

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO

**FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y DE RECURSOS
NATURALES**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y DE
RECURSOS NATURALES**



**DOSIS ÓPTIMA DE MICROORGANISMOS EFICACES EM™ PARA LA
REDUCCIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE COLIFORMES EN EL
BIOL DE ESTIÉRCOL DE PORCINO PARA USO AGRÍCOLA**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AMBIENTAL Y DE RECURSOS NATURALES**

AUTOR

LESLIE CLARA TUSE APONTE

ASESOR

BLGO. CARLOS ODORICO TOME RAMOS

Callao, noviembre del 2018

PERÚ

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y DE RECURSOS
NATURALES



COMISION DE GRADOS Y TITULOS
ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS PARA OPTAR EL
TITULO DE INGENIERO AMBIENTAL Y DE RECURSOS
NATURALES
N° 010-2018-JEDT-FIARN

Siendo las 15:30 horas del día lunes 05 de noviembre de 2018, en el Auditorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y de Recursos Naturales ubicado en la Av. Juan Pablo II 306-Bellavista-Callao; se dio inicio a la Sustentación de la Tesis titulada **“DOSIS ÓPTIMA DE MICROORGANISMOS EFICACES EM™ PARA LA REDUCCIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE COLIFORMES EN EL BIOL DE ESTIÉRCOL DE PORCINO PARA USO AGRÍCOLA”** presentada para optar el título profesional de Ingeniero Ambiental y de Recursos Naturales de la Bachiller Leslie Clara Tuse Aponte.

Contando con la asistencia del Jurado Evaluador y Asesor a fin de dar cumplimiento a la Resolución N° 068-2018-D-FIARN de fecha 23 de octubre de 2018, los mismos que están integrados por los siguientes docentes:

Dr. Rubén Gilberto Rodríguez Flores
Lic: Janet Mamani Ramos
Blgo. Abelardo Virgilio Martín Isla Medina
Blgo. Carlos Odorico Tome Ramos

Presidente
Secretaria
Vocal
Asesor

CARECE DE VALOR SIN SELLO PERFORADOR Y SELLO DE AGUA.

Terminada la exposición y la absolución de las preguntas del Jurado Evaluador, se invita a los Bachilleres y al público en general se retiren del Auditorio para las deliberaciones del caso.

Luego de las deliberaciones el Jurado Evaluador acuerda **APROBAR POR UNANIMIDAD**, no habiendo observación alguna con el Calificativo de **MUY BUENO** y con ello dar por concluido el proceso de Sustentación de Tesis.

En señal de conformidad firman el Jurado Evaluador y Asesor, siendo las 17:00 horas del día 05 de noviembre de 2018.

Dr. Rubén Gilberto Rodríguez Flores
Presidente

Lic. Janet Mamani Ramos
Secretaria

Blgo. Abelardo Virgilio Martín Isla Medina
Vocal

CERTIFICO: QUE ESTA COPIA FOTOSTATICA ES EXACTAMENTE IGUAL A SU ORIGINAL, EL CUAL HE TENIDO A LA VISTA, DOY FE.

Callao, 17 de DIC 2018

Blgo. Carlos Odorico Tome Ramos
Asesor



GERMAN NUNEZ PALOMINO
NOTARIO DEL CALLAO

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a las personas que gustan de la investigación en aras de encontrar soluciones sostenibles en el tiempo para el aprovechamiento de los efluentes generados en el sector pecuario.

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres. Su amor, confianza y apoyo han permitido que hoy me encuentre escribiendo estas líneas.

A Dios por permitirme conocer en el camino a generosas personas como docentes y amigos quienes me han ayudado a concretar uno de mis primeros objetivos profesionales al compartir conmigo, sus conocimientos, experiencia y tiempo. Por ello deseo realizar un especial agradecimiento a las siguientes personas:

Ing. Mabel Luna, directora del Instituto de Investigación de Especialización en Agroindustria por su apoyo y confianza en la etapa final de mi tesis para el uso del laboratorio de microbiología asimismo estoy muy agradecida de mis compañeros de laboratorio ingenieros Iván A., Sandra A., Jesús A. y practicantes Sandrita C., Kevin M., Katy R., Andrea y Elibeth.

Prof. Annie Aniceto, por su colaboración y paciencia con el análisis estadístico para el procesamiento de los datos e interpretación de los resultados obtenidos.

Ing. Francis Reyes por la muestra donada de microorganismos eficaces (EMTM).

Ing. Mario Chujandama por la muestra de efluente e Ing. Rovinson Melgarejo por sus sugerencias.

Profesor Blgo. Carlos Tome, asesor de la presente investigación, por su orientación durante la realización y culminación de este trabajo.

Ing. Juan Carpio T. por su acompañamiento, optimismo y aportes durante la realización de principio a fin de esta investigación.

Asimismo, en la parte inicial, perfil del proyecto, agradecer a la Ing. Carmen Barreto y profesor Blgo. Edgar Zárate por sus recomendaciones para la organización y presentación de la información. Finalmente, a todas las personas que de una forma u otra contribuyeron en la realización de la presente tesis y hoy ocupan un espacio en mi mente y corazón.

IV. METODOLOGÍA	46
4.1 Tipo de investigación	46
4.2 Diseño de la investigación	46
4.2.1 Procedimiento Experimental	46
4.2.2 Materiales, equipos y medios de cultivo y reactivos	53
4.3 Población y Muestra	55
4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	56
4.4.1 Análisis microbiológico	56
4.4.2 Medición de parámetros físicos y fisicoquímicos	56
4.4.3 Cultivo de plantas de maíz	57
4.5 Procedimientos de recolección de datos	57
4.5.1 Procedimiento toma de datos	57
4.6 Procesamiento estadístico y análisis de datos	59
4.6.1 Procesamiento datos en software estadístico.	60
4.6.2 Análisis de datos: Análisis de varianza (ANOVA), media, desviación estándar. Validación de datos.	60
V. RESULTADOS	61
5.1 Objetivo 1. Cuantificación microbiológica (coliformes) del biol de estiércol de porcino para uso agrícola	61
5.2 Objetivo 2. Determinar las concentraciones de microorganismos eficaces (EMTM) que permitan establecer la dosis óptima.	61
5.2.1 Indicador Fisicoquímico	62
5.2.2 Indicadores físicos	63
5.3 Objetivo 3. Determinar la concentración de coliformes totales, fecales y de E. coli presentes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola.	66
5.3.1 Resultados de la concentración de coliformes presentes en el biol de estiércol de porcino	66
5.3.2 Resultados del análisis estadístico descriptivo	70
5.3.3 Resultados del análisis estadístico inferencial	76
5.4 Objetivo 4. Comprobar mediante ensayos de un tipo de cultivo la aplicación del biol tratado con microorganismos eficaces (EMTM)	86

INDICE

TABLAS DE CONTENIDO	
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE GRÁFICOS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	11
1.1 Identificación del problema	11
1.2 Formulación del problema	11
1.3 Objetivos de la investigación	11
1.4 Justificación	12
1.5 Importancia	13
II. MARCO TEÓRICO	15
2.1 Antecedentes del estudio	15
2.2 Marco conceptual	24
2.2.1 Digestión anaerobia	24
2.2.2 Biodigestor	26
2.2.3 Biol	29
2.2.4 Coliformes	30
2.2.5 Método de Fermentación en Tubos Múltiples	32
2.2.6 Microorganismos Eficaces™ (EM™)	35
2.2.7 Concentración aceptable de microorganismos patógenos para uso de biol en el campo agrícola.	39
2.3 Definiciones de términos básicos	43
III. VARIABLES E HIPÓTESIS	44
3.1 Variables de la investigación	44
3.2 Operacionalización de variables	44
3.3 Hipótesis general	45

VI.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	90
6.1	Contrastación de resultados con otros estudios similares	90
6.1.1	Biol sin Tratamiento de Microorganismo Eficaces Activados	90
6.1.2	Biol con Tratamiento de Microorganismo Eficaces Activados	
6.2	Contrastación de hipótesis con los resultados	
VII.	CONCLUSIONES	96
VIII.	RECOMENDACIONES	98
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
	APENDICE	105
A.	Matriz de consistencia	106
B.	Fotografías	107
C.	Fotografías del crecimiento de las plantas de maíz hasta el día 7	110
D.	Fotografías del crecimiento de las plantas de maíz hasta el día 46	111
E.	Fotografía del crecimiento de las plantas de maíz en el día 76	112
F.	Fotografías de las raíces de plantas maíz cultivadas	113
G.	Formato para el registro de los resultados de coliformes	114
H.	Formato para el registro de datos del pH, Temperatura y Humedad relativa	115
I.	Resultados de la evaluación del crecimiento en altura (cm) de las plantas de maíz	116
	ANEXOS	117
A.	Método del Número Más Probable (NMP)	115
B.	Tabla Número Más Probable (NMP) para 100 ml de muestra cuando se usan 5 porciones en cada de 3 diluciones con series geométricas.	119
C.	Fórmula de medios de cultivo	120
D.	Cuadro comparativo de distintos ejemplos de niveles de organización a nivel microscópico.	121
E.	Comparación gráfica y vista microscópica para apreciar formas y tamaños de células de levaduras (yeast), células filamentosas (mold) y bacterias	121
F.	Imagen de microorganismos benéficos de origen natural	122
G.	Imagen de Escherichia Coli O157: H7	122

RESUMEN

La presente investigación se realizó, en el Instituto de Investigación de Especialización en Agroindustria con el apoyo de la Facultad de Ingeniería Ambiental y de Recursos Naturales, de la Universidad Nacional del Callao, Lima-Perú.

El biol, un efluente que se obtiene de la digestión anaerobia de excretas provenientes del sector pecuario requiere de un tratamiento previo a su uso debido a la presencia de coliformes que se encuentran en él. Los microorganismos eficaces han demostrado su capacidad de consumir materia orgánica e inhibir y/o eliminar microorganismos patógenos para el hombre, por ello la presente investigación tuvo por objetivo determinar una dosis óptima de microorganismos eficaces que redujera la concentración de coliformes totales, fecales y *E. coli*, a fin de obtener un abono líquido inocuo para uso agrícola. Por esta razón se procedió a tratar el biol con dosis al 0%, 5%, 10% y 15% de microorganismos eficaces activados (EMA) mediante la implementación de recipientes herméticos a escala pequeña (500 ml) y realizando por triplicado cada tratamiento.

Para la determinación de coliformes se empleó la técnica de fermentación por tubos múltiples cuyos resultados se expresaron en términos de NMP/100 ml asimismo, al término del proceso de evaluación microbiológica las pruebas estadísticas de Dunnett y Tukey junto a la tabla cualitativa del Tono Hedónico del Olor y promedio final del pH permitieron determinar que la dosis óptima de microorganismos eficaces fue del 10% de EMA al obtenerse los mejores resultados a nivel microbiológico y fisicoquímico para un tiempo de evaluación de 7 días.

Concluida la etapa de evaluación microbiológica, se realizaron pruebas en plantas de maíz a las cuales se les aplicó el biol con la dosis óptima del 10% de EMA diluido al 5% en agua por su bajo pH. Los resultados muestran un efecto en el crecimiento de las plantas a nivel de altura y masa para una evaluación de 76 días.

ABSTRACT

The present investigation was carried out in the Research Institute of Specialization in Agroindustry with the support of the Faculty of Environmental Engineering and Natural Resources of the National University of Callao, Lima - Peru.

The biol, an effluent that is obtained from the anaerobic digestion of excreta from the livestock sector, requires prior treatment to its use due to the presence of coliforms found in it. Effective microorganisms have demonstrated their ability to consume organic matter and inhibit and / or eliminate pathogenic microorganisms for humans, therefore the present investigation aimed to determine an optimal dose of effective microorganisms that reduced the concentration of total coliforms, fecal and E. coli, in order to obtain a harmless liquid fertilizer for agricultural use. For this reason we proceeded to treat the biol with doses at 0%, 5%, 10% and 15% of activated effective microorganisms (EMA) by implementing hermetic containers on a small scale (500 ml) and carrying out each treatment in triplicate.

For the determination of coliforms, the multi-tube fermentation technique was used, the results of which were expressed in terms of NMP / 100 ml and, at the end of the microbiological evaluation process, Dunnett and Tukey's statistical tests together with the qualitative table of the Hedonic Tone of the Smell and final pH average allowed to determine that the optimal dose of effective microorganisms was 10% EMA, obtaining the best results at the microbiological and physicochemical levels for a 7-day evaluation period.

Once the microbiological evaluation stage was completed, tests were carried out on maize plants to which the biol was applied with the optimum dose of 10% EMA diluted at 5% in water due to its low pH. The results show a positive effect on plant growth at height and mass level for a 76-day evaluation period.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Identificación del problema

Presencia de coliformes en el biol (abono orgánico líquido) de estiércol de porcino para uso agrícola.

1.2 Formulación del problema

¿Cuál es la dosis óptima de microorganismos eficaces EM™ para la reducción de la concentración de coliformes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola?

1.3 Objetivos de la investigación

1.31. Objetivo General

Determinar la dosis óptima de microorganismos eficaces para reducir la concentración de coliformes presentes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola.

1.32. Objetivos Específicos

- Cuantificación microbiológica (coliformes) del biol de estiércol de porcino para uso agrícola.
- Determinar las concentraciones de microorganismos eficaces (EM™) que permitan establecer la dosis óptima.

- Determinar la concentración de coliformes totales, fecales y de *Escherichia coli* presentes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola.
- Comprobar mediante ensayos de un tipo de cultivo la aplicación del biol tratado con microorganismos eficaces (EMTM).

1.4 Justificación

El proceso controlado de digestión anaerobia es uno de los más idóneos para la reducción de emisiones de efecto invernadero, el aprovechamiento energético de los residuos orgánicos y el mantenimiento y mejora del valor fertilizante de los productos tratados (IDAE, 2007).

El presente estudio se justifica por el aprovechamiento del biol, un producto de excreción, el cual proviene de la digestión anaerobia del estiércol que se genera en una granja de porcinos alimentados con alimento balanceado.

El biol, en la actualidad es utilizado como abono líquido sin embargo debido a su origen, este presenta coliformes que podrían poner en riesgo la salud de las personas al consumir vegetales contaminados.

Mejorar la calidad microbiológica del biol requiere de un tratamiento previo a su uso aplicando microorganismos eficaces EMTM los cuales han demostrado su capacidad de consumir materia orgánica e inhibir y/o eliminar microorganismos patógenos para el hombre.

Proporcionar un biol de estiércol de porcino libre de posibles microorganismos patógenos para uso agrícola garantiza el aprovechamiento de los efluentes que genera esta actividad pecuaria elevando el rendimiento de los suelos por el aporte de nitrógeno orgánico y mejorando la calidad del agua destinado al riego de las plantas.

1.5 Importancia

1.5.1 Ambiental

El aprovechamiento del estiércol porcino para la producción del biol reduciría el impacto negativo en el medio ambiente que genera esta actividad pecuaria, como son los malos olores, la posible contaminación de los suelos, aguas superficiales y subterráneas.

La digestión anaeróbica del estiércol de cerdo produce biol y un abono sólido llamado biosol el cual, luego de un proceso de higienización, podría también ser aprovechado en la agricultura. Al utilizar abonos orgánicos se disminuye la necesidad de depender de productos químicos artificiales en los distintos cultivos.

1.5.2 Social

El uso de un biol de estiércol de porcino libre de coliformes y *E. coli*, evitaría posibles riesgos de contaminación de vegetales cultivados para el consumo humano, así mismo protegería la salud de los agricultores

durante la manipulación del biol en las faenas de producción en el campo de cultivo.

1.5.3 Económica

El uso de un biol de estiércol de porcino libre de coliformes y *E. coli*, reduciría gastos por compras de fertilizantes sintéticos y generaría un ingreso de dinero por la venta del biol asimismo se produciría un ahorro de dinero por el pago de servicios a una EPS-RS para el recojo de estos residuos de granja.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio

Para una mejor comprensión, los antecedentes del presente estudio se han dividido en antecedentes de: Características microbiológicas del biol y efecto de los microorganismos eficaces sobre efluentes, aguas y lugares contaminados.

2.1.1 Características microbiológicas del biol

Los siguientes antecedentes corresponden principalmente a las características microbiológicas del biol, un efluente proveniente de la digestión anaerobia de los residuos de la actividad pecuaria.

En Cuba, la investigación *“EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL EFLUENTE ANAEROBIO DE UN BIODIGESTOR DE CÚPULA FIJA”* analizó la calidad microbiológica del efluente proveniente un biodigestor anaerobio de cúpula fija de 15 m³ para tratar los residuales provenientes de una granja experimental del Instituto de Investigaciones Porcinas, con capacidad para 100 cerdos en las etapas de preceba y ceba. El trabajo se realizó en condiciones de producción durante seis semanas continuas, llevando a cabo un muestreo semanal que incluía dos muestras (una de la entrada del residual al biodigestor y otra de la salida del residual ya tratado), para un total de 12 muestras. La remoción de coliformes fecales fue de 42.42%, siendo el pH a la entrada = 7.01 y el pH a la salida = 7.21. Trabajo refiere una importante

reducción de la presencia de coliformes totales y fecales, así como de huevos de helmintos. (Cruz et al., 2004).

En México, la investigación ***“PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES MEDIANTE BIODIGESTIÓN DE EXCRETA LÍQUIDA DE CERDO”*** utilizando un prototipo de biodigestor de flujo continuo de 9m³ de capacidad, modelo propuesto por la FAO en 1995, llenado con excreta líquida cerdo al 70% de su capacidad total en una sola carga y tiempo de retención 50 días (marzo-abril). Empleando el método de Recuento en placa y siembra por dilución en medio Agar de Eosina con Azul de Metileno para la determinación de coliformes y el uso de un potenciómetro de lectura directa para la medición de pH, obtuvo los siguientes resultados: Influyente (carga inicial), concentración de coliformes: 9×10^{11} UFC/100 ml y pH=7.6. Efluente (carga final): concentración de coliformes: 0 UFC/100 ml y pH=7.05 (Soria et al., 2001).

En Venezuela, la investigación ***“EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DISCONTINUO DE BIODIGESTIÓN ANAEROBIA PARA EL TRATAMIENTO DE DESECHOS AVÍCOLAS”*** utilizando biodigestores experimentales tipo batch de 18,5 litros para tres tipos de tratamientos distintos determinó que existe una escasa reducción en la carga de coliformes fecales y presencia de bacterias de los géneros *Escherichia*,

Proteus, Enterobacter y Klebsiella para un tiempo de retención de 60 días. Concluyendo que el tratamiento anaerobio evaluado resultó poco eficiente para el control de bacterias del grupo Enterobacteriaceae y que no se observó efectos de control sobre los huevos de parásitos encontrados (Palacios, 1999).

En Chile, la investigación ***“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO DE EXCRETAS DE CERDO SOMETIDAS A BIODIGESTIÓN ANAERÓBICA EN LABORATORIO”***, trabajo consistió en dos experimentos a temperaturas de 15°C y 35°C empleando en cada uno tres digestores experimentales idénticos con las siguientes concentraciones de sólidos: A=10%, B=6% y C=3%. Interviniéndose en las variables de temperatura y concentraciones de sólidos totales, considerando el tiempo de retención como una variable dependiente de la temperatura y que para los experimentos a 15°C y 35°C fueron de 75 días y 45 días respectivamente. Sobre el recuento de Coliformes fecales, investigación refiere lo siguiente: Experimento N°1 (35°C), obtuvo reducciones de 76.9% para la dilución (A) y de 100% en las diluciones (B) y (C). Experimento N°2 (15°C), no logró la eliminación total de los indicadores de contaminación fecal, alcanzando a los 75 días, reducciones 40.7, 45.3 y 52.0 %, para las diluciones (A), (B) y (C), respectivamente. Siendo importante destacar que la mayor

dilución presentó el porcentaje de disminución más importante (Nuñez et al., 1987).

En el Perú, el trabajo de investigación ***“GESTIÓN AMBIENTAL DE RESIDUOS AVÍCOLAS MEDIANTE DIGESTIÓN ANAEROBIA PARA LA PRODUCCIÓN DE FERTILIZANTES ORGÁNICOS LÍQUIDOS”*** analizó los efluentes líquidos de procesos de digestión anaerobia de tres tipos de residuos avícolas: Gallinaza de jaula (GJ), Gallinaza de piso (GP) y la mezcla resultante de ambas Gallinaza Mezcla (GM), con la finalidad de obtener un efluente apropiado para uso agronómico. Para ello, empleó biodigestores de 8 litros cada uno tipo batch en un proceso de fermentación bajo condiciones naturales, sin estimuladores, a temperatura ambiente y para un tiempo de retención de 90 días. Al inicio del proceso el estiércol fresco presentaba una concentración de coliformes totales y fecales de entre 11×10^6 y 70×10^6 NMP/ml sin embargo al término del proceso se determinó valores inferiores a 3 NMP/ml (Carhuancho, 2015).

Asimismo la investigación titulada ***“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE BIOGÁS Y BIOL A PARTIR DE DOS MEZCLAS DE ESTIÉRCOL DE VACA EN BIODIGESTORES TUBULARES DE PVC”*** realizada por los investigadores Quipuzco, Baldeón y Tang desde noviembre del 2009 hasta abril del 2010, concluye que al término del tiempo de evaluación, el valor promedio de coliformes fecales del biol fue de 6080

NMP/100 ml y 1270 NMP/100 ml en las mezclas de 1/4 y 1/5 (proporción de estiércol utilizado), respectivamente superando la concentración de coliformes fecales de 1000 NMP/100 ml recomendado para por la Organización Mundial y Estándares de Calidad Ambiental para Agua del Perú (ECA-Agua).

En España, la **GUÍA DE UTILIZACIÓN AGRÍCOLA DE LOS MATERIALES DIGERIDOS* POR BIOMETANIZACIÓN ELABORADA EN ESPAÑA EN EL AÑO 2011**, refiere que Alemania, Reino Unido y Suiza cuentan con estándares que definen la calidad para el uso en agricultura del material residual semilíquido, producto final de la codigestión anaerobia de residuos orgánicos asimismo estos países son referente de España para legislar sobre este tema. La calidad de estos materiales residuales para uso agrícola depende de sus características químicas y biológicas. Los criterios de calidad son: **a)** Contenido en materia orgánica y nutriente, **b)** Estabilidad (biodegradabilidad) y madurez (fitotoxicidad), **c)** Nivel de higienización y **d)** Presencia de compuestos tóxicos e impurezas. Independientemente del cosustrato, el proceso de digestión anaerobia supone una disminución muy importante en la carga de microorganismos coliformes, con contenido de *E. coli* inferior a 1000 NMP/g aunque, la principal limitación del material digerido como fertilizante lo impone la presencia de *Salmonella sp.*

Por estas razones la higienización de estos materiales residuales es un requisito imprescindible antes de su aplicación agrícola. Como parte de las normas para la certificación de estos productos, se establecen tres principales niveles: manejo del proceso de digestión anaerobia (temperaturas termófilas 55°C, tiempo de retención, etc), pre o post tratamiento (pasteurización, compostaje de la fracción sólida, etc) y la calidad del producto final.

***Digerido**, es el término para referirse al material residual resultante de la digestión anaerobia también conocido como digestato en referencia al término inglés “digestate” (PROBIOGAS, 2011).

2.1.2 Efecto de los microorganismos eficaces sobre efluentes, aguas y lugares contaminados

Investigación **“EFICIENCIA DE LOS MICROORGANISMOS EFICACES (EM) EN LA ESTABILIZACIÓN DE LODOS SÉPTICOS PARA SU REUSO AGRÍCOLA”**. Los autores concluyen que el tratamiento con EM eliminó efectivamente más del 99% de los coliformes totales y fecales a las dos semanas de tratamiento y asimismo resaltan la eficacia del tratamiento estudiado (10 % de EM) en la estabilización de los lodos sépticos para su uso agrícola (Fioravanti y Vega, 2003).

En Colombia, la investigación **“UTILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS EFICACES (EM®) EN UNA EXPLOTACIÓN AVÍCOLA DE CÓRDOBA: PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y**

CONTROL AMBIENTAL” refiere que los EM® lograron reducir la carga de coliformes totales presentes en la cama de los pollos. Los resultados del análisis microbiológico mostraron en el día 18 un recuento de unidades formadoras de colonias de 82.5×10^5 UFC/ml en el lote con EM® y 92.5×10^5 UFC/ml en el lote control sin EM®, el día 25 el recuento fue de 95×10^5 UFC/ml en el lote con EM® y 260×10^5 UFC/ml en el lote control sin EM®, el día 35 el recuento fue de 185×10^5 UFC/ml en el lote con EM® y 1575×10^5 UFC/ml en el lote control sin EM® (Hoyos, Alvis, Jabib, Garcés, Pérez y Mattar, 2008).

También la investigación **“REDUCCIÓN DE COLIFORMES Y *Escherichia coli* EN UN SISTEMA RESIDUAL LÁCTEO MEDIANTE MICROORGANISMOS BENÉFICOS”** este estudio evaluó la capacidad de una mezcla de microorganismos benéficos (MB) para remover coliformes y *E. coli* presentes en residuos líquidos generados en una planta de tratamiento lácteo, teniendo como factores controlados, la concentración de MB y el tipo de carga orgánica almacenada en el afluente. La reducción en la población de coliformes totales fluctuó entre 41,1 y 48% y, entre 49,5 y 52,9% para las poblaciones de *E. coli* al utilizar concentraciones de MB de 2% y 4% asimismo el investigador indica que los recuentos iniciales de dichas poblaciones en el efluente fueron superiores a los establecidos como límite por la norma colombiana que exige un NMP de coliformes totales

de 20,000 microorganismos/100 ml y un NMP de *E. coli* de 2,000 microorganismos /100 ml (Corpas y Herrera, 2012).

En Uruguay, la aplicación de EM™ activado sobre efluentes domésticos, industria y granjas es utilizado debido a su eficacia para reducir la demanda biológica de oxígeno (DBO) y la población de patógenos como coliformes, salmonella y otros (EEAITAJ, 2013).

En Perú, la tesis doctoral “**CAPACIDAD DEGRADATIVA DE DOS CONSORCIOS MICROBIANOS DEL DESECHO PESQUERO SANGUAZA CONTAMINANTE DEL PUERTO MALABRIGO, PERÚ**” Determinó la capacidad degradativa de dos consorcios microbianos del desecho pesquero sanguaza contaminante del Puerto Malabrigo en Perú. Empleando 04 recipientes herméticos para la determinación de la capacidad degradativa de: **Microorganismos Eficaces (ME)**, Consorcio nativo (CN), Consorcio Nativo suplementado con Enzimas Inmovilizadas (CN - EI) y el **testigo (solo sanguaza)**, para un tiempo de evaluación de 08 días, el investigador determinó la concentración de coliformes totales en cada uno de los procesos degradativos antes mencionados obteniendo los siguientes resultados **4.6×10^3 NMP/100 mL**, **7.0×10^3 NMP/100 mL**, **6.0×10^3 NMP/100 mL** y **4.6×10^5 NMP/100 mL** respectivamente (Robles, 2005).

Así mismo en la investigación titulada **“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE BIOL DE SEGUNDA GENERACIÓN DE ESTIÉRCOL DE OVINO PRODUCIDO A TRAVÉS DE BIODIGESTORES”** realizado por Alicia Medina Valdiviezo en el año 2013, concluye que los análisis microbiológicos realizados en el biol proveniente de un proceso de biodigestión anaeróbica con una duración de 120 días, no terminó con los patógenos presentes en el estiércol fresco de ovino presentando una concentración inicial de coliformes totales y fecales de 15 NMP/100 ml y 4 NMP/100 ml respectivamente. Sin embargo este mismo biol (70%), al someterlo a una fermentación con microorganismos benéficos (10%) y melaza (20%) durante 30 días dio como resultado un producto inocuo, el cual debido a su nivel de acidez (pH=3.7) se encontraba libre de microorganismos patógenos, coliformes totales, fecales, *Staphylococcus* y *Salmonella sp.*, cuyo uso no implicaría riesgos a la salud de las personas, la calidad del suelo y cultivos.

2.2 Marco conceptual

2.2.1 Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso natural en el que los microorganismos descomponen la materia orgánica en tanques digestores herméticos para producir biogás y digerido¹ (Lukehurst, 2010).

La digestión anaeróbica consiste en la descomposición de material biodegradable en ausencia de oxígeno para dar como resultado dos productos principales: biogás (compuesto mayoritariamente por metano) y el **lodo estabilizado**, conocido como digerido (AgroWaste, 2013).

Del Manual de Biogás, proyecto “Chile: Remoción de Barreras para la Electrificación Rural con Energías Renovables” Elaborado con el apoyo de la FAO y publicado en Chile en el año 2011, se extrajo la siguiente información:

El proceso anaeróbico se clasifica como fermentación anaeróbica o respiración anaeróbica dependiendo del tipo de aceptores de electrones.

A. Fermentación anaeróbica. En una fermentación anaeróbica, la materia orgánica es catabolizada en ausencia de un aceptor de

electrones externo mediante microorganismos anaeróbicos estrictos o facultativos a través de reacciones de oxidación-reducción bajo condiciones de oscuridad. El producto generado durante el proceso acepta los electrones liberados durante la descomposición de la materia orgánica. Por lo tanto, la materia orgánica actúa como dador y aceptor de electrones. En la fermentación, el sustrato es parcialmente oxidado y por lo tanto, sólo una pequeña cantidad de la energía contenida en el sustrato se conserva.

Es importante destacar que *la mayor parte (dos tercios) del metano se produce mediante fermentación anaeróbica* en el cual el acetato actúa como dador y aceptor de electrones. La producción de metano mediante esta vía se conoce comúnmente como *metanogénesis acetotrófica*.

B. Respiración anaeróbica. La respiración anaeróbica es un proceso biológico de oxido-reducción de monosacáridos y otros compuestos en el que el aceptor terminal de electrones es una molécula inorgánica distinta del oxígeno, y más raramente una molécula orgánica. La realizan exclusivamente algunos grupos de bacterias y para ello utilizan una cadena transportadora de electrones análoga a la de las mitocondrias en la respiración aeróbica. No debe confundirse con la fermentación, que es un proceso también anaeróbico, pero en el que no participa nada parecido a una cadena

transportadora de electrones y el aceptor final de electrones es siempre una molécula orgánica. La respiración anaeróbica requiere aceptores de electrones externos para la disposición de los electrones liberados durante la degradación de la materia orgánica. Los aceptores de electrones en este caso pueden ser CO_2 , SO_4^{2-} o NO_3^- . La energía liberada es mucho mayor a la que se produce durante la fermentación anaeróbica.

C. Productos finales de la digestión anaerobia. Los principales productos del proceso de digestión anaerobia, en sistemas de alta carga orgánica y en mezcla completa, son el biogás y un *bioabono que consiste en un efluente estabilizado*.

2.2.2 Biodigestor

Es un recipiente o tanque (cerrado herméticamente) que se carga con residuos orgánicos. En su interior se produce la descomposición de la materia orgánica para generar biogás, el cual puede reemplazar o complementar al gas natural (de garrafas o red pública). El residuo, luego de ser descompuesto y estabilizado, se utiliza como biofertilizante. El biodigestor puede ser construido con diversos materiales como ladrillo, cemento, metal o plástico (IDE-UNCUYO, 2013).

Un biodigestor básicamente consiste en un depósito cerrado, donde se introducen los residuos orgánicos mezclados con agua para ser digeridos por microorganismos (Lagrange, 1979).

A. Características del digestor. Para que un digestor de residuos orgánicos opere en forma correcta, deberá reunir las siguientes características:

Ser hermético con el fin de evitar la entrada de aire, el que interfiere con la digestión anaeróbica y a la vez, impedir las fugas del biogás producido.

- a) Estar térmicamente aislado para evitar cambios bruscos de temperatura, lo que usualmente se consigue construyéndolos enterrados.
- b) Aun no siendo en recipiente de alta presión, el contenedor primario de gas deberá contar con una válvula de seguridad.
- c) Contar con medios para efectuar la carga y descarga del sistema.
- d) Tener acceso para el mantenimiento.
- e) Contar con un medio para romper las natas o costras que se forman.

B. Tipos de biodigestores. Los biodigestores varían ampliamente de acuerdo con su complejidad y utilización. Los más sencillos caen dentro de la clasificación de digestores discontinuos o de cargas por lotes y los más complejos se caracterizan por poseer dispositivos

que permiten alimentarlos, proporcionándoles calefacción y agitación. Resulta conveniente clasificarlos según su modo de operación con relación a su alimentación o carga en los siguientes tipos:

- a) **Continuos:** Cuando la alimentación del digestor es un proceso ininterrumpido, el efluente que descarga es igual al afluente o material de carga (que entra al digestor), con producciones de biogás, uniformes en el tiempo. Son utilizados principalmente para el tratamiento de aguas negras. Corresponde a plantas de gran capacidad, tipo industrial, en las cuales se emplean equipos comerciales para alimentarlos, proporcionándoles calefacción y agitación, así como para su control. Dado que se genera una gran cantidad de biogás, habitualmente, éste se aprovecha en aplicaciones industriales.
- b) **Semi continuos:** Cuando la primera carga que se introduce al digestor consta de una gran cantidad de materias primas. Posteriormente, se agregan volúmenes de nuevas cargas de materias primas (afluente), calculados en función del tiempo de retención hidráulico (TRH) y del volumen total del digestor. Se descarga el efluente regularmente en la misma cantidad del afluente que se incorporó. Este proceso es usado en el medio rural, cuando se trata de sistemas pequeños para uso doméstico. Los diseños más populares son el digestor Indiano y chino.

c) **Discontinuos o régimen estacionario:** Los digestores se cargan con las materias primas en una sola carga o lote. Después de un cierto período de fermentación, cuando el contenido de materias primas disminuye y el rendimiento de biogás decae a un bajo nivel, se vacían los digestores por completo y se alimentan de nuevo dando inicio a un nuevo proceso de fermentación. Esto se conoce también como digestores Batch o Batelada (FAO, 2011).

2.2.3 Biol

El biol se obtiene del proceso de descomposición anaeróbica de los desechos orgánicos. La técnica empleada para lograr este propósito son los biodigestores (RAAA, 1999).

El biol es la fracción líquida resultante del fango proveniente del fermentador o biodigestor. Este “fango” es decantado o sedimentado obteniéndose una parte líquida a la cual se le llama “Biol”. Aproximadamente el 90% del material que ingresa al Biodigestor se transforma a biol. Esto depende naturalmente del tipo de material a fermentar y de las condiciones de fermentación (Aparcana, 2008)

Los investigadores Jesús M. Guzmán China, Elizabeth Guzmán Marrero y Laimi Pisch Vidal afirman en *“Bondades del biol”*, publicado en la web CUBASOLAR, lo siguiente:

Los **cambios químicos** que provocan en el suelo la materia orgánica en general y el bioabono en particular, son:

1. Aumenta la capacidad de intercambio catiónico.
2. Causa un efecto tapón (buffer) en el pH del suelo.
3. Aporta macronutrientes para el consumo de las plantas.

Los **cambios físicos** que la materia orgánica, y por consiguiente el bioabono provocan en el suelo al ser añadida en él, son:

1. En suelos arenosos, favorece la adherencia de partículas, lo que origina una estructura granular que facilita la labranza, la aireación y el movimiento del agua.
2. En suelos muy pesados se mezcla con las arcillas para producir suelos mejor drenados.
3. Disminuye la pérdida de suelos por erosión, causada principalmente por la acción del agua y el viento.
4. Evita la pérdida por lixiviación de nutrientes minerales (por ejemplo, aportados por fertilizantes químicos).
5. Cambia el color original de la tierra a colores más oscuros que absorben mayor cantidad de energía radiante proveniente del Sol.

1978). Debe enfatizarse que la lógica detrás de la utilización de este grupo de bacterias como "indicadores" no se basa en su potencialidad para causar enfermedades al hombre (McJunkin, 1988).

**TABLA N°2.1
GRUPO COLIFORME**

GÉNEROS	FUENTE
<i>Escherichia</i>	Humanos y animales
<i>Klebsiella</i>	Heces, ambiente
<i>Enterobacter</i>	Heces, ambiente
<i>Citrobacter</i>	Ambiente
<i>Serratia</i>	Ambiente

Fuente: (Vargas, 2000)

B. Organismos Coliformes Fecales

Las bacterias coliformes fecales (coliformes termorresistentes) son un subgrupo de las bacterias coliformes totales y tienen las mismas propiedades, excepto que toleran y crecen a una mayor temperatura, 44-45°C, y producen indol a partir del triptófano; los organismos que poseen estas propiedades son considerados como presuntos *Escherichia coli* (PAHO/WHO, 1987).

C. *Escherichia coli*

El anaerobio facultativo *E. coli* es uno de los habitantes más comunes del tracto intestinal. Su presencia en el agua y alimentos es importante como indicación de contaminación fecal. *E. coli* no es considerado normalmente como un patógeno; sin embargo,

2.2.4 Coliformes

A. Organismos Coliformes Totales

Los coliformes se pueden definir como bacterias gramnegativas, oxidasa negativas, aerobias o facultativas anaerobias que no forman esporas, capaces de crecer en presencia de sales biliares, y que fermentan la lactosa para producir ácido y gas dentro de las 24 a 48 horas a 35 o 37 ° C. Los géneros que se ajustan a esta descripción son *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*. Sin embargo, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* incluyen especies que son habitantes normales de las plantas y el medio ambiente; por lo tanto, una prueba de coliformes positiva no necesariamente indica contaminación fecal (Tortorello, 2003) y (PAHO/WHO, 1987).

El grupo de coliformes totales incluye varios géneros, todos los cuales pueden ser de origen fecal. En condiciones adecuadas, pueden multiplicarse en presencia de material orgánico. El grupo coliformes no debe ser considerado en general como un indicador de organismos de origen exclusivamente fecal, especialmente en países con temperaturas muy altas, donde pueden abundar bacterias coliformes de origen no fecal. (PAHO/WHO, 1987).

En la determinación del grupo coliformes se realiza una diferenciación entre los coliformes de origen fecal y no fecal (EPA,

puede ser causa frecuente de infecciones del tracto urinario y algunas cepas producen enterotoxinas que son causa común de la diarrea del viajero (Tortora, 1993).

E. coli está presente en todas las heces de mamíferos en altas concentraciones; no se multiplica de forma apreciable, pero puede sobrevivir en el agua durante 4 a 12 semanas, por lo que es útil como indicador de la contaminación fecal de los sistemas de agua potable (Tortorello, 2003).

2.2.5 Método de Fermentación en Tubos Múltiples

Del libro Fundamentos de limnología neotropical, de los autores Roldán Pérez Gabriel y Ramírez Restrepo John Jairo. Publicado en el año 2008 se extrajo la siguiente información:

El método de fermentación en tubos múltiples determina la presencia del número de bacterias coliformes mediante la siembra de una serie de porciones de un volumen determinado de muestra en tubos que tienen un medio favorable de cultivo. El método de los tubos múltiples se basa en leyes de probabilidades y se utiliza para obtener una estimación del número de bacterias en una muestra que se expresa como el número más probable (NMP). La determinación del NMP de coliformes en una muestra se efectúa a partir de la técnica de los tubos múltiples. Esta se basa en el principio de que las bacterias presentes en una muestra pueden separarse unas de otras por agitación, resultando una suspensión de bacterias individuales, uniformemente distribuidas en ella.

Consiste en la inoculación de volúmenes decrecientes de la muestra en un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de las bacterias investigadas; cada volumen es inoculado en una serie de tubos. Por medio de soluciones sucesivas se obtienen inóculos, cuya siembra da lugar a resultados negativos, al menos en un tubo de la serie inoculada. La combinación de resultados negativos y positivos permite estimar la densidad original de las bacterias (NMP), debido la aplicación de cálculos de probabilidades. Para análisis de agua se utiliza el factor 10 de dilución, inoculándose múltiplos o submúltiplos de 1mL de muestra en series de tres tubos para cada volumen que va a ser inoculado. muestras muy contaminadas se deben hacer diluciones mayores (10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}). El examen se realiza en dos etapas (prueba presuntiva y prueba confirmativa) de realización obligatoria para toda muestra de agua.

(...) Una vez tomada la muestra, se rotula y se transporta refrigerada al laboratorio donde debe procesarse antes de 24 horas. En él, y siguiendo la técnica de los tubos múltiples, se homogenizan, se hacen diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} en solución salina de peptona y se realizan las pruebas presuntiva y confirmativa. La prueba presuntiva consiste en inocular volúmenes determinados de la muestra (10; 1; 0,1; 0,01) en series de tres tubos de caldo lactosado, que son inoculados a 35°C durante 24 a 48 h. La producción de gas en el medio de cultivo indica una prueba presuntiva positiva para coliformes. Dependiendo del número de coliformes esperado, se pueden preparar las series de tubos indicadas en la tabla 2.2

La prueba confirmativa consiste en el traspaso de cada cultivo de la prueba presuntiva, a tubos con caldo lactosado verde bilis brillante (CLVBB) y se incuban a 35°C de 24 a 48 h. La producción del gas en este medio indica una

prueba confirmativa positiva para coliformes. Para más información sobre esta técnica consúltense APHA, AWWA & WPCF (1995).

La tabla 2.3 muestra los criterios utilizados por la Organización Mundial de la Salud —OMS— (1978) para clasificar las aguas de acuerdo con el NMP de coliformes totales en 100 mL. La importancia de los análisis microbiológicos radica no solamente en la potabilidad del agua para uso doméstico, agrícola o industrial, sino que también tiene enormes aplicaciones en la limnología. Muestras de agua que presentan valores elevados de coliformes totales, indican entrada de aguas residuales domésticas al ecosistema y, por tanto, riesgo de eutrofización.

**TABLA N°2.2
RELACIÓN ENTRE DENSIDAD ESPERADA DE
COLIFORMES Y DILUCIONES EFECTUADAS EN TUBOS**

Densidad esperada de coliformes	Series decimales
2 - 542	10, 1, 0.1 mL
20 - 5420	1, 0.1 y 0.01 mL
200 - 54200	0.1, 0.01 y 0.001 mL
2000 - 542000	0.01, 0.001 y 0.0001 mL

Fuente: Fundamentos de limnología neotropical, 2008

**TABLA 2.3
CRITERIOS UTILIZADOS POR LA OMS (1978) PARA LA
CLASIFICACIÓN DE LAS AGUAS DE ACUERDO CON EL NÚMERO
MÁS PROBABLE (NMP) DE COLIFORMES TOTALES EN 100mL**

N°	Clasificación	NMP de coliformes totales
I	Calidad bacteriológica que no exige más que un simple tratamiento de desinfección	0 - 50
II	Calidad bacteriológica que requiere la aplicación de métodos habituales de tratamiento como coagulación y filtración.	50 - 5000

III	Contaminación intensa que obliga a tratamientos más activos	5000 - 50000
IV	Contaminación extrema, que hace inaceptable el agua a menos que se recurra a tratamientos especiales.	> 50000
Otros criterios seguidos para el uso del agua		
Uso del agua	NMP de coliformes/100 mL	
Para baño, natación y recreo	Menos de 200 y no podrá exceder esta cifra cuando están asociados con aguas negras	
Solo recreo (remo y pesca)	Hasta 1000	
Para agricultura	Hasta 5000 coliformes totales y 1000 fecales	
Para acuicultura	Hasta 230 coliformes totales y 43 coliformes fecales	

Fuente: Fundamentos de limnología neotropical, 2008

2.2.6 Microorganismos Eficaces™ (EM™)

EM™ es la abreviatura de "Effective Microorganisms™" (EMROJAPAN, 2015). EM™ es un producto biológico en el que coexisten varios tipos de microorganismos benéficos que no han sido modificados genéticamente, ni sintetizados químicamente. EM™ se encuentran en un medio líquido con un pH no mayor de 3,5.

Los microorganismos benéficos de origen natural presentes en el EM™ pertenecen a 3 grupos principales: bacterias ácido-lácticas (usadas comúnmente en la elaboración de yogurt, quesos, etc.), levaduras (usadas en la industria de panes, cervezas, vinos, etc.) y bacterias fototróficas o fotosintéticas (presentes comúnmente en diversos ecosistemas).

Base de la tecnología EM™. Los microorganismos benéficos contenidos en el EM™ están dispuestos en un medio líquido donde se desarrollan de manera sinérgica y complementaria.

Los microorganismos que forman el EM™ desempeñan individualmente funciones esenciales. Sin embargo, el éxito de la Tecnología EM™ radica en la coexistencia de éstos en el mismo medio, la cual promueve mayores beneficios que los producidos por los mismos de forma independiente.

La comunidad simbiótica de microorganismos creada en el EM™ no tiene un efecto aislado, ya que cuando se desarrollan colectivamente, los microorganismos nativos del medio empiezan a trabajar de la misma manera que los Microorganismos Eficaces™.

Al entrar en contacto con la materia orgánica, los Microorganismos Eficaces™ secretan sustancias benéficas como enzimas, ácidos orgánicos, y antioxidantes, cambian la micro y macro flora del medio y mejoran el equilibrio natural. De esta manera, los microorganismos patógenos causantes de enfermedades son inhibidos por competencia microbiana (BIOEM, 2014).

El aumento de poblaciones de EM en los suelos promueve el desarrollo de microorganismos benéficos existentes en el suelo. En este proceso, microbios específicos (especialmente los dañinos) son suprimidos, reduciendo especies microbiales del suelo que causan enfermedades.

Los EM mantienen un proceso simbiótico con las raíces de las plantas junto a la rizosfera y las raíces de las plantas también secretan sustancias como carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos y enzimas activas. Los EM utilizan estas secreciones para su crecimiento. Esto significa que los EM en la rizosfera coexiste con las plantas. Por ello, en suelos dominados por los EM las plantas crecen excepcionalmente bien.

El EM-1 utilizado en la presente tesis, es uno de los diversos productos con los que cuenta la tecnología EMTM. La diferencia radica en la concentración de los microorganismos eficaces utilizados en cada cultivo (INFOAGRO, 2011).

Principales microorganismos en el EM®

A. Bacterias fototróficas (*Rhodospseudomonas spp.*)

Las bacterias fototróficas son un grupo de microbios independientes y autosuficientes. Estas bacterias sintetizan sustancias útiles de secreciones de raíces, materia orgánica y/o gases dañinos (ej: ácido sulfhídrico) con el uso de luz solar y calor del suelo como fuentes de energía. Estas sustancias útiles incluyen aminoácidos, ácidos nucleicos, sustancias bioactivas y azúcares, los cuales promueven el crecimiento y desarrollo de la planta. Los metabolitos hechos por estos microorganismos son absorbidos directamente por las plantas y actúan como sustrato para el

incremento poblacional de microorganismos benéficos. Las bacterias fototróficas pueden considerarse como el núcleo de la actividad de los EM porque refuerzan las actividades de otros microorganismos, denominándose a este fenómeno “coexistencia y coprosperidad” (INFOAGRO, 2011).

B. Bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus spp.*)

Las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico de azúcares y otros carbohidratos, producidos por las bacterias fototróficas y levaduras. El ácido láctico es un compuesto esterilizante fuerte que suprime microorganismos dañinos y ayuda a la descomposición de materiales como la lignina y la celulosa fermentándolos, removiendo efectos no deseables de la materia orgánica no descompuesta. Las bacterias ácido lácticas tienen la habilidad de suprimir enfermedades incluyendo microorganismos como fusarium, que aparecen en programas de cultivos continuos. El uso de bacterias ácido lácticas reducen las poblaciones de nemátodos y controla la propagación y dispersión de fusarium, y gracias a ello induce un mejor ambiente para el crecimiento de los cultivos (INFOAGRO, 2011).

C. Levaduras (*Saccharomyces spp.*)

Las levaduras sintetizan sustancias antimicrobiales y otras útiles, requeridas por las plantas para su crecimiento a partir de aminoácidos y azúcares secretados por las bacterias fototrópicas, materia orgánica y raíces de plantas. Las sustancias bioactivas como las hormonas y las enzimas producidas por las levaduras promueven la división activa celular y radical. Estas secreciones también son sustratos útiles para los EM como las bacterias ácido lácticas y actinomicetes (INFOAGRO, 2011).

2.2.7 Concentración aceptable de microorganismos patógenos para uso de biol en el campo agrícola.

Los países europeos, como Alemania, Reino Unido y Suiza tienen estándares que definen la calidad para el uso en agricultura de los materiales residuales procedentes de la digestión anaerobia. Ver tabla 2.4.

TABLA Nº2.4
PARÁMETROS DE CALIDAD ESTABLECIDOS PARA LOS MATERIALES
DIGERIDOS EN DIVERSOS PAÍSES EUROPEOS PARA SU UTILIZACIÓN
COMO FERTILIZANTES O ENMIENDAS DEL SUELO

Parámetros	PAS 110 (Reino Unido; BSI, 2010)		RAL - QAS (Alemania; Siebert y col., 2008)		ASCP (Suiza; ASCP, 2001)	
	Indicador	Límite superior	Indicador	Límite superior	Indicador	Límite superior
Estabilidad	Ácidos grasos volátiles	0.43 g DQO/ g MO	Ácidos orgánicos	4000 mg/ l		
	Biogás residual	0.25 g/l MO	Ausencia de malos olores			
Higienización	<i>E. coli</i>	1000 NMP/UFC/g MF	Salmonella	Ausencia		No debe contener niveles detectables de microorganismos patógenos para plantas, animales o humanos
	Salmonella	Ausencia en 25 g MF	Criterios específicos para SANDACH			
	Criterios específicos para SANDACH		Semillas viables	2 semillas/ l		
Residuos tóxicos e impurezas	Cristal, metal, plásticos (> 2mm)	0.5% MS	Impurezas > 2mm	0.5% MS	Cristal, metal, plásticos (> 2mm)	0.5% MS
	Piedras (> 5mm)	8 % MS			Piedras (> 5mm)	5 % MS
	<u>Metales pesados</u>	<u>mg/Kg MS</u>	<u>Metales pesados</u>	<u>mg/Kg MS</u>	<u>Metales pesados</u>	<u>mg/Kg MS</u>
	Cd	1.5	Cd	1.5	Cd	1.0
	Cr	100	Cr	100	Cr	100
	Cu	200	Cu*	100	Cu	100
	Pb	200	Pb	150	Pb	120
Hg	1.0	Hg	1.0	Hg	1.0	
Ni	50	Ni	50	Ni	30	
Zn	400	Zn*	400	Zn	400	
MO y nutrientes	pH	Declarar	Ph	Declarar	pH	Declarar
	MS	Declarar	MS	> 15% (sólido)	MS	Declarar
	MO	Declarar		≤ 15% (líquido)	MO	Declarar
	N-total	Declarar	MO	≥ 30% MS (sólido)	N-total	Declarar
	N-NH4	Declarar		≥ 40% MS (líquido)	N-NH4	Declarar
	P-total	Declarar	N-total	Declarar	P-total	Declarar
	K-total	Declarar	N-NH4+N-NO ₃	Declarar	K-total	Declarar
	Cl- soluble	Declarar	P, K, Mg y S	Declarar	Ca y Mg	Declarar
	Na soluble	Declarar	Alcalinidad (CaO)	Declarar	Salinidad	Declarar
			Salinidad	Declarar	Densidad	Declarar
		Densidad	Declarar			
		Micronutrientes	Declarar			

MO: materia orgánica; MS: materia seca; MF: materia fresca. DQO: demanda química de oxígeno.

*permitidos contenidos más altos, si proceden de estiércoles.

Fuente: Guía de utilización de los materiales digeridos por biometanización. España 2011.

El trabajo de investigación denominado “**Parámetros de calidad para el uso de aguas residuales. Guías de calidad de efluentes para la protección de la salud**” realizado por el Ing. Guillermo León Suematsu (1995), en su apartado: *Normas existentes en los países que favorecen el uso de aguas residuales*, indica que “La comunidad científica ha elaborado criterios de calidad, los cuales son utilizados por organismos como la FAO y la OMS para elaborar las pautas de calidad que se han mencionado anteriormente (ej. lineamientos de Engelberg) y a su vez, los gobiernos pueden utilizarlos para establecer normas de calidad que se aplican de manera coactiva en los países mediante leyes y reglamentos.

En general, estas normas o pautas de calidad de las aguas residuales para uso en riego de cultivos especifican las normas explícitas (ej. concentración máxima de coliformes) y en algunos casos el tratamiento mínimo requerido, de acuerdo con la clase de cultivo que se va a regar.” Ver tabla N° 2.5.

**TABLA N°2.5
EJEMPLOS DE NORMAS MICROBIOLÓGICAS VIGENTES
PARA LA REUTILIZACIÓN DE AGUAS RESIDUALES EN RIEGO**

País	Riego restringido	Riego sin restricciones
Omán	Máximo 23 CT/100 ml ^a Media < 2.2 CT/100 ml	No se permite el riego de cultivos
Kuwait	Menos de 10000 CT/100 ml	< de 100 CT/100 ml No se permite el riego en el caso de verduras para ensalada o frescas
Arabia Saudita	Se permite el uso de efluentes secundario para forraje, cultivos de secano, verduras tratadas para su consumo y también para regar jardines.	< de 2.2 CT/100 ml < de 50 CF/100 ml ^b

Túnez	Árboles frutales, forraje y verduras que se consumen cocinadas. - Tratamiento secundario (incluida cloración) - Ausencia de <i>vibrio cholerae</i> y <i>Salmonelás</i>	No se permite el riego de verduras que se comen crudas.
México	Para zonas recreativas: < de 10.000 CT/100 ml < de 2.000 CF/100 ml	Para verduras que se comen crudas y frutos en posible contacto con el suelo: < de 1.000 CT/100 ml
Perú	Tratamiento específico según el tipo de reutilización.	No se riegan los cultivos de poca altura, tubérculos ni raíces que pueden comerse crudos.

a CT: Coliformes totales
b CF: Coliformes fecales

Fuente: Mara, D. 1990.

Nuestro país no cuenta con estándares que definan la calidad para el uso en agricultura de los materiales residuales procedentes de la digestión anaerobia.

Sin embargo, se cuenta con los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y disposiciones complementarias aprobado por D.S N°004-2017-MINAM, los cuales establecen los siguientes parámetros para el agua Categoría 3: Riego de vegetales y bebida de animales.

TABLA N°2.6
ESTÁNDARES DE CALIDAD AMBIENTAL PARA AGUA.
SUBCATEGORÍA D1: RIEGO DE VEGETALES

PARÁMETROS	Unidad	D1: Riego de vegetales	
		Agua para riego no restringido (c)	Agua para riego restringido
Microbiológicos y parasitológicos			
Coliformes Termotolerantes	NMP/100ml	1000	2000
<i>Escherichia coli</i>	NMP/100ml	1000	**
Huevos de Helmintos	huevos/ litro	1	1

El símbolo ** dentro de la tabla significa que el parámetro no aplica para esta Subcategoría.

(c): Para el riego de parques públicos, campos deportivos, áreas verdes y plantas ornamentales, sólo aplican los parámetros microbiológicos y parasitológicos del tipo de riego no restringido

Fuente: ECA para Agua. D.S N° 004-2017-MINAM

2.3 Definiciones de términos básicos

De acuerdo al Reglamento Técnico para los Productos Orgánicos D.S N° 044-2006-AG del Perú.

- ***Abonos orgánicos precompostados:*** Abonos elaborados con materiales de origen orgánico (estiércol y restos de cultivo), conducidos en aun procesos de descomposición.
- ***Agrícola:*** Referido a lo rural, agrario, agropecuario.
- ***Agricultura orgánica:*** Sistema holístico de gestión de la producción agrícola que fomenta y mejora la salud del agroecosistema y en particular la biodiversidad, los ciclos biológicos y la actividad biológica del suelo.
- ***Biodegradable:*** Sustancia artificial o natural que en condiciones naturales puede descomponerse rápidamente en sustancias más simples, contaminado en menor grado el ambiente.
- ***Estabilización biológica:*** Equilibrio dinámico de las interacciones entre los actores biológicos de un sistema.
- ***Proceso de compostaje:*** Procedimiento controlado por el cual se fabrica el abono orgánico (estiércol y restos de cultivo), hasta su descomposición y estabilización.

CAPÍTULO III VARIABLES E HIPÓTESIS

3.1 Variables de la investigación

- **Variable independiente:** Dosis óptima de Microorganismos eficaces aplicados al biol de estiércol de porcino para uso agrícola.

Definición conceptual: Los microorganismos eficaces son un cultivo mixto de microorganismos benéficos de origen natural que secretan sustancias que inhiben por competencia microbiana a los microorganismos patógenos.

- **Variable dependiente:** Reducción de la concentración de coliformes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola.

Definición conceptual: Los coliformes totales se definen como bacterias gram-negativas que fermentan la lactosa a una temperatura de 35 ó 37°C, con producción de ácido, gas y aldehído dentro de 24 a 48 horas. Este grupo está conformado por coliformes fecales y no fecales. Los coliformes fecales crecen a una mayor temperatura, 44-45°C. La presencia de *Escherichia coli* es un indicador de contaminación fecal directa.

3.2 Operacionalización de variables

$$Y = f(x)$$

A mayor concentración de microorganismos eficaces activados sobre el biol de estiércol porcino habrá una mayor reducción de la concentración de coliformes.

- ❖ **Variable independiente:** Dosis óptima de Microorganismos eficaces aplicados al biol de estiércol de porcino para uso agrícola.

Definición operacional: Dosis óptima del cultivo de Microorganismos eficaces activados con melaza durante una semana que permita reducir la mayor concentración de coliformes.

Indicadores

- Cantidad añadida de microorganismos eficaces (EMTM) sobre el biol.
- Variación de pH
- Olor
- Formación de nata.

❖ **Variable Dependiente:** Reducción de la concentración de coliformes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola.

Definición operacional: Reducción de la concentración de coliformes.

Indicador: Análisis microbiológico para el recuento de coliformes totales, fecales por la técnica de fermentación por tubos múltiples cuyos resultados se expresan en términos de Número Más Probable (NMP) en 100 mL y para la detección de *E. coli* se utilizó medio de cultivo EC con MUG

3.3 Hipótesis general

Una dosis óptima de microorganismos eficaces reduce la concentración de coliformes presentes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola.

CAPÍTULO IV METODOLOGÍA

4.1 Tipo de investigación

La investigación fue aplicada debido a que tenía por objetivo solucionar un problema (Arias F., 2012).

El problema: Presencia de coliformes en el biol.

Se planteó determinar una dosis óptima de microorganismos eficaces (variable independiente), para reducir la concentración de coliformes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola (variable dependiente) (Arias F., 2012).

4.2 Diseño de la investigación

La investigación fue experimental, definida como un proceso que consiste en someter a un objeto a determinadas condiciones (variable independiente), para observar los efectos que se producen (variable dependiente) (Arias F., 2012)

Asimismo, el diseño fue completamente aleatorio por ser un diseño básico, utilizado cuando interviene una única variable independiente, que presenta diversos niveles de tratamientos (...). También llamado "análisis de la varianza unidireccional" o "diseño de factor único" (Vargas A. 1995 p.412)

4.2.1 Procedimiento Experimental

La investigación consistió en la fermentación del biol con dosis del 0%, 5%, 10% y 15% de microorganismos eficaces activados (Ver, gráfico N°4.1). El lugar de tratamiento y determinación de coliformes se realizó

en el laboratorio microbiología del Instituto de Investigación de Especialización en Agroindustria antes llamado Centro Experimental Tecnológico (CET) con el apoyo del laboratorio de microbiología de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Recursos Naturales de la Universidad Nacional del Callao.

Para el análisis microbiológico se tomó una muestra de cada repetición y se determinó la concentración de coliformes por la técnica de fermentación por tubos múltiples cuyos resultados se expresaron en términos de Número Más Probable (NMP) en 100 mL finalmente luego de determinar la dosis óptima de EMA, esta fue diluida en agua al 5%, 10% y 15% y aplicándolo a plantas de maíz sembradas en macetas (Grafico 4.2)

A. Toma de muestras del biol de estiércol porcino

La muestra fue tomada de la laguna de estabilización, estructura que almacenaba el efluente proveniente del biodigestor anaerobio de 640 m³ de propiedad de una granja con alrededor de 3000 mil cerdos, ubicada en La Esperanza, zona rural de Huaral (Apéndice Figuras 4.2 y 4.3)

B. Activación del consorcio de Microorganismos Eficaces EMTM

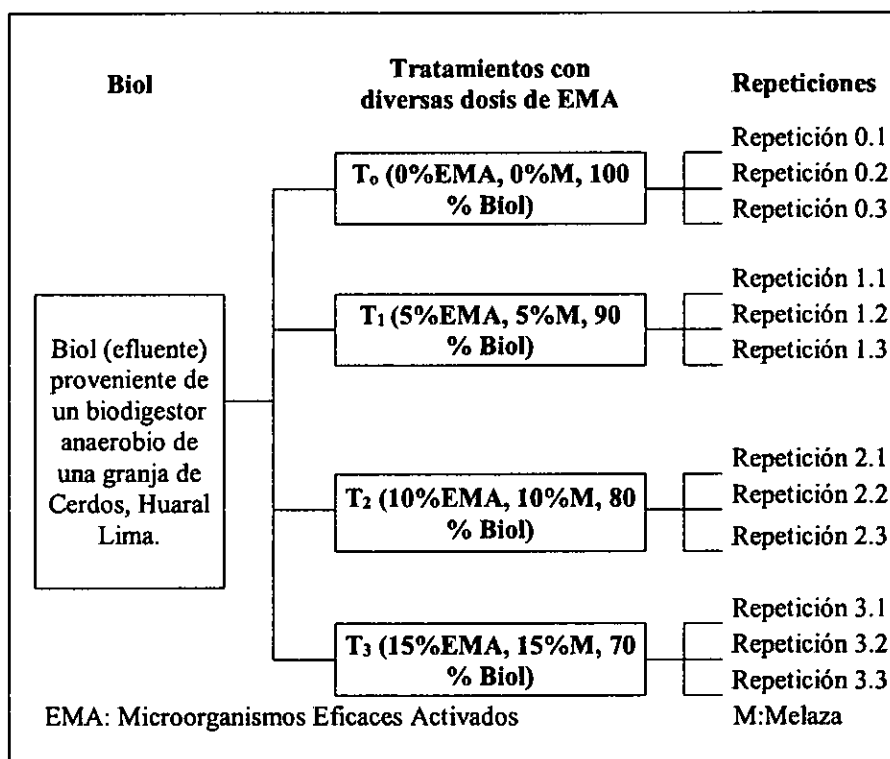
El consorcio de EMTM donado por la empresa BIOEM S.A.C fue activado de acuerdo a las instrucciones del producto, 5% de melaza, 5% EM y 90% agua, dejándose bajo sombra durante 7 días, esta

solución recibió el nombre de Microorganismo Eficaces Activados (EMA).

C. Diseño y construcción de los recipientes herméticos

Se utilizó como recipientes herméticos 12 botellas plásticas transparentes y nuevas de 500 ml de capacidad cada una, con tapa hermética (ver Figura N° 4.1). El material era de plástico (PET) transparente para que pueda verse la reacción durante el proceso. Debido a la producción de gas y toma de muestras para el análisis microbiológico, las botellas resultaron adecuadas para la presente investigación. Cada tratamiento se realizó por triplicado y el contenido de biol, EMA y melaza en cada botella se realizó de acuerdo a la Tabla N° 4.1.

GRÁFICO N° 4.1
DISEÑO EXPERIMENTAL



Elaboración propia

TABLA N° 4.1
CONDICIONES DE TRATAMIENTO PARA OBTENER LA DOSIS ÓPTIMA
DE EMA. CONCENTRACIÓN EN MILILITROS (mL).

T: Tratamiento	Mezcla Total	Biol	Melaza	Variable independiente X: EMA	Variable dependiente Y: Coliformes
T0	500 mL	500 mL	0 mL	X0= 0 mL	Y0
T1	500 mL	450 mL	25 mL	X1= 25 mL	Y1
T2	500 mL	400 mL	50 mL	X2= 50 mL	Y2
T3	500 mL	350 mL	75 mL	X3= 75 mL	Y3

*EMA: EM-1 activado con agua y melaza. Producto comercial EM-1 de la marca EM™

Elaboración propia

TABLA N° 4.2
CONDICIONES DE TRATAMIENTO PARA OBTENER LA DOSIS ÓPTIMA
DE EMA. CONCENTRACIÓN EN PORCENTAJE (%)

T: Tratamiento	Mezcla Total	Biol	Melaza	Variable Independiente X:EMA*	Variable Dependiente Y:Coliformes
T0	100%	100%	0.0%	X0= 0.0%	Y0
T1	100%	90%	5.0%	X1= 5.0%	Y1
T2	100%	80%	10.0%	X2= 10.0%	Y2
T3	100%	70%	15.0%	X3= 15.0%	Y3

*EMA: EM-1 activado con agua y melaza. Producto comercial EM-1 de la marca EM™

Elaboración propia

D. Análisis Microbiológicos

La presencia de coliformes totales, fecales en los tratamientos se determinó utilizando la técnica de fermentación por tubos múltiples cuyos resultados se expresaron en términos de Número Más Probable (NMP) en 100 mL y para la determinación de *E. coli* se utilizó el medio de cultivo EC con MUG. Para el análisis microbiológico se tomó una muestra de cada repetición y se procedió a realizar la metodología establecida por (American Public Health Association [APHA], 2006)

Durante el primer mes, las evaluaciones fueron semanales posteriores a ello se realizaron evaluaciones a la 6ta, 10ma y 17ava semana.

E. Aplicación del biol con dosis optima de EMA en plantas de maíz

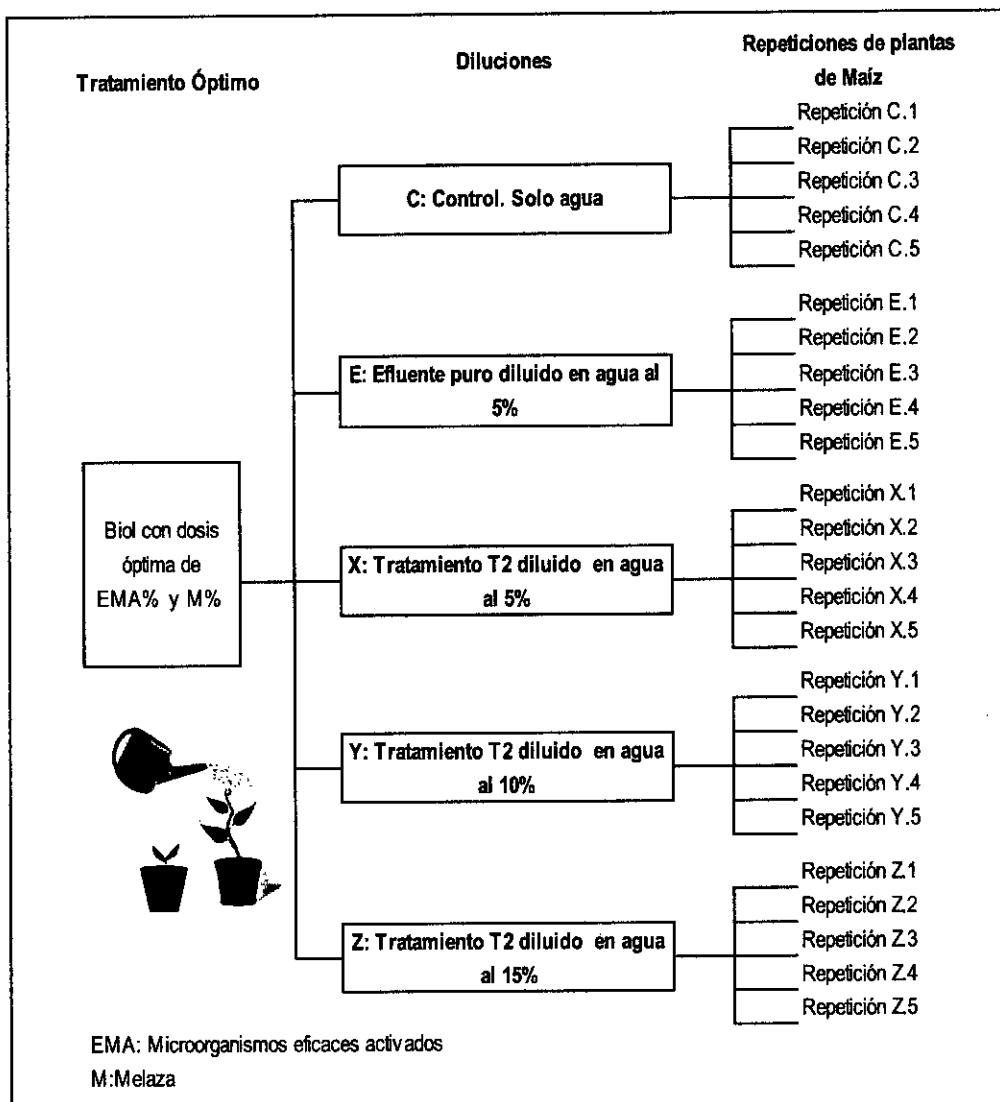
Luego de determinar la dosis óptima de microorganismos eficaces activados (%EMA) se procedió a realizar pruebas con este abono líquido en plantas de maíz. Debido a su bajo pH, este fue diluido en agua al 5%, 10% y 15%. Se acondicionó 05 grupos de macetas por cada dilución, más el control respectivo. Tiempo de evaluación de 77 días (Ver gráfico N° 4.2).

Grupos de Macetas

- **C₀:** Control. Riego de plantas solo con agua
- **E:** Riego de plantas con biol puro diluido en agua al 5%
- **X_n:** Riego de plantas con T₂ diluido en agua al 5%
- **Y_n:** Riego de plantas con T₂ diluido en agua al 10%
- **Z_n:** Riego de plantas con T₂ diluido en agua al 15%

T₂: Tratamiento 2, contiene 10% EMA, 10% Melaza y 80% bi

GRÁFICO N°4.2
DISTRIBUCIÓN DE MACETAS: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ABONO LIQUIDO ORGANICO EN PLANTAS DE MAÍZ HÍBRIDO (VARIEDAD PMX5)



Elaboración propia

Preparación de las macetas (Ver Fotografías en Apéndice)

- **Semillas de maíz:** Se empleó semillas de maíz híbrido de la variedad PMX5, una donación del Programa de Investigación en Maíz de la UNALM.

- **Prueba de germinación:** Bajo sombra en una bandeja de porcelana se colocó en papel toalla 100 semillas de maíz PMX5, luego se procedió a humedecer todas las semillas y a colocar la bandeja dentro de una bolsa transparente. Las semillas germinaron en su totalidad (100% de germinación). Solo con agua y bajo esas condiciones las plantas sobrevivieron 14 días.
- **Macetas:** Se trabajó con recipientes plásticos transparentes de 1 L de volumen a las cuales se les realizó agujeros en la base y laterales.
- **Sustrato:** Se utilizó arena de río, ésta fue lavada, desinfectada con gotas de lejía, secada al sol y esterilizada en un horno de casa a 180 °C por 30 min. Se colocó 1.250 Kg de arena en cada maceta.
- **Capacidad de Campo (CC).** En el laboratorio se determinó que la CC era de 200 ml de agua/maceta. Materiales utilizados una probeta, una gradilla y paño absorbente.
- **Acondicionamiento del lugar:** Todas las macetas fueron colocadas sobre una superficie plana, al aire libre. Debido a la poca capacidad del sustrato de retener el agua se construyó sobre las macetas un techo simple de costalillo con la finalidad de mejorar la humedad del suelo.
- **Agua:** Para todos los ensayos se utilizó agua potable reposada a fin de lograr que se libere el cloro aun presente.
- **Siembra de las semillas de maíz:** Se hizo un hoyo en el sustrato a 02 cm de la superficie y por cada maceta se sembró 02 semillas

- **Riego:** durante las 02 primeras semanas se regó con agua potable reposada. A partir del día 14 se empezó a regar con las diluciones El riego se realizó cada 07 días principalmente.
- **Toma de datos.** Cada 07 días se media altura de la planta (Desde la base superficie hasta la hoja más larga

4.2.2 Materiales, equipos y medios de cultivo y reactivos

A. Toma de muestra del biol

- Frasco de vidrio esterilizado de 500 ml
- Cooler para transportar muestra
- Hielo para conservar muestra
- Bidón de 20 litros con tapa, limpio y desinfectado
- Jarra de plástico de 1 L, limpia y desinfectada
- Guantes, mascarilla y guardapolvo

B. Análisis microbiológico

Medios de cultivo (MC)

- MC Lauryl Tryptose Broth
- MC Brilliant Green Bile Broth
- MC Ec Medium W/Mug
- Peptona

Equipos

- Estufa para esterilización en calor seco
- Incubadora de aire caliente
- Autoclave
- Balanza
- Lámpara UV
- Contador de colonias

Materiales de laboratorios y otros

- Tubos de ensayo
- Campanas Durham
- Pipetas
- Piceta
- Mechero de Bunsen
- Botellas de vidrio con tapa
- Asas de inoculación
- Rejillas
- Propipeta
- Placas Petri
- Matraz
- Mandil
- Guantes
- Escobillas y detergente

C. Medición de parámetros físicos y fisicoquímicos

- Medidor de pH portable de bolsillo. Marca HANNA
- Termohigrometro. Marca Boeco

D. Fermentación del biol con EMA

- Botellas transparentes de 500 ml de plástico PET, nuevas, limpias y estériles.
- Melaza
- Biol
- Jarra de plástico de 1L
- Recipiente de plástico de 2 L

E. Cultivo de plantas de maíz

- Recipientes de 1 L
- Jarra de plástico de 1 L
- Tierra esterilizada
- Semilla de maíz de buena calidad

4.3 Población y Muestra

Población: Biol de estiércol de porcino producido en granjas de cerdos que consumen alimentos balanceados.

Muestra: Veinte (20) litros del biol que provenía de un biodigestor anaerobio de 640 m³ depositado en una laguna de oxidación de propiedad de una granja que albergaba alrededor de 3000 mil cerdos, ubicada en la localidad La Esperanza, zona rural de Huaral en Lima.

4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Los instrumentos utilizados fueron una cámara fotográfica, cuaderno de apuntes formatos impresos y laptop.

4.4.1 Análisis microbiológico

Se empleó el método del NMP para el análisis microbiológico de coliformes totales, fecales y de *Escherichia coli* lo más pronto posible a fin de detectar la carga de coliformes inicial. Para la determinación de coliformes totales y fecales se utilizó el método de Número Más probable (NMP)² y para la determinación de *E. coli* es posible utilizar un medio de cultivo de EC con MUG. **Ver anexo A: Guías del Método de Número Más Probable (NMP) para la determinación de coliformes totales y fecales.** Publicado en la Biblioteca Virtual en Salud Ambiental y Desarrollo Sostenible (BSVDE)

4.4.2 Medición de parámetros físicos y fisicoquímicos

- Medición de pH del biol y tratamientos. Se midió con un medidor de pH portátil
- Medición de la temperatura ambiente. Se midió con un termohigrometro.
- Medición de la Humedad relativa (%). Se midió con un termohigrometro.

- Olor del biol y tratamientos. Se empleó una escala cualitativa para medir el tono hedónico del olor.
- Medición de la nata. No se formó nata en ninguno de los recipientes herméticos por ello no fue necesario su medición.

4.4.3 Cultivo de plantas de maíz

- Medición de altura: Se utilizó una regla
- Determinación de masa: al término de la evaluación el peso (gramos) de cada planta en una balanza de laboratorio.

4.5 Procedimientos de recolección de datos

El procedimiento consistió en la toma de datos a través de análisis microbiológicos, medición de parámetros físicos y fisicoquímicos y el cultivo de plantas de maíz y procesamiento de datos

Se trabajó con formatos impresos para los resultados de los análisis microbiológicos, medición de parámetros físicos y fisicoquímicos y cultivo de plantas de maíz.

4.5.1 Procedimiento toma de datos

A. Análisis microbiológico. Durante el primer mes de evaluación los análisis fueron realizados semanalmente. La lectura de coliformes totales y fecales se realizó a las 24 y/o 48 horas mientras que para la lectura de *E. coli* a las 12 horas. Ver modelo de formato en **Apéndice C**

Luego de incubar durante 24 y/o 48 horas, se procedió a revisar los tubos de ensayos a fin de poder observar presencia de turbidez y gas en los tubos de ensayo y campanas Durham.

Al observar turbidez y producción de gas:

La prueba era considerada **positiva**, debiéndose anotar el número de tubos positivos para posteriormente hacer el cálculo del NMP. Entonces se reportaba la **presencia de coliformes** y se codificaba con el **número 1**.

Asimismo, al no observar producción de gas, aun cuando se observase turbidez, se reportaba la **ausencia de coliformes** y se codificaba con el **número 0**.

De acuerdo con los tubos positivos en las pruebas confirmativas para coliformes Totales y Fecales:

- Determinar un código de tres cifras con la combinación de tubos positivos y negativos obtenidos en cada dilución, en el ensayo confirmativo para calcular por referencia en la tabla (**Anexo A**)
- Con el código establecido, entrar a la tabla NMP de Standard Methods y leer directamente el número más probable de bacterias coliformes por 100 mL, en la columna correspondiente al número de tubos sembrados en cada dilución.

B. Medición de parámetros físicos y fisicoquímicos.

El pH y Olor eran medidos solo cuando se abrían los recipientes herméticos (botellas) para el análisis microbiológico.

La temperatura ambiente era medida los días en los que se realizó el análisis microbiológico. Ver modelo de formato en **Apéndice D**.

C. Cultivo de plantas de maíz

La altura y masa de las plantas fueron medidos semanalmente (por lo general) y al término del tiempo de evaluación, 77 días. Ver modelo de formato en **Apéndice E**.

La altura de cada planta fue medida desde la superficie de la tierra de cada maceta hasta el ápice de la hoja más larga de maíz. La altura fue medida en cm utilizando una regla o wincha.

La masa (gramos) se determinó para cada planta al término del experimento. Luego de retirar cada planta de la maceta, sus raíces fueron sumergidas en agua para poder retirar la tierra, enjuagadas rápidamente y secadas.

4.6 Procesamiento estadístico y análisis de datos

Para el procesamiento de datos estadístico se utilizó MINITAB 17, SPSS 22 y hoja de cálculo Excel.

4.6.1 Procesamiento datos en software estadístico.

Los datos recolectados en el laboratorio de microbiología y campo (cultivo de plantas de maíz) eran procesados y analizados diariamente en una hoja de cálculo Excel.

Concluida la etapa de evaluación en el laboratorio y campo se procedió a realizar un análisis estadístico de toda la información obtenida utilizando la herramienta de análisis estadístico MINITAB 17, Statistical Product and Service Solutions versión 22 (SPSS 22) y hojas de cálculo Excel.

4.6.2 Análisis de datos: Análisis de varianza (ANOVA), media, desviación estándar. Validación de datos.

Los resultados de las concentraciones de coliformes fueron analizados descriptiva y estadísticamente.

- Para el análisis descriptivo se utilizó las medias.
- Para el análisis estadístico se utilizó el análisis de varianza (ANOVA), pruebas de Dunnett y Tukey.

A los resultados de la evaluación del crecimiento de las plantas de maíz y parámetros físico y fisicoquímicos se les realizó un análisis descriptivo utilizando una hoja de Excel.

CAPÍTULO V RESULTADOS

Los análisis microbiológicos de coliformes se realizaron en el periodo de evaluación comprendido entre el 17/09/2016 y 13/01/2017.

5.1 Objetivo 1. Cuantificación microbiológica (coliformes) del biol de estiércol de porcino para uso agrícola

Resultados de la cuantificación microbiológica del biol

- **Coliformes totales:** 5.40×10^5 NMP/100 ml
- **Coliformes fecales:** 1.70×10^5 NMP/100 ml
- ***Escherichia coli*:** Durante el periodo de evaluación no se detectó bacterias *E. coli* en ninguna de las muestras analizadas utilizando el método del NMP con medio de cultivo EC con MUG.

Adicionalmente a la muestra analizada se evaluó:

- **Olor:** Moderadamente desagradable, puntuación -2 (Escala Hedónica del Olor, Guía Alemana 1997)
- **pH:** 9.2
- **Temperatura de la muestra:** 21 °C

5.2 Objetivo 2. Determinar las concentraciones de microorganismos eficaces (EMTM) que permitan establecer la dosis óptima.

Resultados de la evaluación de diversas concentraciones de microorganismos eficaces para la establecer la dosis óptima.

Durante el periodo de evaluación realizada entre el 02/07/15 hasta el 31/10/2015 se realizaron ensayos previos a nivel físico y fisicoquímico (olor, temperatura y pH) de diversas concentraciones de microorganismos eficaces activados (EMA) al 0%, 2%, 5%, 10% y 20% aplicadas al biol las cuales permitieron establecer que las concentraciones de microorganismos eficaces de estudio a evaluar para lograr determinar la dosis optima a nivel microbiológico serían al 5%, 10% y 15% de EMA.

Indicadores evaluados durante el periodo comprendido entre el 17/09/2016 y 13/01/2017: variación de pH, tono hedónico del olor y formación de nata. Resultados:

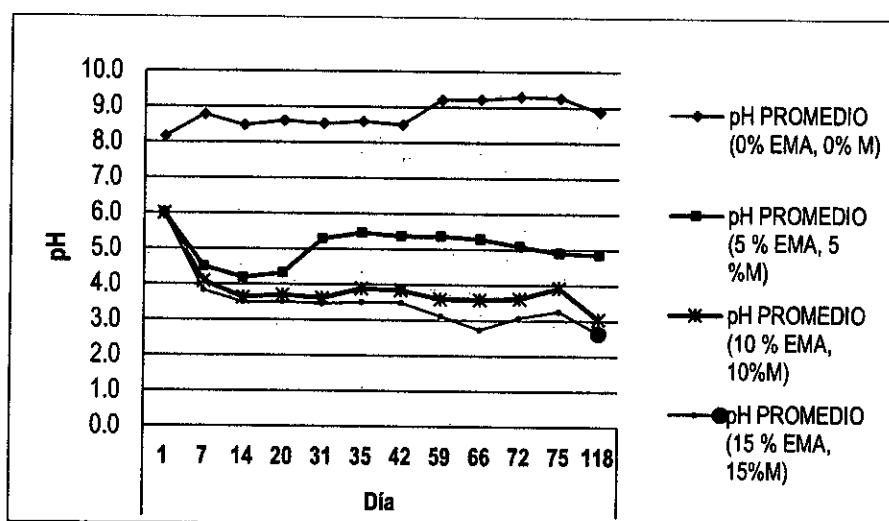
5.2.1 Indicador Fisicoquímico

pH

Los valores del pH en el periodo de evaluación comprendido entre los meses de setiembre del 2016 y enero 2017. Los valores del pH medidos para cada tratamiento indican que el tratamiento T₀ (0%EMA) tuvo un pH promedio final de 8.8, el cual corresponde a un pH básico sin embargo los tratamientos T₁ (5%EMA), T₂ (10%EMA) y T₃ (15%EMA) obtuvieron en

promedio un pH de 5.1, 3.9 y 3.5 respectivamente los cuales corresponden a un pH ácido. Ver grafico N°5.1

GRÁFICO N° 5.1
PROMEDIO DE PH EN LOS TRATAMIENTOS
T₀ (0%EMA), T₁ (5%EMA) T₂ (10%EMA) Y T₃ (15%EMA)



Elaboración propia

5.2.2 Indicadores físicos

Olor

Durante todo el periodo de evaluación, el olor del tratamiento T₀ (0%EMA) fue característico de un efluente proveniente de la degradación de estiércol de porcino observándose que a partir del día 75 éste mejoró en una unidad de la escala cualitativa de la Guía Alemana VDI 3882:1997. Parte 2: Olfatometría, pasando de -2 a -1 (ligeramente desagradable) hasta el final de la evaluación, así mismo el tratamiento T₁ (5%EMA) obtuvo una puntuación final de -3 (**Desagradable**) mientras que los tratamientos T₂ (10%EMA) y T₃ (15%EMA) presentaron el mejor tono

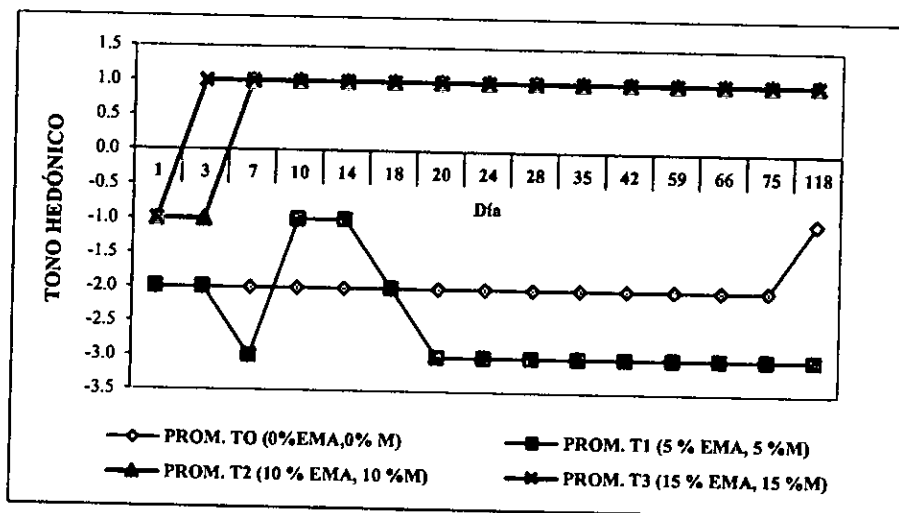
hedónico con una puntuación de +1 (ligeramente agradable). Ver tabla N° 5.1 y gráfico N° 5.02.

**TABLA N° 5.1
ESCALA DE INTENSIDADES PARA LA
EVALUACIÓN DEL TONO HEDÓNICO**

Puntuación	Tono hedónico percibido
4	Muy agradable
3	Agradable
2	Moderadamente agradable
1	Ligeramente agradable
0	Olór neutro/sin olór
-1	Ligeramente desagradable
-2	Moderadamente desagradable
-3	Desagradable
-4	Muy desagradable

Fuente: Guía Alemana, 1997

**GRÁFICO N° 5.02
RESULTADOS DEL TONO HEDÓNICO DEL OLOR**



Elaboración propia

EMA: Microorganismos Eficaces Activados
M: Melaza

Formación de nata

No se observó formación de nata en ninguno de los recipientes empleados durante todo el periodo de evaluación. Los recipientes fueron llenados al ras con los diversos tratamientos para evitar el desarrollo de microorganismos no deseados presentes en el aire asimismo las tomas de muestras para el análisis microbiológico se realizaron cerca al mechero para evitar posible contaminación microbiana.

En la figura N°5.1 se observa en el interior de las botellas un espacio vacío, formado por el ensanchamiento de las botellas a causa del gas acumulado producto del metabolismo de los microorganismos eficaces asimismo en ningún momento de la evaluación se observó la formación de nata.

Adicionalmente se midieron los parámetros de temperatura ambiental y humedad relativa, los cuales influyeron indirectamente en los tratamientos.

FIGURA N° 5.1
RECIPIENTES HERMÉTICOS PARA LOS TRATAMIENTOS
T1 (5%EMA), T2 (10%EMA) Y T3 (15%EMA) Y CONTROL



Fotografía corresponde al día 14 de evaluación.

Temperatura ambiental

La temperatura ambiente dentro del laboratorio de microbiología registró un promedio de 21.9 °C durante el periodo de evaluación comprendido entre 17/09/2016 - 13/01/2017. Ver tabla N° 5.2.

**TABLA N° 5.2
TEMPERATURA AMBIENTAL**

Día	1	7	14	20	31	35	42	59	66	72	75	118	Promedio
T (°C)	21.4	20.4	20.2	21.0	20.6	21.5	22.4	23.1	22.3	21.0	23.5	25.0	21.9

Elaboración propia

Humedad Relativa

La humedad relativa dentro del laboratorio de microbiología registró un promedio de 75.9 % durante el periodo de evaluación comprendido entre 17/09/2016 - 13/01/2017. Ver tabla N° 5.3.

**TABLA N° 5.3
HUMEDAD RELATIVA**

Día	1	7	14	20	31	35	42	59	66	72	75	118	Promedio
H (%)	78.0	78.2	79.1	77.4	78.0	76.0	74.6	75.4	74.0	76.7	75.0	68.0	75.9

Elaboración propia

5.3 Objetivo 3. Determinar la concentración de coliformes totales, fecales y de *E. coli* presentes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola.

5.3.1 Resultados de la concentración de coliformes presentes en el biol de estiércol de porcino

Concentración de coliformes totales Resultados de la concentración de coliformes totales (NMP/100 ml) en los tratamientos: To, T1, T2 y T3, cada uno de ellos realizado por triplicado. Ver tabla N°5.4.

Concentración de coliformes fecales. Resultados de la concentración de coliformes totales (NMP/100 ml) en los tratamientos: To, T1, T2 y T3, cada uno de ellos realizado por triplicado. Ver tabla N°5.5

Concentración de *Escherichia coli*: Durante el periodo de evaluación, mediante la técnica de fermentación en tubos múltiples y el uso del medio de cultivo EC con MUG no se detectó *E. coli* en ninguna de las muestras analizadas.

TABLA N° 5.4
CONCENTRACIÓN COLIFORMES TOTALES (NMP/100 ml) EN LOS
TRATAMIENTOS: T0, T1, T2 y T3

Fecha de análisis	Día	Semana	T0 (Control)		T1 (5% EMA)		T2 (10% EMA)		T3 (15% EMA)	
			Valor	Prom.	Valor	Prom.	Valor	Prom.	Valor	Prom.
17/09/2016	1	0S	9.20E+05		4.70E+04		1.80E+05		7.20E+04	
			9.20E+05	6.34E+05	5.40E+04	1.77E+05	1.80E+05	1.52E+05	1.80E+00	6.40E+04
			6.20E+04		4.30E+05		9.50E+04		1.20E+05	
24/09/2016	7	1S	6.20E+04		1.40E+04		<1.8		<1.8	
			4.80E+04	3.43E+05	1.40E+04	1.50E+04	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			9.20E+05		1.70E+04		<1.8		<1.8	
01/10/2016	14	2S	2.60E+04		1.80E+00		<1.8		<1.8	
			7.00E+04	4.73E+04	1.10E+04	3.67E+03	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			4.60E+04		1.80E+00		<1.8		<1.8	
07/10/2016	21	3S	2.30E+04		<1.8		<1.8		<1.8	
			1.30E+04	1.35E+04	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			4.50E+03		<1.8		<1.8		<1.8	
18/10/2016	31	5S	1.30E+03		<1.8		<1.8		<1.8	
			4.90E+02	7.60E+02	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			4.90E+02		<1.8		<1.8		<1.8	
29/10/2016	43	6S	2.00E+01		<1.8		<1.8		<1.8	
			2.00E+01	2.00E+01	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			2.00E+01		<1.8		<1.8		<1.8	
22/11/2016	66	10S	<1.8		<1.8		<1.8		<1.8	
			<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			<1.8		<1.8		<1.8		<1.8	
28/11/2016	72	10S	<1.8		<1.8		<1.8		<1.8	
			<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			<1.8		<1.8		<1.8		<1.8	
13/01/2017	118	17S	<1.8		<1.8		<1.8		<1.8	
			<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			<1.8		<1.8		<1.8		<1.8	

EMA: Microorganismos Eficaces Activados
<1.8 NMP/100 ml: No se detectó coliformes en el ensayo.
Elaboración propia

TABLA N° 5.5
CONCENTRACIÓN DE C. FECALES (NMP/100 ml) EN LOS TRATAMIENTOS:
To, T1, T2 y T3

Fecha de análisis	Día	Semana	To (Control)		T1 (5% EMA)		T2 (10% EMA)		T3 (15% EMA)	
			Valor	Prom.	Valor	Prom.	Valor	Prom.	Valor	Prom.
17/09/2016	1	0S	9.20E+05		4.70E+04		3.20E+04		6.20E+04	
			9.20E+05	6.31E+05	4.70E+04	5.20E+04	3.90E+04	3.23E+04	1.80E+00	3.13E+04
			5.20E+04		6.20E+04		2.60E+04		3.20E+04	
24/09/2016	7	1S	6.20E+04		1.40E+04		<1.8		<1.8	
			4.00E+04	3.41E+05	1.40E+04	1.12E+04	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			9.20E+05		5.50E+03		<1.8		<1.8	
01/10/2016	14	2S	2.60E+04		<1.8		<1.8		<1.8	
			7.00E+04	4.73E+04	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			4.60E+04		<1.8		<1.8		<1.8	
07/10/2016	21	3S	2.30E+04		<1.8		<1.8		<1.8	
			1.30E+04	1.35E+04	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			4.50E+03		<1.8		<1.8		<1.8	
18/10/2016	31	5S	1.30E+03		<1.8		<1.8		<1.8	
			4.90E+02	7.60E+02	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			4.90E+02		<1.8		<1.8		<1.8	
29/10/2016	43	6S	<1.8		<1.8		<1.8		<1.8	
			<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			<1.8		<1.8		<1.8		<1.8	
22/11/2016	66	10S	<1.8		<1.8		<1.8		<1.8	
			<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			<1.8		<1.8		<1.8		<1.8	
28/11/2016	72	10S	<1.8		<1.8		<1.8		<1.8	
			<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			<1.8		<1.8		<1.8		<1.8	
13/01/2017	118	17S	<1.8		<1.8		<1.8		<1.8	
			<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
			<1.8		<1.8		<1.8		<1.8	

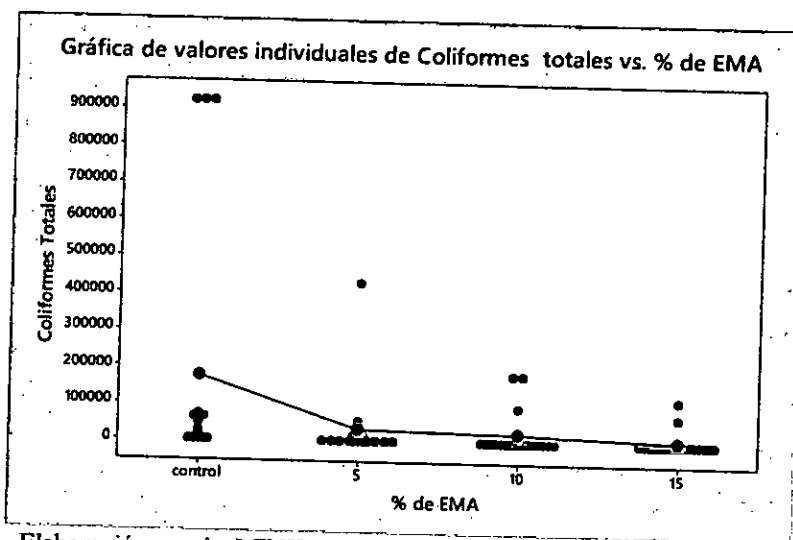
EMA: Microorganismos Eficaces Activados
 <1.8 NMP/100 ml: No se detectó coliformes en el ensayo.
 Elaboración propia

5.3.2 Resultados del análisis estadístico descriptivo

A. Valores individuales de la concentración de coliformes totales (NMP/100ml) vs concentración de EMA

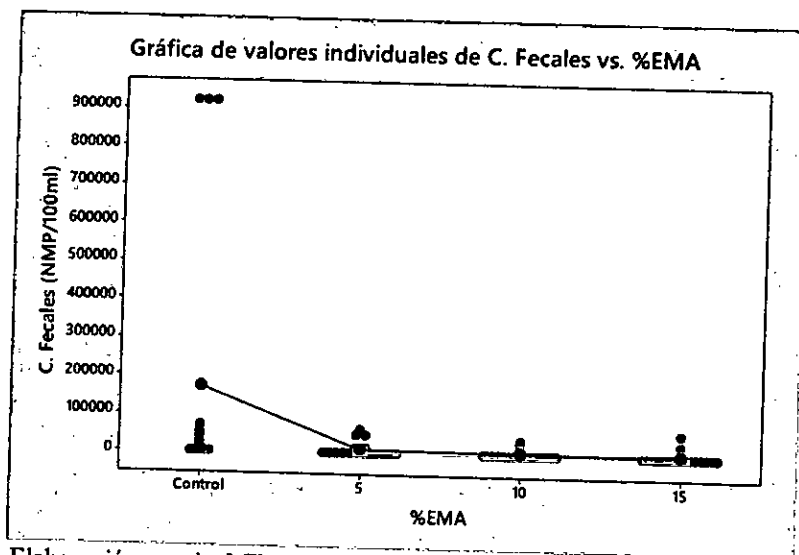
Concentraciones de coliformes totales y fecales en cada tratamiento de 0%, 5%, 10% y 15% de EMA. Ver gráficos N° 5.3 y N°5.4.

GRÁFICO N° 5.3
VALORES INDIVIDUALES DE C. TOTALES vs. % EMA



Elaboración propia. MINITAB 17

GRÁFICO N° 5.4
VALORES INDIVIDUALES DE C. FECALES vs. % EMA

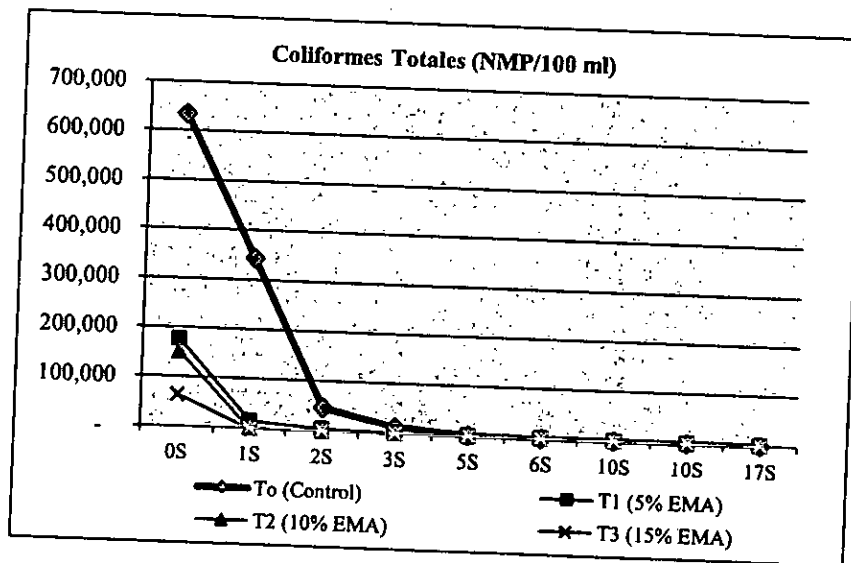


Elaboración propia. MINITAB 17

B. Promedios de la concentración de coliformes totales (C.T) y fecales (C.F) presente en los tratamientos T₀, T₁, T₂ y T₃ (0%, 5%, 10% y 15% de EMA).

En el tratamiento T₀ (0%EMA) fue posible detectar una concentración de C.T hasta la semana 06, siendo esta última concentración de 20 NMP/100 ml, ubicándose sus concentraciones de valores más altos hasta la semana 03 entre las potencias 10⁵ y 10⁴ mientras que el tratamiento T₁ (5%EMA) tuvo una presencia de C.T hasta la semana 02, siendo ésta en promedio de 3668 NMP/100 ml asimismo solo durante los primeros días (semana 0) fue posible determinar en T₂ (10%EMA) y T₃ (15%EMA) una concentración de 1.52x10⁵ NMP/100 ml y 6.4 x10⁴ NMP/100 ml respectivamente. Ver gráfico N° 5.5.

**GRÁFICO N° 5.5
PROMEDIOS DE LAS CONCENTRACIONES DE C. TOTALES
EN T₀ (0%EMA), T₁ (5%EMA), T₂ (10%EMA) Y T₃ (15%EMA)**

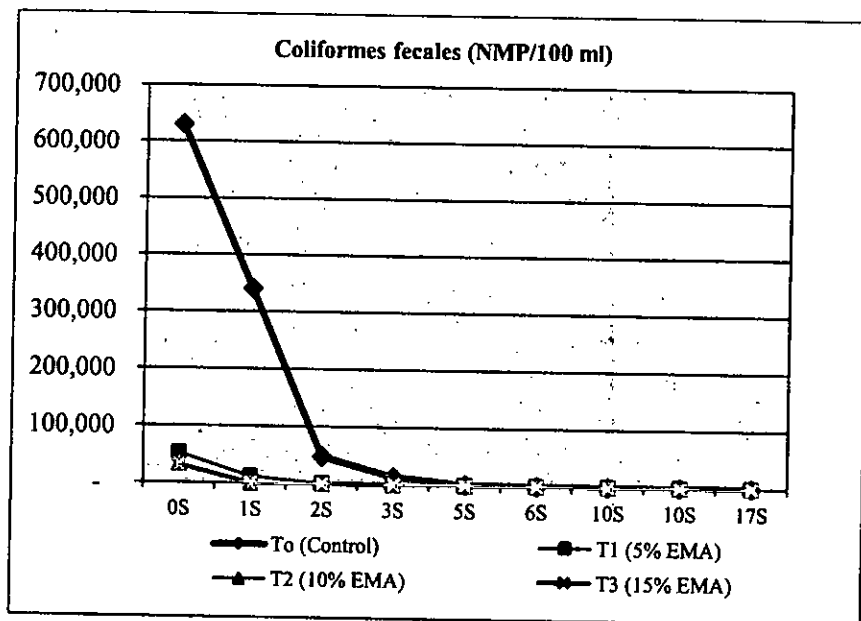


EMA: Microorganismos Eficaces Activados
Elaboración propia

S: semana

Asimismo la concentración de coliformes fecales presentes en T₀, biol sin EMA y tratamientos con EMA 1, 2 y 3 (al 5%, 10% y 15% respectivamente). En el tratamiento T₀ (0%EMA) fue posible detectar una concentración de coliformes fecales hasta la semana 05, siendo esta de 760 NMP/100 ml asimismo sus concentraciones con valores más altos hasta la semana 03 se ubicaron entre las potencias 10⁵ y 10⁴ mientras que el tratamiento T₁ (5%EMA) tuvo presencia de coliformes fecales hasta la semana 02 asimismo solo durante los primeros días (semana 0) fue posible determinar en T₂ (10%EMA) y T₃ (15%EMA) una concentración de 6.2x10⁴ NMP/100 ml y 3.13 x10⁴ NMP/100 ml respectivamente. Ver gráfico N° 5.6.

GRÁFICO N°5.6
PROMEDIOS DE LAS CONCENTRACIONES DE C. FECALES
EN T₀ (0%EMA), T₁ (5%EMA) T₂ (10%EMA) Y T₃ (15%EMA)



EMA: Microorganismos Eficaces Activados
 Elaboración propia

S: semana

C. Resultados sobre el efecto del tiempo y tratamientos en la reducción de la concentración de coliformes.

Es importante indicar que la variable tiempo no ha sido elemento de estudio en la presente tesis sin embargo se exponen sus resultados debido al efecto del tiempo en la variable: **Concentración de coliformes.**

Al realizar un análisis bifactorial controlando en el experimento la variable tiempo se obtuvo los resultados que se muestran en las Tablas N°5.6 y 5.7 y los gráficos 5.13 y 5.14. Estas tablas: Prueba de Efectos Inter-Sujetos ayudaron a determinar si los factores: Tratamientos y Semanas tienen un efecto en la variable dependiente: concentración de coliformes.

La tabla **Prueba de los Efectos Inter-Sujetos** contiene en las filas los componentes del modelo que contribuyen a la variación de la variable dependiente. Las filas denominadas Modelo corregido e intersección contienen los valores para el modelo de regresión. Las columnas **TRATAMIENTOS** y **SEMANAS** son los efectos principales del modelo **TRATAMIENTOS * SEMANAS**, que es la interacción entre los dos factores, el Error hace referencia al término error del ANOVA. En estas filas también se observa la suma de cuadrados, los grados de libertad, la media cuadrática, el valor del estadístico de contraste F y la significación del contraste (para

considerar un contraste significativo la probabilidad deberá ser menor de < 0.05).

Se observa que ambos factores: TRATAMIENTO ($p=0.007$) y SEMANAS ($p=0.000$) tuvieron un efecto significativo sobre la variable dependiente CONCENTRACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, pero la interacción de estos dos factores no resultó significativa ($p=0.114 > 0.05$). Ver tabla N° 5. 6.

TABLA N° 5.6
PRUEBAS DE EFECTOS INTER-SUJETOS. VARIABLE
DEPENDIENTE: CONCENTRACIÓN DE C. TOTALES

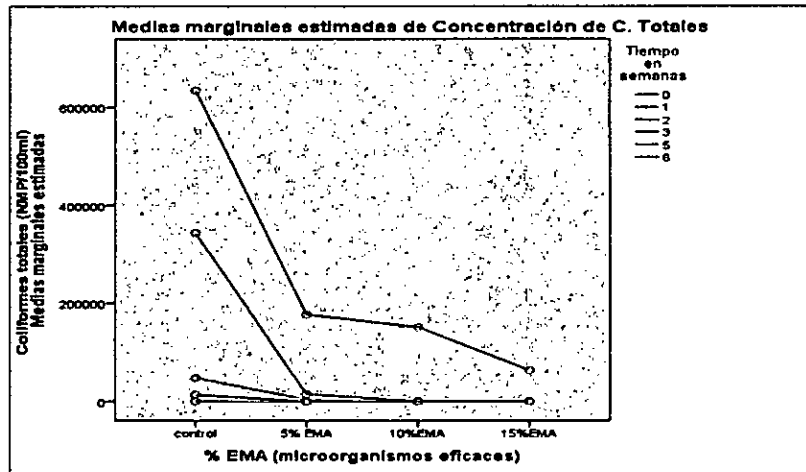
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	1.10E+15 ^a	23	6.43E+14	2,810	,001
Interceptación	6.26E+14	1	2.62E+14	11,483	,001
Tratamiento	3.09E+14	3	1.03E+14	4,505	,007
Semanas	6.26E+14	5	1.25E+14	5,468	,000
Tratamiento * Semanas	5.44E+14	15	3.63E+13	1,585	,114
Error	1.10E+15	48	2.29E+13		
Total, corregido	2.58E+15	71			

a. R al cuadrado = ,574 (R al cuadrado ajustada = ,370)

Elaboración propia. MINITAB 17

Gráficamente se observa que durante las 06 primeras semanas de evaluación, la concentración de **coliformes totales** disminuyó en el tiempo al aplicar concentraciones del 5%, 10% y 15% de EMA sobre el biol. Ver gráfico N°5.7.

GRÁFICO N° 5.7
CONCENTRACIÓN DE C. TOTALES (NMP/100 ml) POR SEMANA



Elaboración propia. SPSS 22

5.3.3 Resultados del análisis estadístico inferencial

La estadística inferencial se enfocó en realizar la estimación de las propiedades de la población, fundamentándose solo en los resultados de la muestra estudiada.

En el ítem 3.3 se ha planteado la hipótesis *“Una dosis óptima de microorganismos eficaces reduce la concentración de coliformes presentes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola”*. Por ello a fin de probar o negar la hipótesis planteada y generalizar los resultados obtenidos sobre la muestra de la población estudiada, se realizó un análisis de la hipótesis a través de pruebas estadísticas que a continuación se detallaran.

A. Análisis del Diseño Unifactorial Completamente Aleatorizado

- Factor: concentraciones de EMA
- Niveles del factor o tratamientos: Control, 5% EMA, 10% EMA y 15% EMA.
- N° de repeticiones por tratamiento: 3
- N° de observaciones del experimento básico: 12
- **Réplicas del experimento básico: 6**
- **Total de observaciones en el experimento: 72**

El modelo estadístico está dado por:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

- Y_{ij} : Concentración de coliformes al aplicarse el tratamiento i -ésimo en los j -ésima réplica.
- μ : Media global del experimento
- α_i : Efecto del i -ésimo tratamiento (Control, 5%EMA, 10% EMA y 15% EMA)
- ε_{ij} : Error aleatorio

Este modelo estadístico se descompone en

$$SS_{Total} = SS_{Tratamientos} + SS_{Error}$$

SS: Suma de cuadrados

Asimismo, el modelo estadístico fue evaluado mediante la técnica del Análisis de Varianza (ANOVA).

B. ANOVA de los Cuatro Tratamientos (Control, 5% EMA, 10% EMA y 15% EMA)

Hipótesis nula: Todas las medias de los tratamientos son iguales

Hipótesis alterna: Por lo menos una media de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

En la tabla N° 5.8 se observa que $p = 0.033 < 0.05$ por tanto se rechaza la hipótesis nula. *Se puede decir que por lo menos una media de tratamiento es diferente para la reducción c. totales.*

TABLA N° 5.8
ANOVA: COLIFORMES TOTALES vs. % DE EMA

Fuente	GL	SC Ajust	MC Ajust	Valor F	Valor p
% de EMA	3	3.09E+11	1.03E+11	3.09	0.033
Error	68	2.27E+12	3.337E+10		
Total	71	2.58E+12			

Elaboración propia. MINITAB 17.

Asimismo en la tabla N° 5.9 se observa que $p = 0.010 < 0.05$ por tanto se rechaza la hipótesis nula. *Se puede decir que por lo menos una media de tratamiento es diferente para la reducción c. fecales.*

TABLA N° 5.9
ANOVA: COLIFORMES FECALES vs. % DE EMA

Fuente	GL	SC Ajust	MC Ajust	Valor F	Valor p
% de EMA	3	3.68344E+11	1.22781E+11	4.10	0.010
Error	68	2.03605E+12	2.99419E+10		
Total	71	2.40440E+12			

Elaboración propia. MINITAB 17

C. Intervalos de Confianza de 95% (IC) ofrecen información sobre las medias de cada uno de los tratamientos (Control, 5%, 10% y 15% de EMA).

Las tablas N° 5.10 y 5.11 muestran los Intervalos de confianza (IC) para las medias de las concentraciones de **coliformes totales y fecales** bajo el efecto de los tratamientos

TABLA N° 5.10
MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES DE COLIFORMES
TOTALES vs. % DE EMA

% de EMA	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control	18	173158	344529	(87234, 259082)
5% EMA	18	32612	100494	(-53312, 118536)
10% EMA	18	25279	60548	(-60645, 111202)
15% EMA	18	10668	32117	(-75256, 96591)

Elaboración propia. MINITAB 17

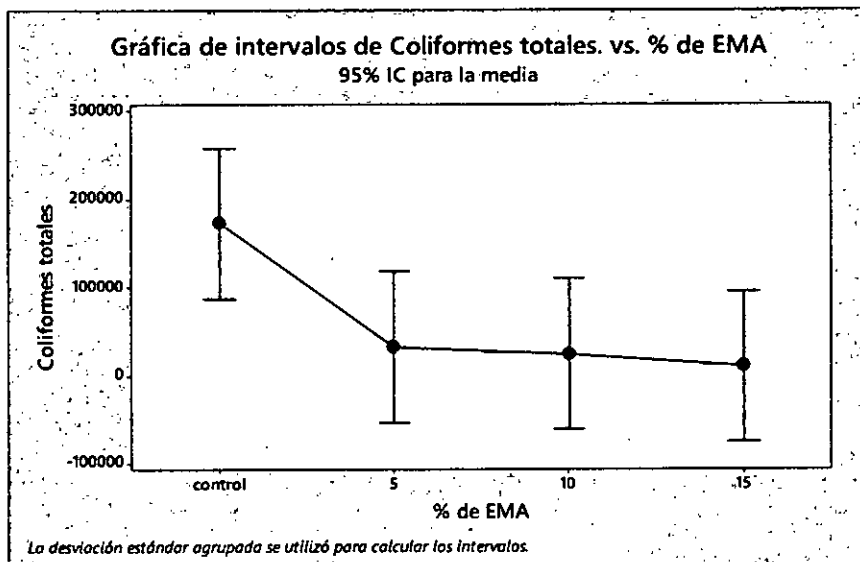
TABLA N° 5.11
MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES DE COLIFORMES
FECALES vs. % DE EMA

% de EMA	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control	18	172155	344903	(90769, 253540)
5% EMA	18	10528	19836	(-70857, 91914)
10% EMA	18	5390	12598	(-75996, 86776)
15% EMA	18	5223	16046	(-76163, 86609)

Elaboración propia. MINITAB 17

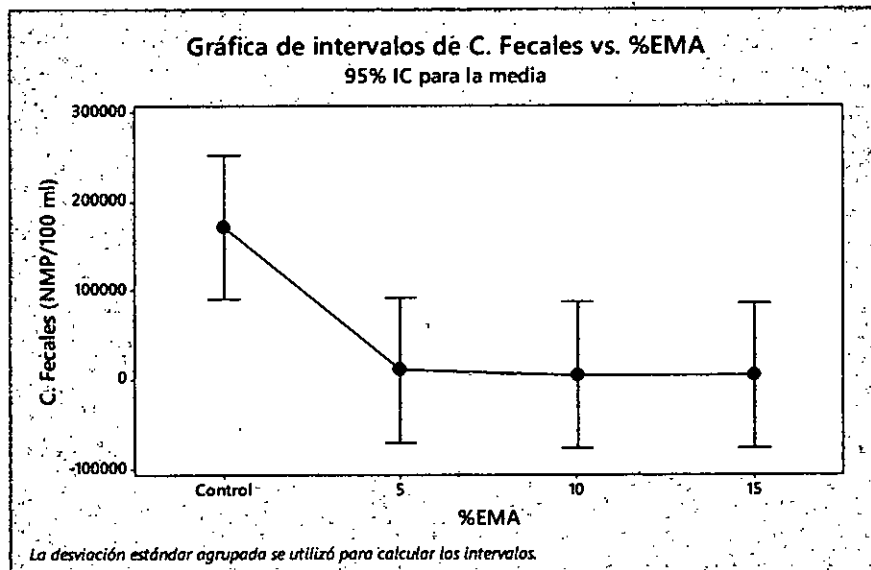
Gráficamente es posible observar la diferencia entre la media del tratamiento Control (0%EMA) y las medias de los tratamientos 5%, 10% y 15% de EMA para la reducción de **coliformes totales y fecales**. Ver gráficos N° 5.9 y 5.10.

GRÁFICO N°5.9
95% IC PARA LA MEDIA DE C. TOTALES VS %EMA



Elaboración propia. MINITAB 17

GRÁFICO N°5.10
95% IC PARA LA MEDIA DE C. FECALES VS %EMA



Elaboración propia. MINITAB

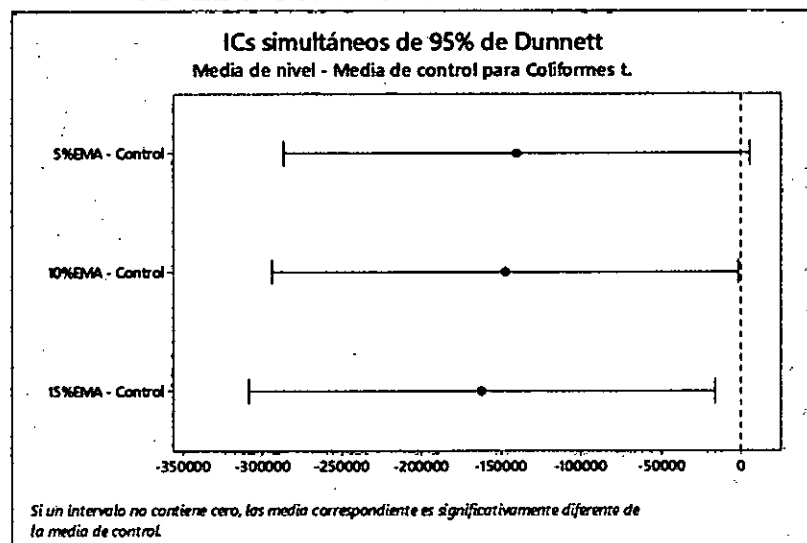
D. Prueba de Dunnett

La prueba se utilizó para comparar la media del grupo control (o sea aquel grupo al que no se le aplica tratamiento) con las medias de los grupos experimentales (grupos que reciben tratamiento).

Esta prueba permitió realizar comparaciones múltiples y determinar las diferencias entre el control y cada uno de los tratamientos del 5%, 10% y 15% de EMA sobre las concentraciones de coliformes totales y fecales.

El gráfico N°5.11 muestra las diferencias significativas entre la media del control y los tratamientos del 10% y 15% de EMA concluyéndose que existe un efecto de estos *02 tratamientos al reducir en cantidades diferentes las concentraciones de C. totales respecto del control.*

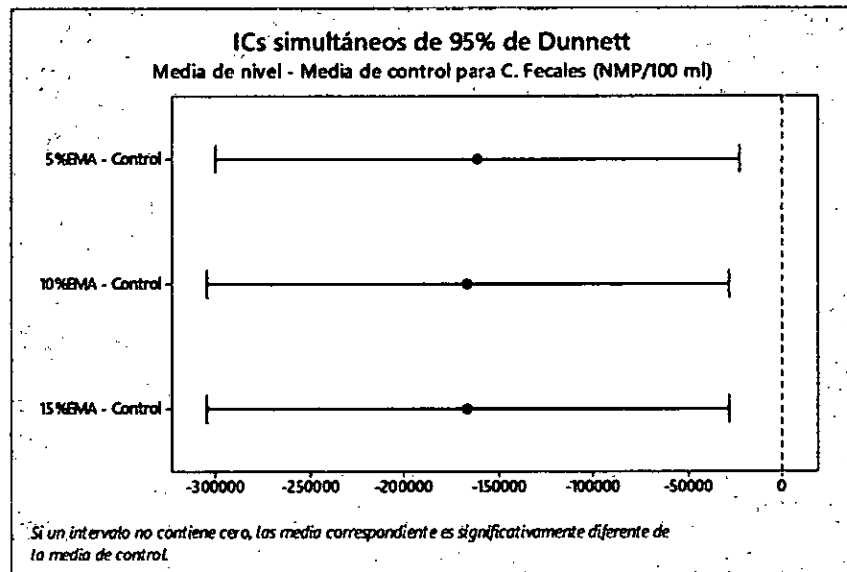
GRÁFICO N° 5.11
IC SIMULTÁNEOS DE 95% DE DUNNETT. MEDIAS DE NIVEL Y CONTROL PARA C. TOTALES.



Elaboración propia. MINITAB 17

El gráfico N°5.12 muestra las diferencias significativas entre la media del control y los tratamientos del 5%, 10 % y 15% de EMA, lo que demuestra que existe un efecto *de los 03 tratamientos en el control, a su vez, gráficamente se puede observar que estas reducciones fueron semejantes entre sí.*

GRÁFICO N° 5.12
IC SIMULTÁNEOS DE 95% DE DUNNETT. MEDIAS DE NIVEL Y CONTROL PARA C. FECALES.



Elaboración propia. MINITAB 17

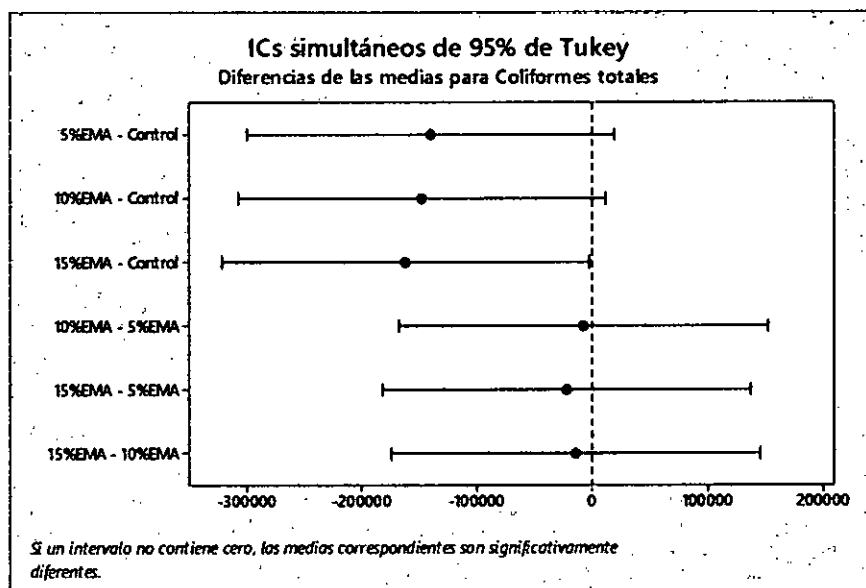
D. Prueba de Tukey

Esta prueba fue utilizada para realizar comparaciones en forma simultánea de todos los tratamientos entre sí sobre el efecto en la reducción de la concentración de coliformes totales y fecales.

En el gráfico N° 5.13 se observa que, en cuanto a la reducción de la concentración de **coliformes totales** existe diferencia significativa del tratamiento del 15% EMA con el control.

Asimismo, esta prueba indica que los tratamientos 5%, 10% y 15% de EMA al ser comparados de manera simultánea entre si *reducen en semejante cantidad la concentración de coliformes totales.*

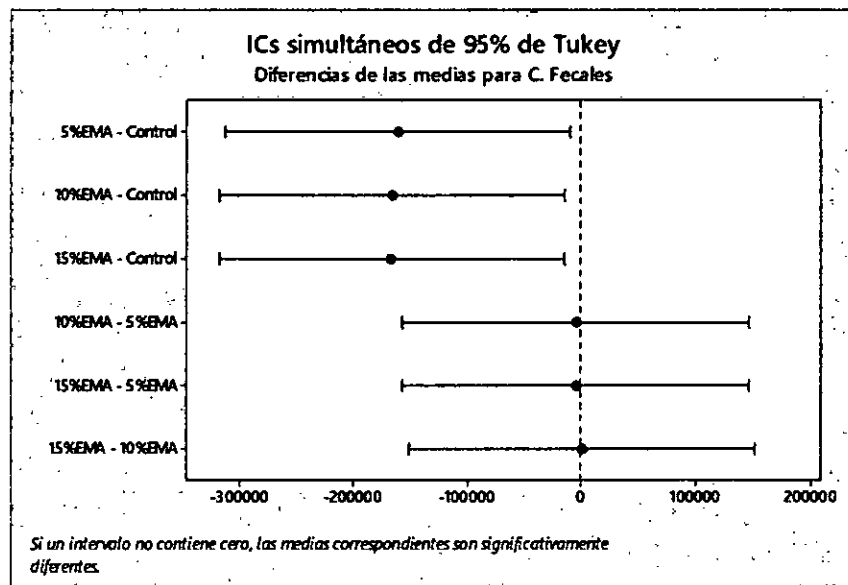
GRÁFICO N° 5.13
IC DE 95% DE TUKEY. DIFERENCIAS DE LAS MEDIAS PARA C. TOTALES



Elaboración propia. MINITAB 17.

En el gráfico N° 5.14 se observa que en cuanto al efecto en la reducción de la concentración de **coliformes fecales** existe diferencia significativa de los tratamientos del 5%, 10% y 15% de EMA con el control. Asimismo, gráficamente se puede observar que *estos 03 tratamientos al ser comparados de manera simultánea entre si reducen en semejante cantidad la concentración de coliformes fecales.*

GRÁFICO N° 5.14
IC DE 95% DE TUKEY. DIFERENCIAS DE LAS MEDIAS PARA
C. FECALES



Elaboración propia. MINITAB 17

E. Análisis de Varianza Excluyendo el Tratamiento Control

Hipótesis nula: Todas las medias de los tratamientos sin el control son iguales

Hipótesis alterna: Por lo menos una media de los tratamientos sin el control es diferente

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Realizando el ANOVA para la concentración de C. Totales vs. % EMA

Se observa que el valor de $p = 0.637 > 0.05$ por tanto se **acepta la hipótesis nula**, es decir no existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos del 5%, 10% y 15% de EMA concluyéndose que estos *reducen en cantidades similares las concentraciones de coliformes totales*. Ver tabla N° 5.12.

TABLA N° 5.12
ANOVA: COLIFORMES TOTALES vs. % DE EMA
EXCLUYENDO EL CONTROL DE LOS TRATAMIENTOS

Fuente	GL	SC Ajust	MC Ajust	Valor F	Valor p
% de EMA (SIN EL CONTROL)	2	4.49E+09	2.25E+09	0.46	0.637
Error	51	2.51542E+11	4.93E+09		
Total	53	2.56035E+11			

Elaboración propia. MINITAB 17.

Asimismo, realizando el ANOVA para la concentración de C. Fecales vs. % EMA.

En relación con el efecto de los tratamientos en la reducción de la concentración de C. Fecales se obtuvo un valor $p = 0.549 > 0.05$ *por lo tanto se acepta la hipótesis nula*, es decir no existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos del 5%, 10% y 15% de EMA concluyéndose que estos *reducen en cantidades similares las concentraciones de coliformes fecales*. Ver tabla N° 5.13.

TABLA N° 5.13
ANOVA: COLIFORMES FECALES vs. % DE EMA
EXCLUYENDO EL CONTROL DE LOS TRATAMIENTOS

Fuente	GL	SC Ajust	MC Ajust	Valor F	Valor p
% de EMA (SIN EL CONTROL)	2	3.27E+08	1.64E+08	0.61	0.549
Error	51	1.38E+10	2.70E+08		
Total	53	1.41E+10			

Elaboración propia. MINITAB 17.

5.4 Objetivo 4. Comprobar mediante ensayos de un tipo de cultivo la aplicación del biol tratado con microorganismos eficaces (EM™)

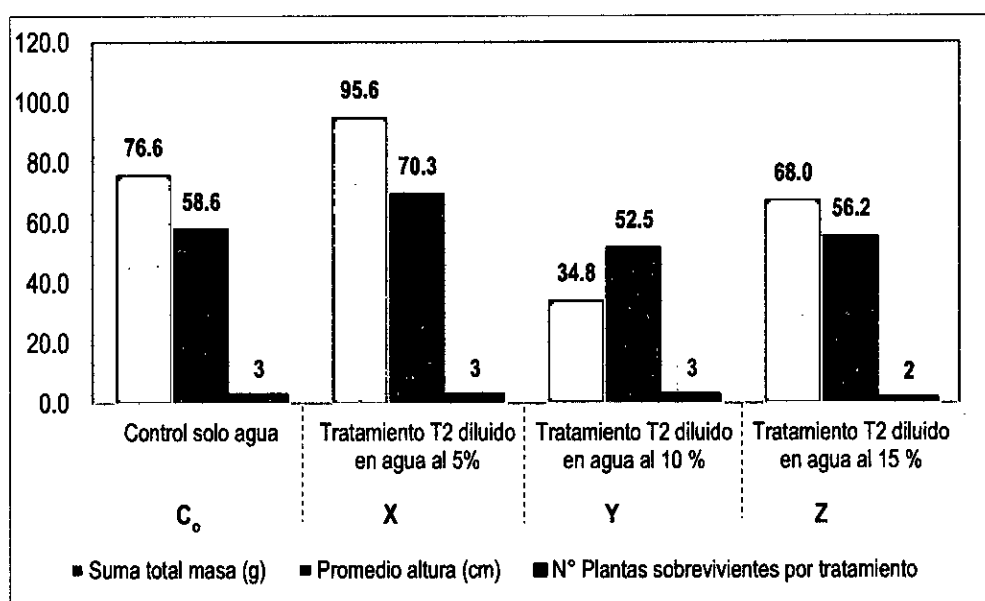
Respecto al crecimiento de las veinticinco (25) plantas de maíz sembradas en macetas y distribuidas en cinco (05) grupos solo el 52% (14 plantas) sobrevivió hasta el final de los 76 días de evaluación. El periodo de evaluación comprendido entre el 11/02/2017 y 28/04/2017.

Experiencia 1. Resultados de la aplicación del biol tratado con EMA en cultivos de maíz

Asimismo, indicar que durante la toma de datos accidentalmente se quebró una de las plantas del grupo de macetas "E" por esta razón los resultados de este grupo no fueron incluidos en los cuadros comparativos del grafico N° 5.13.

En la grafica N° 5.15 se observa que las plantas a las cuales se les aplicó el tratamiento T₂ (10%EMA) diluido en agua al 5% tuvieron un efecto positivo en su crecimiento, obteniendo a nivel de altura y masa, un 24.8% y 22.3% respectivamente más comparado con el control (Co).

GRÁFICO N° 5.15
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FINAL AL APLICAR EL BIOL
TRATADO CON EMA EN CULTIVOS DE MAÍZ. FECHA 28/04/18



EMA: Microorganismos Eficaces Activados
 Elaboración propia

TABLA N° 5.14
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO EN ALTURA (cm)
DE LAS PLANTAS DE MAÍZ DURANTE EL PERIODO COMPRENDIDO
ENTRE 11/02/2017 Y 28/04/2017

Código	Planta N°	18/02/2017	25/02/2017	04/03/2017	11/03/2017	30/03/2017	02/04/2017	08/04/2017	28/04/2017
		Día7	Día14	Día22	Día29	Día48	Día51	Día57	Día 77
Co	1	20	31.5	45.5	55.5	80	82	85	96.5
	2	12	18	29	35.5	35.5	35.5	35.5	35.5
	3	16	25	35	39.5	40	40	40	40
	4	19.5	32	39.5	45	58	60	62.5	62.5
	5	20	32	32	36	42.5	55	55	58.5
	Prom.	17.5	27.7	36.2	42.3	51.2	54.5	55.6	58.6
E	1	13.5	23.5	24	24	24	24	24	24
	2*	19	27.5	29	29	29	29	29	29
	3	18.5	28	37.5	43.5	61	68	68	70
	4	19	29	43	49.5	65	68	72	76
	5	18	27	33	33	33	33	33	33
	Prom.	17.6	27	33.3	35.8	42.4	44.4	45.2	46.4
Xn	1	26	33	47	53.5	73	74	77.5	84
	2	26.5	35	41	57	92	92	95.5	96.5
	3	13	20	27	30	30	30	30	30
	4	12	31.5	39.5	43.5	65	71	77	85.5
	5	17.5	32.5	37.5	46	46	50	55.5	55.5
	Prom.	19	30.4	38.4	46	61.2	63.4	67.1	70.3
Yn	1	16	26	36	40.5	41	41	44.5	55
	2	21	35	48.5	55	64	67	71.5	76
	3	15	23	30	32	32	32	32	32
	4	17	27	39.5	40.5	40.5	40.5	40.5	40.5
	5	21.5	35	43	46	53	62	64	59
	Prom.	18.1	29.2	39.4	42.8	46.1	48.5	50.5	52.5
Zn	1	20	20	20	20	20	20	20	20
	2	18	37.5	45	50.5	63	65	67.5	81.5
	3	15	35	43	56	52	52	52	52
	4	6	15.5	30	30	30	30	30	30
	5	28	41	58	65	86	86.5	90	97.5
	Prom.	17.4	29.8	39.2	44.3	50.2	50.7	51.9	56.2

Elaboración propia

LEYENDA

☐ Significa que la planta dejó de crecer, se marchitó y murió
T₂: Tratamiento 2, contiene 10% EMA, 10% Melaza y 80% biol

Grupos de Plantas

C₀: Control Riego solo con agua
E: Biol puro diluido en agua al 5%
X_n: T₂ diluido en agua al 5%
Y_n: T₂ diluido en agua al 10%
Z_n: T₂ diluido en agua al 15%

TABLA N° 5.15
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FINAL AL APLICAR BIOL TRATADO
CON EMA EN CULTIVOS DE MAÍZ. FECHA 28/04/18

Grupo de Plantas	Código	N°	Fecha De Medición 28/04/2017		Prom. altura (cm)	% Prom. altura	Suma masa total (g)	% Suma masa total	Total de plantas sobrevivientes
			Altura (cm)	Masa (g)					
Control Riego solo con agua	Co	1	96.5	55.6	72.5		76.6		3
		2	0	0					
		3	0	0					
		4	62.5	7.8					
		5	58.5	13.2					
Biol puro diluido en agua al 5%	E	1	0	0	73.0	0.7	40.8	-46.7	2
		2	0**	0**					
		3	70	21.4					
		4	76	19.4					
		5	0	0					
Tratamiento T2 diluido en agua al 5%	Xn	1	84	36.7	88.7	22.3	95.6	24.8	3
		2	96.5	38.9					
		3	0	0					
		4	85.5	20					
		5	0	0					
Tratamiento T2 diluido en agua al 10%	Yn	1	55	9.5	63.3	-12.6	34.8	-54.6	3
		2	76	20.7					
		3	0	0					
		4	0	0					
		5	39	4.6					
Tratamiento T2 diluido en agua al 15%	Zn	1	0	0	89.5	23.4	68	-11.2	2
		2	81.5	26.6					
		3	0	0					
		4	0	0					
		5	97.5	41.4					

Elaboración propia

** : Accidente provocó pérdida de la planta ubicada en la segunda maceta del grupo de macetas E

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Contrastación de resultados con otros estudios similares

6.1.1 Biol sin Tratamiento de Microorganismo Eficaces Activados

En el laboratorio se analizó la muestra inicial con la que se habría de trabajar para los diferentes tratamientos determinándose una concentración inicial de coliformes totales y fecales de 6.34×10^5 NMP/100 ml y 6.31×10^5 NMP/100 ml respectivamente presentes en el biol proveniente del biodigestor anaerobio de 640 m^3 , observándose que la digestión anaerobia no elimina totalmente la presencia de coliformes. Estos resultados concuerdan con las investigaciones de Medina (2013), Quiroz et al. (2009), Cruz et al. (2004), Palacios (1999), Nuñez et al. (1987) y con la Guía de utilización agrícola de los materiales digeridos por biometanización (2011) cuyos tiempos de retención oscilaron entre 45 y 150 días aproximadamente sin embargo estos resultados difieren de las investigaciones de Soria et al. (2001) y Carhuacho (2015) quienes para tiempos de retención de 50 y 90 días determinaron una concentración de 0 UFC/100 ml y <3 NMP/100 ml respectivamente, lo que indicó niveles no detectables de microorganismos en los ensayos de laboratorio realizados.

6.1.2 Biol con Tratamiento de Microorganismo Eficaces Activados

La utilización de EM en el biol tuvo un efecto positivo en la disminución de coliformes totales y fecales. La presente investigación alcanzó niveles no detectables de coliformes en los ensayos (<1.8 NMP/100 ml) *para los* tres tratamientos. La diferencia entre cada uno de ellos radicó en la cantidad de días que requirió cada tratamiento para la reducción de la concentración de coliformes, obteniéndose que los tratamientos T₂ (10% EMA, 10% M) y T₃ (15% EMA, 15% M), requirieron 07 días mientras que el tratamiento T₁ (5% EMA, 5% M) requirió 14 días resultados que concuerdan con los de (Medina, 2013) quien para 30 días de evaluación obtuvo una concentración < 3NMP/100ml para ambos parámetros.

Como en el Perú aún no existe una norma que regule de manera explícita a este tipo de abono orgánico líquido, se utilizó como referencia los ECA para Agua. Categoría III (D.S N° 004-2017-MINAM), los cuales establecen que para el riego de vegetales de tallo bajo debe tener una concentración de coliformes fecales de 1000 NMP/100 ml y coliformes totales de 5000 NMP /100 ml y en el caso del riego de vegetales tallo alto la concentración de C. Fecales podrá ser de 2000 NMP/100 ml y para ambos casos la concentración de *E. coli* podrá ser como máximo de 100 NMP/100 ml, aunque en la presente investigación no se detectó en ninguna de las pruebas.

A excepción de la investigación de (Medina, 2013) los antecedentes hallados en su mayoría hacen referencia del uso de los EMA en aguas residuales domésticas e industriales (por la presencia de materia orgánica), lodos sépticos, avícolas, entre otros efluentes y sustratos, es por ello que a continuación se contrastan investigaciones sobre microorganismo eficaces aplicados en diversos efluentes y sustrato.

Fioravanti, 2003, logró una remoción de 99.96% de C.T y C.F en lodos sépticos tratados con EMA para un tiempo de evaluación de 14 días asimismo (Robles, 2005) logró una remoción del 99% de C.T en el desecho pesquero sanguaza tratada con EMA para un tiempo de evaluación de 8 días, cumpliendo ambas investigaciones con la normativa peruana sin embargo (Corpas et., 2012) también logró reducir de manera significativa la concentración de coliformes al aplicar los EMA sobre el efluente de un sistema residual lácteo pero no alcanzó los valores establecidos por nuestra legislación finalmente la investigación de (Hoyos et.,2008) es otro ejemplo que demuestra una vez más la efectividad de los EMA en la reducción de patógenos al aplicarse en camas de pollos de una avícola.

6.2 Contratación de hipótesis con los resultados

Hipótesis: Una dosis óptima de microorganismos eficaces activados reducirá la concentración de coliformes presentes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola.

Al término del análisis unifactorial realizado se determinó que existió una reducción de los coliformes totales y fecales en los tratamientos con 5%, 10% y 15% de EMA respecto del control asimismo las pruebas estadísticas de ANOVA ($\alpha < 0.05$), Dunnett y Tukey realizadas indicaron que los coliformes se reducen en cantidades similares al utilizar cualquiera de las dosis de microorganismos eficaces activados (EMA) propuestas sin embargo al realizar un análisis bifactorial es decir tomando al tiempo como variable (no contemplada en la presente investigación) fue posible determinar descriptiva y estadísticamente que existió una interacción del tiempo con cada uno de los tratamientos.

El biol tratado con diversas concentraciones de EMA alcanzó un pH entre 3.4 y 4.9 debido a la presencia de ácido láctico y enzimas que fueron sintetizadas por los microorganismos eficaces, sustancias que alteraron drásticamente las condiciones óptimas de pH y disponibilidad de nutrientes necesarios para la supervivencia y desarrollo de coliformes, provocando una reducción de la concentración y del tiempo que demorarían para eliminarse los coliformes de forma natural. Para lograr concentraciones de coliformes no detectables en los ensayos (< 1.8 NMP/100 ml), los tratamientos T₂ (10% EMA, 10% M) y T₃ (15% EMA,

15% M) requirieron 07 días, mientras que el tratamiento T₁ (5% EMA, 5% M) requirió 14 días y el control (biol sin EMA) necesitó aproximadamente entre 44 y 66 días (Ver Tablas N° 5.6 y 5.7).

De acuerdo con la escala cualitativa del tono hedónico del olor al término del periodo de evaluación el tratamiento T₁ (5%EMA, 5% M) obtuvo una puntuación final de -3, considerándose como un olor desagradable mientras que los tratamientos T₂ (10%EMA, 10% M) y T₃ (15%EMA, 15% M) presentaron una mejor puntuación de +1 interpretándose como un olor ligeramente agradable.

Debido a que los microorganismos eficaces e insumos para su activación se consiguieron comercialmente, fue importante considerar este factor para la elección de la dosis adecuada de EMA.

Por las razones antes expuestas se elige como dosis óptima el 10% de EMA del tratamiento T₂ debido a que éste redujo las concentraciones de coliformes totales y fecales a niveles no detectables en un periodo de 07 días en comparación con los otros tratamientos asimismo obtuvo mejor característica física a nivel del tono hedónico del olor comparado con el tratamiento T₁ (5% EMA, 5% M) y su pH final fue ligeramente mayor en comparación al tratamiento T₃ (15% EMA, 15% M), lo cual resulta favorable para ser utilizado como abono líquido. Concluyéndose que al utilizar esta dosis óptima se obtuvo los mejores resultados a nivel microbiológico y fisicoquímico.

Mediante el cultivo de veinticinco (25) plantas de maíz sembradas en macetas y distribuidas en cinco (05) grupos diferentes, para un periodo de evaluación de

76 días. Las plantas a las cuales se les aplicó el tratamiento T₂ (10%EMA) diluido en agua al 5% tuvieron un efecto positivo en su crecimiento, obteniendo a nivel de altura y masa, un 24.8% y 22.3% respectivamente más comparado con el control (Co).

CAPÍTULO VII CONCLUSIONES

1. La caracterización microbiológica del biol de estiércol de porcino para uso agrícola, dio como resultados una concentración inicial de coliformes totales de 5.40×10^5 NMP/100 ml y coliformes fecales, 1.70×10^5 NMP/100 ml sin embargo no se detectó presencia de *Escherichia coli* en la muestra analizada.
2. Las concentraciones de microorganismos eficaces (EMTM) de estudio que permitieron establecer la dosis óptima, fueron del 5%, 10% y 15% de EMA.
3. Se determinó que las concentraciones de coliformes totales y fecales presentes en el biol disminuyeron con la aplicación de microorganismos eficaces activados y en comparación con el control requirieron entre 01 y 02 semanas para lograr una reducción a niveles no detectables (< 1.8 NMP/100 ml) asimismo en ninguno de los análisis realizados se detectó *Escherichia coli*.
4. Se comprobó mediante el cultivo de maíz en macetas que existe un efecto positivo del biol con dosis optima del 10% de EMA diluido al 5% en agua, sobre el crecimiento de las plantas a nivel de altura y masa, alcanzando un 24.8% y 22.3% respectivamente más comparado con el control (Co).

En conclusión, se determinó que la dosis óptima de microorganismos eficaces fue del 10% de EMA, que se comprobó con las pruebas estadísticas de Dunnett y Tukey para un nivel de confianza del 95%, las cuales determinaron que los tres tratamientos con dosis del 5%, 10% y 15% de EMA lograron reducir en semejante cantidad la concentración de coliformes totales y fecales presentes en el biol sin embargo el tratamiento T₂ (10% EMA), redujo la concentración de coliformes a niveles no detectables (< 1.8 NMP/100 ml) en un periodo de 07 días de evaluación obteniendo los mejores resultados a nivel microbiológico y físicoquímico.

CAPÍTULO VIII RECOMENDACIONES

Realizar pruebas de laboratorio para medir la calidad del biol tratado con microorganismos eficaces a fin de determinar los nutrientes totales, estabilidad del abono entre otros parámetros pertinentes.

Al replicar los ensayos con cultivos de maíz u otro tipo de vegetal se recomienda cuidar que las condiciones dadas sean semejantes para todas las plantas en macetas. Tomar en cuenta la calidad de la semilla, el tipo de sustrato y a su vez que este sea homogéneo, exposición a la luz solar y viento asimismo evitar los lugares con pendiente para asegurarse que todas las plantas puedan retener y recibir la misma cantidad de agua.

Debido a la formación y acumulación de gas (CO_2) proveniente de la fermentación realizada por las levaduras que forman parte del consorcio de microorganismos eficaces se recomienda utilizar recipientes plásticos u acondicionar una salida para el gas a fin de evitar una ruptura del envase.

CAPÍTULO IX

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGROWASTE. **Digestión Anaerobia.** Disponible en <http://www.agrowaste.eu/wp-content/uploads/2013/02/DIGESTION-ANAEROBIA.pdf>. Consultado en el marzo del 2015
2. ARIAS FIDIAS G. **El Proyecto de Investigación Guía para su elaboración.** 6ta Edición. Caracas –Venezuela. Publicado en el año 2012. Disponible en: <https://drive.google.com/file/d/0ByOr72-tQvdWkpyNG9URmNPWGh1ZWIsTkpnDIvCT0ZONjdn/view>
3. APARCANA SANDRA y otros. **Estudio sobre el Valor Fertilizante de los Productos del Proceso Fermentación Anaeróbica para producción de Biogás.** Publicado en Perú en el año 2008.
4. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater.** 21th ed. Washington. 9-49
5. BIBLIOTECA VIRTUAL EN SALUD AMBIENTAL Y DESARROLLO SOSTENIBLE (BSVDE) **Coliforme Total. Determinación del Número más Probable de coliforme total por la técnica de los tubos múltiples.** Disponible en <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan/013761/013761-02.pdf>
6. BIBLIOTECA VIRTUAL EN SALUD AMBIENTAL Y DESARROLLO SOSTENIBLE (BSVDE) **Coliforme Fecal. Determinación del Número más Probable de coliforme total por la técnica de los tubos múltiples.** Disponible en <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan/013761/013761-03.pdf>
7. BIOEM. **¿Qué es EM?** Disponible en <http://www.bioem.com.pe/que-es-em/> Artículo web. Consultado el 10 de noviembre del 2014.
8. CARHUANCHO, F., RAMÍREZ, J., & GUERRERO, J. **Gestión ambiental de residuos avícolas mediante digestión anaerobia para la producción de fertilizantes orgánicos líquidos.** (Vol. 76, No. 1, pp. 125-132). Publicado en junio del 2015. Disponible en: <http://revistas.lamolina.edu.pe/index.php/acu/article/view/773/741>
9. CORPAS, E. J. (2012). **Reducción de coliformes y *Escherichia coli* en un sistema residual lácteo mediante microorganismos benéficos.**

10. CUBASOLAR. **Bondades del biol.** Disponible en: <http://www.cubasolar.cu/biblioteca/energia/Energia68/HTML/Articulo04.htm>
11. CRUZ, E, MARTÍNEZ, V. Y SOSA, R. **Evaluación Microbiológica del Efluente Anaerobio de un Biodigestor de Cúpula Fija.** Publicado en Cuba en el año 2004.
12. DEPARTMENT OF ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS (DEFRA). **Odour Guidance for Local Authorities.** Reino Unido. Marzo 2010. Consultado el 08 de octubre del 2015. Disponible en https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/69305/pb13554-local-auth-guidance-100326.pdf
13. ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGROPECUARIA PARA LA INTRODUCCIÓN DE TECNOLOGÍAS APROPIADAS DE JAPÓN (EEAITAJ). **Microorganismos Eficaces™ (EM™).** Disponible en http://www.emuruguay.org/PDF/Microorganismos_Eficaces_EM_Presentacion_breve.pdf Consultado el 10 de noviembre del 2014.
14. EMROJAPAN. **What is EM?** Disponible en: <http://www.emrojapan.com/about-em/microorganisms-in-em.html>. Artículo web. Consultado el 10 de marzo del 2015.
15. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Microbiological methods for monitoring the environment: Water and Wastes.** 1978. Disponible en: <http://www.indigowatergroup.com/Files/Lab%20Files/EPA%20Microbiological%20Methods%20Manual.pdf>. Artículo web. Consultado el 10 de marzo del 2015.
16. ESTÁNDARES DE CALIDAD AMBIENTAL (ECA) PARA AGUA Y DISPOSICIONES COMPLEMENTARIAS. D.S N°004-2017-MINAM. Publicado en el diario El Peruano. Junio 2017.
17. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Manual de Biogás.** Santiago de Chile, 2011. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/019/as400s/as400s.pdf>
18. HOYOS, D., ALVIS, N., JABIB, L., GARCÉS, M., PÉREZ, D., & MATTAR, S. **Utilidad de los microorganismos eficaces (EM®) en una explotación avícola de Córdoba: parámetros productivos y control ambiental.** Revista MVZ Córdoba, 13(2), 1369-1379. Publicado en junio del 2008. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69311191013>

19. INFOAGRO. **Guía de la Tecnología de EM.** Consultado en agosto del 2017. Disponible en:
<http://www.infoagro.go.cr/Inforegiones/RegionCentralOriental/Documents/Boletin%20Tecnologia%20%20EM.pdf>

20. INSTITUTO DE ENERGÍA (IDE) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO (UNCUYO). **Biodigestor. Manual para la construcción.** Disponible en <http://imd.uncuyo.edu.ar/upload/biodigestor-manual-para-la-construccion.pdf>. Consulta realizada en agosto del 2018.

21. INSTITUTO PARA LA DIVERSIFICACIÓN Y AHORRO DE LA ENERGÍA (IDAE). **Biomasa: Digestores anaeróbicos.** Madrid, España. 2007. Disponible en:
http://www.idae.es/uploads/documentos/documentos_10737_Biomasa_digestores_07_a996b846.pdf

22. FIORAVANTI, M., VEGA, N., HERNÁNDEZ, C., YEOMANS, J., & OKUMOTO, S. (2005). **Eficiencia de los microorganismos eficaces (EM) en la estabilización de lodos sépticos para su uso agrícola.** Revista Tierra Tropical, 1(09), 69-76.

23. LABORATORIO HARDY DIAGNOSTICS. CRITERION. **Medio de Cultivo EC con MUG.** Consultado 8 de octubre del 2015. Disponible en https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/CRITN-ECMediumMUG.htm

24. LAGRANGE BERNAND. **Biomethane. Principes, Techniques, Utilisation.** Vol.2. Edisual / Energies Alternatives. 249pp. Publicado en el año 1979.

25. LEÓN SUEMATSU GUILLERMO. **Parámetros de Calidad para el Uso de Aguas Residuales. Guías de Calidad de Efluentes para la Protección de la Salud.** Publicado en el año 1995. Disponible en:
<http://www.bvsde.paho.org/bvsair/e/repindex/rep184/vleh/fulltext/acrobat/1eon2.pdf>

26. LUKEHURST CLARE. **Utilisation of digestate from biogas plants as biofertiliser. Reino Unido.** Publicado en junio del 2010. Disponible en:
https://energiatalgud.ee/img_auth.php/4/46/IEA_Bioenergy._Utilisation_of_digestate_from_biogas_plants_as_biofertiliser._2010.pdf

27. MCJUNKIN. **Agua y Salud Humana.** México. Editorial Limusa. 1988

28. MEDINA ALICIA V. LAWRENCE QUIPUZCO U., JUAN JUSCAMAITA M. **Evaluación de la calidad de biol de segunda generación de estiércol de ovino producido a través de biodigestores.** UNALM. Lima, Perú. 2012. Disponible en

<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/viewFile/690/543>

29. NUÑEZ et al., “**Estudio microbiológico y parasitológico de excretas de cerdo sometidas a biodigestión anaeróbica en laboratorio**” Publicado en junio del 1987. Disponible en: <http://200.89.78.45/index.php/ACV/article/viewFile/4478/10760>
30. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). *Escherichia coli*. Disponible en http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/. Consulta realizada el 11 noviembre 2014.
31. PAHO/WHO. **Guías para la calidad del agua potable**. Volumen 3. (1987).
32. PROBIOGAS. **Guía de utilización de los materiales digeridos por biometanización**. Murcia, España: Tipografía San Francisco S.A. 2011 Disponible en [http://213.229.136.11/bases/ainia_probiogas.nsf/0/89A368DD73F7282DC125753F00587325/\\$FILE/PROBIOGAS_GuiaDigerido.pdf](http://213.229.136.11/bases/ainia_probiogas.nsf/0/89A368DD73F7282DC125753F00587325/$FILE/PROBIOGAS_GuiaDigerido.pdf). Consultado el 10 de marzo del 2015.
33. PALACIOS, Evaluación de un Sistema Discontinuo de Biodigestión Anaerobia para el tratamiento de desechos avícola. Publicado en el año 1999
34. QUIPUZCO LAWRENCE y otros. **Evaluación de la calidad de biogás y biol a partir de dos mezclas de estiércol de vaca en biodigestores tubulares de PVC**. Lima. Publicado en el año 2011. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/view/690/543>
35. RED DE ACCIÓN EN AGRICULTURA ALTERNATIVA (RAAA). **Manejo Ecológico de Suelos. Conceptos, Experiencias y Técnicas**. Publicado en Perú en el año 1999. Disponible en http://www.cepes.org.pe/pdf/manejo_ecologico_de_suelos.pdf
36. **REGLAMENTO TÉCNICO PARA LOS PRODUCTOS ORGÁNICOS**. D.S N° 044-2006-AG. Publicado en el diario El Peruano. Perú 2006.
37. ROBLES CASTILLO, H. M. **Acción degradativa de dos consorcios microbianos del desecho pesquero sanguaza contaminante del puerto Malabrigo, Perú**. Publicado en el año 2005. Disponible en: http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNIT_8d9f19827ce292e9eb88bb8e16a23f2e

38. ROLDÁN PÉREZ GABRIEL Y RAMÍREZ RESTREPO JOHN JAIRO. Fundamentos de limnología neotropical. 2da Edición. Publicado en 377-378 pp. Colombia en el año 2008. Disponible en <http://www.ianas.com/docs/books/wbp14.pdf>
39. SORIA Y OTROS. “Producción de biofertilizantes mediante biodigestión de excreta líquida de cerdo” Publicado en el año 2001. Disponible en: <http://www.aqualimpia.com/PDF/Biogas%20estiercol%20de%20cerdo.pdf>
40. TORTORELLO, MARY L. “Indicator Organisms for Safety and Quality – Uses and Methods for Detection: Minireview.” Journal of AOAC International 86 (2003): 1208-1217. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/e363/a82d9ed14fd8b2c97477ee98d188a6971f6a.pdf>
41. VARGAS SABADÍAS ANTONIO. Estadística descriptiva e inferencial (p.412). Universidad de Castilla La Mancha. 576 páginas. Cuenca, España Publicado en el año 1995.

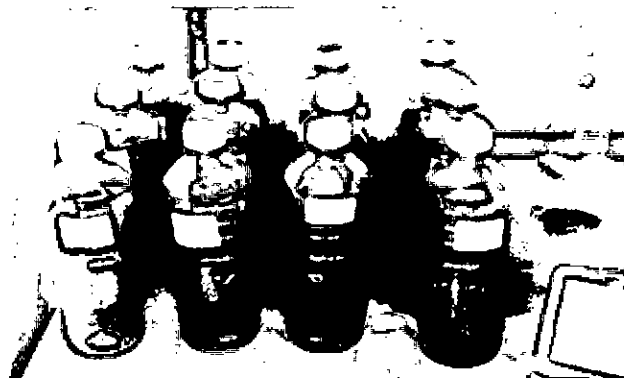
APÉNDICE

A. Matriz de consistencia

DOSIS ÓPTIMA DE MICROORGANISMOS EFICACES EM™ PARA LA REDUCCIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE COLIFORMES EN EL BIOL DE ESTIÉRCOL DE PORCINO PARA USO AGRÍCOLA					
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS INVESTIGACIÓN	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES		MÉTODO A EMPLEAR
			VARIABLES	INDICADORES	
Formulación del problema ¿Cuál es la dosis óptima de microorganismos eficaces EM™ para la reducción de la concentración de coliformes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola?	General Determinar la dosis óptima de microorganismos eficaces para reducir la concentración de coliformes presentes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola. Específicos <ul style="list-style-type: none"> • Cuantificación microbiológica (coliformes) del biol de estiércol de porcino para uso agrícola. • Determinar las concentraciones de microorganismos eficaces (EM™) que permitan establecer la dosis óptima. • Determinar la concentración de coliformes totales, fecales y de <i>Escherichia coli</i> en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola. • Comprobar mediante ensayos de un tipo de cultivo la aplicación del biol tratado con microorganismos eficaces (EM™) 	Una dosis óptima de microorganismos eficaces reduce la concentración de coliformes presentes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola.	Independiente Dosis óptima de Microorganismos eficaces (EM™) aplicados al biol de estiércol de porcino para uso agrícola.	<ul style="list-style-type: none"> - Cantidad añadida de microorganismos eficaces (EM™) sobre el biol. • Variación de pH. • Olor • Formación de nata 	<ul style="list-style-type: none"> - Volumen en mL de microorganismos eficaces (EM™) utilizado en la mezcla • Uso de un potenciómetro. • Tono Hedónico del olor. • Escala de color y espesor de la nata
			Dependiente Reducción de la concentración de coliformes en el biol de estiércol de porcino para uso agrícola.	<ul style="list-style-type: none"> • Concentración de coliformes totales. • Concentración de coliformes fecales. • Concentración de <i>Escherichia coli</i>. 	Análisis microbiológico para el recuento de coliformes totales, fecales y <i>E. coli</i> por la técnica de fermentación por tubos múltiples y fluorescencia respectivamente.

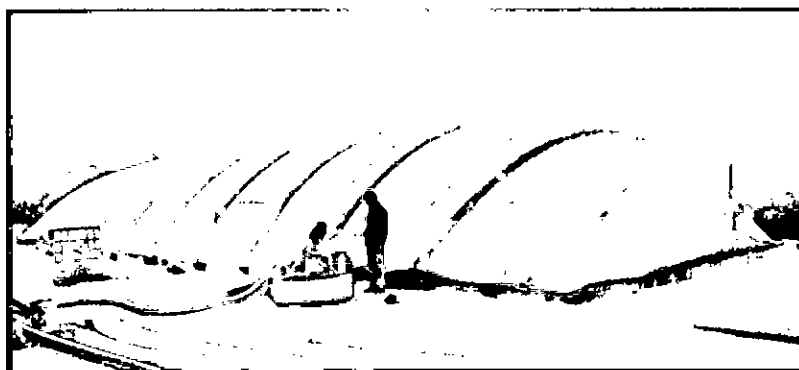
B. Fotografías

FIGURA N° 4.1
TRATAMIENTOS T0, T1, T2 Y T3



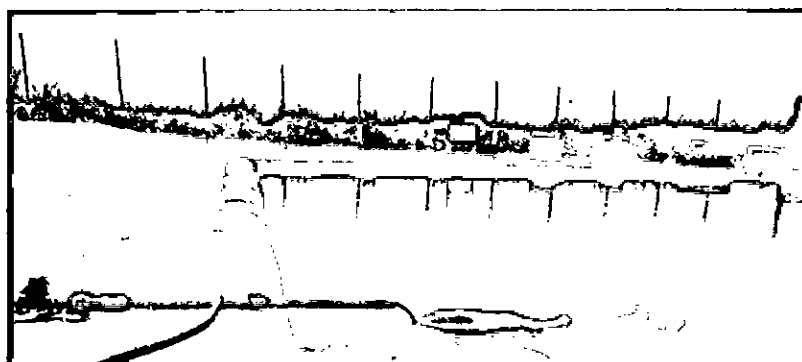
De izquierda a derecha. Tratamiento T0 (0%EMA), T1 (5%ema), T2 (10%EMA) y T3 (15%EMA)

FIGURA N° 4.2
BIODIGESTOR ANAEROBIO DE 640 m³



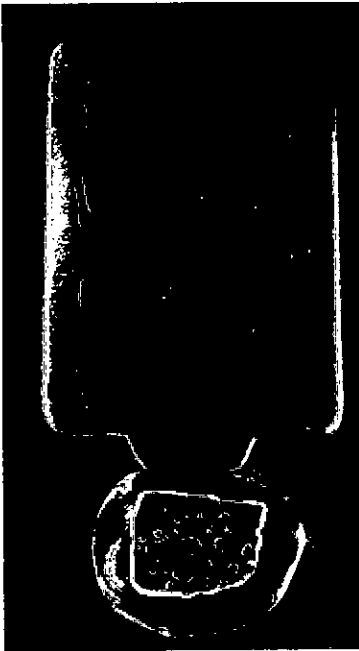
Biodigestor anaerobio de 640 m³ utilizada para el tratamiento de excretas provenientes de una granja porcina ubicada en la localidad de La Esperanza en Huaral- Lima.

FIGURA N°4.3
LAGUNA DE ESTABILIZACIÓN DEL EFLUENTE
PROVENIENTE DEL BIODIGESTOR ANAEROBIO



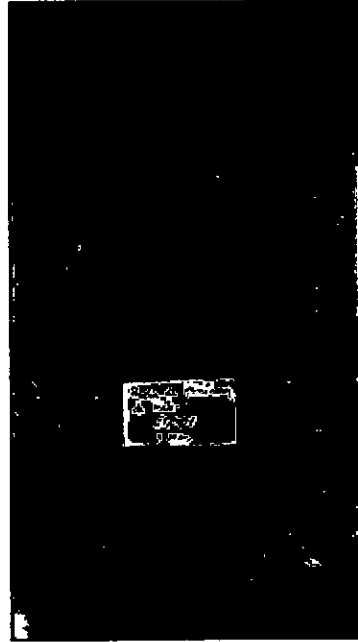
Laguna de oxidación donde se deposita temporalmente el efluente para su posterior tratamiento con microorganismos eficaces activados.

FIGURA N°4.4
PRUEBA DE GERMINACIÓN.
DÍA N° 01



Semillas de maíz colocadas dentro de papel toalla húmedo en una bandeja de cerámica. Distribuida en 02 grupos de 50 unidades cada uno.

FIGURA N°4.5
PRUEBA DE GERMINACIÓN.
DÍA N°01



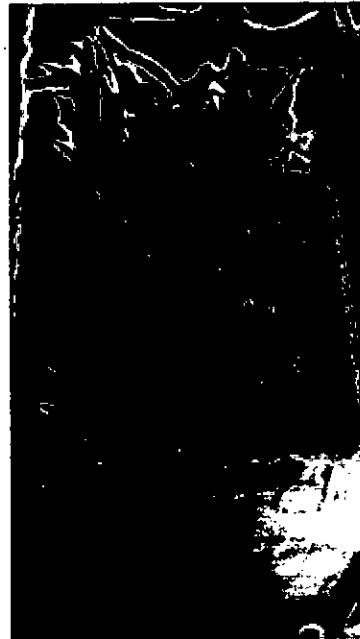
Bandeja de germinación envuelta con bolsa plástica transparente para evitar pérdida de humedad e ingreso de insectos.

FIGURA N°4.6
PRUEBA DE GERMINACIÓN.
DÍA N°03



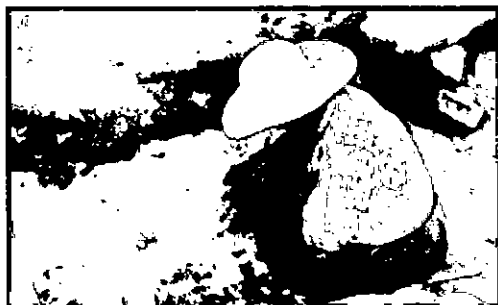
Raíces de semillas germinadas. Ligera inclinación de la mesa donde se encontraba la bandeja de cerámica permitió que las semillas del grupo superior recibieran una mayor cantidad de agua.

FIGURA N°4.7
PRUEBA DE GERMINACIÓN.
DÍA N°06



Las raíces de las semillas se adhirieron al papel toalla y dieron el soporte a la planta para que siguiera desarrollándose.

**FIGURA N°4.8
RECOJO DE ARENA DE RIO**



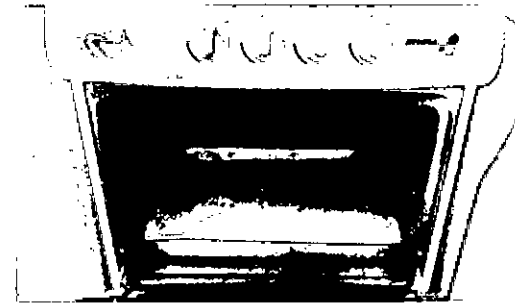
La extracción de arena se realizó en la ribera del río del Huaral, localidad de Cuyo.

**FIGURA N°4.9
LAVADO DE ARENA DE RÍO**



La arena fue colocada en una tina y lavada con agua desinfectada con un poco de lejía. La arena fue secada al sol.

**FIGURA N°4.10
ESTERILIZACIÓN DE LA ARENA**



La arena seca fue colocada en una bandeja de metal y llevada al horno a 180 °C por 30 min.

**FIGURA N°4.11
DISTRIBUCIÓN DE LA ARENA EN
MACETAS**



Se acondicionó un total de 25 macetas distribuidas en 05 grupos para cada dilución.

**FIGURA N°4.12
PREPARACIÓN DE DILUCIÓN DEL
BIOL**



Se diluyó 10 ml de biol con dosis optima 10% de EMA en 200 ml de agua.

**FIGURA N°4.13
DILUCIÓN DEL ABONO LIQUIDO
(TRATAMIENTO T₂)**



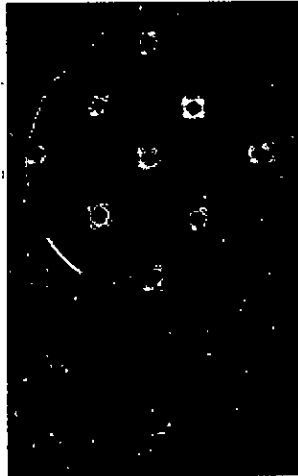
Recipiente con dilución al 5% listo para ser utilizado.

**FIGURA N°4.14
DETERMINACIÓN DE LA
CAPACIDAD DE CAMPO
DEL SUSTRATO A
EMPLEAR (CC)**



En el laboratorio se determinó una CC de 200 ml de agua/maceta. Materiales utilizados una probeta, una gradilla y paño absorbente. La CC se calculó para macetas con 1250 gramos de arena.

**FIGURA N° 4.15
BASE DE MACETA CON
DISTRIBUCIÓN DE
AGUJEROS**



Un total de 12 agujeros fueron realizados en la base y laterales de la maceta.

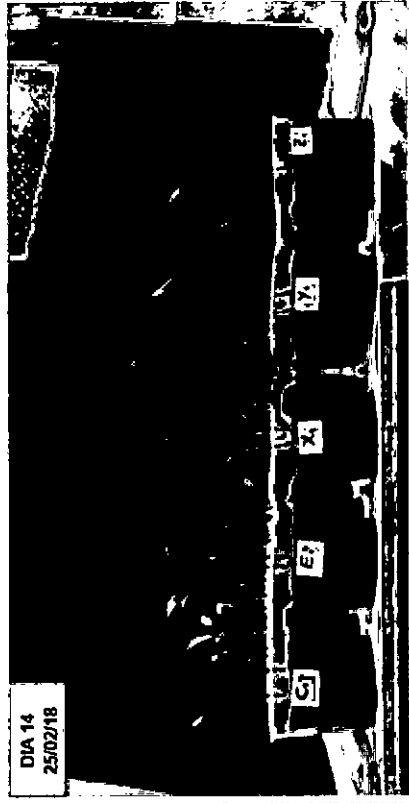
C. Fotografías del crecimiento de plantas de maíz hasta el día 7.

Periodo de evaluación comprendido entre el 11/02/2017 y 28/04/2017



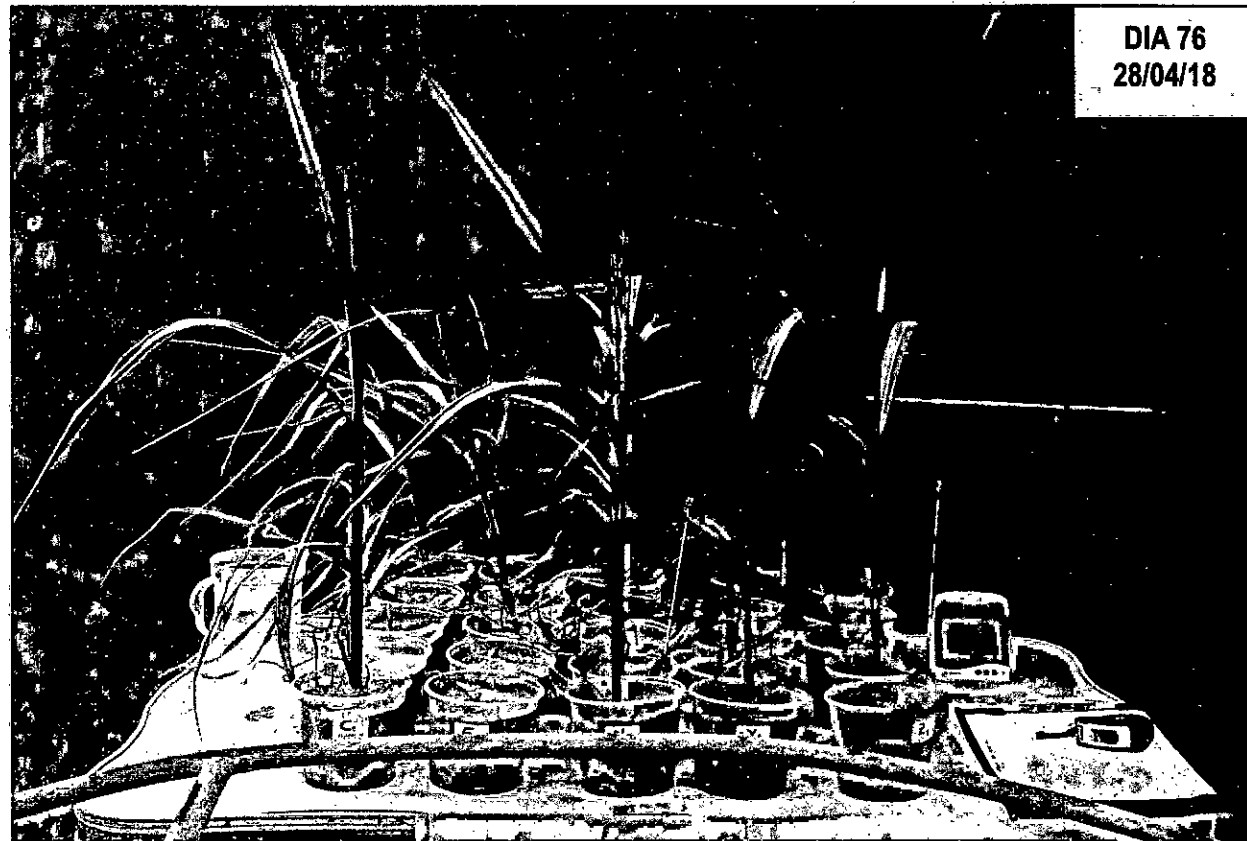
D. Fotografías del crecimiento de las plantas de maíz hasta el día 46

Periodo de evaluación comprendido entre el 11/02/2017 y 28/04/2017



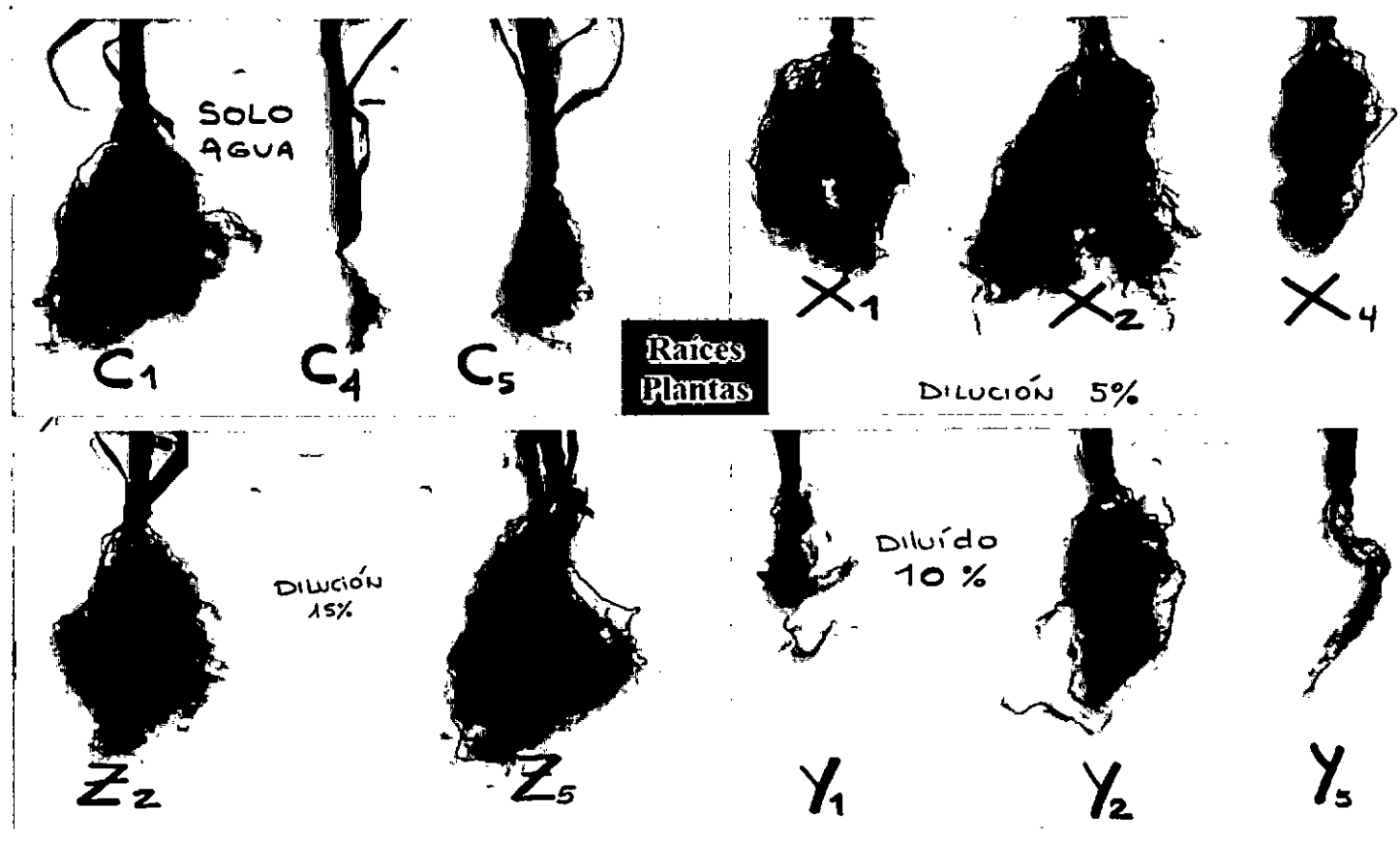
E. Fotografía del crecimiento de las plantas de maíz en el día 76

Periodo de evaluación comprendido entre el 11/02/2017 y 28/04/2017



F. Fotografías de las raíces de plantas maíz cultivadas

Periodo de evaluación comprendido entre el 11/02/2017 y 28/04/2017. Último día de evaluación, día 76.



G. Formato para el registro de los resultados de coliformes

	Prensivos Coliforms Totales (Cable Laredo Substrato)					150/1500 ml	Confirmación Coliformes Totales (Cable Verde Bilis Drillings)					150/1500 ml	Confirmación Coliforms Fecales y E. coli (EC con MUG)					150/1500 ml		
	Dilución						Dilución						Dilución							
Caracterización	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
To (PN EMA)																				
T (SINEMA)																				
T2 (SINEMA)																				
T3 (SINEMA)																				
Caracterización																				
To (PN EMA)																				
T (SINEMA)																				
T2 (SINEMA)																				
T3 (SINEMA)																				

Elaboración propia

I. Resultados de la evaluación del crecimiento en altura (cm) de las plantas de maíz

Altura de plantas (cm)									
Código grupo de macetas	Fecha								
	Planta N°	Día7	Día14	Día22	Día29	Día48	Día51	Día57	Día 77
Co	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	Prom.								
E	1								
	2								
	3								
	4								
	5*								
	Prom.								
Xn	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	Prom.								
Yn	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	Prom.								
Zn	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	Prom.								

- Co: Control Riego solo con agua
- E: Biol puro diluido en agua al 5%
- Xn: T₂ diluido en agua al 5%
- Yn: T₂ diluido en agua al 10%
- Zn: T₂ diluido en agua al 15%

Elaboración propia

ANEXOS

A. Método del Número Más Probable (NMP)

De la Biblioteca Virtual en Salud Ambiental y Desarrollo Sostenible (BSVDE) se obtuvo las Guías del método NMP para la determinación de coliformes totales y fecales, que a continuación se detalla.

La determinación del NMP de bacterias coliformes en una muestra se hace a partir de la técnica de los tubos múltiples, en la cual volúmenes decrecientes de la muestra (diluciones decimales consecutivas) son inoculadas en un medio de cultivo adecuado.

La combinación de los resultados positivos y negativos es usada en la determinación del NMP.

Determinación del NMP de Coliforme Total por la técnica de los tubos múltiples

Resumen del método

El método consta de tres etapas: prueba presuntiva, prueba confirmativa y prueba complementaria.

- **La prueba presuntiva** consiste en colocar volúmenes determinados de muestra en una serie de tubos conteniendo caldo lauril triptosa y son incubados a $35^{\circ} \text{C} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$ durante 24-48 horas. En esta prueba presuntiva la actividad metabólica de las bacterias es estimulada vigorosamente y ocurre una selección inicial de organismos que fermentan la lactosa con producción de gas. La formación de gas a $35^{\circ} \text{C} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$ dentro de las 24 a 48 horas, constituye una prueba presuntiva positiva para la presencia de bacterias del Grupo Coliforme. La prueba presuntiva no debe usarse rutinariamente sin confirmación para análisis de agua y aguas residuales.
- De acuerdo al objetivo del estudio, en algunos casos se puede usar la prueba presuntiva sin confirmación, o en los casos en que exámenes anteriores indican que los resultados de la prueba presuntiva son comparables a la prueba confirmativa.
- **La prueba confirmativa** consiste en transferir todos los tubos positivos de la prueba presuntiva a tubos conteniendo caldo lactosado verde brillante bilis 2% y son incubados durante 24-48 horas a $35^{\circ} \text{C} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$. Esta prueba reduce la posibilidad de resultados falsos gas-positivos que pueden ocurrir por la actividad metabólica de los organismos formadores

de esporas o por la producción sinérgica de gas debido a que algunas cepas bacterianas no pueden, individualmente, producirlo a partir de la fermentación de la lactosa. El caldo lactosado verde brillante bilis contiene agentes selectivos e inhibidores que suprimen el desarrollo de todos los organismos no coliformes. La producción de gas a 35° C después de las 24-48 horas constituye una prueba confirmativa positiva.

- **La prueba complementaria** consiste en transferir por inoculación en estrías, las bacterias a partir de los tubos de caldo lactosado verde brillante bilis positivos, a placas de Agar Endo o Agar Eosina Azul de Metileno (E.A.M.), luego son incubadas a 35° C ± 0.5° C durante 24 ± 2 horas. Se consideran positivas las colonias típicas que son nucleadas con o sin brillo metálico y las colonias atípicas que son opacas, anucleadas, mucoides y de color rosado. Colonias típicas y atípicas son transferidas a tubos con caldo lauril triptosa y tubos con agar inclinado. Será prueba complementaria positiva cuando haya producción de gas a partir de la fermentación de la lactosa y por el examen microscópico, sea demostrada la presencia de bacilo B gram-negativos no esporulados, en las bacterias desarrolladas en el agar inclinado.

Esta prueba se aplica en el examen de muestras de agua, si los resultados son aplicados en el control de la calidad del agua potable. También se **recomienda cuando existe alguna duda sobre la validez de la prueba confirmativa.**

Aplicación

El procedimiento del NMP para la determinación de Coliforme Total puede ser usado para evaluar la potabilidad de aguas tratadas y como indicador de la calidad bacteriológica de aguas naturales y contaminadas.

Ventajas

La prueba presuntiva y confirmativa consiste en observar la presencia o ausencia de gas, para lo cual se requiere mínima experiencia.

Muestras de agua con alta turbiedad y gran número de algas no producen aparentemente efectos nocivos en la reacción de los tubos.

Limitaciones

El tiempo requerido para la prueba puede ser de 96 horas con la prueba confirmativa.

El requerimiento horas-hombre para la preparación del material de vidrio y medios de cultivo para la prueba es significativo

Determinación del NMP de Coliforme Fecal por la técnica de los tubos múltiples

Agitar suavemente cada tubo de (Lauril Sulfato Triptosa) LST que produce gas CO₂, (puede usarse también tubos de (Brilliant Green Bile Broth) BGLB gas positivo) y transferir una asada al tubo de caldo EC e incubar a 44.5 o 45.5°C por 24 a 48 horas y proceder a realizar su lectura con la ayuda de la tabla del NMP.

Método para la determinación de *Escherichia coli* utilizando medio de cultivo EC con MUG

Para este fin, el presente proyecto utilizará el medio de cultivo EC con MUG del laboratorio Hardy Diagnostics (EE.UU).

³Hardy Diagnostics CRITERION™ medio EC con MUG se recomienda para la detección de *Escherichia coli* en muestras de agua y de los alimentos por medio fluorogénicos.

Resumen del método

Medio EC con MUG se compone de la misma fórmula basal como medio EC desarrollado por Hajna y Perry, con la adición de 4-metilumbeliferil-beta-D-glucurónido (MUG). El medio consiste en un caldo de lactosa tamponada con digerido pancreático de caseína, sales biliares y MUG.

La lactosa proporciona hidrato de carbono fermentable para el crecimiento de coliformes. La caseína por digestión pancreática es una fuente de nutrientes. Las sales biliares sirven como agentes inhibidores hacia cocos gram-positivos y formadores de esporas, particularmente estreptococos fecales y bacilos. El pH del medio se mantiene por la presencia de un fuerte sistema de tamponamiento de potasio.

La adición de MUG, un compuesto fluorogénico, permite la rápida detección de *E. coli* cuando se observa el medio de fluorescencia utilizando una onda larga (366 nm) de fuente de luz UV de las cepas de *E. coli* Anaerogenic también se pueden detectar mediante el uso de MUG

La detección de *E. coli* con MUG se basa en la capacidad de beta-glucuronidasa, una enzima que posee la mayoría de las cepas de *E. coli*, para hidrolizar 4-metilumbeliferil-beta-D-glucurónido. Una vez hidrolizada, los

³ https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/CRITN-ECMediumMUG.htm

rendimientos de sustrato 4-metilumbeliferona, un producto final fluorescente. Desarrollo de fluorescencia permite la detección de *E. coli* en cultivos puros o mixtos dentro de 4-24 horas después de la inoculación e incubación de medio EC con MUG.

Los estudios realizados por Feng y Hartman revelaron la actividad beta-glucuronidasa en 96% de *E. coli*, 100% de *E. coli* enterotoxigénica, 17% *Salmonella spp.* y 40% de *Shigella spp.*

Medio EC con MUG es recomendado por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA) para la detección y enumeración de organismos coliformes en alimentos, aguas y aguas residuales.

B. Tabla Número Más Probable (NMP) para 100 ml de muestra cuando se usan 5 porciones en cada de 3 diluciones con series geométricas.

No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos			
10	1	0,1	NMP	10	1	0,1	NMP	10	1	0,1	NMP	10	1	0,1	NMP	10	1	0,1	NMP	10	1	0,1	NMP
ml	ml	ml		ml	ml	ml		ml	ml	ml		ml	ml	ml		ml	ml	ml		ml	ml	ml	
0	0	0	<1,8	1	0	0	2	2	0	0	4,5	3	0	0	7,8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1,8	1	0	1	4	2	0	1	6,8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3,6	1	0	2	6	2	0	2	9,1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5,4	1	0	3	8	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7,2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9,0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
0	1	0	1,8	1	1	0	4	2	1	0	6,8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3,6	1	1	1	6,1	2	1	1	9,2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5,5	1	1	2	8,1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	64
0	1	3	7,3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9,1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	35	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3,7	1	2	0	6,1	2	2	0	9,3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5,5	1	2	1	8,2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7,4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
0	2	3	9,2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5,6	1	3	0	8,3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7,4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
0	3	2	9,3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
0	4	0	7,5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9,4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430
0	5	0	9,4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	330
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81	5	5	5	>1600

Referencia: Official Methods of Analysis of AOAC Internacional, 18 ed. 2005. Chapter 17.3, pag. 40

Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/ccayacm04.pdf>

C. Composición de los medios de cultivo

CALDO LAURIL SULFATO

FORMULA (en gramos por litro)

TRIPTOSA 20 g
LACTOSA 5 g
CLORURO DE SODIO 5g
LAURIL SULFATO DE SODIO 0.1g
FOSFATO DIPOTÁSICO 2.75 g
FOSFATO MONOPOTÁSICO 2.75 g
pH FINAL: 6.8 ± 0.2

Disponible en: http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a282c46acde4.pdf

CALDO DE BILIS VERDE BRILLANTE AL 2%

FORMULA (en gramos por litro)

BILIS DE BUEY DESHIDRATADA 20.0 g
LACTOSA 10.0 g
PEPTONA 10.0 g
VERDE BRILLANTE 0.0133
PH FINAL: 7.2 ± 0.2

Disponible en: http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a298c91358b4.pdf

EC CON MUG

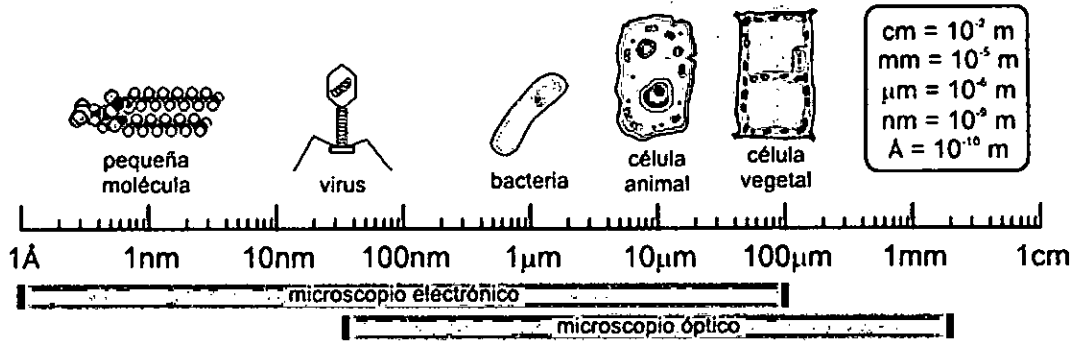
FORMULA

COMPUESTO ENZIMÁTICO DE CASEÍNA 20 g
LACTOSA 5 g
MEZCLA DE SALES BILIARES 1.5g
CLORURO DE SODIO 5 g
FOSFATO MONOPOTÁSICO 1,5 g
FOSFATO DIPOTÁSICO 4 g
4-METILUMBELIFERIL- β -D-GLUCORNIDa 0.05 g
pH FINAL 6.9 ± 0.2 a 25 °C

* Ajustado y / o complementado para cumplir con los criterios de rendimiento.

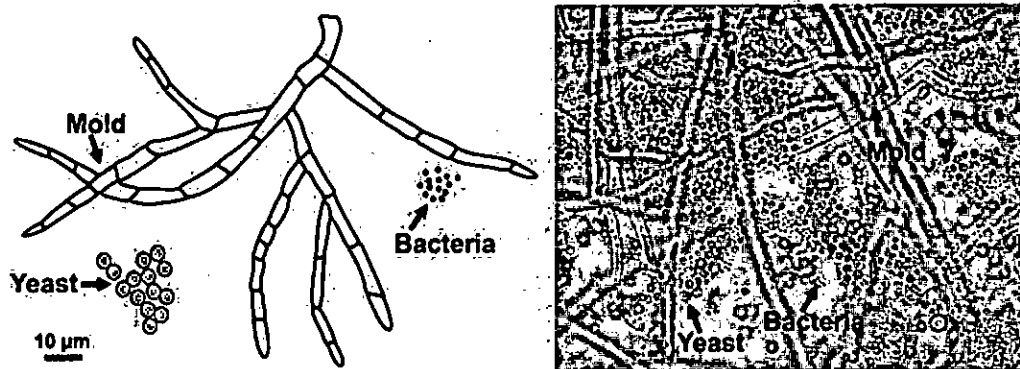
Disponible en: <http://www.healthlinkinc.net/package-inserts/1802.pdf>

D. Cuadro comparativo de distintos ejemplos de niveles de organización a nivel microscópico.



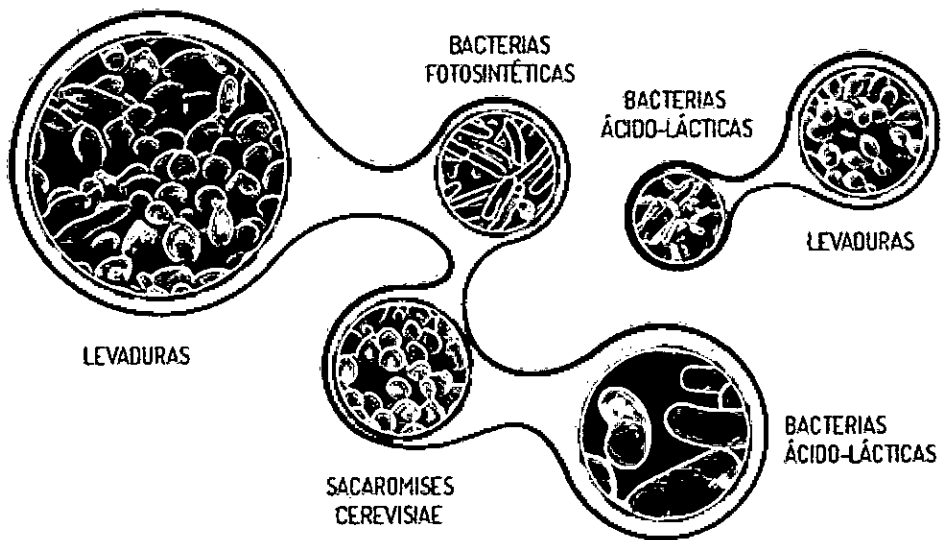
Disponible en: <http://www.genomasur.com/lecturas/guia01.htm>

E. Comparación gráfica y vista microscópica para apreciar formas y tamaños de células de levaduras (yeast), células filamentosas (mold) y bacterias



Disponible en: <https://hongomasquecallampas.wordpress.com/tag/que-son-los-hongos/>

F. Imagen de microorganismos benéficos de origen natural



Disponible en: <http://www.bioem.com.pe/que-es-em/>

G. Imagen de Escherichia Coli O157: H7



Fuente: USDA / Eric Herbs; Colorización, Christopher Pooley.
Disponible en: https://editors.eol.org/eoearth/wiki/Escherichia_Coli_O157:H7