



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PERVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: “EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA E IDENTIFICACIÓN
DE *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* DEL
VERMICOMPOST PRODUCIDO POR EL GOBIERNO
AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO (GAD) DE PUJILÍ EN LA
PROVINCIA DE COTOPAXI”**

AUTOR: CALAHORRANO SARMIENTO, LIRIA SALOMÉ

DIRECTOR: Phd. IZQUIERDO, ANDRÉS

CODIRECTORA: MSc. KOCH, ALMA

SANGOLQUÍ

2015

CERTIFICACIÓN

PhD. Andrés Ricardo Izquierdo Romero

MSc. Alma Rosel Koch Kaiser

Certifican:

Que el trabajo titulado "Evaluación fisicoquímica e identificación de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* del vermicompost producido por el Gobierno Autónomo Descentralizado (GAD) de Pujilí en la provincia de Cotopaxi" realizado por la Srta. LIRIA SALOMÉ CALAHORRANO SARMIENTO como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas estatutarias establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas – E.S.P.E, en el Reglamento de Estudiantes.

El mencionado trabajo, consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Liria Salomé Calahorrano Sarmiento que lo entregue a la Dra. María Augusta Chávez, en su calidad de Coordinadora de la Carrea.

Sangolquí, Mayo 2015.



PhD. Andrés Ricardo Izquierdo Romero

DIRECTOR



MSc. Alma Rosel Koch Kaiser

CODIRECTORA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Liria Salomé Calahorrano Sarmiento

Declaro que:

El proyecto denominado "Evaluación fisicoquímica e identificación de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* del vermicompost producido por el Gobierno Autónomo Descentralizado (GAD) de Pujilí en la provincia de Cotopaxi" ha sido desarrollado en base a una investigación científica exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente, este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Mayo 2015.



Liria Salomé Calahorrano Sarmiento

AUTORIZACIÓN

Yo, Liria Salomé Calahorrano Sarmiento

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas – E.S.P.E., la publicación en la biblioteca virtual de la institución, de la “**Evaluación fisicoquímica e identificación de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli*** del vermicompost producido por el Gobierno Autónomo Descentralizado (GAD) de Pujilí en la provincia de Cotopaxi”, cuyos contenidos y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Mayo 2015.



Liria Salomé Calahorrano Sarmiento

DEDICATORIA

A mis padres, María Liria Sarmiento y Luis Hernán Calahorrano que han sido ejemplo de responsabilidad, honestidad y puntualidad.

A mi hermana, que ha sido un apoyo en estos años de estudios universitarios.

A mis profesores, que han inculcado conocimiento y valores que me han permitido llegar a realizar este trabajo.

A mis amigos, que a lo largo de todo el trayecto universitario me han acompañado y apoyado.

Liria Salomé Calahorrano Sarmiento

AGRADECIMIENTO

A la Universidad de las Fuerzas Armadas – E.S.P.E., con sede Sangolquí, por brindarme una educación de excelencia con docentes capacitados.

A la MSc. Alma Koch, quien estuvo a cargo de los Laboratorios de Microbiología, en donde me brindaron la oportunidad de realizar pasantías y la tesis. Además, la facilidad que se me brindó en el uso de equipos, materiales y reactivos.

A la Lic. Jessica Maisincho quién ha sido un gran apoyo y compañía durante el trabajo realizado.

A Agrocalidad, especialmente al Laboratorio de Suelos, Foliar y Aguas, quienes me brindaron la apertura y recursos necesarios para realizar los análisis físicoquímicos.

A mis amigos y familiares, quienes me han apoyado durante este proyecto y que han sido compañía en los momentos difíciles.

Liria Salomé Calahorrano Sarmiento

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1 Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos específicos	4
1.4 Hipótesis	4
1.5 Marco Teórico	4
1.5.1 Conceptos generales	4
1.5.2 Compostaje y vermicompostaje	5
1.5.2 Compost y vermicompost.....	11
1.5.3 Microorganismos patógenos: Enterobacteriaceae	12
2 METODOLOGÍA.....	17
2.5 Participantes	17
2.6 Zona de estudio.....	17
2.7 Periodo de tiempo de investigación.....	17
2.8 Diseño y análisis de datos.....	17

2.8.2	Variables de respuesta	18
2.9	Procedimiento	18
2.9.2	Muestreo	18
2.9.3	Densidad aparente.....	20
2.9.4	Humedad gravimétrica	20
2.9.5	Preparación de las muestras para los análisis fisicoquímicos ..	20
2.9.6	pH	20
2.9.7	Conductividad Eléctrica.....	20
2.9.8	Carbono Orgánico y Materia Orgánica	20
2.9.9	Capacidad de intercambio catiónico	20
2.9.10	Nitrógeno	20
2.9.11	Relación Carbono-Nitrógeno	20
2.9.12	Fósforo	20
2.9.13	Cobre, Potasio, Zinc	21
2.9.14	Cadmio y Plomo	21
2.10	Recuento de microorganismos aerobios mesófilos (en placa) .	21
2.11	Recuento de enterobacterias y <i>Escherichia coli</i> (Petrifilm)	22
2.12	Identificación de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>	22
2.12.2	Aislamiento <i>Escherichia coli</i>	23
2.12.3	Aislamiento <i>Salmonella</i>	24
2.12.4	Aislamiento <i>Shigella</i> spp.....	25
2.13	Pruebas de fitotoxicidad	26
3	RESULTADOS	28
3.5	Muestreo	28
3.6	Análisis microbiológicos	28
3.6.2	Microorganismos aerobios mesófilos	28

3.6.3	Enterobacterias	28
3.6.4	<i>Salmonella</i> spp.	28
3.6.5	<i>Shigella</i> spp.	31
3.6.6	<i>Escherichia coli</i>	33
3.7	Análisis fisicoquímicos	35
3.8	Prueba de fitotoxicidad	36
3.9	Comparación las normativas internacionales	37
4	DISCUSIÓN	39
5	CONCLUSIONES	43
6	RECOMENDACIONES	44
7	BIBLIOGRAFÍA	45

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Perfil bioquímico de <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> y <i>Escherichia coli</i>	16
Tabla 2. Tamaño de la muestra de acuerdo al tamaño del lote.....	19
Tabla 3. Recuento de microorganismos aerobios mesófilos de tres muestras de vermicompost de Pujilí.	28
Tabla 4. Características de las colonias en medio SS, HEK, y XLD a las 24 h para <i>Salmonella</i>	29
Tabla 5. Morfología de las tres colonias seleccionadas para <i>Salmonella</i>	29
Tabla 6. Resultados de las tres colonias seleccionadas para <i>Salmonella</i> ...	30
Tabla 7. Resultados para colonia sospechosa de <i>Salmonella</i> en API 20E (<i>Citrobacter youngae</i>).	30
Tabla 8. Características de las colonias en medio SS, HEK, y XLD a las 24 h para <i>Shigella</i>	31
Tabla 9. Morfología de las tres colonias seleccionadas para <i>Shigella</i>	32
Tabla 10. Resultados de las tres colonias seleccionadas para <i>Shigella</i>	32
Tabla 11. Características de las colonias en medio MCK y EMB a las 24 h para <i>Escherichia coli</i>	33
Tabla 12. Morfología de las tres colonias seleccionadas para <i>Escherichia coli</i>	34
Tabla 13. Resultados de las tres colonias seleccionadas para <i>Escherichia coli</i>	34
Tabla 14. Resultados para colonia sospechosa de <i>Escherichia coli</i> en API 20E.....	35
Tabla 15. Recuento de <i>Escherichia coli</i> por Petrifilm.	35
Tabla 16. Resultados de los análisis fisicoquímicos en las tres muestras de abono orgánico de Pujilí.....	36
Tabla 17. Porcentaje de germinación, Crecimiento de la radícula relativo e Índice de germinación de las tres muestras del vermicompost de Pujilí.	37
Tabla 18. Análisis de la varianza del Índice de Germinación de tres muestras de vermicompost de Pujilí.	37

Tabla 19. Porcentaje de cumplimiento del vermicompost de Pujilf con respecto a las diferentes normativas internacionales.....	38
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Flujograma diferenciado del manejo integrado de residuos sólidos urbanos	2
Figura 2: Diagrama de proceso de una pila de compostaje manual	9
Figura 3: Producto final empacado, cada saco con 85 lb de compost húmedo del GAD de Pujilí.....	18
Figura 4: Conteo de microorganismos aerobios mesófilos en PCA de tres muestras de vermicompost de Pujilí.	22
Figura 5: Conteo de enterobacterias (izquierda) y <i>Escherichia coli</i> (derecha) en Petrifilm.....	22
Figura 6: Pre-enriquecimiento de muestras de vermicompost en agua peptona.	23
Figura 7: Crecimiento en caldo EC (izquierda) y estriado en McConkey (derecha).....	23
Figura 8: Tinción Gram para colonias sospechosas de <i>Escherichia coli</i>	24
Figura 9: Crecimiento de microorganismos en caldo tetrionato a las 8h de incubación.	24
Figura 10: Tinción Gram para colonias sospechosas de <i>Salmonella</i>	25
Figura 11: Crecimiento de microorganismos en caldo tetrionato a las 24h de incubación.	25
Figura 12: Tinción Gram para colonias sospechosas de <i>Shigella</i>	26
Figura 13: Ensayo de fitotoxicidad con semillas de rábano al quinto día. ...	27
Figura 14: Características morfológicas de colonias presuntivas de <i>Salmonella</i> spp. en agares selectivos SS, HEK y XLD.	29
Figura 15. Resultados para colonia sospechosa de <i>Salmonella</i> en API 20E (<i>Citrobacter youngae</i>).	31
Figura 16. Características morfológicas de colonias presuntivas de <i>Shigella</i> en agares selectivos SS, HEK y XLD.	31
Figura 17. Características morfológicas de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> en agares selectivos MCK y EMB.	33
Figura 18. Resultados para colonia sospechosa de <i>Escherichia coli</i> en API 20E.....	35

Figura 19. Ensayo fitotoxicidad. Izquierda: Semillas al inicio del
ensayo. Derecha: Semillas a los cinco días del ensayo..... 36

LISTADO DE ABREVIATURAS

GAD	Gobierno Autónomo Descentralizado
EMB	Eosin Methylene Blue Agar (Eosina Azul de Metileno)
HEK	Hektoen Entérico Agar
SS	Salmonella Shigella Agar
XLD	Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (Xilosa, Lisina, Desoxicolato)
MCK	MacConkey Agar
FTM	Fluid Thioglycollate Medium (Tioglicolato medio fluido)
OXI	Oxidasa
CAT	Catalasa
TSI	Triple Sugar Iron (Agar triple azúcar-hierro)
MRVP	Rojo de metilo y Voges-Proskauer
IND	Indol
URE	Ureasa
LIS/LDC	Lisina descarboxilasa
ARG/ADH	Arginina deshidrolasa
ORN/ODC	Ornitina descarboxilasa
ONPG	ortho-Nitrophenyl- β -galactoside
CIT	Citrato
GLU	Glucosa
MAN	Manosa
INO	Inositol

SOR	Sorbitol
RHA	Rhamnosa
SAC	Sacarosa
MEL	Melobiosa
AMY	Amigdalina
ARA	Arabinosa

RESUMEN

El Ecuador tiene una producción de basura de 4 139.512 toneladas/año; el 61% de la basura producida es orgánica y puede ser utilizada para la producción de abono orgánico. El gobierno autónomo de Pujilí posee un programa de gestión de residuos sólidos, por lo cual se realiza el vermicompostaje de residuos orgánicos de ferias libres y mercados. El objetivo de este estudio fue evaluar fisicoquímicamente e identificar *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* del vermicompost producido por el GAD de Pujilí. Los resultados demuestran que posee una buena calidad fisicoquímica, no presenta fitotoxicidad, ausencia de *Salmonella*, *Shigella* y presencia de *Escherichia coli*, pero la cantidad de microorganismos no sobrepasa la normativa. El vermicompost de Pujilí puede ser usado para fines agrícolas.

Palabras Clave:

- **VERMICOMPOST**
- **EVALUACIÓN FISICOQUÍMICA**
- **FITOTOXICIDAD**
- **SANIDAD**

ABSTRACT

Ecuador has a waste production of 4 139 512 tons / year; 61% of the waste produced is organic and can be used for the production of organic fertilizers or manures. Autonomous government such as Pujilí, has a program for solid waste management, so vermicomposting of organic wastes from free fairs and markets is performed. The objective of this study was to evaluate vermicompost physicochemically and identify *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli* of vermicompost produced by GAD Pujilí. Results demonstrate that vermicompost of Pujilí has good chemical quality, absence of phytotoxicity, absence of *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli*. Amount of microorganisms does not exceed the standards. So, the vermicompost of Pujilí can be used for agricultural purposes.

Keywords:

- **VERMICOMPOST**
- **PHYSICOCHEMICAL EVALUATION**
- **PHYTOTOXICITY**
- **SANITATION**

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El Ecuador tiene una producción de residuos *per cápita* promedio de 0,75 kilos al día, con un promedio total de 4'139.512 Tm/año. Adicionalmente, se conoce que cada bolsa de basura contiene un 61,4% de orgánicos, un 11% de plásticos, un 9,4% de papel y cartón, un 2,6% de vidrio, un 2,2% de chatarra y un 13% de otros desechos (MAE, 2014). Se puede concluir que el 25,2 % de basura puede ser reciclada y el 61,4 % de orgánicos puede ser aprovechado para la generación de abono orgánico con la consecuente disminución del volumen de desechos en los rellenos sanitarios.

Los residuos sólidos urbanos (RSU) si se acumulan en un lugar a cielo abierto y no se reincorporan al medio ambiente generan contaminación, que afecta al suelo, aire, cuerpos de agua, fauna, flora y personas (Rodríguez & Córdova, 2006).

El Programa Nacional para la Gestión Integral de Residuos Sólidos (PNGIDS) impulsa la gestión integral de los RSU en los 221 municipios a nivel nacional. La gestión de residuos incluye la generación, recolección, transferencia, tratamiento y disposición final (Figura 1). Se han registrado 71 municipios con procesos de aprovechamiento de residuos sólidos orgánicos para disminuir el impacto que causan los residuos sobre el medio ambiente circundante.

En el año 2007 se implementó el proceso de compostaje al municipio de Pujilí. Semanalmente se recolectan aproximadamente 15 m³ de residuos sólidos desde Mercados y ferias libres del sector. Actualmente, el GAD de Pujilí posee cuatro camas de lombricultura de 2 m de ancho, 50 m de largo y 0,40 m de altura. El proceso de compostaje inicia con la clasificación de la

materia orgánica e inorgánica, la trituración manual de los desechos orgánicos y la colocación de los desechos orgánicos triturados en las camas. Durante el proceso de compostaje se cuenta con riego de agua y volteo de la materia orgánica en las camas. Finalmente, se tamiza el material estabilizado para ser envasado en sacos y su posterior utilización en los espacios verdes del municipio.

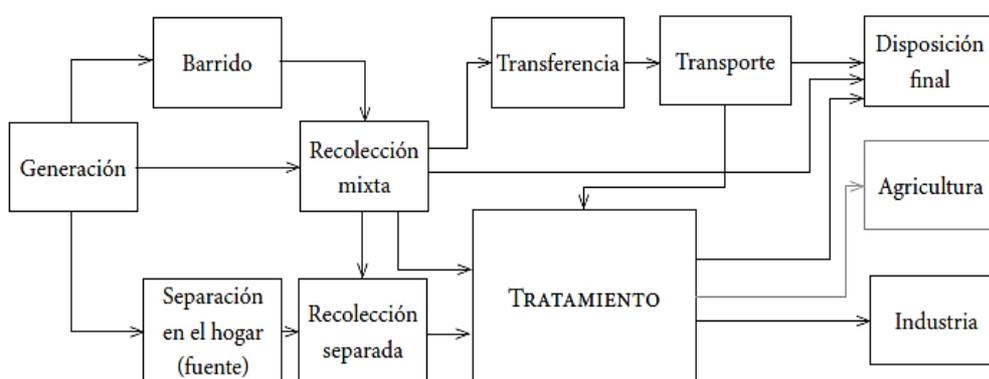


Figura 1. Flujograma diferenciado del manejo integrado de residuos sólidos urbanos

Fuente: Rodríguez & Córdova, 2006

La necesidad de reportar científicamente la calidad del compost es una respuesta a la creciente industria del compostaje en países desarrollados con interacción del departamento público ambiental, los reguladores sanitarios y asociaciones de agricultores (Brinton W. F., 2000). La calidad del abono se mide a través de parámetros fisicoquímicos como nutrientes, metales pesados, pruebas de fitotoxicidad, indicadores de estabilidad, contenido de materias externas y parámetros de inocuidad, como la determinación de patógenos humanos: *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* (Soto & Meléndez, 2004).

1.2 Justificación del problema

A nivel internacional, países como Austria, Australia, Bélgica, Canadá, Francia, Reino Unido poseen regulaciones ambientales y de calidad del compost; por ejemplo, la EPA (Environmental Protection Agency: Agencia de Protección Ambiental) en Estados Unidos, Dinamarca. En normas de calidad

se puede mencionar al Real Decreto 506/2013 acerca de fertilizantes en la Unión Europea. Las normativas delimitan los parámetros característicos del producto, macro y micronutrientes (en algunos casos), metales pesados y microorganismos patógenos.

En el marco legal del Ecuador no se contempla una normativa específica para la evaluación del compost/abonos orgánicos producido a partir de los RSU, así como el control de los posibles impactos negativos generados en el ambiente debido a un inadecuado proceso de compostaje a nivel municipal. Un compost mal elaborado puede contaminar el suelo y acumular sustancias nocivas en plantas y animales (bioacumulación). Además, el manejo inadecuado del proceso de compostaje puede ocasionar problemas de salud en los operarios de las plantas de compostaje y viviendas vecinas (Rodríguez & Córdova, 2006).

Se requiere evaluar los parámetros nutricionales (macro y micronutrientes), contaminantes como los metales pesados que pueden bioacumularse en leguminosas y microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. en compost producido por los municipios del Ecuador, de manera que se garantice la utilidad, seguridad e inocuidad del abono orgánico para la planta, el agricultor o consumidor final y el medio ambiente.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Evaluar fisicoquímicamente e identificar *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* del vermicompost producido por el Gobierno Autónomo Descentralizado (GAD) de Pujilí en la provincia de Cotopaxi.

1.3.2 Objetivos específicos

- Recolectar muestras del proceso de compostaje en la etapa final.
- Determinar los parámetros fisicoquímicos como pH, conductividad eléctrica, humedad, densidad aparente, materia orgánica, relación C/N, CIC, nutrientes y metales pesados.
- Identificar la presencia/ausencia de microorganismos aerobios mesófilos, Enterobacterias, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli*.
- Realizar pruebas de fitotoxicidad.
- Comparar los resultados obtenidos con la normativa internacional: EPA (Estados Unidos), NTEA (Normativa Técnica Estatal Ambiental, México), NTC (Norma Técnica Colombiana), Real Decreto 824 (España) y NCh (Norma Chilena).

1.4 Hipótesis

La evaluación fisicoquímica e identificación de *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* del vermicompost producido por el Gobierno Autónomo Descentralizado (GAD) de Pujilí en la provincia de Cotopaxi cumple con los requerimientos de las normativas internacionales: NTEA-006-SMA-2006, NTC 5167, EPA 2003, NCh2880 y el Real Decreto 824/2005.

1.5 Marco Teórico

1.5.1 Conceptos generales

Un residuo es cualquier material generado de un proceso de transformación natural o artificial, consumo o utilización que carecen de un valor económico y no puede usarse de nuevo (Rodríguez & Córdova, 2006). Un tipo de residuo es el orgánico, que tiene como característica ser biológicamente degradable. Otro tipo de residuo común es el sólido urbano (RSU) producido en las casas o domicilios y que son materiales resultantes de las actividades domésticas, de los productos, embalajes, envases o empaques que se consumen. Se debe resaltar que los residuos sólidos poseen líquidos o gases asociados o mezclados (Rodríguez & Córdova,

2006). Adicionalmente, un residuo sólido urbano orgánico puede ser biodegradado.

El abono orgánico es producto de la transformación biológica de los residuos orgánicos, con la formación de compuestos como el humus con un alto contenido de carbono orgánico. Adicionalmente, provee nutrientes, mejora las características del suelo como porosidad y retención del agua y aire (Espinosa, 2011). Dentro de los abonos orgánicos se encuentran el compost producto del compostaje; debe ser inodoro, estable y rico en materia orgánica, parecido al humus (Rodríguez & Córdova, 2006); y el vermicompost producido por las lombrices con un mayor contenido de nutrientes y humus. Es necesario recordar que los abonos orgánicos no son competencia de los fertilizantes sino complementarios.

Varios estudios han propuesto e investigado la utilización de los residuos orgánicos recolectados en los rellenos sanitarios para la elaboración de compost (Brinton W. F., 2000), con la finalidad de disminuir los volúmenes de basura depositados en los rellenos sanitarios, aumentando su tiempo de vida útil. Además, se evita la contaminación que provoca la disposición de estos residuos en el medio ambiente. Es por eso que han nacido diferentes normas ambientales y de calidad en varios países, para controlar el proceso y el producto final que garanticen seguridad y utilidad del abono orgánico.

1.5.2 Compostaje y vermicompostaje

Compostaje

Las técnicas para la elaboración de compost son muy antiguas, en China se conocen técnicas de más de 6000 años de antigüedad. El compostaje es el proceso de transformación aerobio de los residuos orgánicos a compost debido a la actividad microbiológica por bacterias, hongos, protozoos e invertebrados (incluido nematodos), en una sucesión ecológica (Rodríguez & Córdova, 2006). Produce la fijación (mineralización) de nutrientes y carbono que pueden ser utilizados por la planta, así como la solubilización de

compuestos inorgánicos (Romero, 2003). De residuos orgánicos se obtiene un producto útil que apoya a la agricultura orgánica.

Las bacterias y hongos secretan enzimas que catalizan reacciones de oxidación para degradación de azúcares, almidones, proteínas (en aminoácidos) y otros compuestos orgánicos complejos (celulosa, lignina, quitina) disponibles con la consecuente producción de anhídrido carbónico, vapor de agua y calor por la actividad biológica. A medida que el material orgánico se descompone, se liberan fuentes de nitrógeno como NH_4^+ o NO_3^- , fósforo, potasio y azufre (SO_4^-) que son reciclados a través de los microorganismos e invertebrados (Trautmann & Krasny, 1997). Los nutrientes liberados también pueden ser utilizados por las plantas al finalizar la degradación biológica.

Sin embargo, no todos los compuestos terminan en simples iones. Los microorganismos también pueden sintetizar polímeros que en conjunto se conocen como humus y es el producto final del compostaje (Trautmann & Krasny, 1997). En el proyecto de compostaje impulsado en Bangladesh, a partir de una tonelada de residuos orgánicos se obtiene aproximadamente un 25 % de producto final, es decir un cuarto de tonelada de compost (Enayetullah, 2006); pueden ser desechos vegetales, animales, domésticos (fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos) e industriales que varían las cantidades de carbono y nitrógeno disponibles para la microbiota. Al finalizar el proceso, la composta no se degrada (es estable), no crecen más microorganismos y se puede almacenar por bastante tiempo manteniendo sus características constantes (Rodríguez & Córdova, 2006).

El material original determinará la calidad del compost, el contenido de nutrientes, materia orgánica, elementos trazas (metales pesados) y la materia inerte (Stofella, 2004), por lo que se recomienda la recolección separada desde la fuente de generación. Adicionalmente, la materia orgánica destinada al compostaje puede contener organismos patógenos que pueden causar enfermedades a los trabajadores o reacciones alérgicas en personas sensibles por la presencia de esporas de hongos especialmente de

Aspergillus fumigatus (Trautmann & Krasny, 1997). Las moscas y los olores pueden ser molestos, pero no generan problemas de salud.

Las escalas de producción del compost pueden ser doméstico, agrícola, comercial y municipal. Un programa de compostaje municipal tiene cinco componentes: separación, recolección, tratamiento, distribución y utilización (Rodríguez & Córdova, 2006). Los objetivos de los programas de gestión integral de residuos son reutilizar los materiales orgánicos de los RSU, aumentar la vida útil del relleno sanitario y mejorar la vida de las personas que son parte del servicio de recolección.

La separación consiste en la selección de los residuos orgánicos del total de RSU, se recomienda una separación en la fuente para obtener residuos menos contaminados y mayor calidad del producto final (Brinton W. F., 2000; Rodríguez & Córdova, 2006). La recolección consiste en el transporte de los residuos separados al lugar del tratamiento. El tratamiento consiste en el proceso de compostaje. La distribución es el transporte de la composta a los consumidores finales y la utilización es el fin para el cual la composta fue creada. En caso que la composta no fuese utilizada se puede llegar a detener la producción de una planta de compostaje por la acumulación excesiva de producto final, por lo que no se puede receptor materia prima ni almacenar el compost que se produzca.

Factores importantes en el compostaje

- ✓ **Humedad:** Es necesaria para que se lleven a cabo las reacciones químicas, provee el medio para transportar nutrientes y dar movilidad a los microorganismos (NRAES, 1992). El porcentaje de humedad varía entre el 50 y el 70%, valores menores de humedad disminuyen la disponibilidad de oxígeno y valores superiores de humedad disminuyen la temperatura de la pila de compostaje (Mendez, 1997).
- ✓ **pH:** Afecta a la tasa de reacción química de los microorganismos, generalmente en el compostaje fluctúa entre 6 y 8 (NRAES, 1992).

- ✓ **Tamaño de partícula:** Es conveniente disminuir el tamaño de partícula del material a compostarse a través de procesos de trituración para acelerar y homogeneizar la degradación, debido a que partículas con pequeño tamaño poseen mayor área superficial para los microorganismos (Rodríguez & Córdova, 2006).
- ✓ **Relación carbono/nitrógeno:** El carbono es la fuente de energía de los microorganismos, el nitrógeno ayuda a la síntesis de proteínas, la relación C/N inicial oscila entre los 25 a 35 (De Carlo, 2001). Si la materia prima tiene una alta relación C/N, el proceso será lento, la temperatura no sube lo suficiente y se emite mayor cantidad de anhídrido carbónico; en cambio si la relación es baja se pierde nitrógeno en forma de amoníaco. La relación C/N de los RSU suele ser adecuada (Rodríguez & Córdova, 2006).
- ✓ **Aireación:** La concentración de oxígeno disminuye y aumenta la concentración de dióxido de carbono (Trautmann & Krasny, 1997), la aireación suministra la cantidad de oxígeno para llevar a cabo la degradación aerobia y evitar una degradación anaerobia y la producción de malos olores. Los métodos pueden ser naturales (túneles provocados por partículas de diferentes tamaños), manuales o mecánicos (volteo) y forzada (tubería con aire) (Rodríguez & Córdova, 2006).
- ✓ **Temperatura:** Si la temperatura es baja, la actividad metabólica disminuye y viceversa. Puede ser controlada a través de la composición de los materiales orgánicos o con volteos, además de los mecanismos de pérdida de calor: conducción, convección y radiación (Trautmann & Krasny, 1997).

Es importante indicar las fases y el progreso del proceso de compostaje (Trautmann & Krasny, 1997):

- La degradación (mesofílica), de 10°C a 40°C que dura un par de días. Donde los microorganismos (mayoritariamente del género *Bacillus*) escinden rápidamente los compuestos solubles y el calor que se produce debido a la degradación aumenta rápidamente la temperatura.

- La pasteurización (termofílica), con temperaturas mayores a 40°C, generalmente se llega los 55°C durante tres a cinco días dependiendo del tamaño del sistema y la composición de los ingredientes para destruir bacterias patógenas y semillas de hierbas. Una temperatura entre 60-65°C o mayor puede ser letal para la población microbiana beneficiosa. Al final de la fase se obtiene un compost inmaduro.
- La maduración (mesofílica) de 10°C a 40°C que dura varios meses y en donde se produce la maduración del compost, es una degradación lenta a temperatura ambiente. Se produce el aumento de la diversidad microbiana. Finalmente, el carbón disponible se acaba y la población microbiana disminuye otra vez.

Se debe tener en cuenta que puede existir un proceso de contaminación de microorganismos patógenos, si las condiciones con las que se produce el compostaje no son controladas y el proceso está expuesto a estiércol de roedores o de pájaros (Zamorano-Escuela Agrícola Panamericana, 2011).

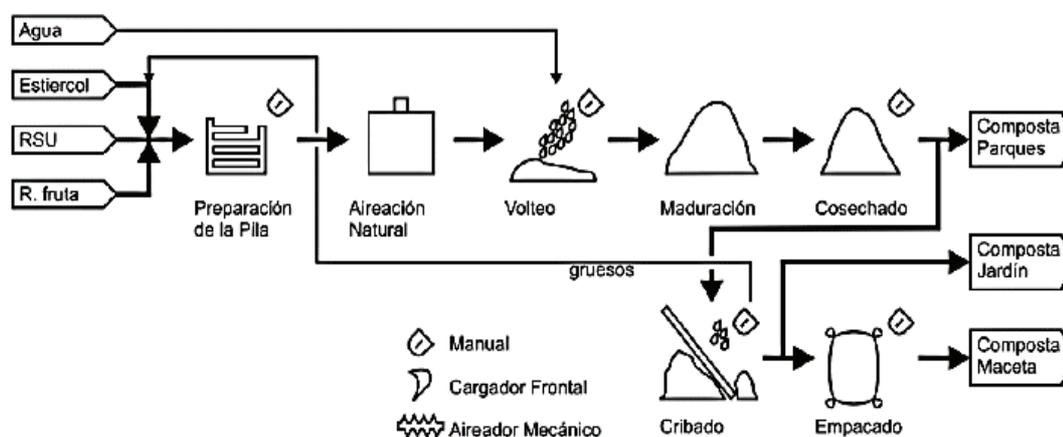


Figura 2. Diagrama de proceso de una pila de compostaje manual
Fuente: Rodríguez & Córdova, 2006.

Las operaciones unitarias de una planta de compostaje municipal son la separación de residuos, la reducción de tamaño (molienda), transporte, degradación, aireación, humectación, pasteurización, maduración, lombricompostaje, cribado (tamizado o cernido), secado y empacado

(Rodríguez & Córdova, 2006). Las plantas en el Ecuador, en su mayoría son de operación manual debido a sus bajos costos, el diseño de este tipo de plantas se muestra en la Figura 2.

Vermicompostaje

Los científicos han usado varios métodos para determinar el rol de los gusanos y otros invertebrados en la descomposición, por ejemplo en un experimento colocaron materia orgánica de peso conocido en una funda con huecos de diferentes tamaños dentro del suelo. Después de varios meses, determinaron el peso seco de las fundas y encontraron que existía mayor degradación en las fundas que tenían huecos lo suficientemente grandes como para permitir el paso de gusanos (Trautmann & Krasny, 1997).

En el vermicompostaje, el protagonista es la lombriz, que se encuentra en la parte superior orgánica del suelo. Entre las especies más usadas se encuentra *Eisenia foetida* o lombriz californiana que está distribuida a escala global. Las reacciones que se llevan a cabo son procesos de bioxidación (con la ayuda de la microorganismos que habitan en el interior del tracto digestivo de la lombriz) que acondicionan y mejoran las propiedades del producto final, debido a la fragmentación los compuestos orgánicos (Trujillo & Ortiz, 2009). Además, producen microtúneles que aumentan la aireación y humectación.

En la lombricultura no existe un aumento excesivo de temperatura, por lo que varios lugares recomiendan usar primero el compostaje y, para mejorar el producto, el vermicompostaje. Si el compost se calienta, los invertebrados entran a una fase dormante o se mueven a la periferia donde las temperaturas son menores (Trautmann & Krasny, 1997). La excreta de las lombrices contiene mayor cantidad de nutrientes (Rodríguez & Córdova, 2006). Tanto el vermicompostaje como el compostaje degradan la materia orgánica produciendo compuestos estables y fragmentados de fácil asimilación para la planta.

1.5.2 Compost y vermicompost

El compost y vermicompost debe cumplir con las siguientes características para poder ser usado como enmienda del suelo (Espinosa, 2011) :

- Poca cantidad de sustancias contaminantes.
- Valor nutricional adecuado.
- Relación C:N entre 12 y 8, aunque depende de la materia prima. Si C/N es inferior al límite significa que la composta se ha mineralizado excesivamente y si C/N es mayor puede indicar que aún falta degradación.
- Madurez: no debe existir degradación, color oscuro y olor a tierra.
- Humedad favorable para los procesos de solubilidad y crecimiento microbiológico.
- Ausencia de bacterias patógenas: *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*.
- Ausencia de partículas extrañas (vidrio, plástico, metal).

Adicionalmente, el compost a partir de residuos sólidos urbanos orgánicos debe cumplir con requisitos fisicoquímicos y sanitarios como los especificados en normas internacionales, la NTEA-006-SMA-2006 de México, NTC 5167 de Colombia, TAS 9503 (Thai Agricultural Standard) de Tailandia, EPA 2003, NCh2880 de Chile, Real Decreto 824/2005 de España aplicado en la Unión Europea (Anexo 1).

Ventajas

Permite la eliminación y el reciclado de diferentes residuos, con el aumento de la vida útil de los rellenos sanitarios y la obtención de un producto para uso agrícola. Es un mejorador de suelos por lo que ocasiona (Espinosa, 2011):

- *Acondicionamiento del suelo*: Reponen la materia orgánica del suelo para asegurar la fertilidad.

- *Mejora de las propiedades físicas del suelo:* Aumentan la conductividad eléctrica, la permeabilidad hídrica y gaseosa, la capacidad de retención hídrica mediante la formación de agregados.
- *Mejora de las propiedades químicas:* Aporta macronutrientes N,P,K y micronutrientes, mejora la capacidad de intercambio de cationes, por lo que favorece al almacenamiento de nutrientes y su disponibilidad para las plantas.
- *Mejora de la actividad biológica:* Aumentan la cantidad de carbono y nitrógeno disponible (Le Blanc, 2000); por lo que estimula a los microorganismos del suelo. Al tener una población microbiana activa el suelo puede considerarse fértil.

Desventajas

La cantidad de compost que debe utilizarse es superior en comparación con los fertilizantes químicos, debido a que el compost posee una lenta liberación de nutrientes que debe mineralizarse para ser asimilados por las plantas (Espinosa, 2011). Adicionalmente, los abonos orgánicos que no se manejan adecuadamente o incumplen las normas pueden generar efectos nocivos sobre el suelo (Raggi, 1990) y el agricultor, a consecuencia de la presencia de microorganismos patógenos o metales pesados que se pueden bioacumular en las leguminosas.

1.5.3 Microorganismos patógenos: Enterobacteriaceae

En los últimos años, han aumentado los brotes de enfermedades producidas por patógenos que se transmiten a través de productos vegetales frescos (Miller, Heringa, Kim, & Jiang, 2013) como la lechuga, el tomate, el melón y la espinaca. Desde 1998 al 2007, los productos frescos fueron asociados con el 14,8% de brotes (CSPI, 2009). La mayor parte de los patógenos bacterianos son parte de la familia *Enterobacteriaceae*.

En la familia *Enterobacteriaceae* se incluyen géneros como *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersenia*, *Citrobacter*, *Serratia*, entre otros. La mayoría de microorganismos fermentan la glucosa, son oxidasa negativos,

crecen fácilmente en agar McConkey, rara la vez oxidan los nitratos a nitritos. Todos los miembros producen catalasa, a excepción de *Shigella dysenteriae* tipo I (Forbes, Samon, & Weissfeld, 2009).

1.5.2.1 *Escherichia, Shigella y Salmonella*

Las especies de los tres géneros mencionados, son bacilos gram negativos, crecen fácilmente en agar McConkey. Algunos microorganismos son móviles (flagelos peritricos) y otros como *Shigella* spp., algunas especies de *Escherichia* y *Salmonella* son no mótils. Todos fermentan D-glucosa; las cepas de *Escherichia* y *Salmonella* suelen producir gas.

Las coliformes fecales como *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. son indicadores útiles de la higiene del compost (Elving, Ottoson, B, & Albiñ, 2009). Los tres géneros son frecuentes en el intestino de humanos y animales. Debido a que, *E. coli* es ubicuo en las heces de animales y humanos, se considera como un indicador de contaminación fecal. Algunas especies o serotipos son aislados principalmente de seres humanos (todas las especies de *Shigella* y *Salmonella* serotipo *typhi*), otros son extremadamente asociados a animales (*Salmonella* serotipo *gallinarum* y *Salmonella* serotipo *marina*). Las cepas de *Salmonella* pueden sobrevivir por largos periodos (incluso años) en el medio ambiental (Nataro, Bopp, Fields, Kaper, & Strockbine, 2007), por lo que pueden habitar en una amplia variedad de nichos, desde el tracto digestivo hasta diversos sitios ambientales.

Los miembros clínicamente importantes se dividen en dos grandes grupos: los patógenos oportunistas y los patógenos manifiestos. Los patógenos oportunistas más frecuentes son especies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Serratia*. Los patógenos manifiestos son *Salmonella typhi*, las especies de *Shigella* y *Y. pestis*. Adicionalmente, a *E. coli* se le clasifica entre patógeno oportunista y manifiesto, a pesar de ser parte de la flora normal del intestino (Forbes, Samon, & Weissfeld, 2009).

1.5.2.1.1 *Escherichia coli*

E. coli habita normalmente en la flora del intestino de los seres humanos y otros animales, también en el aparato genital femenino. Tiene diversos modos de transmisión que varían con el tipo de infección: en caso de infecciones no gastrointestinales, pueden ser organismos endógenos o diseminarse de persona a persona. En infecciones gastrointestinales, el modo de transmisión varía con el tipo de *E. coli*, involucra la diseminación fecal-oral entre seres humanos a través de agua o alimentos contaminados o consumo de carne mal cocida o leche de ganado bovino colonizado (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2014).

Los tipos de *Escherichia coli* y las enfermedades que causan según Bailey & Scott (2009) son:

- ***Escherichia coli* (como causa de infecciones extraintestinales):** causa infecciones urinarias, bacteriemia, infecciones nosocomiales en varios sitios del cuerpo.
- ***E. coli* enterotoxigénica (ETEC):** provoca diarrea del viajero y de la infancia.
- ***E. coli* enteroinvasora (EIEC):** ocasiona disentería (necrosis, ulceración e inflamación del intestino grueso).
- ***E. coli* enteropatógena (EPEC):** diarrea en lactantes en países pobres o en vías de desarrollo; diarrea crónica.
- ***E. coli* enterohemorrágica (EHEC):** origina una inflamación y sangrado de la mucosa del intestino grueso, síndrome urémico hemolítico
- ***E. coli* enteroagregativa (EAEC):** produce diarrea acuosa (puede ser prolongada).

1.5.3.1.1 Especies de *Shigella*

No forman parte de la flora intestinal normal, solo se encuentran en los seres humanos durante una infección. La diseminación es interpersonal por vía fecal-oral. En general provoca disentería (colitis inflamatoria aguda),

diarrea sanguinolenta. Las infecciones por *S. sonnei* pueden producir sólo diarrea acuosa (Ausina & Moreno, 2006).

1.5.3.1.2 Especies de *Salmonella*

Se encuentran ampliamente diseminadas por la naturaleza y asociadas a diversos animales. En el caso de *Salmonella typhi* y *paratyphi*, sólo se encuentran en los seres humanos durante una infección, no forman parte de la flora intestinal normal. Se transmiten por la ingestión de productos alimenticios contaminados provenientes de animales (generalmente de aves o derivados lácteos) o por transmisión interpersonal directa por vía fecal-oral (Forbes, Samon, & Weissfeld, 2009).

Según Bailey & Scott (2009) se dividen en tres categorías generales de infección

1. Gastroenteritis y diarrea causadas por una amplia variedad de serotipos que producen infecciones limitadas a la mucosa y la submucosa del tubo digestivo (*S. typhimurium* y *S. enteritidis*).
2. Bacteriemia e infecciones extraintestinales (*S. choleraesuis* o *S. dublin*, entre otras).
3. Fiebre entérica (fiebre tifoidea) causado por *S. typhi* o *S. paratyphi*.

1.5.2.2 **Identificación de bacterias**

Para la diferenciación entre los distintos miembros de la familia Enterobacteriaceae y entre *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella*, se realizan un conjunto de pruebas morfológicas (tamaño, forma, borde, elevación de las colonias), tinción Gram y pruebas de cribado en agar diferencial (especialmente fermentación de lactosa) (Prats, 2005).

Para la identificación definitiva se realizan pruebas bioquímicas que permitan identificar enzimas y productos finales de rutas metabólicas de cada una de las colonias seleccionadas para la identificación, de manera que se genera un perfil bioquímico como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Perfil bioquímico de *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli*.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Shigella</i>	
			Grupo A, B, C	<i>S. sonnei</i>
CAT	+	+	+	+
OXI	-	-	-	-
TSI	A/A	K/A	K/A	K/A
GAS	+	+	-	-
H₂S	-	+	-	-
RM	+	+	+	+
VP	-	-	-	-
IND	+	-	+/-	-
CIT	-	+	-	-
PAD	-	-	-	-
URE	-	-	-	-
MOT	+	+	-	-
LIS	+	+	-	-
ARG	+/-	+/-	-	-
ORN	+/-	+	-	+
ONPG	+	-	-	+

Fuente: Koneman, Diagnóstico microbiológico (2008).

2 METODOLOGÍA

2.5 Participantes

El presente proyecto “Evaluación fisicoquímica e identificación de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* del vermicompost producido por el Gobierno Autónomo Descentralizado (GAD) de Pujilí en la provincia de Cotopaxi” fue financiado por el Laboratorio de Microbiología perteneciente al Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas – E.S.P.E. Ubicado en el Campus Politécnico de Sangolquí, con dirección Av. El Progreso s/n – vía Amaguaña.

De igual manera, los análisis fisicoquímicos fueron realizados en los Laboratorios de Suelos, Foliar y Agua en Agrocalidad, ubicado en la parroquia de Tumbaco, La Granja MAGAP en la Avenida Interoceánica Km. 141/2.

El director de tesis del presente trabajo fue el PhD. Andrés Ricardo Izquierdo Romero, de igual manera la codirectora de la tesis fue la MSc. Alma Rosel Koch Kaiser.

2.6 Zona de estudio

El abono recolectado fue obtenido del vivero municipal del GAD de Pujilí. En la parroquia y cantón Pujilí, ubicado en la región interandina del Ecuador, en la zona Centro – Occidental de la Provincia de Cotopaxi, a 10 Km al Oeste de la ciudad de Latacunga.

2.7 Periodo de tiempo de investigación

La investigación tuvo un tiempo de duración de 6 meses.

2.8 Diseño y análisis de datos

En los análisis fisicoquímicos se realizó un ANOVA, para determinar si existe una variación de los datos obtenidos en las tres muestras. Cada muestra fue considerada como un tratamiento y cada tratamiento tuvo tres repeticiones para los análisis fisicoquímicos y las pruebas de fitotoxicidad.

En los análisis microbiológicos de cada muestra se realizó dos diluciones con dos repeticiones. En este caso se utilizó una estadística descriptiva.

2.8.2 Variables de respuesta

Las variables de respuestas fisicoquímicas son humedad, pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, relación carbono-nitrógeno, fósforo, potasio, cobre, sodio, zinc, cadmio, cromo, plomo, níquel, arsénico e índice de germinación.

Las variables de respuesta microbiológicas son unidades formadoras de colonia de aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes y presencia/ausencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. en las muestras analizadas.

2.9 Procedimiento

2.9.2 Muestreo

El muestreo se realizó según la norma ISO/INEN 2859 (Tabla 2), a través de un muestreo aleatorio simple para la inspección normal. Se recolectaron muestras compuestas del producto final empacado.



Figura 3. Producto final empacado, cada saco con 85 lb de compost húmedo del GAD de Pujilí.

Tabla 2

Tamaño de la muestra de acuerdo al tamaño del lote.

Tamaño del lote (número de sacos)	Tamaño de la muestra
2 - 8	2
9 – 15	3
16- 25	5
26- 50	8
51 – 90	13
91 – 150	20
151 – 280	32
281 – 500	50
501 – 1200	80
1201 – 3200	125
3201 – 10000	200
10001 – 35000	315
35001 – 150000	500
150001 – 500000	800
Mayor a 500001	1250

Fuente: ISO/INEN 2859

El saco seleccionado al azar se orientó de forma horizontal y se introdujo un dispositivo muestreador en forma diagonal dentro de él, se recogió la submuestra y se la puso en un envase limpio y estéril. Se repitió la operación dos veces en diferentes sitios del mismo saco para obtener las diferentes submuestras. Este proceso se repitió para los otros sacos seleccionados.

Todas las submuestras se mezclaron y por cuarteo se obtuvo una muestra compuesta de 1,6 kg. Se destinó 1,5 kg para los análisis físicoquímicos y 100 g para los análisis microbiológicos, que fueron transportados en envases estériles a 4°C

Se recolectaron tres muestras compuestas de diferentes sacos siguiendo el procedimiento descrito.

Los análisis fisicoquímicos se realizaron con los respectivos ensayos específicos de Agrocalidad, que por motivos de confidencialidad no pueden ser detallados.

2.9.3 Densidad aparente

PEE/Determinación de densidad aparente en suelos/2015/Rev. 2.

2.9.4 Humedad gravimétrica

PEE/Determinación de humedad gravimétrica en suelos/2015/Rev. 2.

2.9.5 Preparación de las muestras para los análisis fisicoquímicos

PEE/Preparación de muestras de suelos/2015/Rev. 2.

2.9.6 pH

PEE/Determinación de pH en suelos/2015/Rev. 2.

2.9.7 Conductividad Eléctrica

PEE/Determinación de la Conductividad Eléctrica en suelos/2015/Rev. 2.

2.9.8 Carbono Orgánico y Materia Orgánica

PEE/Determinación de Materia Orgánica (Método Walkey-Black) y Carbono Orgánico en suelos/2015/Rev. 2.

2.9.9 Capacidad de intercambio catiónico

PEE/Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico (Método del Cloruro de Bario) en suelos/2015/Rev. 2.

2.9.10 Nitrógeno

PEE/Determinación de Nitrógeno Total (Método Dumas)/2015/Rev. 2.

2.9.11 Relación Carbono-Nitrógeno

Se dividió el porcentaje de carbono para el porcentaje de nitrógeno.

2.9.12 Fósforo

PEE/Determinación de Fósforo Foliar/2015/Rev. 2.

2.9.13 Cobre, Potasio, Zinc

El análisis se basó en el método 3050 B (EPA, 2007) para espectrofotometría de absorción atómica con modificaciones.

PEE/Determinación de Macro y Micronutrientes Foliare/2015/Rev. 2.

2.9.14 Cadmio y Plomo

Para el análisis de metales pesados como Cd, Cr, Pb y Ni, se utilizó la metodología 3050 B (EPA, 2007) modificada.

PEE/Determinación de Cadmio y Plomo en suelos /2015/Rev. 2.

2.10 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos (en placa)

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se procedió según la norma NTE INEN 1 529-5:2006, donde se utilizaron cinco diluciones seriadas. Se pesaron 10 g de abono y se colocaron en 90 mL de solución salina al 9% (10^{-1}), de la solución se tomó 1 mL y se colocó en 9 mL de solución salina al 9% (10^{-2}) y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10^{-5} .

Se realizaron dos duplicados por cada dilución, donde se puso 1 mL de la dilución correspondiente en una caja Petri estéril, previamente rotulada y luego se cubrió con medio PCA. Se mezcló con cuidado el PCA y la muestra con un movimiento circular.

Se incubaron las placas a 37°C, durante 24 a 72 h. Se contaron las placas que contenían entre 30 y 300 colonias (Figura 4). Se hizo un promedio de los resultados obtenidos, tomando en cuenta el factor de dilución.

En caso de dos diluciones sucesivas, se expresó el resultado como una media pondera de las dos diluciones:

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0.1n_2)d}$$

Donde:

$\sum c$ = Suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas;

V= Volumen inoculado en cada caja Petri;

n_1 = Número de placas de la primera dilución seleccionada;

n_2 = Número de placas de la segunda dilución seleccionada;

d = Factor de dilución de la primera dilución seleccionada.



Figura 4. Conteo de microorganismos aerobios mesófilos en PCA de tres muestras de vermicompost de Pujilí.

2.11 Recuento de enterobacterias y *Escherichia coli* (Petrifilm)

Para cada muestra, se colocó 1 mL de la dilución 10^{-2} en el Petrifilm para Enterobacteriaceae y *Escherichia coli* (Figura 5). Se incubaron durante 24 a 72 horas a 37°C .

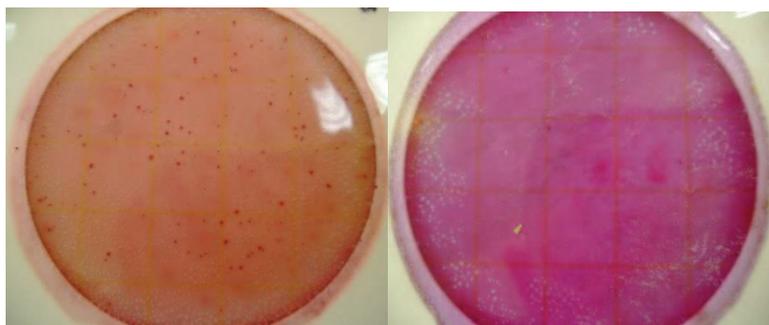


Figura 5. Conteo de enterobacterias (izquierda) y *Escherichia coli* (derecha) en Petrifilm.

2.12 Identificación de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*.

Se realizó una fase de pre-enriquecimiento, 10 g de muestra en 90 mL de agua peptona (Figura 6). Luego, se incubó a 37°C por 24 h (WHO, 2010).



Figura 6. Pre-enriquecimiento de muestras de vermicompost en agua peptona.

2.12.2 Aislamiento *Escherichia coli*.

Se colocaron 5 mL del agua peptona en 50 mL de caldo EC y se incubaron durante 24 h a 37°C. Luego, se realizó un estriado en medio EMB y McConkey por duplicado (Figura 7), las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h. En agar McConkey las colonias de *E.coli* son rojas a rosadas y en EMB son colonias azuladas a negras con brillo verde metálico (Rivas, Leotta, & Chinen, 2008).



Figura 7. Crecimiento en caldo EC (izquierda) y estriado en McConkey (derecha).

Se pasaron a cajas de agar nutriente las colonias sospechosas de ser *E. coli* y se incubaron a 37°C durante 24 h. Se realizó una tinción Gram para verificar la pureza del cultivo (Figura 8), en caso contrario se realizaba el aislamiento en agar nutriente a partir de una sola colonia (RENALOA, 2011).

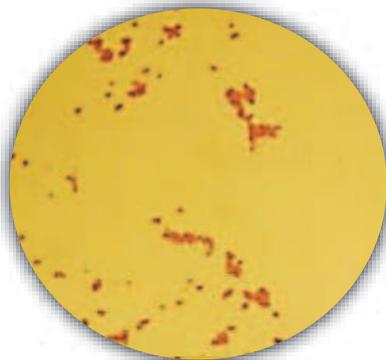


Figura 8. Tinción Gram para colonias sospechosas de *Escherichia coli* (100x).

2.12.3 Aislamiento *Salmonella*.

Se colocaron 5 mL del agua peptona en 50 mL de caldo tetrionato y se incubaron durante 8 h a 37°C (Figura 9). Luego, se realizó un estriado en agar SS, XLD y HEK por duplicado, las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h. En agar SS las colonias de *Salmonella* son incoloras con centro negro, en XLD son colonias rojas con centro negro y en HEK son colonias verde-azuladas, con o sin centro negro (Caffer, Terragno, & Binsztein, 2008; WHO, 2010).



Figura 9. Crecimiento de microorganismos en caldo tetrionato a las 8h de incubación.

Se pasaron a cajas de agar nutriente las colonias sospechosas de ser *Salmonella* y se incubaron a 37°C durante 24 h. Se realizó una tinción Gram para verificar la pureza del cultivo, en caso contrario se realizaba el aislamiento en agar nutriente a partir de una sola colonia (Caffer, Terragno, & Binsztein, 2008; WHO, 2010).

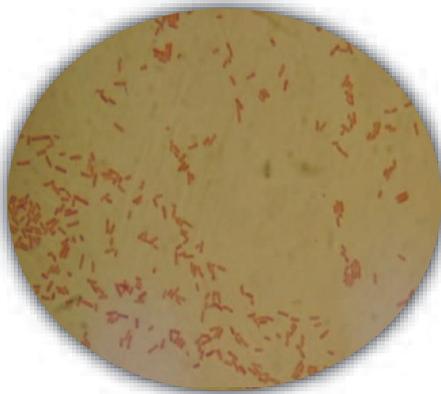


Figura 10. Tinción Gram para colonias sospechosas de *Salmonella* (100x).

2.12.4 Aislamiento *Shigella* spp.

Se colocaron 5 mL del agua peptona en 50 mL de caldo Gram negativo, se incubaron durante 24 h a 37°C (Figura 11). Luego, se realizó un estriado en agar SS, XLD y HEK por duplicado, las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h. En agar SS son colonias translúcidas, ligeramente rosadas, a veces con un centro más oscuro, en agar XLD son colonias translúcidas con un tono rojizo y en HEK, las colonias son verdes, elevadas, húmedas (Terragno, Caffer, & Binsztein, 2007; WHO, 2010).



Figura 11. Crecimiento de microorganismos en caldo tetrionato a las 24h de incubación.

Se pasaron a cajas de agar nutriente las colonias sospechosas de ser *Shigella* y se incubaron a 37°C durante 24 h. Se realizó una tinción Gram para verificar la pureza del cultivo (Figura 12), en caso contrario se realizaba el aislamiento en agar nutriente a partir de una sola colonia (Terragno, Caffer, & Binsztein, 2007; WHO, 2010).

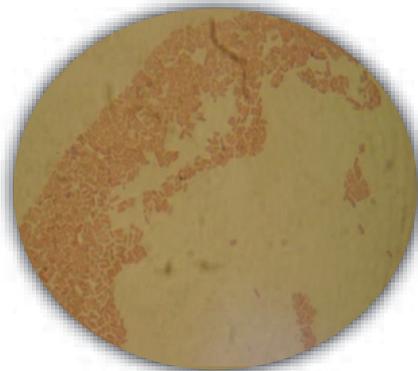


Figura 12. Tinción Gram para colonias sospechosas de *Shigella* (100x).

Las colonias sospechosas se analizaron con un perfil bioquímico con las siguientes pruebas: oxidasa, catalasa, FTM, MRVP, TSI, citrato, urea, SIM, MIO, arginina dihidrolasa, ornitina descarboxilasa, fenilalanina desaminasa, utilización de acetato. En el caso de *Escherichia coli* se adicionaron las pruebas de lipasa y licuefacción de gelatina.

Para confirmar los resultados obtenidos, se inocularon las colonias sospechosas en el Kit de pruebas confirmativas API 50 CHB/E Medium, *Enterobacteriaceae*; se incubó durante 24 a 48 h a 36°C. Se leyó las galerías a las 24 y 48 horas de incubación y se comparó con el perfil bioquímico obtenido con la base de datos del manual API 50 CHB/E.

2.13 Pruebas de fitotoxicidad

Se preparó un extracto 1:5, abono orgánico y agua destilada, 10 g de abono en 50 mL de agua destilada. Se agitó la mezcla por 20 min, luego se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se filtró el sobrenadante. Se colocaron 10 mL del extracto en las cajas Petri con papel filtro con 20 semillas de rábano (se utilizaron tres repeticiones para cada muestra). Las semillas de rábano poseían una pureza del 99% y un porcentaje de germinación del 85%. El testigo (por triplicado) contuvo 10 mL de agua destilada con las 20 semillas. Se incubaron a 25°C en oscuridad, durante cinco días (LIFE, 2008). Se midió la germinación y la elongación de la radícula al quinto día (Figura 13). Se obtuvieron los cálculos de la siguiente manera:

$$PGR = \frac{\text{No. de semillas germinadas en el extracto}}{\text{No. de semillas germinadas en el testigo}} \times 100$$

$$CRR = \frac{\text{Elongación de radícula en el extracto}}{\text{Elongación de radícula en el testigo}} \times 100$$

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

Donde:

PGR: Porcentaje de germinación relativo;

CRR: Crecimiento de radícula relativo;

IG: Índice de germinación.



Figura 13. Ensayo de fitotoxicidad con semillas de rábano al quinto día.

3 RESULTADOS

3.5 Muestreo

El municipio de Pujilí tenía en su almacenamiento alrededor de 154 sacos (de 85 lb). Se obtuvieron tres muestras compuestas, cada muestra conformada por submuestras de 32 sacos al azar según la metodología de la Tabla 2.

3.6 Análisis microbiológicos

3.6.2 Microorganismos aerobios mesófilos

Existe presencia de microorganismos aerobios mesófilos, en la Tabla 3 se muestran los conteos realizados en recuento por placas.

Tabla 3

Recuento de microorganismos aerobios mesófilos de tres muestras de vermicompost de Pujilí.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Número total (UFC/g)	3,02x 10 ⁵	2,38x 10 ⁵	1,41 x 10 ⁵
(Miller, <i>et al.</i> , 2013)	10 ³ -10 ⁹ UFC/g	10 ³ -10 ⁹ UFC/g	10 ³ -10 ⁹ UFC/g

Rep.: Repetición.

La norma NTC 5167 indica que se deben declarar los microorganismos aerobios mesófilos presentes en el abono para evaluar el contenido de microorganismos benéficos. En el vermicompost de Pujilí el promedio de las tres muestras es de 2,27 x 10⁵ UFC/g. Adicionalmente, la cantidad de bacterias benéficas es de 2,24 x 10⁵ UFC/g en el abono.

3.6.3 Enterobacterias

Existe presencia de Enterobacteriaceae. El contenido de bacterias de las tres muestras analizadas en promedio fue de 2,9 x 10³ UFC/g en el abono orgánico del GAD de Pujilí.

3.6.4 *Salmonella* spp.

Después de la fase de enriquecimiento selectivo, las muestras se colocaron en agares selectivos para elegir las colonias que presentaron

características presuntivas de *Salmonella* spp. como se muestra en la Tabla 4 y en la Figura 14.

Tabla 4

Características de las colonias en medio SS, HEK, y XLD a las 24 h para *Salmonella*.

Medios	SS	HEK	XLD
Muestra 1	Colonias incoloras (Lac-) Centro negro (H ₂ S +)	Colonias verde-azuladas (Lac -) Centro negro (H ₂ S +)	-
Muestra 2	Colonias incoloras (Lac-) Centro negro (H ₂ S +)	-	Colonias rojas (Lac -) Centro negro (H ₂ S +)
Muestra 3	Colonias incoloras (Lac-) Centro negro (H ₂ S +)	Colonias verde-azuladas (Lac -) Centro negro (H ₂ S +)	-
Salmonella	Colonias incoloras (Lac-) Centro negro (H ₂ S +)	Colonias verde-azuladas (Lac -) Centro negro (H ₂ S +)	Colonias rojas (Lac -) Centro negro (H ₂ S +)

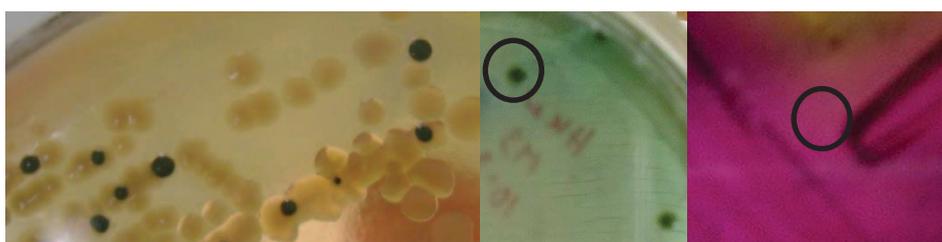


Figura 14. Características morfológicas de colonias presuntivas de *Salmonella* spp. en agares selectivos SS, HEK y XLD.

De todas las colonias descritas se eligieron tres colonias que se encontraban puras y se anotaron las características morfológicas Tabla 5.

Tabla 5

Morfología de las tres colonias seleccionadas para *Salmonella*.

Característica	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3	<i>Salmonella</i>
Medio de aislamiento	SS	SS	SS	SS
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular
Borde	Entero	Entero	Entero	Entero
Elevación	Convexo	Convexo	Convexo	Convexo
Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Color	SS	SS	SS	SS
Tinción Gram	-	-	-	-

Las tres colonias seleccionadas pasaron a través de varias pruebas bioquímicas, los resultados se muestran en la Tabla 6.

Los resultados comparados con la clave de Koneman, *et al.* (2008) muestran que es probable que las Colonia 1 y Colonia 3 sean un tipo *Salmonella* sp. o un tipo de *Citrobacter* sp.

Tabla 6

Resultados de las tres colonias seleccionadas para *Salmonella*.

Prueba	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3	<i>Salmonella</i> (Koneman, 2008)
<i>Catalasa</i>	+	+	+	+
<i>Oxidasa</i>	-	-	-	-
<i>TSI</i>	K/A	A/A	K/A	K/A
<i>H₂S</i>	+	+	+	+
<i>Gas</i>	+	+	+	+
<i>FTM</i>	AF	AF	AF	AF
<i>Indol</i>	-	-	-	-
<i>Rojo de metilo (MR)</i>	+	+	+	+
<i>Voges-Proskauer (VP)</i>	-	-	-	-
<i>Citrato (Simmons)</i>	+	+	+	+
<i>Arginina dihidrolasa</i>	+	+	+	+/-
<i>Ureasa</i>	-	-	-	-
<i>Fenilalanina desaminasa</i>	-	-	-	-
<i>Utilización de acetato</i>	-	-	-	-
<i>Movilidad</i>	+	+	+	+

AF: Anaerobio facultativo, K/A: pico alcalino y fondo ácido, A/A: pico ácido y fondo ácido.

Para comprobar los resultados bioquímicos se realizó la prueba API para la Colonia 1 (Figura 15 y Tabla 7), que demuestra la presencia de *Citrobacter youngae* (3604512).

Tabla 7

Resultados para colonia sospechosa de *Salmonella* en API 20E (*Citrobacter youngae*).

O	A	L	O	C	H	U	T	I	V	G	G	M	I	S	R	S	M	A	A
N	D	D	D	I	2	R	D	N	P	E	L	A	N	O	H	A	E	M	R
P	H	C	C	T	S	E	A	D		L	U	N	O	R	A	C	L	Y	A
G																			
+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+

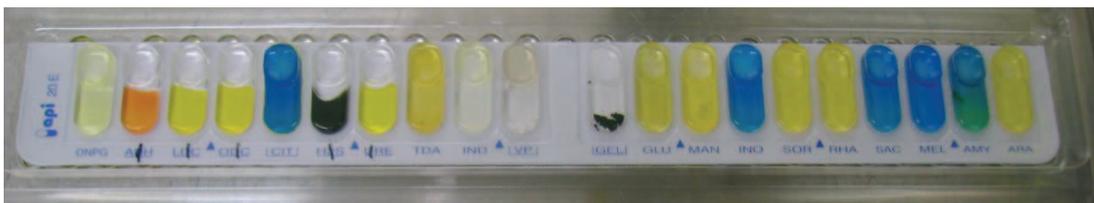


Figura 15. Resultados para colonia sospechosa de *Salmonella* en API 20E (*Citrobacter youngae*).

3.6.5 *Shigella* spp.

Después de la fase de enriquecimiento selectivo con caldo Gram negativo, las muestras se colocaron en agares selectivos para elegir las colonias que presentaron características presuntivas de ser *Shigella* spp. como se muestra en la Tabla 8 y en la Figura 16.

Tabla 8

Características de las colonias en medio SS, HEK, y XLD a las 24 h para *Shigella*.

Medios	SS	HEK	XLD
Muestra 1	Colonias incoloras (Lac-)	Colonias verde-azuladas (Lac -)	-
Muestra 2	Colonias incoloras (Lac-)	-	-
Muestra 3	Colonias incoloras (Lac-)	Colonias verde-azuladas (Lac -)	-
<i>Shigella</i>	Colonias incoloras (Lac-)	Colonias verdes (Lac -)	Colonias incoloras, ligeramente rojizas (Lac-)

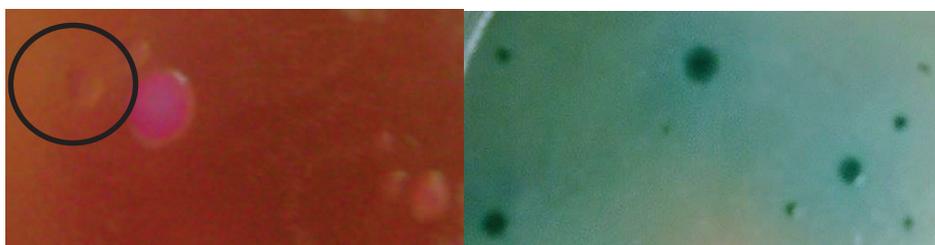


Figura 16. Características morfológicas de colonias presuntivas de *Shigella* en agares selectivos SS, HEK y XLD.

De todas las colonias descritas anteriormente se eligieron tres colonias que se encontraban puras y se anotaron las características morfológicas Tabla 9.

Tabla 9Morfología de las tres colonias seleccionadas para *Shigella*.

Característica	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3	<i>Shigella</i>
Medio de aislamiento	SS	HEK	SS	SS
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular
Borde	Entero	Entero	Entero	Entero
Elevación	Convexo	Convexo	Convexo	Convexo
Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Color	Transparente	Verde-azulada	Transparente	Transparente
Tinción Gram	-	-	-	-

Las tres colonias seleccionadas pasaron a través de varias pruebas bioquímicas, los resultados se muestran en la Tabla 10.

Ninguna de las tres colonias pueden ser de *Shigella* spp, debido a la presencia de motilidad y la alta actividad bioquímica que presenta las colonias. Se presume la presencia de una especie del género *Serratia*.

Tabla 10Resultados de las tres colonias seleccionadas para *Shigella*.

Prueba	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3	<i>Shigella</i> (Koneman, 2008)
<i>Catalasa</i>	+	+	+	+
<i>Oxidasa</i>	-	-	-	-
<i>TSI</i>	A/A	A/A	A/A	K/A
<i>H₂S</i>	-	-	-	-
<i>FTM</i>	AF	AF	AF	AF
<i>Indol</i>	-	-	-	-
<i>Rojo de metilo (MR)</i>	+	+	+	+
<i>Voges-Proskauer (VP)</i>	-	-	-	-
<i>Citrato (Simmons)</i>	+	+	+	-
<i>Arginina dihidrolasa</i>	+	+	+	-
<i>Ornitina descarboxilasa</i>	+	+	+	+/-
<i>Ureasa</i>	-	-	-	-
<i>Fenilalanina desaminasa</i>	-	-	-	-
<i>Utilización de acetato</i>	-	+	-	-
<i>Movilidad</i>	+	+	+	-

AF: Anaerobio facultativo, A/A: pico ácido y fondo ácido

3.6.6 *Escherichia coli*

Después de la fase de enriquecimiento selectivo con caldo EC, las muestras se colocaron en agares selectivos para elegir las colonias que presentaron características presuntivas de ser *Escherichia coli* como se muestra en la Tabla 11 y en la Figura 17.

Tabla 11

Características de las colonias en medio MCK y EMB a las 24 h para *Escherichia coli*.

Medios	MCK	EMB
Muestra 1	Colonias rosadas (Lac+) con precipitación biliar	Colonias oscuras (Lac +)
Muestra 2	Colonias rosadas (Lac+) con precipitación biliar	Colonias oscuras (Lac +) con brillo metálico
Muestra 3	Colonias rosadas (Lac+) con precipitación biliar	Colonias oscuras (Lac +) con brillo metálico
<i>Escherichia coli</i>	Colonias rosadas (Lac+) con precipitación biliar	Colonias oscuras (Lac +) con brillo metálico

De todas las colonias descritas anteriormente se eligieron tres colonias que se encontraban puras y se anotaron las características morfológicas Tabla 12.

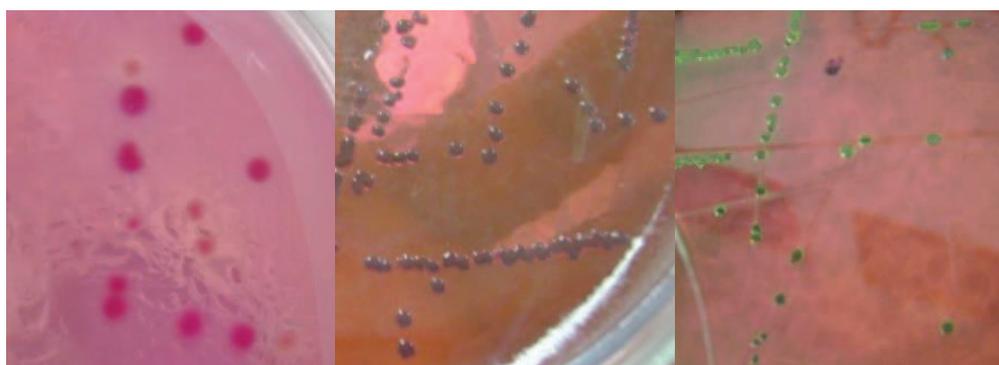


Figura 17. Características morfológicas de colonias presuntivas de *Escherichia coli* en agares selectivos MCK y EMB.

Tabla 12

Morfología de las tres colonias seleccionadas para *Escherichia coli*.

Característica	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3	<i>Escherichia coli</i>
Medio de aislamiento	EMB	EMB	EMB	EMB
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular
Borde	Entero	Entero	Entero	Entero
Elevación	Convexo	Convexo	Convexo	Convexo
Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Color	Negro con brillo verde metálico			
Tinción Gram	-	-	-	-

Las tres colonias seleccionadas pasaron a través de varias pruebas bioquímicas, los resultados se muestran en la Tabla 13.

Las tres colonias son muy probables de ser *Escherichia coli*.

Tabla 13

Resultados de las tres colonias seleccionadas para *Escherichia coli*.

Prueba	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3	<i>Escherichia coli</i> (Konemam, 2008)
<i>Catalasa</i>	+	+	+	+
<i>Oxidasa</i>	-	-	-	-
<i>TSI</i>	A/A	A/A	A/A	A/A
<i>H₂S</i>	-	-	-	-
<i>FTM</i>	AF	AF	AF	AF
<i>Indol</i>	+	+	+	+
<i>Rojo de metilo (MR)</i>	+	+	+	+
<i>Voges-Proskauer (VP)</i>	-	-	-	-
<i>Citrato (Simmons)</i>	-	-	-	-
<i>Arginina dihidrolasa</i>	-	-	-	+/-
<i>Ornitina descarboxilasa</i>	+	+	+	+/-
<i>Ureasa</i>	-	-	-	-
<i>Fenilalanina desaminasa</i>	-	-	-	-
<i>Utilización de acetato</i>	+	+	+	+
<i>Licuefacción de la gelatina</i>	-	-	-	-
<i>Lipasa</i>	-	-	-	-
<i>Movilidad</i>	+	+	+	+

Los resultados de confirmación del API para la primera colonia se muestran en la Figura 18 y Tabla 14. Con el código octal: 5144572, que confirma la sospecha de presencia de *Escherichia coli*.

Tabla 14

Resultados para colonia sospechosa de *Escherichia coli* en API 20E.

O	A	L	O	C	H	U	T	I	V	G	G	M	I	S	R	S	M	A	A	
N	D	D	D	I	2	R	D	N	P	E	L	A	N	O	H	A	E	M	R	
P	H	C	C	T	S	E	A	D		L	U	N	O	R	A	C	L	Y	A	
G																				
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	



Figura 18. Resultados para colonia sospechosa de *Escherichia coli* en API 20E.

Adicional a la identificación, se realizó un conteo de *Escherichia coli* en las tres muestras de vermicompost a través del método de Petrifilm (Tabla 15). En promedio se obtuvieron 800 UFC/g de abono.

Tabla 15

Recuento de *Escherichia coli* por Petrifilm.

Muestras	UFC/g	EPA
Muestra 1	4×10^2	$< 10^3$ UFC/g
Muestra 2	$1,1 \times 10^3$	$< 10^3$ UFC/g
Muestra 3	9×10^2	$< 10^3$ UFC/g

3.7 Análisis fisicoquímicos

Los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados en las tres muestras se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16

Resultados de los análisis fisicoquímicos en las tres muestras de abono orgánico de Pujilí.

Característica	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio
<i>pH</i>	5.93	6.12	5.82	5.96
<i>Densidad aparente (g/cm³)</i>	1.34	1.58	1.65	1.52
<i>Humedad (p/p)</i>	20.6%	12.3%	19.6%	17.5%
<i>Conductividad eléctrica (dS/m)</i>	5.01	4.13	4.47	4.54
<i>Materia orgánica (p/p)</i>	22.47%	19.01%	16.09%	19.19%
<i>Carbono orgánico oxidable (p/p)</i>	13.03%	11.02%	9.33%	11.13%
<i>Nitrógeno Total (p/p)</i>	0.886%	0.894%	0.630%	0,80%
<i>Relación C/N</i>	14,71	12,33	14,81	13,95
<i>Fósforo (p/p)</i>	0,59%	0,68%	0,51%	0,595%
<i>Potasio (p/p)</i>	0,18%	0,18%	0,10%	0,16%
<i>Cadmio (ppm)</i>	1,11	0,74	0,55	0,8
<i>Cobre (ppm)</i>	0,26	0,28	0,28	0,27
<i>Plomo (ppm)</i>	5,36	5,59	4,86	5,27
<i>Zinc (ppm)</i>	0,76	0,70	0,60	0,69
<i>CIC* (meq./100 g)</i>	145,5	132,5	82,5	120,17

3.8 Prueba de fitotoxicidad

La prueba de fitotoxicidad fue medida a los cinco días con cada uno de los extractos en semillas de *Raphanus sativus* (Figura 19), los datos se muestran en la Tabla 17.



Figura 19. Ensayo fitotoxicidad. Izquierda: Semillas al inicio del ensayo. Derecha: Semillas a los cinco días del ensayo.

Tabla 17

Porcentaje de germinación, Crecimiento de la radícula relativo e Índice de germinación de las tres muestras del vermicompost de Pujilí.

Muestras	Repetición	PGR	CRR	IG
Muestra 1	1	100,00	85,30	85,30
	2	100,00	100,00	100,00
	3	90,00	77,87	70,08
Muestra 2	1	100,00	81,80	81,80
	2	95,00	85,59	81,31
	3	100,00	86,03	86,03
Muestra 3	1	100,00	88,65	88,65
	2	100,00	94,32	94,32
	3	95,00	92,77	88,13

Con los datos obtenidos de IG, se realizó un ANOVA y se obtuvo un valor p de 0,6147 (Tabla 18); por lo que no existe variación en el IG (86,18%) de las tres muestras. Debido a que el compost no contiene sustancias fitotóxicas posee un IG mayor al 80%.

Tabla 18

Análisis de la varianza del Índice de Germinación de tres muestras de vermicompost de Pujilí.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	9	0,15	0,00	10,43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	85,37	2	42,68	0,53	0,6147
Columna1	85,37	2	42,68	0,53	0,6147
Error	484,70	6	80,78		
Total	570,06	8			

3.9 Comparación las normativas internacionales

Se compararon los resultados con las diferentes normativas internacionales, en base a la cantidad de parámetros cumplidos por cada norma. En la Tabla 19 se muestra el porcentaje de cumplimiento de cada una de las muestras analizadas.

Tabla 19

Porcentaje de cumplimiento del vermicompost de Pujilí con respecto a las diferentes normativas internacionales.

Normativa	Vermicompost de Pujilí
NTEA-006-SMA-2006	62,5%
NTC 5167	77,77%
EPA 2003	54,54%
NCh2880	75%
Real Decreto 824/2005	57,14%

4 DISCUSIÓN

El vermicompost de Pujilí posee una carga bacteriana de aerobios mesófilos de $2,27 \times 10^5$ UFC/g y la población de enterobacterias en el estudio fue de $5,2 \times 10^3$ UFC/g. Se encontró que la variación de la carga de microorganismos aerobios mesófilos en abonos orgánicos oscila entre 3 a 9 log CFU/g (para vermicompost de 5.28 log CFU/g) y de enterobacterias entre <1 a 7 log CFU/g (para vermicompost de 3.35 log CFU/g) (Miller, Heringa, Kim, & Jiang, 2013). Los resultados muestran una concentración media baja para el vermicompost analizado y similar a otros estudios realizados.

El vermicompost de Pujilí presenta *E. coli*, con un contenido de coliformes de 800 NMP/g, contenido que se encuentra dentro del límite establecido por la EPA, la norma chilena y mexicana (1000 MNP/g). Un estudio en Estados Unidos analizó 94 composts orgánicos comerciales en Washington, Oregon y California; se encontró que el 23%, 44% y 20% de las muestras superaban el límite de coliformes fecales (1000 MNP/g). Una muestra fue positiva para *Salmonella*, pero estaba debajo del límite de 3MNP/4g y tres muestras fueron positivas para *Escherichia coli* O157:H7 (Brinton, Storms, & Blewett, 2009).

Otro estudio, realizado en el mercado de Grecia, analizó 28 muestras; la mayoría de muestras reportaron una carga bacteriana mayor a 10^8 UFC/g, donde se excedía el límite de coliformes fecales en todas las muestras (Lasaridi, MK, Pilidis, Manios, & Kyriacou, 2006).

El vermicompost de Pujilí no presenta *Salmonella* spp., ni *Shigella* spp., debido a que son microorganismos con baja incidencia en composts, como lo muestran los estudios antes mencionados. Se ha demostrado que *Salmonella* y *E. coli* crecen y sobreviven más en compost con un contenido de humedad mayor al 20% (Pietronave, Fracchia, Rinaldi, & Martinotti, 2004), en el caso del compost con un 17,5% de humedad la probabilidad de crecimiento de bacterias patógenas disminuye. La humedad de 17,5% se debe a los costales de lona en donde se almacena el vermicompost y que a su vez permite el paso

de la humedad con el medio ambiente (Del Rocío, Valdovinos, & Padilla, 2008).

La presencia de patógenos se puede ocasionar debido a que el proceso térmico de reducción de patógenos no alcanza los niveles aceptables, debido a que no se llegan a las condiciones óptimas para que se produzca el proceso. Otra alternativa, es que los patógenos son reintroducidos en el producto final a través de contaminación cruzada con el lugar, por insectos, animales salvajes, escurrimientos de agua y materiales para manejar el vermicompost (Miller, Heringa, Kim, & Jiang, 2013).

Un manejo inadecuado del compost o el ingreso de material orgánico contaminado puede aumentar el número de coliformes totales y patógenos. Es así, que microorganismos como *E. coli*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* tienen un gran potencial para crecer en compost estéril en comparación con compost no estéril (Kim & Jiang, 2010).

La presencia de *Escherichia coli* en el vermicompost y el uso inadecuado del abono, pueden causar la contaminación de productos vegetales (Olaimat & Holley, 2012). En Estados Unidos desde el 2005, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7 fueron relacionados con enfermedades causadas por vegetales frescos (Warriner & Namvar, 2010).

Actualmente, el grado de madurez de un compost está relacionado directamente con la ausencia de fitotoxicidad, que puede ser producida por compuestos orgánicos como el amoníaco, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos hidrosolubles; adicionalmente, concentraciones altas de metales pesados y/o sales solubles (Iglesias, 2014). En el caso de un índice de germinación de 86,18%, mayor al 80%. Indica la ausencia de cualquier sustancia fitotóxica y la presencia de sustancias que promueven la germinación y elongación de las semillas.

La cantidad de materia orgánica es baja de 19,19%, sin embargo este valor puede variar a partir del material de partida para el proceso de compostaje. El valor de nitrógeno es bajo de 0,8%. Se debe tomar en cuenta

que las lombrices asimilan los elementos nutricionales al realizar sus procesos fisiológicos, por lo que las concentraciones tienen a disminuir (Mamani, Mamani, Sainz, & Villca, 2012). La relación carbono/nitrógeno en el vermicompost de Pujilí es de 13,95, con un valor aceptable menor a 15, en la mayoría de normativas.

La concentración de fósforo es baja, entre las causas posibles se puede recalcar la naturaleza de la materia prima o las pérdidas producidas por lixiviación o riego periódico (Mamani & Mamani, Red Worm Behavior (*Eisenia* spp) With Different Types of Organic Residues in Carmen Pampa, La Paz - Bolivia, 2008). En el caso del vermicompost de Pujilí, la concentración de fósforo puede ser causada por la materia prima, ya que al ser de contenido vegetal la cantidad de fósforo es menor, adicionalmente la frecuencia de riego oscila entre dos a cuatro días, por lo que puede ser una causa para la baja concentración del fósforo por un proceso de lavado del abono.

El valor de pH general es de 5,6 en el rango de ácido-neutro. Generalmente, el pH del vermicompost oscila entre ácido-básico, debido a la presencia de sales y amonio liberado que tiene a alcalinizar el medio (Serrano, 2004). Sin embargo, un pH ligeramente ácido es apto para el uso agrícola debido a que no alcaliniza el suelo.

La densidad aparente fue mayor que los límites de las normativas, sin embargo, no es un factor que influya directamente en el desarrollo de los cultivos agrícolas. La densidad aparente está relacionada con la aireación y tamaño de poro que se produce al mezclar el abono orgánico con el suelo.

La conductividad eléctrica es medianamente elevada (4.54 dS/m) por lo que el manejo de este vermicompost debe ser cauteloso, debido a que una conductividad eléctrica mayor a 4dS/m afecta a la productividad de los cultivos (LIFE, 2008). Adicionalmente, puede inhibir ligeramente la germinación de semillas pequeñas y el desarrollo de las plantas (Mamani, Mamani, Sainz, & Villca, 2012). La causa de una conductividad eléctrica elevada en vermicompost es la adición de sales por parte de la materia orgánica (Del Rocío, Valdovinos, & Padilla, 2008).

Entre los metales pesados, el cobre y el zinc cumplen con las normativas ambientales y poseen un bajo valor. La causa de las concentraciones bajas de metales parten del material de origen; ya que, se compostan desechos de mercados y ferias libres que en su gran mayoría son completamente orgánicos y no han tenido contacto con productos contaminantes.

5 CONCLUSIONES

De las muestras recolectadas del final del proceso de compostaje y según la normativa NTEA-006-SMA-2006, se evidenció un pH adecuado, una conductividad eléctrica ligeramente elevada pero apta para el consumo agrícola y una densidad aparente elevada debido al material mineral. La materia orgánica y C/N se encuentran debajo del límite. La CIC, nutrientes y metales pesados dentro de los límites aceptables.

El vermicompost de Pujilí microbiológicamente es apto para su uso agrícola (higiénico), debido a la baja cantidad de microorganismos coliformes (*Escherichia coli*) encontradas, adicionalmente la ausencia de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp, según la NTEA-006-SMA-2006, NTC 5167, EPA 2003 y NCh2880.

El vermicompost no contiene sustancias fitotóxicas, que puedan dañar las semillas. De hecho, promueve el desarrollo, crecimiento y germinación de las semillas de rábano utilizadas en el estudio, con un Índice de Germinación del 86,18%.

La evaluación fisicoquímica e identificación de *Salmonella*, *Shigella* y *Escheria coli* del vermicompost producido por el GAD de Pujilí en la provincia de Cotopaxi cumple con el 77,77% de los parámetros analizados en la norma NTC 5167, con el 54,54% en la EPA 2003, según la NCh2880 se cumplió con el 75% de los requerimientos. Finalmente, con el Real Decreto 824/2005 el 57,14% de los parámetros fisicoquímicos cumplen con los límites, la norma no contempla parámetros microbiológicos.

El vermicompost cumple en promedio con el 65% de los parámetros analizados entre las cinco normativas ambientales. Se debe considerar que los parámetros de aceptación varían entre normativas. Por lo cual, se concluye que el vermicompost tiene una calidad buena.

6 RECOMENDACIONES

Se recomienda tener precaución con el material compostado, en especial si no se considera que se han alcanzado las condiciones óptimas para llevar a cabo el proceso térmico de eliminación de patógenos.

Durante el proceso de compostaje se recomienda registrar la temperatura y humedad, a través de un termómetro y métodos manuales en las instalaciones del municipio de Pujilí. Así como, realizar periódicamente análisis fisicoquímicos y microbiológicos para optimizar el proceso de degradación y transporte del producto final.

Se debe mantener condiciones asépticas, después de terminar la fase de estabilización del vermicompost, durante la recolección, empaclado y transporte.

Se recomienda mantener la composta solo de material vegetal de mercados, debido a que la adición de restos animales puede aumentar el riesgo de presencia de microorganismos enteropatógenos.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Agrocalidad. (2014). *Determinación de Densidad Aparente y Porosidad en suelos*. Tumbaco: Laboratorio de Suelos, Foliare y Aguas.
- Agrocalidad. (2014). *Determinación de materia orgánica en suelos*. Tumbaco: Laboratorio de Suelos, Foliare y Aguas.
- Agrocalidad. (2014). *Tratamiento de las muestras de suelos*. Tumbaco: Laboratorio de Suelos, Foliare y Aguas.
- Ausina, V., & Moreno, S. (2006). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. México DF: Ed. Médica Panamericana.
- Brinton, W. F. (2000). *COMPOST QUALITY STANDARDS & GUIDELINES*. New York.
- Brinton, W., Storms, P., & Blewett, T. (2009). Occurrence and levels of fecal indicators and pathogenic bacteria in market-ready recycled organic matter composts. *J food Protect*(72), 332-339.
- Caffer, M., Terragno, R., & Binsztein, N. (2008). *Manual de Procedimientos: Diagnóstico y caracterización de Salmonella spp.* Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán" .
- CSPI, C. f. (2009). *Outbreak Alert: Analyzing foodborne outbreaks 1998 to 2007*. Recuperado el 02 de Abril de 2015, de <https://cspinet.org/new/pdf/outbreakalertreport09.pdf>
- De Carlo, E. (2001). Estudio de la población microbiana en las etapas iniciales de compostaje. *Revista Ceres*, 48-280.
- Del Rocío, M., Valdovinos, V., & Padilla, M. (2008). *Evaluación de calidad de lombricompostas, comparación con norma mexicana*. Universidad Autónoma Chapingo.

- Elving, J., Ottoson, J., B, V., & Albiñ, A. (2009). Growth potential of faecal bacteria in simulated psychrophilic/mesophilic zones during composting of organic waste. *J Appl Microbiol*(108), 1975-1981.
- Enayetullah, I. (2006). *Community Based Solid Waste Management Through Public-Private-Community Partnerships: Experience of Waste Concern in Bangladesh*. Dept. of Environment.
- EPA. (2007). *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods*.
- Espinosa, K. (2011). *Elaboración de un abono orgánico a base de desechos del procesamiento del brócoli (Brassica oleracea itálica), para disminuir la dependencia de productos químicos artificiales*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.
- Forbes, B., Samon, D., & Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott; Diagnóstico Microbiológico* (12 ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Iglesias, E. (2014). *Aspectos físicoquímicos, bioquímicos y microbiológicos del proceso de compostaje. Evaluación de la calidad*. Recuperado el 10 de 04 de 2015, de <http://digital.csic.es/bitstream/10261/92881/1/3%20%20Unidad%20tematica%204.pdf>
- Kim, J., & Jiang, X. (2010). The growth potential of Escherichia coli O157:H7, Salmonella spp. y Listeria monocytogenes in dairy manure-based compost in greenhouse setting under different seasons. *J Appl Microbiol*(109), 2095-2140.
- Koneman, Winn, Allen, Janda, Procop, Schreckenberger, & Woods. (2008). *Diagnóstico microbiológico* (Sexta ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Lasaridi, L., MK, P., Pilidis, G., Manios, T., & Kyriacou, A. (2006). Quality assessment of compost in Greek market: The need for standards and quality assurance. *J Environ Manage*(80), 58-65.

- Le Blanc, F. (2000). *Evaluación de los efectos del compost*. Santiago de Chile: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- LIFE. (2008). *Design and Application of an Innovative Composting Unit for the Effective Treatment of Sludge and other Biodegradable Organic Waste in Morocco, MOROCOMP*. Marruecos.
- MAE. (22 de Enero de 2014). *La gestión de los residuos sólidos en los municipios, un proyecto prioritario*. Obtenido de <http://www.ambiente.gob.ec/la-gestion-de-los-residuos-solidos-en-los-municipios-un-proyecto-prioritario-para-el-gobierno-nacional/>
- Mamani, G., & Mamani, F. (2008). Red Worm Behavior (*Eisenia* spp) With Different Types of Organic Residues in Carmen Pampa, La Paz - Bolivia. Houston: ASA-CSSA-SSSA.
- Mamani, G., Mamani, F., Sainz, H., & Villca, R. (2012). Comportamiento de la lombriz roja (*Eisenia* spp.) en sistemas de vermicompostaje de residuos orgánicos. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 1(1), 44-54.
- Mendez, H. (1997). *Evaluación de cuatro tratamientos para la compostización de aserrín de Pinus radiata*. Valdivia: Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Forestales.
- Miller, C., Heringa, S., Kim, J., & Jiang, X. (2013). Analyzing Indicator Microorganisms, Antibiotic Resistant *Escherichia coli*, and Regrowth of Foodborne Pathogens in Various Organic Fertilizers. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(6), 520-527.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2014). *Microbiología médica* (Septima ed.). Rio de Janeiro: Elsevier.
- Nataro, J., Bopp, C., Fields, P., Kaper, J., & Strockbine, N. (2007). *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. En E. J. P. R. Murray (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology* (págs. 670-687). Washington, DC: USA: ASM press.

- NRAES. (1992). *Natural Resource, Agricultural and Engineering Service, On-Farm composting handbook*.
- Olaimat, A., & Holley, R. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiol*, 32, 1-19.
- Pietronave, S., Fracchia, L., Rinaldi, M., & Martinotti, M. (2004). Influence of biotic and abiotic factors on human pathogens in a finished compost. *Water Res*(38), 1963-1970.
- Prats, G. (2005). *Microbiología clínica* (Primera ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Raggi, R. (1990). *Importancia de la materia orgánica en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo*. Panamá: Croveto.
- RENALOA. (2011). *Análisis Microbiológico de los Alimentos*. Recuperado el 11 de 04 de 2015, de http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_i.pdf
- Rivas, M., Leotta, G., & Chinen, I. (2008). *Manual de Procedimientos: Diagnóstico y caracterización de Escherichia coli O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos*. Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur.
- Rodríguez, M., & Córdova, A. (2006). *Manual de compostaje municipal: Tratamiento de residuos sólidos urbanos* (Primera ed.). México: Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit.
- Romero, M. (2003). *Producción ecológica certificada de hortalizas de clima frío*. Bogotá: CIAA.
- Serrano, C. (2004). *Evaluación de procesos de vermicompostaje para el tratamiento de residuos sólidos urbanos de la localidad de Tihuanacu*. La paz: Universidad Católica Boliviana.

- Soto, G., & Meléndez, G. (2004). Cómo medir la calidad de los abonos orgánicos. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*.
- Stofella, M. (2004). *Utilización de compost en los sistemas de cultivo horícola*. España: Grupo Mundi-Prensa.
- Terragno, R., Caffer, M., & Binsztein, N. (2007). *Manual de Procedimientos: Diagnóstico y caracterización de Shigella spp.* Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán".
- Trautmann, N., & Krasny, M. (1997). *Composting in the classroom: Scientific Inquiry for High School Students*. National Science Foundation, Cornell Waste Management Institute, Cornell Center for Environment.
- Trujillo, V., & Ortiz, G. (2009). *Efecto de la Aireación en Indicadores de Madurez de Cuatro Abonos Orgánicos*. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas: ECOSUR.
- Warriner, K., & Namvar, A. (2010). The tricks learnt by human enteric pathogens to persist within the plant environment. *Curr Opin Biotechnol*(21), 131-36.
- WHO. (2010). *Isolation of Salmonella and Shigella from Faecal Specimens*. Atlanta: WHO Global Foodborne Infections Network Laboratory .
- Zamorano-Escuela Agrícola Panamericana. (2011). *Aumentando La Calidad Y Competitividad De La Producción Agroalimentaria En Honduras*. Tegucigalpa.
- Zaragoza, V., Carrillo, R., & Guitierrez, C. (2011). Lead sorption-desorption from organic residues. *Environmental Technology*, 32(4), 353-361.