

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**MODIFICACIÓN DE LA RELACION CARBONO/NITRÓGENO,
UTILIZANDO UREA EN LA BIODEGRADACION DE PULPA DE
CAFÉ, POR LA ACCIÓN DE FLUIDO RUMINAL**

PRESENTADO POR

LUIS MANOLO SIERRA MÉNDEZ

PARA OPTAR AL TÍTULO DE

QUÍMICO BIÓLOGO

Guatemala. Marzo 2,001

**PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central**

DL

06

T(2120)

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Decana: Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta.

Secretario: Lic. Oscar Federico Nave Herrera.

Vocal I: Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto.

Vocal II: Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda.

Vocal III: Dr. Federico Adolfo Richter Martinez.

Vocal IV: Br. César Alfredo Flores López.

Vocal V: Br. Manuel Aníbal Leal Gómez.

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

Por haberme creado y darme la dicha de sentir su amor.

A MIS PADRES

MARTA LIDIA MENDEZ CONDE
JOSE RAMON SIERRA CHAVEZ

Gracias por su amor, comprensión y apoyo en todo momento.

A LA SEÑORA

LIRIA ARLETA DE SIERRA

Por hacerme sentir parte de su vida, y darme el cariño de Madre.

A MIS ABUELITOS

DELIA DE MENDEZ (Q.E.P.D)
CANDIDO MENDEZ (Q.E.P.D)
ANTONIA DE SIERRA.

Por su amor y cariño.

A MI HIJO

LUIS PABLO SIERRA MENDEZ

Por su ternura y cariño.

A MIS HERMANOS

SANDRA, ARMANDO, ANABELLA, JORGE, RONI,
GUAYO, MARIBEL Y CORY.

Gracias por su apoyo.

A MIS SOBRINOS

Gracias por su cariño.

A MIS CUÑADOS

En especial a:

Por su apoyo.
IVONNE DE SIERRA

Por darme mucho apoyo y cariño.

A MI FAMILIA EN GENERAL

Con respeto y agradecimiento.

A MIS AMIGOS

Gracias.

En especial a: Bayron Lara, Edwin, Estuardo, Bayron, Lish, Indira, Mirsha,
Olga, Familias: Abascal-Carcamo, Camping-Corado, De La Roca-Gonzalez,
Castellanos- Dardón.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA.

AL LIC. CARLOS KLEE MENDOZA, POR SU ASESORIA.

AL HOSPITAL HERRERA LLERANDI Y LABORATORIO CLINICO AMEDESUA.

AL LIC. EDWIN MUÑOZ ESPINOZA; POR SU APOYO Y SU AMISTAD.

INDICE

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. ANTECEDENTES	3
4. JUSTIFICACIÓN	10
5. OBJETIVOS	11
6. HIPÓTESIS	12
7. MATERIALES Y MÉTODOS	14
8. RESULTADOS	17
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	19
10. CONCLUSIONES	21
11. RECOMENDACIONES	22
12. REFERENCIAS	23
13. ANEXOS	28

1. RESUMEN

Debido a que la pulpa de café y el material ruminal, son desechos orgánicos que se obtienen en grandes cantidades en nuestro país, estos podrían ser utilizados eficazmente para la elaboración de un reacondicionador del suelo; el procedimiento orgánico mejora las propiedades fisicoquímicas de los suelos. Para que esto ocurra es necesario que el material orgánico se encuentre susceptible a la biodegradación; por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar la mejor relación C/N utilizando urea y líquido ruminal, para la biodegradación de la materia orgánica, aprovechando la diversidad de microorganismos celulolíticos que posee el rumen; modificando inicialmente la relación carbono / nitrógeno del sustrato (pulpa de café), y lograr así, un mejor reacondicionador.

Se tomó como base el sustrato establecido por Valvert C.(1) (ver anexo No. 7); constituido por pulpa de café y fluido ruminal de vaca; modificando la relación de carbono / nitrógeno en 10, 15, 20, 25, y 30; utilizando urea como fuente de nitrógeno e incubando a 35 °C por 14 días.

Como indicativos de la biodegradación se estudiaron las variables: materia orgánica fácilmente oxidable, fosfato soluble, cenizas, nitrógeno orgánico y amoniacal.

Los resultados obtenidos demostraron que la mejor relación C/N para lograr la biodegradación de la materia orgánica, es la de 20; Influído principalmente por el pH y la disponibilidad de nitrógeno, aumentando en promedio 3 veces la materia orgánica fácilmente oxidable, en relación a la contenida en el grupo de control. El análisis estadístico reveló diferencia significativa ($p > 0.05$) entre muestras y controles.

2. INTRODUCCION

En Guatemala, los consumidores de fertilizantes agrícolas afrontan cada día el aumento en los precios de los insumos necesarios para la explotación de la tierra.

Por tal razón, se han buscado fuentes complementarias para suplirlos, mencionándose el empleo de abonos orgánicos y el uso de microorganismos fijadores de nitrógeno. De éstos dos, a los primeros se les ha dado mayor importancia, existiendo ya empresas productoras de gallinaza para la distribución a los agricultores.

Por estas razones, los residuos orgánicos agrícolas deben recibir la importancia que merecen, ya que constituyen una fuente alternativa de energía renovable, fuente de mejoramiento del medio ambiente y de la productividad de la tierra. En Guatemala se generan gran cantidad de residuos agrícolas; como la paja de trigo, pulpa de café, bagazo de caña de azúcar, desechos domésticos, etc., que se pierden como tales.

Actualmente, algunos de estos residuos ya están siendo procesados en aboneras, mezclándolos con estiércol de ganado vacuno o equino, para que la microbiota de éstos, acelere el proceso de degradación de los residuos agrícolas y puedan ser usados como reacondicionadores de suelos.

En el presente trabajo se determinó el efecto de la variación de la relación C/N en la degradación de la materia orgánica, para lo cual se analizaron por triplicado muestras de reacondicionador a base de pulpa de café, fluido ruminal, urea y agua; después de ser incubadas a 35 °C/14 días, y cuyas relaciones C/N se modificaron inicialmente en: 10, 15, 20, 25 y 30.

Este estudio contribuye a mejorar la técnica aplicada en la degradación de la materia orgánica, empleando bacterias capaces de transformarla.

3. ANTECEDENTES

3.1 SITUACION DE LOS DESECHOS ORGANICOS EN GUATEMALA

En Guatemala se cuenta con una variedad de subproductos orgánicos. Los desperdicios, se pueden clasificar dependiendo de su origen de la siguiente forma:

a) Agroindustriales subproductos de caña de azúcar, café, cacao, trigo, etc.; b) Pecuarios: Estiércol ovino, bovino, equino, porcino y gallinaza; c) Municipales: residuos sólidos urbanos y rurales, aguas negras (2, 3).

En la evolución de la sociedad desde la vida primitiva hasta la fecha, los desechos o desperdicios han constituido un problema grave para nuestro medio ambiente. Uno de los principales problemas ocasionados por los desechos sólidos, como la basura, es la contaminación del ambiente, tanto en las ciudades como en sus alrededores cuyos efectos negativos son bastantes evidentes. La contaminación, ocasionada por los desechos orgánicos animales o vegetales, provoca un aumento en la prevalencia de enfermedades, incrementando el número de vectores, principalmente por las aguas negras no tratadas (4, 5, 6).

Algunos de los desechos anteriormente mencionados son reutilizados por el agricultor por forma independiente o en mínima relación, para la obtención de abonos, producción de energía y reconstructores de suelos (4).

En nuestro país, no existe suficiente información que aporte datos cuantitativos respecto a la producción total de residuos sólidos que generan las diversas industrias, entre ellas la agroindustria. Sin embargo, los desechos orgánicos han sido motivo de estudio de muchos países, en donde se menciona diversidad de compuestos que pueden utilizarse como abonos orgánicos, que por su contenido de nitrógeno, carbono, fósforo y potasio son considerados de gran importancia (7, 8).

3.2 PROCESO PARA LA ELABORACION DEL COMPOST

3.2.1 UTILIZACION DE OXIGENO:

Se considera dos divisiones: compostaje aeróbico y compostaje anaeróbico, estos términos tienen un significado relativo, indican las condiciones predominantes en el proceso.

El compostaje aeróbico se caracteriza por una rápida descomposición a cargo de bacterias aeróbicas presentes con la consecuente liberación de una gran cantidad de energía en forma de calor a causa de la oxidación del carbono orgánico a dióxido de carbono.

En el compostaje anaeróbico el oxígeno libre es incluido de la masa de compostaje, por acción de microorganismos anaeróbicos. Este proceso se caracteriza por realizarse a temperaturas mesófilas y termófilas (9, 10).

3.2.2 TEMPERATURA:

Actúa tanto en la velocidad de crecimiento de los microorganismos como en la reacción química. Los rangos óptimos de temperatura para los mesofílicos están entre 15 y 40°C y para los termofílicos entre 45 y 65°C.

3.3 MICROBIOLOGIA DEL COMPOSTAJE

Durante el proceso de composteo interviene una gran cantidad de microorganismos, pudiendo ser más de cien especies distintas, dependiendo del rango de temperatura en que se desarrollen (psicrófilos, mesófilos y termófilos).

Al comenzar el compostaje la temperatura de la masa es igual a la del medio y el pH es ligeramente ácido, los microorganismos mesófilos rápidamente empiezan a multiplicarse y la temperatura se eleva causando una disminución inicial de pH. Cuando la temperatura sube a más de 40 °C, la actividad de los microorganismos mesófilos decae y el proceso de degradación es continuado por los microorganismos termófilos, el pH se torna alcalino produciéndose una liberación de amoníaco (11, 12).

En el compostaje aeróbico interviene una mayor cantidad de bacterias que en el compostaje anaeróbico (13,14).

3.4 FACTORES QUE AFECTAN EL PROCESO DE COMPOSTAJE

Debido a que el compost es un proceso biológico, los factores del medio ambiente tienen influencia en la actividad de los microorganismos, los más importantes son: 1) el tamaño de la partícula del material, 2) concentración de cada desecho de la mezcla de reacción 3) concentración iones de hidronio, 4) temperatura y 5) relación carbono / nitrógeno del desecho para el compostaje entre 25-20:1 y para el compost ya terminado de 14-20:1 (15,16).

3.5 CARACTERISTICAS DE LA MATERIA ORGANICA DEL SUELO

3.5.1 IMPORTANCIA DEL SUELO

La materia orgánica es una porción importante del suelo, que generalmente en regiones cultivadas se encuentran en una concentración del 1 al 5 por ciento en los primeros 25 centímetros de la capa superficial de la tierra (6).

La materia orgánica es fuente de la mayor parte del nitrógeno, fósforo, azufre, boro y molibdeno; elementos que constantemente sufren cambios y deben ser reemplazados continuamente para mantener la productividad del suelo (8, 17, 18).

3.5.2 COMPOSICION DE LA MATERIA ORGANICA

Todo organismo vivo o muerto, agregado al suelo, llega a ser parte de la materia orgánica. La mayor parte de la materia orgánica es conformada por la degradación de raíces y partes aéreas de las plantas (18).

Está constituida aproximadamente por 58 por ciento en peso de carbono, hidrógeno, oxígeno y otros elementos en menores cantidades. Los átomos de carbono unidos entre sí constituyen el esqueleto básico de la materia orgánica(19, 20, 21).

3.5.3 DESCOMPOSICION DE LA MATERIA ORGANICA

Algunos microorganismos como bacterias y hongos, obtienen nutrientes y energía, descomponiendo la materia orgánica del suelo, lo cual origina el uso de carbono, agua y algunos elementos; liberando dióxido de carbono, agua y algunos elementos a la solución del suelo o la atmósfera; y contribuye a la formación del humus (19).

Es un hecho que tanto las bacterias como los hongos trabajan óptimamente en suelos húmedos, siendo las bacterias las más efectivas para la degradación del material vegetal. Las bacterias utilizan aproximadamente el 70 por ciento del nitrógeno presente en los materiales de desechos animales de establo; además, la concentración de nitrógeno presente en el suelo controla la velocidad de degradación de la materia orgánica, ya que éste se usa para la producción de proteína en nuevas colonias de bacterias y hongos (20, 22).

El contenido de nitrógeno en microorganismos y materiales orgánicos esta en proporción al contenido de carbono; esta relación se denomina carbono-nitrógeno (C/N). La cantidad de microorganismos presentes en el suelo, esta limitada por condiciones en donde la

disponibilidad de nitrógeno es baja (20, 22, 23). Además, la descomposición se puede acelerar agregando fertilizantes nitrogenados para suplir las necesidades de los microorganismos y plantas (24).

3.6 CELULOSA

Un importante constituyente carbonado de las plantas y probablemente el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza, es la celulosa; pues gran parte de la vegetación tiene estructura celulósica, que en determinado momento se usará para formar parte del suelo (19, 25). La celulosa es un carbohidrato compuesto de unidades de glucosa, las cuales están unidas por enlaces Beta en los átomos de carbono 1 y 4 y dos moléculas de la unidad estructural glucosa, dando como resultado el disacárido celobiosa. La descomposición de este carbohidrato tiene importancia en el ciclo biológico del carbono. Como resultado de esto, se ha dado gran importancia y atención a los microorganismos que participan en la descomposición de la misma (19, 20).

3.7 MICOORGANISMOS CELULOLITICOS

Han y Callihan, encontraron que en regiones donde la concentración de nitrógeno es mayor de la necesaria, la descomposición de la celulosa no responde a estos incrementos suplementarios; lo que demuestra que se requiere aproximadamente 1 unidad de nitrógeno por cada 35 unidades de celulosa oxidada, y que 3 partes de nitrógeno se incorporan al protoplasma microbiano por cada 100 partes de celulosa que se descompone (25, 26).

En estudios realizados por Van Gylswyk y colaboradores, se encontró que de cada muestra analizada de material ruminal, había un promedio de cinco bacterias con actividad celulolítica comprobada, y dependiendo de la dieta administrada a cada animal, variaba el número de bacterias con dicha actividad (27).

La actividad celulolítica mostrada por gran diversidad de microorganismos, se debe a la presencia del complejo enzimático [1,4-(1,3:1,4)-B-D-glucan 4-glucanhidrolasa], cuya actividad se estimula por el aumento de la concentración de fosfatos, en presencia de bacterias ruminales (28, 29). (Ver anexo No. 8)

Se tienen datos sobre el alto grado de actividad celulolítica de bacterias ruminales, por determinación de la pérdida de peso en fibras de algodón, al ser incubadas con fluidos del

rumen a diferentes valores de pH; evidenciando de esta forma la actividad celulolítica y demostrando además, que la velocidad de descomposición de la materia orgánica es proporcional a la concentración del nitrógeno presente en el suelo (24, 30).

3.8 UTILIZACION DE LOS DESECHOS VEGETALES

La materia orgánica proveniente de desechos vegetales favorece la producción de buenas condiciones físicas del suelo, aumenta la capacidad de retención de agua, el intercambio de iones y la disponibilidad de nitrógeno, fósforo y potasio a través de la mineralización (31).

La utilización de desechos vegetales ha sido practicada en Guatemala desde hace muchos años. La pulpa de café, por ejemplo; ha sido utilizada como abono orgánico aplicado directamente a los cafetales, así como en la preparación de almácigos. El contenido de nitrógeno en la pulpa de café es tres veces más alto que en el abono de establo, y de dos a siete veces mayor en potasio. El resultado de estas investigaciones favorece su uso como abono para los cafetales (32).

La pulpa de café, además de servir como abono en la agricultura, se utiliza como alimento para animales, combustión y producción de biogás. Uno de los objetivos de la industrialización de los desechos provenientes de sub productos del café, lo constituye el darle mayor valor agregado a la producción, la tierra, el ser humano y la tecnología (33, 34).

El empleo de bagazo de citronela y de té de limón, como cobertura y abono para algunos cultivos en varios lugares de la república, son buena fuente de nitrógeno, así como de otros elementos importantes para las plantas; además de impartirle características importantes al suelo (35, 36).

3.8 UTILIZACION DE DESECHOS ANIMALES

Los abonos orgánicos han venido usándose desde tiempos remotos, principalmente como estiércol fresco y continuarán utilizándose en tanto el hombre mantenga una explotación agropecuaria. El valor del estiércol como abono, depende de factores importantes como: tipo de alimento consumido por el animal, origen y procedencia del estiércol, edad del estiércol, y por último; el método de aislamiento o almacenamiento. El abono viejo biodescompuesto contiene nutrientes más fácilmente utilizables que el estiércol recientemente depuesto (37).

Todos los animales herbívoros tienen una porción dilatada en su tubo digestivo donde los alimentos fibrosos y voluminosos que forman una gran proporción de su dieta, pueden ser detenidos y sufrir fermentación, la cual es necesaria para su aprovechamiento. En los rumiantes, esta porción dilatada está representada por el rumen, que es un pre-estómago complejo. A medida que crece el rumen, va estableciéndose una población mixta de bacterias y protozoarios y una gran variedad de microorganismos. La proporción de cada tipo depende de la dieta del animal (38, 39).

El rumen y su fluido pueden ser considerados como una gran cámara de fermentación, que proporciona el medio conveniente para el cultivo continuo de la población microbiana (39, 40). Además, es un sistema anaerobio en un medio ligeramente ácido y en una fase gaseosa compuesta principalmente de bióxido de carbono, metano y nitrógeno. En este medio se forma una población microbiana muy especializada (40, 41, 42).

3.10 COMPONENTES QUIMICOS DE VALOR AGRONÓMICO

Muchos elementos son necesarios para el desarrollo saludable de las plantas. Algunos han sido llamados esenciales ya que son requeridos en gran cantidad, mientras que otros en cantidades pequeñas (21, 43, 44,).

El nitrógeno posee una enorme importancia entre los elementos esenciales ya que los componentes nitrogenados comprenden del 40 a 50 por ciento de la materia orgánica seca del protoplasma, por esta razón el nitrógeno es requerido en cantidades relativamente grandes para los procesos de crecimiento. El nitrógeno está íntimamente ligado a la actividad de los organismos del suelo; y es absorbido normalmente por las plantas en forma de nitrato (43,45).

Los suelos cubiertos por pastos y/o leguminosas se vuelven más ricos en nitrógeno; mientras, los que son continuamente cultivados agotan sus suplementos de nitrógeno. Es de mencionar que muchos suelos han sido explotados hasta el punto que el nitrógeno orgánico en condiciones naturales casi ha desaparecido (31, 43, 45).

En cuanto al fósforo, se encuentra íntimamente ligado con el crecimiento de las plantas involucrado en muchas reacciones bioquímicas en las cuales los componentes fosforados actúan como intermediarios. Su efecto amortiguante es bastante notorio en las plantas para la regulación de la acidez. El fósforo existe en el suelo en muchas formas, tanto como

compuestos orgánicos como inorgánicos, y su disponibilidad se ve limitada por la presencia de poderosos fijadores de fosfatos como calcio, aluminio y hierro (32, 45).

Otro elemento importante es el potasio, que contribuye en la formación de carbohidratos, proteínas y regula el contenido de agua en las células. Por otro lado el calcio, está relacionado con la actividad de crecimiento y tiene especial importancia en el desarrollo de la raíz. Por último; el magnesio es un constituyente de la clorofila e interviene como el activador más efectivo de las reacciones enzimáticas (43, 45, 46).

4. JUSTIFICACION

Siendo la pulpa de café y el material ruminal, desechos orgánicos que se obtienen en grandes cantidades en nuestro país, estos podrían ser utilizados eficazmente para el reacondicionamientos de suelos; por lo que se considera de importancia realizar un estudio que permita el aprovechamiento de la actividad celulolítica bacteriana del material ruminal de bovinos, sobre la pulpa de café, variando la relación carbono-nitrógeno en 10,15,20,25,30; mediante el uso de urea como fuente nitrogenada para la biodegradación de la celulosa de la pulpa de café, y lograr así materiales útiles para la agricultura, de bajo costo y reduciendo considerablemente la contaminación del medio ambiente.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Modificar la relación carbono / nitrógeno (C/N), utilizando urea en la biodegradación anaeróbica de pulpa de café por la acción de fluido ruminal.

5.2 Objetivos Específicos

5.2.1 Determinar la relación carbono / nitrógeno del reacondicionador obtenido, a través de las determinaciones de nitrógeno, carbono, fósforo, materia orgánica y cenizas.

5.2.2 Establecer la concentración adecuada de urea, como agente modificador de la relación carbono / nitrógeno para el mejoramiento de un reacondicionador de suelo, a partir de pulpa de café y fluido ruminal.

6. HIPOTESIS

La variación de la relación carbono / nitrógeno en el sistema (anaeróbico) pulpa de café y fluido ruminal, acelera la biodegradación del mismo; obteniéndose un reacondicionador de suelos de mejor calidad.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO

El universo estuvo constituido por pulpa de café, como desecho vegetal; fluido ruminal de vaca, como desecho animal, como agente biodegradador y urea como modificador de la relación carbono / nitrógeno. Se analizaron 18 muestras que fueron sometidas a una temperatura de 35°C y un tiempo de 14 días.

7.2 RECURSOS HUMANOS

- Luis Manolo Sierra Méndez (investigador).
- Lic. Carlos Klee Mendoza (Asesor).

7.3 RECURSOS INSTITUCIONALES

- Biblioteca del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP).
- Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (USAC).
- Biblioteca de la Facultad de Veterinaria (USAC).
- Biblioteca del Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industriales (ICAITI).
- Biblioteca de la Facultad de Ingeniería (USAC).
- Biblioteca de la Facultad de Agronomía (USAC).
- Matadero de Animales, Facultad de Veterinaria (USAC).

7.4 RECURSOS MATERIALES

7.4.1 EQUIPO Y MATERIALES

- Espectrofotómetro UV - Visible
- Equipo de digestión y destilación micro Kjeldahl
- Balanza semi-analítica
- Espátulas de metal
- Termómetro
- Estufa

- Papel Whatman No. 40
- Equipo de uso rutinario en el laboratorio

7.4.2 REACTIVOS

- Dicromato de potasio p.a.
- Ácido sulfúrico p.a.
- Difelamina p.a.
- Ácido fosfórico p.a.
- Sulfato ferroso amónico p.a.
- Sulfato de cobre p.a.
- Hidróxido de sodio al 30%
- Ácido clorhídrico 0.5 N
- Indicador Shiro –Tashiro (Rojo de metilo verde de bromo cresol)
- Cromógeno (vanadato/molibdato)
- Agua destilada

7.4.3 CRISTALERIA

- Balones Kjeldahl de 500 ml
- Balón aforado de 100 y 500 ml
- Erlenmeyer de 250 y 500 ml
- Y cristalería de uso común en el laboratorio

7.5 PROCEDIMIENTO

La pulpa de café fue secada al sol y reducida de tamaño usando un molino para aumentar la superficie de contacto.

Se utilizaron 6 reactores por composteo anaeróbico; 5 con pulpa de café, rumen, urea y agua; 1 solo con pulpa de café y agua (control). Se incuban a 35 °C por de 14 día; todo por triplicado (Anexo No. 3).

En cada reactor se agregan 60 gramos de pulpa de café, 10 ml de fluido ruminal, urea con una relación de carbono / nitrógeno de 10, 15, 20, 25 30, y 190 ml de agua.

En el reactor control se agregaron 60 gramos de pulpa de café, y 190 ml de agua.

Después de finalizado el tiempo de incubación, se determinan los parámetros siguientes: nitrógeno orgánico y amoniacal, carbono, materia orgánica fácilmente oxidable, fosfato total y cenizas.

7.6 METODOS DE ANÁLISIS

7.6.1 MATERIA ORGANICA (METODO DE WALKLEY Y BLACK)

En un erlenmeyer de 250 ml colocar un gramo de muestra triturada. Se añaden 60 ml de dicromato de potasio 0.2492 N y 20 ml de ácido sulfúrico concentrado. La suspensión debe tener coloración marrón. Agitar por un minuto y dejar reposar por media hora, luego se transferir a un balón aforado de 250 ml; llevar a volumen con agua.

En un beaker agregar 5 ml de la solución más 10 ml de agua destilada, 5 gotas de difenilamina y 3 ml de ácido fosfórico concentrado. Luego valorar con sulfato ferroso amónico 0.025 M, hasta obtener una coloración verde manzana.

7.6.2 NITROGENO TOTAL (METODO DE KJELDAHL)

Transferir a un matraz de Kjeldahl un gramo de muestra seca, añadir 20 ml de mezcla digestiva y 5 gotas de una solución de sulfato de cobre sobresaturada, arrastrando las partículas de muestra que pudieran quedarse adheridas al cuello del matraz. Calentar en vitrina suavemente hasta obtener una solución de tono claro y se deja enfriar. Lavando con agua se transfiere todo el contenido a un balón de 100 ml y aforar con agua. Agregar al equipo de destilación Kjeldahl 10 ml de la solución y 10 ml de hidróxido de sodio al 30%. Recoger el destilado en un beaker que contenga 20 ml de agua destilada y 20 ml de ácido bórico sobresaturado, recogiendo 40 ml de destilado (hasta la marca de 80 ml de beaker). Agregar 5 gotas del indicador Shiro-Tashiro al destilado y valorar el nitrógeno con ácido clorhídrico 0.5 N, hasta coloración rosada. Calcular la cantidad de nitrógeno.

7.6.3 CENIZAS

Pesar 2 gramos de muestra y colocar en un crisol previamente tarado, luego introducir a la mufla hasta una temperatura de 500 °C durante 2 horas, dejar enfriar y pesar. El peso del residuo del crisol se calcula como porcentaje de cenizas.

7.6.4 FOSFATO SOLUBLE

Al residuo obtenido de la determinación de cenizas, agregar 5 ml de una solución de ácido clorhídrico y calentar durante media hora. La solución que se obtiene se filtra con papel Whatman No. 40 hacia un balón aforado de 100 ml. Llevar a volumen con agua destilada.

Tomar una alícuota de 10 ml y colocar en un balón de 100 ml y aforar, luego transferir el contenido total a un erlenmeyer de 250 ml. Agregar 10 ml de cromógeno (vanadato/molibdato), y a los 10 minutos leer en el espectrofotómetro a 400 nm.

El cálculo de fosfato se hace con una curva preparada de la siguiente manera: se toman alícuotas de 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 ml de la solución patrón de fosfatos con una concentración de 25 ppm; se colocan en balones de 100 ml y se aforan, el contenido total de ellos se traslada a erlenmeyer de 250 ml, se le agrega 10 ml de cromógeno, y a los 10 minutos se leen a 400 nm. El blanco es preparado con 100 ml de agua y 10 ml de cromógeno.

Se expresan los resultados en ppm de muestra seca al aire.

7.7 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Muestreo tipo no probabilístico por conveniencia.

Variables independientes :

- Urea
- Fluido ruminal
- Tiempo
- Materia orgánica

Dependientes:

- Fosfato soluble
- Nitrógeno
- Cenizas

Análisis de resultados:

Se compararon los diferentes niveles de relación Carbono / nitrógeno para cada uno de los componentes que interesan: Materia Orgánica, Fosfato Total, Nitrógeno y Cenizas, utilizando para ello Análisis de varianza de una vía.

8. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos del análisis del contenido de los reactores.

Tabla No. 1

COMPONENTES ANALIZADOS	CONTROL			REL. C/N=10			REL C/N=15			REL. C/N=20			REL C/N=25			REL. C/N=30		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
TRATAMIENTOS																		
MATERIA ORGÁNICA	15.01	14.49	16.13	27.35	29.01	30.40	31.45	32.02	28.66	44.30	46.68	46.42	30.16	30.08	29.79	21.65	21.25	21.33
FOSFATO	2.06	2.08	1.92	5.22	6.13	6.35	5.20	4.94	4.22	1.10	1.37	1.13	6.02	6.22	6.15	5.31	5.18	5.86
CENIZAS	7.90	7.77	7.73	6.55	6.19	5.53	6.48	6.51	6.09	4.33	4.25	4.32	6.00	6.25	6.38	5.55	5.11	5.33
NITROGENO ORGÁNICO Y AMONICAL	15.40	15.81	15.20	9.00	9.81	9.15	8.66	8.39	9.71	8.90	8.24	9.77	8.89	8.62	8.92	8.09	8.37	8.41

Los resultados están expresados en porcentajes, a excepción del Fosfato; el cual está expresado en ppm.

Tabla No.2

Resultados promedio de las determinaciones realizadas por triplicado
Rel. C/N

	Control	10	15	20	25	30
MATERIA ORGÁNICA	15.21	28.92	30.71	45.80	30.01	21.41
FOSFATO	2.02	5.90	4.79	1.20	6.13	5.45
CENIZAS	7.80	6.09	6.36	4.30	6.21	5.33
NITROGENO ORGÁNICO Y AMONICAL	15.47	9.32	8.92	8.97	8.81	8.29

Se realizó Análisis de Varianza de una vía a los datos anteriores con el objeto de establecer diferencias entre y dentro de los grupos.

La tabla de ANDEVA se detalla en el anexo No. 6

Por último, se contruyeron gráficas para determinar la mejor relación C/N en la degradación del material vegetal.

Un total de 24 determinaciones fueron realizadas (entre muestras y controles), después de 14 días de incubación a 35 °C. Todas las mediciones se efectuaron por triplicado, dando un total de 72 determinaciones.

Se observa variación marcada en los resultados obtenidos de los sistemas en los que se modificó la relación C/N, en relación al sistema control, como lo demostró el análisis estadístico aplicado ($p > 0.05$).

La cantidad de materia orgánica en el sistema con una relación de C/N = 20, es un 67.79 % más elevado en relación a la cantidad observada en el sistema control.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Todas las variables analizadas en el presente trabajo establece la actividad celulítica de bacterias y organismos contenidos en rumen de vaca en la biodegradación de la pulpa de café, con el fin de obtener un material como reacondicionador de suelo de buena calidad; es así, que en los resultados obtenidos se observa que en el reactor con una relación Carbono Nitrógeno (C/N) de 20, el porcentaje obtenido de materia orgánica fácilmente oxidable es mayor, debido a que el conjunto de organismos contenidos en el rumen de vaca actuaron en forma óptima sobre el sustrato; favorecidas principalmente por dos factores: el pH del medio y la disponibilidad de nitrógeno (ver anexo No. 1 materia orgánica).

El pH es importante, ya que pequeñas variaciones afectan, por un lado, a las bacterias del fluido ruminal, cuyo pH óptimo para su multiplicación está entre 6.0 y 6.5 ; y por otro, la pérdida por volatilización del nitrógeno en forma de NH_3 en medios cuyo pH es mayor a 7.0. Por lo anterior, la disponibilidad de nitrógeno condujo a que las bacterias se reprodujeran a mayor velocidad, dando como resultado una mayor transformación del sustrato (pulpa), y por lo tanto un elevado porcentaje de materia orgánica fácilmente oxidable; lo cual se observó en el reactor con la relación C/N = 20 con un pH de 6.4 (ver anexo No. 2 pH) .

El porcentaje de fósforo soluble disminuye, debido a su utilización para la generación de energía en forma de ATP (ver anexo No. 3 fósforo). El porcentaje de cenizas es también bajo, ya que hay suficiente transformación de la materia orgánica, provocando liberación de CO_2 como producto del metabolismo bacteriano; y además solubilización en el líquido residual del proceso (ver anexo No. 4 cenizas).

El porcentaje de la materia orgánica fácilmente oxidable, es un buen indicativo de la eficiencia de la utilización del nitrógeno y la capacidad de transformación del sustrato por las bacterias, ya que a mayor biodegradación, mayor es la cantidad de materia orgánica fácilmente oxidable que se obtiene.

Es importante señalar que las diferencias en porcentaje de nitrógeno final en los reactores no son muy marcadas, pues la eficacia en su utilización se ve reflejada en el porcentaje final de materia orgánica y la relación C/N(ver anexo No. 5 nitrógeno orgánico y amoniacal).

En cuanto a los reactores con relación C/N de 10 y 15, la biodegradación fue menor reflejándose en el bajo porcentaje de materia orgánica fácilmente oxidable final, alta concentración de fósforo y alto porcentaje de cenizas contenidos en el material biodegradado, debido a que la urea agregada al medio se inactiva fácilmente por residuos orgánicos. La reproducción bacteriana se disminuye por el contenido de carbono disponible, dando como resultado un porcentaje bajo de materia orgánica fácilmente oxidable aunque el pH sea adecuado para sus desarrollo y la pérdida de nitrógeno por volatilización sea baja.

En los dos reactores restantes (relación C/N de 25 y 30), el pH vuelve a ser crucial, no sólo para la reproducción bacteriana; sino porque afecta la volatilización del nitrógeno en forma de NH_3 . Cuando se incrementa la cantidad de urea, se incrementa el pH del medio según la siguiente ecuación:



lo que da lugar a pérdidas considerables de nitrógeno en forma de NH_3 .

Lo anterior conduce a que las bacterias y organismos celulolíticos tengan, por un lado menos nitrógeno disponible; y por otro, un pH no favorable para su desarrollo y la consecuente disminución en la transformación del sustrato.

En lo referente al tratamiento estadístico de los datos, el análisis de varianza (ver *anexo No. 6* análisis de varianza de una vía) demostró que existe diferencia estadísticamente significativa entre las relaciones C/N ($p > 0.05$), por lo que la variación en las mismas es la causa primordial en la elevación de la materia orgánica fácilmente oxidable, en comparación al sistema control.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 La relación C/N = 20 , es la mejor para acelerar la biodegradación de la pulpa de café, y obtener un reacondicionador de suelos de buena calidad.
- 10.2 La materia orgánica fácilmente oxidable contenidos en el material biodegradado, es el mejor indicativo de la efectividad de la degradación de la materia orgánica por las bacterias celulolíticas contenidas en el fluido ruminal.
- 10.3 Utilizando la relación C/N de 20, se aumenta en promedio 3 veces la cantidad de materia orgánica fácilmente oxidable en comparación al sistema de control.
- 10.4 El factor que más influye en la formación de NH_3 , y la subsiguiente pérdida de nitrógeno, es el pH alcalino del medio.
- 10.5 El efecto del pH es importante para la efectiva degradación del sustrato por las bacterias ruminales, siendo el pH óptimo entre 6.0 y 6.5.
- 10.6 La inactivación de la urea por la ureasa, no es compensada por la saturación del medio con urea, debido al aumento del pH.
- 10.7 La disminución en el porcentaje de fósforo, refleja su utilización para la generación de energía en forma de ATP.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Reproducir el presente estudio, utilizando un reactor a gran escala empleando pulpa de café, líquido ruminal y urea, equivalentes a los utilizados en éste (relación C/N = 20); para evidenciar su efectividad en la producción de materia orgánica como un reacondicionador de suelos agrícolas, con valores bajos en materia orgánica.
- 11.2 Utilizar líquido ruminal proveniente de animales de la misma zona geográfica y con dietas similares, para así minimizar las variaciones en la población microbiana que contienen.
- 11.3 Cuantificar y de ser posible identificar inicialmente, la población microbiana del fluido ruminal; para determinar su capacidad celulolítica frente a un sustrato en particular.
- 11.4 Comprobar la eficacia de la utilización de los elementos empleados en el presente estudio, frente a diferentes sustratos, especialmente desechos agroindustriales.

12. REFERENCIAS

1. Valvert C. Obtención de un acondicionador de suelos (compost) utilizando pulpa de café como substrato y liquido ruminal de vaca como material degradador. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1996. 54p.
2. Velarde de Toledo Me. Evaluación preliminar de los desechos sólidos de algunas unidades académicas de la ciudad universitaria. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1982. 51p.
3. Mansur Aisse M, Obladen NL, dos Santos AS. Aprovechamiento de residuos sólidos. Brasil: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPdq-ITAH-IPPVC-LHI-SAMA), 1981. 108p. (p.8-11)
4. Organización Mundial de la Salud. El reciclaje. Costa Rica: Organización Mundial de la Salud. Doc Tec No. 2, 1983. 358p.
5. Tay JM. Evaluación preliminar del proceso de compostamiento en la planta de tratamiento de la Municipalidad de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos (estudio para optar el grado académico de Magister Scientifcae, Facultad de Ingeniería), 1984. 60p.
6. Ramírez G. Sistemas de disposición de excretas y aguas servidas en lugares que carecen de alcantarillado. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ingeniería), 1980. 87p.
7. Restrepo I, Phillips D. La basura, consumo y desperdicio en el distrito federal. México: Instituto Nacional del Consumidor, 1982.193p. (p.22-55)
8. Church JK. Organic gardening and farning (eds). Organic fertilizer; wich ones and how to

use them. Emmaus, Pa.USA: Rodale press Inc. 1976. 129p.

9. Donahue RL. Miller R, Shecksluna JC. Introducción a los suelos y al crecimiento las plantas. ed. Colombia: Prenticeal, 1981. 632p.
10. FRY J. Practical building of methane power plant for rural energy independence. Santa Bárbara, California USA: John Fry: 1974. 112p.
11. Gray K.R. Sherman K. Biddlestone A.J. A review of composting. practical process biochen 1971; 1:30-34.
12. Gray K.R. Sherman K. Biddlestone A.J. A review of composting. Practical process biochen 1973; 3:15-18.
13. Barrientos C. Tratamiento y Utilización de desechos urbanos, reciclaje de desechos una solución atractiva. Doc. Tec. 1986. 89p. (20-21).
14. Hubbell D.F. Técnica agropecuaria aplicada a zonas tropicales, Fernández G.A. (trad), México, AID, 1969. 135p.
15. Organization of the United Nations, China recycling of organic wastes in agriculture, soils. 1977. 55p. 40:10-12.
16. Donahue R.C. Soils an introduction to soils and plant growth, 2 ed. New Jersey, USA: Prentice-hall, 1965. 140p.
17. Kellogg CE, *et al.* The yearbook of agriculture. USA: The United States government office, 1957. 784p.
18. Molina M. Microbiología de suelos y técnicas fitopatológicas, Guatemala: Universidad de San Carlos, 1957. 287p. (p.42-47).

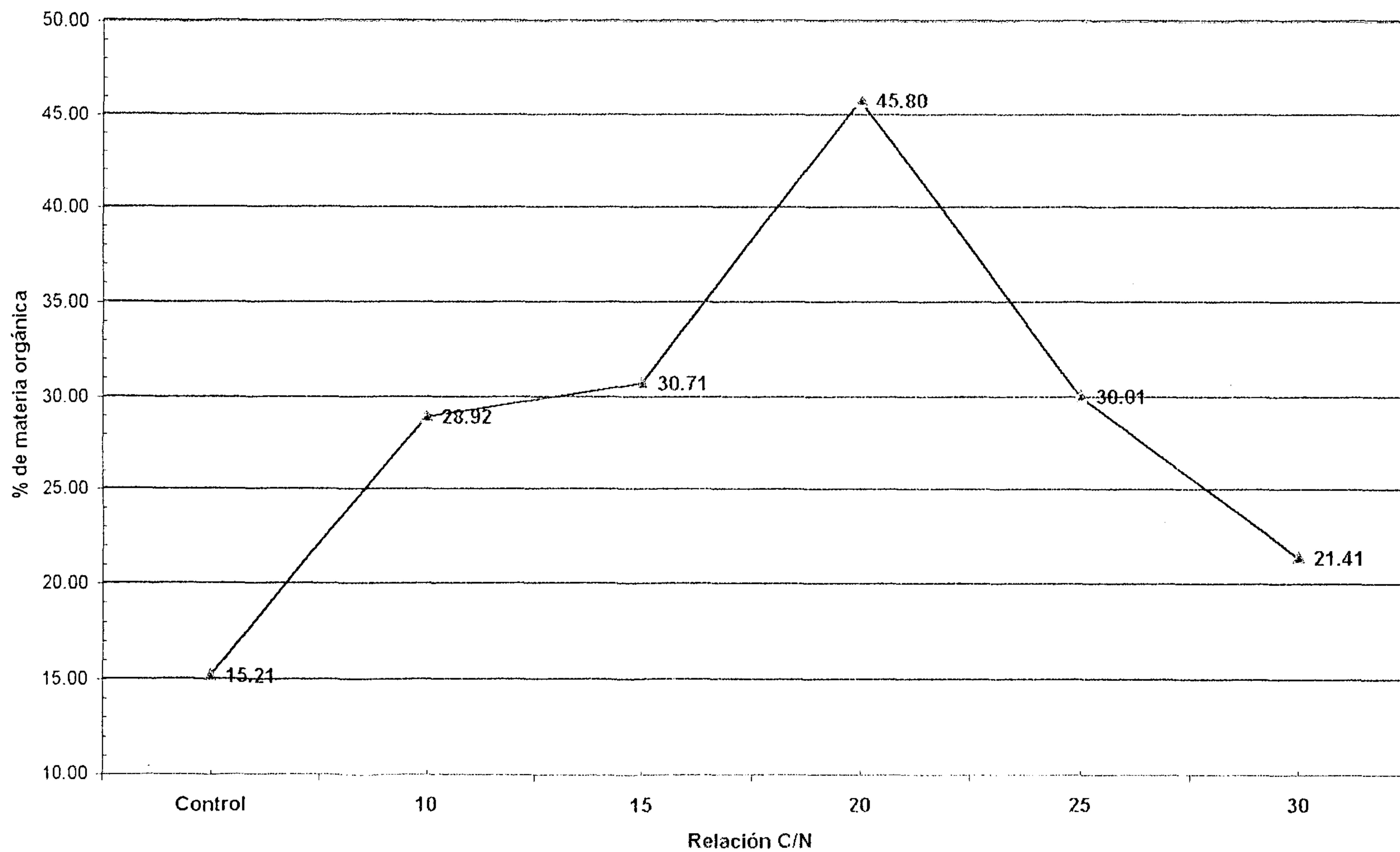
19. Alexander M. Introducción a la microbiología del suelo. Penco JJ. Trad México: AGT, 1980. 499p. (p.162-177).
20. Hopton HE. Ciencias y tecnología del suelo. Guatemala: Universidad de San Carlos, 1973. 366p.
21. Foth HD. Fundamentos de la ciencia del suelo. 2 ed. México: CECOSA, 1986. 433p. (p. 207-228).
22. Weinr Ba. Rhoders Ra. Fermentation of feedlot waste filtration by fungi an streptomycetes. *App1 Microbio1*, 1974; 28:845-850.
23. Belsder LW. Nitrate reduction to nitrite, a possible source of nitrite for growth of nitrite-oxidizing bacteria. *App1 Env Microbiol*, 1977; 34:403-410.
24. Aken De, Birdich D. Rumen bacterial interrelationships with plant tissue during degradation. *App1 Env Microbiol*, 1974; 27:1149- 1156.
25. Han YW. Callihan CD. Cellulose fermentation effect of substrate pretreatment on microbial rumen growth. *App1 Microbiol*, 1974; 27:159-165.
26. Fenchel Tm, Mc Roy CP, *et al*. Symbiotic cellulose degradation in green turtles, chelonian mydes. *Appl Env Microbiol*, 1979; 37:348-350.
27. Van Gylswyk NO, Wejdeman K, Kulander K. Comparative cultures of various rumen bacteria in clarified rumen fluid from cow and sheep fed different diets. *appl Env Microbiol*, 1991; 58:99-105.
28. Gleich R, Cor T. Fagan D. Biochemicals organic compound for research and diagnostic reagents. St. Lous, Mo. USA: Sigma Chemical co. 1992. 2077p. (p.286).

29. Cellulolytic activity of Thermomonospora curvata: (optimal assay conditions, partial purification, and product of the cellulase). Appl Microbiol, 1972; 24:83-90.
30. Cohen JA, Dehority BA. Degradation and utilization of hemicelulose from intact forage by pure cultures of rumen bacteria. Appl Env Microbiol, 1970; 20:362-368.
31. Fassbender DW. Química de suelos; con énfasis en los suelos de América Latina. Costa Rica: Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura, 1982. XXV+385p. (p.66-345)
32. Herrera GA. Comparación de medio de desarrollo de almácigos de café en bolsa, utilizando pulpa de café con diferentes tratamientos. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 1980. 39p.
33. Rivera K. Experiencias sobre el aprovechamiento de la pulpa de café, subproductos de café S.A. Costa Rica. Memorias III Simposium Internacional sobre la Utilización Integral de los Subproductos del Café, Guatemala 1987. 162p. (21p)
34. Ocampo HJ, Ricaurte JL. et al. Revista cafetera de Colombia. Colombia: Federación nacional de cafeteros, 1958. 320p. (p.295-297)
35. Ponce GA. Evaluación de cinco niveles de N, P₂O₅, K₂O y bagazo de Té de limón (Cymbopogon flexuosus st). Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 1985. 55p.
36. Asociación de Productos de Aceites Esenciales (ed.). Experimentos e investigaciones resultados analíticos. Guatemala: APAE. Doc Tec No.2, 1966. 38p. (p.8-14)
37. Hubbell DF. Técnica agropecuaria aplicada a zonas tropicales. Fernández GA (trad) México: Centro regional de ayuda técnica (AID), 1969. 369p. (p.16-24)

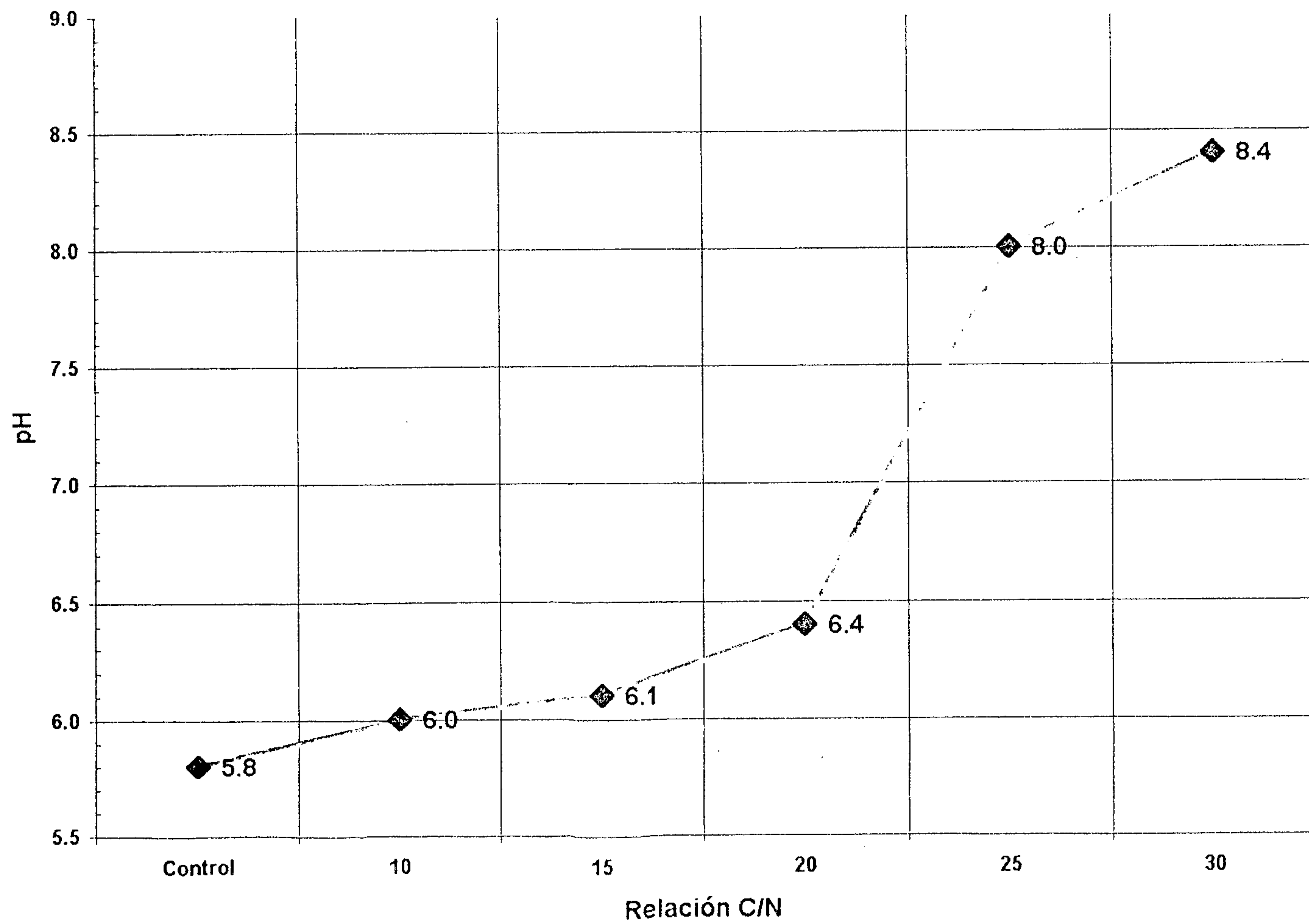
38. Pearson HA. Rumen microbiol ecology in mule deer. *Appl Microbiol*, 1969; 17:819-824.
39. Leedle S, Bryant MP, Hespell RB. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low or high forage diets. *Appl Env Microbiol*, 1962; 44:402-412.
40. Thenon J, Kistner A, Kornelius J. Effect of pH on growth rates of rumen amylolytic and lactilic bacteria. *Appl Env Microbiol*, 1982; 44:428-434.
41. Grubb JA, Dehority BA. Variation in colony counts of total viable anaerobic rumen bacteria as influenced by media and cultural methods. *Appl Env Microbiol*, 1976; 33: 262-267.
42. Dehority BA. Pectin-fermenting bacteria isolated from the bovine rumen. *J Bacteriol*, 1969; 99:189-196.
43. Wallace T. *et al.* The diagnosis of mineral deficiencies on plants; by visual symptoms. London: Her Majesties Stationary Office, 1961. 125p. (p.8-13)
44. Gerard H, Rougieux R. Técnicas de microbiología agrícola. Esp.: Acribia, 1964. XII + 267p.
45. Jacob A, Uexkull H. Fertilización; nutrición y abandono de los cultivos tropicales y subtropicales. Martínez LL. (trad) Hannover, Alemania uehlagsgesell für Ackerbau mbh, 1966. 623p.
46. Ochse JJ. *et al.* Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. México: Limusa -wiley, vols. 2, vol. 1, 1965. 1535p. (p.241-274)

13. ANEXOS

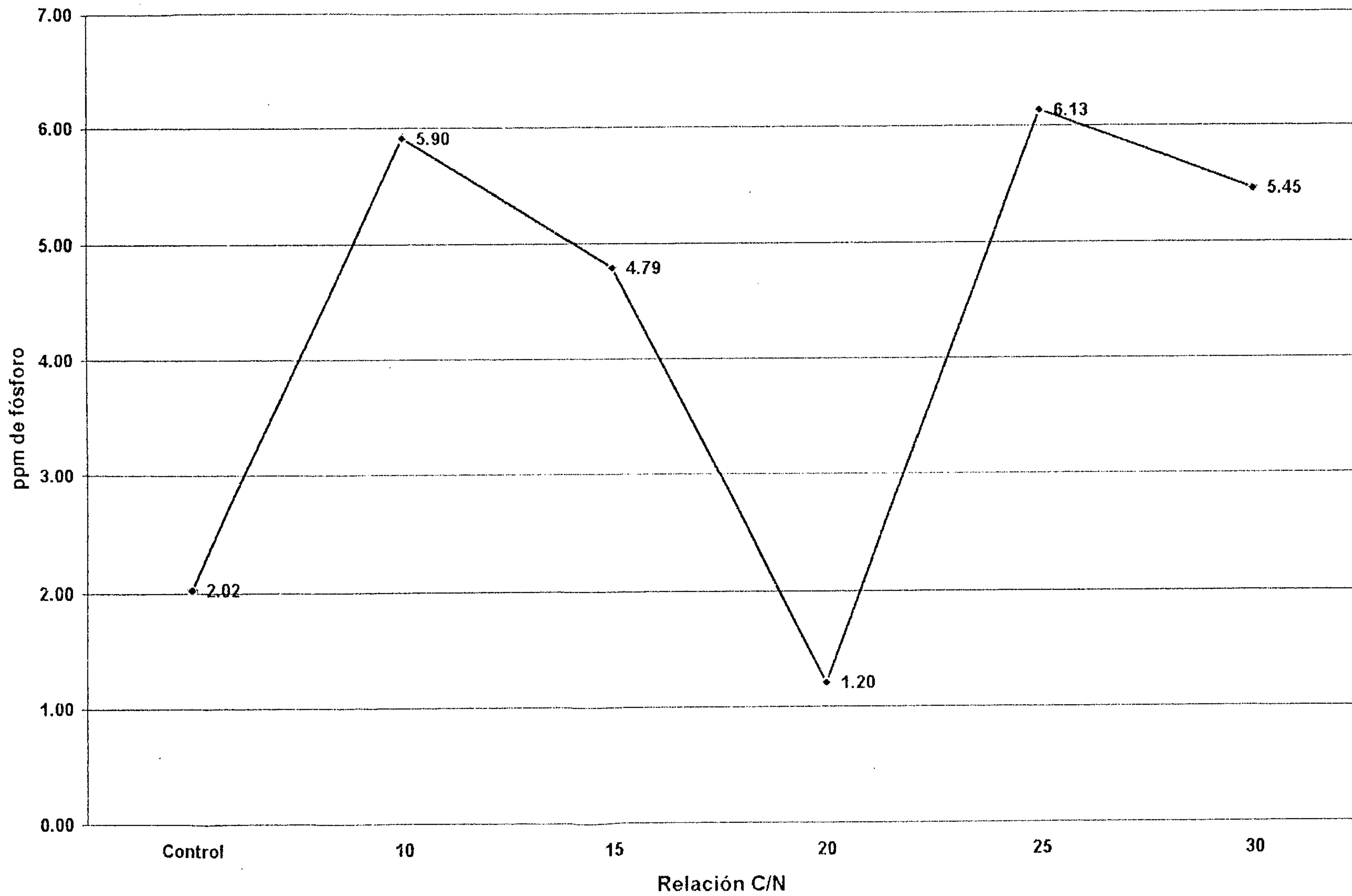
ANEXO No. 1
MATERIA ORGÁNICA



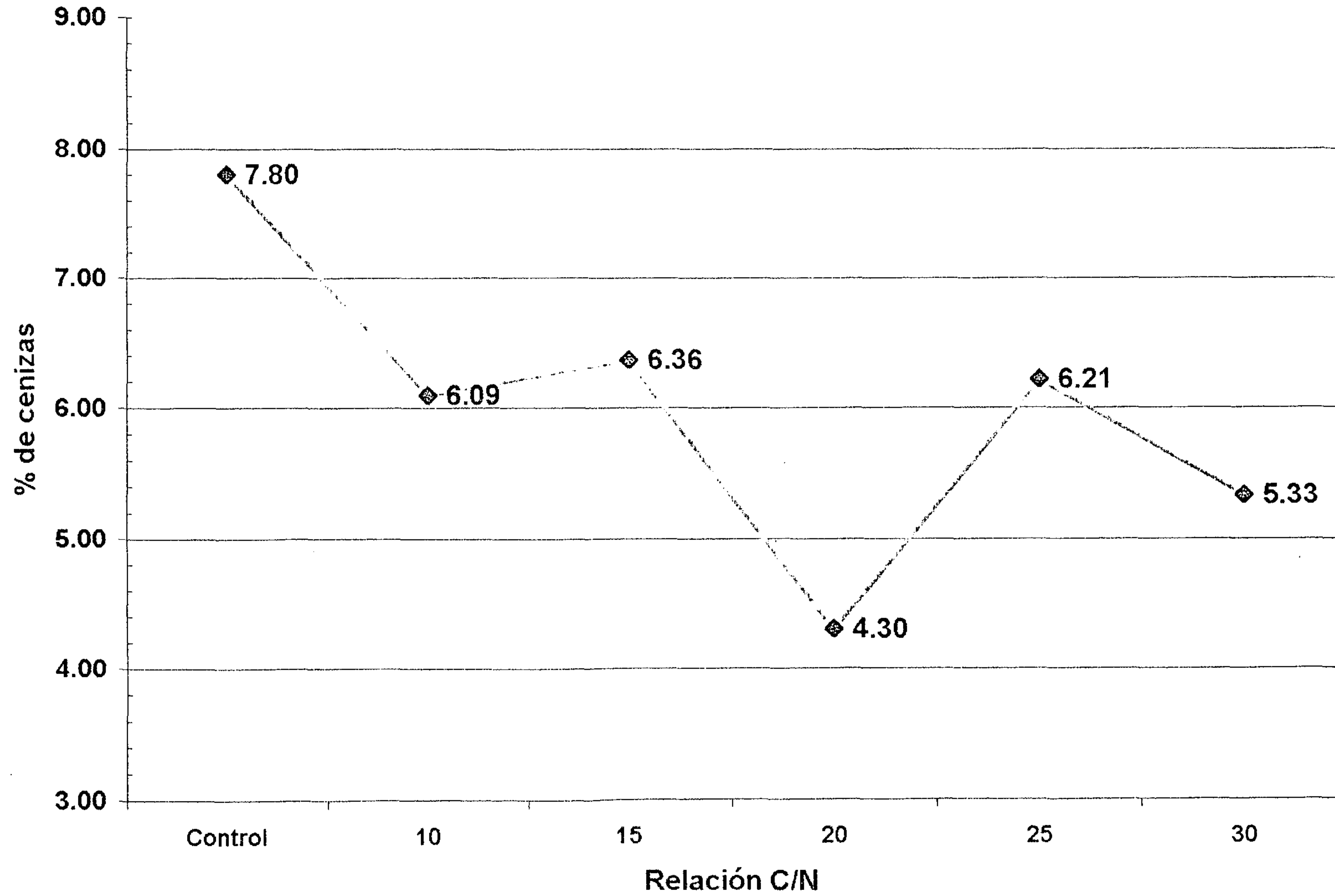
Anexo No. 2
pH



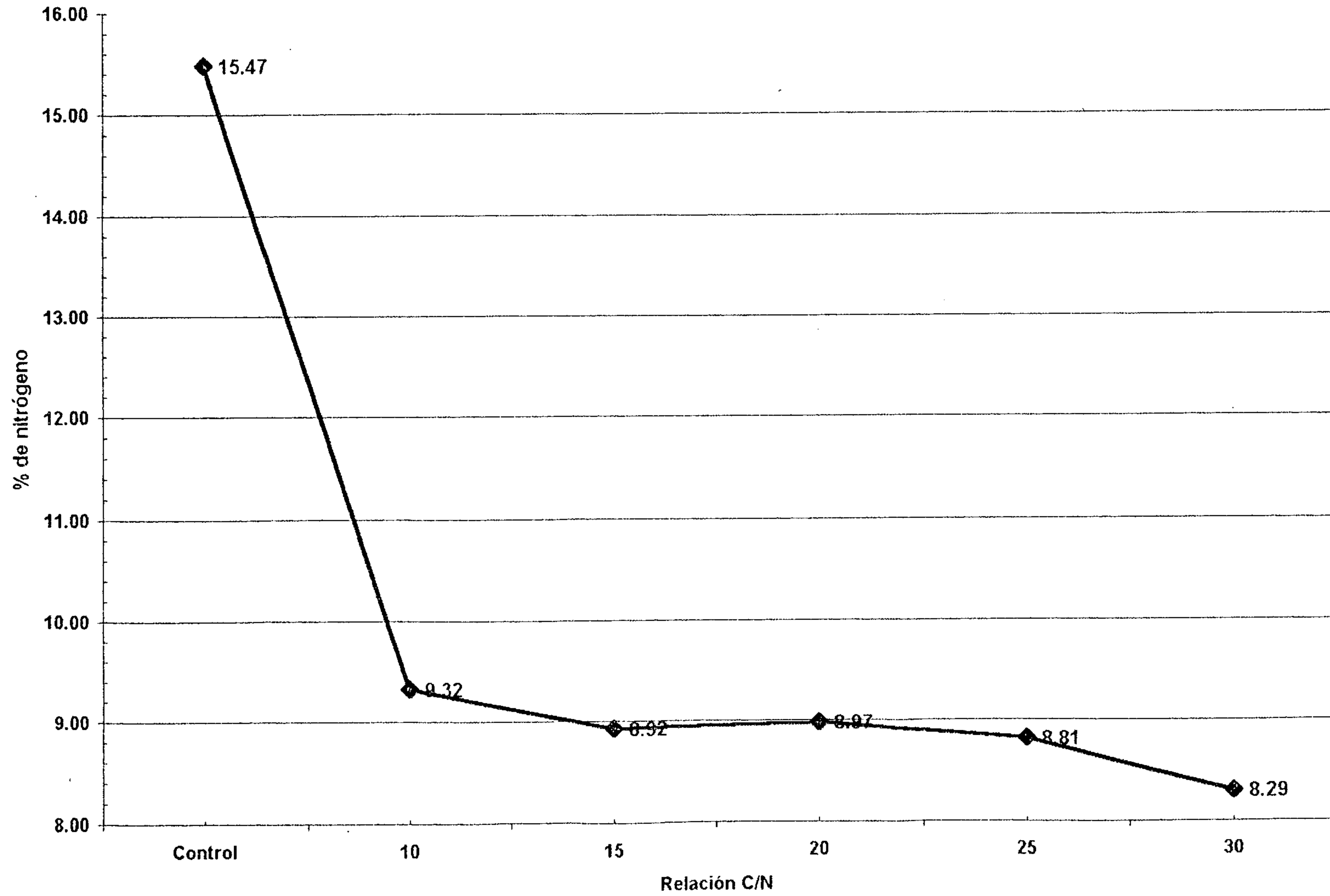
ANEXO No.3
FOSFORO



ANEXO No.4
CENIZAS



ANEXO No. 5
NITRÓGENO ORGÁNICO Y AMONIAICAL



ANEXO No. 6

ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VÍA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	20.72206235	5	4.144412469	0.33603282	0.881465241	3.105874669
Dentro de los grupos	148.0002741	12	12.33335617			
Total	168.7223364	17				

ANEXO No. 7
COMPOSICION QUIMICA DE LA PULPA DE CAFE

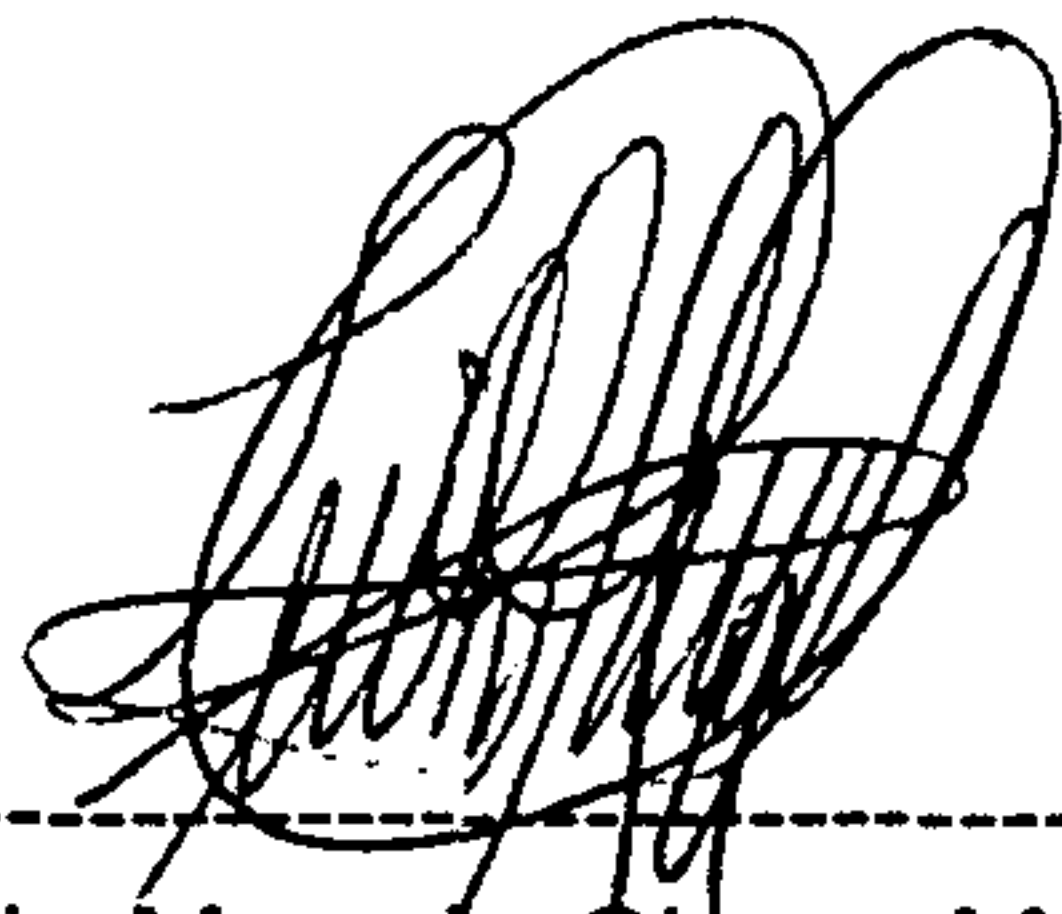
	Pulpa De Café Sin Tratamiento %	Pulpa De Café Con Tratamiento %
NITROGENO ORGANICO	16.31	15.99
MATERIA ORGANICA	13.53	16.64
FOSFORO	2.51	7.29
CENIZAS	6.42	2.95

Tomado de: Valvert C. Obtención de un Acondicionador de Suelos (Compost) Utilizando Pulpa de Café como Substrato y Líquido Ruminal de Vaca como Material Degradador. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1996. 54p.

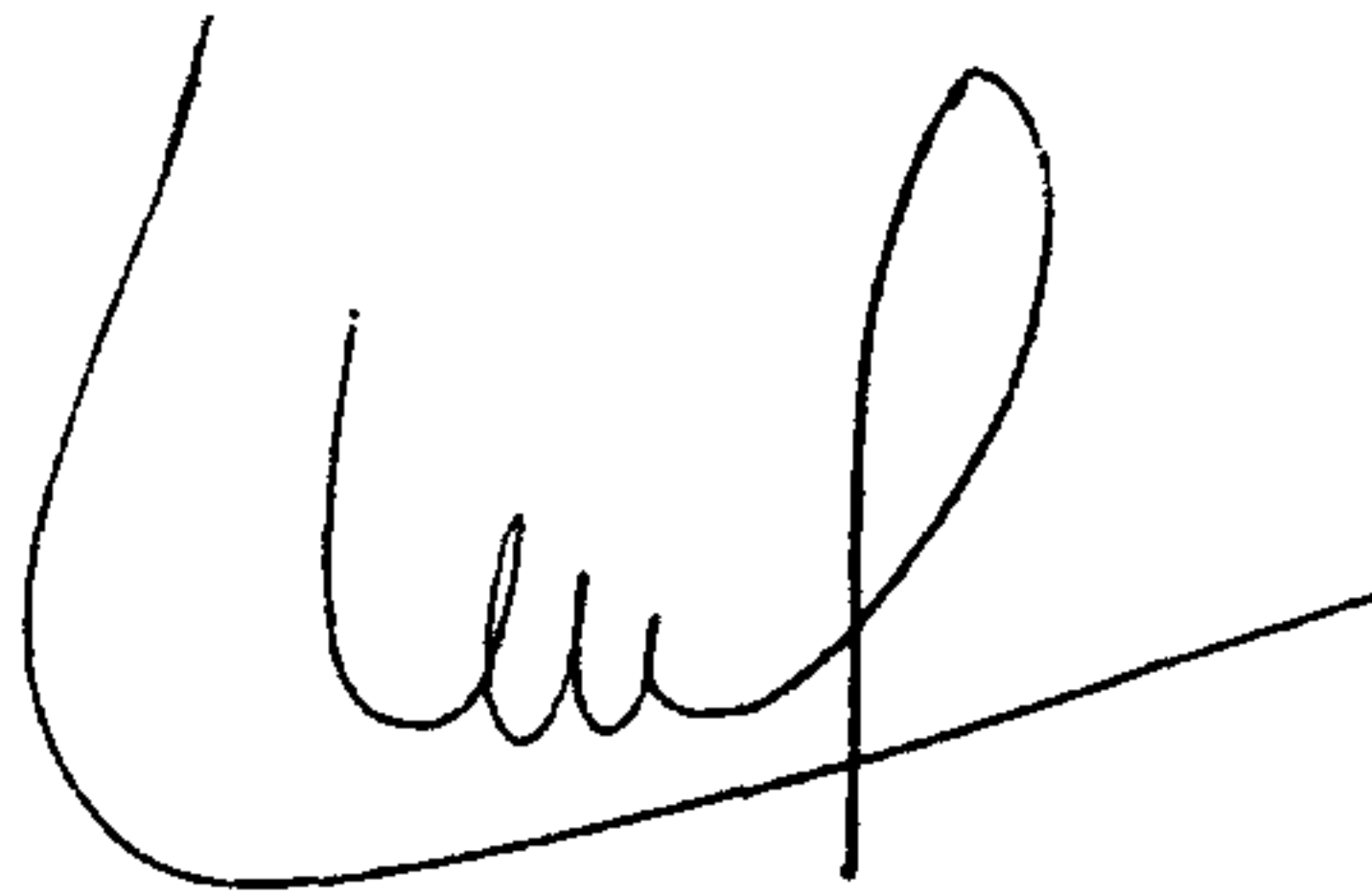
ANEXO No. 8
MICROBIOLOGIA DEL RUMEN (BACTERIAS AEROBICAS Y ANAEROBICAS)

AEROBICAS	ANAERÓBICAS
<u>Azotobacter</u> sp	<u>Acetovibrio cellulolyticum</u>
<u>Bacillus</u> sp	<u>Bacteroides ruminicola</u>
<u>Corynebacterium</u> sp	<u>Butyrivibrio fibrisolvens</u>
<u>Cytophaga</u> sp	<u>Clostridium thermocellum</u>
<u>Pseudomonas</u> sp	<u>Clostridium ruminis</u>
<u>Sporocytophaga</u> sp	<u>Lactobacillus</u> sp

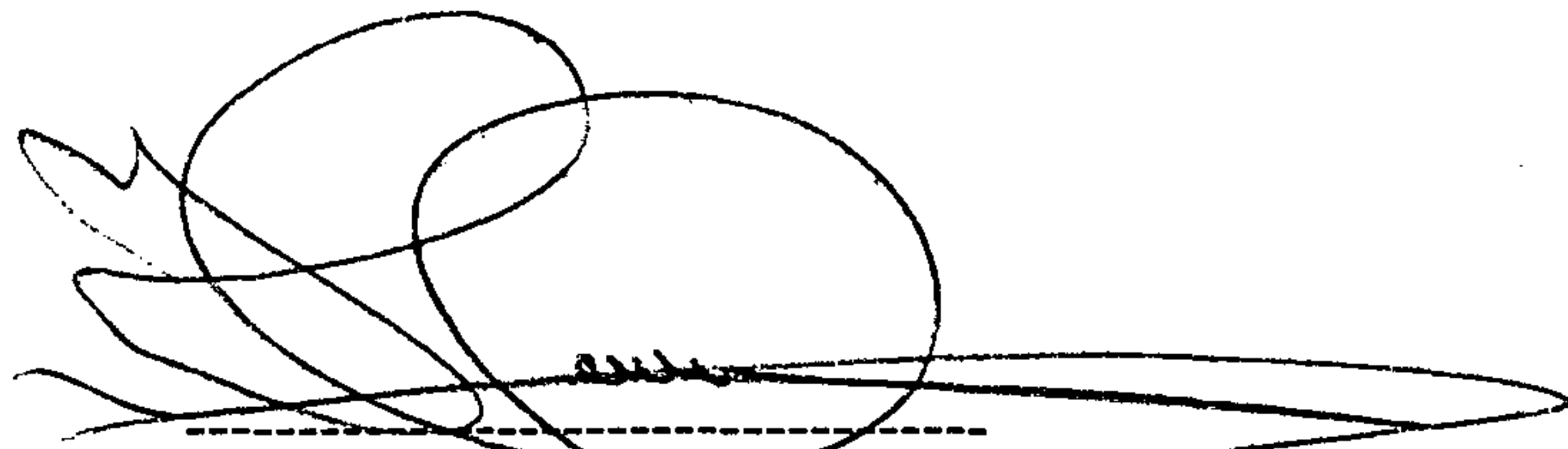
Tomado de: Girard H, Rougieux R. Técnicas de microbiología agrícola. España: Acribia, 1964. XII + 267p. (p.31-36)



Luis Manolo Sierra Méndez.
Tesisista



Lic. Carlos Klee Mendoza.
Asesor



Licda. Heidi Logemann Lima
Directora



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
Decana