero se mantenía debajo de cuatro hasta el día cinco, como se indica en la Tabla 18.

Tabla 18: pH de los tratamientos sin melaza (Bloque B-E)

| Tratamientos | Día 0 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 10 | Día 20 | Día 30 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| T1 | 4.07 | 4.11 | 4.06 | 3.64 | 3.31 | 3.32 | 5.18 | 7.22 | 8.04 |
| T2 | 3.86 | 3.88 | 3.85 | 3.6 | 3.25 | 3.26 | 5.01 | 7.44 | 7.71 |
| T3 | 3.75 | 3.77 | 3.72 | 3.44 | 3.25 | 3.19 | 4.18 | 7.15 | 7.65 |

B: Biolac, E: Efluente

Después del día cinco vemos que no permanece estable, al contrario, empezó a alcalinizarse y su porcentaje de acidez no llega al uno por ciento, cuyos valores se observa en la Tabla 19, con respecto a sus propiedades organolépticas estas mostraron olor fétido y con una capa en la superficie de moho.

Tabla 19: Evolución del porcentaje (%) de acidez de los tratamientos sin melaza (Bloque B-E)

| Tratamiento | Día 0 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día30 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| T1 | 0.18 | 0.18 | 0.24 | 0.30 | 0.29 | 0.26 | 0.045 |
| T2 | 0.24 | 0.29 | 0.35 | 0.39 | 0.41 | 0.39 | 0.045 |
| T3 | 0.50 | 0.38 | 0.41 | 0.63 | 0.44 | 0.51 | 0.045 |

En la medida que aumenta el pH el porcentaje de acidez disminuye, como se menciona estos tratamientos solo tenían Bio-lac y esa ligera disminución de pH se debió a la producción de ácido láctico a partir de las fuentes de azúcar por acción de las bacterias ácido lácticas que provienen del consorcio microbiano (Buchelli, 2014) al pasar el día 5 el pH se va elevando, lo que significa que necesita de sustrato para su producción de ácido láctico, ya que el efluente por sí solo no aporta los azúcares necesarios para que se dé la producción de ácido láctico.

El otro bloque de tratamientos T4, T8, T12 y T16 que no contienen consorcio microbiano también presentó disminución de pH y aumento del porcentaje de ácido láctico, como se observa en la Tabla 20 y 21.

Tabla 20: Evolución de pH

| Tratamiento | Día 5 | Día 30 |
|-------------|-------|--------|
| T4 | 2.83 | 4.97 |
| T8 | 2.95 | 3.73 |
| T12 | 3.03 | 3.56 |
| T16 | 2.78 | 3.64 |

Tabla 21: Evolución de porcentaje de acidez

| Tratamiento | Día 5 | Día 30 |
|-------------|-------|--------|
| T4 | 0.72 | 0.25 |
| T8 | 1.05 | 1.15 |
| T12 | 1.23 | 1.86 |
| T16 | 1.38 | 1.87 |

A pesar que estos resultados mostraban disminución de pH y aumento de porcentaje de acidez durante los cinco días, y a lo largo de treinta días mostraron el mismo comportamiento. Pero estos resultados no fueron tomados en cuenta para el análisis estadístico ya que este comportamiento pudo deberse a que en la melaza se encuentran

bacterias que también producen ácido láctico, y también porque el objeto en evaluación que es el efluente de tarwi no está dentro de esos tratamientos.

La tendencia que se observó durante la fase de experimentación fue la acidificación. Esa producción de ácido láctico producida por las BAL crean un ambiente desfavorable para muchos otros organismos, estos ácidos pueden difundirse a través la membrana de la célula para ingresar posteriormente al citoplasma, donde rápidamente se disocian en protones y derivados con carga a la que la membrana celular es impermeable, y esa acumulación intracelular de protones puede disminuir el pH intracelular (pHi) y por lo tanto afecta el pH transmembrana lo que contribuye a la fuerza motriz de protones (FMP) lo que se utiliza como una fuente de energía en el transporte transmembrana de numerosos procesos. (Peredo, 2013)

Para que haya esta producción de ácido láctico como se puede observar en la gráfica, pudo deberse a que las BAL emplearon fuentes de azúcares más complejos de la forma continua hasta que se empieza a ralentizar y se estabiliza como se observa en los gráficos; el consumo inicial de la fuente de azúcares de fácil asimilación en vez de una más compleja confirma el comportamiento de la represión catabólica por carbono de las BAL. La posterior ralentización de la acidificación se puede explicar por la inhibición ocasionado por el propio ácido láctico. (Wang *et al.*, 2015)

Entonces cuando se le dan las condiciones óptimas a las BAL se asegura la fermentación homoláctica, ya que no presentan desvíos los tratamientos seleccionados de fermentación heteroláctica.

4.1.3. Selección del mejor tratamiento

Estos tres tratamientos fueron los que mejor resultado organoléptico tuvieron, mostraron muy buen aroma sin capas de moho durante los cinco días de evaluación, incluido hasta el día treinta, y un color acaramelado sin turbidez; estadísticamente también mostraron mejor resultado, tanto a nivel de pH como porcentaje de acidez. Así como fueron los que mayor aprovechamiento de residuo tuvieron. (Tabla 22)

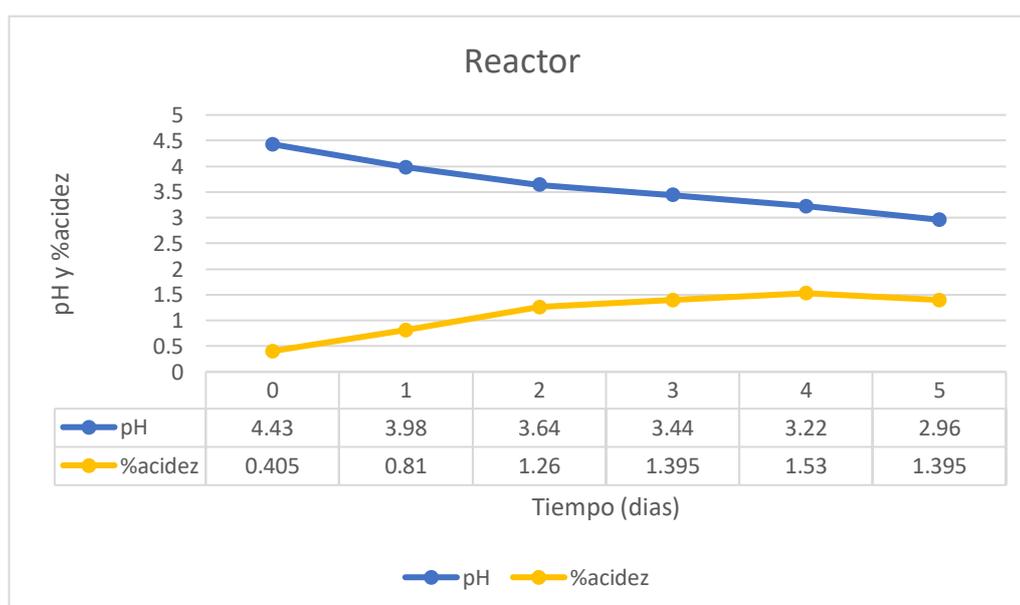
Tabla 22: Selección del mejor tratamiento

| Tratamiento | Ausencia de mal olor, mohos y levaduras | Residuo utilizado | Costos de insumos (PEN/Kg) |
|-------------|---|-------------------|----------------------------|
| T9 | Si | 85 % | 0.6 |
| T11 | Si | 75% | 1.6 |
| T17 | Si | 75% | 0.7 |

Según las evaluaciones tanto de pH como porcentaje de ácido láctico durante los primeros cinco días y evaluándose en el quinto día se sugiere que los mejores tratamientos serían T9, T11 y T17, pero considerando su bajo costo en insumos y el mejor aprovechamiento del residuo se seleccionó el tratamiento T9, esto como parte del análisis costo-beneficio, el cual está detallado en el ANEXO N°8.

4.1.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA FASE PILOTO

El tratamiento seleccionado T9 (85% de efluente de tarwi, 5% biolac y 10% melaza) y también se realizó una réplica a temperatura ambiente durante cinco días para comparar ambos resultados, el cual se evaluó tanto su pH como porcentaje de ácido láctico hasta el quinto día (ver Figura 21 y 22). La información adicional sobre las condiciones iniciales y cosecha se encuentran en el anexo N°9.

**Figura 21.** Evolución del pH y porcentaje de acidez del tratamiento seleccionado (escala piloto)

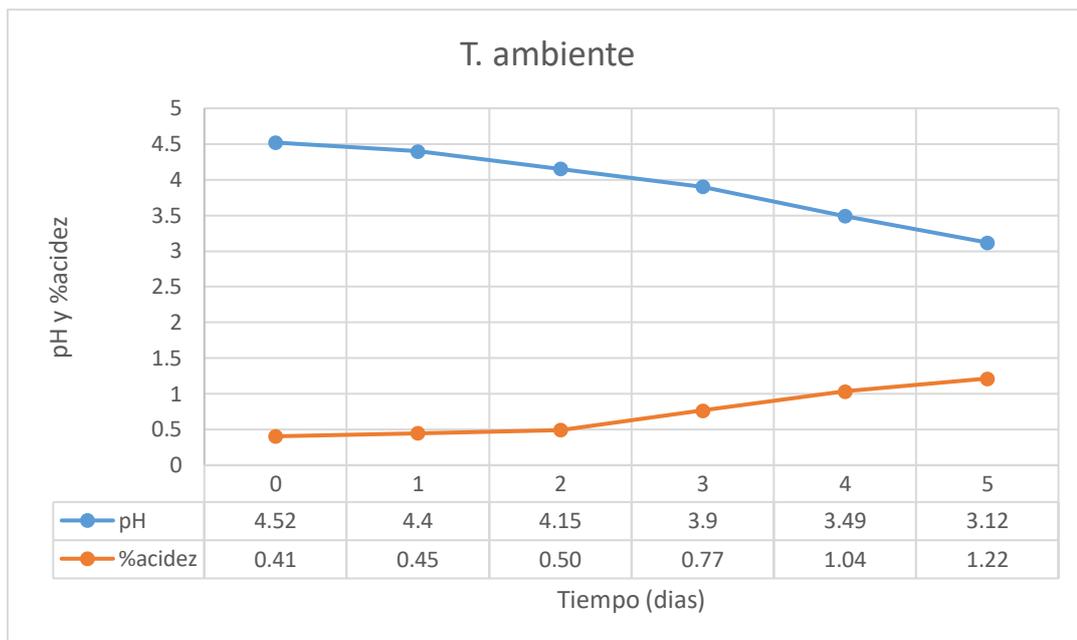


Figura 22. Evolución del tratamiento seleccionado a escala piloto (temperatura ambiente)

En la Figura 23 y 24 se observa que hasta el día treinta conservaron su estabilidad tanto de pH como porcentaje de acidez.

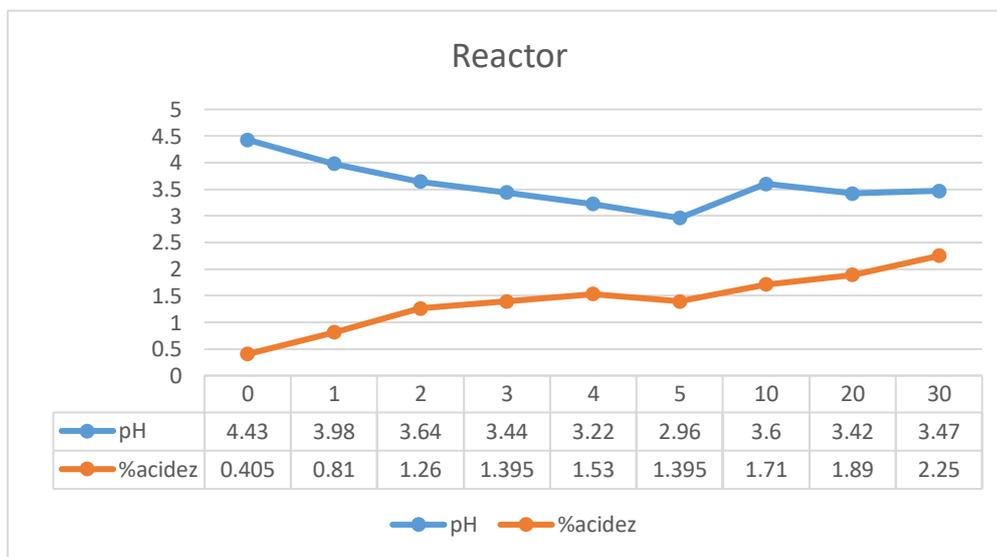


Figura 23. Estabilidad de pH y porcentaje de acidez de la escala piloto hasta el día treinta

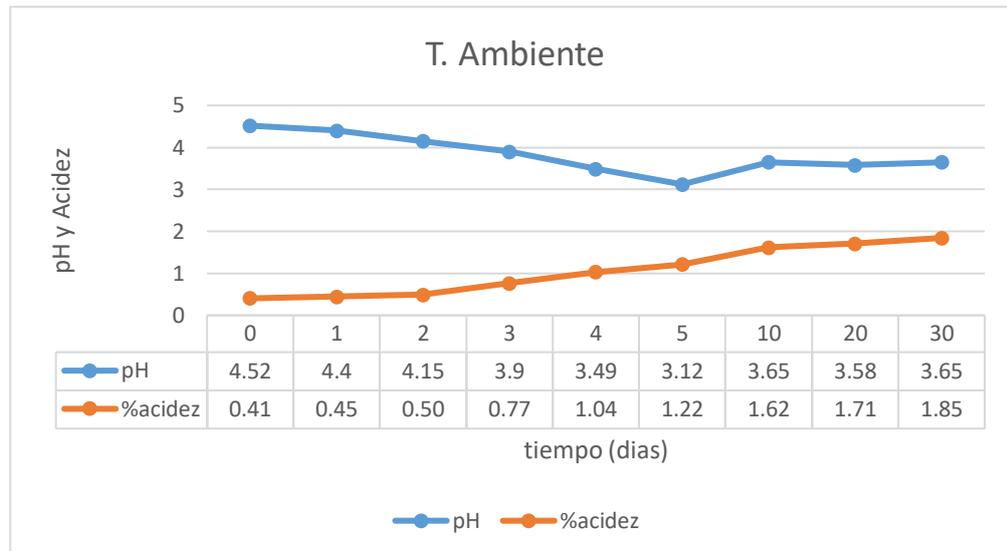


Figura 24. Estabilidad del pH y porcentaje de acidez a escala piloto a temperatura ambiente hasta el día treinta

Comparando estos resultados de la fase piloto (Fig.23) con la fase de laboratorio vemos cierta similitud, una cierta correspondencia entre el nivel de pH con el porcentaje de acidez. Aunque en la fase piloto los parámetros tanto de pH como porcentaje de acidez láctico se alcanzó mejor en los primeros días, y esto pudo deberse a que en el reactor se pudo controlar mejor en el reactor y también a que tuvo condiciones más anoxigénicas que la fase laboratorio. Con respecto a la prueba a escala en temperatura ambiente también mostro resultados favorables, pero vemos que la tendencia de acidez láctica es a bajar, ya que a temperatura ambiente no ayuda a la optimización de las BAL.

A pesar de las diferencias que observamos, la evolución de pH de la fase piloto se mantiene por debajo de 4. Este pH como mencionamos en el marco teórico de esta investigación evita el crecimiento de mohos y levaduras, así como de otros patógenos.

4.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL ABONO LÍQUIDO

4.2.1. Macronutrientes y micronutrientes

El efluente de tarwi fue enviado a analizar al LASPAF (anexo). Se hizo la evaluación previa y después de ser enriquecido para poder obtener el biofertilizante (tarwifer).

Tabla 23: Contenido de Macro y Micronutrientes del Tarwi-fer

| Parámetro | Unidad | Efluente | Tarwifer |
|-----------------|--------|----------|----------|
| pH | - | 4.34 | 3.75 |
| C.E | dS/m | 2.20 | 3.70 |
| Solidos totales | g/L | 11.33 | 14.38 |
| M.O en solución | g/L | 9.26 | 11.31 |
| N | mg/L | 179.20 | 526.40 |
| P | mg/L | 32.00 | 144.57 |
| K | mg/L | 284.70 | 1080.00 |
| Ca | mg/L | 81.38 | 52.60 |
| Mg | mg/L | 40.43 | 85.00 |
| Na | mg/L | 74.00 | 15.50 |
| Pb | mg/L | 0.55 | - |
| Cd | mg/L | 0.08 | - |
| Cr | mg/L | 0.18 | - |
| Fe | mg/L | 3.97 | 0.50 |
| Cu | mg/L | 0.16 | 0.08 |
| Zn | mg/L | 0.34 | 0.28 |
| Mn | mg/L | 0.97 | 0.14 |
| B | mg/L | 0.89 | 1.41 |

Como vemos en la Tabla 23, el efluente también aporta nutrientes de importancia (81.38 ppm Ca, 40.43 ppm Mg y 284.70 K ppm) para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas, ya que estas requieren de fuentes complejas de nitrógeno, vitaminas y minerales para el crecimiento y producción de ácido láctico. (Wang *et al.*, 2015) Los niveles más altos en el producto final se registraron en los macronutrientes principales como N, P, K y Mg. Para la producción de ácido láctico se requiere fuente de nitrógeno, el cual el efluente aporta 179.20 ppm N, ya que si hay algo que limita la producción de ácido láctico es el acceso a una fuente

de nitrógeno, ya que el extracto de levadura es muy costoso. (Aragon, 2015) El magnesio estimula el crecimiento y la producción de ácido láctico de las BAL, lo que es indispensable como cofactor para numerosas enzimas del crecimiento celular, la proporción de manganeso como observamos en la tabla es necesario para el correcto funcionamiento de enzimas como la ARN polimerasa, la lactato deshidrogenasa, la NADH oxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, aportando resistencia a lactobacilos como *Lactobacillus plantarum* contra peróxidos y superóxidos en medios con una baja aireación, y el aporte del potasio es esencial para la regulación de pH intracelular y su presión osmótica. (Aragon, 2015)

Tabla 24: Tabla comparativo nutricional con otros biofertilizantes

| Parámetro | Unidad | Tarwifer | Fresa | Bagazo, vacuno y suero |
|------------------|---------------|-----------------|----------------|-------------------------------|
| pH | - | 3.75 | 3.64 | 3.72 |
| M.O en solución | g/L | 11.31 | 32.40 | 72.50 |
| C.E | dS/m | 3.70 | 8.55 | 22.2 |
| N | mg/L | 526.40 | 630.00 | 3546.70 |
| P | mg/L | 144.57 | 120.18 | 955.26 |
| K | mg/L | 1080.00 | 2300.00 | 5190.00 |
| Ca | mg/L | 52.60 | 357.50 | 2440.00 |
| Mg | mg/L | 85.00 | 355.00 | 755.00 |
| Na | mg/L | 15.50 | 1150.0 | 755.00 |
| Pb | mg/L | - | 0.07 | 1.20 |
| Cd | mg/L | - | 0.17 | 0.07 |
| Cr | mg/L | - | 0.09 | 0.55 |
| Fe | mg/L | 0.50 | 2.68 | 33.15 |
| Cu | mg/L | 0.08 | 1.50 | 12.30 |
| Zn | mg/L | 0.28 | 1.50 | 21.60 |
| Mn | mg/L | 0.14 | 1.98 | 12.30 |
| B | mg/L | 1.41 | 1.81 | 8.74 |
| Fuente: | | Propia | Herrera (2016) | Buchelli (2014) |

En el análisis físico químico del tarwifer fue comparado con otros biofertilizantes provenientes de la fermentación homoláctica.

Todos los biofertilizantes presentaron valores de pH ácido debido al proceso homofermentativo, sin embargo el Tarwifer presento bajo nivel en materia orgánica disuelta, ya que a diferencia de las otras dos no presento sedimentación debido a que el principal residuo es el efluente y no restos sólidos, solo hubo una mínima sedimentación, que puede deberse al uso de melaza la cual es de consistencia semisólida que se diluyo al mezclar con efluente de tarwi y la biomasa de las BAL, esto tendrá un aprovechamiento mayor como abono foliar para su aplicación directa a las plantas. Otro parámetro a considerar es la conductividad eléctrica (dS/m) el cual observamos que el tarwifer es el más bajo comparado con los otros dos biofertilizantes líquidos, el cual le da una ventaja ya que no va necesitar muchas diluciones para llegar a un valor adecuado.

Los valores del tarwifer son menores al biofertilizante líquido del bagazo, tanto como macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg y Na) y micronutrientes (Fe, Cu, Zn, Mn y B) solo supero en niveles de P al biofertilizante líquido obtenido de residuos de fresa, (ver Tabla 24) esto pudo deberse a que el abono de frutas en este caso la fresa contiene en su composición química algunos aminoácidos y elementos menores, que son proporcionadas por las frutas. (Quinde 2014)

4.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL TARWIFER

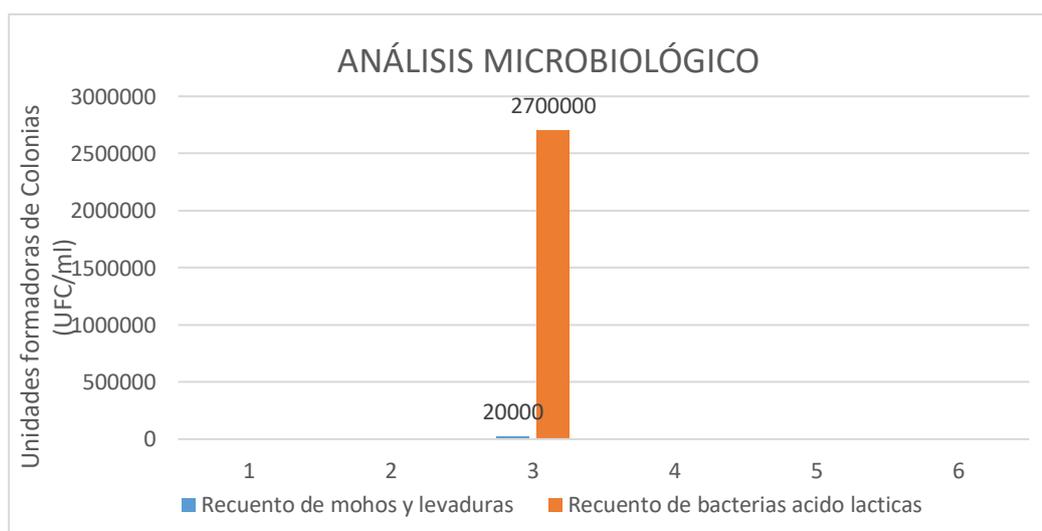


Figura 25. Recuento de Bacterias ácido lácticas vs mohos y levaduras

Según los resultados obtenidos, (fig. 25) en el recuento de bacterias ácido lácticas se obtuvo 27×10^5 UFC/ml muy por encima del género levaduras, ya que en el tratamiento no se

observaron capas de mohos, pero una baja cantidad de levaduras 20×10^2 UFC/ml, lo que indica que predominó las bacterias ácido lácticas ya que precisamente la producción de ácido láctico inhibió la proliferación de levaduras

También en la Tabla 25 se observa los resultados de coliformes totales y fecales, el cual se descarta la presencia de patógenos en el abono líquido, quedando conforme con el Real Decreto 506/2013 (Ministerio de Presidencia, 2013) ya que los valores <3 indica ausencia del microorganismo. Esta inocuidad se debió a que el grado de acidez alcanzado predominó el crecimiento de patógenos, con este resultado se demostró el antagonismo láctico de las cepas provenientes del consorcio B-lac.

Tabla 25: Resultado de análisis Microbiológico del Tarwifer

| ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO | UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/ml) |
|--|--|
| Recuento de mohos y levaduras | 20×10^2 |
| Recuento de bacterias lácticas | 27×10^5 |
| Enumeración de coliformes totales | <3 |
| Enumeración de coliformes fecales | <3 |
| Enumeración de <i>Escherichia coli</i> | <3 |

Nota: <3 indica ausencia de microorganismo en el ensayo

4.3 ENSAYO DE FITOTOXICIDAD DEL TARWIFER

Los resultados de los tratamientos de toxicidad mostraron diferencias fisicoquímicas a nivel de pH (3.43-7.21) y conductividad eléctrica (0.6-14.10 mS/cm) según las diluciones realizadas. (Tabla 26)

Tabla 26: Resultado pH, CE de las diluciones de Tarwifer

| | Concentrado | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | Control |
|--------------|-------------|--------|-------|---------|----------|-----------|---------|
| Diluciones | 100/100 | 10/100 | 1/100 | 0.1/100 | 0.01/100 | 0.001/100 | 0/100 |
| pH | 3.43 | 3.69 | 5.82 | 7.01 | 7.26 | 7.37 | 7.21 |
| C.E (mS/cm) | 14.10 | 2.5 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.5 | 0.6 |
| Volumen (ml) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

Con respecto al índice de germinación también se obtuvo diferente resultado (anexo N°5) las diluciones D2 y D3 tuvieron índice de germinación superior al del control

Tabla 27: Características de los tratamientos de los ensayos de fitotoxicidad

| Diluciones | Elongación de radículas (*promedio) | Numero de semillas (promedio) | PGR (%) | CRR (%) | IG (%) |
|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------|---------|---------|-------------|
| Concentrado | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Control (0/100) | 19.429 | 18.333 | 100 | 100 | 100 |
| D1 (10/100) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D2 (1/100) | 23.161 | 18.667 | 119.204 | 101.818 | 121.3714013 |
| D3 (0.1/100) | 18.838 | 19.333 | 96.955 | 105.455 | 102.2437734 |
| D4 (0.01/100) | 19.194 | 17.667 | 98.787 | 96.364 | 95.19480815 |
| D5 (0.001/100) | 16.912 | 18.667 | 87.043 | 101.818 | 88.62556392 |

*Elongación medida en milímetros

PGR: Porcentaje de Germinación radicular

CRR: Crecimiento de Radícula Relativo

IG: Índice de Germinación

En la Tabla 26 los resultados de la prueba de fitotoxicidad indican que el concentrado 100/100 (tarwifer sin diluir) y la dilución 10 /100 no se produjo germinación alguna y esto se debió a su elevado C.E, 14.10 y 2.5 mS/cm respectivamente, ya que una elevada conductividad eléctrica indica que hay mayor concentración de sales solubles, ya que la salinidad afecta directamente al crecimiento de las plantas por la reducción de la capacidad de las plantas para absorber agua (Nichol, 2017) el rango óptimo para un crecimiento adecuado se encuentra entre 1.5 a 2.5 mS/cm el otro factor sería el pH, debido a su acidez 3.43 y 3.69 respectivamente, ya que la mayoría de las plantas prefieren rangos de 5.5-7.5, también influyen directamente sobre el crecimiento vegetal como el movimiento y disponibilidad de los nutrientes en el intercambio catiónico, en el caso de las lechugas prefieren un pH de 5.5 y máximo 7 (Infoagro, 2014) la disponibilidad de nutrientes varía en función al pH de la solución nutritiva, por eso se debe mantener dentro del rango 5.5 a 6.5 (Barrios, 2004) Debido a eso es que por eso recién se pudo ver la germinación a partir de las diluciones 1/100 hasta 0.001/100, ya que estos si presentaban valores dentro de los rangos de pH y conductividad eléctrica adecuados.

En la dilución 1/100 se observó que el porcentaje de germinación fue superior a la del control, lo que indica que el pH (5.82) y la C.E (0.7) son adecuados, casi cerca al control, demostrando que no es una solución cargada de sales,

beneficiando el desarrollo vegetal y su índice de germinación también indica que no hay presencia de sustancias fitotóxicas. A diferencia de las diluciones 10/100 y 100/100 no se observó germinación ya que la salinidad y acidez que presentaron evitaron la germinación

(Tabla 27), esto debido a los efectos fitotóxicos, ya que en elevadas concentraciones pueden inhibir la germinación de semillas. (Muñoz *et al.*, 2015) Incluso la longitud de las radículas de la solución 1/100 fue superior a la del control, ya que sus parámetros de pH y C.E no fueron fitotóxicos e incluso se favoreció su desarrollo, como se observa en la figura 26 y Tabla 28.

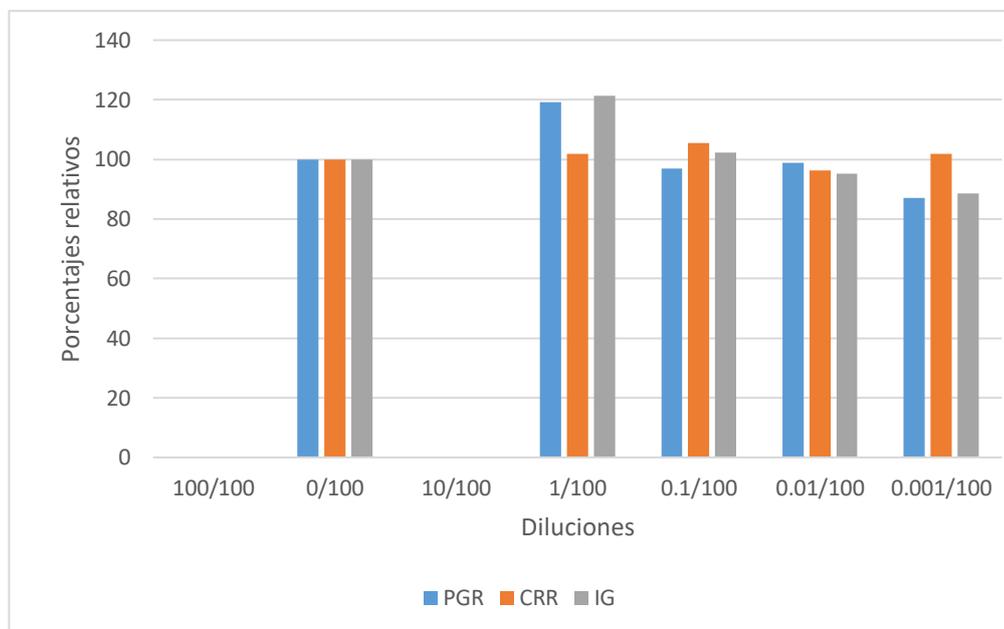


Figura. 26. Porcentajes relativos de PGG, CRR e IG de las diluciones

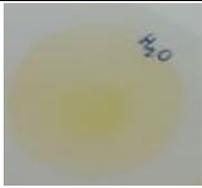
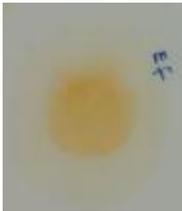
Tabla 28: Índice de Germinación

| | Concentrado | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 |
|---------|-------------|--------|---------|---------|----------|-----------|
| | 100/100 | 10/100 | 1/100 | 0.1/100 | 0.01/100 | 0.001/100 |
| PGR (%) | 0 | 0 | 119.204 | 96.955 | 98.787 | 87.043 |
| CRR (%) | 0 | 0 | 101.818 | 105.455 | 96.364 | 101.818 |
| IG (%) | 0 | 0 | 121.371 | 102.244 | 95.195 | 88.626 |

4.4 Análisis cualitativo de alcaloides mediante prueba de Dragendorff

El método de Dragendorff mediante el revelado en papel filtro revelo presencia de alcaloides en el efluente y tarwifer con un borde marrón alrededor de la muestra la cual se considera positiva para alcaloides. (Gutiérrez-Pineda *et al.* 2020)

Tabla 29: Caracterización cualitativa de alcaloide mediante reactivo de Dragendorff

| Resultado con el reactivo de Dragendorff | |
|--|--|
| 1. Reactivo de Dragendorff (Control) |  |
| 2. Muestra de Efluente solo |  |
| 3. Muestra tarwifer |  |

4.5 Análisis de la capacidad nematicida del producto “Ch” (Tarwifer)

Según los resultados a la concentración de 2.5% el producto “Ch” presenta propiedades nematicidas porque los nematodos no recuperan su movimiento. En cambio, a la concentración de 1% el producto muestra propiedades nemastaticas, porque los nematodos recuperan su movimiento en agua, a 0.5% casi no muestra propiedades nematicidas. (Ver figura 27)

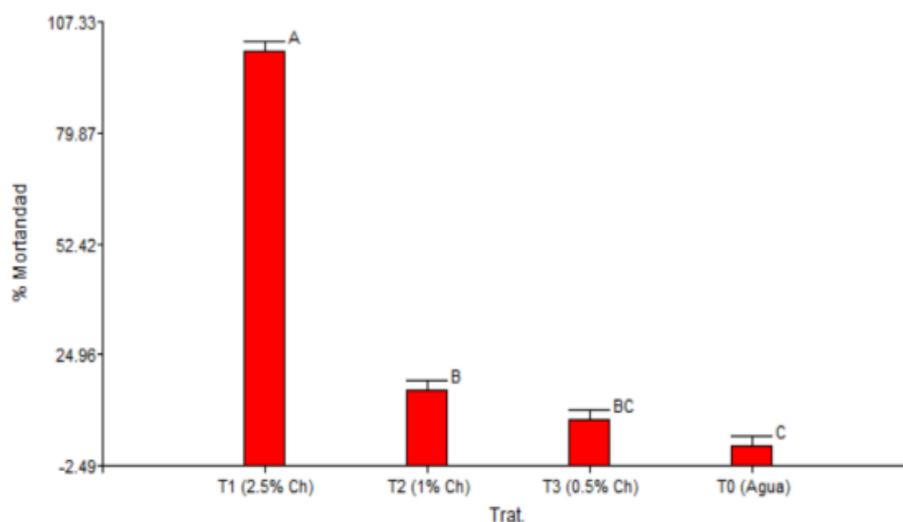


Figura. 27. Porcentaje de mortandad de J2 de *Meloidogyne incognita* expuestos durante 48 horas en los productos y 48 horas en el agua

En el ANVA indica diferencia significativa entre tratamientos con un C.V de 14.67%.
(Anexo N°7)

Con una mayor concentración de tarwifer se observó acción nematocida (Fig. 28), esto debido a la lupanina, el cual posee actividad nematocida y se puede usar contra coleópteros.
(Rodriguez 2009)



Figura 28. J2 de Meloidogyne después de 48 horas en el producto "Ch" a 2.5%, 1% y 0.5%

V. CONCLUSIONES

- La fermentación homoláctica del efluente de tarwi produce un biofertilizante líquido de alta calidad nutricional, estable e inocuo.
- La evaluación de pH y porcentaje de acidez de los tratamientos a escala laboratorio determinó que el mejor tratamiento fue T9, ya que obtuvo pH=3.17 al quinto día y porcentaje de acidez por encima al uno por ciento y se mantuvo estable durante los siguientes días de evaluación hasta el día 30 en condiciones óptimas de temperatura (T=40°C) y a temperatura ambiente pH a 3.12 y porcentaje de acidez un poco más del uno por ciento.
- El Tarwifer presentó destacables valores de nutrientes y materia orgánica, no evidencio presencia de metales pesados. La caracterización microbiológica presento 27×10^5 UFC de bacterias ácido lácticas y ausencia de coliformes, lo que indica que no presenta patógenos estando conforme con el Real Decreto 506/2013 y Ley N° 29196 de la normativa peruana.
- La fitotoxicidad del Tarwifer se produce a concentraciones de 100/100 y 10/100. Siendo la dosis de 1/100 la que genera mejores resultados en los indicadores de germinación, demostrando así que no tiene elementos fitotóxicos.
- El efecto nematicida del Tarwifer se produce a una concentración de 2.5%.
- El tratamiento seleccionado T9 se obtuvo mejor costo beneficio, ya que se pudo aprovechar la mayor cantidad de desamargado para su conversión en abono líquido con capacidad biofertilizante/biocida e inocuo para las plantas. La composición final fue de 85 por ciento de desamargado, cinco por ciento de Bio-lac y diez por ciento de melaza.

VI. RECOMENDACIONES

- Para la determinación de alcaloides de forma cuantitativa se recomienda realizar HPLC para determinar el contenido de lupanina y esparteína del desamargado antes de su tratamiento y después del proceso de conversión, ya que las moléculas de alcaloides son muy sensibles.
- Se recomienda hacer un estudio de campo para verificar el efecto nematocida en cultivos.
- Como buenas prácticas agrícolas se recomienda almacenar el producto de tal forma que evite la exposición al sol, y se recomienda la dilución del tarwifer a nivel óptimo para su aplicación.
- Se recomienda pruebas en mesetaria y campo para determinar su dosificación óptima (L/ha) del tarwifer.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aceves, M.O.; Alonso, J. & Araya, C. (2019). Resumen II. Morfología y estructura de las hojas: aspectos críticos en la absorción de nutrientes por vía foliar (en línea). *Revista Pensamiento Actual* 19(33):106-120. Doi: <https://doi.org/10.15517/pa.v19i33.39636>
- Aguado-Santacruz, G.A. (2012). *Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura*. Edition: FirstPublisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
- Agudelo, N.; Torres, M.; Alvarez, C. & Vélez, L. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos (en línea). *Alimentos hoy* 23(36):63-72. Recuperado de: <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/356>.
- Ancín, M. (2011). Evaluación de diferentes tipos de fertilizantes químicos y orgánicos en la producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. var. Alubia) en el distrito de San Juan de Castrovirreyna - Huencavelica (Perú) (en línea). s.l., Universidad Publica de Navarra. 1-109 p. Recuperado de: <http://academica-e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/3454/577423.pdf?sequence=1>.
- Antonio, L; Rubio, S; Medina, C. 2014. biofertilizantes. .
- Aragon, J. 2015. Evaluacion de fuentes alternativas de Nitrogeno en Fermentacion Lactica (en línea). s.l., Universidad Nacional de Colombia. 12-36 p. Recuperado de: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/56343/1015410877.2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Aranda, J; Bocanegra, G. 2018. Evaluación de parámetros durante la extrusión de una mezcla de harinas de tarwi (*lupinus mutabilis*) y arroz (*oryza sativa*) para la producción de un snack (en línea). s.l., Universidad Nacional del Santa. 10-14 p. Recuperado de: <http://repositorio.uns.edu.pe/handle/UNS/3052>.

- Arias, MCC. 2015. Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) una planta con potencial nutritivo y medicinal (en línea). *Revista Bio Ciencias* 3(3):163-172. DOI: <https://doi.org/10.15741/139>.
- Barajas, L. N. A. (2017). Biofertilizantes: conceptos, beneficios y su aplicación en Colombia. *Ingeciencia*, 2(1), 65-76.
- Barrios, N. (2004). Evaluación del cultivo de la lechuga, *Lactuca sativa* L. bajo condiciones hidropónicas en Pachalí, San Juan Sacatepéquez, Guatemala (en línea). s.l., Universidad de San Carlos de Guatemala. 30 p. Recuperado de: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2071.pdf.
- Bautista, E., Mesa, L. & Gomez, M. (2018). Alternativas de producción de bioplaguicidas microbianos a base de hongos: el caso de América Latina y El Caribe. 9(4):585-604. DOI: <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.04.15>.
- Buchelli, H.A. (2014). Producción de biofertilizante de bagazo de cebada, excretas de vacuno y suero de quesería mediante fermentación homoláctica (en línea). s.l., Universidad Nacional Agraria La Molina. 139 p. Recuperado de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2335/F04-B919-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Carmen, J., Ramírez, R., Ulloa, P.R., Velázquez, M.Y., Ulloa, J.A. & Romero, F.A. (2011). Bacterias lácticas : Importancia en alimentos y sus efectos en la salud (en línea). Fuente Año 2(7). Recuperado de: [http://dspace.uan.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/436/1/Bacterias lácticas%2C Importancia en alimentos y sus efectos en la salud.pdf](http://dspace.uan.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/436/1/Bacterias%20lácticas%20Importancia%20en%20alimentos%20y%20sus%20efectos%20en%20la%20salud.pdf).
- Carrion, A. (2018). Evaluación del comportamiento agronómico del cultivo de banano (*Musa acuminata* triploide A), aplicando un fertilizante a base de silicio en el cantón El Guabo , provincia de El Oro . (en línea). s.l., Universidad Católica De Santiago De Guayaquil. 1-34 p. Recuperado de: <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/10345/1/T-UCSG-PRE-TEC-AGRO-138.pdf>.
- Carvajal-Larenas, F.E., Linnemann, A.R., Nout, M.J.R., Koziol, M; van Boekel, M.A.J.S. (2016). *Lupinus mutabilis*: Composition, Uses, Toxicology, and Debittering. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(9):1454-1487. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.772089>.

- Chavez, A. & Guzman, G. (2009). Elaboracion de Biofermentos y su aplicacion como abono foliar (en línea). Costa Rica, s.e. Recuperado de: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/AV-0958.pdf>.
- Chávez, M., Antonio, J., González, A., Noé, C. & Herrera, R. (2013). Bacteriocinas : características y aplicación en alimentos Bacteriocins: characteristic and applications in foods (en línea). *Investigacion y Ciencia* 21(59):64-70. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67430113008.pdf>.
- Corlay, L., Hernandez, A., Robledo, S., Maldonado, T. & Cruz, J. (2011). 12790 - Calidad microbiológica de abonos orgánicos (en línea). *Cadernos de Agroecologia* 6(2):1-4. Recuperado de: <https://revistas.aba-agroecologia.org.br/cad/article/download/12790/7292>
- González, J. D., Mosquera, J. D., & Trujillo, A. T. (2015). Efectos e impactos ambientales en la producción y aplicación del abono supermagro en el cultivo de sandía. *Ingeniería y Región*, 13, 103-111.
- Fajardo, E. & Sarmiento, S. (2014). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* (en línea). s.l., s.e. 23-28 p. Recuperado de: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf>.
- Fernandez, E. (2017). Determinacion del contenido de antinutrientes en tres variedades de chocho (Andino INIAP 450, Guaranguito INIAP y Criollo) (en línea). s.l., Pontificia Universidad Catolica del Ecuador. 9-15 p. Recuperado de: [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14472/Tesis Final.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14472/Tesis%20Final.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- Fernández, V., Sotiropoulos, T., & Brown, P. (2015). Fertilización foliar. Principios científicos y prácticas de campo. Asociación Internacional de la Industria de Fertilizantes (IFA). Paris, Francia, 49-82. Recuperado de: https://www.guiaverde.com/files/company/03032016122136_libro_2015_foliar_fertilizers_spanish_def.pdf
- Garay, O.B. (2015). El tarwi alternativa para la lucha contra la desnutrición infantil (en línea). 1. Huancayo, s.e. 500. Recuperado de: <https://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/731>
- García-Gutiérrez, C., Nava-Perez, E., Camacho-Baez, J. & Vazquez-Montoya, E. (2012). Ra

- Ximhai (en línea). Ra Ximhai 8(3):41-49. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46112896007>
- García, B. (2011). Bioreguladores de crecimiento, fertilizantes químicos y orgánicos en tomate (*Lycopersicon esculentum* MILL.) de invernadero (en línea). s.l., Universidad Autónoma de Nuevo León. 14-16 p. Recuperado de: <http://eprints.uanl.mx/2417/1/1080211208.pdf>.
- García, C.A., Arrázola, G.S. & Durango, A.M. (2010). Biotechnological Production of Lactic Acid. *Temas Agrarios* 15(2):9-26.
- García Carvajal, Z.Y. & Espinosa-Andrews, H. (2017). Desarrollo de un método espectrofotométrico para la detección de alcaloides pirrolizidínicos (pas) en mieles y polen de plantas melíferas de la península de Yucatán (en línea). s.l., Centro de Investigación Y Asistencia En Tecnología Y Diseño Del Estado de Jalisco A.C. 22-25 p. DOI: <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2016.17.58159>.
- González, L.C., Prado, R.D.M. & Silva, N. (2015). El Silicio En La Resistencia De Los Cultivos a Las Plagas Agrícolas (en línea). *Cultivos Tropicales* 36(1):16-24. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v36s1/ctr02s115.pdf>.
- Gutiérrez-Pineda, K.M., Morales, R. & Batista, A. (2020). Descubrimiento de alcaloides en la piel de la rana *Pristimantis gagei*, indicios de mimetismo Mülleriano en dos poblaciones de Panamá. *Mesoamericana* 24(1):49-57. DOI: <https://doi.org/10.48204/j.mesoamericana.v24n1a7>.
- Gutiérrez, A., Infantes, M., Pascual, G. & Zamora, J. (2016). Assessment of the factors in the debittering of tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) (en línea). *Agroindustrial Science* 1:145-149. DOI: <https://doi.org/10.17268/agroind.science.2016.01.17>.
- Herrera, R. (2017). Elaboración de un abono líquido a partir de residuos de fresa (*Fragaria X Ananassa*) por fermentación láctica. Tesis Ingeniera Ambiental, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima. Perú. 104 pp.
- Holguin, Z. (2018). Factores Que Influyen en el consumo Del Tarwi (*Lupinus mutabilis*), En El Poblador Aymara De La Zona Baja De Ilave (en línea). s.l., Universidad Nacional Del Altiplano. 1-99 p. Recuperado de: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/10080/Holguin_Cuentas_Zulma_Nohelia.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

- Huaman, N. (2015). Biotoxicidad del extracto hidroalcoholico de las hojas de *Lupinus mutabilis* «tarwi» sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* (en línea). s.l., Universidad Nacional De San Cristobal De Huamanga. 1-86 p. Recuperado de: http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/handle/UNSCH/1696/TESIS_B745_Hua.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Infoagro. (2014). Analisis de suelo 1° parte (en línea, sitio web). Recuperado de: https://www.infoagro.com/abonos/analisis_suelos.htm.
- Jacobsen, S.E., Mujica, A., Jacobsen, S.E. & Mujica, A. (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres (en línea). *Botanica economica de los andes centrales- Universidad mayor de San Andrés* 28:458-482. Recuperado de: https://beisa.au.dk/Publications/BEISA_Book_pdfer/Capitulo_28.pdf.
- De La Torre, F., Cañas, R.A. (2014). La dependencia humana de los fertilizantes nitrogenados y sus consecuencias (en línea). *Encuentros en la Biología* 7(152):1-4. Recuperado de: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros152/fertilizantes.pdf>.
- Larqué, B., Limón, A., Irizar, M. & Díaz, M. (2017). Fertilización química del maíz, su impacto en el rendimiento y en los costos de producción (en línea). *Texcoco, s.e.* Recuperado de: http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/4429/4730_Fertilización_química_del_maíz%2C_su_impacto_en_el_rendimiento_y_en_los_costos_de_producción.pdf?sequence=1.
- Leiva Trujillo, B.F. (2018). Elaboración de biofertilizante a partir de estiércol de ganado vacuno y efluente del proceso de fermentación cervecera mediante fermentación homoláctica (en línea). s.l., s.e. 8 p. Recuperado de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3740/leiva-trujillo-brigitte-fabiola.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Leng, P., Zhang, Z., Pan, G. & Zhao, M. (2011). Applications and development trends in biopesticides (en línea). *African Journal of Biotechnology* 10(86):19864-19873. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJBX11.009>.
- López Seijas, J. (2017). Biodiversidad de bacterias ácido lácticas asociada a la variedad Albariño (*Vitis vinifera* L.) cultivada en Val do Salnés. Estudio de sus Jacobo López Seijas (en línea). s.l., Universidad de Vigo. 9-15 p. Disponible en [file:///C:/Users/W7/Downloads/Biodiversidad_de_las_bacterias_ácido_\(2\).pdf](file:///C:/Users/W7/Downloads/Biodiversidad_de_las_bacterias_ácido_(2).pdf).

- Martin, A. (2002). Capacidad Antagonista Frente a *Listeria monocytogenes* de VALDIVIA-CHILE (en línea). s.l., Universidad Austral de Chile. 8-11 p. Recuperado de: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2002/fam381c/doc/fam381c.pdf>.
- Moreno, L.A. (2019). CALIDAD DE ABONOS ORGÁNICOS A PARTIR DEL ESTIÉRCOL PORCINO Y SU EFECTO EN EL RENDIMIENTO DEL MAÍZ CHALA (en línea). s.l., Universidad Nacional Agraria La Molina. 18-19 p. Recuperado de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3942/moreno-ayala-luis-alberto.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Muñoz, E.H., Hernández, J.C., Álvarez, L.A., Caballero, R., Felipe, L. & Hidalgo, P. (2015). TOXICIDAD DE FERTILIZANTES ORGANICA CON BIOENSAYO DE GERMINACION DE LECHUGA. *Tierra Latinaamericana* 33(2):179-185.
- Naranjo, I. (2013). Aplicación De Microorganismos Para Acelerar La Transformacion de Desechos Organicos En Compost» (en línea). s.l., Universidad Tecnica De Ambato. 7 p. Recuperado de: <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/5310/1/Tesis-52 Ingenieria Agronomica -CD 173.pdf>.
- Nichol, O. (2017). Niveles de salinidad del agua de riego en el rendimiento del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* var. *Longifolia*), en el suelo arenoso (en línea). s.l., Universidad Nacional Agraria la Molina. 10-12 p. Recuperado de: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3003/P35-N5-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Ortega-David, E.; Rodríguez, A.; David, A. & Zamora-Burbano, A. 2010. Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia (en línea). *Acta Agronómica* 59(1):111-118. Recuperado de: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/14094/14957.
- Orús Pueyo, F., Betrán Aso, J., Iguácel Soteras, F. & López Sánchez, M.V. (2011). Fertilización con subproductos orgánicos (Hacia una gestión sostenible de los nutrientes en la agricultura). (232):72.
- Ossa, J.A., Vanegas, M.C. & Badillo, Á.M. (2010). EVALUACIÓN DE LA MELAZA DE CAÑA COMO SUSTRATO PARA EL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus plantarum* EVALUATION OF CANE MOLASSES AS SUBSTRATE FOR

Lactobacillus plantarum GROWTH. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 13(1):97-104.

Parada, R., Beraud, L., Andoro, D., Sosa, F., Marguet, E. & Vallejo, M. (2017). Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas aisladas de invertebrados marinos de la costa del Chubut (Patagonia – Argentina). Bionatura 2(4):456-459. DOI: <https://doi.org/10.21931/rb/2017.02.04.8>.

Parra-Huertas, R.A. (2010). Review Lactic Acid Bacteria: Functional Role in The Foods. Facultad de Ciencias Agropecuarias 8(1):93-105.

Pentreath, V., González, E., Barquín, M., Ríos, S. M., & Perales, S. (2015). Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo. Revista de salud ambiental, 15(1), 13-20. Disponible en [file:///D:/Datos%20de%20User/Downloads/admin,+03+\(551\)+Derrame+petr%C3%B3leo+RV04.pdf](file:///D:/Datos%20de%20User/Downloads/admin,+03+(551)+Derrame+petr%C3%B3leo+RV04.pdf)

Peredo, Z. (2013). Universidad veracruzana instituto de ciencias basicas (en línea). s.l., Universidad Veracruzana Instituto de Ciencias Basicas. 13-15 p. Recuperado de: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46946/PeredoSuarezZairaDione.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Perez, F. (2017). Nutricion Mineral (en línea). Ucayali, s.e. DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

Pérez, J.P. (2014). Uso de los fertilizantes y su impacto en la producción agrícola (en línea). s.l., Universidad Nacional de Colombia. 1-126 p. DOI: <https://doi.org/10.4039/Ent79196-11>.

Quinde, A.F. (2014). Evaluación de la incidencia de la aplicación foliar de un biofertilizante elaborado a base de frutas en el nivel de clorofila a y b y en la calidad del follaje de tomate riñón (*Solanum lycopersicum* L.), fresa (*Fragaria vesca*), y rosas (*Rosae* sp.) (en línea). Repositorio UTA :66. Recuperado de: <http://repo.uta.edu.ec/handle/123456789/8456>.

Quiñones, H. (2012). PRODUCCIÓN DE ABONO LÍQUIDO ACELERADO CON HECES DE ALPACA, LACTOSUERO BOVINO Y MELAZA DE CAÑA MEDIANTE FERMENTACIÓN HOMOLÁCTICA (en línea). s.l., Universidad Nacional Agraria la Molina. 1-144 p. Recuperado de:

<http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2219/F04-Q855-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Quispe, D. (2015). Composicion nutricional de diez genotipos de Lupino (*L. mutabilis* y *L. albus*) desamargado por proceso acuoso (en línea). s.l., Universidad Nacional Agraria La Molina. 215 p. Recuperado de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2408/Q02-R459-T.pdf?sequence=1>.

Ramirez, M. (2005). T e s i s (en línea). s.l., Universidad Autonoma del Estado de Hidalgo. 3-8 p. Recuperado de: [https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10600/Actividad inhibitoria de cepas de bacterias.pdf?sequence=1](https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10600/Actividad%20inhibitoria%20de%20cepas%20de%20bacterias.pdf?sequence=1).

Robalino, H. (2011). “ Evaluación de la Actividad Biológica y Nutricional del Biol en Diferentes Formulaciones y la Respuesta a su Aplicación en Cultivos de Arroz (*Oriza sativa*) y Maíz (*Zae mays*), en Guayas ” (en línea). s.l., Escuela Superior Politecnica del Litoral. 1-77 p. Recuperado de: <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/30225/D-79469.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>.

Rodriguez, A. (2009). Evaluacion in-vitro de la actividad microbiana de los alcaloides de agua de coccion del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* sweet) (en línea). s.l., Escuela Superior Politecnica De Chimborazo. 1-83 p. Recuperado de: <http://dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/219/1/56T00193.pdf>.

Rodriguez, F.P., González, G.P.B. & Rodriguez, M.V. (2017). Evaluación de la calidad bioquímica resultante de biofermentos agrícolas para uso de familias productoras orgánicas (en línea). Primera. Biodiversidad, R de C en (ed.). Costa Rica, Asociación de Productores Orgánicos de la Zona Norte de Cartago (APROZONOC). 3-4 p. Recuperado de: <http://agroecologia.org/wp-content/uploads/2017/11/biofermentos-APROZONOC-INA.pdf>.

Rodríguez Romero, A.J., Robles Salazar, C.A., Ruíz Picos, R.A., López López, E.; Sedeño Díaz, J.E. & Rodríguez Dorantes, A. (2014). Seed germination and root elongation test of *Lactuca sativa* for biomonitoring water quality of the Chalma river (en línea). *Revista internacional de contaminación ambiental* 30(3):307-316. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-

49992014000300007.

- Ruiz Pérez, P. (2010). Biodiversidad de microbiota láctica en FML de vinos tintos cencibel caracterización molecular y tecnológica para la selección de cepas. s.l., s.e. 239 p.
- Sáenz, T.A. (2008). BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS : (en línea). Biotempo 8:54-64. Recuperado de: <http://www.urp.edu.pe/pdf/biologia/BACTERIAS.pdf>.
- Salazar-Antón, W.; Guzmán-Hernández, T.D.J. (2014). Efecto nematocida de extractos de *Quassia amara* y *Brugmansia suaveolens* sobre *Meloidogyne* sp. asociado al tomate en Nicaragua. *Agronomía Mesoamericana* 25(1):111. DOI: <https://doi.org/10.15517/am.v25i1.14210>.
- Salazar, A. (2015). Propiedades Nutricional y Medicinales del Tarwi o Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) (en línea). *Research Gate* (April):1-9. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/275274314%0APropiedades>.
- Sebastián, J., Muñoz, C., Consuelo, A. & Benavides, M. (2010). Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Producción + Limpia*. 5(2):78-94. Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/315188262/Dialnet-FertilizacionBiologicaTecnicasDeVanguardiaParaElDe-3875676>
- Sobrero, M.C. (2017). Estudio de la fitotoxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos (en línea). s.l., Universidad Nacional de La Plata. 1-253 p. Recuperado de: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/5246>.
- Soni, S.K., Soni, R. & Janveja, Ch. (2013). Production of Fermented Food. *Biotechnology in agriculture and food processing: Opportunities and challenges*. First. S.S, PPS& M (ed.). Boca Raton, CRC Press. 219-278 p. DOI: <https://doi.org/10.1201/b15271>
- Suca, G. (2016). Potencial del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) como futura fuente proteínica y avances de su desarrollo agroindustrial. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química* 18(2):55-71.
- Tapia, M. (2015). TARWI-espanol revista (en línea). Ancash, s.e. Recuperado de: <http://fadvamerica.org/wp-content/uploads/2017/04/TARWI-espanol.pdf>.
- Valencia, A. & Zapata, C. (2014). Remocion de Calcio y Magnesio de la melaza para el mejoramiento del proceso de Fermentacion (en línea). s.l., Universidad Nacional de Trujillo. 3-5 p. Recuperado de:

- http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3581/ValenciaLescano_A - ZapataSandoval_C.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Varnero, M., Rojas, C, & Orellana, R. (2007). INDICE DE FITOTOXICIDAD EN RESIDUOS ORGANICOS DURANTE EL COMPOSTAJE (en línea). J. Soil Sc Nutr 7(1):28-37. Recuperado de:
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/rcsuelo/v7n1/art03.pdf>.
- Vega, C. (2017). Problemas Ambientales y De Salud Derivados Del Uso de Fertilizantes Nitrogenados (en línea). s.l., Universidad Complutense. 5-7 p. Recuperado de:
<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/CRISTINA VEGA OLIVA.pdf>.
- Villacreces, N.R. (2011). Evaluación del procesamiento artesanal del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) sobre el consumo de agua, tiempo empleado y la calidad nutricional y microbiológica (en línea). s.l., Universidad San Francisco De Quito. 33 p. Recuperado de:
<http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/963/1/99493.pdf>.
- Wang, Y., Tashiro, Y, & Sonomoto, K. (2015). Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits (en línea). Journal of Bioscience and Bioengineering 119(1):10-18. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.06.003>.
- Zare, N. & Paulino, V. (2015). OPTIMIZACION DEL SECADO DEL TARWI (*Lupinus mutabilis*) POR COMBINACION DE MICROONDAS Y AIRE CALIENTE (en línea). s.l., UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO. 1-117 p. Recuperado de:
<http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/8208/Tesis DoctoradoX - Viviano P. Ninaquispe Zare.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Zirena, D. (2014). EVALUACIÓN DEL EFECTO ESCABICIDA DEL EXTRACTO *Lupinus mutabilis sweet* (Tarwi), PARA EL TRATAMIENTO DE LA ESCABIOSIS, “Sarna Humana”, EN PACIENTES DEL “HOSPITAL REGIONAL HONORIO DELGADO” (en línea). s.l., Universidad Católica de Santa María. . Recuperado de:
<http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/UCSM/3432/65.1513.FB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Distribución de porcentaje de los tratamientos

| | Tratamientos | | | Peso Final (g) de los tratamientos |
|---------------------|--------------|--------|----------|---------------------------------------|
| | Bio-lac | Melaza | Efluente | |
| T0 (Control) | 0 | 0 | 600 | 600 |
| T1 | 30 | 0 | 570 | 600 |
| T2 | 60 | 0 | 540 | 600 |
| T3 | 90 | 0 | 510 | 600 |
| T4 | 0 | 30 | 570 | 600 |
| T5 | 30 | 30 | 540 | 600 |
| T6 | 60 | 30 | 510 | 600 |
| T7 | 90 | 30 | 480 | 600 |
| T8 | 0 | 60 | 540 | 600 |
| T9 | 30 | 60 | 510 | 600 |
| T10 | 60 | 60 | 480 | 600 |
| T11 | 90 | 60 | 450 | 600 |
| T12 | 0 | 90 | 510 | 600 |
| T13 | 30 | 90 | 480 | 600 |
| T14 | 60 | 90 | 450 | 600 |
| T15 | 90 | 90 | 420 | 600 |
| T16 | 0 | 120 | 480 | 600 |
| T17 | 30 | 120 | 450 | 600 |
| T18 | 60 | 120 | 420 | 600 |
| T19 | 90 | 120 | 390 | 600 |

Lo resaltado en verde es el tratamiento control, mientras que los tratamientos en amarillo son los que no se consideraron dentro de la evaluación estadística ya que alteraba el análisis y no se ajustaban.

Anexo 2. Resultados en extenso

1. Niveles de pH (expresados en unidades de pH)

| Tratamiento | B-LAC | Melaza | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 10 | 20 | 30 |
|-------------|-------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Composición | | | | | | | | | | |
| T1-R1 | 5% | 0% | 4.07 | 4.12 | 4.07 | 3.66 | 3.31 | 3.36 | 5.35 | 7.54 | 8.36 |
| T1-R2 | 5% | 0% | 4.07 | 4.1 | 4.07 | 3.64 | 3.31 | 3.27 | 4.65 | 6.71 | 7.84 |
| T1-R3 | 5% | 0% | 4.07 | 4.1 | 4.05 | 3.62 | 3.32 | 3.33 | 5.55 | 7.4 | 7.91 |
| T2-R1 | 10% | 0% | 3.87 | 3.88 | 3.86 | 3.63 | 3.26 | 3.28 | 5.02 | 7.39 | 7.66 |
| T2-R2 | 10% | 0% | 3.85 | 3.88 | 3.84 | 3.56 | 3.21 | 3.21 | 5.17 | 7.54 | 7.75 |
| T2-R3 | 10% | 0% | 3.86 | 3.88 | 3.84 | 3.61 | 3.29 | 3.3 | 4.83 | 7.4 | 7.71 |
| T3-R1 | 15% | 0% | 3.75 | 3.77 | 3.72 | 3.45 | 3.14 | 3.18 | 4.62 | 6.67 | 7.55 |
| T3-R2 | 15% | 0% | 3.75 | 3.77 | 3.72 | 3.41 | 3.4 | 3.15 | 4.01 | 7.3 | 7.84 |
| T3-R3 | 15% | 0% | 3.74 | 3.77 | 3.73 | 3.46 | 3.2 | 3.25 | 3.92 | 7.49 | 7.56 |
| T4-R1 | 0% | 5% | 4.87 | 3.78 | 3.69 | 3.19 | 2.85 | 2.8 | 3.32 | 3.5 | 3.96 |
| T4-R2 | 0% | 5% | 4.87 | 3.78 | 3.66 | 3.19 | 2.86 | 2.83 | 3.51 | 4.21 | 5.72 |
| T4-R3 | 0% | 5% | 4.87 | 3.78 | 3.67 | 3.2 | 2.9 | 2.85 | 3.48 | 4.41 | 5.24 |
| T5-R1 | 5% | 5% | 4.6 | 4.52 | 3.66 | 3.65 | 3.29 | 3.36 | 2.94 | 3.48 | 3.34 |
| T5-R2 | 5% | 5% | 4.59 | 4.51 | 3.75 | 3.81 | 3.4 | 3.3 | 2.87 | 3.41 | 3.31 |
| T5-R3 | 5% | 5% | 4.59 | 4.5 | 3.85 | 3.82 | 3.14 | 3.26 | 2.88 | 3.55 | 3.24 |
| T6-R1 | 10% | 5% | 4.35 | 4.28 | 3.94 | 3.58 | 3.15 | 3.28 | 2.92 | 3.48 | 3.25 |
| T6-R2 | 10% | 5% | 4.34 | 4.26 | 3.72 | 3.69 | 3.21 | 3.31 | 2.9 | 3.47 | 3.24 |
| T6-R3 | 10% | 5% | 4.33 | 4.26 | 3.83 | 3.6 | 3.11 | 3.24 | 2.88 | 3.51 | 3.32 |
| T7-R1 | 15% | 5% | 4.18 | 4.11 | 3.75 | 3.63 | 3.25 | 3.33 | 2.92 | 3.51 | 3.37 |
| T7-R2 | 15% | 5% | 4.18 | 4.08 | 3.81 | 3.81 | 3.56 | 3.2 | 2.94 | 3.5 | 3.32 |
| T7-R3 | 15% | 5% | 4.17 | 4.09 | 3.76 | 3.58 | 3.16 | 3.28 | 2.93 | 3.5 | 3.3 |
| T8-R1 | 0% | 10% | 4.94 | 3.85 | 3.74 | 3.3 | 3 | 2.96 | 3.43 | 3.54 | 3.7 |
| T8-R2 | 0% | 10% | 4.94 | 3.85 | 3.74 | 3.31 | 2.99 | 2.96 | 3.45 | 3.54 | 3.65 |
| T8-R3 | 0% | 10% | 4.94 | 3.85 | 3.76 | 3.32 | 3 | 2.92 | 3.45 | 3.63 | 3.86 |
| T9-R1 | 5% | 10% | 4.56 | 4.53 | 3.44 | 3.42 | 3.23 | 3.07 | 2.94 | 3.5 | 3.29 |
| T9-R2 | 5% | 10% | 4.56 | 4.53 | 3.64 | 3.6 | 3.35 | 3.25 | 3.05 | 3.55 | 3.35 |
| T9-R3 | 5% | 10% | 4.56 | 4.52 | 3.63 | 3.55 | 3.24 | 3.18 | 2.96 | 3.51 | 3.32 |
| T10-R1 | 10% | 10% | 4.32 | 4.33 | 3.85 | 3.64 | 3.26 | 3.32 | 3.03 | 3.59 | 3.4 |
| T10-R2 | 10% | 10% | 4.37 | 4.31 | 4 | 3.7 | 3.22 | 3.24 | 3.04 | 3.63 | 3.42 |
| T10-R3 | 10% | 10% | 4.31 | 4.31 | 4.01 | 3.76 | 3.29 | 3.32 | 3.03 | 3.64 | 3.42 |
| T11-R1 | 15% | 10% | 4.19 | 4.18 | 4.02 | 3.66 | 3.27 | 3.36 | 3.02 | 3.63 | 3.42 |
| T11-R2 | 15% | 10% | 4.21 | 4.17 | 3.98 | 3.5 | 3.16 | 3.28 | 3.02 | 3.59 | 3.4 |
| T11-R3 | 15% | 10% | 4.14 | 4.17 | 4.06 | 3.74 | 3.34 | 3.38 | 3.04 | 3.61 | 3.39 |
| T12-R1 | 0% | 15% | 4.96 | 3.94 | 3.78 | 3.38 | 3.09 | 3.05 | 3.45 | 3.56 | 3.62 |
| T12-R2 | 0% | 15% | 4.96 | 3.94 | 3.81 | 3.39 | 3.06 | 3.01 | 3.47 | 3.51 | 3.48 |
| T12-R3 | 0% | 15% | 4.96 | 3.94 | 3.81 | 3.4 | 3.08 | 3.03 | 3.45 | 3.6 | 3.57 |
| T13-R1 | 5% | 15% | 4.57 | 4.57 | 3.94 | 3.74 | 3.35 | 3.24 | 2.99 | 3.5 | 3.35 |
| T13-R2 | 5% | 15% | 4.58 | 4.57 | 3.98 | 3.73 | 3.18 | 3.32 | 2.97 | 3.48 | 3.4 |
| T13-R3 | 5% | 15% | 4.58 | 4.56 | 4.19 | 3.71 | 3.16 | 3.32 | 2.98 | 3.48 | 3.3 |
| T14-R1 | 10% | 15% | 4.35 | 4.39 | 3.8 | 3.53 | 3.16 | 3.31 | 2.96 | 3.5 | 3.28 |
| T14-R2 | 10% | 15% | 4.38 | 4.37 | 3.74 | 3.49 | 3.14 | 3.3 | 2.95 | 3.56 | 3.3 |
| T14-R3 | 10% | 15% | 4.4 | 4.38 | 3.71 | 3.5 | 3.19 | 3.34 | 2.98 | 3.55 | 3.29 |
| T15-R1 | 15% | 15% | 4.25 | 4.25 | 4.06 | 3.79 | 3.46 | 3.46 | 2.99 | 3.53 | 3.3 |
| T15-R2 | 15% | 15% | 4.25 | 4.25 | 4.08 | 3.93 | 3.41 | 3.3 | 2.95 | 3.49 | 3.25 |
| T15-R3 | 15% | 15% | 4.24 | 4.24 | 4.09 | 3.88 | 3.49 | 3.48 | 3.01 | 3.52 | 3.3 |
| T16-R1 | 0% | 20% | 4.96 | 4.01 | 3.87 | 3.48 | 3.17 | 3.12 | 3.58 | 3.72 | 3.62 |
| T16-R2 | 0% | 20% | 4.96 | 4.02 | 3.88 | 3.47 | 3.17 | 2.11 | 3.58 | 3.57 | 3.65 |
| T16-R3 | 0% | 20% | 4.95 | 4.02 | 3.88 | 3.48 | 3.17 | 3.11 | 3.51 | 3.65 | 3.66 |
| T17-R1 | 5% | 20% | 4.59 | 4.61 | 3.93 | 3.76 | 3.44 | 3.43 | 3.03 | 3.55 | 3.37 |
| T17-R2 | 5% | 20% | 4.59 | 4.61 | 3.88 | 3.74 | 3.36 | 3.47 | 3.1 | 3.58 | 3.34 |
| T17-R3 | 5% | 20% | 4.56 | 4.6 | 3.73 | 3.6 | 3.38 | 3.44 | 3.13 | 3.61 | 3.36 |
| T18-R1 | 10% | 20% | 4.43 | 4.43 | 4 | 3.71 | 3.45 | 3.32 | 3.07 | 3.55 | 3.34 |
| T18-R2 | 10% | 20% | 4.39 | 4.42 | 4.08 | 3.79 | 3.32 | 3.41 | 3.04 | 3.56 | 3.33 |
| T18-R3 | 10% | 20% | 4.43 | 4.43 | 3.9 | 3.65 | 3.34 | 3.45 | 3.02 | 3.53 | 3.3 |
| T19-R1 | 15% | 20% | 4.29 | 4.29 | 4.12 | 3.71 | 3.35 | 3.44 | 3.13 | 3.62 | 3.45 |
| T19-R2 | 15% | 20% | 4.19 | 4.25 | 4.13 | 3.82 | 3.45 | 3.52 | 3.16 | 3.64 | 3.41 |
| T19-R3 | 15% | 20% | 4.28 | 4.28 | 4.14 | 3.73 | 3.37 | 3.46 | 3.18 | 3.66 | 3.47 |
| T19-R1 | 15% | 20% | 4.29 | 4.29 | 4.12 | 3.71 | 3.35 | 3.44 | 3.13 | 3.62 | 3.45 |
| T19-R2 | 15% | 20% | 4.19 | 4.25 | 4.13 | 3.82 | 3.45 | 3.52 | 3.16 | 3.64 | 3.41 |
| T19-R3 | 15% | 20% | 4.28 | 4.28 | 4.14 | 3.73 | 3.37 | 3.46 | 3.18 | 3.66 | 3.47 |

2. Porcentaje de ácido láctico (expresado en %)

| tratamiento | REP | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | Dia5 | 10 | 20 | Dia30 |
|-------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| T1 | R1 | 0.18 | 0.18 | 0.23 | 0.27 | 0.32 | 0.23 | 0.09 | 0.09 | 0.05 |
| | R2 | 0.18 | 0.18 | 0.23 | 0.36 | 0.27 | 0.27 | 0.14 | 0.09 | 0.05 |
| | R3 | 0.18 | 0.18 | 0.27 | 0.27 | 0.27 | 0.27 | 0.09 | 0.09 | 0.05 |
| T2 | R1 | 0.27 | 0.27 | 0.36 | 0.41 | 0.41 | 0.41 | 0.14 | 0.05 | 0.05 |
| | R2 | 0.23 | 0.27 | 0.36 | 0.41 | 0.41 | 0.41 | 0.18 | 0.14 | 0.05 |
| | R3 | 0.23 | 0.32 | 0.32 | 0.36 | 0.41 | 0.36 | 0.18 | 0.09 | 0.05 |
| T3 | R1 | 0.50 | 0.36 | 0.41 | 0.63 | 0.45 | 0.54 | 0.23 | 0.09 | 0.05 |
| | R2 | 0.50 | 0.36 | 0.41 | 0.63 | 0.45 | 0.50 | 0.36 | 0.05 | 0.05 |
| | R3 | 0.50 | 0.41 | 0.41 | 0.63 | 0.41 | 0.50 | 0.59 | 0.05 | 0.05 |
| T4 | R1 | 0.18 | 0.36 | 0.54 | 0.54 | 0.63 | 0.77 | 0.90 | 1.04 | 0.54 |
| | R2 | 0.14 | 0.41 | 0.59 | 0.59 | 0.59 | 0.68 | 0.72 | 0.50 | 0.09 |
| | R3 | 0.14 | 0.41 | 0.54 | 0.59 | 0.63 | 0.72 | 0.81 | 0.41 | 0.14 |
| T5 | R1 | 0.59 | 0.59 | 1.08 | 1.31 | 1.89 | 2.12 | 2.12 | 2.25 | 1.58 |
| | R2 | 0.59 | 0.59 | 0.95 | 1.04 | 1.80 | 2.30 | 2.34 | 2.34 | 1.85 |
| | R3 | 0.59 | 0.54 | 0.72 | 0.95 | 1.85 | 2.30 | 2.25 | 2.03 | 1.76 |
| T6 | R1 | 0.72 | 0.63 | 0.99 | 1.44 | 2.48 | 2.79 | 2.48 | 2.34 | 2.21 |
| | R2 | 0.77 | 0.68 | 0.95 | 1.35 | 2.43 | 2.66 | 2.52 | 2.34 | 2.16 |
| | R3 | 0.81 | 0.59 | 0.77 | 1.31 | 2.30 | 2.79 | 2.66 | 2.12 | 1.67 |
| T7 | R1 | 0.90 | 0.77 | 0.81 | 1.35 | 2.25 | 2.21 | 2.66 | 2.57 | 1.58 |
| | R2 | 1.04 | 0.86 | 0.59 | 1.26 | 2.52 | 2.57 | 2.03 | 1.80 | 1.76 |
| | R3 | 0.99 | 0.86 | 0.63 | 1.40 | 2.30 | 2.79 | 2.34 | 2.21 | 2.03 |
| T8 | R1 | 0.23 | 0.50 | 0.72 | 0.86 | 0.90 | 1.04 | 1.26 | 1.44 | 1.08 |
| | R2 | 0.23 | 0.50 | 0.72 | 0.86 | 0.90 | 1.04 | 1.31 | 1.89 | 1.49 |
| | R3 | 0.23 | 0.50 | 0.72 | 0.86 | 0.99 | 1.08 | 1.26 | 1.85 | 0.90 |
| T9 | R1 | 0.50 | 0.54 | 0.86 | 1.71 | 2.52 | 2.66 | 2.67 | 2.30 | 2.75 |
| | R2 | 0.50 | 0.45 | 0.86 | 1.71 | 2.57 | 2.84 | 2.48 | 2.66 | 2.12 |
| | R3 | 0.50 | 0.59 | 0.59 | 0.86 | 1.58 | 2.61 | 2.70 | 2.66 | 2.66 |
| T10 | R1 | 0.59 | 0.68 | 0.54 | 1.71 | 2.52 | 3.06 | 2.03 | 2.30 | 2.07 |
| | R2 | 0.68 | 0.72 | 0.50 | 1.58 | 2.88 | 3.33 | 3.02 | 2.70 | 2.66 |
| | R3 | 0.59 | 0.68 | 0.54 | 1.40 | 2.75 | 2.25 | 3.02 | 2.75 | 2.48 |
| T11 | R1 | 0.77 | 0.72 | 0.54 | 1.80 | 2.66 | 3.24 | 2.88 | 2.66 | 2.57 |
| | R2 | 0.72 | 0.86 | 0.54 | 1.89 | 2.75 | 2.84 | 2.25 | 2.84 | 2.48 |
| | R3 | 0.68 | 0.81 | 0.59 | 1.62 | 2.84 | 3.20 | 2.61 | 2.97 | 2.88 |
| T12 | R1 | 0.27 | 0.72 | 1.08 | 1.04 | 0.86 | 1.22 | 1.89 | 2.34 | 1.71 |
| | R2 | 0.32 | 0.68 | 0.95 | 0.77 | 1.04 | 1.22 | 1.53 | 2.30 | 2.12 |
| | R3 | 0.27 | 0.72 | 0.81 | 0.86 | 1.08 | 1.26 | 1.98 | 1.76 | 1.76 |
| T13 | R1 | 0.72 | 0.54 | 0.45 | 1.85 | 2.97 | 2.66 | 2.61 | 2.88 | 2.48 |

Continuación ...

| | | | | | | | | | | |
|-----|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | R2 | 0.59 | 0.54 | 0.50 | 1.62 | 2.52 | 2.84 | 2.52 | 2.25 | 2.39 |
| | R3 | 0.59 | 0.59 | 0.50 | 1.49 | 3.20 | 2.79 | 3.02 | 3.02 | 2.97 |
| T14 | R1 | 0.63 | 0.68 | 0.81 | 2.07 | 3.02 | 2.57 | 2.66 | 3.02 | 2.79 |
| | R2 | 0.68 | 0.59 | 0.72 | 1.98 | 2.88 | 2.66 | 2.34 | 2.21 | 2.25 |
| | R3 | 0.72 | 0.68 | 0.86 | 1.89 | 2.79 | 2.39 | 2.30 | 2.30 | 2.61 |
| T15 | R1 | 0.77 | 0.54 | 0.50 | 1.49 | 2.16 | 2.66 | 3.11 | 3.47 | 3.33 |
| | R2 | 0.81 | 0.68 | 0.45 | 0.99 | 2.88 | 2.16 | 3.24 | 3.51 | 3.38 |
| | R3 | 0.81 | 0.81 | 0.50 | 0.95 | 2.43 | 2.21 | 2.70 | 3.11 | 2.84 |
| T16 | R1 | 0.41 | 0.86 | 1.04 | 1.17 | 1.26 | 1.35 | 1.80 | 2.30 | 1.98 |
| | R2 | 0.41 | 0.86 | 0.95 | 1.08 | 1.13 | 1.44 | 1.71 | 2.70 | 1.76 |
| | R3 | 0.41 | 0.86 | 0.95 | 0.95 | 1.22 | 1.35 | 2.12 | 1.89 | 1.89 |
| T17 | R1 | 0.59 | 0.63 | 0.54 | 1.53 | 2.66 | 2.12 | 2.93 | 3.15 | 3.92 |
| | R2 | 0.59 | 0.63 | 0.59 | 1.58 | 2.52 | 1.58 | 2.52 | 2.61 | 2.93 |
| | R3 | 0.50 | 0.63 | 0.68 | 1.80 | 2.79 | 1.67 | 2.12 | 2.75 | 2.57 |
| T18 | R1 | 0.68 | 0.72 | 0.54 | 1.76 | 2.70 | 2.03 | 2.61 | 2.70 | 3.29 |
| | R2 | 0.72 | 0.68 | 0.45 | 1.71 | 2.84 | 2.48 | 2.75 | 3.56 | 3.33 |
| | R3 | 0.72 | 0.63 | 0.86 | 2.07 | 2.52 | 1.98 | 3.02 | 3.42 | 3.20 |
| T19 | R1 | 0.86 | 0.95 | 0.50 | 2.34 | 2.84 | 2.39 | 2.61 | 2.70 | 2.84 |
| | R2 | 0.77 | 0.72 | 0.59 | 1.35 | 2.34 | 2.12 | 2.93 | 3.38 | 3.33 |
| | R3 | 0.81 | 0.99 | 0.50 | 2.34 | 2.84 | 2.30 | 2.48 | 2.79 | 2.88 |

Anexo 3. Análisis Estadístico

1. Resumen del análisis de pH

| Supuesto de Normalidad | | | | | |
|---|--|--|--|--|--|
| Shapiro-Wilk normality test | | | | | |
| data: rstandard(modelo_pH_t) | | | | | |
| W = 0.9646, p-value = 0.2968 | | | | | |
| Supuesto de Homogeneidad de Varianza | | | | | |
| Non-constant Variance Score Test | | | | | |
| Variance formula: ~ fitted.values | | | | | |
| Chisquare = 0.5359976, Df = 1, p = 0.4641 | | | | | |
| CV del Modelo | | | | | |
| el cv es 1.735369% | | | | | |

El método usado para corregir los supuestos de manera óptima fue la transformación de Box y Cox

- **Comparación**

| Tratamientos | tabla_pH\$Dia5 | groups |
|--------------|----------------|--------|
| T19 | 3.473333 | a |
| T17 | 3.446667 | ab |
| T15 | 3.413333 | abc |
| T18 | 3.393333 | abc |
| T11 | 3.340000 | abc |
| T14 | 3.316667 | abcd |
| T5 | 3.306667 | abcd |
| T10 | 3.293333 | bcd |
| T13 | 3.293333 | bcd |
| T6 | 3.276667 | bcd |
| T7 | 3.270000 | cd |
| T9 | 3.166667 | d |

- **ANOVA**

| | Grados de Libertad | Sum de cuadrados | Cuadrados medios del error | F value | Pvalor(>F) |
|--------------------|--------------------|------------------|----------------------------|---------|------------|
| Tratamiento | 11 | 0.24501 | 0.022273 | 6.66 | 5.46e-05 |
| Residuales | 24 | 0.08027 | 0.003344 | | |

Anexo 4. Evaluación porcentaje de acidez

1. Resumen del análisis de porcentaje de acidez

| Transformacion Raiz Cuadrada | | | | |
|---|--|--|--|--|
| Supuestos de Normalidad | | | | |
| Shapiro-Wilk normality test | | | | |
| data: rstandard(modelo_pH_t) | | | | |
| W = 0.96516, p-value = 0.3084 | | | | |
| Supuestos de Homogeneidad de Varianzas | | | | |
| Non-constant Variance Score Test | | | | |
| Variance formula: ~ fitted.values | | | | |
| Chisquare = 0.05359976, Df = 1, p = 0.461 | | | | |

- Comparación de porcentaje de acidez

| Tratamiento | acidez% | Dia5 groups |
|-------------|---------|-------------|
| T11 | 3.090 | a |
| T10 | 2.880 | ab |
| T13 | 2.760 | ab |
| T6 | 2.745 | ab |
| T9 | 2.700 | ab |
| T14 | 2.535 | ab |
| T7 | 2.520 | abc |
| T15 | 2.340 | bc |
| T19 | 2.265 | bc |
| T5 | 2.235 | bc |
| T18 | 2.160 | bc |
| T17 | 1.785 | c |

- Anova

| | Grados de Libertad | Sum de cuadrados | Cuadrados medios del error | F value | Pvalor(>F) |
|--------------------|--------------------|------------------|----------------------------|---------|------------|
| Tratamiento | 11 | 4.139 | 0.3926 | 6.171 | 1e-04 |
| Residuales | 24 | 1.527 | 0.0636 | | |

Anexo 5. Resultados del ensayo de fitotoxicidad

1. Germinación

Cada dilución conto con tres repeticiones

Semillas por placa:20

Total: 60 semillas

| | Control | 100/100 | 10/100 | 1/100 | 0.1/100 | 0.01/100 | 0.001/100 |
|-------------------|----------------|----------------|---------------|--------------|----------------|-----------------|------------------|
| | 19 | 0 | 0 | 17 | 20 | 18 | 18 |
| | 18 | 0 | 0 | 19 | 19 | 18 | 19 |
| | 18 | 0 | 0 | 20 | 19 | 17 | 19 |
| Promedio T | 18.333 | | | 18.667 | 19.333 | 17.667 | 18.667 |

| Diluciones | Control: 0/100 | | | 0.001/100 | | | 0.01/100 | | | 0.1/100 | | | 1/100 | | |
|--------------|----------------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------------|-------|-------|
| Repeticiones | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 |
| 1 | 20.6 | 25.6 | 19.12 | 16.71 | 25.43 | 31.75 | 17.31 | 24.12 | 11.93 | 13.68 | 18.19 | 15.27 | 26.95 | 18.83 | 16.69 |
| 2 | 17.51 | 27.84 | 16.3 | 26.27 | 31.39 | 22.81 | 21.03 | 17.22 | 16.96 | 15.63 | 12.24 | 19.06 | 22.08 | 24.33 | 25.79 |
| 3 | 11.39 | 15.8 | 15.88 | 20.26 | 36.91 | 11.71 | 18.35 | 12.19 | 15.13 | 10.66 | 23.79 | 21.76 | 16.01 | 18.28 | 20.87 |
| 4 | 23.57 | 24.65 | 16.59 | 22.29 | 22.24 | 13.06 | 14.7 | 14.69 | 15.7 | 19.25 | 16.98 | 18.03 | 13.61 | 17.14 | 18.01 |
| 5 | 21.43 | 24.61 | 21.88 | 20.9 | 19 | 26.46 | 13.34 | 18.24 | 18 | 25.95 | 18.1 | 23.99 | 25.48 | 10.62 | 21.29 |
| 6 | 19.56 | 21.56 | 18.28 | 22.46 | 26.02 | 25.86 | 23.86 | 22.57 | 24.23 | 21.67 | 21.33 | 19.67 | 21.09 | 16.96 | 18.85 |
| 7 | 19.4 | 16.53 | 20.13 | 17.52 | 24.65 | 17.54 | 23.85 | 25.69 | 17.2 | 16.62 | 30.55 | 18.46 | 15.44 | 16.7 | 17.75 |
| 8 | 14.71 | 15.44 | 28.11 | 26.51 | 15.02 | 28.3 | 16.04 | 18.83 | 19.72 | 19.5 | 13.32 | 17.35 | 19.99 | 6.79 | 13.68 |
| 9 | 21.15 | 16.88 | 20.8 | 35.56 | 27.95 | 26.11 | 17.61 | 28.18 | 8.31 | 17.44 | 20.31 | 17.92 | 10.85 | 8.95 | 22.44 |
| 10 | 27.31 | 20.64 | 14.75 | 17.67 | 25.67 | 35.73 | 22.66 | 17.86 | 21.95 | 19.35 | 24.65 | 19.26 | 14.8 | 22.58 | 13.31 |
| 11 | 21.57 | 13 | 18.63 | 18.24 | 35.38 | 30.64 | 25.03 | 26.56 | 19.71 | 22.62 | 17.85 | 17.64 | 12.85 | 21.1 | 13.96 |
| 12 | 27.31 | 21.48 | 19.33 | 20.84 | 22.26 | 17 | 21.8 | 16.22 | 17.16 | 34.24 | 18.66 | 22.26 | 16.12 | 22.17 | 18.98 |
| 13 | 21.57 | 17.27 | 15.39 | 24.54 | 21.14 | 15.39 | 22.66 | 15.01 | 15.95 | 17.28 | 16.26 | 23.25 | 17.99 | 12.86 | 11.09 |
| 14 | 15.98 | 17.22 | 20.23 | 22.68 | 32.75 | 38.45 | 17.93 | 15.69 | 17.92 | 19.51 | 24.71 | 14.6 | 13.52 | 17.6 | 13.79 |
| 15 | 18.12 | 19.28 | 20.64 | 19.24 | 20.93 | 21.23 | 14.47 | 21.86 | 26.85 | 26.64 | 18.03 | 18.7 | 18.07 | 15.38 | 14.4 |
| 16 | 29.6 | 15 | 19 | 15.87 | 21.49 | 25.9 | 17.57 | 18.81 | 26.92 | 5.23 | 15.11 | 32.45 | 17.59 | 24.72 | 16.83 |
| 17 | 23.03 | 15.42 | 15.44 | 17.95 | 22.03 | 9.15 | 19.85 | 11.24 | 15.11 | 14.4 | 12.99 | 20.93 | 13.11 | 17.57 | 13.67 |
| 18 | 18.29 | 13.6 | 17.26 | 20.81 | 22.35 | 11.95 | 19.03 | 18.26 | | 22.26 | 16.26 | 19.01 | | 8.13 | 15.44 |
| 19 | 18.04 | | | 20.1 | 29.36 | | | | | 18.52 | 16.36 | 17.01 | | 16.56 | 12.44 |
| 20 | | | | | | | | | | 20.32 | | | | | 13.76 |
| Promedio T | 20.53 | 18.99 | 18.76 | 21.39 | 25.37 | 22.72 | 19.28 | 19.07 | 18.16 | 19.04 | 18.72 | 19.82 | 17.39 | 16.70 | 16.65 |
| | 19.42937622 | | | 23.16060429 | | | 18.83781046 | | | 19.19371053 | | | 16.91190506 | | |

Anexo 6. Caracterización fisicoquímica y microbiológica del tarwifer

2. Análisis de materia orgánica de Tarwifer



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS ESPECIAL DE MATERIA ORGANICA

SOLICITANTE : JUAN JUSCAMAYTA MORALES
PROCEDENCIA : LIMA/ LIMA/ LA MOLINA
MUESTRA DE : BIOFERMENTO DE SANMARGADO DE CHOCHO
REFERENCIA : H.R. 68745
BOLETA : 3129
FECHA : 26/06/19

| Nº LAB | CLAVES | pH | C.E. dS/m | Sólidos Totales g/L | M.O. en Solución g/L | N Total mg/L | P Total mg/L | K Total mg/L |
|--------|--------|------|--------------|---------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 559 | CHE-I | 3.29 | 18.80 | 81.84 | 67.16 | 1512.00 | 369.55 | 2687.50 |

| Nº LAB | CLAVES | Ca Total mg/L | Mg Total mg/L | Na Total mg/L |
|--------|--------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 559 | CHE-I | 619.25 | 415.75 | 157.50 |

| LAB | CLAVES | Fe Total mg/L | Cu Total mg/L | Zn Total mg/L | Mn Total mg/L | B Total mg/L |
|-----|--------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| 559 | CHE-I | 14.05 | 0.63 | 1.07 | 0.85 | 2.63 |



Sady García Bendejú L.
Jefe de Laboratorio

Av. La Molina s/n Campus UNALM
Telf.: 614-7800 Anexo 222 Teléfono Directo: 349-5622
e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe

3. Análisis microbiológico del tarwifer



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
 Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO N° 1909352 - LMT

SOLICITANTE : JUAN JUSCAMAITA MORALES
DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO
MUESTRA : FERTI TARWI UNALM
 1909352)

PROCEDENCIA : Lima - UNALM
TIPO DE ENVASE : Botella de plástico
CANTIDAD DE MUESTRA : 01 muestra x 01 und. x 1 000 ml. aprox.
ESTADO Y CONDICIÓN : En buen estado y cerrado
FECHA DE MUESTREO : 2019 - 09 - 12
FECHA DE RECEPCIÓN : 2019 - 09 - 12
FECHA DE INICIO DE ENSAYO : 2019 - 09 - 12
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO : 2019 - 09 - 18

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

| Análisis Microbiológico | Muestra 1909352 |
|--|----------------------|
| *Recuento de mohos y levaduras (UFC/ml) | 20 x 10 ² |
| *Recuento de bacterias ácido láctica (UFC/ml) | 27 x 10 ⁴ |
| *Enumeración de coliformes totales (NMP/ml) | < 3 |
| *Enumeración de coliformes fecales (NMP/ml) | < 3 |
| *Enumeración de <i>Escherichia coli</i> (NMP/ml) | < 3 |

NOTA: El valor < 3 indica ausencia de microorganismos en ensayo.

Métodos:
 *International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1983, 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trat. 1988) Reimp. 2000, Editorial Acribia.
 *American Public Health Association, 1992, Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods, 3ª Ed. Chapter 13.
 *Zapater J., 1975, Evaluación en el maíz del coeficiente nutrientes-suelo (P/S) referidos a bacterias libres, Spedias de la UNALM 13:45-57.
 *Anderson J. 1967, Soil respiration. En: Page A., Miller R., Keeney D. (Eds.) Methods of Soil Analysis Part II, Chemical and Microbiological

Observaciones:
 Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.
 Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.
 Validez del documento:
 Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.


DRA. DORIS ZUÑIGA DÁVILA
 Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
 y Biotecnología "Marino Tabusso"
 Universidad Nacional Agraria La Molina
 Teléfono: 6147800 anexo 274
 E-mail: lmt@tamolina.edu.pe



La Molina, 19 de Setiembre del 2019

LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGÍA "MARINO TABUSSO"
 ☎ (511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: lmt@tamolina.edu.pe

Anexo 7. *Meloidogyne incognita* Fase J2

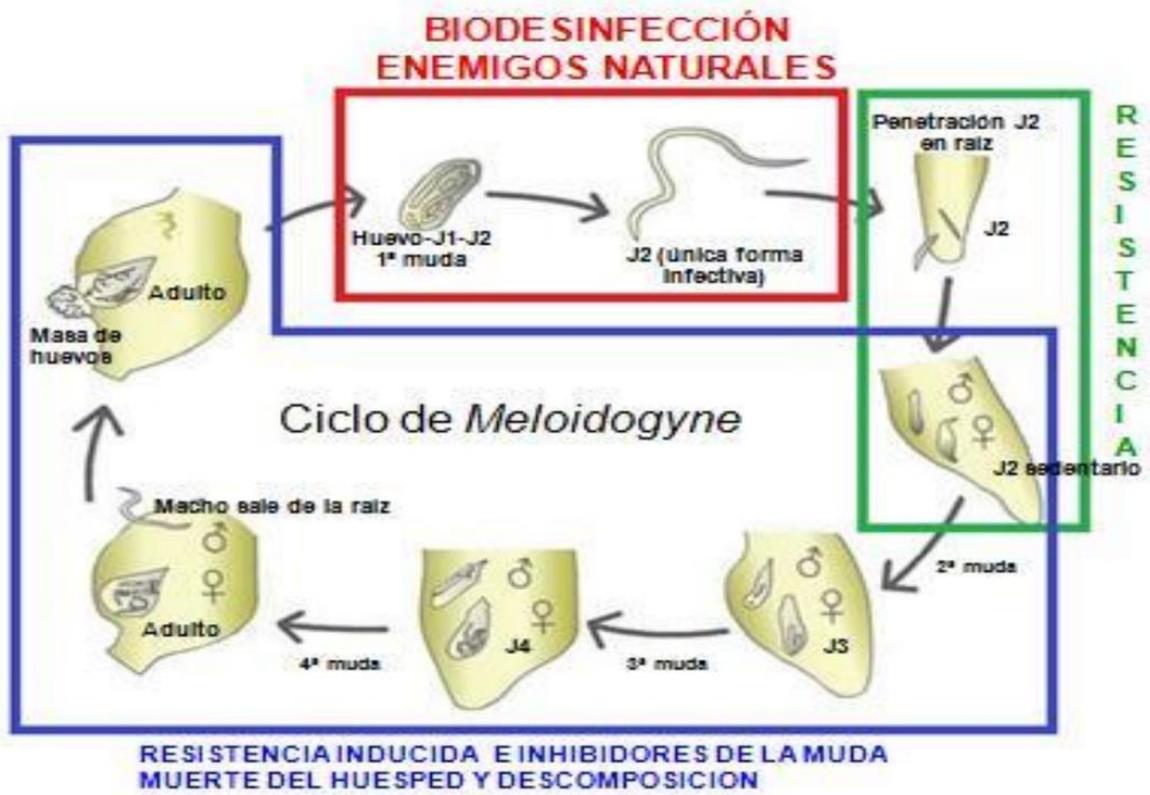


Figura 29. Ciclo de vida de *Meloidogyne incognita*

Anexo 8. Resultados de efecto nematicida del tarwifer

1. Análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|-------------|----|----------------|-------------------|-------|
| % Mortandad | 16 | 0.99 | 0.99 | 14.67 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------|----------|----|---------|--------|---------|
| Modelo | 25131.25 | 3 | 8377.08 | 382.95 | <0.0001 |
| Trat. | 25131.25 | 3 | 8377.08 | 382.95 | <0.0001 |
| Error | 262.50 | 12 | 21.88 | | |
| Total | 25393.75 | 15 | | | |

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=9.81872
 Error: 21.8750 gl: 12

| Trat. | Medias | n | E.E. | |
|--------------|--------|---|------|-----|
| T1 (2.5% Ch) | 100.00 | 4 | 2.34 | A |
| T2 (1% Ch) | 16.25 | 4 | 2.34 | B |
| T3 (0.5% Ch) | 8.75 | 4 | 2.34 | B C |
| T0 (Agua) | 2.50 | 4 | 2.34 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

2. Datos reales obtenidos en la prueba de mortandad de J2 de Meloidogyne

| Trat. | Rep. | Instalados | 48 horas en producto | | 48 horas en agua | | % Mortandad |
|--------------|------|------------|----------------------|-----------------|------------------|--------------|-------------|
| | | | N° móviles | N° J2 inmóviles | N° móviles | N° inmóviles | |
| T0 (Agua) | R1 | 20 | 19 | 1 | 19 | 1 | 5 |
| T0 (Agua) | R2 | 20 | 20 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| T0 (Agua) | R3 | 20 | 20 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| T0 (Agua) | R4 | 20 | 19 | 1 | 19 | 1 | 5 |
| T1 (2.5% Ch) | R1 | 20 | 0 | 20 | 0 | 20 | 100 |
| T1 (2.5% Ch) | R2 | 20 | 0 | 20 | 0 | 20 | 100 |
| T1 (2.5% Ch) | R3 | 20 | 0 | 20 | 0 | 20 | 100 |
| T1 (2.5% Ch) | R4 | 20 | 0 | 20 | 0 | 20 | 100 |
| T2 (1% Ch) | R1 | 20 | 3 | 17 | 18 | 2 | 10 |
| T2 (1% Ch) | R2 | 20 | 1 | 19 | 16 | 4 | 20 |
| T2 (1% Ch) | R3 | 20 | 1 | 19 | 15 | 5 | 25 |
| T2 (1% Ch) | R4 | 20 | 0 | 20 | 18 | 2 | 10 |
| T3 (0.5% Ch) | R1 | 20 | 18 | 2 | 19 | 1 | 5 |
| T3 (0.5% Ch) | R2 | 20 | 16 | 4 | 17 | 3 | 15 |
| T3 (0.5% Ch) | R3 | 20 | 17 | 3 | 19 | 1 | 5 |
| T3 (0.5% Ch) | R4 | 20 | 18 | 2 | 18 | 2 | 10 |

Anexo 9. Datos adicionales para costo-beneficio

1. Cálculo de Costo de insumos

| Tratamiento | B-Lac* | Melaza* | Formula | Consumo de insumos (PEN/Kg)** |
|-------------|--------|---------|---|-------------------------------|
| T9 | 5% | 10% | | 0.6 |
| T11 | 15% | 10% | $\text{Costo} = \frac{(\%Biolac * 10 + \%Melaza * 1)}{100}$ | 1.6 |
| T17 | 5% | 20% | | 0.7 |

(*) 1L de B-Lac=10 PEN, 1Kg de melaza=1 PEN

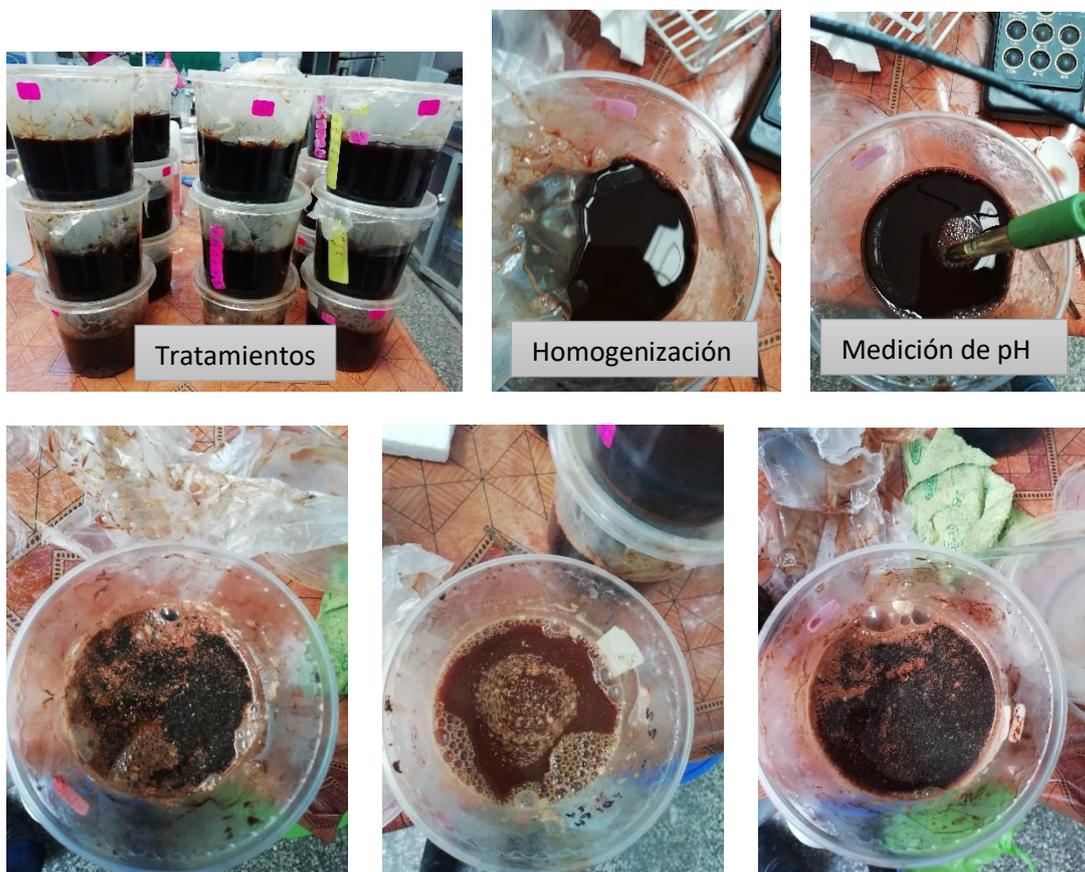
(**) Costos expresados en PEN (código de la divisa en Nuevos Soles) por 1Kg de mezcla

Anexo 10. Registro fotográfico

1. Fase preliminar



2. Fase Laboratorio



Tratamientos con presencia de mohos y levaduras



Tratamientos con condiciones organolépticas aceptables

3.

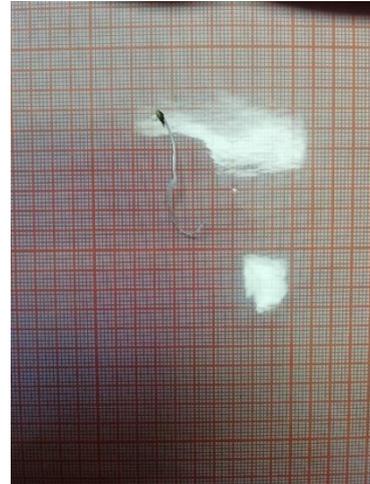
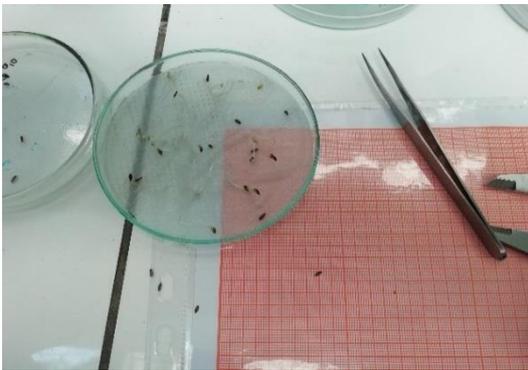
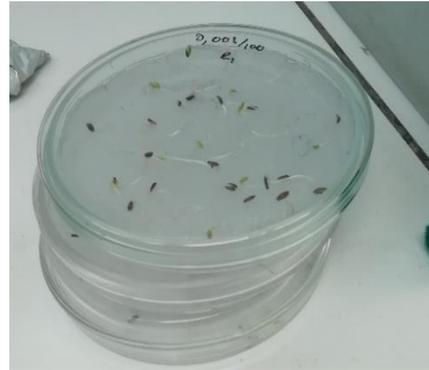
Proceso de titulación



4. Fase Piloto



- Prueba de fitotoxicidad



Diluciones de Tarwifer para la prueba de Dragendorf

