



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V**



**Biofertilizante a partir de residuos bovinos y porcinos para su uso
en la producción agrícola**

TESIS

Que para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA
TROPICAL**

Presenta

Cecilia Guadalupe Pereyra Tamayo L140076

Directora de tesis

Dra. Mariela Beatriz Reyes Sosa

Co-directora

Dra. María del Carmen Ponce Caballero

Villaflores, Chiapas, México

Agosto 2022



Villaflores, Chiapas
12 de agosto de 2022
Oficio N° D/675/22

C. CECILIA GUADALUPE PEREYRA TAMAYO
MAESTRANTE EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS *CAMPUS V*
P R E S E N T E.

En atención a que usted ha presentado los votos aprobatorios del Honorable Jurado designado para su evaluación de posgrado, de la tesis titulada. **“BIOFERTILIZANTE A PARTIR DE RESIDUOS BOVINOS Y PORCINOS PARA SU USO EN LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA”**, por este medio le comunico que se le autoriza la impresión del documento, de acuerdo a los lineamientos vigentes de la Universidad.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR LA CONCIENCIA DE LA VERDAD Y LA LIBERTAD DE SERVIR”

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONOMICAS



M. C. CARLOS ALBERTO VELÁZQUEZ SANABRIA
DIRECTOR

C. c. p. Archivo

CAVS*marh.



Código: FO-113-05-05

Revisión: 0

CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DE LA TESIS DE TÍTULO Y/O GRADO.

El (la) suscrito (a) Cecilia Guadalupe Pereyra Tamayo
Autor (a) de la tesis bajo el título de "Biofertilizante a partir de residuos bovinos y porcinos para su uso en la producción agrícola"

presentada y aprobada en el año 2022 como requisito para obtener el título o grado de MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL, autorizo a la Dirección del Sistema de Bibliotecas Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH), a que realice la difusión de la creación intelectual mencionada, con fines académicos para que contribuya a la divulgación del conocimiento científico, tecnológico y de innovación que se produce en la Universidad, mediante la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Consulta del trabajo de título o de grado a través de la Biblioteca Digital de Tesis (BIDITE) del Sistema de Bibliotecas de la Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH) que incluye tesis de pregrado de todos los programas educativos de la Universidad, así como de los posgrados no registrados ni reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT.
- En el caso de tratarse de tesis de maestría y/o doctorado de programas educativos que sí se encuentren registrados y reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional del Ciencia y Tecnología (CONACYT), podrán consultarse en el Repositorio Institucional de la Universidad Autónoma de Chiapas (RIUNACH).

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; a los 16 días del mes de agosto del año 2022.

Cecilia Guadalupe Pereyra Tamayo
Nombre y firma del Tesista o Tesistas

AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Ciencias Agronómicas C-V por cobijarme y formarme profesionalmente.

A la Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical (MCPAT) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para realizar mis estudios de posgrado.

Al Cuerpo Académico en Agroforestería Pecuaria por el respaldo brindado durante la realización de este proyecto.

A mi comité tutorial: Dra. Mariela Beatriz Reyes Sosa, Dra. María del Carmen Ponce Caballero, Dr. José Apolonio Venegas Venegas y Dr. Rene Pinto Ruiz; por brindarme su apoyo en cada etapa de este proyecto y por depositar su confianza en mí.

A mis compañeras de generación: Susi, Ani, Paulina y Esmeralda, gracias por todo su apoyo y su cariño hacia mí, aprendí mucho de cada una de ustedes y deseo que siempre sigan triunfando y luchando desde sus trincheras.

A todas aquellas personas que estuvieron involucradas en la realización de este proyecto les estaré siempre agradecida.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	3
1.2 Planteamiento del problema y justificación	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Estiércol bovino.....	4
2.2 Estiércol porcino	4
2.3 Problemas ambientales generados por la acumulación de estiércol	5
2.4 Microorganismos presentes en el estiércol	6
2.5 El suelo.....	6
2.6 Digestión anaerobia	7
2.7 Tipos de digestores	8
2.7.1 Diseños de biodigestores	9
2.8 Biofertilizante	10
2.9 Características fisicoquímicas del biofertilizante	11
2.10 Implementación de los biofertilizantes productos de la digestión anaerobia.....	13
2.11 El cultivo de frijol.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Área de estudio	15
3.3 Etapas del proyecto.....	16
3.3.1 Caracterización Fisicoquímica y microbiológica del sustrato y biofertilizante	16
3.3.2 Evaluación agronómica del biofertilizante	18
3.4 Análisis estadístico	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 Caracterización fisicoquímica del estiércol y biofertilizante bovino y porcino.....	22
4.2 Características microbiológicas del estiércol y biofertilizante bovino y porcino.	28
4.3 Secuenciación masiva de nueva generación del gen 16S ARNr	31

4.4. Evaluación agronómica de los biofertilizantes en el cultivo de frijol	32
4.5. Análisis del potencial regenerativo del suelo	36
5. CONCLUSION	50
6. LITERATURA CITADA	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional del estiércol y biofertilizante bovino	22
Tabla 2. Características fisicoquímicas del estiércol y biofertilizante bovino	22
Tabla 3. Composición nutricional del estiércol y biofertilizante porcino	23
Tabla 4. Características fisicoquímicas del estiércol y biofertilizante porcino	23
Tabla 5. Composición nutricional de los biofertilizantes bovino y porcino.....	26
Tabla 6. Características fisicoquímica de los biofertilizantes bovino y porcino.	26
Tabla 7. Porcentaje de eliminación DQO de los sustratos bovino y porcino	28
Tabla 8. Parámetros microbiológicos del sustrato bovino antes y después de la DA	29
Tabla 9. Parámetros microbiológicos del sustrato porcino antes y después de la DA	29
Tabla 10. Porcentaje de Bacterias patógenas y de interés agrícola presentes en el estiércol y el biofertilizante bovino.	31
Tabla 11. Altura promedio de las plantas (cm) de frijol.....	33
Tabla 12. Diámetro promedio del tallo (cm) de las plantas de frijol.....	33
Tabla 13. Variables de crecimiento vegetal.....	34
Tabla 14. Promedio de la tasa fotosintética y clorofila total de las plantas de frijol	35
Tabla 15. Temperatura y pH del suelo durante el ciclo del cultivo	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema básico de un biodigestor tubular (Martí, 2007).....	10
Figura 2. Ubicación del área de estudio	15
Figura 3. Análisis de Coordenadas Principales (PCO) de los resultados de la caracterización físico-química de los sustratos y biofertilizantes producidos en Villaflores, Chiapas. Las muestras están estandarizadas, transformadas (raíz cuadrada) y analizadas con una matriz de Distancia Euclidiana. El tamaño de los círculos rojos y azules, representa el contenido de fosfatos en mg L^{-1}	24
Figura 4. Análisis de los perfiles de similaridad (SIMPROF) de los sustratos bovinos y porcinos representados con los círculos verdes. Los vectores corresponden a la correlación de Pearson 0.7.....	27
Figura 5. Análisis de los resultados microbiano de los sustratos bovino y porcino.: EB= entrada bovino, SB= salida bovino, EP= entrada porcino, SP= salida porcino, O.C= otros coliformes, Aero= aerófilos. Los círculos en color rosa representan los perfiles de similaridad (SIMPROF basado en 999 permutaciones a un 95 % de confianza). Los vectores corresponden a la correlación de Pearson 0.7.....	30
Figura 6. Bacterias de interés agrícola. A Bacterias identificadas según bibliografía de interés agrícola presentes en el biofertilizante a partir de excretas bovinas. B Funciones benéficas que se les atribuye a las bacterias identificadas según bibliografía.....	32
Figura 7. Análisis de Coordenadas Principales (PCO) según manejo de suelo y fertilizante. Las muestras están estandarizadas, transformadas (raíz cuadrada) y analizadas con una matriz de distancia euclidiana. Los círculos verdes representan los perfiles de similaridad (SIMPROF basado en 999 permutaciones a un 95 % de confianza).....	36
Figura 8. Análisis de Coordenadas Principales (PCO) de la tasa de cambio de los tratamientos con respecto al testigo. Las muestras están estandarizadas, transformadas (raíz cuadrada) y analizadas con una matriz de distancia euclidiana. El círculo en verde representa el perfil de similaridad (SIMPROF basado en 999 permutaciones a un 95 % de confianza).....	37
Figura 9. Análisis de Coordenadas Principales (PCO) del análisis microbiológico según tratamiento. Las muestras están estandarizadas, transformadas (raíz cuadrada) y analizadas con una matriz de distancia euclidiana. Los círculos de colores representan las abundancias relativas de las bacterias	

analizadas presentes; azul presencia de E.coli, morado presencia de O.C y naranja población aerófila. Los vectores representan la correlación (0.7 múltiple) con los nutrientes.	39
Figura 10. Resultados del estadístico nMDS de los análisis de suelo antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.	40
Figura 11. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de fosforo (P- Bray) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.....	40
Figura 12. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de nitrógeno (N-NO ₃) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.....	41
Figura 13. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de potasio (K) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.	42
Figura 14. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de calcio (Ca) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.	43
Figura 15. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de magnesio (Mg) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.	44
Figura 16. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de manganeso (Mn) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.....	44
Figura 17. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de sodio (Na) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.	45
Figura 18. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de azufre (S) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.	46
Figura 19. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de boro (B) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.	47
Figura 20. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de zinc (Zn) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.	48
Figura 21. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de materia organica (MO) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.....	49

RESUMEN

Ante la problemática ambiental que se tiene actualmente, existe un interés en la búsqueda de estrategias en todos los sectores productivos que sean más amigables con el ambiente. En las actividades pecuarias se estima una contribución del 16% de las emisiones globales de metano liberado a la atmósfera, lo cual, contribuye al cambio climático. Sumado a ello, las actividades agrícolas y su intensificación, ha llevado al uso indiscriminado de fertilizantes y demás agroquímicos que contribuyen a la degradación del suelo. Es por ello, que el objetivo de este trabajo fue analizar la calidad de los biofertilizantes obtenidos con digestores tipo Taiwán (tubulares de media bolsa) con 30 días de tiempo retención celular (TRC) a partir de distintos estiércoles (bovino y porcino), y su uso en el mejoramiento nutricional y microbiano del suelo para que pueda contribuir en los sistemas productivos agrícolas. Para ello, se caracterizaron los biofertilizantes considerando los parámetros fisicoquímicos: nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), magnesio (Mg), calcio (Ca), fosfatos (PO_4^{3-}), amonio (NH_4^+), hierro (Fe), pH, temperatura, sólidos totales (ST), sólidos fijos (SF), sólidos volátiles (SV), demanda química de oxígeno (DQO), y conductividad eléctrica (CE), así como la presencia de microorganismos aerófilos, *E. coli* y otros coliformes (O.C). También se realizó una identificación microbiana por secuenciación masiva de nueva generación del gen 16S ARNr del estiércol bovino y del biofertilizante a base del mismo. Se realizaron pruebas agronómicas del cultivo de frijol en macetas y se caracterizó el perfil de nutrientes y presencia de *E. coli* y OC en el suelo antes de siembra y después de cosecha. Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los resultados de entrada y salida de cada sustrato en la digestión anaerobia (DA). El sustrato bovino muestra una disminución en el contenido de NO_3^- (90 %), NO_2^- (92 %), Ca (31 %), Mg (11 %) y Fe (7 %), mientras que el contenido de PO_4^{3-} aumento (44 %) después del proceso de la DA. El biofertilizante porcino tuvo un aumento significativo en la concentración de NH_4^+ (68 %) y una disminución en los parámetros, NO_2^- (72 %), Ca (0.65 %), Mg (41 %) y Fe (61 %). Existe una disminución significativa de las unidades formadoras de colonias (UFC) de *E. coli* y de OC después del proceso de DA en ambos sustratos. Los resultados de la secuenciación de las muestras correspondientes al estiércol bovino arrojaron un total de lectura de 34 654 en la entrada y 26 772 en la salida. Se logró la identificación a nivel de género del 59.2 % del total de las lecturas en la entrada y un 66.3 % del total de las lecturas en la salida, de las cuales se identificó que el 36.4 % en la entrada y 4.3 % en la salida corresponden a géneros identificados como bacterias etiológicas, así como un 2.2 % en la entrada y un 1.5 % en la salida corresponden a géneros descritos con capacidades benéficas para uso agrícola. En la prueba agronómica y análisis del perfil del suelo, los resultados dejan en evidencia el potencial de estos biofertilizantes en el mejoramiento nutricional y microbiano del suelo, así como el efecto positivo en la planta.

Con estos resultados se concluye que el establecimiento de 30 días de TRC en los digestores tubulares, es adecuado para la eliminación eficiente de bacterias patógenas

presentes en los estiércoles (bovino y porcino), además el proceso de la DA aumenta la concentración de fosfatos que contribuye al mejoramiento nutricional del suelo. Los biofertilizantes analizados tienen un impacto positivo en las variables agronómicas como floración, altura, número de vainas y rendimiento de cultivo en la planta de frijol (cuarentano), lo que podría ser de apoyo para los productores locales de la región.

1. INTRODUCCIÓN

Entre las actividades ganaderas que resaltan en Chiapas encontramos la cría y engorda de ganado bovino y porcino. En el estado se produce cerca de 2 611 000 cabezas de ganado bovino y 306 000 cabezas de ganado porcino que representan un 10.9 % de la producción nacional entre ambos sistemas (SIAP¹, 2021).

Dentro del territorio estatal, se encuentra la Región Frailesca, zona predominantemente agropecuaria conformada por 7 municipios, de los cuáles Villaflores es el segundo mayor productor estatal de ganado bovino y Villacorzo el cuarto, entre la producción de ambos se estima que cubre el 23.7% de la producción de ganado bovino estatal y el 14.0 % de la producción porcina estatal (SIAP, 2021). Cabe destacar que la Región Frailesca es una de las zonas más perturbadas en gran medida por la ganadería y la agricultura de ladera, presentando gran alteración ambiental en sus bosques y por lo mismo sus suelos están erosionados con acentuada pérdida de fertilidad (Vázquez *et al.*, 2009).

Se considera que un bovino adulto defeca entre 20-30 kg día⁻¹, cabe mencionar que la generación del estiércol está relacionado con el peso del animal y este a su vez dependerá de la actividad zootécnica (ganado para engorda, ganado para leche, sementales, etc.) (Pérez *et al.*, 2017). En cuanto al ganado porcino, se considera que un animal defeca en promedio 2.3 kg día⁻¹ (SAGARPA², 2004).

En base a los datos anteriores se estima una generación de 12 376 t día⁻¹ de estiércol bovino y 259 t día⁻¹ de estiércol porcino entre los municipios de Villaflores y Villa Corzo. La acumulación permanente de los desechos de la actividad pecuaria sin un manejo adecuado, contribuye a una problemática ambiental; en el proceso de degradación, dichos desechos liberan en el ambiente metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O), gases de gran impacto ambiental dentro de los gases de efecto invernadero (Hernández y Corona, 2018), aunado a esto, la acumulación de nutrientes y microorganismos patógenos en el suelo debido al mal manejo, llegan tanto en aguas superficiales y subterráneas alterando el equilibrio ecológico de estos ecosistemas.

Conforme a la demanda de alimentos, este sector ganadero ha ido en aumento y junto con ello también ha aumentado la generación de gases efecto invernadero, la contaminación del agua y del suelo derivado de las excretas porcinas que se generan durante el proceso de producción.

Por consiguiente, se plantea la utilización del estiércol generado por la actividad ganadera, esto como una estrategia que contribuya a disminuir el daño ambiental al reducir las cantidades de CH₄ liberadas a la atmósfera, así como otros gases y producir beneficios adicionales en el sector productivo.

¹ Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

² Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

Una de las alternativas es la implementación de la DA que se lleva a cabo por medio de bioreactores en donde los residuos orgánicos (estiércol) son metabolizados por la acción de los microorganismos, dando como resultado la producción de biogás y biofertilizante (biol). En la región Frailesca, esta tecnología se ha empezado a implementar, pero su uso se centra principalmente en la generación de biogás, dejando el biofertilizante como un subproducto que es desechado debido a la falta de información del sector productivo agrícola sobre sus beneficios hacia los cultivos y al suelo, por lo que se siguen utilizando los fertilizantes químicos que contribuyen al deterioro de los suelos de cultivo.

El biofertilizante contiene nutrientes y microorganismos, que al ser suministrado en el suelo puede mejorar sus características tanto físicas como microbiológicas, además de su implementación en cultivos como fertilizante foliar (Cano *et al.*, 2016). La calidad del biofertilizante varía de acuerdo al tipo y característica del sustrato (tipo de animal), por otro lado, la eficiencia del proceso dependerá del tipo de digestor y de las condiciones ambientales de cada lugar donde realice el proceso.

Por consiguiente, es necesario evaluar el proceso de DA de acuerdo a su balance de masa y en la calidad microbiológica con el fin de asegurar un residuo inocuo con características tanto nutricionales como microbianas óptimas para su uso en suelos y cultivos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es evaluar la calidad del biofertilizante obtenido a partir de biodigestores anaerobios alimentados con estiércol bovino y porcino para su uso en el mejoramiento del suelo y en la producción agrícola.

Pregunta de investigación

¿Los biofertilizantes a partir de residuos pecuarios obtenidos de digestores tipo Taiwán con 30 días de retención celular son adecuados y seguros para su aplicación en la agricultura?

1.1 Objetivos

Objetivo general

Analizar la calidad del biofertilizante obtenido por sistemas rurales anaerobios a 30 días de retención celular, a partir de estiércol bovino y porcino para su uso en el mejoramiento del suelo para la producción agrícola.

Objetivos específicos

- a) Caracterizar el biofertilizante obtenido por cada tipo de sustrato para asegurar los parámetros nutricionales y microbiológicos adecuados para su uso en el mejoramiento del suelo.
- b) Evaluar agronómicamente los biofertilizantes en el cultivo de frijol.

1.2 Planteamiento del problema y justificación

En la región Frailesca se tiene una gran generación de estiércol derivado de las actividades ganaderas, ante el aumento en los precios de los fertilizantes químicos el uso del estiércol como abono empieza a ser atractivo para los productores agrícolas, sin embargo, la mayor parte aún está sin utilizar causando daños en el ambiente, sumado a ello, el uso directo del estiércol como abono no considera los riesgos fitosanitarios derivados a ello debido a que el estiércol sin tratar puede contener microorganismos patógenos así como trazas de medicamentos de uso veterinario que se pueden encontrar en el estiércol cuando no se le da un manejo adecuado.

Por tal motivo, se propone trabajar con los sistemas de digestión anaerobia para el tratamiento del estiércol, este proceso como tal es aún incipiente en la región, aunque ya existen algunos sistemas en funcionamiento (estiércol bovino e inicia el porcino), estos se han limitado en la obtención de gas metano, sin utilizar el biofertilizante generado de manera segura y eficiente en los sistemas de cultivo locales. El uso del biofertilizante contribuye a la nutrición de las plantas y a la regeneración de los suelos, por tanto, es importante conocer el balance de masas del sistema y su eficiencia en la eliminación de patógenos, así como de la materia orgánica.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Estiércol bovino

En Chiapas existen cerca de 2 611 000 cabezas de ganado bovino, de los cuales el municipio de Villaflores y Villa Corzo contribuyen con el 23.7 % de la producción estatal (SIAP, 2021). Es así, que la ganadería bovina se convierte en la base del sector primario en el Región Frailesca. El estiércol producido en el mismo sector es un subproducto que produce CH₄ al degradarse y su impacto ambiental es 25 veces mayor que el del dióxido de carbono (CO₂) (Hernández y Corona, 2018), al degradarse aeróbicamente el estiércol libera los gases generados a la atmósfera, contribuyendo a la liberación de gases de efecto invernadero.

Además, el estiércol también tiene una cantidad considerable de sustancias orgánicas disueltas y particuladas entre las que se encuentran polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos grasos volátiles (AGV) (Eastman y Ferguson, 1981). Este sustrato se considera una base excelente para el desarrollo del proceso de digestión anaeróbica, debido a que tiene una alta capacidad amortiguadora y un alto contenido de nutrientes necesarios para el desarrollo de las poblaciones microbianas (Cendales, 2011), también contiene entre su microbiota, poblaciones de organismos metanogénicos que están por naturaleza presentes en los sistemas digestivos del ganado, estos son de los principales grupos encargados de llevar a cabo la digestión anaerobia.

La composición química del estiércol está estrechamente relacionada principalmente por factores como el tipo de ración alimenticia y su digestibilidad, así como también la edad del ganado y el estado general del animal (Pérez y Viniegra, 2007). Cabe señalar que, el estiércol está compuesto principalmente por agua y por elementos no digeridos, ya sea por fibra lignificada indigerible o por granos con cubierta muy firme, también por otras fracciones alimenticias que podrían ser digeridas, pero por causa de un pasaje muy rápido por el tracto intestinal no llegan a ser digeridas, entre los que se encuentran alimentos en partículas muy finas, algunos restos de fibra del forraje, alimentos muy digeribles, granos enteros, entre otros (Bavera y Peñafort, 2006). En este sentido, cuanto más refinadas sea la parte alimenticia en determinados elementos, mayor es la cantidad que se va a hallar en los excrementos (López y Antonio, 2003).

2.2 Estiércol porcino

El estado de Chiapas contribuye con cerca del 3.5 % a la producción nacional porcina, a pesar de que como estado su aportación es pequeña, a nivel regional Villaflores ocupa el primer lugar y Villa Corzo el quinto lugar en producción (8.1 % y 5.9 % respectivamente, contribución estatal) (SIAP, 2021), lo que resulta interesante para su aprovechamiento en la DA en la región. El estiércol porcino contiene nutrientes que pueden ser utilizados

para la agricultura, pero también tienen elevadas concentraciones de coliformes fecales que representan un peligro para la salud humana (Soria *et al.*, 2001).

A diferencia del ganado bovino, la explotación porcina es completamente confinada, lo que facilita la recolección de las excretas y su aprovechamiento. Las excretas porcinas contienen un alto porcentaje de agua y una alta capacidad amortiguadora (Campos, 2001), también contienen nutrientes como hierro (Fe), zinc (Zn), cobre (Cu) y manganeso (Mn), así como nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y sodio (Na) (FAO, 2007), que son utilizados por los microorganismos anaerobios para su reproducción.

2.3 Problemas ambientales generados por la acumulación de estiércol

Si no existe control en el almacenamiento, transporte o aplicación, el estiércol producido en los sistemas ganaderos puede emitir gases contaminantes a la atmósfera, así como una acumulación de nutrientes en el suelo, lo que puede provocar efectos adversos en el ambiente, así como en el suelo y aguas superficiales (Pinos *et al.*, 2012).

Además del CH₄, el estiércol bovino es fuente de emisión de CO₂, N₂O y amoníaco (NH₃), porque contiene nitrógeno, carbono y agua, que es utilizado por los distintos grupos microbianos como fuente de carbono y energía (Ospina *et al.*, 2014).

La fermentación entérica y las excretas representan el 80 % de las emisiones de CH₄ y su importancia en el impacto ambiental ha sido reconocida durante mucho tiempo. Sin embargo, aunque el valor absoluto de las emisiones de CH₄ en los desechos bovinos es mucho menor, sigue siendo considerable y está creciendo rápidamente. En cuanto a las emisiones de N₂O, uno de los gases más potentes, es producido durante el manejo aeróbico del estiércol. Así mismo, la ganadería aporta el 68 % de las emisiones por NH₃ derivado del mal almacenaje del estiércol y su aplicación en cultivos (Pérez, 2008).

De igual forma, la ganadería porcina también es considerada una actividad con efectos negativos significativos hacia el ambiente debido a las concentraciones de excretas, orina y patógenos. Dichos residuos además de tener altas cantidades de nutrientes y organismos patógenos, también contienen restos de medicamentos como antibióticos, hormonas y desparasitantes (Fernández, 2010). Alvarado *et al.* (2017), mencionan que la producción porcina contribuye a la contaminación del suelo, agua y aire, debido a las emisiones de gases en la degradación aerobia y a la alta carga de agentes patógenos que contiene. Además, se calcula que aporta 668 millones de toneladas de CO₂ anualmente (McAuliffe *et al.*, 2017).

2.4 Microorganismos presentes en el estiércol

La microbiota que habita en el rumen, se encuentra constituida por bacterias, protozoarios y hongos que se encargan de transformar el material vegetal (Montalbetti, 2009; Jami y Mizrahi, 2012), dentro de esta cavidad se puede encontrar la presencia de diferentes comunidades microbianas, bacterias, protozoarios y hongos pertenecientes a los anaerobio facultativo y anaerobios estrictos (Ruiz, 2013), algunas especies de *espiroquetas*, *flavobacterias*, *esfingobacterias*, *actinobacterias*, *cloroflexi*, *firmicutes* y *proteobacterias* (Pandey *et al.*, 2018) parte de esta microbiota es liberada junto con las heces.

En este sentido, el estiércol bovino constituye un reservorio de poblaciones microbianas, dentro de esta se encuentran microorganismos etiológicos, estos son organismos patógenos o potencialmente patógenos que pueden causar contaminación sanitaria y afectar la salud pública y animal (Pandey *et al.*, 2018). Algunos de estos organismos que nos podemos encontrar en el estiércol son: *Salmonella spp.*, *Escherichia coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium subsp.*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Cryptosporidium parvum* y *Giardia spp.* (Ozbek, 2003).

Por otro lado, en estiércol porcino también se pueden encontrar una gran cantidad de microorganismos; a los desechos porcinos se les considera como una fuente importante en la transmisión de organismos patógenos como virus, bacterias, levaduras, mohos y parásitos (Betancur *et al.*, 2016).

Cuando el estiércol generado en los sistemas pecuarios es suministrado en los campos de cultivo como fertilizante sin un manejo previo, aumenta su potencial para aumentar la carga de patógenos en el suelo, y posteriormente, estas poblaciones bacterianas pueden llegar a las aguas superficiales y subterráneas por el efecto de la lluvia o escorrentía (Mateu *et al.*, 1992; McLaughlin *et al.*, 2009), además facilita la transferencia de patógenos en los cultivos que son de consumo directo (Erickson *et al.*, 2014; Klerks *et al.*, 2007)

Por el contrario, cuando el estiércol es tratado mediante procesos como la digestión anaerobia, las bacterias patógenas como *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria* se reducen (Arikan *et al.*, 2015). Lo que evidencia que las comunidades bacterianas dominantes cambian con la aplicación de los procesos de manejo del estiércol.

2.5 El suelo

El suelo es uno de los ecosistemas más complejos y diversos que existe en la naturaleza; es uno de los recursos naturales más importante que proporciona el sustento para la población humana al permitirnos la generación de alimentos.

Actualmente, el uso indiscriminado de fertilizantes sintéticos, así como el mal manejo de los residuos derivados de la actividad agropecuaria han venido amenazando la calidad del suelo. Según datos estimados por la SEMARNAT³ en el 2016, menciona que a nivel nacional los suelos agrícolas presentaban erosión, pérdida de nutrientes, salinidad y compactación, derivado de las prácticas de cultivo.

La región Frailesca ubicada en el estado de Chiapas, es una zona eminentemente agropecuaria y una de las más perturbadas en gran medida por la ganadería y la agricultura de ladera, presenta gran alteración ambiental en sus bosques y por lo mismo sus suelos están erosionados con acentuada pérdida de fertilidad (Vázquez *et al.*, 2009). En ese sentido, Chiapas presenta un 79 % y la región Frailesca 89 % de suelos degradados por acciones naturales y antrópicas (Ortiz, 2019). Esto ha ocasionado la disminución de los rendimientos de los cultivos de la región, lo que exige cada vez más una mayor demanda de insumos externos para incrementar la producción (Martínez-Aguilar *et al.*, 2020).

Estudios realizados en diferentes municipios de la región Frailesca, demuestran que existe una degradación generalizada del suelo por las diferentes prácticas antropogénicas poco sostenibles relacionadas principalmente por el cultivo de maíz (Martínez-Aguilar *et al.*, 2020), ya que los suelos cultivados con esta gramínea evidencian una baja fertilidad derivado de la acidez y el bajo contenido de materia orgánica (López, 2018), con alto contenido de plomo (por arriba de 100 mg kg⁻¹) y aluminio (superior al 20 %). Además, existe un problema de compactación superficial y de subsuelo, derivado del laboreo intensivo y el bajo contenido de materia orgánica (Tasistro, 2012; López *et al.*, 2018; Martínez-Aguilar *et al.*, 2020).

En zonas de ladera, la erosión de suelo es un factor para la pérdida de minerales como el fósforo, por lo que la implementación de prácticas de conservación de suelos (Camas *et al.*, 2012) y la adopción de alternativas que brinden soluciones a esta problemática, representan una necesidad en la actualidad.

2.6 Digestión anaerobia

La DA es un proceso biológico en ausencia de oxígeno que consiste en tres etapas principalmente, hidrólisis, fermentación y metanogénesis, en las cuales intervienen diferentes poblaciones microbianas que digieren la materia orgánica para alimentarse y reproducirse (Ferrer y Seco, 2007).

Como resultado del proceso, se tiene una mezcla de gases (CH₄ y CO₂ principalmente) llamado “biogás”, y un biofertilizante rico en minerales conocido como “biol” que puede ser utilizado en las plantas (Alburquerque *et al.*, 2012).

³ Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

El proceso de DA se lleva a cabo dentro de biorreactores, en el cual se introduce materia orgánica (sustrato) como estiércol animal, residuos industriales, restos vegetales, etc. que son diluidos en agua, para que se lleve a cabo su fermentación. Como sustrato para la DA, el estiércol bovino tiene un efecto positivo en la estabilidad del proceso debido a su capacidad amortiguadora y alto contenido de oligoelementos (Weiland, 2006).

Para que la implementación de la DA tenga éxito, se debe seguir una serie de pasos, principalmente en la elección del biorreactor donde se llevara a cabo el proceso prestando atención en sus diferentes aspectos (Jarauta, 2005). Cuando los reactores no cumplen con el volumen adecuado y los tiempos de retención hidráulico (TRH) adecuados a las características del residuo, los productos generados no pueden ser aprovechados en la agricultura (Jiménez-Peña *et al.*, 2014). Por otro lado, se debe considerar el tiempo de retención celular (THC), este es un parámetro fundamental en el diseño y operación de los biodigestores (Ferrer y Seco, 2007), se recomienda tiempo entre 25-35 días para procesos mesófilos (25-45° C).

2.7 Tipos de digestores

La implementación de la DA ha permitido la existencia de diferentes tipos de reactores para que se lleve a cabo este proceso, estos reactores conocidos como biodigestores se clasifican según su modo de operación y la forma de alimentación o carga, la FAO⁴ (2011) clasifica a los biodigestores de la siguiente forma:

Continuos: estos son alimentados sin interrupción, se caracterizan porque el efluente (descarga) es igual al afluente (alimentación del digestor). Se utilizan principalmente para el tratamiento de aguas negras. Su uso es industrial y se requiere de equipos eléctricos, y/o electromecánicos para alimentarlos e incluso para mantener temperatura y agitación.

Semicontinuos: la primera carga que se introduce en el reactor es una gran cantidad de materias primas. Después, se agregan volúmenes de nuevas cargas de afluente que se calculan en función del tiempo de retención hidráulico (TRH) y del volumen total del digestor. El efluente se descarga en la misma cantidad del afluente que se incorpora. Este proceso es usado en el medio rural, cuando se trata de sistemas pequeños para uso doméstico. Los diseños más populares son el indiano y el chino, pero también los hay verticales.

Discontinuos o estacionario: Los digestores se cargan con las materias primas en una sola carga. Después de un cierto período de fermentación, cuando el contenido de materias primas disminuye y el rendimiento de biogás decae a un bajo nivel, se vacían,

⁴ Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

los digestores por completo y se alimentan de nuevo dando inicio a un nuevo proceso de fermentación. Esto se conoce también como digestores *batch* o en lote.

2.7.1 Diseños de biodigestores

Biodigestor chino

Su diseño es de forma cilíndrica con el techo en forma de domo y se construyen totalmente enterrados. Al no contar con un gasómetro, el biogás que se genera es almacenado dentro del reactor a medida que el volumen de biogás aumenta se incrementa la presión dentro del reactor, forzando a los líquidos a salir. Una a dos veces al año el reactor debe de ser vaciado y limpiado. Los tiempos de retención de operación de este modelo son de 30 a 60 días.

Biodigestor indiano

Este modelo de biodigestor suele ser enterrado de forma vertical. Se carga una vez al día por gravedad y su volumen de muestra depende del tiempo de retención. Este sistema integra un gasómetro, en la parte superior del pozo se encuentra una campana donde se almacena el gas. Por lo que la presión del gas sobre la superficie de la mezcla es baja. La campana logra, además, una presión constante, que permite una operación eficiente de los equipos a los que alimenta.

Biodigestor horizontal

El biodigestor por lo general se construye enterrado, son poco profundos y alargados. Se operan a régimen semicontinuo, entrando la carga por un extremo y saliendo los efluentes por el extremo opuesto del biodigestor. La cúpula puede ser rígida o de algún material flexible que no presente fugas y que sea resistente a las condiciones del ambiente.

Biodigestores familiares de bajo costo

En los sistemas de producción rural en México, se usa un tipo de biodigestor conocido como biodigestor tubular de tipo Taiwán o biodigestores tubulares de polietileno. Estos han sido eficientes en la generación de biogás en sistemas de traspatio (Galindo-Barboza *et al.*, 2020). Este diseño de biodigestores familiares es construido con mangas de

polietileno tubular, se caracteriza porque su costo es bajo ya que para su construcción se utilizan materiales locales. Además, son de fácil instalación y mantenimiento (Martí, 2007).

El film de polietileno tubular se amarra por los extremos a tuberías de conducción de aproximadamente seis pulgadas de diámetro, para el amarre, se utilizan ligas recicladas de las ruedas de los carros. Como el polietileno tubular es flexible, se requiere de una cuna o tanque que lo albergue. De esta forma y con la inclinación adecuada de las tuberías, se tendrá un sistema hermético (Martí, 2007).

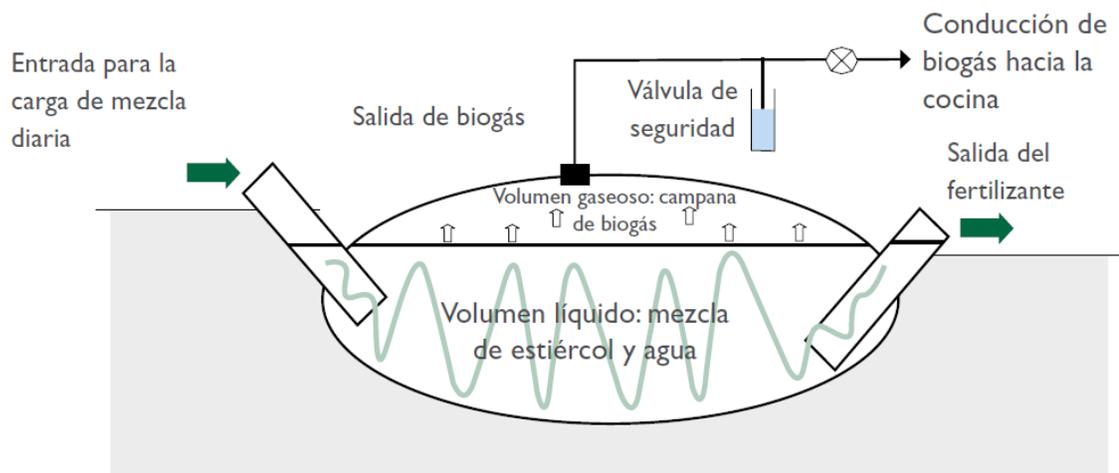


Figura 1. Esquema básico de un biodigestor tubular (Martí, 2007).

2.8 Biofertilizante

Los productos generados por el proceso de la DA son aprovechables, pues generan energía (calórica o eléctrica) a través del biogás y también producen fertilizantes orgánicos que se pueden utilizar en los cultivos. Dicho biofertilizante, inicialmente se ha considerado un producto secundario, pero actualmente se le trata con la misma importancia o mayor que el biogás, esto es resultado de las mejoras en el rendimiento de las cosechas (Martí, 2008).

El biofertilizante es una fuente de fitorreguladores que se obtiene como producto del proceso de DA de los desechos orgánicos (Medina, 1990); contiene una gran cantidad de microorganismos, por lo que se le considera un tipo de vida altamente fértil, sus pueden ser en el ambiente, tanto ecológicos como económicos (SisteBio, 2009). Este producto es utilizado como estimulante biológico, puede promover el crecimiento, desarrollo y enraizamiento de las plantas, actúa sobre las hojas, mejora la floración, activa el vigor y la germinación de las semillas, lo que se traduce en un aumento significativo de las cosechas (Gomero, 2005; Suquilanda, 2006). Otra característica de los biofertilizantes

es que tienen el potencial de mejorar el intercambio de cationes en el suelo, aumenta así la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Cano *et al.*, 2016) y por ende contribuye al crecimiento de la flora microbiana del suelo.

2.9 Características fisicoquímicas del biofertilizante

Para evaluar la calidad del biofertilizante se deben realizar análisis del pH, sólidos totales y volátiles, nitrógeno orgánico y amoniacal, potasio, calcio, magnesio, manganeso, hierro, entre otros componentes (Palacios, 2005); así como la presencia y abundancia de los coliformes fecales como mínimo.

La literatura reporta diferentes estudios realizados utilizando estiércol bovino o porcino como sustrato en procesos de DA en los cuales se evidencia la variación de las características nutricionales de los biofertilizantes de acuerdo al tipo de sustrato y el contenido de las excretas. En la tabla 1, se presentan los resultados de los principales elementos contenidos en los biofertilizantes obtenidos por los distintos autores consultados.

Tabla 1. Características de biofertilizantes a partir de estiércol bovino y porcino.

Referencia	Tipo de estiércol	Tipo de reactor	TRH (días)	T °C	pH	MO Mg L ¹	N Mg L ¹	P Mg L ¹	K Mg L ¹	Mg Mg L ¹	Na Mg L ¹
Durazno, (2018)	Bovino	Biodigestor cilíndrico de producción por etapas	50	14.27	7	-	598	310	1023	-	-
Cabos <i>et al.</i> , (2019)	Bovino	Biodigestor de Geomembrana de policloruro de vinilo	30	-	-	-	2100	202.8	741	-	-
Torres (2016)	Bovino	Biodigestor tipo Chino	30	23	7.96	4180	520	430	1050	190	400
Soria <i>et al.</i> , (2001)	porcino	Biodigestor tipo FAO	50	-	7.05	-	0.058	17.2	363.8	59.3	Fe 1.159
López-Dávila <i>et al.</i> , 2017	Porcino + microorganismos eficientes (5%)	-	-	-	7.1	0.11%	0.03 N-NH ₄	0.83 PO ₄	0.80	4.86	4.40

TRH= tiempo de retención hidráulica, pH= potencial de hidrogeno, N= nitrógeno, P= fósforo, K= potasio, Mg= magnesio, Na= sodio.

De acuerdo con Ferrer y Seco (2007), las características y la calidad de los biofertilizantes dependen de diferentes factores como los ambientales, de diseño del reactor, TRH, así como el tiempo de retención celular (TRC), este último parámetro se considera uno de los más importantes en los procesos biológicos, pues representa el tiempo que los microorganismos permanecen dentro del proceso. Cabe señalar que el TRC coincide con el TRH para los biodigestores diseñados sin recirculación y de tipo *batch*.

2.10 Implementación de los biofertilizantes productos de la digestión anaerobia

Las investigaciones sobre la aplicación de los biofertilizantes en los suelos y cultivos agrícolas son muy amplias y sus resultados dependen de la forma de su aplicación, del tipo de suelo donde se aplica y del cultivo establecido.

En una investigación realizada por Chauca (2010), se destaca que la aplicación de los biofertilizantes a base de estiércol bovino en el cultivo de alfalfa, aumentó la producción en base a materia seca. En el cultivo de tomate *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, la aplicación del biofertilizante favoreció el desarrollo foliar de las plantas (Martínez, 2016). Santin (2017) aplicó el biofertilizante a base de estiércol bovino en cultivos de frijol, demostró que una dosis de 250 mL/planta se logra un efecto positivo en el rendimiento del cultivo. Cuando el biofertilizante es aplicado a los pastos (*Setaria sphacelata*), favorece el crecimiento de los tallos y la producción en peso fresco y seco de los mismos (Barrena *et al.*, 2019).

Los biofertilizantes suelen contener microorganismos como *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Samonella*, *Penicillium*, *Shigella*, *Bacteriodes*, *Aspergillus* y *Bacillus* que potencian sus propiedades agronómicas. *Klebsiella* y *Clostridium* spp., son liberadores y fijadores de nitrógeno, mientras *Bacillus* y *Pseudomonas* spp., son solubilizadores de fosfato (Alfa *et al.*, 2014). Estos microorganismos aceleran los procesos microbianos en el suelo y aumentan la disponibilidad de nutrientes asimilables por las plantas (Johansen *et al.*, 2013) En cuanto a su composición nutricional, los biofertilizantes contienen cantidades sustanciales de nitrógeno (N), fosforo (P), potasio (K) que son esenciales para el crecimiento de las plantas (Seleiman *et al.*, 2017).

2.11 El cultivo de frijol

El frijol es uno de los cultivos más importantes en México, sus funciones alimenticias y socioeconómicas han permitido su permanencia en la actualidad. Esta planta crece casi en todos los estados de la república, debido a su alta capacidad de adaptación a los diferentes climas (Ayala, 2016). El frijol es una fuente de proteínas y de hidratos de carbono natural, contiene vitaminas y proporciona algunos nutrientes como el hierro,

cobre, zinc, fosforo, entre otros. De las 70 especies que se considera existen, México cuenta con 50 de estas, de las cuales destacan cinco especies que se han domesticado *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus coccineus* L. (frijol ayocote), *Phaseolus lunatus* L. (frijol comba), *Phaseolus dumosus* (frijol gordo) y *Phaseolus acutifolius* A. Gray (frijol tepari) (Sangerman *et al.*, 2010).

El frijol es el segundo grano de importancia agrícola después del maíz en México (Prieto-Cornejo *et al.*, 2019), el consumo per cápita a nivel nacional es de 9 Kg (SIAP, 2021). De los estados productores de frijol, Chiapas ocupa el cuarto lugar en volumen de producción, con una aportación nacional de 67 600 t (SIAP, 2020) y representa un cultivo básico para la alimentación en el estado.

Actualmente en la región Frailesca del estado de Chiapas, el cultivo de frijol es de baja rentabilidad debido a que los suelos en esta región tienen baja fertilidad, sumado a que sus suelos son ácidos (pH 5.6-6.3) y de textura areno arcillosa. Aunado a esto, en la producción de este grano básico, se utilizan herbicidas, plaguicidas y fertilizantes sintéticos que incrementan los costos de producción (Arias *et al.*, 2007) y acrecientan la pérdida de la fertilidad. Por lo que se deben buscar estrategias que aumenten el rendimiento del cultivo de frijol de una manera sustentable, que cubran las necesidades de los productores al cultivar este grano.

Hipótesis

1. Los biofertilizantes obtenidos a 30 días de retención celular en los digestores tipo Taiwán obtenidos de excretas pecuarias contribuyen a mejorar las características nutricionales e incrementan las abundancias microbianas del suelo.
2. El uso de los biofertilizantes a partir de excretas pecuarias y obtenidos bajo digestión anaerobia mejoran las características agronómicas del cultivo de frijol.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en dos sistemas productivos localizados en el municipio de Villaflores Chiapas, entre los paralelos 16° 14' 07" N y 93° 16' 03" W, con una altitud de 561 msnm. El lugar presenta una precipitación promedio anual de 1 200 mm y una temperatura promedio anual de 23.8 °C, la cual oscila entre 21 y 25° C. Predomina el clima cálido sub-húmedo con lluvias en verano, correspondiendo al clima tipo (AW1) (W) (i) g, según datos del INEGI (2017).

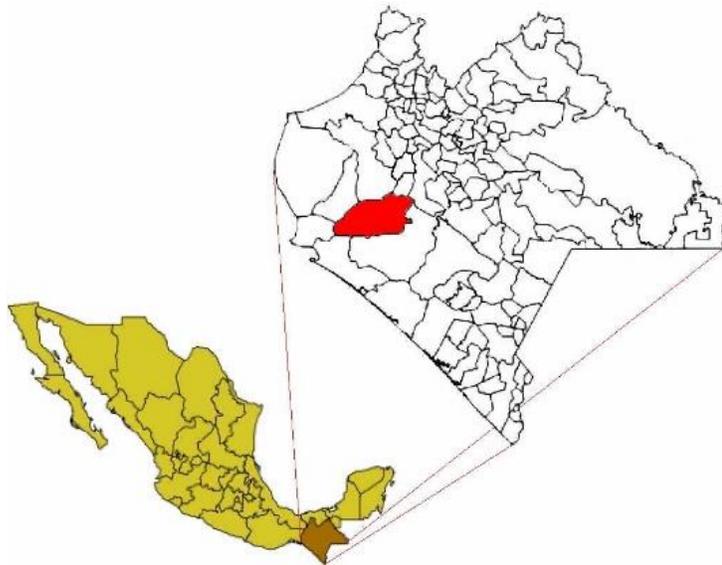


Figura 2. Ubicación del área de estudio

3.2 Obtención de biofertilizante (biol)

Se utilizaron dos biodigestores adaptados tipo Taiwán de reciente instalación en la zona de estudio, con capacidad de 10 m³ (sustrato bovino) que se encuentra instalado en el rancho el “Saucedal” en el centro de la ciudad de Villaflores y un biodigestor de 6 m³ que corresponde al sistema de producción porcino que se encuentra instalado en el rancho “El Recreo II” ubicado a las afueras de la ciudad de Villaflores, los cuáles fueron alimentados diariamente con una mezcla de agua y estiércol en una proporción 1:3 para ambos sustratos, es de recalcar que el sustrato porcino pasa por un filtro antes de

introducirse al biodigestor esto con la finalidad de retener las partículas de mayor tamaño que no fueron digeridas durante el proceso de digestión del animal.

Las razas de ganado presentes en el sistema de producción bovina pertenecen al ganado Cebú (Brahman con Nelore), la alimentación que reciben los animales es una dieta a base de pollinaza, maíz, harina de palmaste, gabazo de caña y sal mineral. En el sistema de producción porcino los animales son alimentados con una dieta a base de maíz, soya y mezcla mineral. Se estableció un tiempo de retención celular de 30 días para ambos sustratos, a partir de este dato y el volumen total, se estimó la alimentación del proceso, quedando un TRH de 24h (salida fase líquida). Se realizaron muestreos al interior del digestor cada 30 días (3 muestreos) para la realización de los análisis correspondientes para su evaluación.

3.3 Etapas del proyecto

El estudio se realizó en dos etapas, de acuerdo a los objetivos establecidos anteriormente.

3.3.1 Caracterización Físicoquímica y microbiológica del sustrato y biofertilizante

Etapa 1. Caracterización de los parámetros físicoquímicos y microbiológicos del estiércol bovino y porcino (sustrato) del proceso de DA.

Se realizaron todos los análisis de la mezcla de agua y estiércol (porcino y bovino) (relación 3:1) antes de la entrada al proceso de la DA. Este paso es importante para conocer la carga tanto microbiana como su composición química, así como conocer el rendimiento del proceso.

De igual forma, con la finalidad de obtener los rendimientos del proceso, así como la composición química y carga microbiana que permitan evaluar la calidad de los biofertilizantes, se analizaron los parámetros físicoquímicos y microbiológicos de los biofertilizantes obtenidos al final del proceso de DA.

La realización de los análisis correspondientes de la etapa 1, se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal y Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Autónoma de Chiapas.

Variables evaluadas

Temperatura (T°), potencial de hidrogeno (pH), conductividad eléctrica (CE), sólidos disueltos totales (TDS)

Se midió con un potenciómetro combinado de (T°, CE, TDS) de la marca HANNA modelo (HI9914059) calibrado con sustancias tampón para pH y solución de calibración apropiado para CE. Las lecturas fueron registradas en una tabla.

Demanda química de oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno se realizó por duplicado y mediante *kits* de espectrofotometría y el equipo *Spectroquant move* 100 de la marca Merck.

Nitratos, nitritos, amonio, fosfatos, magnesio, calcio y hierro

Se determinaron mediante *kits* de Reflectometría y el equipo RQflex20 de la marca Merck, siguiendo las especificaciones del fabricante. Se realizaron dos repeticiones para cada parámetro y para cada muestra.

Población microbiana total de aerófilos, *E. coli* y otros coliformes

Se determinarán mediante el método almohadilla nutriente (MC-Pad Merck Millipore) por triplicado. Para ello las muestras fueron inoculadas en la almohadilla de prueba recubierta con un medio selectivo y sustrato cromogénico para su detección específica. Posteriormente las almohadillas se incubaron a 35° C durante 24-48 horas.

Sólidos totales, volátiles y fijos

Sólidos totales, volátiles y fijos se determinó siguiendo la metodología de la NMX-AA-034-SCFI-2015 por triplicado.

Secuenciación masiva de nueva generación del gen 16S ARNr

El método utilizado para la extracción del ADN fue el descrito en Rojas *et al.*, (2008). La extracción del ADN fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % y determinada su calidad y cantidad con un fluorómetro (QuantusTM Promega) y NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). La amplificación por PCR del gen 16S ARNr se realizó utilizando los cebadores y las condiciones sugeridas por Klindworth *et al.*, (2013) siguiendo el protocolo de preparación de la biblioteca de secuenciación metagenómica

16S de Illumina. La secuenciación fue realizada en el CINVESTAV⁵-Mérida con la plataforma Illumina-MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.), y el *kit* de reactivos MiSeq V2 nano (2 x 250) según las recomendaciones del fabricante. El análisis bioinformático se realizó en la plataforma ONE CODEX y el MG-RAST, se removieron las secuencias de baja calidad para obtener un 99 % de precisión en la identificación.

3.3.2 Evaluación agronómica del biofertilizante

Etapa 2. Se realizó la evaluación agronómica de los biofertilizantes seleccionados en el cultivo de frijol, cultivo de importancia económica y gastronómica para la región de estudio, además que su ciclo de cultivo (40 días) se acopla a los tiempos establecidos para esta investigación.

La semilla de frijol utilizada fue adquirida de un agricultor del municipio de Villa Corzo, Chiapas, siendo una semilla de variedad criolla.

Tratamientos

Los tratamientos fueron: **T1:** biofertilizante bovino, **T2:** biofertilizante porcino, **T3:** fertilización convencional (urea) y **T4:** testigo, todos los tratamientos tuvieron cinco repeticiones (macetas).

Unidad experimental

El experimento se realizó mediante pruebas en macetas y el diseño experimental fue completamente al azar. Cada unidad experimental consistió en una maceta con cuatro kg de suelo. En cada maceta se colocaron tres semillas de frijol y se cubrió con suelo. Una vez emergidas se seleccionaron las más vigorosas y las restantes fueron retiradas, quedando dos plantas por maceta.

El suelo utilizado para este experimento se recolectó de una parcela ubicada en el municipio de Villaflores, el cual recibe un manejo agroecológico.

Aplicación de los tratamientos

La aplicación de los tratamientos se realizó al momento de la siembra. T1: se aplicó 250 mL de biofertilizante bovino por maceta que corresponde a una unidad experimental, por aplicación (Santin, 2017). T2: se aplicó 250 mL de biofertilizante porcino por maceta que corresponde a una unidad experimental, por aplicación (Santin, 2017). T3: se empleó un fertilizante químico comercial (urea), se aplicó al suelo 10 g de urea por punto de siembra (UE), esto de acuerdo con la dosis que los productores usan en el cultivo de frijol. T4:

⁵ Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

para el tratamiento cuatro que corresponde al testigo no se realizaron ningún tipo de fertilización, solo se le dio los mismos manejos al igual que los otros tratamientos.

Variables evaluadas

Se realizó seguimiento semanalmente después de la siembra a variables de la planta para observar el comportamiento de los tratamientos aplicados.

Días a emergencia: Esta variable se consideró a partir del número de días transcurridos desde la siembra hasta que se observó el 50 % de las plantas emergidas sobre la superficie del suelo.

Altura promedio de plantas: Para evaluar la variable altura de planta, se tomaron datos de altura de planta durante el desarrollo del cultivo para evaluar el desarrollo del cultivo con los diferentes tratamientos. Se utilizó una cinta métrica, el promedio se consideró como altura promedio de planta.

Diámetro promedio del tallo: Se tomaron datos del diámetro del tallo de las plantas durante el desarrollo del cultivo para evaluar el desarrollo del cultivo con los diferentes tratamientos. Se utilizó un vernier y el promedio se consideró como diámetro promedio del tallo de planta.

Vainas por planta: se contaron las vainas presentes en cada planta, el promedio se consideró como vainas por planta.

Clorofila total: se midió con el equipo MC-100 de la marca Apogee Instruments.

Fotosíntesis: se midió con un Fluorímetro OS30p+.

Análisis fisicoquímico del suelo

Adicionalmente de las variables agronómicas, se realizó el análisis fisicoquímico del suelo utilizado en el experimento con macetas. El análisis se llevó a cabo antes y después de la aplicación de los tratamientos para conocer el impacto de su aplicación en el suelo. Las muestras fueron enviadas al laboratorio de Fertilab®, para su determinación.

Análisis del potencial regenerativo del suelo

La evaluación del uso potencial de los biofertilizantes para regeneración de los suelos de la región se realizó recolectando muestras de dos suelos con diferente manejo (agricultura agroecológica y agricultura convencional). La toma de las muestras de suelo

se realizó en una parcela ubicada en el municipio de Villaflores con manejo agroecológico que consiste en movimiento mínimo de suelo, retención de residuos de cultivos previos, rotación y diversificación de cultivos, curvas a nivel y barreras vivas, una segunda parcela en el municipio de Villa Corzo con manejo convencional que consiste en la aplicación de fertilizantes químicos en cada ciclo de cultivo. La toma del suelo consistió en una muestra compuesta de 20 puntos aleatorios (0-30 cm de profundidad) en cada parcela, colectando 100 kg de tierra fresca por parcela.

Posteriormente de las muestras de los suelos colectadas, se sacaron cuatro submuestras de 25 kg, esto fue para ambos tipos de suelo. Cada submuestra consistió en un tratamiento de la siguiente manera: T1 tierra más biofertilizante bovino (1250 mL); T2 tierra más biofertilizante porcino (1250 mL); T3 tierra más 10 g de urea; T4 testigo. La cantidad de biofertilizante utilizado fue en base a lo sugerido en bibliografía (Santin, 2017), la cantidad de urea utilizada fue en base a la cantidad comúnmente utilizada por los agricultores de la región para cultivo de frijol.

Cada submuestra se homogenizó para distribuir correctamente los biofertilizantes y la urea, seguido de un proceso de secado al sol por 48 horas. Posteriormente se tomó dos muestras por cada tratamiento y por cada tipo de suelo, una muestra fue enviada a un laboratorio certificado (Fertilab ®) para su análisis químico que consistió en materia orgánica (MO), fósforo (P-Bray), potasio (K), calcio, (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), hierro (Fe), zinc (Zn), manganeso (Mn), Cobre (Cu), boro (B), aluminio (Al), azufre (S) y nitrito (N-NO₃); una muestra se llevó al Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Autónoma de Chiapas para su análisis microbiológico por triplicado con la misma metodología utilizada con los biofertilizantes.

Los suelos utilizados presentan características franco-arcillo-arenoso, en el caso del suelo agroecológico presentó un pH de 6.85 y salinidad (CE) de 0.35 mS/cm⁻¹, el suelo con manejo convencional presenta un pH de 6.42 y salinidad (CE) de 0.73 mS/cm⁻¹. De acuerdo a sus características los suelos utilizados se clasifican como suelos ácidos según los resultados del análisis químico realizado Fertilab ®).

3.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en todas las etapas de la investigación fueron almacenados en una base de datos de excel para ordenarlos y evaluarlos mediante estadística descriptiva como media, desviación estándar, frecuencia, así como intervalos de confianza. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) (SAS, 2008). Las medias se compararon a través de la prueba de Tukey ($p < 0.05$). La realización de los análisis multivariantes se realizó con el paquete ecológico estadístico PRIMER-e v7 (Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research versión 7). Los datos fueron transformados con raíz cuadrada para los análisis de los parámetros fisicoquímicos y (\log_{x+1}) para los microbiológicos y secuencias de

ADN. Los análisis realizados son análisis de coordenadas principales (PCO por sus siglas en inglés), análisis jerárquico Clúster, SIMPROF-test (perfil de similaridad) y el análisis no métrico de escalamiento multidimensional (nMDS) (Anderson et al 2008; Clarke, *et al.*, 2014).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización fisicoquímica del estiércol y biofertilizante bovino y porcino.

Los resultados obtenidos de las características fisicoquímicas del estiércol y biofertilizante bovino obtenidos a 30 días de TRC, se presentan en la tabla 1 y 2. Se puede observar que existe diferencia significativa entre los valores de algunos parámetros.

Tabla 1. Composición nutricional del estiércol y biofertilizante bovino

	mg L ⁻¹						
	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	Ca	Mg	NH ₄ ⁺	PO ₄ ³⁻	Fe
EB	71.5 a	15.1 a	153.1 a	67.0 a	47.6 a	58.8 b	5.7 a
SB	6.8 a	1.1 b	105.5 a	59.6 a	144.3 a	105.1 a	5.3 a

EB= entrada bovino, SB= salida bovino, NO₃⁻ = nitrato, NO₂⁻ = nitrito, Ca= calcio, Mg = magnesio, NH₄⁺ = amonio, PO₄³⁻ = fosfato, Fe = hierro. Medias con letra distinta en la misma columna son diferentes estadísticamente (p<0.05).

Tabla 2. Características fisicoquímicas del estiércol y biofertilizante bovino

	T°C	Ph	CE ms	TDS ppt	mg L ⁻¹			
					ST	STF	STV	DQO
EB	24.5 b	6.7 a	3.4 a	1.6 a	3.2 a	1.0 a	2.2 a	21.2 a
SB	31.2 a	6.8 a	3.1 a	1.5 a	1.0 b	0.4 b	0.6 b	8.6 b

EB= entrada bovino, SB= salida bovino, T= temperatura, pH= potencial hidrogeno, CE= conductividad eléctrica, TDS= sólidos disueltos totales, ST= solidos totales, STF= solidos fijos totales, STV= solidos volátiles totales. Medias con letra distinta en la misma columna son diferentes estadísticamente (p<0.05).

La medición de la temperatura del biofertilizante registro un valor de 31.2 °C lo que significa un incremento en comparación a la temperatura inicial del estiércol antes de la DA, esto ocurre debido a los mecanismos de reacción y a la cinética del sistema.

Los resultados del análisis del sustrato bovino muestran una disminución en el contenido de algunos nutrientes y fracciones de estos: NO₃⁻ (90 %), NO₂⁻ (92 %), Ca (31 %), Mg (11 %) y Fe (7 %), mientras que el contenido de PO₄³⁻ registró un aumento significativo (44 % p<0.05), en el caso del NH₄⁺ el incremento (67 %) no tuvo diferencia significativa (p<0.05). En un estudio realizado por Torres (2016), al evaluar un biofertilizante a base de estiércol bovino con un TRC de 30 días, reportó un valor de 190 mg L⁻¹ de Mg y un pH de 7.9. Por su parte Durazno (2018) y Cabos *et al.* (2019) encontraron valores de nitrógeno y fósforo total de 598 310 mg L⁻¹ y 2 100 202.8 mg L⁻¹ respectivamente. Estos resultados difieren con los obtenidos en este trabajo (tabla 1 y 2), esto se debe a que las

características y la calidad del biofertilizante dependen de diferentes factores, como los ambientales, diseño y tipo de reactor, TRH, TRC y de la calidad del sustrato (Ferrer y Seco, 2007), Así como del Tiempo de Retención Hidráulico (TRH) y temperatura (Martí-Herrero, 2019).

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del estiércol y biofertilizante porcino se presentan en la tabla 3 y 4.

Tabla 3. Composición nutricional del estiércol y biofertilizante porcino

	mg L ⁻¹						
	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	Ca	Mg	NH ₄ ⁺	PO ₄ ³⁻	Fe
EP	5.7 a	4.7 a	167.8 a	125.3 a	418.2 b	60.5 a	20 a
SP	8.3 a	1.3 b	166.7 a	73.7 a	1308.3 a	83.2 a	7.8 a

EP= entrada porcino, SP= salida porcino, NO₃⁻ = nitrato, NO₂⁻ = nitrito, Ca= calcio, Mg = magnesio, NH₄⁺ = amonio, PO₄³⁻ = fosfato, Fe = hierro. Medias con letra distinta en la misma columna son diferentes estadísticamente (p<0.05).

Tabla 4. Características fisicoquímicas del estiércol y biofertilizante porcino

	T°C	pH	CE ms	TDS ppt	mg L ⁻¹			
					ST	STF	STV	DQO
EP	24.9 b	6.7 b	8.9 b	4.4 b	2.5 a	0.9 a	1.5 a	53.4 a
SP	26.6 a	7.6 a	16.2 a	8.1 a	2.2 a	1.1 a	1.3 a	30.4 a

EP= entrada porcino, SP= salida porcino, T= temperatura, pH= potencial hidrogeno, CE= conductividad eléctrica, TDS= sólidos disueltos totales, ST= solidos totales, STF= solidos fijos totales, STV= solidos volátiles totales. Medias con letra distinta en la misma columna son diferentes estadísticamente (p<0.05).

Se puede notar un aumento significativo en la temperatura y el valor del pH (6.3 y 11.8 % respectivamente), este aumento es un indicador de que el proceso de DA está ocurriendo dentro del sistema. El biofertilizante porcino presenta un aumento significativo (68 %) en la concentración de NH₄⁺, de igual forma presenta un aumento en el contenido de NO₃⁻ y PO₄³⁻, sin embargo, los incrementos no son significativos. Por otro lado, se observa una disminución en los parámetros NO₂⁻ (72 %), Ca (0.6 %), Mg (41 %) y Fe (61 %). Lo que deja en evidencia que el tipo de animal, su alimentación, las condiciones locales de cada región de estudio y los TRC influyen en la calidad de los biofertilizantes.

El aumento en ambos biofertilizantes del contenido de NH₄⁺ puede deberse en gran parte en el contenido de bacterias desnitrificantes en el proceso (Reyes et al., 2015). En este sentido, la tecnología de la DA tiene como ventaja la mineralización, aumentando la concentración de iones NH₄⁺ y PO₄³⁻ (Foged *et al.*, 2012).

En la figura 3, se puede apreciar el análisis de coordenadas principales (por sus siglas en ingles PCO) con una explicación del 74 % de la varianza multiparamétrica entre los promedios de cada muestreo de los biofertilizantes bovino y porcino. El resultado de la

PCO en conjunto con el Análisis Jerárquico Clúster (matriz basada en la distancia euclidiana), muestra la formación de 2 grupos (distancia 3.5) entre cada uno de los tipos de sustrato (estiércoles empleados). Después del proceso de la DA, los sustratos de salida (biofertilizante) presentan cierta similitud observada con la formación de un grupo a la distancia de 3.5 (para ambos estiércoles), a excepción del muestreo 1 bovino. A una menor distancia (distancia euclidiana de 2) se puede observar agrupaciones entre las muestras de biofertilizantes de excretas porcinas, lo que indica en un análisis más detallado existen diferencias entre biofertilizantes.

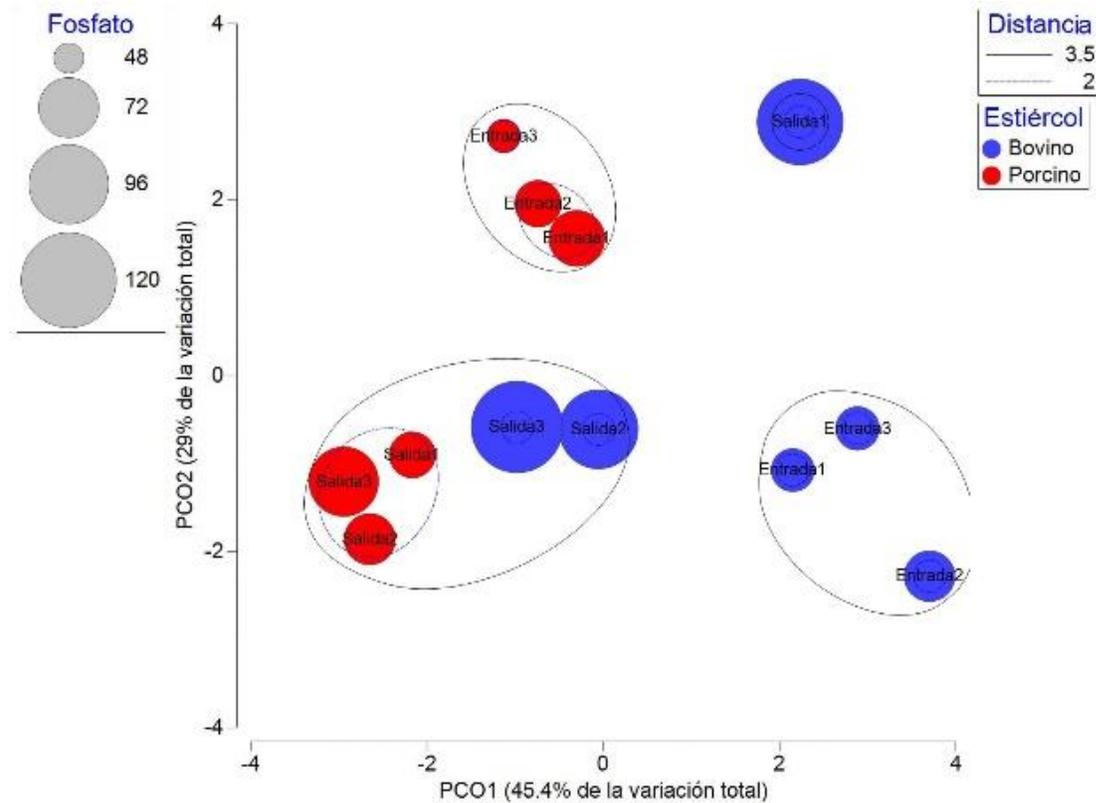


Figura 3. Análisis de Coordenadas Principales (PCO) de los resultados de la caracterización físico-química de los sustratos y biofertilizantes producidos en Villaflores, Chiapas. Las muestras están estandarizadas, transformadas (raíz cuadrada) y analizadas con una matriz de Distancia Euclidiana. El tamaño de los círculos rojos y azules, representa el contenido de fosfatos en mg L⁻¹.

La conformación de dos grupos diferentes entre los tipos de estiércol puede deberse a las diferencias entre los tipos de animal. En el caso del bovino, son animales rumiantes cuyo sistema digestivo contiene organismos metanogénicos, por lo que la DA inicia dentro del animal, lo que da como resultado un estiércol mucho más digerido en comparación al porcino.

Lo anterior se podía observar incluso físicamente, el estiércol porcino contenía más sólidos sin digerir. Otra diferencia entre los estiércoles se debe al tipo de alimento de cada animal, mientras el bovino consume una dieta a base de forrajes y concentrados, el porcino fue alimentado en base a concentrados como el maíz y la soya, por lo tanto, las características químicas del estiércol de los animales son diferentes y por consiguiente la composición del perfil químico de los biofertilizantes también lo será. Todo lo anterior coincide con Pérez y Viniegra (2007), quienes mencionan que la composición química del estiércol está relacionada con el tipo de ración alimenticia y su digestibilidad, pero también depende del estado general y la edad de los animales. En este sentido, la calidad de los biofertilizantes depende no solo de las condiciones ambientales y de operación, sino también en el tipo y alimentación de los animales.

En general, en la figura 3 se resalta el aumento de los fosfatos en los biofertilizantes en comparación a los estiércoles. Este aumento probablemente se deba entre otros factores al incremento del pH durante el proceso de la DA, en rangos de pH de 7 el equilibrio químico se mueve hacia la formación de fosfato (Hjorth *et al.*, 2010; Nelson *et al.*, 2003). El fósforo es un importante macronutriente vegetal, ya que participa como componente de los arenalitos, ácidos nucleicos y fosfolípidos (Möller y Müller, 2012). El contenido de los fosfatos es de importancia ya que la mayoría de los suelos de la región tienen deficiencia en este nutriente (López-Báez *et al.*, 2018).

Uno de los parámetros importantes para el éxito del proceso de la DA es el pH, ya que este parámetro interviene en el comportamiento de la actividad microbiana, en la concentración de H⁺ y en los procesos químicos, bioquímicos y biológicos que tiene lugar dentro del sistema (Acosta y Abreu 2005). Durante todo el estudio, el pH se mantuvo entre 6 y 8 en ambos digestores (tabla 6), esos valores se encuentran dentro de los rangos deseables para el proceso de la DA (Ferrer y Seco, 2007).

En la tabla 5 y 6 se presenta los resultados de la comparación entre los biofertilizantes bovino y porcino. En ellas se observa que existe diferencia significativa entre algunos parámetros de ambos biofertilizantes, principalmente en el contenido de NH₄⁺, pH y temperatura. A pesar de que no hay diferencia significativa en el resto de los parámetros, se aprecian diferencias numéricas, ello, puede influir en la calidad de los efluentes al analizarlos de forma global, considerando todos los parámetros en conjunto.

Tabla 5. Composición nutricional de los biofertilizantes bovino y porcino.

	mg L ⁻¹						
	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	Ca	Mg	NH ₄ ⁺	PO ₄ ³⁻	Fe
SB	6.8 a	1.1 a	105.5 a	59.6 a	144.3 b	105.1 a	5.3 a
SP	8.3 a	1.3 a	166.7 a	73.7 a	1308.3 a	83.2 a	7.8 a

SB= salida bovino, SB= salida bovino, NO₃⁻ = nitrato, NO₂⁻ = nitrito, Ca= calcio, Mg = magnesio, NH₄⁺ = amonio, PO₄³⁻ = fosfato, Fe = hierro. Medias con letra distinta en la misma columna son diferentes estadísticamente (p<0.05).

Tabla 6. Características fisicoquímicas de los biofertilizantes bovino y porcino.

	T°C	pH	CE ms	TDS ppt	mg L ⁻¹			
					ST	STF	STV	DQO
SB	31.2 a	6.8 b	3.1 b	1.5 b	1.0 b	0.4 b	0.6 b	8.6 a
SP	26.6 b	7.6 a	16.2 a	8.1 a	2.2 a	1.1 a	1.3 a	30.4 a

SB= salida bovino, SB= salida bovino, T= temperatura, pH= potencial hidrogeno, CE= conductividad eléctrica, TDS= solidos disueltos totales, ST= solidos totales, STF= solidos fijos totales, STV= solidos volátiles totales. Medias con letra distinta en la misma columna son diferentes estadísticamente (p<0.05).

Como puede observarse, el contenido de ST fue menor estadísticamente en el biofertilizante bovino que en el biofertilizante porcino. Los STF fueron más altos estadísticamente en el biofertilizante porcino que en el bovino, por lo tanto, el biofertilizante porcino tuvo estadísticamente un mayor contenido de STV que el biofertilizante bovino. Esto probablemente se deba a que el estiércol porcino contiene mayor cantidad de elementos no digeridos por el animal, resaltando en este punto la diferencia entre los rumiantes y los monogástricos.

La CE en los biofertilizantes osciló entre 3.1 y 16.2 mS/cm⁻¹; fue mayor en el biofertilizante porcino. Para el caso del biofertilizante bovino, el valor de la CE se encuentra dentro del rango típico para los digestatos anaeróbicos (Kataki *et al.*, 2017), que es de 5 mS cm⁻¹, este criterio indica el límite permisible para el uso de una enmienda sin dilución antes de la aplicación en el suelo (Fleming *et al.*, 2006). Cabe señalar, que el biofertilizante porcino registro un aumento (79 %) con respecto al estiércol (tabla1), lo que pudo deberse al bajo consumo de los compuestos solubles del sustrato por los microorganismos, llegándose a almacenar dentro del biodigestor. Los resultados de la CE de los biofertilizantes difieren al reportado por Cano *et al.* (2016) en la biodigestión de excretas bovinas y porcinas en un periodo de dos meses, al final del proceso obtuvieron 8.94±2.8 y 8.4±2.71 mS cm⁻¹ para biofertilizante bovino y porcino respectivamente, estos mismos autores mencionan que la CE en suelos considerados muy salinos oscila entre 8 y 16 mS cm⁻¹, por lo que recomiendan que biofertilizantes con CE altas solo podrán ser aplicados en suelos ácidos, lo cual coincide con los suelos de la región.

En la figura 4 se puede observar la conformación de cuatro grupos estadísticamente significativos (SIMPROF), así como también los parámetros que correlacionan con algunos de estos grupos (correlación Pearson 0.7).

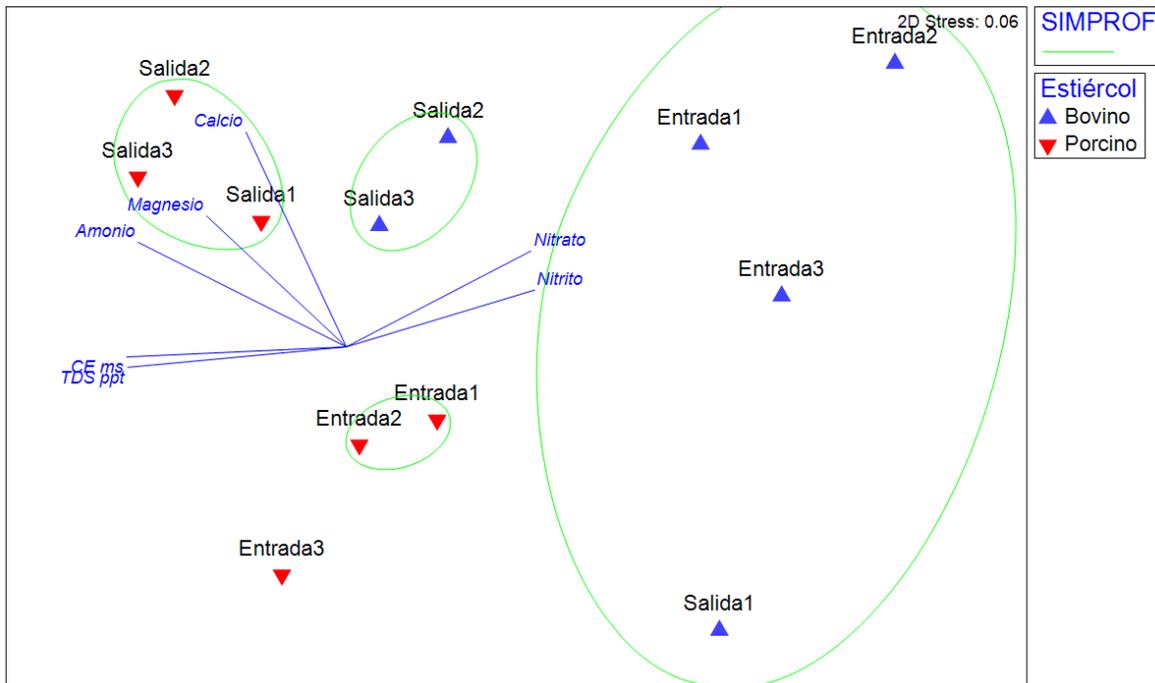


Figura 4. Análisis de los perfiles de similaridad (SIMPROF) de los sustratos bovinos y porcinos representados con los círculos verdes. Los vectores corresponden a la correlación de Pearson 0.7.

El NH_4^+ , Ca y Mg tienen una correlación positiva con el grupo de biofertilizante porcino, mientras que el NO_3^- y NO_2^- tienen una correlación positiva con la entrada del bovino.

Estas diferencias observadas tanto en la tabla 5 y figura 4, pueden deberse a que el biofertilizante bovino presentó una temperatura más elevada 14.7 % superior al porcino, en contraste el valor del pH del biofertilizante porcino fue por arriba del 10.3 % en comparación con el bovino. Además, el biofertilizante bovino contiene más PO_4^{3-} que el porcino, aunque este valor no es significativo estadísticamente. El biofertilizante porcino contiene más NH_4^+ (88.9 %) en comparación con el bovino, en este sentido (Morazán-Nuñez, 2014) indican que cuando el valor del pH es ácido la acción de la enzima ureasa es inhibida y por lo tanto no se forman compuestos como el amoníaco (precursor del amonio). En este estudio el valor del pH en el biofertilizante porcino fue de 7.6, lo que pudo favorecer que la concentración de amonio aumentara debido a que la enzima ureasa trabaja en condiciones de pH de 7-10. Contrario al biofertilizante bovino, su pH

fue de 6.8, coincidiendo con una menor concentración de NH_4^+ . Por otro lado, Gutser *et al.* (2005) mencionan que el contenido de amonio en los efluentes de la DA está relacionado con el contenido de nitrógeno (N) total de los estiércoles. En este sentido, los biofertilizantes de materias primas con alta degradabilidad como los estiércoles de cerdo que son alimentados con una dieta alta en concentrados, se caracterizan por una alta proporción de NH_4^+ : N total (Asmus *et al.*, 1998 ; Pötsch, 2005; Emmerling y Barton, 2007; Fouda, 2011), en contraste, el estiércol de ganado bovino por su contenido de materias primas fibrosas (pastos) dan lugar a una proporción baja de NH_4^+ : N total (Möller y Müller, 2012).

El porcentaje de remoción de DQO en el proceso de la DA es muy importante, este parámetro indica la eficiencia en la transformación de la materia orgánica durante el proceso (Shirakawa, 2016). El porcentaje de eliminación de la DQO en el sustrato bovino fue de 59.2 % y en el porcino fue de 43.1 % (tabla 7), la eliminación de la DQO depende de la parte soluble de la materia orgánica que entra al proceso (Ferrer y Seco 2007). En este sentido CONAGUA⁶ (2016), menciona que la tecnología de la DA es comúnmente utilizada para la remoción de la materia orgánica, con eficiencias de remoción que van del 40-90 % de la DQO y la cual dependerá del tipo de reactor y del agua residual a tratar, en este estudio los porcentajes de remoción de la DQO caen dentro de los rangos descritos anteriormente. A pesar de que el proceso puede mejorarse para obtener una mayor eliminación de la DQO los resultados obtenidos cumplen con los límites máximos permisibles según la NOM-001-SEMARNAT-2017 para ser aplicados a los suelos.

Tabla 7. Porcentaje de eliminación DQO de los sustratos bovino y porcino

	Bovino		Porcino	
	Entrada	Salida	Entrada	Salida
DQO	21.2 a	8.6 b	53.4 a	30.4 a
% ELIMINACIÓN	59.2		43.1	

DQO= demanda química de oxígeno

4.2 Características microbiológicas del estiércol y biofertilizante bovino y porcino.

En la tabla 8 y 9, se describen las UFC presentes en el sustrato bovino y porcino antes y después de la DA. Se puede notar diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los resultados.

⁶ Comisión Nacional del Agua

Tabla 8. Parámetros microbiológicos del sustrato bovino antes y después de la DA

	<i>E. coli</i> UFC mL⁻¹	O.C UFC mL⁻¹	Aerófilos UFC mL⁻¹
EB	3688889 a	1466667 a	134801223 a
SB	11326 b	33390 b	1374161 a

O.C= otros coliformes. Medias con literal distinta en la misma columna son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

Tabla 9. Parámetros microbiológicos del sustrato porcino antes y después de la DA

	<i>E. coli</i> UFC mL⁻¹	O.C UFC mL⁻¹	Aerófilos UFC mL⁻¹
EP	6155556 a	3900000 a	59867611 a
SP	79209 b	107 b	5681469 a

O.C= otros coliformes. Medias con literal distinta en la misma columna son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

Como puede apreciarse en las tablas anteriores existe una disminución significativa de las UFC de *E.coli* y O.C después del proceso de DA en los sustratos bovino y porcino. No hubo diferencia significativa en las UFC aerófilos de ambos sustratos, pero si se nota una disminución de estas bacterias después del proceso. En la figura 5 se observa la formación estadística de cinco grupos, dos corresponden a los biofertilizantes (salidas) y tres a las entradas (estiércol) de acuerdo a los resultados de la UFC.

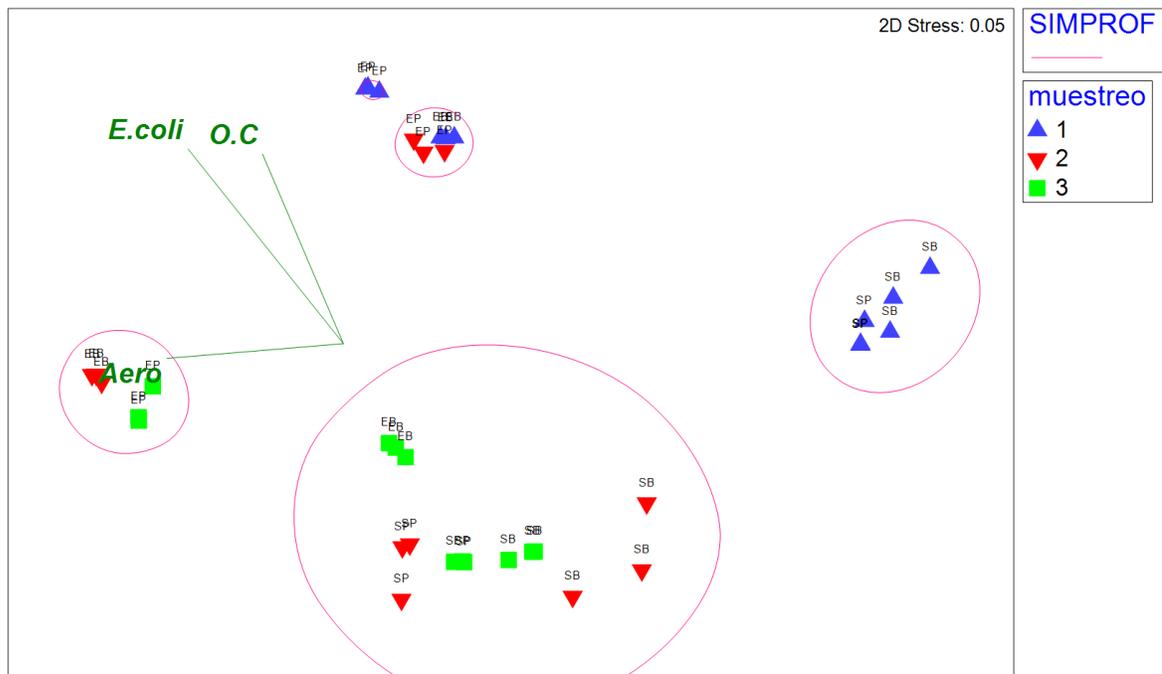


Figura 5. Análisis de los resultados microbiano de los sustratos bovino y porcino.: EB= entrada bovino, SB= salida bovino, EP= entrada porcino, SP= salida porcino, O.C= otros coliformes, Aero= aerófilos. Los círculos en color rosa representan los perfiles de similaridad (SIMPROF basado en 999 permutaciones a un 95 % de confianza). Los vectores corresponden a la correlación de Pearson 0.7.

El porcentaje de eliminación de las UFC de *E.coli*, O.C y aerófilos del sustrato bovino después del proceso de DA fue de 99.8 %, 97.6 % y 98.9 % respectivamente. Y para el sustrato porcino fue de 99 % (*E. coli*), 99.9 % (O.C) y 90.6 % (aerófilos). Estos resultados coinciden con lo reportado por Coté *et al.* (2006) quienes mencionan que en los sistemas mesófilos se obtiene una eliminación eficiente entre los 25 y 35 días. Los diferentes estudios enfocados a patógenos microbianos indican que el estiércol de los animales actúan como reservorios de patógenos humanos, con potencial para contaminar los recursos hídricos y representar un riesgo para la salud pública y animal (Pandey *et al.*, 2018), es por ello que la disminución de los organismos patógenos es importante, y como se ha demostrado en este estudio, la aplicación de la digestión anaerobia logra reducir un gran número de unidades formadoras de colonias de organismos patógenos por lo cual su implementación como fertilizante puede no representar un riesgo sanitario, sin embargo se recomienda la realización de un estudio más detallado.

4.3 Secuenciación masiva de nueva generación del gen 16S ARNr

Los resultados obtenidos de la secuenciación masiva de las muestras de sustrato bovino arrojaron un total de 34 654 lecturas en la muestra de entrada y 26 772 lecturas en la muestra de salida, con lo cual se puede ver una disminución de la población microbiana después del proceso. Las muestras correspondientes al estiércol porcino presentaron inhibidores en la amplificación de las secuencias, por lo cual hasta el momento no se ha podido realizar su secuenciación.

Se logró la identificación a nivel de genero del 59.2 % del total de las lecturas de entrada y un 66.3 % del total de las lecturas de salida. En la tabla 10 se presenta el porcentaje de bacterias identificadas según bibliografía como patógenas (etiológicas) y de bacterias con potencial interés agrícola. En dicha tabla se observa tanto el porcentaje correspondiente a estas clasificaciones del total de las lecturas y el porcentaje total correspondiente a los géneros identificados.

Tabla 10. Porcentaje de Bacterias patógenas y de interés agrícola presentes en el estiércol y el biofertilizante bovino.

Bacterias	Total de lecturas*		Géneros**	
	Entrada	Salida	Entrada	Salida
Patógenas	21.5 %	2.8 %	36.4 %	4.3 %
De interés agrícola	1.28 %	1.0 %	2.2 %	1.5 %

* Con respecto al total de lectura

** Con respecto al total de géneros identificados

Después del proceso de la DA los organismos patógenos se reducen en un 86.8 %, en cambio, los organismos de interés agrícola solo se reducen en un 22 % lo que indica que la mayor parte de estos se quedan en el biofertilizante. Esto sugiere que su aplicación en el suelo podría tener un impacto potencial en la microbiota de los suelos de cultivo en los cuales se aplique el biofertilizante.

En la figura 6, se observan las bacterias presentes en el biofertilizante bovino, descritas como benéficas en bibliografía, así como el beneficio agronómico que se les atribuye.

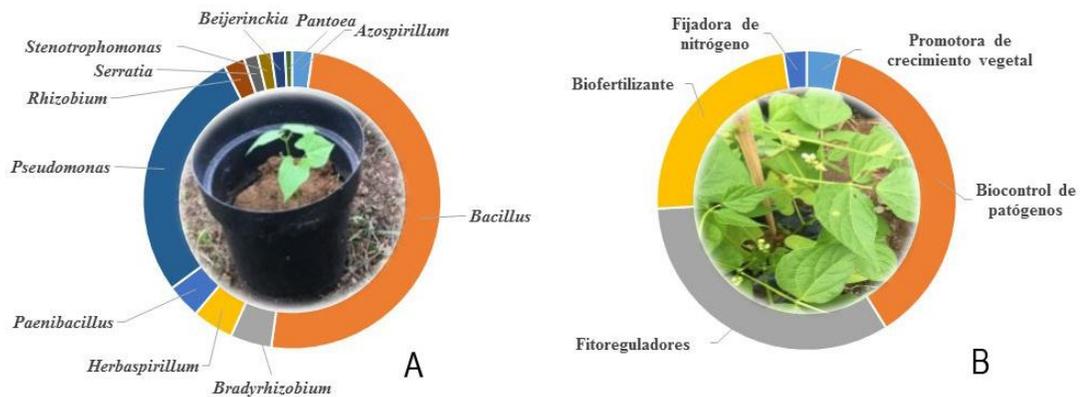


Figura 6. Bacterias de interés agrícola. **A** Bacterias identificadas según bibliografía de interés agrícola presentes en el biofertilizante a partir de excretas bovinas. **B** Funciones benéficas que se les atribuye a las bacterias identificadas según bibliografía.

Alfa *et al.* (2014) mencionan que los biofertilizantes suelen contener microorganismos como *Pseudomonas* y *Bacillus* que son solubilizadores de fosfato y potencian sus propiedades agronómicas. Lo que coincide con lo reportado en este estudio (figura 2), además se encontraron bacterias del genero *Azospirillum*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum*, *Pandoraea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Beijerinckia*, que se les atribuye la función de fitoregulación, fijar nitrógeno, controlar patógenos y promover el crecimiento vegetal (Mehnaz y Lazarovits, 2006; Hipólito-Romero *et al.*, 2017; Creus, 2017). Estos microorganismos aceleran los procesos microbianos en el suelo y aumentan la disponibilidad de nutrientes asimilables por las plantas (Johansen *et al.*, 2013).

4.4. Evaluación agronómica de los biofertilizantes en el cultivo de frijol

Los resultados de la evaluación agronómica de los biofertilizantes seleccionados en el cultivo de frijol se presentan a continuación.

Altura de la planta

En la tabla 11, se puede observar el comportamiento de la altura de la planta del frijol durante el ciclo del cultivo. Existe diferencia significativa a los 19 y 26 días DDS, pero no hubo diferencia significativa a los 12 DDS y al final del ciclo del cultivo.

Tabla 11. Altura promedio de las plantas (cm) de frijol

	12 DDS	19 DDS	26 DDS	34 DDS
T1	20.8 a	36.2 ab	50.9 ab	82.1 a
T2	19.4 a	48.4 a	73.9 a	103.2 a
T3	18.7 a	34.4 b	57.1 ab	91.5 a
T4	22.2 a	31.2 b	47.1 b	87.3 a

DDS= días después de la siembra. Medias con literal distinta en la misma columna son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

En la primera medición el promedio de la altura de las plantas de frijol en el T4 fue la más alta, aunque este valor no fue significativo, a partir de la segunda medición se aprecia que el T2 fue el que presentó mayor altura promedio siendo significativa a los 19 y 26 DDS. En este sentido, Alfa *et al.* (2014) mencionan que los efluentes resultantes de la DA contienen una gran diversidad de microorganismos que potencian sus propiedades agronómicas, dentro de ese grupo se pueden encontrar bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo. Como se puede observar en la figura 6, los microorganismos benéficos encontrados en este estudio pudieron haber favorecido el crecimiento de las plantas de frijol en el T2. El T2 también contenía mayor cantidad de NH_4^+ , que es la forma en que las plantas toman el nitrógeno (N) a través de las raíces para ser usado en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Jarauta, 2005) por lo que también pudo haber contribuido a que las plantas de frijol fueran más altas en comparación a los otros tratamientos.

Diámetro del tallo

En la tabla 12, se observan los valores promedio del diámetro del tallo de las plantas de frijol, no se observa diferencias significativas en las primeras tres mediciones, pero si a los 34 DDS entre el testigo y los biofertilizantes.

Tabla 12. Diámetro promedio del tallo (cm) de las plantas de frijol

	12 DDS	19 DDS	26 DDS	34 DDS
T1	2.9 a	3.5 a	3.6 a	3.8 a
T2	3.1 a	3.4 a	3.6 a	3.9 a
T3	2.9 a	3.4 a	3.4 a	3.6 ab
T4	2.5 a	3.4 a	3.3 a	3.3 b

DDS= días después de la siembra. Medias con literal distinta en la misma columna son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

Se puede observar que en la última medición los biofertilizantes (T1 y T2) y el T4 presentan diferencias significativas, mientras que al compararlos con el T3 no presentaron diferencia significativa, lo que infiere que el diámetro del tallo con la aplicación de los biofertilizantes y el T3 se comportan de la misma manera, sin embargo a pesar de no tener diferencia estadística, se puede notar que este valor siempre es mayor en aquellas plantas en donde se aplicaron los biofertilizantes, pudiéndose resaltar su impacto positivo como fertilizante para las plantas.

En la tabla 13, se presentan las variables correspondientes a la germinación, floración, número de vainas y número de granos por vainas que presentaron las plantas con los diferentes tratamientos.

Tabla 13. Variables de crecimiento vegetal

	DDS			
	Germinación	Floración	NVP	NGV
T1	5	27	11	6
T2	6	30	12	6
T3	8	30	11	5
T4	8	30	8	6

DDS= días después de siembra, NVP= número de vainas por planta, NGV= número de granos por vaina.

Se puede observar que las plantas que se encontraban en los tratamientos 1 y 2 fueron las primeras en emerger, posteriormente emergieron las plantas del tratamiento 3 y 4, algo interesante que se observó es que a pesar de que el T2 germinó un día después que el T1, las plantas del T2 tenían las hojas más anchas, además las plantas con ambos tratamientos se mantuvieron con mayor follaje en comparación con las plantas del tratamiento 3 Y 4. En cuanto a la floración, se observó que las plantas con el T1 florecieron antes que los demás tratamientos. En cuanto al número de vainas por plantas el testigo fue quien presentó menor cantidad en esta variable, mientras que en el número promedio de granos por vaina el T3 fue el de menor cantidad, mientras que el T4 el tamaño de los granos fue menor en comparación con los otros tratamientos, con estos resultados podemos ver que la aplicación de los biofertilizantes en el suelo favorece la germinación de las plantas de frijol y un mayor desarrollo foliar. Por lo que ambos biofertilizantes demuestran que pueden tener potencial como fertilizante en los cultivos agrícolas. En este sentido Yu *et al.* (2010) afirman que los efluentes de la DA contienen sustancias como fitohormonas, ácidos nucleicos, vitaminas, etc., con el potencial de promover el crecimiento de las plantas y aumentar la tolerancia al estrés biótico y abiótico.

En la tabla 14, se presentan los promedios de la tasa fotosintética y el contenido de clorofila total del cultivo de frijol, los cuales fueron medidos a los 19, 29 y 41 días después de la siembra (DDS).

Tabla 14. Promedio de la tasa fotosintética y clorofila total de las plantas de frijol

	Fotosíntesis Fv/Fm			Clorofila total		
	19 DDS	29 DDS	41 DDS	19 DDS	29 DDS	41 DDS
T1	0.799 a	0.823 a	0.795 b	216.09 a	266.06 a	206.44 b
T2	0.796 a	0.822 a	0.810 ab	227.93 a	286.33 a	225.08 ab
T3	0.808 a	0.820 a	0.834 a	247.31 a	267.46 a	271.22 a
T4	0.795 a	0.816 a	0.835 a	237.77 a	274.07 a	280.09 a

DDS= días después de la siembra. Medias con literal distinta en la misma columna son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

La relación FV/Fm (fluorescencia variable y máxima) es utilizada como indicador de la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (PS II) de plantas expuestas a diferentes tipos de estrés (Brestic y Ziv cak, 2013), en plantas sanas, los valores son cercanos a 0.750-0.850 (valores óptimos) una disminución en este valor indica pérdida de función fotosintética (Salazar *et al.*, 2016). En este estudio, el índice Fv/Fm estuvo entre 0.795-0.835, y se encuentran dentro del intervalo típico de las plantas desarrolladas en condiciones naturales o sanas.

Se puede observar que no hubo diferencia en la tasa fotosintética a los 19 y 29 DDS entre los tratamientos, sin embargo, se observa que a los 41 DDS el T1 presenta diferencia significativa con los tratamientos 3 y 4. Este mismo comportamiento se puede observar en el contenido total de clorofila. La variación en la tasa fotosintética y el contenido de clorofila total a los 41 DDS entre los tratamientos puede deberse a que las plantas con el T1 se encontraba en la última etapa de su ciclo vegetativo por haber emergido antes (tabla 13) que las demás plantas sometidas a los otros tratamientos, esto se relaciona con la edad que presentan los tejidos de las hojas ya que el envejecimiento de estos hacen que las hojas cambien de color, lo que induce que este parámetro sea más bajo en comparación con las hojas más jóvenes que mantiene una pigmentación uniforme. La emergencia temprana de las plantas sometidas con el T1 pudo deberse a las características microbianas (figura 6) y contenido de nutrientes (tabla 1) que presenta el biofertilizante bovino, ya que al contener bacterias promotoras del crecimiento vegetal y solubilizadoras de fósforo así como el aumento en el contenido de amonio y fosfatos favoreció la disponibilidad de estos nutrientes para la planta en comparación con los tratamientos T3 Y T4 con los que tuvo diferencia significativa. Como puede observarse en la tabla 15, todas las plantas crecieron en condiciones homogéneas (pH y T°) por lo cual nuevamente se resalta el papel importante que tienen los biofertilizantes al ser aplicados a los cultivos.

Tabla 15. Temperatura y pH del suelo durante el ciclo del cultivo

	12 DDS		19 DDS		26 DDS		34 DDS	
	T°	pH	T°	pH	T°	pH	T°	pH
T1	29 a	5.3 a	28.2 a	4.9 a	31.2 a	4.5 a	27.6 a	5.1 a
T2	29.6 a	4.9 a	27.6 a	4.9 a	30.6 a	4.7 a	28 a	6.1 a
T3	28.8 a	5.5 a	27.6 a	4.9 a	31.6 a	4.9 a	27.8 a	5.2 a
T4	29 a	4.8 a	28.4 a	4.9 a	31.6 a	5.2 a	27 a	4.8 a

DDS= días después de la siembra. Medias con literal distinta en la misma columna son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

4.5. Análisis del potencial regenerativo del suelo

Los resultados del análisis de suelo tratado con los biofertilizantes y urea se presentan en la figura 7. En ella se puede observar las diferencias por tipo de suelo (manejo agroecológico y convencional)

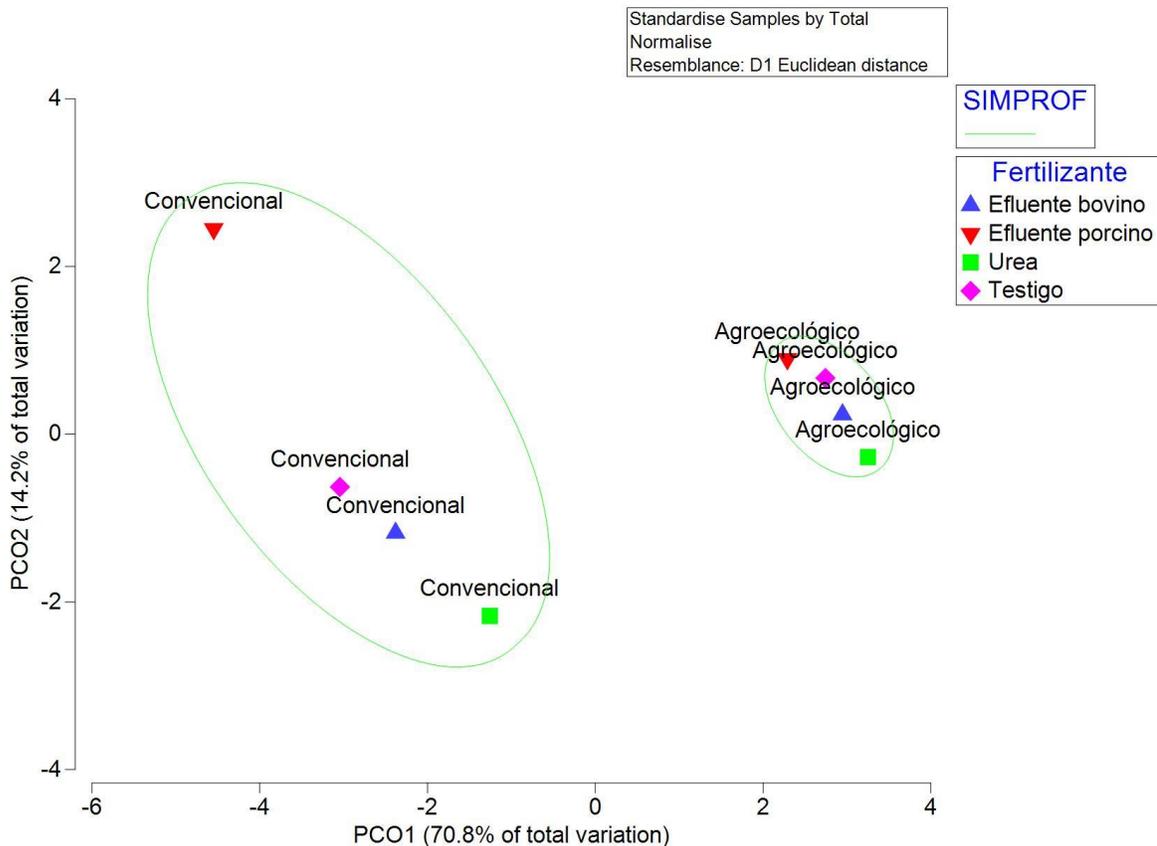


Figura 7. Análisis de Coordenadas Principales (PCO) según manejo de suelo y fertilizante. Las muestras están estandarizadas, transformadas (raíz cuadrada) y analizadas con una matriz de distancia euclidiana. Los círculos verdes representan los perfiles de similaridad (SIMPROF basado en 999 permutaciones a un 95 % de confianza).

Con el análisis de coordenadas principales representado de forma gráfica en la figura 7, se explica el 85 % de la varianza con los dos primeros ejes. Con este gráfico, se puede observar la separación de dos grupos según el tipo de suelo (manejo de suelo) y que no hay diferencia significativa entre tratamientos eso se puede observar por los grupos formados por el SIMPROF (círculos verdes). Estos resultados se pueden deber que la aplicación ha sido puntual y los incrementos que se obtuvieron en algunos nutrientes no son estadísticamente diferentes, sin embargo, estos incrementos representan una posible mejora a mediano o largo plazo. El análisis PCO de la tasa de cambio de los tratamientos con respecto al testigo se observa en la figura 8. En ella, los resultados del SIMPROF (test) indican que los cambios en los nutrientes del suelo (independiente del tipo de manejo) de cada tratamiento es estadísticamente similar. Esto indica que los biofertilizantes probados tienen la misma mejora que la urea en cuanto a enriquecimiento del suelo para uso agrícola. Esto resulta interesante considerando que en el tipo de suelo convencional se suele usar la urea en todos los ciclos de cultivo; el productor es dependiente de la adquisición de este fertilizante sin representar una mejora en el suelo a largo plazo. Estos resultados refuerzan la idea de un estudio a largo plazo con el uso de los biofertilizantes y el impacto en los nutrientes en el suelo.

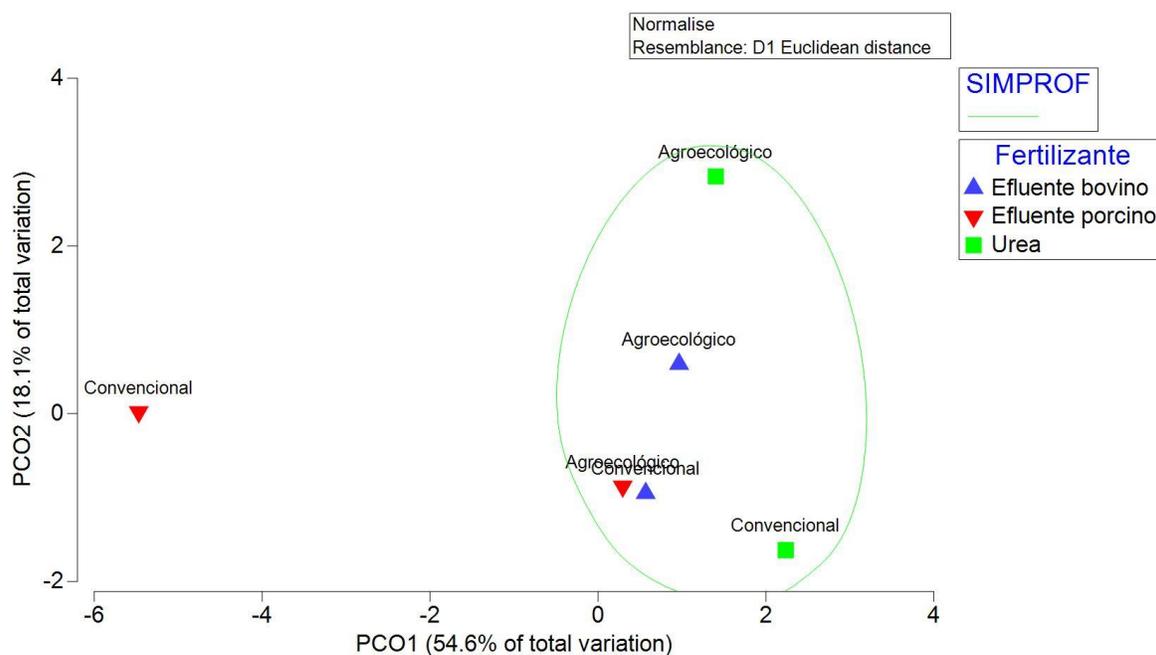


Figura 8. Análisis de Coordenadas Principales (PCO) de la tasa de cambio de los tratamientos con respecto al testigo. Las muestras están estandarizadas, transformadas (raíz cuadrada) y analizadas con una matriz de distancia euclidiana. El círculo en verde representa el perfil de similitud (SIMPROF basado en 999 permutaciones a un 95 % de confianza).

Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos se detallan en la figura 9. En ella se puede apreciar que con el uso del biofertilizante bovino hay una disminución importante de los patógenos, resaltando una eliminación completa de *E. coli* en las muestras. También hay un aumento de la población microbiana de aerófilos, este aumento tiende a igualar el total de bacterias analizadas con las presentes en el testigo. Esto indica que el número de bacterias en el suelo conservaron la abundancia total. Con respecto al biofertilizante porcino, se presentaron menores cambios que en los otros tratamientos, su disminución fue 38 % de los coliformes totales, cuando los otros tratamientos tienen una eliminación de 71 % (biofertilizante bovino) y 100 % (urea); por tanto, el cambio en los nutrientes y en los microorganismos analizados hacen que el T2 tenga una mayor distancia (euclídeana) que el resto de los tratamientos. La urea presentó una disminución total de patógenos, pero también una disminución importante de aerófilos 45 %, frente al aumento de los microorganismos aerófilos de los otros tratamientos, 15 % (biofertilizante porcino) y 87 % (biofertilizante bovino), esto indica que el tratamiento con urea no es la mejor opción para promover un enriquecimiento microbiano en el suelo. También se observa una correlación directa entre el contenido de K y biofertilizante porcino mientras es inversamente proporcional al tratamiento que contiene urea. El Fe tiene correlación directamente con el biofertilizante Porcino, mientras que el contenido de N-NO₃ correlaciona inversamente al testigo y al biofertilizante bovino.

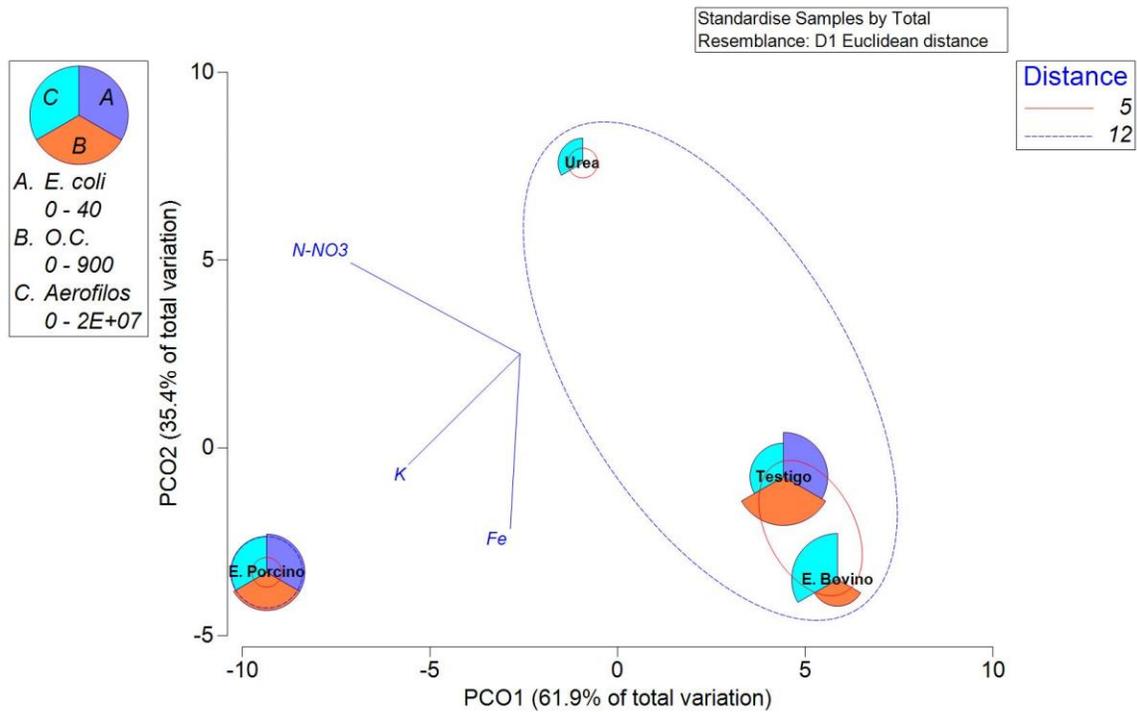


Figura 9. Análisis de Coordenadas Principales (PCO) del análisis microbiológico según tratamiento. Las muestras están estandarizadas, transformadas (raíz cuadrada) y analizadas con una matriz de distancia euclidiana. Los círculos de colores representan las abundancias relativas de las bacterias analizadas presentes; azul presencia de *E. coli*, morado presencia de O.C y naranja población aerófila. Los vectores representan la correlación (0.7 múltiple) con los nutrientes.

En la figura 10. Se observa los resultados del MDS con respecto a los análisis químicos del suelo antes y después del cultivo según el tratamiento aplicado. Esos resultados forman dos grupos estadísticamente diferenciados, uno conformado por el grupo antes de siembra y el otro después de siembra. El análisis de cada una de las variables químicas se pueden observar en las figuras, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21.

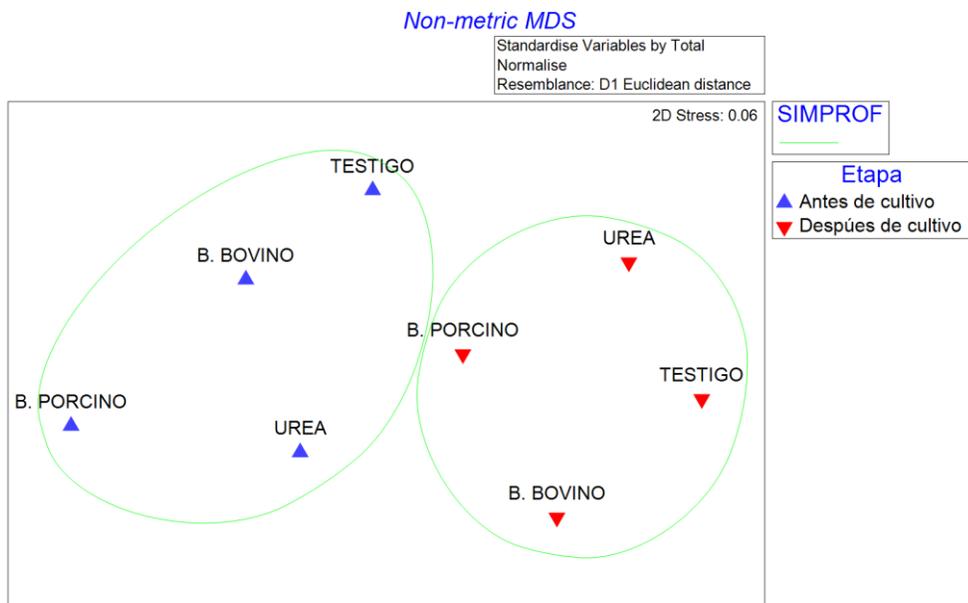


Figura 10. Resultados del estadístico nMDS de los análisis de suelo antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.

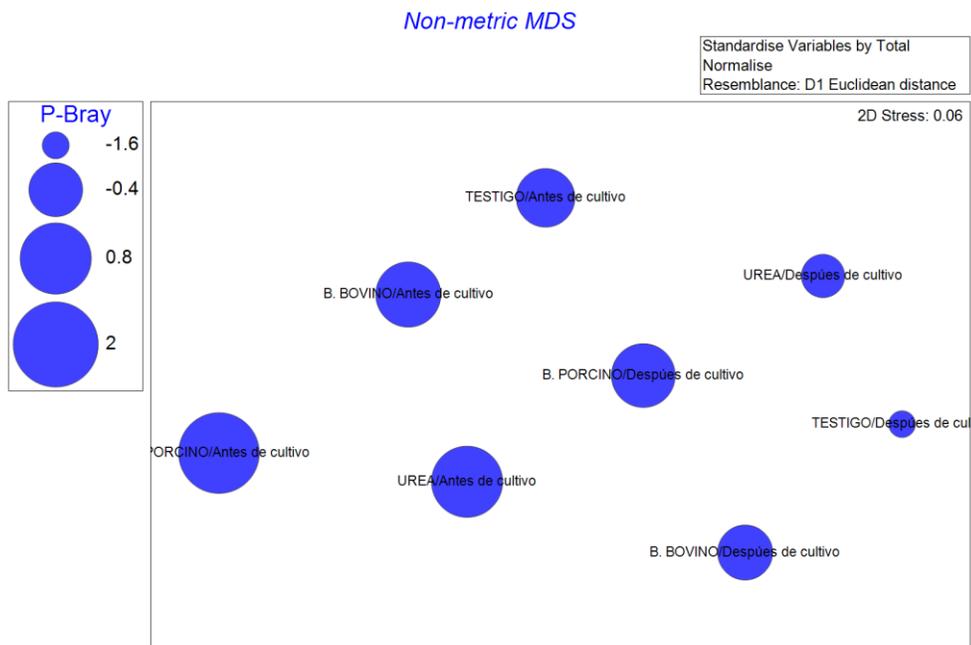


Figura 11. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de fosforo (P-Bray) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.

Las burbujas de los gráficos de los análisis que representan valores negativos, se deben a que los datos fueron estandarizados y normalizados por lo que el programa realiza ajustes para su representación.

En la figura 11, se puede observar que una disminución del fósforo después de la cosecha ya que el fósforo disponible fue aprovechado por la planta. En el suelo después de la cosecha se mantiene una buena concentración del fósforo con los tratamientos con biofertilizante bovino y porcino.

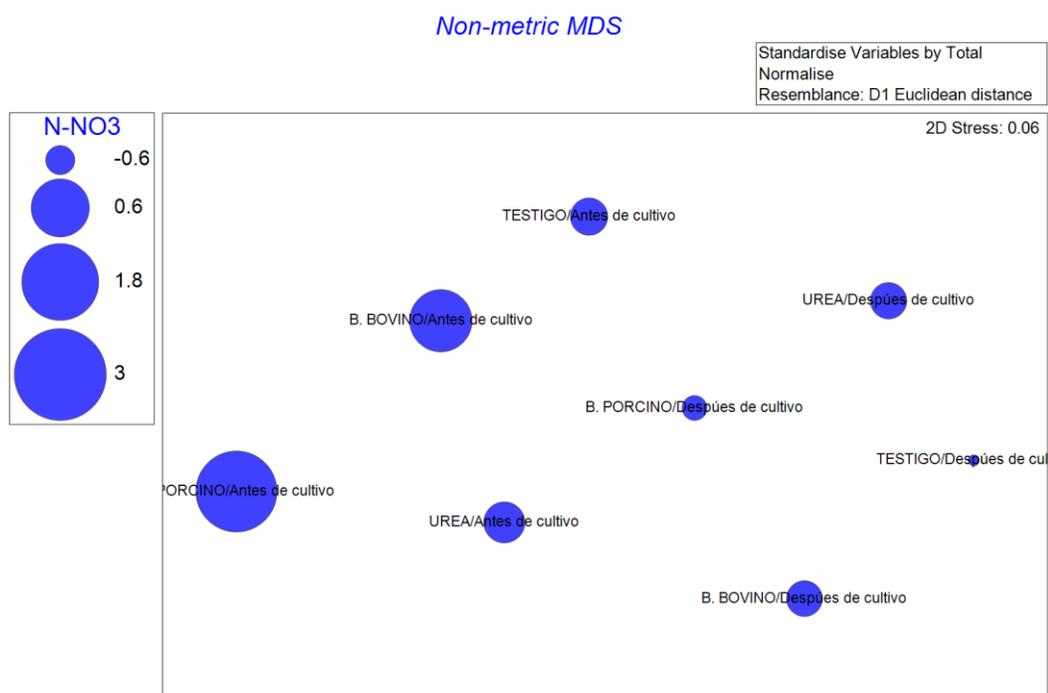


Figura 12. Análisis estadístico nMDS y gráfico de burbujas del contenido de nitrógeno (N-NO₃) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.

En la figura 12 a diferencia de lo que se observó en la figura anterior vemos bastante reducción del contenido de nitrógeno después de la cosecha; el testigo notoriamente fue el que termino con menos concentración de este elemento.

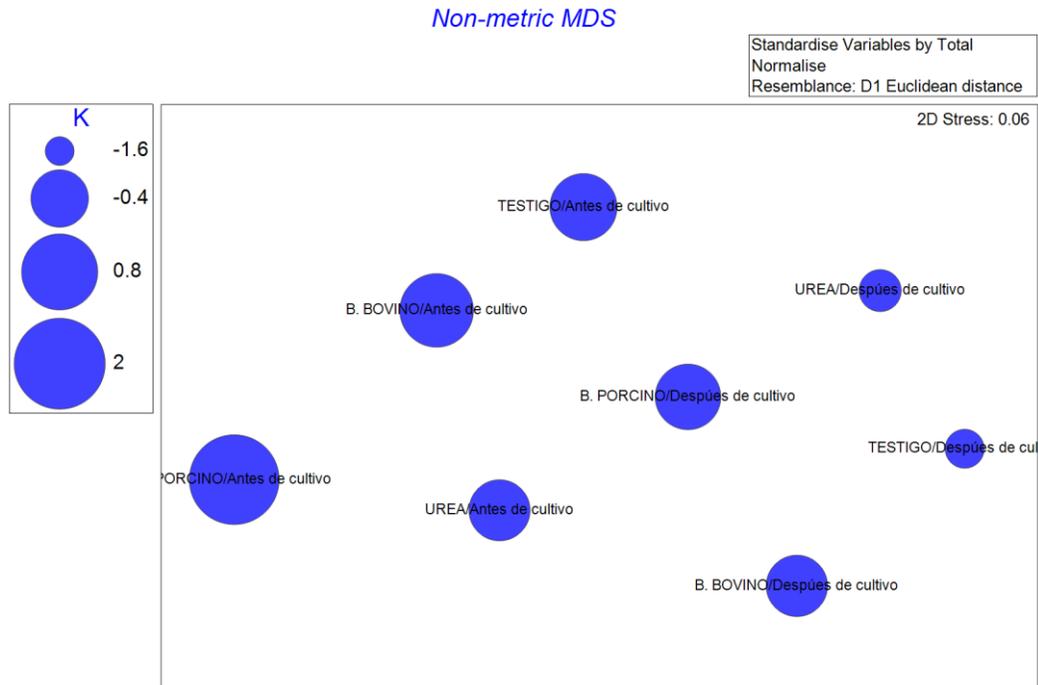


Figura 13. Análisis estadístico nMDS y gráfico de burbujas del contenido de potasio (K) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.

En la figura 13 se observa que para el caso del potasio, hay disminución de este nutriente después de la cosecha. En el suelo después de la cosecha tratados con los biofertilizantes, se observa una concentración de potasio similar al testigo antes de siembra.

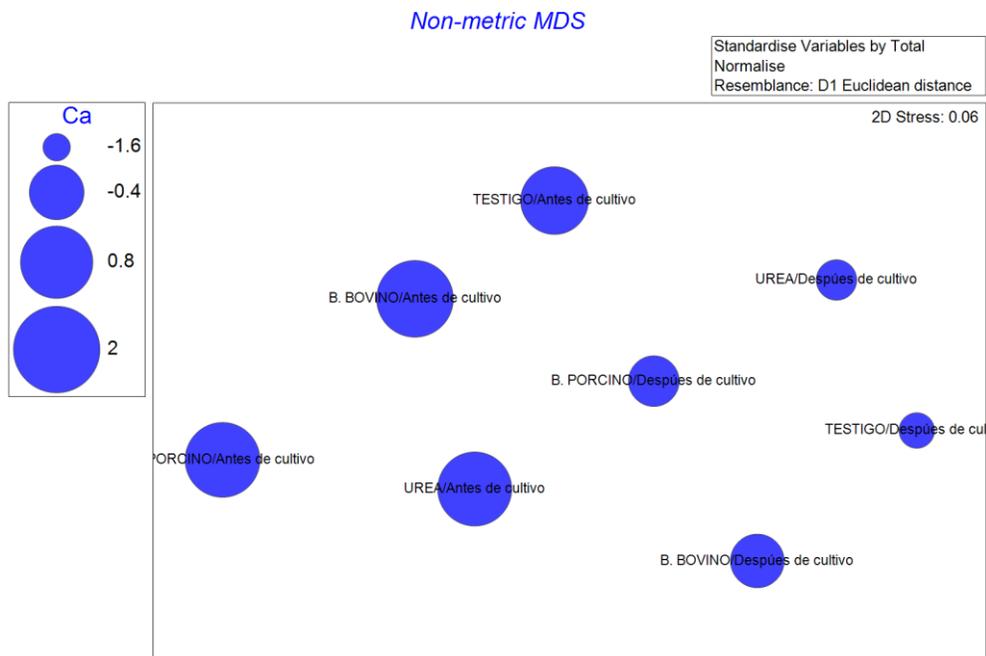


Figura 14. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de calcio (Ca) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.

Para el análisis del contenido de calcio en los suelos antes de siembra y después de la cosecha, se observa una disminución en todos los tratamientos, esto puede deberse a que los suelos de la región son deficientes en este elemento.

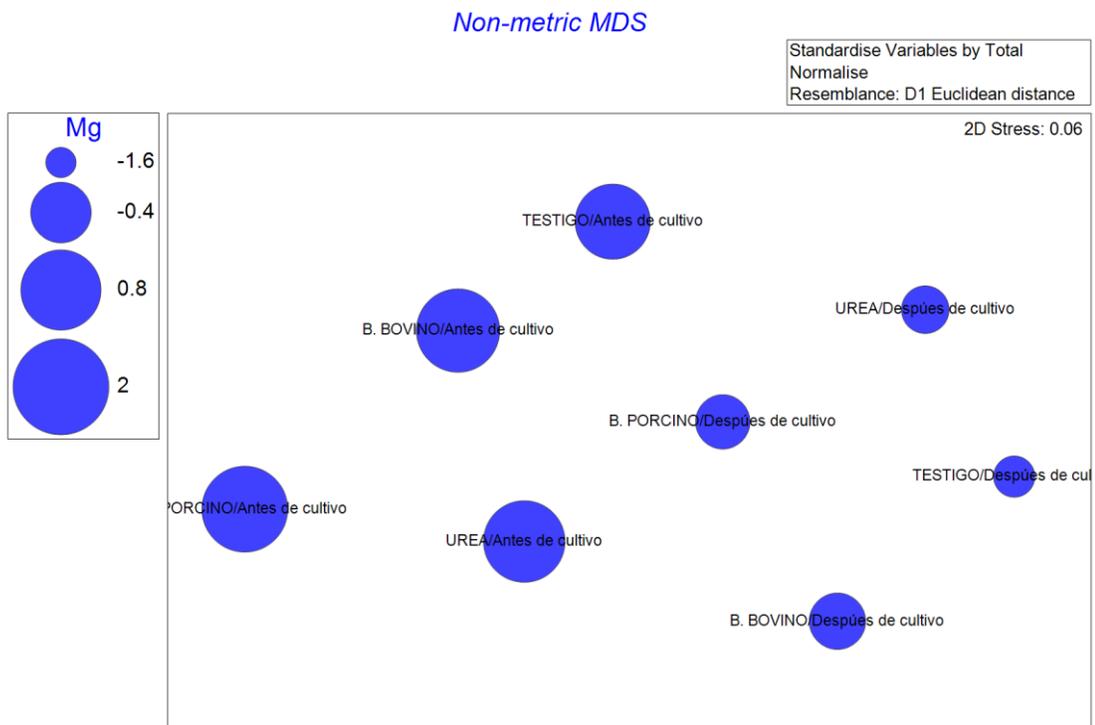


Figura 15. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de magnesio (Mg) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.

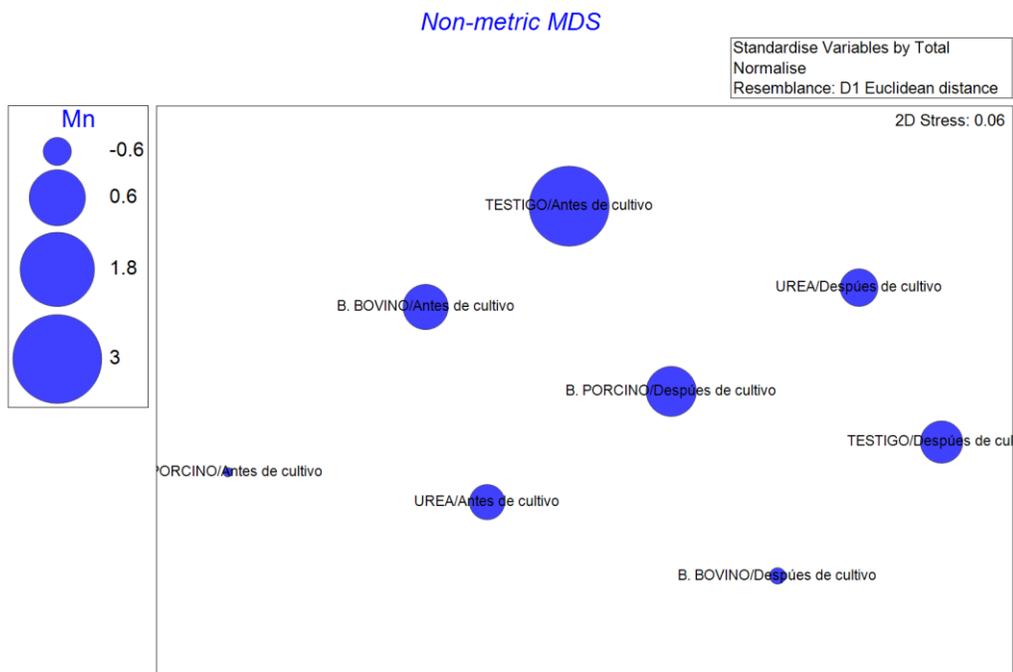


Figura 16. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de manganeso (Mn) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.

Contrario a los resultados anteriores, en la figura 16 con respecto al Mn, se puede observar que después de la cosecha el contenido de este nutriente aumenta en el suelo tratado con biofertilizante porcino y con urea, mientras que para el tratamiento con biofertilizante bovino y el tratamiento testigo disminuyó.

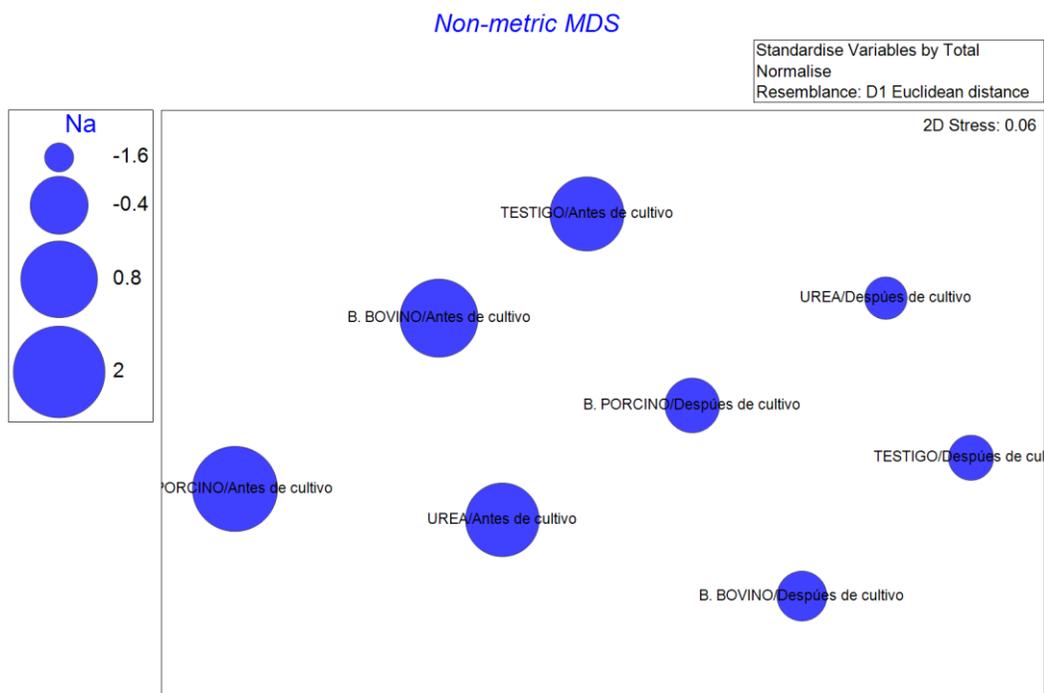


Figura 17. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de sodio (Na) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.

En el caso del Na, lo óptimo es tener una concentración baja, en el resultado del análisis de este nutriente, existe una disminución de este después de la cosecha en todos los tratamientos.

Non-metric MDS

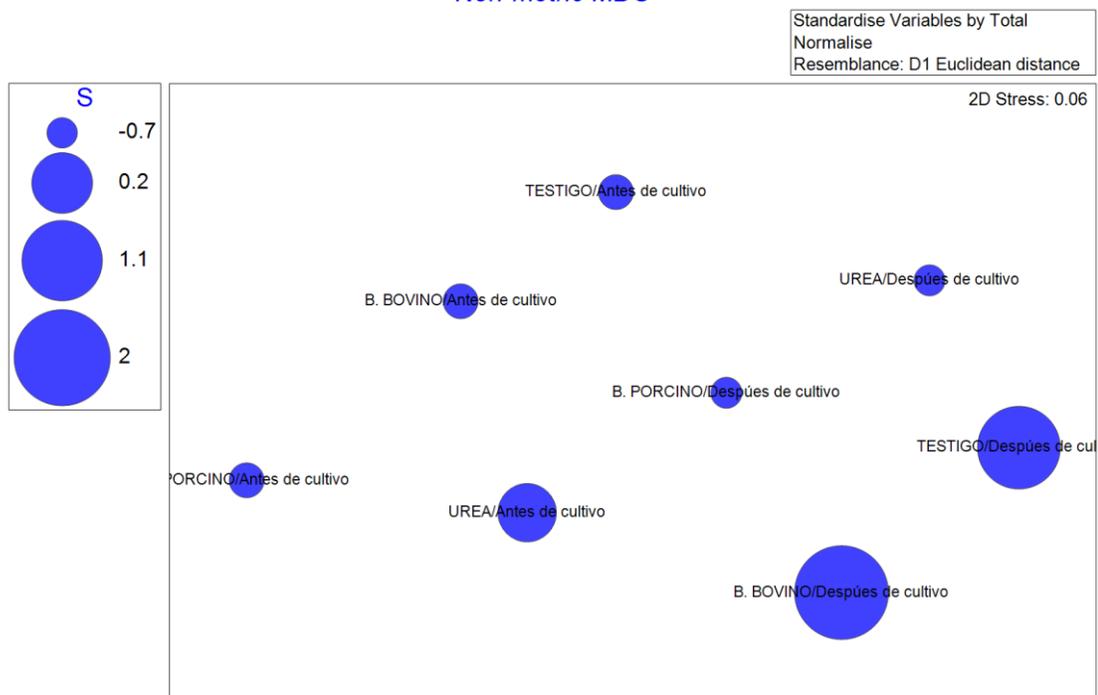


Figura 18. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de azufre (S) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.

En el tratamiento con biofertilizante bovino y el testigo, se observa que hubo un aumento en la concentración de S después de la cosecha, mientras que para el tratamiento con biofertilizante porcino y urea disminuyó.

Non-metric MDS

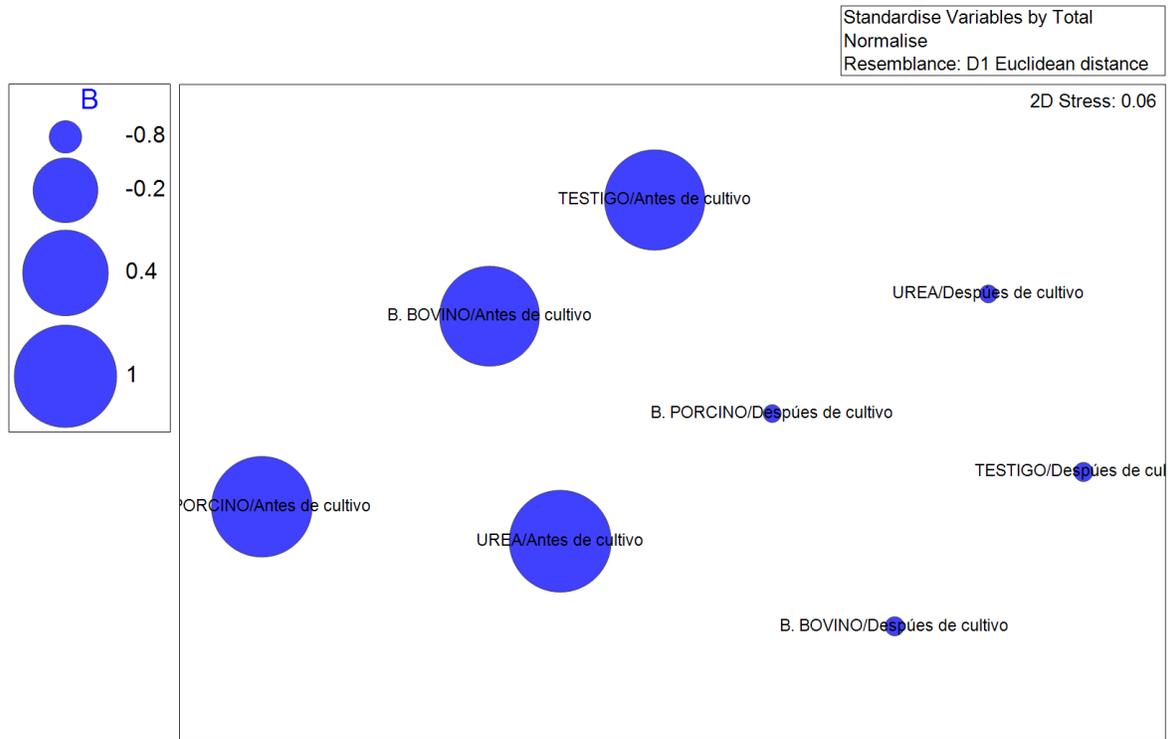


Figura 19. Análisis estadístico nMDS y gráfico de burbujas del contenido de boro (B) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.

Con respecto al contenido de B en los suelos analizados, se observa que este nutriente fue consumido en gran medida, por ello después de la cosecha se observan concentraciones mínimas.

Non-metric MDS

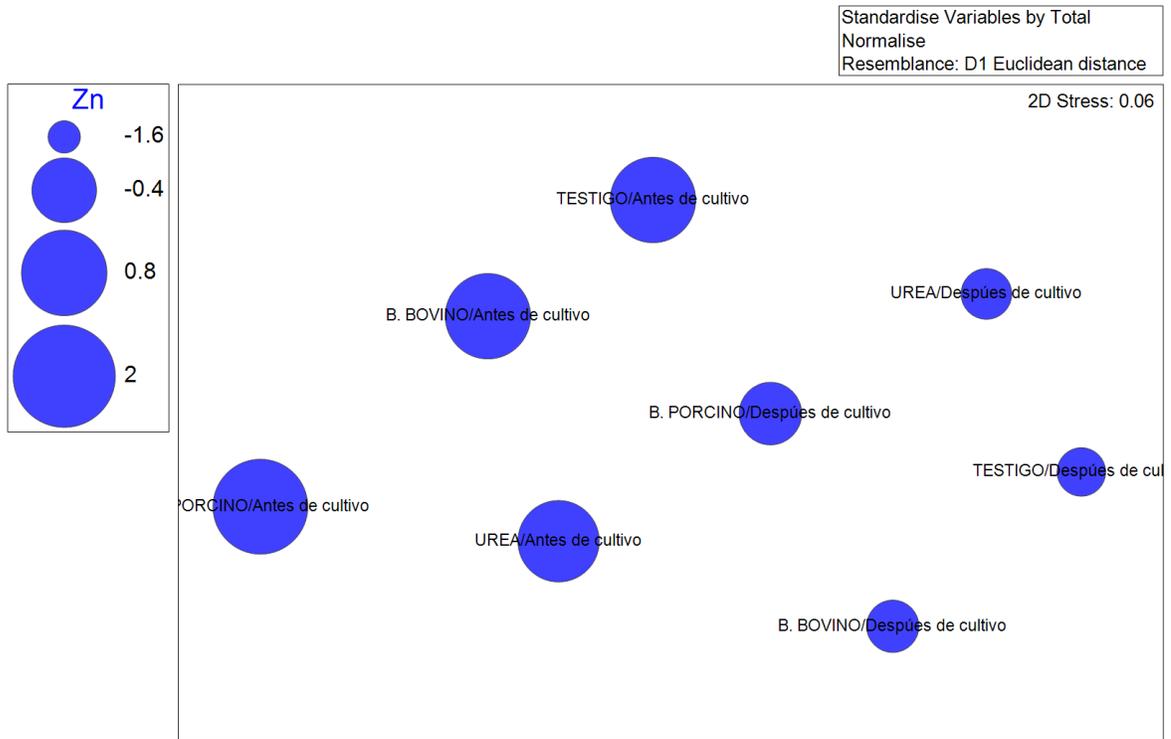


Figura 20. Análisis estadístico nMDS y grafico de burbujas del contenido de zinc (Zn) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.

Non-metric MDS

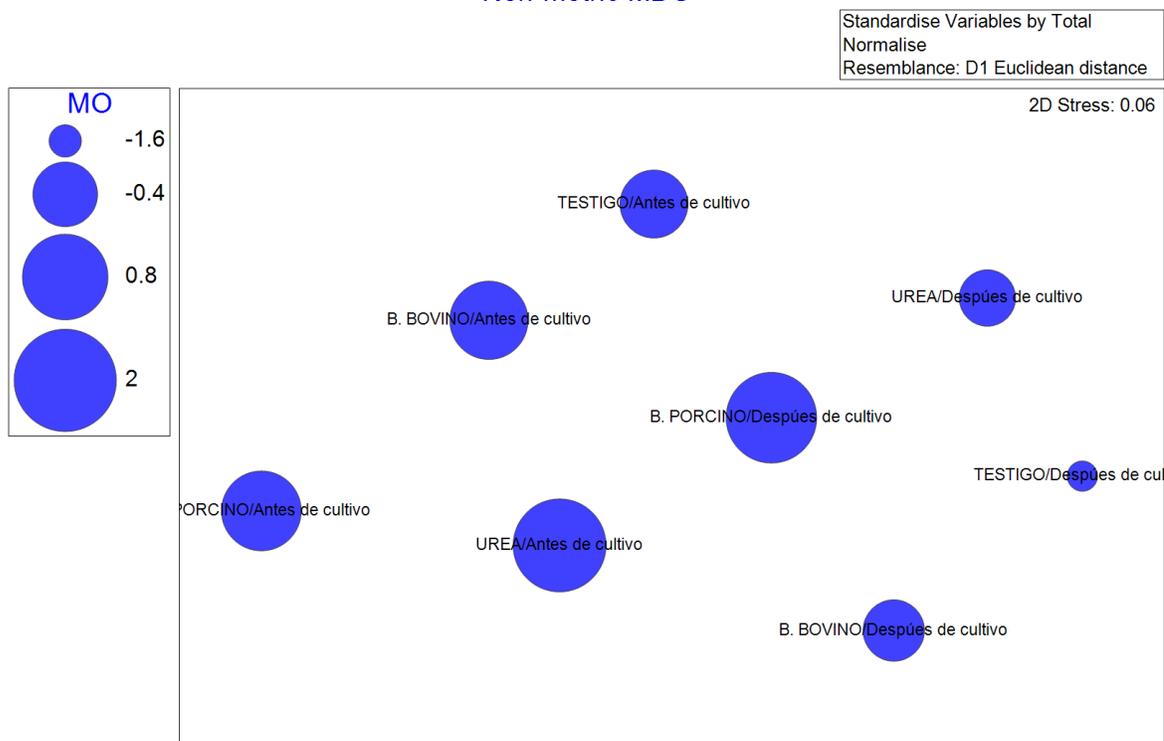


Figura 21. Análisis estadístico nMDS y gráfico de burbujas del contenido de materia orgánica (MO) en las muestras de suelo según tratamiento antes de siembra y después de cosecha del cultivo de frijol.

El contenido de materia orgánica presentó un aumento en el suelo tratado con biofertilizante porcino, mientras que existió una disminución de este en los demás tratamientos, como puede observarse en la figura.

5. CONCLUSION

Se concluye que la implementación de la digestión anaerobio para el tratamiento de las excretas pecuarias es una adecuada opción para la mitigación de la liberación del metano entérico a la atmósfera. El tiempo de retención celular de 30 días establecido para los biodigestores tipo Taiwán implementados en la Región Frailesca, resulta adecuado para la eliminación eficiente (95 %) de agentes patógenas presentes en las excretas pecuarias. La caracterización fisicoquímica y microbiológica de las excretas y biofertilizantes bovino y porcino, resaltan que la implementación de la tecnología de digestión anaerobia como tratamiento de las excretas bovina y porcina permite obtener un biofertilizante con altas concentraciones de nutrientes como el el fósforo y amonio fácilmente asimilable para las plantas.

En base a los resultados de la secuenciación del 16S ARNr en el estiércol bovino, el proceso de digestión anaerobia tiene una eliminación del 88.2 % de los patógenos que entran con el sustrato, además se encontraron bacterias benéficas que podrían ayudar en el enriquecimiento de la diversidad microbiana del suelo y con ello una mejora de la calidad a mediano y largo plazo.

De acuerdo al experimento en macetas, la respuesta del cultivo de frijol se vio favorecida con la aplicación de los biofertilizantes bovino y porcino, ya que las variables agronómicas como germinación, altura de planta, floración, y número de vainas en las plantas de frijol cuarentano se vieron afectadas positivamente.

La cantidad de nutrientes, así como el contenido de poblaciones de bacterias aerófilas y de interés agrícola presente en los biofertilizantes puede representar su uso potencial como estrategia para los procesos de regeneración de los suelos impactados por las actividades agropecuarias. Además, el uso de los biofertilizantes a partir de excretas pecuarias podría ser una opción viable para sustituir fertilizantes de uso local que beneficie a los productores rurales, y al mismo tiempo representa una estrategia potencial en la regeneración de los suelos impactados por las actividades agrícolas.

6. LITERATURA CITADA

- Acosta, Y. L., y Abreu, M. C. O. (2005). La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 39(1), 35-48.
- Alburquerque, J.; C. de la Fuente.; M, B. 2012. Chemicals properties of anaerobic digestates affecting C and N dynamics in amended soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 160:15-22.
- Alfa, M. I., Adie, D. B., Igboro, S. B., Oranusi, U. S., Dahunsi, S. O., y Akali, D. M., 2014. "Assessment of biofertilizer quality and health implications of anaerobic digestión effluent of cow dung and chicken droppings". *Renewable Energy*, vol. 63, pp. 681-686.
- Alvarado, J.; Puente, A.; Rubio, M. y Villarreal, F. 2017. La cadena de valor de embutidos y otras conservas de cerdo en México. Comisión Económica de Desarrollo Agrícola (CEPAL). Ciudad de México, México: 7-101.
- Arikan, O. A.; Mulbry, W., y Lansing, S. 2015. Effect of temperature on methane production from field-scale anaerobic digesters treating dairy manure. *Waste management*, 43, 108-113.
- Asmus, F.; Linke, B., & Dunkel, H. 1988. Eigenschaften und Düngerwirkung von ausgefaulter Gülle aus der Biogasgewinnung. *Archiv für Acker-und Pflanzenbau und Bodenkunde*, 32(8):527-532.
- Ayala Garay AVSchwentesi Rindermann R.Gómez Cruz M. Á.Almaguer Vargas G. (2016). Competitividad del frijol mexicano frente al Delaware Estados Unidos en un contexto Delaware liberalización comercial. *región y sociedad, Región y Sociedad*, vol. XX, núm. 42, mayo-agosto, 2008, pp. 37-62 10.22198
- Barrena, M.; W. Gosgot; C. Ordinola; J. Rascón & M. Huanes. 2019. Sistema de producción de biogás y bioabonos a partir del estiércol de bovino, Molinopampa, Chachapoyas, Amazonas- Perú. *Arnaldoa* 26 (2): 725-734.
- Acosta, Y. L., y Abreu, M. C. O. (2005). La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 39(1), 35-48.
- Bavera, G.A. y Peñafort, C.A. 2006. Lectura de la bosta del bovino y su relación con la alimentación. FAV UNRC. 9 pp.
- Brestic, M., and Zivcak, M. 2013. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. In: *Molecular Stress Physiology of Plants* (pp. 87-131). Springer India.
- Cabos, S.J.; C.B. Bardales; C.A. León; L.A. Gil. 2019. Evaluación de las concentraciones de Nitrógeno, Fósforo y Potasio del biol y biosol obtenidos a partir de estiércol de

- ganado vacuno en un biodigestor de geomembrana de policloruro de vinilo. ARNALDO. 26 (3): 1165- 1176.
- Camas G., R., A. Turrent F., J. I. Cortes F., M. Livera M., A. González E., B. Villar S., J. López M., N. Espinosa P. y P. Cadena I. 2012. Erosión del suelo, escurrimiento y pérdida de nitrógeno y fósforo en laderas bajo diferentes sistemas de manejo en Chiapas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3: 231-243.
- Campos, P.A.E. 2001. Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. Universidad de Lleida.
- Cano, H. M.; Bennet, E.A; Silva, G.E; Robles, G.S; Sainos, A.u; Castorena, G.h. 2016. Caracterización de bioles de la fermentación anaeróbica de excretas bovina y porcina. *AGROCIENCIA*, 50(4):471-647.
- Cendales, E.D. 2011. Producción de biogás mediante la cogestión anaeróbica de la mezcla de residuos cítricos y estiércol bovino para su utilización como fuente de energía renovable. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 9 p.
- Chauca, N. 2010. Propuesta para manejo sustentable de la ganadería en Santo Tomás - Región Amazonas. Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero Agroindustrial.
- Clarke, K.R., Gorley, R.N., Somerfield, P.J., Warwick, R.M. 2014. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 3rd edition. PRIMER-E: Plymouth.
- Comision Nacional del Agua (CONAGUA), 2016. Lineamientos Técnicos: Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales a Nivel Vivienda en Zona Rural. México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/152777/LINEAMIENTOS_TRATAMIENTO_AGUAS_NIVEL_VIVIENDA.pdf. [Consultado el 04 de febrero de 2022].
- Coté, C., Massé, D. I., y Quessy, S. 2006. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. *Bioresource Technology*, 97(4), 686-691.
- Creus, C.M., 2017. Inoculantes microbianos: Piezas de un rompecabezas que aún requiere ser ensamblado. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 207-209.
- Durazno, C.A.D. 2018. Valoración de estiércol bovino y porcino en la producción de biogás en un biodigestor de producción por etapas. Tesis profesional. Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca, Ecuador. P 74.
- Eastman, J., & Ferguson, J. 1981. Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase anaerobic digestion. *Wat Pollut Control Fed* (53), 352-366.

- Emmerling, Ch. and Barton, J. 2007. Anaerobic co-digestion of topinambour (*Helianthus tuberosus* L.) and properties of the remaining biogas manure. *Arch. Agron. Soil Sci.* **53**, 683—690.
- Erickson, M. C.; Liao, J.; Jiang, X.; y Doyle, M. P. 2014. Inactivation of pathogens during aerobic composting of fresh and aged dairy manure and different carbon amendments. *Journal of food protection*, 77(11), 1911-1918.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2007. Buenas prácticas para la industria de la carne. Fundación Internacional Carrefour. Roma:1-44.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2011. Manual de biogás. Global Environment Facility. 69-71
- Ferrer, P.J.; A.T. Seco. 2007. Tratamientos biológicos de aguas residuales. Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Valencia, España. pp. 111-112.
- Fleming, R., MacAlpine, M., English, S., 2006. Feasibility of Using Anaerobic Digestion and Composting to Recover Additional Value from Spent Mushroom Substrate. Univ. Guelph Prep. Can. Mushroom Grow. Assoc.
- Foged, H., Flotats Ripoll, X., Bonmatí Blasi, A., Palatsi Civit, J., & Magrí Aloy, A. 2012. End and by-products from livestock manure processing-general types, chemical composition, fertilising quality and feasibility for marketing.
- Fouda, S. 2011. *Nitrogen availability of biogas residues*. Doctoral dissertation. Technische Universität München.
- Galindo-Barboza, A. J., Domínguez-Araujo, G., Arteaga-Garibay, R. I., y Salazar-Gutiérrez, G. (2020). Mitigación y adaptación al cambio climático mediante la implementación de modelos integrados para el manejo y aprovechamiento de los residuos pecuarios. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11, 107-125.
- Gomero, Luis. 2005. Los Biodigestores Campesinos una Innovación para el Aprovechamiento de los Recursos Orgánicos. LEISA Revista de Agroecología.
- Hernández, J.H.; L. Corona. 2018. El metano y la ganadería Bovina en México: ¿parte de la solución y no del problema? *Agroproductividad*. 11(2):46-51.
- Hipólito-Romero, E., Carcaño-Montiel, M., Ramos-Prado, J., Vázquez-Cabañas, E., López-Reyes, L., y Ricaño-Rodríguez, J., 2017. Efecto de inoculantes bacterianos edáficos mixtos en el desarrollo temprano de cultivares mejorados de cacao (*Theobroma cacao* L.) en un sistema agroforestal tradicional del norte de Oaxaca, México. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 356-365.

- Hjorth, M.; Christensen, K. V.; Christensen, M. L. & Sommer, S. G. 2011. Solid–liquid separation of animal slurry in theory and practice. In *Sustainable Agriculture. Volume 2* (pp. 953-986). Springer, Dordrecht.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). <https://www.inegi.org.mx/app/buscador/default.html?q=villaflores+chiapas>. [Consultado el 04 de febrero de 2022].
- Jami, E y Mizrahi, I. 2012. Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. *PLOS ONE*. 7(3).
- Jarauta Rovira, L. 2005. Digestión anaerobia para el tratamiento de residuos orgánicos: estudio de las necesidades para la implantación en Perú.
- Jimenez-Peña, Y.; Valdés, L. A.; Vidal-Olivera, V.; Castro-Carrillo, M., y Moineda, A. 2014. Evaluación de efluentes anaerobios en el sector porcino no especializado de la provincia Ciego Ávila. *Rev Comput Prod Porc*, 21(3), 140-145.
- Johansen, A., Carter, M. S., Jensen, E. S., Hauggard-Nielsen, H., y Ambus, P, 2013. “Effects of digestate from anaerobically digested cattle slurry and plant materials on soil microbial community and emission of CO₂ and N₂O”. *Applied Soil Ecology*, vol. 63, pp. 36-44.
- Kataki, S., Hazarika, S., y Baruah, D., 2017. Assessment of by-products of bioenergy systems (anaerobic digestion and gasification) as potential crop nutrient. *Waste Management*, 59, 102-117.
- Klerks, M. M., Franz, E., van Gent-Pelzer, M., Zijlstra, C., & Van Bruggen, A. H. 2007. Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. *The ISME journal*, 1(7), 620-631.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., y Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of General 16S Ribosomal RNA Gene PCR Primers for Classical and Next-Generation Sequencing-Based Diversity Studies. *Nucleic Acids Res*, 41.
- López Dávila, E., Calero Hurtado, A., Gómez León, Y., Gil Unday, Z., Henderson, D., & Jimenez, J. 2017. Efecto agronómico del biosólido en cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*): Control biológico de *Rhizoctonia solani*. *Cultivos Tropicales*, 38(1), 13-23.
- Lopez, B.W.; Reynoso, R.S.; Lopez, M.J.; Camas, G.R.; Tasistro, A. 2018. Diagnóstico de la compactación en suelos cultivados con maíz en la Region Frailesca Chiapas. *Revista Mexicana de Ciencias Sgrícolas*. 9(1): 15.
- López, P y Antonio, C. 2006. Valoración del estiércol de cerdo a través de la producción de biogás. Bogotá, Colombia. [Consultado 15 de abril de 2020]. Disponible

- Marti, H. J. 2007. Experiencia de transferencia tecnológica de biodigestores familiares en Bolivia. *Livestock Research for Rural Development*. 19(12).
- Martí, J.H. 2008. Biodigestores familiares: Guía de diseño y manual de instalación. GTZ-Energía. Bolivia.
- Martí-Herrero, J. 2019. Experiencias Latino Americanas en la implementación de estrategias para democratizar los biodigestores entre pequeños y medianos productores agropecuarios: Aportes a Ecuador. Climate Technology Centre and Network (CTCN)-UNFCCC, Ecuador, pp. 19-20.
- Martínez-Aguilar, F. B., F. Guevara-Hernández, C. E. Aguilar-Jimenez, L. A. Rodríguez-Larramendi, M. B. Reyes-Sosa y M. A. La O-Arias. 2020. Caracterización físico-química y biológica del suelo cultivado con maíz en sistemas convencional, agroecológico y mixto en la Frailesca, Chiapas. *Terra Latinoamericana* 38: 871-881.
- Mateu, A.; Mata-Alvarez, J. y Parés, R. Enterobacterial and viral decay experimental models for anaerobic digestion of piggery waste. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992. 38:291–296.
- McAuliffe, G.; Takahashi, T.; Mogensen, L.; Hermansen, J.; Sage, C.; Chapman, D. y Lee, M. 2017. Environmental trade-offs of pig production systems under varied operational efficiencies. *Journal of Cleaner Production*. 165:1163-1173.
- McLaughlin, M. R.; Brooks, J. P. y Adeli, A. 2009. Characterization of selected nutrients and bacteria from anaerobic swine manure lagoons on sow, nursery, and finisher farms in the Mid-South USA. *Journal of environmental quality*, 38(6):2422-2430.
- Medina, V. y Solari, E.G. 1990. El Biol, Fuente de Fitoestimulante en el Desarrollo Agrícola. Programa Especial de Energía UMSS-TZ. Impresiones Poligráficas, Cochabamba, Bolivia.
- Mehnaz, S., y Lazarovits, G., 2006. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under -38- greenhouse conditions. *Microbiol Ecol*, 51(3): 326–335.
- Möller, K., & Müller, T. 2012. Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review. *Engineering in Life Sciences*, 12(3), 242-257.
- Montalbetti, A. 2009. Microbiología del rumen. España: El Cid Editor. Recuperado de <https://ebookcentral.proquest.com>. [Consultado el 13 de enero de 2022].
- Morazán-Nuñez, H. J. 2014. Emisión de amoníaco (NH₃) y gases con efecto invernadero (CH₄ y N₂O) en cerdos en crecimiento: efecto del nivel de proteína y fibra de la ración. Tesis Doctoral. Universitat de Lleida.

- Nelson, N. O.; Mikkelsen, R. L. & Hesterberg, D. L. 2003. Struvite precipitation in anaerobic swine lagoon liquid: effect of pH and Mg: P ratio and determination of rate constant. *Bioresource Technology*, 89(3): 229-236.
- Ortiz Solorio, C. A. 2019. Edafología. Trillas. Ciudad de México, México. ISBN: 978-607-17-3577-5.
- Ospina D., Sánchez O. y Montoya S. 2014. Estudio de características físico químicas y grupos de microorganismos durante el proceso de compostaje con y sin adición de roca fosfórica. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia, 87 pp.
- Özbek, A.; Michel Jr, F. C.; Strother, M.; Motiwala, A. S.; Byrum, B. R.; Shulaw, W. P. y Sreevatsan, S. 2003. Evaluation of two recovery methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR: direct-dilution-centrifugation and C18-carboxypropylbetaine processing. *FEMS microbiology letters*, 229(2), 145-151.
- Palacios, O. 2005. Evaluación de un Sistema Discontinuo de Biodigestión Anaerobia para el Tratamiento de Desechos avícolas. Venezuela. ISSN 0798-406.
- Pandey, P.; Chiu, C.; Miao, M.; Wang, Y.; Settles, M.; Del Rio, N. S.; Castillo, A.; Souza, A.; Pereira, R.; y Jeannotte, R. 2018. 16S rRNA analysis of diversity of manure microbial community in dairy farm environment. *PloS one*, 13(1).
- Pérez, E.R. 2008. El lado oscuro de la ganadería. Revista latinoamericana de economía. 39(154): 218-127.
- Pérez, P., y Viniegra, G., 2007. Potencial del uso de estiércol en la alimentación de bovinos. México: UNA.
- Pérez, P; Viniegra, G. 2007. Potencial del uso de estiércol en la alimentación de bovinos. México: UNA.
- Pérez, S.; Bautista, M.; Hernández, A., y Enríquez, J. 2017. Evaluación del potencial de generación de estiércol como materia prima para la producción de biogás en la zona Altamira, Tamaulipas. *Revista de Sistemas Experimentales*, 4(10), 34-40.
- Pinos, J.M.; J.C. García.; L.Y. Peña.; J.A. Rendón.; C. Gonzales.; L. Trisyán. 2012. Impactos y regulaciones ambientales del estiércol generado por los sistemas ganaderos de algunos países de América. *Agriciencia*. 46(4): 359-370.
- Pötsch, E. M. 2005. Nutrient content of fermentation residues from agricultural biogas systems and their utilization on permanent grassland. *Final report*, pp 32.
- Prieto-Cornejo M. R., J. A. Matus-Gardea, F. Gavi-Reyes, J. M. Omaña-Silvestre, J. J. Brambila-Paz, J. Sánchez-Escudero y M. Á. Martínez-Damián. 2019. Evolución de la superficie cultivada de frijol e impacto económico de la sequía sobre su

- rendimiento bajo condiciones de temporal en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 42:173- 182.
- Rojas-Herrera, R., Narváez-Zapata, J., Zamudio-Maya, M., y Mena-Martínez, M.E., 2008. A simple silica-based method for Metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Mol Biotechnol* doi: 10.1007/s12033-008-9061-8.
- Ruiz, M. A. (2013). Comportamiento Químico e Microbiológico no Biofertilizante tipo Supermagro. Tesis de maestría. Universidade de Brasilia. Facultad de Agronomía e Medicina Veterinaria. Brasília, Brasil.
- SAGARPA. 2004. Situación actual de la producción de leche de bovino en México 2004. Coordinación General de Ganadería. In: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg>. (Consultado 7 abril de 2020).
- Salazar, C; Pino, M. T. y Villagra, P. 2016. La emision de fluorescencia de la clorofila a: una herramienta para la deteccion del efecto del estres hidrico en el aparato fotosintetico de la papa. Santiago: Boletin INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 331.
- Sangerman, J. D.; Acosta, G. J.; Schwentesius, R. R.; Damián, H. M. Larqué, S. B. 2010. Consideraciones e importancia social en torno al cultivo del frijol en el centro de México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 1 (3): 363-380.
- Santin, E.B., 2017. Efecto de la aplicación de Biol en el cultivo de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedades Amadeus 77 y Dehoro, Zamorano Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/6191>. [Consultado el 28 de enero de 2022].
- SAS., 2008. SAS User's Guide: Statistics. Ver. 9.SAS Institute. Cary, N.C. 5180 p.
- Seleiman, M. F.; Selim, S.; Jaakkola, S., & Mäkelä, P. S. 2017. Chemical composition and in vitro digestibility of whole-crop maize fertilized with synthetic fertilizer or digestate and harvested at two maturity stages in boreal growing conditions. *Agricultural and Food Science*, 26(1): 47-55.
- SEMARNAT (Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2016. La degradación de los suelos en México. Los procesos que llevan a la desertificación. pp. 158-187. In: SEMARNAT. Informe de la situación del medio ambiente en México: compendio de estadísticas ambientales, indicadores clave de desempeño ambiental y de crecimiento verde. Edición 2015. SEMARNAT. Ciudad de México, México.
- Shirakawa Apac, A. Y. 2016. Evaluación del método de ensilado de excretas de cerdo en la generación de biogás y biol mediante biodigestores. Tesis profesional. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú. p. 104.

- Sistema BioBolsa. SISTEBIO. 2009. Manual de Biol. [En línea] *Sistema BioBolsa*. [Consulta: 20 de abril de 2021]. Disponible en: <http://sistemabiobolsa.com/pdf/manualDeBiol.pdf>.
- Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera. SIAP. 2020. Producción ganadera por estado. Chiapas. [tipo=0&anioRep=2016&entidadFed=30](#) [consultado el 26 de febrero de 2020].
- Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera. SIAP. 2021. Chiapas- infografía agroalimentaria 2021. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2021/Chiapas-Infografia-Agroalimentaria-202. [Consultado el 20 de enero de 2022].
- Soria, F.M.; Ferrera, C. R.; Etchevers, B.J.; Alcántar, G.G.; Trinidad, S. J.; Borges, G. L.; Pereyda, P. G. 2001. Producción de biofertilizantes mediante biodigestión de excreta líquida de cerdo. *Terra Latinoamericana*. 19(4):353-362
- Suquilanda, M. 2006. Agricultura orgánica alternativa tecnológica del futuro. Quito.
- Tasistro, A. 2012. Uso de líneas límite para el diagnóstico de campo y la investigación agrícola-avances en México. *Informaciones Agronómicas de Hisoanoamérica*. 5(20):17-20.
- Torres, J.F. 2016. Diseño de un biodigestor para la producción de biol a partir de excretas de ganado vacuno generado en la finca “La Envidia” parroquia la belleza cantón Francisco de Orellana coca. Tesis profesional. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. Riobanba, Ecuador. 90 p.
- Weiland, P. 2006. Biomass digestion in agriculture: a successful pathway for the energy production and waste treatment in Germany. *Eng. Life Sci*. 6: 302-309.
- Yu, F., Luo, X., Song, C., Zhang, M., Shan, S. 2010. Concentrated biogas slurry enhanced soil fertility and tomato quality. *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci*. 60, 262– 268.