



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“PRODUCCIÓN DE UN SIMBIÓTICO PARA ALIMENTACIÓN
ANIMAL A PARTIR DE *Bacillus subtilis* CON UN SUSTRATO DE
RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.”**

TRABAJO DE TITULACIÓN
TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Previo a la obtención del título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: GAVIN MOYANO CÉSAR STALIN

Riobamba – Ecuador

2018

©2018, César Stalin Gavin Moyano.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho del Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: “**Producción de un simbiótico para alimentación animal a partir de *Bacillus subtilis* con un sustrato de residuos agroindustriales**”, de responsabilidad del señor egresado César Stalin Gavin Moyano, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. C. Byron Leoncio Díaz Monroy

DIRECTOR DE TESIS

Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes

MIEMBRO DE TRIBUNAL

Yo, César Stalin Gavin Moyano, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que proviene de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 03 de Julio de 2018

César Stalin Gavin Moyano
060357538-2

Yo, César Stalin Gavin Moyano soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de Investigación y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

César Stalin Gavin Moyano
060357538-2

AGRADECIMIENTO

A Dios y la Virgen, por haberme dado la oportunidad de volver a vivir y culminar esta etapa estudiantil.

Le doy gracias a la vida por darme a mis padres y hermanas.

Agradezco a mi Director de Tesis Dr. Byron Díaz Monroy y Evaluadora Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes por haberme brindado con su tiempo, conocimientos y la guía necesaria en el trabajo de titulación.

Al equipo del Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal encabezado por el Ing. Nelson Zúñiga.

Un agradecimiento especial a la Ing. María Rafaela Viteri Uzcategui la ayuda brindada en el presente trabajo.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de Titulación a Lucía Moyano Ayala gracias por ser mi mami y jamás darse por vencida conmigo.

A mi Padre Segundo Olmedo Gavin Asadobay quien con sus consejos y guía me ha apoyado siempre en toda mi vida.

A mis hermanas Mishell y Vanesa quienes son el motor que me impulsa a seguir adelante y la inspiración en cada proyecto de mi vida.

A mis amigos y amigas gracias por acompañarme y ayudarme en esta aventura politécnica.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

pH	Potencial de hidrógeno
FES	Fermentación en estado sólido
FEL	Fermentación en estado líquido
Kg	Kilogramos
UFC	Unidades formadoras de colonias
mL	Mililitros
S	Simbiótico
F1	Formulación 1
F2	Formulación 2
F3	Formulación 3
F1R1	Formulación 1 repetición 1
F1R2	Formulación 1 repetición 2
F1R3	Formulación 1 repetición 3
F2R1	Formulación 2 repetición 1
F2R2	Formulación 2 repetición 2
F2R3	Formulación 2 repetición 3
F3R1	Formulación 3 repetición 1
F3R2	Formulación 3 repetición 2
F3R3	Formulación 3 repetición 3
g	Gramos
%H	Porcentaje de humedad
L	Litros
UFC.g⁻¹	Unidades formadoras de colonia por gramo
UFC.m⁻¹	Unidades formadoras de colonia por mililitro
\bar{x}	Media

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	15
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS.....	18
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	19
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO	20
1.1. Residuo.....	20
1.1.1. Clasificación de los Residuos.....	20
1.2. Residuo Agroindustrial.....	22
1.3. Rastrojos	23
1.3.1. Rastrojo de Maíz	25
1.4. Afrecho Cervecerero	25
1.4.1. <i>Afrecho de Trigo</i>	27
1.4.2. <i>Afrecho de cerveza</i>	28
1.5. <i>Bacillus subtilis</i>	29
1.5.1. <i>Formación de esporas de B. subtilis</i>	30
1.5.2. <i>Clasificación Científica</i>	30
1.6. Fermentación en estado Solido - FES.....	31
1.6.1. <i>Ventajas y desventajas de FES</i>	33
1.7. Aditivos para la alimentación Animal.....	34
1.7.1. <i>Categorías de aditivos para alimentación animal</i>	34
1.8. Prebiótico	35
1.9. Probiótico.....	37
1.9.1. <i>Uso de Probióticos en Animales</i>	38
1.9.2. <i>Ventajas de Usar Probióticos</i>	38
1.9.3. <i>Efectos beneficiosos del uso de Bacillus</i>	25
1.10. Simbiótico	40
CAPÍTULO II	
2. MARCO METODOLÓGICO.....	41
2.1. Lugar de estudio.....	41
2.2. Hipótesis y Especificación de variables	42

2.2.1. <i>Hipótesis General</i>	42
2.2.2. <i>Hipótesis Específicas</i>	42
2.3. Variables	42
2.3.1. <i>Variables dependientes</i>	42
2.3.2. <i>Variables independientes</i>	42
2.4. Tipo y diseño investigación	43
2.5. Unidad de análisis	44
2.6. Población de Estudio	45
2.7. Tamaño de muestra	45
2.8. Selección de muestra	45
2.9. Técnicas de recolección de datos	45
2.9.1. <i>Material biológico (inóculo)</i>	45
2.10. Métodos y Técnicas	46
2.10.1. <i>Muestreo de la materia prima – residuos agroindustriales</i>	46
2.10.2. <i>Replicación de la cepa Bacillus subtilis</i>	47
2.10.3. <i>Preparación de los residuos agroindustriales.</i>	48
2.10.4. <i>Preparación del inóculo</i>	49
2.10.5. <i>Preparación del aditivo</i>	50
2.10.6. <i>Preparación del simbiótico</i>	51
2.10.7. <i>Análisis organolépticos del simbiótico (F1-F2-F3)</i>	52
2.10.8. <i>Análisis de humedad del formulado</i>	53
2.10.9. <i>Análisis bromatológicos de los simbióticos F1, F2, F3.</i>	53
2.10.10. <i>Prueba de campo en pollos broiler</i>	59
2.10.11. <i>Análisis costo beneficio</i>	60
CAPÍTULO III	
3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
3.1. Materia prima obtenida	62
3.2. Replicación de la cepa Bacillus subtilis	62
3.3. Preparación de los residuos agroindustriales.	63
3.4. Preparación del inóculo bacteriano de Bacillus subtilis	64
3.5. Preparación del aditivo	64
3.6. Análisis de humedad del simbiótico	64
3.7. Análisis bromatológicos de los simbióticos F1, F2, F3.	66
3.8. Análisis organolépticos de los simbióticos (F1-F2-F3).	68
3.9. Resultado del simbiótico formulado	69
3.10. Prueba de pollos en la etapa de Engorde	71

3.11. Análisis Costo – Beneficio	75
CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Requisitos óptimos de los subproductos de trigo.....	14
Tabla 2-1:	Taxonomía de <i>Bacillus subtilis</i>	17
Tabla 3-1:	Tipos de Fermentaciones de algunos microorganismos.....	18
Tabla 1-2:	Condiciones meteorológicas de la parroquia Calpi.....	27
Tabla 2-2:	Tratamientos y formulaciones del simbiótico.....	30
Tabla 3-2:	Unidad de análisis para la prueba biológica en campo del simbiótico....	30
Tabla 4-2:	Residuos agroindustriales, porcentajes y peso usado en el simbiótico...	38
Tabla 1-3:	Pesos inicial y final de muestras del simbiótico.....	50
Tabla 2-3:	Análisis proximal de los simbióticos F1-F2-F3.....	51
Tabla 3-3:	Resultados de análisis organolépticos de los simbióticos F1-F2-F3.....	53
Tabla 4-3:	Matriz de evaluación con promedios de los análisis de los formulados...	55
Tabla 5-3:	Promedio de raciones alimenticias suministradas a pollos broiler.....	56
Tabla 6-3:	Análisis del costo – beneficio en la producción del simbiótico utilizado...	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Diagrama general de la clasificación de los residuos.	7
Figura 2-2:	Diagrama de efectos fisiológicos de la fibra.....	22

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3:	Resultado estadístico del “Modelo General Univariante”.....	55
Gráfico 2-3:	Registro de dietas y pesos de pollos broiler en etapa de engorde...	57
Gráfico 3-3:	Evaluación del peso en pollos broiler alimentados con T1 y T2...	58

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Costo/Beneficio.....	46
Ecuación 2: Porcentaje de humedad.....	49

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue producir un simbiótico para alimentación animal a partir de *Bacillus subtilis* y de residuos agroindustriales: rastrojo de maíz, afrecho cervecero, y afrecho de trigo como sustrato. Se plantearon 3 formulaciones en base a diferentes porcentajes de los residuos más aditivos, con 3 réplicas de cada formulación. El proceso consistió en una fermentación en estado sólido (FES) a una temperatura de 37°C, siendo F3 la mejor formulación, misma que estuvo conformada por: 30 % de afrecho cervecero, 40 % de afrecho de trigo, 25 % de rastrojo de maíz, 5 % de aditivos, e inóculo bacteriano; no presentó microorganismos patógenos luego de FES. Posteriormente se elaboró el simbiótico para alimentación animal (especies avícolas) utilizando: 300 g de afrecho cervecero, 400 g de afrecho de trigo, 250 g de rastrojo de maíz, 50 g de aditivos, y 40 mL de inóculo bacteriano, y se realizó la mezcla compacta que fue colocada en un recipiente hermético de plástico de 2 litros, durante 2 días, a 37°C en incubadora. Se realizó la prueba de campo en pollos entre la sexta y séptima semanas de edad (etapa de engorde), la ración suministrada durante 15 días fue de 5.4 kg del simbiótico producido, estableciendo dietas en una proporción 97:3 y 95:5 de balanceado comercial – simbiótico, obteniéndose un consumo total y un nulo desperdicio, lo cual es un claro indicativo de que los pollos broiler asimilaron el suplemento alimenticio. Se recomienda realizar pruebas con más especies del genero *Bacillus* para la formulación de este tipo de simbiótico.

Palabras Claves: <CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES>, <BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL>, <PROBIOTICO>, <SIMBIOTICO>, <*Bacillus subtilis*>, <ENDOESPORAS>, <FERMENTACIÓN EN ESTADO SOLIDO>, <ALIMENTACIÓN ANIMAL>.

ABSTRACT

The objective of this work was to produce a symbiotic for animal feed from *Bacillus subtilis* and agroindustrial waste: corn stubble, beer bran, and wheat bran as a substrate. Three formulations were proposed based on different percentages of the most additive residues, with 3 replicates of each formulation. The process consisted of a fermentation in solid state (FES) at a temperature of 37 ° C, with F3 being the best formulation, which was made up of: 30% of beer bran, 40% of wheat bran, 25% of stubble corn, 5% additives, and bacterial inoculum; did not present pathogenic microorganisms after FES. Later, the symbiotic for animal feed (poultry species) was elaborated using: 300 g of beer bran, 400 g of wheat bran, 250 g of corn stubble, 50 g of additives, and 40 mL of bacterial inoculum, and the compact mixture that was placed in a 2 liter plastic airtight container, for 2 days, at 37 ° C in incubator. The field test was carried out on chickens between the sixth and seventh weeks of age (fattening stage), the ration supplied during 15 days was 5.4 kg of the produced symbiotic, establishing diets in a ratio of 97: 3 and 95: 5 of balanced commercial - symbiotic, obtaining a total consumption and no waste, which is a clear indication that the broiler chickens assimilated the food supplement. It is recommended to carry out tests with more species of the genus *Bacillus* for the formulation of this type of symbiotic.

Key words: <EXACT AND NATURAL SCIENCES>, <ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY>, <PROBIOTIC>, <SIMBIOTIC>, <*Bacillus subtilis*>, <ENDOESPORAS>, <FERMENTATION IN SOLID STATE>, <ANIMAL FEEDING>

INTRODUCCIÓN

Las actividades agrícolas pese a su importante contribución con el desarrollo y bienestar popular, podrían tener efectos perjudiciales para el ambiente. Sin un control adecuado, la agroindustria puede producir una grave contaminación ambiental que incluye riesgos ecológicos como la generación de residuos orgánicos en los suministros hídricos, presencia de residuos peligrosos por xenobióticos, emisiones de polvo y gases que empeoran la calidad del aire produciendo sustancias tóxicas, la utilización de maquinaria peligrosa para la seguridad y salud de los trabajadores; en los países de bajos ingresos las actividades agrícolas no controladas presentan varios problemas con los residuos que emanan pues carecen de recursos financieros para utilizar tecnologías modernas y más limpias.

En el Ecuador las distintas actividades agroindustriales generan una gran cantidad de desechos, residuos y subproductos como biomasa sólida y líquida; la principal problemática es el mal manejo y disposición final de estos; en algunos casos son arrojados en vertederos a cielo abierto o directamente a los ríos sin un previo tratamiento, como resultado de este mal manejo se convierten en focos de contaminación por su elevado contenido de materia orgánica a esto se suma la presencia de vectores biológicos los mismos que aumentan la problemática causando malos olores e impactos ambientales.

Algunos de los principales residuos generados son aquellos provenientes de camales como rumen, entre otros; dentro de la industria láctica tenemos el suero de leche, en la industria agrícola tenemos residuos como rastrojo de maíz, salvado de trigo, afrecho de trigo; así como desperdicios de la industria de pulpas y mermeladas. En la actualidad, esta ingente biomasa de subproductos representa un importante problema ambiental para los productores, con doble incidencia tanto en la sanidad ambiental como en la economía local, lo que genera considerables gastos económicos en vista a minimizar los efectos. (Peñañiel *et al.*, 2015, p.201)

Algunos datos que sirven como referencia del volumen de residuos que generan las distintas industrias son los siguientes: la industria cervecera solamente utiliza el 8 % de los componentes del grano, el 92 % restante es un residuo, la industria del aceite de palma utiliza solo el 9 % para su producción un ejemplo más claro es el de la industria del papel el cual solo usa el 30 % para su industria el resto se convierte en un desecho. (Saval, 2012)

La falta de conciencia ambiental para el manejo adecuado de los residuos agroindustriales donde se cite un buen manejo de las materias primas desde su generación hasta su disposición final es

uno de los principales problemas que enfrenta la agroindustria junto con la falta de capacidad tecnológica y de recursos económicos para darles un destino final adecuado, además la falta de una legislación ambiental muy poco específica para promover la gestión de este tipo de residuos sólidos.

Estas grandes cantidades de residuos agroindustriales resultan ser el centro de interés para varias investigaciones a nivel mundial, pues debido a las características propias de cada sub producto generado resulta ser una materia prima de calidad y de mucho interés para la industria alimentaria animal, la cual ha desarrollado un sin número de productos de buena calidad nutricional.

Los alimentos que poseen características beneficiosas para la salud y prevención de enfermedades en animales son conocidos en general como alimentos funcionales para animales que pueden ser probióticos, simbióticos entre otros; estos no sólo podrían disminuir los costos de producción y el riesgo de enfermedades intestinales, sino que también serán una excelente oportunidad para el crecimiento y desarrollo de la industria agropecuaria. (Veterinaria, 2014)

El uso de probióticos en la alimentación animal las preparaciones de probióticos pueden ser administradas inmediatamente después del nacimiento de los animales o en periodos en los que el productor espera la aparición de enfermedades (preventivo) o mezcladas con el alimento por periodos de tiempo largo. Los microorganismos pueden ser ingeridos mediante su adición en el agua o el alimento. (Tourmut, 1989, p. 551 - 566)

Uno de los géneros microbianos más estudiados es *Bacillus* que como producto probiótico multifuncional ha recibido bastante atención, debido a que estos producen varias enzimas extracelulares que potencian la digestibilidad de los alimentos, así como también compuestos antimicrobianos que mejoran el desempeño del animal. Las bacterias formadoras de esporas, particularmente varias especies del género *Bacillus*, son Cada vez más populares como probióticos para su uso en piensos, debido a su robustez en soportar altas temperaturas, haciéndolas más fáciles de manejar durante Fabricación, almacenamiento y transporte de piensos. Dicho genero microbiano ha sido usado en distintas investigaciones y ha formado parte de fermentación en estado sólido (FES) se espera crear un simbiótico a partir del aprovechamiento de residuos agroindustriales. Frente a esto, potenciarlo con la finalidad de alcanzar un producto de calidad que pueda ser utilizado como alimento para animales. (Lee *et al.*, 2012)

Entre las distintas bacterias probióticas que han sido empleadas en la alimentación animal se puede distinguir diferentes grupos de como *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus toyoi*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus facíminis*, *Pediococcus*

acidilactici. Todas estas cepas han demostrado efectos positivos en diferentes especies tales como rumiantes, aves, porcinos, peces y conejos. (Leonor *et al.*, 2013)

El desarrollo y búsqueda de nuevos mecanismos biotecnológicos que permitan hacer uso de materias primas alternativas, es de mucha importancia, especialmente en casos donde materias primas producidas a gran escala por su uso en la alimentación son usadas para la obtención de productos destinados a otros fines, como por ejemplo la producción de etanol, alimentos funcionales, etc. A partir de subproductos o material residual proveniente de la agroindustria. (Ospina Henao, Hernandez Rodríguez y Lozano Moreno, 2012, p. 17)

Para obtener un alimento energético-proteico con alto contenido de proteína y bajo en fibra, de adecuada calidad para los animales, se estudió el efecto de la inclusión del 20 % de fuentes energéticas en la FES de la caña de azúcar. La FES, intenta que el crecimiento de microorganismos en un material sólido con ausencia o casi ausencia de humedad libre. El material sólido, sirve como soporte y fuente de nutrientes. La FES tiene ventajas, como destacar la alta productividad volumétrica, menor generación de efluentes y residuos, aprovechamiento de numerosos desperdicios agroindustriales, menores costos de energía en los procesos entre otros. (Thomas, Larroche y Pandey, 2013)

Actualmente se presentan en el mercado una amplia variedad de alimentos prebióticos, probióticos y simbióticos, los cuales se comercializan bajo distintas marcas comerciales, estos suelen ser de carácter importado lo cual genera una dependencia tecnológica extranjera; debido a la falta de investigación e innovación en esta rama de la alimentación animal, ya que existen muchos compuestos que potencialmente podrían usarse en el desarrollo de nuevos productos, los cuales ampliarían la oferta de este tipo de alimentos en el mercado nacional.

Frente a estos sucesos es de vital importancia el adecuado manejo de los residuos agroindustriales tanto en nuestro país como en el mundo, para esto es necesario la aplicación de alternativas factibles que permitan explotar las propiedades de los residuos para la producción de productos como probióticos, prebióticos y simbióticos entre otros productos de vital importancia para así desarrollar una alternativa ambiental responsable.

JUSTIFICACIÓN

Los residuos sólidos agroindustriales en la actualidad tienen características muy variadas que dependen de la materia prima del proceso que los generó sin embargo comparten una característica principal que es el contenido de distintos porcentajes de celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina. Estos componentes difíciles de tratar son abundantes en residuos como el rastrojo de maíz, afrecho cervecero y afrecho de trigo los cuales son subproductos del resultado de distintas actividades agroindustriales.

Teniendo un criterio de selección y aprovechamiento se han desarrollado distintas técnicas biotecnológicas para el manejo de estos residuos, una alternativa interesante resulta investigar el aprovechamiento como suplemento alimenticio para animales, la cual es una opción interesante ya que se espera que su rendimiento sea igual o de mejor calidad que los cereales existentes en el mercado.

Se plantea atender de una manera ambientalmente responsable la disposición final de los residuos y reutilizarlos como un sustrato de *Bacillus subtilis* para la elaboración de un simbiótico para alimentación animal mediante FES; entre los múltiples beneficios de un simbiótico se tiene un valor nutritivo directo, una mejora en los índices productivos además previene la aparición de enfermedades metabólicas respetando el bienestar animal y del ambiente; además es una alternativa para los productores agropecuarios quienes se ven obligados a adquirir productos importados al no existir una alternativa nacional.

Siguiendo una de las sub líneas de investigación en el área de la carrera de Ingeniería en biotecnología ambiental, y la línea de tecnologías de tratamiento de residuos y recursos de la Escuela de ciencias químicas de la Facultad de Ciencias, en colaboración del con el Laboratorio de Biotecnología y microbiología Animal – LABIMA de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH, se plantea una investigación basada en una fermentación en estado sólido (FES); en donde se espera que *Bacillus subtilis* produzca al menos 1×10^7 UFC. g^{-1} y desarrollar un simbiótico alimenticio de buena calidad para especies avícolas (pollos broiler).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Producir un simbiótico para alimentación animal a partir de *Bacillus subtilis* con un sustrato de residuos agroindustriales mediante FES.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar diferentes formulaciones de sustratos a base de residuos agroindustriales para el crecimiento de *Bacillus subtilis* mediante fermentación en estado sólido (FES).
- Realizar una prueba biológica de aceptabilidad del simbiótico producido en pollos Broiler.
- Analizar los costos y beneficios de esta tecnología.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Residuo

Los residuos son el subproducto de la actividad del hombre y se han producido desde los inicios de la humanidad. Cada día aumentan en cantidad y variedad como consecuencia del incremento de la población humana y del desarrollo tecnológico e industrial. Su disposición final incorrecta ha ocasionado grandes problemas al ambiente, contaminando agua, aire y suelo.(Castrillón, Olivia & Puerta, 2004, p. 16)

Los residuos son todas aquellas materias primas las cuales no se hallan en un producto final luego de haberse generado una actividad productiva, estos no suelen representar un interés significativo de estas actividades. También se puede decir que un residuo es todo material que no tiene una aplicación específica y que, por tanto, su valoración es nula además estos precisan de un costo de gestión.

La problemática ambiental generada por el incremento de los residuos sólidos se debe, en parte, a la falta de educación y responsabilidad ambiental para separarlos en la fuente y poder aprovecharlos nuevamente como materia prima para la fabricación de nuevos productos. (Castrillón, Olivia & Puerta, 2004, p. 15)

1.1.1. Clasificación de los Residuos

Los residuos tienen una clasificación de acuerdo a su composición, su biodegradabilidad y la fuente de origen. Es importante tener en cuenta que es desecho y que es residuo, a diferencia del residuo los desechos no se pueden reciclar, por lo que es recomendable darle un mejor uso a los residuos y colaborar con el medio ambiente que día a día se deteriora más. (Clasificación residuos, 2018)

1.1.1.1. Según su origen.

- Residuos domiciliarios.
- Residuos Municipales
- Residuos Industriales y de construcción
- Residuos hospitalarios o sanitarios

1.1.1.2. Según su biodegradabilidad

- Residuos orgánicos
- Residuos Inorgánicos
- Según su Composición

1.1.1.3. Clasificación de los residuos

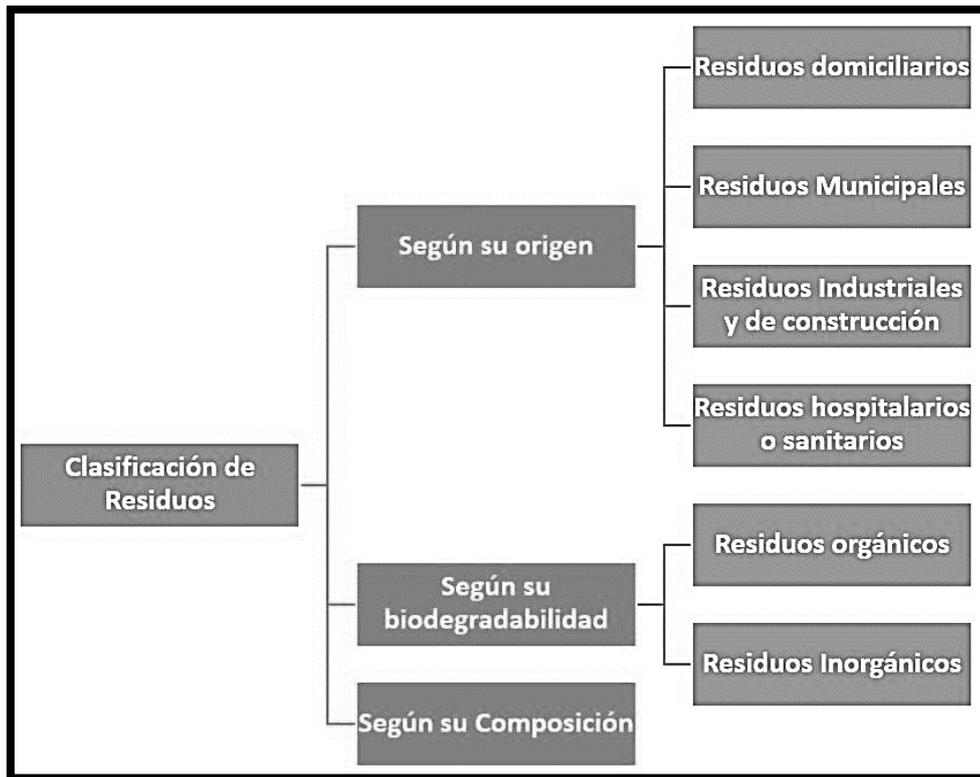


Figura 1-1: Diagrama general de la clasificación de los residuos.

Realizado por: (Clasificación residuos, 2018)

1.1.1.3.1. Residuos orgánicos

Aquellos que componen este grupo son principalmente las frutas, vegetales, animales y productos comestibles que se encuentran en descomposición y que pueden volver a la tierra una vez descompuestos convertidos en organismos unicelulares y microscópicos.

1.1.1.3.2. Residuos Inorgánicos

Este subgrupo lo forman los residuos que por sí solos no tienen la capacidad de degradarse, como las latas, vidrios, plásticos y otros productos; por lo cual se hace necesario el uso de máquinas y aditivos para poder reutilizarlos, estos son productos biodegradables.

1.1.1.3.3. Según su Composición

Engloba los residuos como el cartón y papel (revistas, facturas, periódicos, carpetas y libros) el vidrio (bombillos, vajillas, vasos, jarrones, espejos y mesas), plásticos (envases de jugos o refrescos, bolsas, juguetes y tubos), metales (tubos, cables, lamias, latonería dañada, estaño, rejas y sillas), aceites, pinturas, y muchos otros, que poseen sustancias derivadas del aluminio, azufre, petróleo, litio y diferentes sustancias químicas que pueden ser fácilmente reutilizadas.

1.2. Residuo Agroindustrial

Principalmente son residuos vegetales los cuales están integrados por restos de cosechas y cultivos (tallos, fibras, cutículas, cáscaras, bagazos, rastrojos, restos de podas, frutas, etc.), las cuales proceden de diversas especies cultivadas. Una propiedad física de estos residuos es el contenido de humedad de este tipo de residuos es relativo dependiendo de varios factores como las características de las especies cultivadas, ciclo del cultivo, tiempo de exposición a los factores climáticos, manejo, condiciones de la disposición, etc. (Veloz, 2005, p. 23)

Es aquel residuo generado por la industria agroindustrial estos pueden ser fuentes atractivas por su contenido en compuestos químicos (azúcares, pigmentos, fibra alimentaria, proteína,

poli fenoles, lignina, etc.) y pueden ser útiles cuando se les transforma mediante tratamientos químicos o microbiológicos en productos de valor agregado, con lo cual se puede ayudar en la lucha contra el deterioro del medioambiente. (Rosero, 2016, p. 13)

Los residuos agroindustriales son estrictamente de naturaleza orgánica, esta es su principal característica lo cual brinda la facilidad y viabilidad para su reciclaje transformando así un problema en una oportunidad; se puede generar varias alternativas para su posterior aprovechamiento.(Ospina Henao, Hernandez Rodríguez y Lozano Moreno, 2012, p. 17)

Los residuos originados por la agroindustria pueden convertirse en materias primas sin embargo se encuentran desaprovechados y su degradación da origen a la producción de gases tóxicos, atracción de vectores y producción de lixiviados, que tienen consecuencias a corto, mediano y largo plazo.(Ospina Henao, Hernandez Rodríguez y Lozano Moreno, 2012, p. 17)

Dentro de nuestro país, se encuentran los residuos como rastrojo de maíz, afrecho cervecero y de trigo los cuales son producto del procesamiento de harinas entre otros; una parte de estos es utilizada en la alimentación animal y en otros casos es degradada al ambiente ocasionando problemas de contaminación ambiental, como los mencionados anteriormente.(Ospina Henao, Hernandez Rodríguez y Lozano Moreno, 2012, p. 17)

Pueden constituir en materia prima para la producción de alimentos funcionales además de otros usos y hace falta despertar el interés y realizar estudios de factibilidad que muestren la viabilidad de este tipo de actividades. Se presenta la situación de la generación de residuos y lo que se están haciendo las empresas, además de dar señalar las cantidades que podrían estar disponibles.(Araya Cloutier, 2013, p. 1)

1.3. Rastrojos

Las principales cosechas producen grandes volúmenes de subproductos fibrosos, como: rastrojo de maíz, de quinua, pajas de sorgo y trigo, afrecho de fréjol, etc.; de la transformación agroindustrial de la caña de azúcar, café y frutos se obtienen cantidades considerables de bagazos, pulpas y residuos diversos. Todos estos subproductos se utilizan en forma parcial,

quedando un 70-80 % de biomasa disponible constituido principalmente de celulosa que puede ser aprovechada. (Toledo, 2008, p. 24)

El rendimiento de rastrojo en la producción agrícola, depende de diversos factores, como son: tipo de suelo, clima, manejo agronómico, disponibilidad de agua y variedades sembradas. Se estima que por cada kilogramo de grano producido se obtiene 1 kg de rastrojo. (Reyes-Muro, Camacho-Villa y Guevara-Hernández, 2013, p. 15)

Los rastrojos son subproductos derivados de las actividades agrícolas y son importantes por su uso como fuente de alimentación en la ganadería; en México representan 24 % de la materia seca (MS) disponible por lo general para el consumo animal. Con el propósito de contextualizar el entorno de los rastrojos en esa región, se estimó la producción y consumo nacional. Para calcular la producción se empleó información sobre producción de grano y rastrojo de los cultivos de maíz, sorgo, trigo y cebada. Para el consumo, se utilizó información sobre inventarios ganaderos y requerimientos alimenticios en MS para las especies de bovinos, caprinos y ovinos. (Reyes-Muro, Camacho-Villa y Guevara-Hernández, 2013, p. 12)

Los rastrojos, al ser un subproducto de la producción de granos, comparten diversas características asociadas al cultivo del cual se derivan. Estas características o variables son: la superficie destinada a la producción y la modalidad hídrica, entre otras condiciones y determinantes que afectan el rendimiento de los cultivos. (Reyes-Muro, Camacho-Villa y Guevara-Hernández, 2013, p. 14)

Los residuos agroindustriales o agroalimentarios son considerados sustratos con un bajo valor comercial, tenemos por ejemplo el caso del rastrojo de maíz, paja de trigo, bagazo de caña, entre otros ricos en celulosa y hemicelulosa, pueden ser transformados por hidrólisis biológica, en azúcares fermentables por medio de las enzimas producidas durante el proceso metabólico de algunos microorganismos. (Rosero, 2016, p. 21)

1.3.1. Rastrojo de Maíz

El rastrojo de maíz es un subproducto abundante y valioso para la alimentación de varias especies pecuarias de producción y el grano para la alimentación humana; siendo el maíz es el cultivo más importante desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social; de igual manera, es el más significativo por la superficie sembrada y el volumen de producción. Anualmente se destinan grandes extensiones de hectáreas para la producción de este grano, que representa aproximadamente un 49.7 % de la superficie cultivable. (Reyes-Muro, Camacho-Villa y Guevara-Hernández, 2013, p. 14)

Entre el 60 a 75 % de las dietas manejadas en la crianza de animales está presente el maíz; por lo cual contribuye con un importante aporte de energía (el rastrojo de maíz es un subproducto con $1.78 \text{ Mcal.Kg}^{-1}$) y un mesurado aporte de proteína, el 30 % de la proteína total es aportada por esta materia prima; el aporte energético en dietas de aves se podría considerar que el maíz aporta entre el 65 a 70 % de la energía contenida en la dieta, al igual que en dietas de cerdos aunque en este caso con un aporte menor en proteínas, cerca del 8 %. La importancia del maíz dentro de la elaboración de otros productos pecuarios como la carne de pollo, huevos y carne de cerdo y la necesidad de su producción con el fin de cubrir la demanda local. (Luis y Baca, 2016, p. 28)

En la producción, el rastrojo puede llegar a ser tanto o más importante que el grano debido a que sustenta en diferente proporción la manutención de distintas especies pecuarias; al cual se recurre en tiempos difíciles para mitigar los desbalances económicos. A pesar de su relevancia, en muchas ocasiones el rastrojo producido por el agricultor es insuficiente, por lo que no se cubren totalmente las necesidades de consumo durante la época de estiaje. (Muñoz-Tlahuiz *et al.*, 2013, p. 516)

1.4. Afrecho Cervecerero

La “AAFCO” (American Association of Feed Control Officials) detalla al afrecho como “Un residuo seco extraído de la sola malta de cebada o un mezclado con otros granos cereales u otros productos de granos”. El cual en su aminograma muestra una composición equilibrada de los aminoácidos más limitantes en las especies monogástricos como la lisina, metionina,

cistina y triptófano, con relación al contenido mineral el afrecho contiene niveles invertidos en la relación calcio y fosforo y bajos niveles de potasio. (Morales, 2015, p. 2)

Entre las propiedades nutricionales más importantes del afrecho es la característica proteica, la cual hace de este subproducto un elemento altamente benéfico para la alimentación animal. Por ejemplo para los rumiantes fracción proteica o proteína verdadera de un concentrado y/o materia prima, es activada por los microorganismos, sufriendo una degradación en aminoácidos y péptidos y quedando una fracción de proteína llamada de degradación lenta, la cual continua su paso hacia el intestino delgado y allí es degradada por acción de las enzimas del animal como lo haría un monogástrico para asimilarla. (Morales, 2015, p. 2)

El intestino delgado no puede digerir toda la fracción no degradable de la proteína; cierta porción no es degradada por el animal, y esta varia de un ingrediente a otro, sin embargo algunos ingredientes que han sido sometidos al calor durante su proceso de extracción o cuando tienen productos químicos en su composición presentan una fracción degradable alta. (Morales, 2015, p. 2)

Para los vegetales la solubilidad es muy variable, el maíz, que tiene un elevado contenido de zeína soluble, se desdobra solo en un 40 %, la harina de Soya es el ejemplo de proteína de un ingrediente que tiene fracción degradable 60 %; harinas como la de sangre, la harina de gluten de maíz, la harina de carne, los granos de destilería, la alfalfa deshidratada y el afrecho seco de cervecería, son ejemplos de proteína sobre pasante o “bypass”. (Morales, 2015, p. 2)

Estos subproductos presentan excelentes especificaciones de calidad en cuanto a proteína y energía, razón por la cual son empleados en la industria de los alimentos para consumo animal y aun para consumo humano (naturalistas y bioenergéticas). Su contenido de proteína cruda, aminoácidos, fibra, grasa, vitaminas y minerales; permiten emplearlas de acuerdo con los requerimientos nutricionales específicos tanto para monogástricos (Aves, cerdos, caballos y perros), como para poligástricos (ganado ovejas y cabras). (Morales, 2015, p. 2)

1.4.1. Afrecho de Trigo

El salvado, o afrecho de trigo, es el resultado de los subproductos de la comercialización e industrialización de los cereales y oleaginosas luego del proceso de moler los granos limpios y libres del tegumento para separar por medio de tamices, el 50 % (o más) de la harina de trigo. La producción nacional de trigo asciende a 3.9 millones de toneladas al año, en promedio, estos cultivos ocupan el 5 % de la superficie sembrada del país. (Reyes-Muro, Camacho-Villa y Guevara-Hernández, 2013, p. 14)

Es una fuente importante de nutrientes para satisfacer las necesidades de distintas especies agropecuarias cuyos requerimientos nutricionales son altos. Suelen ser fuentes indispensables para "balancear" las dietas de alta producción o engorde intensivo, principalmente cuando se utiliza como base forrajera de las raciones una importante proporción de silajes fibrosos (sorgos forrajeros) y/o pasturas y verdeos invernales. (Gallardo, 2002)

Desde el punto de vista nutricional el afrecho de trigo puede definirse como un alimento de tipo energético-proteico, con valores intermedios tanto de energía como proteínas. Puesto que es un subproducto que le confiere el valor energético deriva fundamentalmente de la "fibra" de la cubierta de los granos. El valor proteico, proviene tanto del "germen" de la semilla como de las cubiertas del grano, siendo el germen el que contribuye con la mayor proporción de sustancias proteicas de calidad. (Gallardo, 2002)

El valor energético del afrecho de trigo, es sólo un 22 % inferior al grano de maíz. Sin embargo, el afrecho de trigo evaluado en ensayos biológicos de respuesta animal ha demostrado poseer un valor energético todavía más bajo. Diferentes condiciones de alimentación, un mismo alimento puede constituir tanto un componente que desequilibra o uno que equilibra la dieta. No obstante, los análisis de laboratorio de cada ingrediente son indispensables para formular raciones balanceadas. Bajo condiciones de producción el valor nutritivo de un alimento no es simplemente el mero reflejo de su composición química sino principalmente de las interacciones con otros alimentos que componen la dieta del animal. (Gallardo, 2002)

Tabla 1-1: Requisitos óptimos de los subproductos de trigo

Requisitos	Unidad	Salvado		Salvadillo		Muyuelo		Germen		Método de ensayo
		Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	
Humedad	%	-	13.5	-	13.5	-	13.5	-	13.5	INEN 540
Proteína Cruda	%	14	-	14	-	16	-	22	-	INEN 543
Fibra cruda	%	-	12	-	10	-	6	-	4	INEN 542
Grasa cruda	%	-	-	-	-	-	-	6	-	INEN 541
Cenizas	%	-	8	-	6	-	4	-	10	INEN 544

Fuente: FEDNA 2011

1.4.2. Afrecho de cerveza

El afrecho de cerveza es resultante del proceso de fabricación del mosto o de la cerveza, y que puede contener residuos de lúpulo gastado el cual no excede la una cantidad del 3 %; se realizan los procesos de germinación, cocción de la malta y de la mezcla con triturados de cereales para obtener el mosto; también un proceso de filtrado y selección donde se recoge un residuo que contiene un 81 % de humedad, el cual al someterlo al secamiento su humedad fluctúa entre un 7 y 10 % y su color podrá variar de acuerdo a la clase de cebada (materia prima esencial) y de los triturados que se empleen, generalmente adopta un color grisáceo o amarillo pardusco. (Morales, 2015, p. 2)

En condiciones controladas de temperatura y humedad en el proceso de malteado se obtiene por cribado un subproducto que se presenta en forma de hilos mezclados con cascarilla de cebada y algo de malta, su olor es aromático y su sabor amargo. La composición fisicoquímica de la raicilla varía de acuerdo a la cebada utilizada, a la técnica de secado y al método de conservación y almacenamiento; el porcentaje de proteína del subproducto es de un 25 % y los niveles de fibra varían entre un 11 y 13 %. (Morales, 2015, p. 2)

En países como Ecuador y Colombia donde la empresa líder de producción cervecera Bavaria (SAB Miller) facturó más de 2700 millones de dólares al año; los subproductos de esta producción son una alternativa disponible que resulta difícil dimensionar por la gran cantidad en la cual son generados. Para la industria animal es una gran fuente de recursos los cuales dependiendo de la especie se pueden suministrar raciones en forma seca o húmeda. De acuerdo a la cantidad y calidad de las proteínas y aminoácidos de este subproducto se permite diseñar formulados económicos para distintas especies zootécnicas; mismas que al competir con ingredientes más costosos como es el caso de las tortas de soya misma que presenta una mayor cantidad de proteína.(Morales, 2015, p. 1)

1.5. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis, es un microorganismo que se encuentra generalmente en el suelo y tiene entre sus distintas características ser una bacteria Gram positiva, aerobia facultativa, catalasa positiva, tiene la capacidad especial de formar esporas resistentes, lo cual permite al organismo tolerar condiciones ambientalmente extremas, entre las características de las colonias son redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café; se puede desarrollar en un Ph mínimo de 4.9 y máximo de 9.3 además tiene una $A_w = 0.93 - 0.95$.

Es capaz de Producir una gran variedad de enzimas como las proteasas, amilasas, glucosidasas y otras enzimas (algunas hidrolíticas) que le permiten descomponer un sin número de moléculas complejas de los alimentos (sustratos) y las transforman en nutrientes más simples mismos que ayudan en el ciclo nutritivo de los animales. (Costa Marcia, 2006, p. 21)

Estos compuestos son absorbidos más rápidamente por el animal o pueden ser empleados por otras bacterias beneficiosas para el establecimiento de una microflora intestinal balanceada. El empleo de las bacterias del género *Bacillus* y sus endosporas también viene dado por su capacidad de producción de enzimas, estas además de mejorar la digestión en el hospedero, son capaces de inhibir el crecimiento microbiano de bacterias dañinas.(Aguavil, 2012, pp. 24–25)

Además *B. subtilis*, es un microorganismo ubicuo, no es considerado patógeno o toxigénico de los humano, animales, o plantas, por lo que el potencial riesgo asociado al uso de este, en instalaciones industriales es bajo. Es usado en la producción comercial ya que posee una

reconocida actividad antimicrobiana (pertenecen a la familia Iturina), lo cual ha permitido emplearlo como un agente de control biológico. Produce más de dos docenas de antibióticos, donde la clase predominante son los de naturaleza peptídica. (Costa Marcia, 2006, p. 22)

1.5.1. Formación de esporas de *B. subtilis*

Las esporas son estructuras termotolerantes, resistente a la sequía, radiación ultravioleta y solventes orgánicos; Al finalizar la fase exponencial *B. subtilis* surgen una serie de cambios en las células tanto estructurales como metabólicas, donde la formación de esporas es el proceso final. Los estímulos principales para que se dé inicio la esporulación, son una población microbiana alta y la limitación de nutrientes.

El inicio del proceso de esporulación es regulado por la proteína de unión a DNA Spo0A, la cual actúa como regulador maestro del proceso esta tiene influencia directa o indirectamente sobre la expresión de más de 500 genes durante el temprano desarrollo de *B. subtilis*. En la segunda etapa se producen enzimas hidrolíticas, como las proteasas y amilasas, y esta termina con la formación de un septo en un polo de la célula, seguidamente ocurre el engullimiento de la pre espora hasta la formación de la corteza, la cubierta, la maduración de la espora y la lisis celular. La duración por cada etapa es de aproximadamente una hora. (Ramos y Rodriguez, 2014, p. 22)

En síntesis durante la esporulación se forman dentro de un mismo cuerpo dos células; la célula madre y la pre espora, estas mantienen una comunicación para poder de una forma metabólica y ordenada, formar la espora, esta transición es gobernada por seis proteínas reguladoras llamadas factores sigma, que se unen a la ARN polimerasa y determina qué promotores serán reconocidos para su posterior transcripción. (Ramos y Rodriguez, 2014, p. 23)

1.5.2. Clasificación Científica

La primera vez que fue identificado fue en el año 1835 y reconocido por Christian Gottfried Ehrenberg y su nombre fue rectificado por Ferdinand Cohn en 1872.

Tabla 2 – 1: Taxonomía de *Bacillus subtilis*

Reino	Mónera
Filo	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Bacillales</i>
Familia	<i>Bacillaceae</i>
Genero	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>Bacillus subtilis</i>

Fuente: (RUEDA, 2015, p. 18)

1.6. Fermentación en estado Sólido - FES

Está definida como un cultivo de microorganismos adheridos a un soporte sólido poroso y humedecido en el cual el medio líquido está extendido en una capa muy fina en contacto con una interface aérea; siendo el material sólido la fuente energética, donde el sustrato puede estar formado por un material sólido inerte y húmedo, al cual se le adiciona una fuente energética. Las bacterias, levaduras y hongos son los microorganismos que pueden crecer en fermentación sólida, pero la mayoría de las investigaciones se llevan a cabo con hongos filamentosos. Sin embargo las esporas de *Bacillus subtilis* han demostrado que su tolerancia a bajas actividades de agua y condiciones de alta osmolaridad hacen que la microflora natural más adecuada para la FES. (Diaz, 2013, pp. 11–12)

En un proceso de FES, por lo general requiere de agregar agua si el sustrato posee un elevado contenido de humedad y no necesariamente se tiene que inocular con alguna especie de microorganismo; sin embargo existe la posibilidad de potencializar el crecimiento de algunas de las especies microbianas de las que se encuentran de manera natural en los sustratos; algunos de estos tienen una amplia diversidad de microorganismos. (Diaz, 2013, p. 12)

FES debe cumplir con varios requerimientos como: Poseer una matriz porosa que puede ser biodegradable o inerte, y requiere presentar una gran superficie de área por volumen dentro del rango de 10^3 o $10^6 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ que permita el crecimiento microbiano en la interface sólido-líquido. Debe absorber agua en una o varias veces su propio peso con una actividad de agua relativamente grande en la interface sólido-líquido para poder permitir una alta velocidad de los procesos bioquímicos. (Diaz, 2013, p. 12)

La matriz sólida debe estar libre de contaminantes y de inhibidores del crecimiento de los microorganismos y debe ser capaz de absorber o contener sustratos para el crecimiento microbiano como carbohidratos, fuentes de nitrógeno y sales minerales. Estas condiciones son cumplidas por la mayoría de los soportes naturales utilizados en la fermentación sólida como el bagazo de caña, el salvado de trigo, etc. (Díaz, 2013, p. 15)

La fermentación en estado sólido resulta ser un proceso que permite el aprovechamiento de fuentes no convencionales de carbohidratos mediante el uso de microorganismos en medios sólidos con ausencia de agua libre, donde el sustrato sobre el cual actúa el microorganismo no está disuelto ni en suspensión ni en un gran volumen de agua; este sustrato tiene un alto porcentaje de humedad esto dependerá del microorganismo a utilizar. El uso de la FES de subproductos de la agroindustria constituye una alternativa ideal para el aprovechamiento de estos, pues ayudan a mitigar la contaminación ambiental provocada por la rápida descomposición de los mismos. (Díaz, 2013, p. 7)

TABLA 3 - 1: TIPOS DE FERMENTACIONES DE ALGUNOS MICROORGANISMOS

Tipo de fermentación	Productos	Organismos
Alcohólica	Etanol + CO ₂	Levadura (<i>Saccharomyces</i>)
Ácido láctico	Ácido láctico	Bacterias del ácido láctico (<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , etc)
Ácido mixto	Ácido láctico, ácido acético, etanol, CO ₂ , H ₂	Bacterias entéricas (<i>Escherichia Salmonella</i>)
Butanodiol	Butanodiol, ácido láctico, ácido acético, CO ₂ , H ₂	Bacterias entéricas (<i>Aerobacter</i> , <i>Serratia</i>)
Ácido butírico	Acetona butírico, ácido acético, CO ₂ , H ₂	Algunos clostridios (<i>Clostridium butyricum</i>)
Acetona - butanol	Acetona, butanol, etanol	Algunos clostridios (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
Ácido propiónico	Ácido propiónico	<i>Propionibacterium</i>

Fuente: (Veloz, 2004)

1.6.1. Ventajas y desventajas de FES

1.6.1.1. Ventajas (Chacha Pozo y Díaz, 2016, pp. 4, 5)

- Simplicidad de los medios de cultivo, pues por lo general un único sustrato puede proporcionar la mayoría de nutrientes necesarios.
- Fermentadores con menores requerimientos, debido a que los sustratos se utilizan más concentrados y por lo general no se utiliza grandes volúmenes de agua.
- Mayor simplicidad en el diseño de los fermentadores y de los sistemas de control.
- Mayor facilidad en la aplicación del inóculo, se puede utilizar las esporas directamente en la mayor parte de ensayos y experimentos.
- Facilidad para el escalado de los procesos.
- Necesidades reducidas de disolventes para la extracción de los productos.
- Rendimientos comparables, e incluso superiores, a los correspondientes procesos en cultivo sumergido
- Reducido riesgo de contaminaciones bacterianas, menos aptas para soportar la baja actividad de agua que caracteriza a estos sistemas.
- Posibilidad en locaciones de trabajar incluso en condiciones no asépticas.
- Elevada aireación del sistemas, lo que hace a esta modalidad de cultivo especialmente adecuada a aquellos procesos que impliquen un metabolismo oxidativo intenso.
- Bajos requerimientos energéticos.
- A menudo no es preciso auto clavar, airear ni agitar.
- Ambiente similar al de los hábitats naturales de los microorganismos utilizados.
- Reducido volumen de efluentes.

1.6.1.2. Desventajas (Chacha Pozo y Díaz, 2016, pp. 4, 5)

- Frecuente necesidad de pretratamiento de los sustratos (molienda, pre hidrolisis parciales).
- Dificultad para mantener los niveles óptimos de humedad durante la fermentación.
- Ausencia de métodos analíticos simples para determinar el crecimiento microbiano.
- Dificultad de control y regulación de variables del cultivo como temperatura, humedad, pH y oxígeno libre durante el proceso.
- Dificultad para la agitación en aquellos procesos que así lo requieran.
- Frecuente necesidad de inóculo voluminoso.

- Escasez (al menos por el momento) de diseños y desarrollos de ingeniería para la construcción de los fermentadores, así para ciertas operaciones (inoculación, extracción de los productos).

1.7. Aditivos para la alimentación Animal

En los últimos años el auge de la biotecnología moderna se ha vinculado entre sus muchos procesos a la industria de alimentos, donde han desarrollado distintos procesos entre los cuales se destaca la fermentación tanto líquida, sólida o semi sólida mismas que permiten obtener nuevos productos compuestos con un alto valor nutricional que son usados como aditivos de la industria alimentaria. (Parzanese, 2016, p. 1)

Se define como un aditivo alimenticio a aquellas sustancias, compuestos, microorganismos y distintos preparados extras que se agregan junto con la dieta de las distintas especies zootécnicas; estos aditivos suele ser provenientes de varias fuentes o materias primas; las cuales se añaden premeditadamente y en menor proporción a los piensos, balanceados, pastos o al agua. (ELIKA, 2011, p. 1)

Los aditivos ayudan a realizar específicamente una o varias de las funciones entre las cuales destacan:

- Influir de forma positiva en las características de los piensos y los productos animales.
- Satisfacer los requerimientos alimenticios de los animales.
- Influir de manera positiva en los efectos ambientales de la producción animal.
- Respalda positivamente la producción, el bienestar de los animales, especialmente actuando en la flora gastrointestinal o la digestibilidad de los piensos y balanceados.
- Tener un efecto coccidiostático o histomonostático.

1.7.1. Categorías de aditivos para alimentación animal

El Consejo de la Unión Europea en su el Reglamento (CE) N° 1831/2003 clasifica a los aditivos para alimentación animal en cinco categorías:

- a) **Aditivos tecnológicos**, se definen como cualquier sustancia añadida a los piensos con fines tecnológicos y que incluyen a los conservantes, antioxidantes, emulgentes, estabilizantes, espesantes, gelificantes, ligantes, anti aglomerantes, reguladores de la acidez, aditivos para ensilaje y desnaturalizantes. (Carro, 2006, p. 2)
- b) **Aditivos organolépticos**, se definen como cualquier sustancia la cual añadida a los piensos, mejora o modifica las distintas propiedades organolépticas de las características visuales de los alimentos de origen animal también se incluye en este grupo a los colorantes y aromatizantes. (Carro, 2006, p. 2)
- c) **Aditivos nutricionales**, se incluyen a las vitaminas, provitaminas y sustancias químicamente definidas de efecto análogo, oligoelementos o sus compuestos, aminoácidos sus sales y análogos a la urea y sus derivados. (Carro, 2006, p. 2)
- d) **Aditivos zootécnicos**, es cualquier compuesto utilizado para influir positivamente en la productividad de los animales sanos o en el medio ambiente y que incluyen a diversos grupos funcionales, como los digestivos, los estabilizadores de la flora intestinal y a otros aditivos zootécnicos. (Carro, 2006, p. 2)
- e) **Coccidiostáticos e histomonostáticos** Es uno de los grupos que suscita mayor interés, ya que su utilización puede mejorar el rendimiento productivo de los animales y disminuir los costes de producción a este grupo pertenecen son los probióticos, los prebióticos, los ácidos orgánicos, los preparados enzimáticos y los extractos vegetales. (Carro, 2006, p. 2)

1.8. Prebiótico

Se define a un prebiótico como el sustrato nutritivo de un probiótico. Son aquellas sustancias no digeribles por el ser humano y especies animales que forman parte de algunos alimentos. Estos pueden beneficiar al huésped estimulando de manera selectiva el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias intestinales.

Entre los prebióticos naturales se desatacan los presentes en fuentes como el trigo, la cebolla, los plátanos, el ajo, etc. Es decir compuestos donde se hallen sustancias como péptidas, lípidos, carbohidratos, alcoholes y fibra; estos pueden ser clasificados como prebióticos, y los

oligosacáridos de cadena corta, tales como MOS (MOS), el fructooligosacarídeos (FOS) y glucoligosacarídeos (SMO) el más estudiado. (Cordovez, 2014, p. 24)

La ingestión de fructooligosacárido (fibra) puede aumentar diez veces la representación numérica de las bacterias; tenemos un efecto prebiótico cuando: “los componentes no digeribles de la dieta resultan ser beneficiosos para el huésped porque producen el crecimiento selectivo y la actividad y/o de una o un número limitado de bacterias del colon”(Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006, p. 6)

La evidencia científica actual indica que los minerales junto con la fibra llegan al colon y allí son liberados, lo cual permite su absorción. Los hidratos de carbono de cadena corta aumentan la absorción colónica de zinc, calcio y magnesio al provocar la atracción de agua por ósmosis, en la que se disuelven dichos minerales.(Tomaló, 2007, pp. 46–47). Los efectos fisiológicos de la fibra a nivel del colon están estrechamente relacionados con la propiedad de fermentable y efecto prebiótico, ver la figura 2-1. (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006, p. 8)

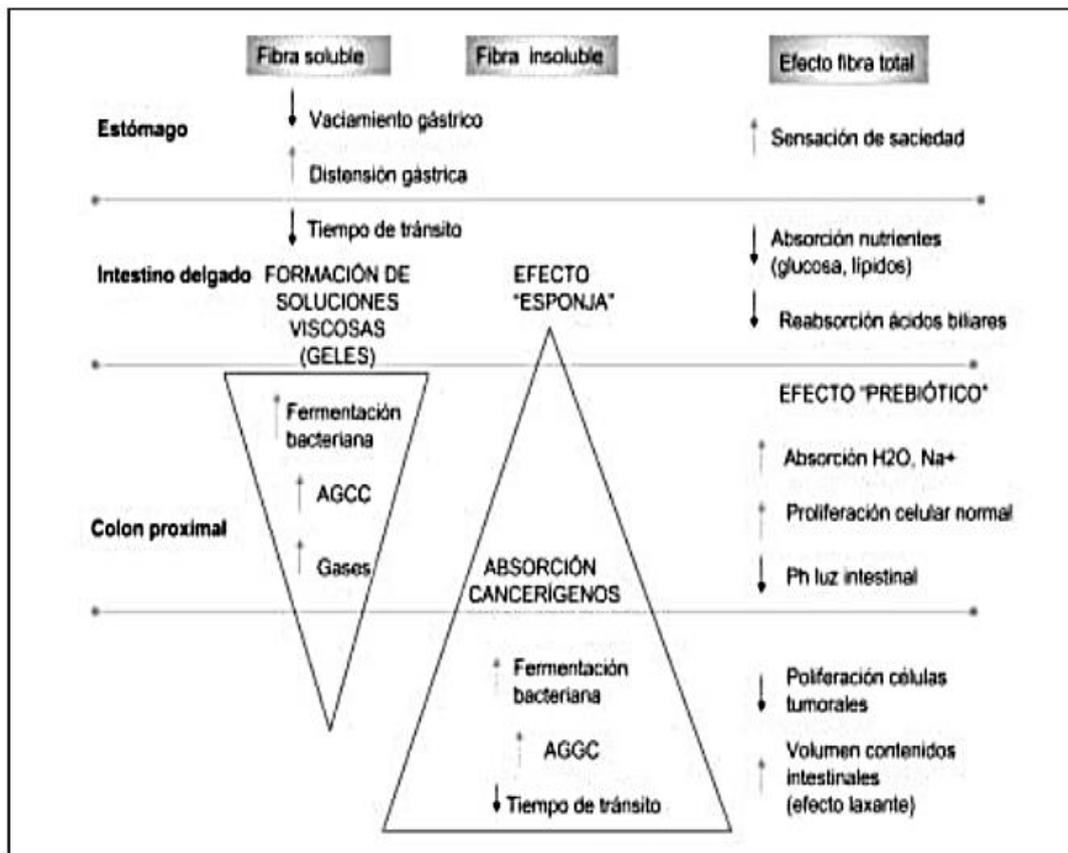


Figura 2-1: Diagrama de efectos fisiológicos de la fibra

Realizado por: (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006, p. 7)

1.9. Probiótico

Los probióticos están definidos como suplementos dietéticos fundamentados con en el uso de microorganismos vivos los cuales afectan positivamente al animal o ser humano huésped mediante el equilibrio de la microbiota intestinal. La OMS define a los probióticos como microorganismos vivos, los cuales se administran en cantidades apropiadas, y proporcionan beneficios para la salud del huésped. Donde la flora microbiana interviene dentro de las funciones digestivas adicionales del huésped para aumentar la gama de enzimas y proporcionar una barrera contra la introducción de patógenos y así prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales; a estos también se los conoce como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos. (Cordovez, 2014, p. 22)

En los postulados de Huchetson se dicta las funciones de protección que un microorganismo debe cumplir para ser considerado probiótico: ser compatible con el intestino, tener un tiempo de reproducción corto, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda llegar vivo al intestino, Es importante que estos microorganismos puedan ser capaces de atravesar la barrera gástrica para poder multiplicarse y colonizar el intestino.(Cagigas y Blanco, 2008, p. 65)

El efecto protector de los microorganismos probióticos se desarrolla mediante 2 mecanismos: primero el antagonismo el cual impide la multiplicación de los patógenos y la producción de toxinas que imposibilitan su acción patogénica, está dado por la competencia por los nutrientes o los sitios de adhesión. En segundo lugar tenemos la inmuno - modulación la cual protege al huésped de las infecciones, induciendo a un aumento de la producción de inmunoglobulinas, aumento de la activación de las células mononucleares y de los linfocitos.(Cagigas y Blanco, 2008, p. 66)

Es esencial que los probióticos permanezcan vivos durante su tránsito por el tracto gastrointestinal. Para potenciar la inmunidad, favorecer el equilibrio de la microflora colónica, incrementar la biodisponibilidad de algunos nutrientes, mejorar el tránsito y la motilidad intestinal, estimular la proliferación celular y elaboran ciertos productos fermentados beneficiosos. (Tomaló, 2007, pp. 37–38)

Los probióticos, proveen bacterias vivas beneficiosas que les da una excelente estabilidad si son protegidos del calor y humedad extrema. Por la relación tan estrecha entre el animal y la bacteria es importante que se administren los organismos correctos en una preparación de probiótico para cada especie.(Tomaló, 2007, pp. 38)

1.9.1. Uso de Probióticos en Animales

Entre los géneros microbianos más vinculados al uso de probióticos en organismos tenemos: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* y *Sacharomyces*, estos géneros han sido evaluados, estudiados y probados en varios productos tanto para el consumo animal y del ser humano; la fermentación de estos microorganismos da como resultado metabolitos secundarios y producción de enzimas .(Tomaló, 2007, p. 39)

El empleo de productos con propiedades probióticas surgen del interés de remplazar los antibióticos de la dieta animal, los cuales se usan para tener un buen balance de la microflora del tracto gastrointestinal y eliminar ciertos microorganismos patógenos; se busca por esta vía una reducción de alteraciones gastrointestinales en animales. Los antibióticos además de la destrucción de la microflora patógena dañan la microflora gastrointestinal benigna, estos presentan un efecto residual en los tejidos y productos de origen animal como la carne, los huevos y la leche.(Tomaló, 2007, p. 40)

El uso de probióticos como aditivos alimentarios proporcionan varios beneficios como:

- Estimular el crecimiento de los animales de corral.
- Incrementar la utilización del alimento.
- Aumentar la producción de huevos.
- Mejorar el estado de salud animal.

1.9.2. Ventajas de Usar Probióticos según. (Tomaló, 2007, p. 45)

- Prevenir las diarreas mediante la inhibición de la flora patógena causante.
- Disminuir la mortalidad que las diarreas provocan en animales de edad corta.

- Previenen ciertas enfermedades como ligadas al estado sanitario deficiente del animal con tránsito intestinal acelerado o que ha padecido diarreas; también las pulmonares y anorexias.
- Mayor absorción de los nutrientes de los formulados alimenticios, con el aumento del índice de conversión y su significado económico en ganancia de peso.
- Control higiénico ambiental de la producción.
- Al realizarse correctas fermentaciones intestinales, se logra homogeneizar y mejorar la textura y olor de las heces siendo estas aptas como fertilizantes.
- La mejora general en los lotes de animales en menor tiempo.
- Al mejorar la resistencia inmunológica del animal, se disminuye la utilización abusiva de antibióticos, su costo y dificultad de administración.
- En tratamientos de aves ponedoras, se evita la transmisión de salmonelosis a través de los huevos.
- Se ha comprobado que el intestino de los animales nacidos de madres tratadas con probióticos está libre de patógenos, lo que optimiza la capacidad de sobrevivir en las primeras 72 horas de vida.

1.9.3. Efectos beneficiosos del uso de *Bacillus*

Según Ross Tech (1999) las esporas de *Bacillus* unidas a otras especies de bacterias tales como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*, contribuyen a disminuir la acidez del intestino, favoreciendo los procesos digestivos y el control del crecimiento de Enterobacteriaceae en aves. Dentro de la actividad enzimática específica de algunas especies de *Bacillus* se citan: Se produce proteasa, amilasa, β -glucanasa y otras enzimas por *Bacillus subtilis*, produce proteasa, amilasa y otras enzimas el *Bacillus licheniformis* y produce β -glucanasa la especie de *Bacillus circulans*.

El empleo de endosporas de *Bacillus sp* puede contribuir a una disminución de acidez del intestino en las aves, favoreciendo el crecimiento de *Lactobacillus* en el TGI, estimulando el sistema inmune, contribuyendo a la resistencia contra el desafío de patógenos ambientales, Inhibiendo y controlando el crecimiento microbiano de bacterias dañinas y favorecen los procesos digestivos del (Anon, 1998).

Las endosporas de *Bacillus subtilis* que generalmente, permanecen viables en el alimento suministrado a aves son estables en la acidez gástrica, actúan contra patógenos específicos en el intestino e incrementan los *Lactobacillus* del tubo intestinal.(Milián, Pérez y Bocourt, 2008, p. 9)

1.10. Simbiótico

La asociación de un probiótico y un prebiótico se ha denominado simbiótico, la cual beneficia al huésped mediante el aumento de la sobrevivencia e implantación de los microorganismos vivos de los suplementos dietéticos en el sistema gastrointestinal. Esta aumenta la supervivencia de las bacterias en su trayecto dentro al intestino y por lo tanto aumenta la potencialidad para desarrollar más funciones en el aparato digestivo , existe un efecto sinérgico entre ambos, donde , los prebióticos contribuyen a estimular el crecimiento de ciertas cepas específicas mismas que contribuyen al establecimiento de una microflora bacteriana con efectos benéficos para la salud del individuo.(Cagigas y Blanco, 2008, p. 67)

La composición de la flora intestinal puede ser modificada por la ingesta de alimentos suplementados con prebióticos, probióticos o ambos (simbióticos). Algunas cepas bacterianas tienen mejores beneficios en una enfermedad determinada donde la dosis efectiva para tales propósitos sea suministrada. Se debe tratar de que lleguen al intestino en cantidad suficiente como para implantarse y colonizar la superficie. (Cagigas y Blanco, 2008, p. 67)

El desarrollo de alimentos funcionales que aporten carbohidratos no digeribles que puedan proporcionar cantidades óptimas de sustrato para la nutrición y desarrollo de las bacterias para el tracto gastrointestinal, activando la producción de Ácidos Grasos de Cadena Corta, ácido láctico y energía. (Cagigas y Blanco, 2008, p. 67)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de estudio

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Ambiental – LABIMA perteneciente a la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicado en el km 1 ½ de la Panamericana sur, ciudad de Riobamba. El trabajo de campo se lo realizó en la quinta “Luz Petrona” situada en la parroquia Calpi, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo.

Los análisis microbiológicos se desarrollaron en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Ambiental – LABIMA, los análisis de bromatológicos se realizaron en el Laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal perteneciente a la Facultad de Ciencias Pecuarias, mientras que los procesos de pretratamiento de la materia prima se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Laboratorio de Operaciones Unitarias perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Tabla 1-2: Condiciones meteorológicas de la ESPOCH y de la parroquia Calpi.

ESPOCH – RIOBAMBA Estación meteorológica ESPOCH (2018)	
PARÁMETRO	PROMEDIO
Altitud	2754 msnm
°Humedad relativa	70,2 %
Precipitación	97,1 mm
Temperatura	15,2 °C
Parroquia de Calpi GADPO 2017	
PARÁMETRO	PROMEDIO
Altitud	2750msnm
Humedad relativa	69%
Precipitación	62 mm
Temperatura	15°C

Fuente: GAVIN César (2018)

2.2. Hipótesis y Especificación de variables

2.2.1. Hipótesis General

- La Selección objetiva de una formulación de residuos agroindustriales permite la obtención de un sustrato adecuado para la producción de un simbiótico para alimentación animal a base de *Bacillus subtilis* mediante Fermentación en estado Sólido (FES).

2.2.2. Hipótesis Especificas

- Una formulación ideal (residuos agroindustriales rastrojo de maíz, afrecho cervecero, afrecho de trigo) sirve como sustrato para *Bacillus subtilis* mediante FES.
- Un simbiótico de calidad a base de residuos agroindustriales sirve para la alimentación animal.
- La prueba biológica de campo en pollos de engorde determina la aceptabilidad del producto
- El simbiótico producido incide en la ganancia de peso de pollos Broiler durante su fase de engorde.
- Esta tecnología genera un índice costo beneficio mayor a un dólar americano.

2.3. Variables

2.3.1. Variables dependientes

- Calidad del simbiótico
- Características del proceso
- Aceptabilidad del producto en pollos Broiler
- Costo de producción

2.3.2. Variables independientes

- Formulación de residuos agroindustriales (Sustrato) para la elaboración de un simbiótico.

2.4. Tipo y diseño investigación

Por el tipo de investigación: Aplicada, pues tiene un propósito directo el cual plantea elaborar un simbiótico con ayuda de *Bacillus subtilis* y un sustrato de residuos agroindustriales (rastros de maíz, afrecho cervecero, afrecho de trigo), dicho producto se utiliza como suplemento para alimentación animal en este caso para alimentación de pollos broiler en etapa de engorde.

Por la temporalidad: Longitudinal, porque a lo largo de la investigación se recolectaron datos en determinados periodos de tiempo, favorecen al desarrollo y evaluación de *Bacillus subtilis* en un sustrato de residuos agroindustriales, los niveles de sustrato para elaborar un simbiótico de calidad, además de pruebas de campo para determinar la eficiencia y aceptabilidad del simbiótico.

Por el tipo de enfoque: Cualitativo y Cuantitativo. Cuantitativo porque se tomó datos físicos, químicos, microbiológicos, bromatológicos. Cualitativo porque se tomó datos sin medición como cualidades organolépticas.

Por el diseño de investigación: Experimental. Se empleó el método estadístico Anova de un factor para las pruebas de laboratorio en las formulaciones del simbiótico para determinar la aceptación y calidad del mejor simbiótico elaborado a escala de laboratorio y en las diferentes dietas aplicadas para alimentación de pollos en etapa de engorde.

2.5. Unidad de análisis

Tabla 2-2: Tratamientos y formulaciones del simbiótico.

Tratamiento	Formulación	Réplicas
F1 simbiótico con residuos agroindustriales	20% Afrecho cervecero + 40% Afrecho de trigo + 35% Rastrojo de maíz + 5% Aditivos	Simbiótico F1 R1 Simbiótico F1 R2 Simbiótico F1 R3
F2 simbiótico con residuos agroindustriales	25% Afrecho cervecero + 40% Afrecho de trigo + 30% Rastrojo de maíz + 5% Aditivos	Simbiótico F1 R1 Simbiótico F1 R2 Simbiótico F1 R3
F3 simbiótico con residuos agroindustriales	30% Afrecho cervecero + 40% Afrecho de trigo + 25% Rastrojo de maíz + 5% Aditivos	Simbiótico F1 R1 Simbiótico F1 R2 Simbiótico F1 R3

Realizado por: GAVIN César (2018)

En la tabla 2-2: Formulación y tratamientos del simbiótico se detalla la cantidad porcentual de residuos agroindustriales y aditivos usados en el proceso de elaboración del simbiótico, se realizaron 3 réplicas para cada tratamiento con la finalidad de determinar mediante análisis la mejor formulación, para posteriormente realizar una prueba biológica en campo con pollos broiler en etapa de engorde.

Tabla 3 – 2: Unidad de análisis para la prueba biológica en campo del simbiótico producido.

Formulación	Proporción (g)	Unidades
Testigo	-	30 unidades separados en bloques de 10 unidades
F1	22	30 unidades separados en bloques de 10 unidades
F1	44	30 unidades separados en bloques de 10 unidades
Total		90 unidades pollos broiler en etapa de engorde

Realizado por: GAVIN César (2018)

En la tabla 2-3: Se describen las unidades de especies avícolas (pollos broiler) que se utilizaron para determinar el incremento de peso en un período de 15 días (etapa de engorde), aplicando una prueba testigo, y dos pruebas con el simbiótico (mejor formulado) utilizando las proporciones correspondientes a 22 g.Kg⁻¹ y 44 g.Kg⁻¹ de balanceado comercial.

2.6. Población de Estudio

En el desarrollo de este proceso se elaboraron 3 tratamientos en los que se usaron diferentes porcentajes de residuos agroindustriales (afrecho cervecero, afrecho de trigo, rastrojo de maíz), aditivos y solución esporas de *Bacillus subtilis*. Se realizaron 3 repeticiones para cada formulado tomando muestras de cada tratamiento respectivamente para realizar los distintos análisis de calidad, se utilizaron 90 pollos broiler de los cuales se dividieron 30 para aplicar cada dieta y divididos en bloques de 10 unidades.

2.7. Tamaño de muestra

Muestras de 100 g por cada formulado y repetición para los análisis bromatológicos, 100 g para análisis organolépticos, 5 g de cada formulado y repetición para cada conteo de esporas.

2.8. Selección de muestra

Una vez elaborado el simbiótico se procedió a abrir los biorreactores plásticos y se tomó una muestra desde el centro del bioreactor, este procedimiento se aplicó para las 9 biorreactores que contenían el simbiótico y las muestras que se tomaron fueron colocadas en fundas ziploc previamente rotuladas, obteniéndose un total de 9 muestras las mismas que fueron trasladadas al laboratorio de nutrición y bromatología animal, biotecnología en una caja refrigerada para sus respectivos análisis.

2.9. Técnicas de recolección de datos

2.9.1. Material biológico (inóculo)

El material biológico se obtuvo en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias, una vez madurada la cepa de *Bacillus subtilis* (fase de esporulación), se desarrolló una solución de esporas con ayuda de Tween 80 al 10% (agente astringente).

2.10. Métodos y Técnicas

2.10.1. Muestreo de la materia prima – residuos agroindustriales

Materiales

- Saquillo
- Cuerda

Método

El rastrojo de maíz se obtuvo en una cantidad representativa de la quinta “Luz Petronila” perteneciente a la parroquia Calpi. Posteriormente se realizó el proceso de tratamiento del residuo. Se tomó una muestra de 10 Kg, para los respectivos formulados y repeticiones respectivamente, mientras que el afrecho cervecero y afrecho de trigo se obtuvo de los “Molinos Anita” para en lo posterior realizar los tratamientos de residuos. Se tomó una muestra de 5 Kg de afrecho cervecero y 8 Kg de afrecho de trigo los formulados y repeticiones correspondientes; todas las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente y almacenadas en una bodega.

Con un marcador indeleble en cada una de las muestras se colocó información necesaria como el lugar de muestreo, personal responsable del muestreo y la hora del muestreo. Las muestras de los residuos agroindustriales recolectadas fueron trasladadas al Laboratorio de Biotecnología y Procesos Industriales perteneciente a la Facultad de Ciencias para los respectivos pretratamientos, y al Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal - LABIMA en la Facultad de Ciencias Pecuarias, en un tiempo de 48 horas luego de su muestreo, para su respectivo análisis.

2.10.2. Replicación de la cepa *Bacillus subtilis*.

Materiales

- Cepa de *Bacillus subtilis*
- Asa de siembra
- Cajas Petri
- Mechero
- Fósforos
- Papel film
- Marcador permanente punta fina
- Nutrient Agar
- Balanza analítica
- Espátula
- Papel Aluminio
- Frasco termo resistente de 1000 mL
- Probeta de 1000 mL
- Agua destilada
- Autoclave
- Incubadora

Método

Se preparó el medio de cultivo para lo cual se rotuló un frasco con capacidad para 1000 mL:

- Nutrient Agar: sobre papel aluminio se pesó 28 g de agar y se colocó en un frasco termo resistente con 1000 mL de agua destilada.

En el frasco termo resistente se colocó una varilla de agitación se homogenizó y disolvió el medio en el agitador magnético durante 15 minutos. Posteriormente se introdujo en el autoclave (a 121°C durante 15 minutos) las cajas Petri para esterilizar junto con el medio, una vez finalizado el proceso de auto clavado se llevó el material a una cámara de flujo laminar

y se dejó enfriar durante 10 minutos; se destapó el frasco y se colocó 15 mL del medio nutriente en 66 cajas Petri luego se debe dejar reposar las cajas durante 20 minutos y se aplica radiación UV durante este tiempo para evitar contaminación.

Con ayuda de un mechero el asa de siembra se esterilizo y una vez fría se procede a tomar una muestra de *Bacillus subtilis* y se realizó la siembra en cada una de las cajas aplicando la técnica de siembra por agotamiento por estrías, después se rotularon cada una de las cajas y luego se colocaron en la incubadora a 37°C por un lapso de 24 horas y se procedió a realizar el análisis de las colonias presentes.

2.10.3. Preparación de los residuos agroindustriales.

Materiales

- Trituradora
- Balanza
- Molino industrial
- Estufa de secado
- Afrecho de trigo
- Afrecho cervecero
- Rastrojo de maíz
- Bandejas de aluminio
- Saquillo

Método

Los residuos agroindustriales fueron tratados en el laboratorio de Operaciones Unitarias.

- El rastrojo de maíz fue lavado, triturado, secado, molido y tamizado hasta obtener un diámetro de partícula adecuada.
- El afrecho cervecero y de trigo fue secado, molido y tamizado hasta obtener un diámetro de partícula adecuada.

Todos los residuos agroindustriales una vez tratados fueron trasladados al laboratorio de biotecnología y microbiología animal para su uso posterior.

2.10.4. Preparación del inóculo

Materiales

- Cajas Petri con la cepa de *Bacillus subtilis*
- Tween 80 al 10 %
- Agitador magnético
- Varilla de agitación
- Agua destilada
- Frasco termo resistente de 1000 mL
- Probeta de 1000 mL
- Pera de succión
- Pipeta de 10 mL
- Cámara de flujo laminar

Método

Se tomó 1000 mL de agua destilada en una probeta y se colocó en un frasco termo resistente junto con 10 mL de Tween 80 al 10 % y la varilla de agitación; tomamos este frasco y llevamos al agitador magnético durante 15 minutos, llevamos esta solución a la cámara de flujo laminar y esterilizamos con radiación UV durante 10 minutos.

Tomamos las cajas Petri con la cepa de *Bacillus subtilis* madura y en cada una de ellas añadimos 5 mL de agua destilada y dejamos reposar por 3 minutos, agitamos durante 3 minutos y llevamos esta solución a un vaso de precipitación procurando obtener el mayor número de esporas posibles, rotulamos y almacenamos a 4 °C en la refrigeradora.

2.10.4.1. *Conteo de esporas*

Materiales

- Cámara de Neubauer
- Cubre objetos
- Microscopio
- Vaso de precipitación
- Pipeta Pasteur
- Espátula Muestra de la solución de esporas

Método

Tomamos el cubre objetos y lo colocamos sobre la cámara de Neubauer; con ayuda de una pipeta Pasteur tomamos 1 mL de solución de esporas y llevamos hacia la cámara de Neubauer donde esta se llena mediante capilaridad, colocamos la cámara de Neubauer en el microscopio y dejamos reposar por un tiempo de 3 minutos, finalmente conteo.

2.10.5. *Preparación del aditivo*

Materiales

- Probeta de 1000 mL
- 1 galón de agua destilada
- 1 Espátula
- Balanza Analítica
- Papel aluminio
- Vaso de precipitación de 50 mL
- 100 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 100 g KH_2PO_4
- 600 g Mezcla de sales minerales
- 1000 g de melaza
- 1 Erlenmeyer de 1000 mL

- Auto clave
- Cámara de flujo laminar
- Marcador permanente punta fina
- Cinta adhesiva

Método

Con ayuda de una balanza analítica se pesó 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4.10 g KH_2PO_4 , 10 g Mezcla de sales minerales, y 40 g de melaza; con ayuda de agua destilada mezclamos todas estas sustancias en un Erlenmeyer de 1000 mL y agitamos hasta disolver. Llevamos a la autoclave durante 15 minutos y a una temperatura de 121 °C. Dejamos reposar y enfriamos en la cámara de flujo laminar donde adicionalmente activamos la radiación UV para esterilizar durante 20 minutos. Este proceso lo realizamos para cada formulado y cada repetición.

2.10.6. Preparación del simbiótico

Materiales

- Solución de esporas
- 8000 g de afrecho de trigo
- 5000 g de afrecho cervecero
- 10000 g de rastrojo de maíz
- 18000 mL de Aditivos
- Espátula
- Balanza
- Bandejas de aluminio
- Autoclave
- Baldes plásticos de 2 litros
- Erlenmeyer junto con aditivo
- Papel aluminio
- Fundas ziploc
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora

Método

Cada residuo agroindustrial se pesó de acuerdo al porcentaje establecido siendo 1000 g el 100 % del formulado, posteriormente en un balde plástico con capacidad de 2 litros se mezcló los residuos según las distintas formulaciones y se añadió 40 mL de solución de esporas, con ayuda de una espátula se mezcló hasta obtener una masa homogénea y húmeda, se rotulo, empaco y se dejó en la incubadora a una temperatura de 37 °C. Esto se realizó para cada formulado y repetición.

Tabla 4 - 2: Residuos agroindustriales, porcentajes y peso usado en el simbiótico.

Formulado	Residuo	Porcentaje	Peso (g)
F1	Afrecho cervecero	20%	200
	Afrecho de trigo	40%	400
	Rastrojo de maíz	35%	350
	Aditivos	5%	50
F2	Afrecho cervecero	25%	250
	Afrecho de trigo	40%	400
	Rastrojo de maíz	30%	300
	Aditivos	5%	50
F3	Afrecho cervecero	30%	300
	Afrecho de trigo	40%	400
	Rastrojo de maíz	25%	250
	Aditivos	5%	50

Realizado por: GAVIN César (2018)

2.10.7. Análisis organolépticos del simbiótico (F1-F2-F3)

Materiales

- Cuchara plástica.
- Fundas ziploc
- Balanza.

Método

Se pesaron 150 g de cada formulado (F1, F2 y F3) las cuales se colocaron en “Fundas ziploc” previamente rotuladas para determinar el aspecto, color, olor y textura mediante los órganos de los sentidos.

2.10.8. Análisis de humedad del formulado

Materiales

- 1 kilogramo de formulado
- Papel aluminio
- Balanza analítica
- Estufa de secado

Método

Por triplicado se pesaron 100 g de cada formulado sobre papel aluminio, las muestras fueron colocadas en una estufa de secado a 75°C durante 72 horas, posteriormente se sacaron las muestras de la estufa de secado y se dejaron enfriar por lapso de 10 minutos, se tomaron los pesos de cada una de las muestras.

2.10.9. Análisis bromatológicos de los simbióticos F1, F2, F3.

Materiales

- Fundas ziploc
- Espátula
- Marcador permanente punta fina
- Balanza
- Gel de hielo
- Caja térmica

Método

De cada formulación del simbiótico se tomó 250 g y se colocaron en fundas herméticas ziploc previamente rotuladas, se ubicaron todas las muestras en la caja térmica y fueron trasladadas al Laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal de la facultad de Ciencias Pecuarias para realizar el análisis proximal.

2.10.9.1. Análisis de humedad Inicial

Materiales

- Bandeja de cristal
- Espátula
- Papel aluminio
- Balanza analítica
- Estufa
- Desecador
- Pinza

Método

En una balanza analítica pesamos 100 g de cada una de las muestras del simbiótico y las bandejas de cristal; en las bandejas de cristal previamente rotuladas colocamos las muestras y llevamos a la estufa a una temperatura de 65°C por 48 horas; luego de este tiempo colocamos las muestras en el desecador por media hora y realizamos los pesajes de cada muestra.

2.10.9.2. *Análisis de humedad higroscópica*

Materiales

- Balanza analítica
- Crisoles
- Espátula
- Papel aluminio
- Estufa
- Desecador

Método

Se pesa alrededor de 1 a 2 g de muestra, se pesa también el crisol previamente tarado y se registra estos pesos, depositamos la muestra en los crisoles y las llevamos a la estufa a una temperatura de 105°C por 24 horas luego de este tiempo colocamos las muestras en el desecador por media hora y realizamos los pesajes de cada muestra.

2.10.9.3. *Análisis de porcentaje de Cenizas*

Materiales

- Balanza analítica
- Crisoles
- Espátula
- Papel aluminio
- Estufa
- Desecador
- Lana de vidrio

Método

En este análisis debemos garantizar que antes de la calcinación total de la muestra para ello se precedió a realizar un pre calcinado de la misma esta se realizó en una estufa a 105°C por un tiempo de 24 horas; posteriormente la calcinación se realizó sobre lana de vidrio en una mufla por 4 horas a una temperatura de 465 °C. Al final se procedió a pesar los crisoles con la ceniza y se registra este peso.

2.10.9.4. Análisis de proteína cruda

Materiales

- Balones de proteína de 1000 mL
- Hoja de papel bond
- Balanza analítica
- Espátula
- Papel aluminio
- Digestores
- Probeta 500 mL
- Agua destilada
- Erlenmeyer 250 mL
- Granallas de Zinc
- Indicador
- Catalizador (sulfato de sodio más sulfato de cobre)
- Bureta de 25 mL
- Soporte
- Ácido sulfúrico 98 %
- Ácido bórico 2.5 %
- Hidróxido de sodio
- Marcador de tinta permanente punta fina

Método

El análisis se realizó con 1 – 2 g de muestra de cada formulado primeramente en la etapa de digestión se debe cerciorar que exista el sistema de vacío que permita la emanación de los gases dentro de la reacción del ácido sulfúrico + catalizador + muestra, en esta etapa la muestra debe reaccionar de un color negro hasta un color verde esmeralda. En la segunda etapa de destilación se debe permitir el contacto directo del destilado con el ácido bórico sin bajar la temperatura ya que si existe ese cambio de temperatura va existir una reabsorción del destilado. Para la etapa de titulación que se realiza con HCl 0.1N (ácido clorhídrico) debemos realizar una valoración del ácido para saber la concentración real que contenga el ácido para los cálculos posteriores.

2.10.9.5. Análisis de fibra cruda

Materiales

- Vaso de fibra de 600 mL
- Equipo de fibra
- Ácido sulfúrico
- Hidróxido de sodio
- Acetona
- Estufa
- Mufla
- Balanza analítica
- Espátula
- Papel aluminio
- Papel vidrio

Método

Se pesa una muestra de 1 a 2 g de muestra para este tipo de análisis debe ser completamente seca, este método mide cantidades variables de celulosa y lignina en la muestra la hemicelulosa; se colocó en el matraz y se adiciono 200 mL de la solución de ácido sulfúrico

en ebullición. Coloque en el condensador y se llevó a ebullición en un minuto; de ser necesario adiciónale antiespumante. Déjelo hervir exactamente por 30 minutos, manteniendo constante el volumen con agua destilada y moviendo periódicamente el matraz para remover las partículas adheridas a las paredes, al término del tiempo de ebullición, se retiró el matraz, reposó por un minuto y se filtró cuidadosamente usando una bomba de vacío; la filtración se debe realizar en menos de 10 minutos. Se lavó el papel filtro con agua hirviendo. Transfiera el residuo al matraz con ayuda de una pizeta conteniendo 200 mL de solución de NaOH en ebullición y deje hervir por 30 min como en paso, se precalentó el crisol de filtración con agua hirviendo y se filtró cuidadosamente después de dejar reposar el hidrolizado por 1 minuto. Lave el residuo con agua hirviendo, con la solución de HCl y nuevamente con agua hirviendo, para terminar con tres lavados con éter de petróleo. Coloque el crisol en el horno a 450°C por 4 horas y se enfrió en el desecador. Pese rápidamente los crisoles con el residuo (no los manipule) y colóquelos en la mufla a 450°C por 4 horas, déjelos enfriar en un desecador y péselos nuevamente.

2.10.9.6. *Análisis de Grasa*

Materiales

- Balanza analítica
- Espátula
- Papel aluminio
- Equipo de análisis de grasa
- Capuchones
- Vaso para análisis de grasa de 250 mL

Método

Realizo el pesaje de las muestras en papel aluminio, pese 1 g, registre el peso. Coloque en un papel limpio Na_2SO_4 , colóquelo en la muestra pesada Pese el papel aluminio con el residuo de la muestra, registre el peso. Coloque la muestra con el Na_2SO_4 en un dedal.

Introduzca un tapón de algodón desengrasado en la boca del dedal. Coloque el dedal dentro de la porta-dedal. Coloque los porta-dedales con dedales dentro de los ganchos metálicos que están ubicados en el aparato Goldfish.

Saque los beakers del desecador y proceda a poner una medida de Hexano de 25 mL, coloque el beaker con el hexano dentro del anillo metálico de rosca y en el aparato de Goldfish.

Se Abrió el grifo de agua que está conectado a los refrigerantes del aparato. Se extrae el extracto etéreo durante 4 horas. En este tiempo debe controlar que el hexano no se evapore.

Una vez realizada la extracción del extracto etéreo y al cabo de las 4 horas se Baja los calentadores coloque el beaker con el E.E. en la estufa a 105⁰C. Por 1/2 hora, saque los beakers de recuperación con el solvente que se encuentra en el equipo y ponga el hexano recuperado en el frasco destinado para este fin, saque los beakers con el E.E. de la estufa y colóquelos en el desecador por 1/2 hora para su enfriamiento. Péselos y registre el peso.

2.10.10.Prueba de campo en pollos broiler

Materiales

- Balanceado de engorde “Pro Aves”
- Simbiótico
- Comederos de acero inoxidable
- Bebederos plásticos
- Vitaminas
- Balanza digital
- Virusa
- Formol
- Chispeador
- Botas de caucho
- Cal
- Yodo
- Guantes
- Tabla triple
- Balde
- bandeja
- Agua

Método

En un galpón ubicado en Calpi de dimensiones de 4.5 m de ancho, 5.5 m de largo, con paredes de tabla y el piso de cemento se realizó la fase prueba de campo, se efectuó la desinfección del galpón con un chispeador mezclando 50 mL de creso por cada litro de agua y finalmente se esparció con cal para una mejor esterilización; posteriormente se recibió a los 90 pollos. Conforme avanzó la investigación se separó cada una de las unidades experimentales en bloques de 30 pollos y con separaciones de 10 unidades.

Se colocó virusa con un espesor de 15 cm de altura desde el piso, para evitar que la cama no se moje, se instalaron dos bandejas para la respectiva desinfección de las botas de caucho previo a entrar al galpón, en una tina se colocó agua limpia para eliminar el exceso de tierra en las botas, en la tina dos se colocó una solución de creso y yodo (3 mL de yodo por Litro de agua), también se instaló 1 comedero y un bebedero por bloque de pollos.

En cuanto a los estudios realizados en pollos broiler se trabajó con 90 pollos Broiler de 21 días de crecimiento. Hubo dos tratamientos (dietas con 22 g y 44 g por cada kilogramo de balanceado) y una prueba testigo formándose nueve bloques de diez aves, tres replicas por cada formulado, se realizó la prueba de campo alimentando a las aves a las 07:00 am y a las 4:00 pm. Se evaluó el incremento del peso en cada pollo y el consumo de alimento se determinó por diferencia entre la cantidad suministrada y la cantidad sobrante, actividad que se realizó diariamente, hasta el final del periodo de evaluación.

2.10.11. Análisis costo beneficio

Materiales

- Cuadernillo de apuntes
- Calculadora
- Computador

Método

Se Realizará la cotización de los materiales, sustancias y reactivos, mano de obra y transporte, que implica la producción con la finalidad evaluar la rentabilidad del producto y los beneficios económicos que obtuvieron de la venta de los pollos broiler calculado con la siguiente ecuación.

$$B - C = \frac{\text{Beneficios-contrabeneficios}}{\text{costos}}$$

ECUACIÓN 1

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Materia prima obtenida

Los residuos agroindustriales obtenidos tenían características según su composición:

- El rastrojo de maíz presentó un peso de 10 Kg este residuo presento distintas características como marchitamiento en ciertas partes de las hojas, tallo grueso y altura promedio de 1.5 a 2 m.
- El afrecho cervecero se pesó en 5 Kg y este presento un tamaño de partícula promedio de 5 mm a 8 mm, además esta presento un color café oscuro y una característica seca.
- El afrecho de trigo que se pesó fue de 8 kg este tuvo un tamaño de partícula promedio de 3 mm a 5 mm además un color café claro y ser de característica propiamente seca.

Según Suquilanda (1995, pp. 242-243), los sustratos que sirven fuente de alimento nutricional para los microorganismos mismos que deben tener una relación de carbono/nitrógeno (C/N) que esté en un rango entre 20:1 a 30:1 respectivamente.

Es importante tener en cuenta la relación de los residuos agroindustriales que se ocuparon en el experimento pues *Bacillus subtilis* necesita una fuente de carbono y nitrógeno disponible. La relación C/N del rastrojo de maíz es del 53:1, mientras que el afrecho cervecero tiene una relación C/N de 25:9 y el afrecho de trigo posee una relación C/N 51:1.

3.2. Replicación de la cepa *Bacillus subtilis*

Las cepas de *Bacillus subtilis* obtenidas como resultado de la siembra mostraron varias colonias de color blanco y con forma ovoide y diámetro de 2 a 4 mm de diámetro, situadas a lo largo de la estría sembrada sobre la superficie del agar nutriente; en todas las cajas petri se obtuvo un elevado crecimiento de colonias de *Bacillus subtilis* desarrolladas. Además no hubo rastro de presencia de agentes contaminantes. En la vista al microscopio se observa esporas con forma esférica y de color verde claro.

Según Castro, (2015, p. 10), que cultivó *Bacillus subtilis* en agar sangre de cordero al 5 % , obtuvo colonias, de 2 a 4 mm de diámetro, además estas tuvieron un aspecto liso, mucoide, rugoso; los bordes fueron ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos. Luego de una prueba de tinción de GRAM se pueden observar Bacilos Gram positivos de 0,8 mm de diámetro por 2 a 3 mm de largo con bordes redondeados. Presentan esporas esféricas y centrales que no deforman el bacilo.

3.3. Preparación de los residuos agroindustriales.

Los residuos agroindustriales fueron tratados en el laboratorio de Procesos Industriales perteneciente a la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

- El rastrojo de maíz fue lavado con agua potable, secado al ambiente por 4 horas, posteriormente este se cortó para reducir su tamaño, se trituró en una trituradora de cuchillas y martillos para poda, posteriormente se molió en un molino de trituración. Se continuó con el proceso de secado a una temperatura de 75⁰C por 3 horas, posteriormente se tamizó con un tamizador de diámetro de partícula de 2 mm.
- El afrecho cervecero y el afrecho de trigo fue molido en un “molino de trituración”, se tamizó con un tamizador de diámetro de partícula de 2 mm.

Díaz Sanchez, (2009, pp. 39–40) en su estudio menciona que el tamaño de partícula es uno de los factores más importante a tener en cuenta para sustratos; las partículas pequeñas proporcionan una gran área específica la cual afecta de manera positiva al desarrollo del microorganismo; sin embargo una partícula demasiado pequeña genera un espacio inter partícula reducido, lo cual disminuye la eficiencia de la respiración/aireación dificultando el crecimiento microbiano. En su trabajo cita que los resultados del estudio determinaron que la máxima producción para FES se obtenía cuando se utilizaban en un rango de partículas de 1,2 a 1,6 mm, mientras que los valores más bajos se analizaban con partículas de 1,7 a 2 mm. Esto debido a que las partículas de este tamaño presentaban mayor porosidad, lo cual provoca una mejor transferencia de calor y materia aumentando la producción.

3.4. Preparación del inóculo bacteriano de *Bacillus subtilis*.

El inóculo formado con la cepa de *Bacillus subtilis*; un color amarillo oscuro y se obtuvo un volumen de 330 mL de solución. Posteriormente se realizó el conteo de esporas obteniendo 4.06×10^7 UFC. ml^{-1} De solución de esporas.

E Maldonado Chávez, MC Rivera Cruz, F Izquierdo Reyes, (2010, p. 5) cita en su experimento donde ocupó un inóculo bacteriano de esporas el cual fue de 250×10^6 UFC. ml^{-1} Y 40×10^5 UFC ml^{-1} de inóculo de hongos para su experimento “Efectos De Rizosfera, Microorganismos Y Fertilización En La Biorremediación Y Fitorremediación De Suelos Con Petróleos Crudo Nuevo E Intemperizado”.

3.5. Preparación del aditivo.

Se obtuvo 2 litros de aditivo para cada formulado y repetición, los reactivos como $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 , mezcla de sales minerales y melaza fueron disueltos por completo en agua destilada; el aditivo obtenido fue de color negro y olor dulce agradable. Es importante que antes de iniciar la fermentación se realiza una selección de condiciones de proceso fermentativo donde también se adiciona nutrientes al sustrato como se plantea en el trabajo de grado

Sanabria Rodríguez Y Sarmiento Lemus (2017, pp. 59–60) en su experimento evalúan la adición de nutrientes como Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 $(NH_4)_2SO_4$ en las siguientes concentraciones $4,45 \text{ g. } L^{-1}$ $1,5 \text{ g. } L^{-1}$ y $1 \text{ g. } L^{-1}$ respectivamente; donde evalúa el crecimiento microbiano durante el proceso fermentativo y la producción de PHA. En esta referencia bibliográfica utilizaron una cepa microbiana (*Bacillus sp.*), de la misma familia a la utilizada en el presente trabajo de titulación *Bacillus subtilis*.

3.6. Análisis de humedad del simbiótico.

$$\%H = \frac{P1-P2}{P1} * 100$$

Ecuación 2

Tabla 1-3: Pesos inicial y final de muestras del simbiótico

FORMULADO	PESO INICIAL	PESO FINAL
F1	100.5 g	41.8 g
F2	100.4 g	41.4 g
F3	100.4 g	42.7 g
\bar{x}		41.96 g

Realizado por: GAVIN César (2018)

$$\%H = \frac{100g - 41,96g}{100g} * 100 = 58,2\%$$

En la tabla 3-1: Pesos inicial y final de las muestras de los simbióticos preparados se pueden observar los pesos correspondientes a la F1 nos dio un peso inicial de 100.5 g un peso final de 41.8 g, para F2 se obtuvo un peso inicial de 100.4 g y un peso final de 41,4 g, para F3 se obtuvo un peso inicial de 100.4 g y un peso final de 42.7 g, dando como resultado la media del peso final 41.96 g la media del peso inicial es 100 g, mediante el uso la ecuación 2 se obtuvo el porcentaje de humedad de 58.21%.

Ferrer, Machado y Brieva, (2014, p. 14) señalan que la actividad de agua (*aw*) del sustrato tiene una participación muy importante en la actividad microbiana, ser el factor clave para permitir el tipo de microorganismo a desarrollarse en dicho sustrato. En los procesos de FES la *aw* es muy variada, al ser el componente principal de la biomasa, sirviendo como fase para difusión de las enzimas y los nutrientes, al mismo tiempo que permite el intercambio gaseoso. *Bacillus subtilis* se desarrolla correctamente con un rango de actividad de agua de mínimo de 0.90 y máximo de 0.95 (90 – 95 %).

Una humedad elevada en el sustrato (>60 %), causa una disminución de la capacidad de acción de los poros del sustrato, dificultando la difusión del oxígeno. Por el contrario, una baja humedad (<30 %) no permite un crecimiento adecuado del microorganismo ni una disponibilidad importante del sustrato.

3.7. Análisis bromatológicos de los simbióticos F1, F2, F3.

Los análisis bromatológicos completos fueron realizados por en el laboratorio de bromatología y nutrición animal.

Tabla 2-3: Análisis proximal de los simbióticos F1-F2-F3

CONTENIDO NUTRICIONAL	F1	F2	F3
Ho (%)	76.59	71.71	72.65
H (%)	6,5	7	6,4
E.E (%)	3,4	3,0	2,9
F.C (%)	16	14,9	15,5
P.C (%)	13	13	12
CENIZAS (%)	9,7	7,4	8,4
ELN (%)	51,4	54,7	54,8

Realizado por: GAVIN César (2018)

El análisis proximal de los simbióticos F1-F2-F3 se indican en la tabla 3-2: Todos los datos obtenidos se trabajaron con las medias de las réplicas para cada formulación, existen diferencias significativas al 5 % es diferente el análisis proximal debido a la composición de cada formulación. Se observó que el pH promedio de las formulaciones F1- F2- F3 y sus réplicas dieron como resultado para \bar{X} F1 pH de 5.4 , \bar{X} F2 que fue de 4.7 y \bar{X} F3 con un pH de 6.1 dados estos valores no se encontró diferencia significativa entre en las formulaciones en cuanto al pH.

Para el parámetro de Humedad higroscópica se encontró \bar{X} F1 6,5 %, para \bar{X} F2 7 % y para \bar{X} F3 6,4 % sin que existan diferencias significativas entre las 3 formulaciones. Los resultados del parámetro porcentaje de cenizas se encontró \bar{X} F1 9,7 %, para \bar{X} F2 7,4 % y para \bar{X} F3 8,4 % sin que existan diferencias significativas entre las 3 formulaciones. En cuanto al parámetro a grasa se encontró \bar{X} F1 3,4 %, para \bar{X} F2 3,0 % y para \bar{X} F3 2,9 % no se encontró diferencias significativas entre las 3 formulaciones. Para el parámetro proteína cruda se determinó para \bar{X} F1 13 %, para \bar{X} F2 13 % y para \bar{X} F3 12 % sin que existan diferencias significativas entre las formulaciones, \bar{X} F2 y \bar{X} F3 son iguales . El parámetro fibra cruda encontró \bar{X} F1 16 % \bar{X} F2 14,9 % - \bar{X} F3 15,5% no se encontró diferencias significativas entre las 3 formulaciones. Para el caso del ELN

se determinó para \bar{X} F1 51.4 %, para \bar{X} F2 54,7 % y para \bar{X} F3 54,8 % no se presentó diferencias significativas entre \bar{X} F1, \bar{X} F2 y \bar{X} F3.

Los valores del extracto libre de nitrógeno son mayores sin embargo no tienen diferencias significativas entre ellos, esto se debe posiblemente a la calidad y al tipo de cada residuo agroindustrial.

Los valores difieren de los análisis del presente estudio ya que fueron realizados en materia húmeda mientras que los análisis de presentados en esta investigación se realizaron en base seca según.

Valores reportados por Toledo, (2008, p. 71) en su investigación “Residuos de Maíz y Quinoa como potenciales sustratos para el cultivo de hongos comestibles *Pleurotus ostreatus*” cita los valores del análisis proximal de su sustrato formulado comprendía valores de proteína 20.72 %, fibra 17.98 %, grasa 1.7 %, ceniza en 13.4 % y humedad en 82.58 % , mientras que la media del análisis proximal del mejor simbiótico formulado “F3” (30 % Afrecho cervecero , 40 % Afrecho de trigo , 25 % Rastrojo de maíz y 5 % Aditivos) fue proteína 12 % , fibra 15,5 %, humedad 6,4% y cenizas 8,4%. El valor que muestra una diferencia significativa es el de proteína cruda esto se debe al tipo de sustrato que más difiere por el tipo de residuo usado en cada investigación.

3.8. Análisis organolépticos de los simbióticos (F1-F2-F3).

Tabla 3-3: Resultados de análisis organolépticos de los simbióticos F1-F2-F3.

Formulación	Olor	Color	Consistencia	Calificación
F1R1	Dulce suave	Café Oscuro	Blanda - semisólida	Bueno
F1R2	Dulce suave	Café Oscuro	Blanda - semisólida	Bueno
F1R3	Dulce suave	Café Oscuro	Blanda - semisólida	Bueno
F2R1	Dulce suave	Chocolate Oscuro	Blanda - semilíquida	Regular
F2R2	Dulce suave	Chocolate Oscuro	Blanda - semilíquida	Regular
F2R3	Dulce suave	Chocolate Oscuro	Blanda - semilíquida	Regular
F3R1	Dulce suave	Café Obscuro	Blanda - semisólida	Muy bueno
F3R2	Dulce suave	Café Oscuro	Blanda - semisólida	Muy bueno
F3R3	Dulce suave	Café Oscuro	Blanda - semisólida	Muy bueno

Calificación cualitativa

Realizado por: GAVIN César (2018)

En la tabla 3-3: Resultados de análisis organolépticos del simbiótico F1-F2-F3 y sus repeticiones se pudo determinar que F1R1, F1R2, F1R3 presentaron un olor dulce suave similar a la de un balanceado comercial y su coloración café obscura y chocolate obscura; presentaron una consistencia blanda semisólida, F1 y F3 mientras que F2 presento una consistencia blanda semilíquida; la coloración fue chocolate obscuro para F2 y café obscuro para F1 y F3; las tres formulaciones presentaron un olor dulce suave. Estos análisis fueron evaluados por un grupo de 5 personas.

Betancourt, (2006) cita en su artículo “Evaluación de la calidad de los Forrajes” que el análisis organoléptico es una evaluación basada en la apreciación subjetiva de la calidad de un ensilaje a través de los sentidos. La exactitud de este método está sujeta a la experiencia del evaluador y a sus posibilidades para clasificar los rangos intermedios dentro de las categorías establecidas entre “muy bueno y de mala calidad”.

3.9. Resultado del simbiótico formulado

Los birreactores con los distintos simbióticos formulados fueron abiertos luego de 48 horas de fermentación en estado sólido a una temperatura de 37⁰C en una incubadora, estos formulados no presentaron agentes de contaminación, los formulados presentaron un color café oscuro, masa densa; el conteo de esporas nos dio como resultado una alta concentración de esporas de *Bacillus subtilis* siendo 1,80x10⁸ UFC. g⁻¹ Para F3R3 el conteo más alto y 2.29x10⁷ UFC. g⁻¹ del F2R1 el más bajo.

Para seleccionar el simbiótico mejor formulado nos basamos en una matriz de evaluación con los resultados de los análisis obtenidos además se realizó una prueba estadística en el programa IBM – SPSS denominada “Modelo General Univariante” para comprobar los resultados obtenidos.

Tabla 4-3: Matriz de evaluación con promedios de los análisis de los formulados.

Tratamientos	Resultados de Análisis										£ de puntos	Calificación		
	\bar{X} HUMEDAD	S O H Z C P	\bar{X} P.C.	S O H Z C P	\bar{X} F.C.	S O H Z C P	\bar{pH}	S O H Z C P	\bar{X} E.E.	S O H Z C P			\bar{X} CONTEO DE ESPORAS UFC. g^{-1}	S O H Z C P
F1	76.9	10	13	10	16	10	5.4	9	3,4	8	1.0975×10^8	8	55	BUENO
F2	72	8	13	9	14.9	9	4.7	8	3,0	8	9.525×10^7	7	49	BAJO
F3	73.3	9	12	9	15.5	9.5	6.1	10	2.9	10	1.80×10^8	10	57.5	MEJOR

(\bar{X}) media promedio de Proteína cruda (P.C.) – Fibra cruda (F.C.) - Extracto etéreo (E.E.) – Potencial de hidrogeno (pH) Conteo de esporas.

Calificación en escala 1 – 10 puntos. Sumatoria de puntos en una escala 1 – 60 puntos.

Realizado por: GAVIN César (2018)

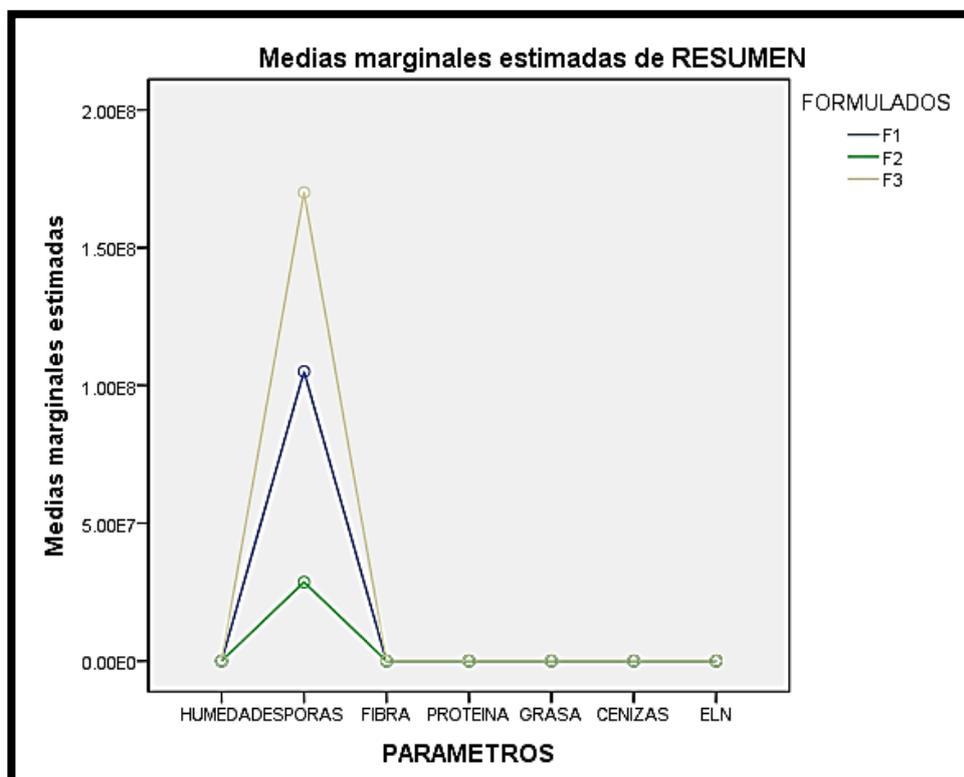


Gráfico 1-3: Resultado estadístico del “Modelo General Univariante”

Realizado por: GAVIN César (2018)

Los resultados obtenidos en la matriz de evaluación dieron como resultado que el mejor simbiótico formulado fue el tratamiento denominado “F3”, el cual fue formulado con una mezcla de afrecho cervecero 30 %, afrecho de trigo 40 %, rastrojo de maíz 25 %, aditivos 5 %. Este tuvo un porcentaje de humedad de 73.3 %, un valor de 12 % de proteína cruda, un valor de fibra de 15.5 %, un pH 6.1 además de un 2.9 % de extracto etéreo además de un conteo de esporas de 1.80×10^8 UFC. g^{-1} Y su análisis organoléptico fue evaluado como “muy bueno”; el formulado “F3” fue validado con el estadístico “Modelo General Univariante”.

En el mercado tenemos varios formulados a base de esporas bacterianas un ejemplo es “AP01 - Probióticos para pollos de engorde” de la marca PANGOO el cual presenta un consorcio bacteriano de distintas especies bacterianas como *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*, *Lactobacillus* de plantas, *Bacillus licheniformis*, *Candida utilis* y muchas enzimas de alta actividad; este producto tiene un recuento viable de 8×10^9 UFC. g^{-1} . De la misma marca tenemos “EP1004 - Probióticos para pollos de engorde” Cuyo recuento es de 2×10^8 UFC. g^{-1} con una formulación especializada de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*.

3.10. Prueba de pollos en la etapa de Engorde

Tabla 5-3: Promedio de raciones alimenticias suministradas a pollos broiler.

Formulaciones	Total	Total
	g	Kg
Blanco testigo	-	-
T1 Dieta 97:3	22	1
T2 dieta 95:5	44	1

Realizado por: GAVIN César (2018)

En la tabla 5-3: Se detalla el promedio de raciones alimenticias dadas en la etapa de engorde. Esta fue suministrada durante 3 días en la etapa de crecimiento esto para adaptación de las aves, posteriormente durante 15 días en etapa de engorde (semanas 6 y 7 de la vida de los pollos), las raciones fueron suministradas por las mañanas y las mismas dietas por las tardes.

El probiótico comercial de la marca PANGOO “AP01 - Probióticos para pollos de engorde” cuyo origen procede de China viene en presentaciones de 1 Kg por cartón y se suministra en una dosis de Alimentación de 1-2 Kg. ton^{-1} de alimento. Otro probiótico comercial llamado PANGOO PLUS - Aves de Corral probióticos “POL-03S” se debe dosificar 200g para 4000 pollos por día, este es soluble y se administra en las raciones de agua.

Se evidenció una nula cantidad de desperdicio en las distintas dietas lo que indica que los pollos broiler en etapa de engorde aceptaron el simbiótico en su dieta, la aceptación por los animales es importante, porque así éstos presentan un mayor rendimiento productivo, antes y después de aplicar las dietas alimenticias se tomaron los pesos de los pollos, registrándose un mayor incremento de masa en los pollos que se alimentaron con la dieta T2, dieta 95-5%.

El suplemento comercial “MFeed+” cita que la dosis puede adaptarse a las características de cada animal y su alimentación (de 1 a 2,5 kg. t^{-1} de pienso completo).

La eficiencia de la alimentación depende de una digestión optimizada, en la que las enzimas desempeñan un papel clave en el intestino delgado. MFeed + ha sido diseñado para optimizar la actividad de estas enzimas y mejorar así el uso del pienso.

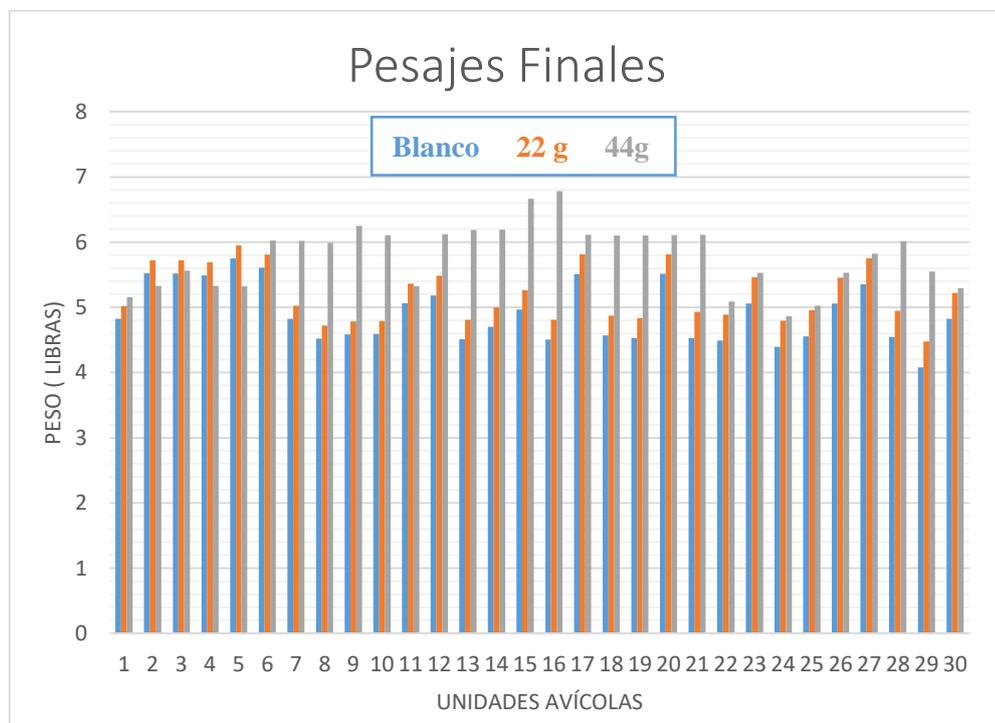


Grafico 2-3: Registro de dietas y pesos de pollos broiler en etapa de engorde.

Realizado por: GAVIN César (2018)

El registro de dietas alimenticias durante 15 días para pollos broiler en etapa de engorde se observa en la figura 3-1: El tratamiento que finalmente presenta un mayor crecimiento en pollos broiler es la T2 aplicada en una dieta 95-5 %. Es decir 95 % de balanceado comercial y 5 % de simbiótico, para el 97 % balanceado comercial y 3 % de simbiótico registra un menor crecimiento en los pollos frente a la dieta 95:5 y un mayor crecimiento en los pollos frente a la dieta alimenticia del testigo.

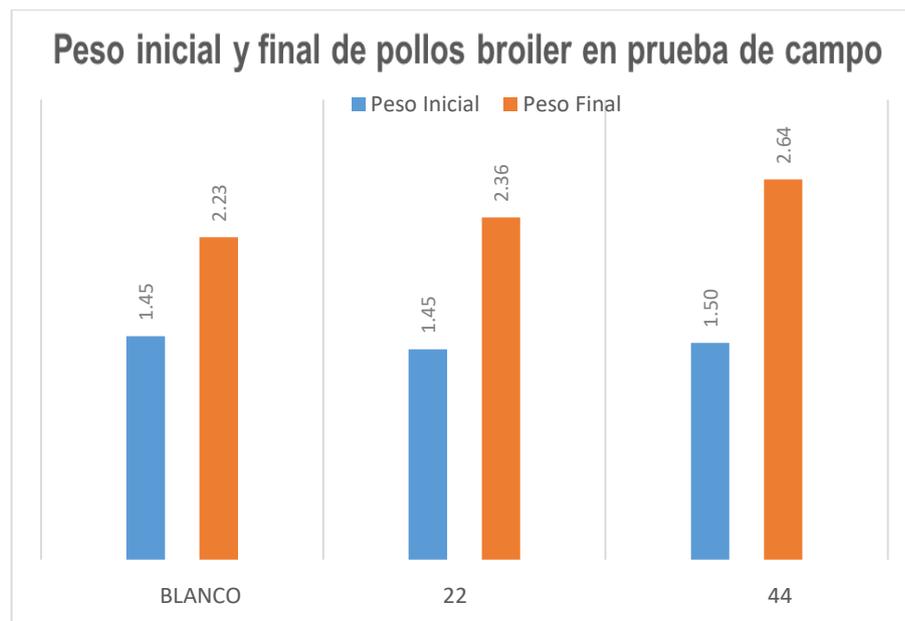


Gráfico 3-3: Evaluación del peso en pollos broiler alimentados con T1 y T2.
Realizado por: GAVIN César (2018)

En la figura 3-3: Se puede observar que hubo un incremento de peso en los pollos con todas las dietas aplicadas, con la prueba blanco testigo el peso inicial fue de 1,45 Kg y el peso final fue de 2,23 Kg, para prueba con la dieta de 97:3 (22 g) se registró un peso inicial de 1,45 Kg a 2,36 Kg, para la prueba con la dieta 95:5 (44 g) se registró un peso inicial de 1,50 Kg a 2,64 Kg, por lo que la dieta con más aceptabilidad y la más adecuada fue la dieta 95:5

Li y col. (2008), evaluaron la adición de FOS y *B. subtilis* a la dieta de pollos, observando una mejora en la ganancia media diaria y el índice de conversión, además de una reducción en la incidencia de diarreas y en la tasa de mortalidad, en comparación con el grupo control.

Recientemente, Harrington y col. (2015) alimentaron pollos de engorde con dietas con diversos niveles de energía metabolizable, suplementadas o no suplementadas con 8×10^5 UFC. g^{-1} de pienso de una determinada cepa de *B. subtilis*.

En los últimos años, diversos estudios científicos está demostrado la eficacia de *B. subtilis* como probiótico en dietas para broilers tanto a nivel de rendimiento productivo como de promoción de un buen estado sanitario de las aves (Lee y col., 2013; Latorre y col., 2014; Li y col., 2014; Park y Kim, 2014; Jeong y Kim, 2014).

Enríquez, (2011) cita en su trabajo de titulación que La inclusión de bacterias probióticas contribuyó a mejorar el estado sanitario de las aves, siendo más efectivas en el tratamiento uno y cuatro con la dosis de 1,5 mL fue la que alcanzó mayor ganancia de peso.

3.11. Análisis Costo – Beneficio

Tabla 6-3: Análisis del costo – beneficio en la producción del simbiótico utilizado.

Rubro	Cantidad	Unidad	Costo por unidad (\$)	Costo total
Insumos				
Pollos Broiler	90		0,8	80
Vacuna, Vitamina, Antibiótico	9		9	9
Balanceado	250	Kg	0,65	162,5
Afrecho de trigo	9	Kg	0,00	0,00
Afrecho de cerveza	5	Kg	0,00	0,00
Rastrojo de maíz	10	Kg	0,00	0,00
Sales mineral	600	g	0,35	0,35
Fosfato de potasio monobásico	100	g	0,10	0,10
Sulfato de amonio	10	g	0,3	3
Agua	3,5	L	2,5	10
Melaza	400	mL	0,55	0,55
Subtotal 1				193,50
Manejo				
Recipientes	9		1,50	13,5
Comederos	6		5	30
Bebedores	9		3	27
Subtotal 2				264
Egresos				
venta de pollos	90		5	450
Ingresos	450			
Egresos	264			
	186			
B/C	1,70			

Realizado por: GAVIN César (2018)

En la tabla 6-3: Análisis del costo - beneficio en la producción del Simbiótico se observa que los egresos para la elaboración del simbiótico y la producción avícola es de 264 dólares americanos mientras que los ingresos representan 450 dólares americanos el beneficio costo se calcula dividiendo los ingresos para los egresos dando como resultado 1.70, cuando $B/C > 1$ indica que los beneficios son superiores a los costos, por consiguiente el proyecto fue viable o económicamente factible.

CONCLUSIONES

- Se produjo un simbiótico para alimentación animal a partir de *Bacillus subtilis* con un sustrato de residuos agroindustriales mediante FES, evaluado mediante una prueba de campo para pollos broiler en etapa de engorde.
- Basándose en el conteo de esporas, análisis proximal, y pruebas organolépticas, la mejor fuente nutricional para el crecimiento de *Bacillus subtilis* en FES fue el tratamiento “F3” cuya formulación fue 30 % de afrecho cervecero, 40 % de afrecho de trigo, 25 % de rastrojo de maíz, 5% de aditivos, además presentó un conteo de esporas, de 1.80×10^8 UFC. g^{-1} .
- Se desarrolló la prueba biológica de campo para determinar la aceptabilidad del producto donde se ocupó el tratamiento F3. Las raciones alimenticias administradas durante 15 días fueron de 22 g.Kg^{-1} en un proporción 97:3 y 44 g.Kg^{-1} en un proporción 95:5 siendo balanceado comercial y simbiótico formulado, obteniéndose un consumo total y un nulo desperdicio en ambas raciones.
- De acuerdo al análisis económico se determinó que éste simbiótico para alimentación animal se obtuvo un grado de rentabilidad alto, determinándose índice de costo -beneficio de 1.70 dólares americanos, lo cual indica que por cada dólar de inversión hay una rentabilidad de 0.70 centavos de dólar.

RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas del simbiótico formulado en la dieta alimenticia de otras especies zootécnicas.
- Desarrollar variaciones en la formulación del simbiótico tomando en cuenta otras fuentes de carbono, como por ejemplo residuos de frutas.
- Usar el salvado de soya como sustrato para remplazar al afrecho de cerveza debido a que la soya es una fuente que tiene alto valor nutritivo y uso potencial.
- Probar otras especies del genero *Bacillus* para la elaboración de un simbiótico para alimentación animal.

BIBLIOGRAFÍA

Aguavil, Juan. "Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a *L. acidophilus* y *B. subtilis* sobre el sistema gastrointestinal en pollos broiler Ross-308 en santo domingo de los Tsáchilas". [En Línea] (Tesis) (grado). ESPE. 2012. pp. 24-25 [Consulta: 16 abril 2018]. Disponible en: http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5213/1/T-ESPE-IASA_II_002399.pdf.

Araya Cloutier, C. "Nuevas oportunidades con Residuis agroindustriales tropicales". [En Línea] (Artículo) (Científico). Costa Rica. 2013. pp. 9 [Consulta: 17 abril 2018] . Disponible en: http://www.altec2013.org/programme_pdf/50.pdf.

Betancourt, M., "Evaluación de la calidad de los Forrajes" [En línea] (Artículo) (Científico). Agricultura ENGROMIX. 2006. pp. 1 [Consulta: 17 abril 2018] . Disponible en: <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/evaluacion-calidad-forrajes-t26728.htm>

Brizuela, 2003. "Evaluación de un biopreparado a base de *Bacillus subtilis* con actividad probiótica en cerdos de las categorías de cría y preceba " [En línea] (Artículo) (Científico). Revista electronica de Veterinaria. 2003. pp. 1 - 13 [Consulta: 18 abril 2018] Disponible en : <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080815/081501.pdf>

Cagigas, A. L. de las y Blanco, J. "Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa". , [En Línea] (Artículo) (Científico) Revista Cubana Aliment Nutr. 2008, pp. 63–68. [Consulta: 18 abril 2018] . Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16_1_02/ali10102.htm.

Carro, M. D. "Utilización de aditivos en la alimentación del ganado ovino y caprino", 37, [En Línea] (Artículo) (Revisión). Universidad de Leon 2006, pp. 1–11. [Consulta: 18 abril 2018] Disponible en :http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_promotor_es_crecimiento/29-aditivos_ovinos.pdf.

Castrillón, Olivia & Puerta, S. "Impacto del manejo integral de los residuos sólidos en la Corporación Universitaria Lasallista", [En Línea] (Artículo) (Científico). Lasallista de Investigación. 2004 pp. 15–21. [Consulta: 19 abril 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69511003>.

Castro, N. G. "De Bacillus subtilis".[En Línea] (Presentacion) (Científica). Investigacion microbiana. 2015 pp. 10 [Consulta: 20 abril 2018] Disponible en: https://www.academia.edu/11408282/Bacillus_subtilis_Natalia_G_De_Castro_L._Citología_microbiana_Bacillus_subtilis_Reino_Bacterias_Phylum_Firmicutes_Clase_Bacilos_Orden_Bacillales.

Cordovez, M. "Caracterización y efecto de bioensilaje en la producción y calidad de la leche bovina"., [En Línea] (Tesis) (grado). ESPOCH. 2014 pp. 22-24 [Consulta: 21 abril 2018] Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/4282>.

Costa Marcia., "Formulación de un biopesticida para combatir la pudrición húmeda en *cazantedeschia spp*) producida por erwinia carotovora". [En Línea] (Tesis) (grado). Universidad de Chile.2006 pp.22 [Consulta:22 abril 2018] Disponible en:<file:///C:/Users/SYSTEMarket/Downloads/tesis-bacillus-residuos.pdf>.

Clasificación residuos.,"Clasificación De Resisuos". [En línea]. CLASIFICACIONDE. 2018. pp. 1 [Consulta: 22 abril 2018] Disponible en: <https://www.clasificacionde.org/clasificacion-de-residuos/>

Enríquez, J. C. A., "evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a *lactobacillus acidophilus* y *bacillus subtilis* sobre el sistema gastrointestinal en pollos broiler ross-308 en santo domingo de los tsáchilas." [En línea] (Presentacion). ESPE. 2011, pp.69.[Consulta:22 abril 2018] Disponible en:<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5213/2/T-ESPE-IASA%20II%20-%20002399-P.pptx>

Díaz B., Elías A., and V. C. "Eficiencia alimentaria y económica de tres tipos de bioensilajes de residuos agroindustriales en bovinos de carne." [En Línea] (Articulo) (Científico), Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 47, N, 2013 pp. 143. [Consulta: 23 abril 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1930/193028751006.pdf>

Díaz, D. "Desarrollo De Un Inóculo Con Diferentes Sustratos Mediante Fermentacion Solida Sumergida." [En Línea] (Articulo) (Científico) , Journal of Chemical Information and Modeling, 2013 pp.16.[Consulta:24 abril 2018] Disponible en:<http://www.lebas.com.mx/files/DESARROLLO-DE-UN-IN-CULO-CON-DIFERENTES-SUSTRATOS-MEDIANTE-FERMENTACION-SOLIDA-SUMERGIDA.pdf>

Díaz Sanchez, A. B. “Reciclado del orujo de uva como medio sólido de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas de interés industrial.” [En Línea] (Tesis) (Doctoral), Universidad de Cadiz, 2009 pp. 382. [Consulta: 25 abril 2018] Disponible en: http://rodin.uca.es/xmlui/bitstream/handle/10498/15774/Tes_2010_03.pdf;jsessionid=044DA838BC53A50FF845F555D2C901B0?sequence=1

E Maldonado Chávez, MC Rivera Cruz, F Izquierdo Reyes, D. P. “Efectos de rizosfera , microorganismos y fertilización en la crudo nuevo e intemperizado Effects of rizosphere , microorganisms and fertilization on bioremediation and phytoremediation of soils with new and weathered crude oil.” [En Línea] (Artículo) (Científico), Universidad y ciencia vol.26 no.2 Villahermosa ago. 2010 pp. 121–136.[Consulta: 26 abril 2018] Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792010000200001.

ELIKA "Situación de los aditivos para la alimentación animal introducción." [En Línea] (Artículo) (Revista), Berezia . 2011 pp. 1 [Consulta: 27 abril 2018] Disponible en: <http://www.elika.eus/datos/articulos/Archivo734/berezi aditivos AA 11.pdf>

Escudero Álvarez, E. y González Sánchez, P. “La fibra dietética”, [En Línea] (Artículo) (Científico) Nutricion Hospitalaria, 21(SUPPL. 2), 2006 pp. 61–72. [Consulta: 28 abril 2018] Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v21s2/original6.pdf>

Ferrer, J. R., Machado, J. L. y Brieva, J. “Fermentación en estado sólido : Una alternativa biotecnológica para el aprovechamiento de desechos agroindustriales”, [En Línea] (Artículo) (Científico) Revista Tecnocientífica URU, 2014 pp. 11–22. [Consulta: 29 abril 2018] Disponible en: <http://200.35.84.134/ojs-2.4.2/index.php/rtcu/article/view/233>.

Gallardo, I. M.,"Utilización eficiente del afrechillo de trigo para la suplementación de vacas lecheras". [En línea] (Texto), EEA Rafaela-INTA, 2002. pp. 1. [Consulta: 30 abril 2018] Disponible en: <http://rafaela.inta.gov.ar/revistas/pxx10602.htm>

GROUP, O., "Eficiencia digestiva". [En línea] (Olmix) (Group). ANIMAL CARE, 2018. pp. 1. [Consulta: 1 de Mayo 2018] Disponible en : <https://www.olmix.com/es/animal-care/mfeed>

Lee, J.-K. et al. “Bacillus strains as feed additives: In vitro evaluation of its potential probiotic properties”, [En Línea] (Artículo) (Científico) Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 25, 2012 pp.585.[Consulta:30 abril 2018] Disponible en:http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902012000400005

Leonor, R. et al. “Evaluación de residuos agrícolas como sustrato para la producción de *Pleurotus ostreatus*”, [En Línea] (Artículo) (Científico) Luna Azul, 2(37), 2014 pp. 89–100. [Consulta: 30 abril 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223131337008.pdf>

Luis, N. y Baca, A. “La producción de maíz amarillo en el Ecuador y su relación con la soberanía alimentaria Resumen”. [En Línea] (Tesis) (Grado), PUCE, 2016, pp. 28 [Consulta: 1 mayo 2018] Disponible en: [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12652/La producción de maíz amarillo en el Ecuador y su relacion con la soberania alimentaria - Luis Al.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12652/La%20produccion%20de%20maiz%20amarillo%20en%20el%20Ecuador%20y%20su%20relacion%20con%20la%20soberania%20alimentaria%20-%20Luis%20Al.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

Milián, G. ., Pérez, M. . y Bocourt, R. “Empleo de probióticos basado en *Bacillus sp* y de sus endosporas en la producción avícola”, [En Línea] (Artículo) (Científico) Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 42(2), 2008 pp. 117–122. [Consulta: 2 mayo 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1930/193015494001.pdf>

Morales, F. “Industria de cerveza en colombia y ecuador”, [En Línea] (Artículo) (Científico)., Sitio Argentino de Producción Animal, 2015 pp. 1– 4. [Consulta: 3 mayo 2018] Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/tablas_composicion_alimentos/156residuos_cerveza.pdf.

Muñoz-Tlahuiz, F. et al. (2013) “Stover and grain production from maize landraces under rainfed conditions in the highland plateau of Libres-Serdán, Puebla, Mexico | Producción de rastrojo y grano de variedades locales de maíz en condiciones de temporal en los valles altos de Libres-Serd”, [En Línea] (Artículo) (Científico)., Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias, 4(4), 2013 pp.530.[Consulta: 4 mayo 2018]Disponible en:<http://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/3205>.

Ospina Henao, S. M., Hernandez Rodríguez, E. N. y Lozano Moreno, C. A. “Estudio Experimental del Proceso de Fermentación de Residuos Agroindustriales del Mango (*Mangifera Indica L*) Usando *Saccharomyces cerevisiae*”, [En Línea] (Tesis) (Grado)., Universidad Católica de Manizales, Facultad de Salud. 2012 pp. 17 [Consulta: 4 mayo 2018] Disponible en: <http://repositorio.ucm.edu.co:8080/jspui/handle/10839/230>

Parzanese, M. “Fermentación En Sustrato Sólido : Aprovechamiento De Subproductos De La Agroindustria”, [En Línea] (Artículo) (Científico), Tecnologías para la industria de alimentos, Ficha N° 2, 2016 pp. 1–13. [Consulta: 4 mayo 2018] Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_27_Fermentacion_en_sustrato_solido_para_el_aprovechamiento_de_subproductos_de_la_agroindustria.pdf.

Peñañiel, S. et al. “Utilización De Residuos Agroindustriales Para La Producción De Proteína Microbiana”, [En Línea] (Artículo) (Científico) , European Scientific Journal, 11(27), 2015 pp. 201.[Consulta:5mayo2018]Disponibleen:<http://ejournal.org/index.php/esj/article/viewFile/6270/6042>.

Ramos, F. y Rodríguez, M. Cultivo de Bacillus subtilis cepa 105 en biorreactor y su actividad antagonista contra Sclerotinia sclerotiorum. [En Línea] (Tesis) (Grado), Instituto Politecnico Nacional,2014 pp.23.[Consulta:6 mayo 2018] Disponible en:[http://itzamna.bnct.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/12790/Tesis Florencio Ramos Gómez.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://itzamna.bnct.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/12790/Tesis%20Florencio%20Ramos%20G%C3%B3mez.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

Reyes-Muro, L., Camacho-Villa, T. C. y Guevara-Hernández, F. Rastrojos. Manejo, uso y mercado en el centro y sur de México. [En Línea] (Tesis) (Grado) Libro Técnico Núm. 7. 2013 pp.15.[Consulta:7 mayo 2018] Disponible en:[https://www.zef.de/uploads/tx_zefportal/Publications/tbeuchelt_download_Rastrojos manejo, uso y mercados en el centro y sur de México.pdf](https://www.zef.de/uploads/tx_zefportal/Publications/tbeuchelt_download_Rastrojos%20manejo,%20uso%20y%20mercados%20en%20el%20centro%20y%20sur%20de%20M%C3%A9xico.pdf).

Rosero, E. “Impacto de la producción de biomasa de Auricularia auricula , utilizando residuos agroindustriales contaminantes en el Ecuador.” [En Línea] (Tesis) (Grado), Universidad Tecnica de Manabi. 2016 pp. 21.[Consulta:8 mayo 2018].Disponible en:https://www.researchgate.net/profile/Ernesto_Rosero/publication/315663699_Impacto_de_la_produccion_de_biomasa_de_Auricularia_auricula_utilizando_residuos_agroindustriales_contamina

RUEDA, E. “Evaluación de la actividad enzimática de la celulasa obtenida y purificada de bacillus subtilis crecido en los sustratos cascarilla de arroz, cascarilla de avena y zuro.”. [En Línea] (Tesis) (Grado). ESPE, 2015, pp. 18. [Consulta: 9 mayo 2018]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/10377/TESPE048656.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Sanabria Rodríguez, C. A. Y Sarmiento Lemus, D. E. "Evaluación de la obtención de polihidroxicanoatos (phas) partiendo del residuo de almidón de papa por medio de bacillus subtilis a nivel laboratorio". [En Línea] (Tesis) (Grado). Fundación universidad de américa, 2017, pp.60.[Consulta:10mayo2018].Disponible en:<http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6040/2/1014242217-2017-1-IQ.pdf>.

Saval, S. "Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales : Pasado , Presente y Futuro", [En Línea] (Artículo) (Científico). Instituto de Ingeniería, UNAM . 2012. pp. 14–46. [Consulta: 11 mayo 2018].Disponible en:https://www.academia.edu/23775116/Aprovechamiento_de_Residuos_Agroindustriales_Pasado_Presente_y_Futuro

Spanopoulus , M. "Producción de ensilados biológicamente a partir de desechos de pescado, del ahumado de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y del fileteado de tilapia (*oreochromis sp*) para la alimentación de especies acuáticas". [En Línea] (Tesis) (Grado). Revista Mexicana de Ingeniería Química, 9(2), 2010. pp. 167-178. [Consulta: 11 mayo 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/620/62016248004.pdf>

Thomas, L., Larroche, C. y Pandey, A. "Current developments in solid-state fermentation", [En Línea] (Artículo) (Científico). Biochemical Engineering Journal, 81. 2013, pp. 146–161. [Consulta: 12 mayo 2018]. Disponible en: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84891431171&partnerID=40&md5=1e3060d871666e23fa79da5ec0e33d22>

Toledo, M. "Residuos de Maiz y Quinoa como potenciales sustratos para el cultivo de hongos comestibles *Pleurotus ostreatus*",[En Línea] (Tesis) (Grado). ESPOCH.2008, pp. 1–125. [Consulta:13 mayo 2018] Disponible en:<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/229/1/236T0015.pdf>.

Tomaló, V. "Utilización de promotor de crecimiento simbiótico lacture, en producción de huevos de la línea isabrown".[En Línea] (Tesis) (Grado). ESPOCH. 2007,pp.37-39-40- 45-46-47.[Consulta: 14 mayo 2018] Disponible: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/1760>.

Tournut, J. "Applications of probiotics to animal husbandry", [En Línea] (Tesis) (Grado). Scientific and technical Review. International Office of Epizootics, 8(2). 1989, pp. 551–566. [Consulta:15 mayo 2018]Disponible en:<http://pdfs.semanticscholar.org/7355/4ec11102b7332d1c5b6c7450623e236832b2.pdf>

Veloz, J. “evaluación y aprovechamiento biotecnológico de residuos agroindustriales de zanahoria y suero de leche generados como alimento para rumiantes”. [En Línea] (Tesis) (Grado). ESPOCH.2005.pp.23 [Consulta:16 mayo 2018] Disponible en:<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1870/1/17T0698.pdf>.

Veloz, N., "Enriquecimiento proteico de residuos de pescado mediante fermentación sólida, s.l.: s.n." [En Línea] (Tesis) (Grado). Agro Veracruzano. 2004. pp. 278. [Consulta: 6 mayo 2018] Disponible en: <file:///C:/Users/SYSTEMarket/Downloads/libroagroveracruzano2016.pdf>

Veterinaria, A., "Albeitar Portal Veterinaria". [En línea] (Portal). Albeitar. 2014. pp.1.[Consulta:11 mayo 2018] Disponible en:<http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/10233/articulos-nutricion-archivo/los-probioticos-como-alimento-funcional.html>