



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN CON LA COLECTIVIDAD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y LA
CONSTRUCCIÓN

MAESTRÍA EN SISTEMAS DE GESTÓN AMBIENTAL

TEMA: EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA E IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE *SALMONELLA* SP., *SHIGELLA* SP., Y *ESCHERICHIA COLI*, DE TRES ABONOS ORGÁNICOS (LOMBRICULTURA, TAKAKURA Y BIOABONO), PRODUCIDO POR EL GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO (GAD) DE LA PROVINCIA DE LOJA DEL APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS URBANOS".

AUTOR: JESSICA CRISTINA MAISINCHO ASQUI

DIRECTOR: ANDRÉS IZQUIERDO Ph.D

SANGOLQUÍ, MAYO DE 2015.

DECLARACIÓN DE CERTIFICACIÓN

Andrés Izquierdo Ph.D

Marco Masabanda Ph.D

Certifican:

Que el trabajo titulado "EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA E IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE *SALMONELLA SP.*, *SHIGELLA SP.*, Y *ESCHERICHIA COLI*, DE TRES ABONOS ORGÁNICOS (LOMBRICULTURA, TAKAKURA Y BIOABONO), PRODUCIDO POR EL GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO (GAD) DE LA PROVINCIA DE LOJA DEL APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS URBANOS", ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE.

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 JESSICA CRISTINA MAISINCHO ASQUI que lo entregue a la Coordinadora de la Maestría en Sistemas de Gestión Ambiental Msc Esthela Salazar.

Sangolquí, 22 de mayo de 2015.



Andrés Izquierdo Ph.D.

DIRECTOR



Marco Masabanda Ph.D.

OPONENTE

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

JESSICA CRISTINA MAISINCHO ASQUI

Declaro que:

El proyecto de grado denominado "EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA E IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE *SALMONELLA SP.*, *SHIGELLA SP.*, Y *ESCHERICHIA COLI*, DE TRES ABONOS ORGÁNICOS (LOMBRICULTURA, TAKAKURA Y BIOABONO), PRODUCIDO POR EL GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO (GAD) DE LA PROVINCIA DE LOJA DEL APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS URBANOS", ha sido desarrollado en base a una investigación exhaustiva, respetando los derechos intelectuales de terceros, conforme a las citas que constan en el texto 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 del proyecto de grado de mención.

Sangolquí, 22 de mayo de 2015.



Jessica Cristina Maisincho Asqui

AUTORIZACIÓN

Yo, Jessica Cristina Maisincho Asqui

Autorizo a la UNIVERSIDAD DE LA FUERZAS ARMADAS - ESPE, la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo "EVALUACIÓN FISICOQUÍMICA E IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE *SALMONELLA* SP., *SHIGELLA* SP., Y *ESCHERICHIA COLI*, DE TRES ABONOS ORGÁNICOS (LOMBRICULTURA, TAKAKURA Y BIOABONO), PRODUCIDO POR EL GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO (GAD) DE LA PROVINCIA DE LOJA DEL APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS URBANOS", cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 22 de mayo de 2015.



Jessica Cristina Maisincho Asqui

DEDICATORIA

Los esfuerzos realizados se los dedico a mi padre quien me enseñó a ser responsable, trabajadora y humilde.

A mí querido esposo e hijos quienes han compartido lo bueno y lo malo. La motivación en todas las actividades propuestas.

A mi hermana Mary que siempre me ha dado sus manos apoyándome en todo.

A mi familia, a mi madre por el apoyo incondicional, a mis hermanos siempre ha estado pendiente de mí motivándome e incentivándome.

A mis Sobrinos bellos por estar siempre a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la salud, bendiciones y sabiduría
Al Ministerio del Ambiente Ecuador. Proyecto
PNGIDS

Ing. Susana Ledesma

A la Universidad de las Fuerzas Armadas –
Laboratorio de Microbiología- Biotecnología.

MSc. Alma Koch, Andres Izquierdo Ph.D,
Ing. Pedro Romero Marco Masabanda Ph.D,
MSc. Esthela Salazar.

Grupo de Laboratorio: Sofy Játiva, Jaime
Betancourd, Katy Garay, Andrés Pazmiño,
Alejandra Oviedo, Salomé Calohorrano, Justin
Gallegos, Ivanna Sanchez, Vanne Marcillo,
Sofía Hoyos, Alejandro, Felipe, Gabriel

Agrocalidad Laboratorios de Suelos.

Luis Ramos Ph.D, Ing. Rusbel Jaramillo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	CAPÍTULO 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	Marco Teórico	4
1.4.1	Abonos orgánicos.....	4
1.4.2	Propiedades de los abonos orgánicos.....	5
1.4.2.1	Propiedades físicas.....	5
1.4.2.2	Propiedades químicas	6
1.4.2.3	Propiedades biológicas	6
1.4.3	Tipos de Abonos orgánicos	7
1.4.3.1	Compostaje	7
1.4.3.2	Fases del proceso de compostaje	8
1.4.3.2.1	Fase de latencia y crecimiento.....	8
1.4.3.2.2	Etapa mesófila.....	8
1.4.3.2.3	Etapa termófila	9
1.4.3.2.4	Etapa mesófila de enfriamiento.....	9
1.4.3.2.5	Fase de maduración	10
1.4.3.3	Factores que condicionan el proceso de compostaje.....	10
1.4.3.3.1	Parámetros de seguimiento.....	10
1.4.3.3.1.1	Temperatura.	10
1.4.3.3.1.2	Humedad.....	11
1.4.3.3.1.3	Potencial Hidrógeno (pH).....	12
1.4.3.3.1.4	Aireación	13
1.4.3.3.2	Parámetros relativos a la naturaleza del sustrato	13
1.4.3.3.2.1	Tamaño de partícula	13
1.4.3.3.2.2	Relaciones carbono nitrógeno (C/N) y carbono fósforo (C/P).....	14
1.4.3.3.2.3	Nutrientes	15
1.4.3.3.2.4	Materia orgánica.....	16
1.4.3.3.2.5	Conductividad Eléctrica (CE)	17

1.4.4	Lombricultura.....	18
1.4.4.1	<i>Eisenia foetida</i>	19
1.4.5	Takakura.....	20
1.4.6	Bioabono.....	21
1.5	Calidad del Abono Orgánico.....	21
1.5.1	Enfermedades humanas causadas por bacterias patógenas encontradas en el Compost.....	22
1.5.1.1	Microorganismos patógenos encontrados en compostaje.....	23
1.5.1.2	Bacterias patógenas en el compost.....	23
1.5.1.2.1	<i>Salmonella</i>	25
1.5.1.2.2	<i>Shigella</i>	26
1.5.1.2.3	Coliformes.....	27
1.5.1.2.4	<i>Escherichia coli</i>	28
1.6	Métodos de identificación de los microorganismos.....	29
1.7	Metales pesados.....	30
1.7.1	Características de los metales pesados.....	32
1.8	Fitotoxicidad de los vermicompostajes.....	33
1.9	Hipótesis.....	35
2	CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
2.1	Participantes.....	36
2.2	Zona de estudio.....	36
2.2.1	Trabajo de campo.....	36
2.2.2	Trabajo de laboratorio.....	36
2.3	Periodo de tiempo de investigación.....	37
2.4	Procedimientos.....	37
2.4.1	Recolección de muestras.....	37
2.4.2	Pruebas de campo.....	38
2.4.3	Fase de Laboratorio.....	39
2.4.3.1	Análisis Microbiológicos.....	39
2.4.3.2	Fase analítica.....	39
2.4.3.2.1	Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> sp.....	39
2.4.3.2.2	Pre-enriquecimiento.....	39
2.4.3.2.3	Enriquecimiento selectivo.....	39
2.4.3.2.4	Aislamiento primario en medios selectivos y diferenciales.....	39
2.4.3.2.5	Selección y purificación de las colonias confirmativas.....	40

2.4.3.2.6	Identificación bioquímica.....	40
2.4.3.2.7	Aislamiento e identificación de <i>Shigella</i> sp.....	40
2.4.3.2.8	Pre-enriquecimiento	40
2.4.3.2.9	Enriquecimiento selectivo.....	41
2.4.3.2.10	Aislamiento primario en medios selectivos y diferenciales.....	41
2.4.3.2.11	Selección y purificación de las colonias sospechosas	41
2.4.3.2.12	Identificación bioquímica.....	41
2.4.3.3	Fase analítica.....	42
2.4.3.3.1	Aislamiento e identificación de <i>Echerichia coli</i> y Coliformes.....	42
2.4.3.3.2	Pre-enriquecimiento	42
2.4.3.3.3	Aislamiento primario en medios selectivos y diferenciales.....	42
2.4.3.3.4	Selección y purificación de las colonias confirmativas	42
2.4.3.3.5	Identificación bioquímica.....	43
2.4.4	Placas Petrifilm Coliformes (3M).....	43
2.4.5	Identificación bioquímica y confirmación con pruebas API.....	43
2.5	Análisis físico-químicos	44
2.5.1	Análisis de muestras de suelo	44
2.5.1.1	Preparación de las muestras.....	44
2.5.1.2	Determinación de las características fisicoquímicas de los abonos orgánicos.....	45
2.5.1.2.1	Características físicas	45
2.5.1.2.2	Características químicas.....	46
2.5.2	Determinación de metales pesados.....	47
2.6	Determinación de fitotoxicidad de los abonos orgánicos	47
2.6.1.1	Análisis estadístico	48
3	CAPÍTULO3: RESULTADOS.....	49
3.1	Fase de Laboratorio	49
3.1.1	Análisis microbiológicos.....	49
3.1.1.1	Aislamiento de colonias del género <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp. y <i>E. coli</i>	49
3.1.1.2	Descripción macroscópica celular.....	49
3.1.1.3	Descripción morfológica celular.....	50
3.1.2	Análisis confirmativo.....	51
3.2	Análisis fisicoquímico	52
3.2.1	Resultados de las características fisicoquímicas.....	52
3.2.1.1	Macro y micronutrientes	54

3.3 Metales pesados	55
3.4 Resultados de fitotoxicidad	57
3.4.1 Análisis estadístico	58
4 CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	59
4.1 Identificación microbiológica de <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp., <i>Escherichia coli</i>	59
4.2 Identificación físico-química	59
4.3 Identificación de Metales Pesados	60
4.4 Prueba de fitotoxicidad	61
5 CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	62
6 CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....	63
7 CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA	64

LISTADOS DE TABLAS

Tabla 1	
Límites de población de microorganismos patógenos establecidos por la EPA, en la norma 503, para biosólidos que serán dispuestos en suelos.	22
Tabla 2	
Valores de los límites permisibles de metales pesados establecidos por la EPA en la norma 503 para biosólidos dispuestos en suelos.	33
Tabla 3	
Número de muestras elementales de fertilizantes.	37
Tabla 4	
Análisis microbiológico y límites máximos permisibles según la EPA 503. ..	52
Tabla 5	
Características físicas de los abonos orgánicos (humus, Takakura, bioabono).	53
Tabla 6	
Características químicas de los abonos orgánicos (Humus, Takakura y bioabono).	54
Tabla 7	
Resultado de los análisis fisicoquímicos para determinar metales pesados de los abonos orgánicos (humus, Takakura, bioabono).	56
Tabla 8	
Índice de germinación en la aplicación de abonos orgánicos. Prueba de t.	58

LISTADOS DE CUADROS

Cuadro 1

Se muestran los microorganismos patógenos que pueden encontrarse en el compostaje, las enfermedades y síntomas.25

Cuadro 2

Las características de los metales pesados.....32

Cuadro 3

Determinación física de las tres muestras de abonos orgánicos; procedimientos estandarizados por los Laboratorios de suelos de Agrogalidad.45

Cuadro 4

Determinación química de las tres muestras de abonos orgánicos; procedimientos estandarizados por los Laboratorios de suelos de Agrogalidad.46

Cuadro 5

Determinación de metales pesados de las tres muestras de abonos orgánicos; procedimientos estandarizados por los Laboratorios de suelos de Agrogalidad.47

LISTADOS DE FIGURAS

Figura 1

Muestreo para el análisis microbiológico y físico-químico de los abonos Humus, Takakura y bioabono.38

Figura 2

Proceso de preparación de las muestras de los abonos orgánicos.45

Figura 3

Características macroscópicas celular observadas de las colonias sospechosas: a) Salmonella, b) Shigella y c) E. coli. En medios de cultivo selectivos y diferenciales.50

Figura 4

Tinción Gram de las colonias presuntivas: a) Salmonella, b) Shigella y c) E. coli (100x).50

Figura 5

Pruebas bioquímicas realizadas a las colonias presuntivas aisladas de los tres abonos orgánicos: a) Oxidasa negativa para Salmonella, Shigella y E. coli, b) Pruebas IMVC para E. coli, c) Prueba de Voges Proskauer para Shigella, d) Fermentación51

Figura 6

Análisis confirmativo de E. coli de la colonias, aisladas del bioabono.52

Figura 7

Comparación límites permisibles de metales pesados de la EPA 503, La Unión Europea con los abonos orgánicos humus, Takakura y bioabono.57

Figura 8

Porcentaje de Índice de Germinación de los Abonos Orgánicos.57

RESUMEN

El Ministerio del Ambiente Ecuador (MAE) dentro del Programa Nacional para la Gestión Integral de Desechos Sólidos – PNGIDS ECUADOR, crea la iniciativa de implementar una política ambiental y normar la calidad de los abonos orgánicos en los 221 Gobiernos autónomos Descentralizados (GAD's) del país. Actualmente 55 GAD's han implementado proyectos en la elaboración de abonos orgánicos aprovechando el 60% de los residuos sólidos orgánicos que generan en cada ciudad. Por lo que fue necesario realizar una identificación microbiológica de la presencia o ausencia de ***Salmonella sp.***, ***Shigella sp.***, ***Escherichia Coli.***, bacterias patógenas al ser humano, análisis fisicoquímico y prueba de fitotoxicidad de los tres abonos orgánicos del producto final Humus, Takakura y Bioabono del GAD de la provincia de Loja y comparar con la Norma EPA 503 Biosólidos. Los resultados obtenidos al determinar los niveles de patógenos fueron: En los abonos orgánicos humus, Takakura y bioabono se reporta ausencia de *Salmonella sp.*, y *Shigella sp.* Existe presencia de coliformes fecales (<1000 UFC/g) dentro del rango permitido por la norma internacional EPA 503. Los parámetros físicos-químicos de los abonos orgánicos se encuentran dentro de los rangos de madurez y estabilidad comparados por las normativas internacionales NTAE-006-SMA-2006, MNX-FF-109-SCFI, 2007, FAO, 2013, y entre otros. La conductividad eléctrica se encuentra en valores superiores a la MNX-FF-109-SCFI, 2007 (<4 ds/cm). Los niveles de metales pesados en los abonos orgánicos, se encuentran dentro de los límites permisibles comparados con la EPA 503. Los valores del índice de germinación IG en los extractos son superiores al 80% de germinación, lo que indican ausencia de sustancias fitotóxicas, por lo que se define como abonos orgánicos maduros y estables.

PALABRAS CLAVES:

ABONO ORGÁNICO.

BACTERIAS PATÓGENAS.

PARÁMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS.

METALES PESADOS, FITOXICIDAD.

LÍMITES PERMISIBLES.

ABSTRACT

Ecuador's Ministry of Environment (MAE) within the National Program for Integrated Solid Waste Management - ECUADOR PNGIDS creates the initiative to implement an environmental policy of regulating the quality of organic fertilizers in the 221 autonomous governments (GAD's) from the country. Currently 55 GAD's have implemented projects to develop organic fertilizers using as advantage the 60% of solid organic waste that is generated in each city. Hence, it was necessary a microbiological identification of the presence or absence of *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, and *Escherichia coli* (pathogenic bacteria that affect humans), therefore it was carried out a physicochemical analysis and phytotoxicity test of the three final products Humus, Takakura and Bioabono produced by GAD in the province of Loja. Afterwards, the data was compared with the standard 503 Biosolids EPA. The results obtained in the humus and in the organic fertilizers Bioabono and Takakura reported absence of *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* and presence of fecal coliforms with a concentration of <1000 CFU / g. Ultimately, it was found that the three products are within the permissible limits compared with international standards EPA 503. The physical-chemical parameters were within the ranges of maturity and stability compared to international standards NTAE-006-SMA-2006, MNX-FF-109-SCFI, 2007 and FAO, 2013. The electrical conductivity had higher values in the MNX-FF-109-SCFI, 2007 (<4 ds/cm), the levels of heavy metals are within permissible limits compared to the EPA 503. Finally, the index values IG germination were above 80% germination, which indicated absence of phytotoxic substances, so therefore defined as mature and stable manure.

KEY WORDS:

ORGANIC MANURE

PATHOGENIC BACTERIA.

PHYSICAL CHEMICAL PARAMETERS.

HEAVY METALS AND PHYTOTOXICITY.

PERMISSIBLE LIMITS.

1 CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Los residuos orgánicos municipales en el proceso de compostaje o enmiendas orgánicas pueden tener efectos negativos en el producto final. Ocasionan daños si son aplicados como acondicionadores de suelos, por el exceso de materiales inertes, emisión de malos olores, salinidad elevada, toxicidad por contaminantes orgánicos, toxicidad por metales pesados, inmadurez del proceso y presencia de organismos patógenos (Puerta, s/a).

Al utilizar los abonos y enmiendas orgánicas que no han llevado a cabo un proceso de compostaje adecuado se contaminan los suelos con microorganismos patógenos para el ser humano y se desencadenan problemas a futuro en la agricultura (FAO, 2003). Las temperaturas altas en el compostaje permiten realizar un proceso de sanitización o pasteurización eliminando los agentes patógenos siempre y cuando el proceso de compostaje cumpla con todos los requerimientos ambientales para su madurez (González, 2013).

El uso de los de abonos orgánicos de diversos orígenes, y en especial el compost que se obtiene a partir de residuos sólidos urbanos, requiere una evaluación fisicoquímica de sus contenidos y metales pesados. Los metales pesados pueden acumularse en el suelo, sustratos y en las plantas; alteran su equilibrio biológico, afectan el rendimiento de los cultivos y la salud animal, inclusive la del hombre (Rodríguez, 2010).

La toxicidad por contaminantes orgánicos depende de los residuos empleados en el proceso de compactación. Son restos de pesticidas, productos farmacéuticos, pintura, tintes, derivados de petróleo, aceites,

grasas, ceras, disolventes, productos de la industria de los plásticos, detergentes, entre otros. Según Abad, 1998, estos niveles de toxicidad se reducen por la actividad microbiológica adaptada a cada contaminante.

El Ministerio del Ambiente Ecuador (MAE), dentro del Programa Nacional para la Gestión Integral de Desechos Sólidos, mantiene proyectos de aprovechamiento de residuos sólidos urbanos en 55 GADs (Gobiernos Autónomos Descentralizados) mediante la elaboración de abonos orgánicos (lombricultura, Takakura, Bocashi, biol, bioabono, compost).

Al no contar con una normativa ambiental que regule la calidad microbiológica y fisicoquímica de los abonos, independientemente de la procedencia de las materias primas para su proceso, se podría ocasionar a largo plazo contaminación por bacterias patógenas y por metales pesados en el suelo. Se afectaría a la cadena trófica y se desencadenaría problemas de sanidad e inocuidad (FAO, 2013).

1.2 Justificación del problema

Los municipios en cada ciudad del Ecuador se ven enfrentados a la creciente cantidad de residuos sólidos urbanos que se generan, con un índice *per cápita* de 0.73 kilogramos de desechos diarios por habitante, lo que representa aproximadamente cuatro millones de toneladas anuales. Más del 60 % son residuos orgánicos (FONAG, 2013) que pueden ser reciclados como nuevas alternativas en la elaboración de abonos orgánicos y así, reducir los impactos negativos ambientales.

En el GAD de Loja habitan 69.552 personas, que generan 0,63 kilos de residuos promedio al día en la zona urbana, con una producción mancomunada de 11,77 toneladas diarias. El 51,7% son residuos orgánicos

(MAE-PNGIDS) que son aprovechados en la elaboración de abonos orgánicos.

La ciudad de Loja tiene como alternativa viable y sostenible el aprovechamiento de los residuos sólidos urbanos en la elaboración de abonos orgánicos (lombricultura, Takakura y bioabono), que se comercializan para su uso en la agricultura, parques y jardines. Actualmente tiene implementado el programa de Gestión Integral de residuos sólidos involucrando a los ciudadanos en el proceso de clasificación domiciliaria y educación ambiental.

En Ecuador no existen normas que regulen la producción y uso de los abonos orgánicos en la inocuidad. La producción de los abonos y fertilizantes orgánicos se ha incrementado durante los últimos años; sin embargo, los agricultores los aplican sin conocer sus niveles nutricionales ni sus características biológicas y fisicoquímicas. Para hacer más eficiente este proceso es necesario conocer la composición microbiológica de los abonos orgánicos con la finalidad de asegurar la inocuidad de los productos, evitar la contaminación del ambiente y posibles daños a la salud humana (Benzing, 2001).

Los resultados de esta investigación servirán con el fin de implementar una línea base para elaboración de una política y normativa ambiental que permita el control de los abonos orgánicos en el proceso y utilización.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Evaluar las propiedades físico-químicas y microbiológicas (*Salmonella* sp., *Shigella* sp., y *Escherichia coli*), de tres abonos orgánicos (lombricultura, Takakura y bioabono), producidos por el Gobierno Autónomo Descentralizado

(GAD) de la Provincia de Loja a partir del aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos urbanos.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Diseñar un método de muestreo de abonos orgánicos (lombricultura, Takakura y bioabono), de la planta de Lombricultura del Centro de Gestión Ambiental en el manejo de residuos sólidos de la ciudad de Loja.
- Analizar las propiedades fisicoquímicas de los abonos orgánicos.
- Identificar la presencia y ausencia de bacterias patógenas (*Salmonella* sp., *Shigella* sp., y *Escherichia coli*), en los abonos orgánicos, mediante técnicas microbiológicas dependientes de cultivo.
- Analizar y comparar los resultados con los parámetros físico-químicos y microbiológicos establecidos por la legislación ambiental internacional sobre la calidad de abonos orgánicos.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Abonos orgánicos

Los abonos orgánicos constituyen una forma de reciclaje de nutrientes en el sistema agropecuario, incluyen todo material de origen orgánico utilizado para la fertilización de cultivos o como mejoradores de suelos (Soto, 2003). Se considera abono orgánico a elementos de origen animal o vegetal que se utilicen principalmente para mejorar las características del suelo, en calidad de fuentes de vida y nutrientes al suelo. Con relación a las propiedades biológicas, los abonos orgánicos favorecen la aireación y oxigenación del suelo, promoviendo una mayor actividad radicular y facilitando la dinámica de microorganismos aerobios. De esta manera, constituyen una fuente de

energía para que los microorganismos se multipliquen rápidamente (Kolmas y Vásquez, 1996).

Los abonos orgánicos o enmiendas orgánicas se han venido utilizando durante años como una fuente para mejorar y fertilizar los suelos. Al principio se los utilizó de manera simple con la aplicación en cultivos de desechos de cosechas, rastrojo y residuos animales. Con el pasar del tiempo se fueron realizando procesos mejorados para la elaboración de compostaje (Rosalba, 2002 y Suárez et al., 2002) y el humus de lombriz, cuyo uso en los últimos años se ha generalizado (Noriega, 1998 y Cuesta, 2002).

Entre los abonos orgánicos y enmiendas orgánicas, los principales y más conocidos son el compost, el Bocashi y el lombricompost o lombrihumus, pero también son comúnmente utilizados las aplicaciones de gallinaza y otros desechos animales y vegetales frescos, como la pulpa del café (Soto y Melendez, 2004).

1.4.2 Propiedades de los abonos orgánicos

Los abonos orgánicos tienen propiedades que ejercen determinados efectos sobre el suelo y juegan un papel importante en sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas.

1.4.2.1 Propiedades físicas

Los abonos orgánicos captan más radiaciones solares por su color oscuro, el suelo adquiere más temperatura lo que le permite absorber con mayor facilidad los nutrientes y mejorar su estructura así como textura haciendo más ligeros a los suelos arcillosos y más compactos a los suelos arenosos. Además regula la velocidad de infiltración del agua, disminuyendo la erosión producida por el escurrimiento superficial (Yanque, 2014). También influyen en

el drenaje y aireación con la mejora de la permeabilidad del suelo. Aumentan la retención de agua en el suelo cuando llueve, contribuyen a recuperar el uso de agua para riego por la mayor absorción del terreno, y disminuyen la erosión ya sea por efectos del agua o del viento (FONAG, 2010).

1.4.2.2 Propiedades químicas

Los abonos orgánicos aumentan el poder de absorción del suelo y reducen las oscilaciones de pH. Mejoran la capacidad de intercambio catiónico y conductividad eléctrica del suelo, recuperando la fertilidad (Yanque, 2014). También mantienen los micro y macro elementos alrededor del sistema radical de las plantas (Peña, 2002) así como aumentan la capacidad de intercambio catiónico del suelo (Ruíz, Russian y Tua, 2007).

1.4.2.3 Propiedades biológicas

Durante el proceso de elaboración de los abonos orgánicos, la aireación y la oxigenación incrementan la actividad radicular y la de los microorganismos aerobios. Algunos microorganismos durante el proceso pueden producir sustancias inhibitoras y activadoras de crecimiento, incrementan considerablemente la reproducción de microorganismos benéficos, tanto para degradar la materia orgánica del suelo como para favorecer el desarrollo del cultivo (FONAG, 2010).

Los abonos orgánicos constituyen una fuente de energía para los microorganismos. Su calidad y cantidad pueden cambiar las propiedades biológicas, incrementando la diversidad y la actividad microbiológica del suelo (Álvarez, 2006). Los microorganismos constituyen un factor importante en el proceso de formación del suelo en la transformación de compuestos orgánicos y minerales, e influyen en el contenido y movilidad de los macro y micro

elementos, así como en su balance y asimilación de las plantas (Martinez, 2003).

1.4.3 Tipos de Abonos orgánicos

Existen varios tipos de abonos o enmiendas orgánicas, sólidos y líquidos, que a lo largo del tiempo han sido mejorados y modificados.

1.4.3.1 Compostaje

El compostaje constituye un ecosistema en el que diversas poblaciones microbianas como bacterias, hongos y actinomicetos, degradan secuencialmente la materia orgánica en presencia del oxígeno generando un producto estable humificador junto con gases, agua, calor y residuos del metabolismo microbiano.

El compostaje se basa en la acción de diversos microorganismos aerobios (Haug, 1993). Predomina un metabolismo respiratorio aerobio. Se da la alternancia de la etapa mesófila (10-40°C) con la etapa termófila (40-75°C), que actúan de manera sucesiva sobre la materia orgánica original, en función de la influencia de determinados factores que producen elevadas temperaturas, los cuales disminuyen tanto el volumen como el peso de los residuos y provocan su humificación y oscurecimiento (Nakasaki, Nag y Karita, 2005). Durante la evolución del proceso se produce una sucesión natural de poblaciones de microorganismos que difieren en sus características nutricionales (quimioheterotrofos y quimioautotrofos), entre los que se establecen efectos sintróficos y nutrición cruzada (OPS, 2010).

1.4.2.3 Fases del proceso de compostaje

Durante el proceso de compostaje, la temperatura va variando en el tiempo con el resultado de diferentes fases.

1.4.2.3.1 Fase de latencia y crecimiento

Es la etapa inicial en la que los microorganismos se adaptan a su nuevo medio e inician la multiplicación y colonización de los residuos. Durante los primeros días se inicia la degradación microbiana de los elementos más fácilmente biodegradables, se calienta la pila de los residuos y se observa la emanación de vapor de agua en la parte superior de la materia vegetal (Manual de Compostaje, 2001).

1.4.2.3.2 Etapa mesófila

En la etapa mesófila, la actividad metabólica de todos los microorganismos eleva la temperatura hasta 40°C; se degradan los azúcares y aminoácidos por la acción de grupos de bacterias, *Bacillus* y *Thermus*, (Trautmann y Olynciw, 2000) y por la presencia de bacterias mesofílicas, el pH disminuye desde un valor 7.0 hasta 5.5-6.0 aproximadamente, debido a la descomposición de lípidos y glúcidos en ácidos pirúvicos, y de proteínas en aminoácidos, favoreciendo la aparición de hongos mesofílicos más tolerantes a las variaciones del pH y humedad.

La relación carbono nitrógeno en esta etapa debe estar en torno a 30/1. Si se supera, la actividad biológica disminuye, mientras que proporciones altas de nitrógeno provocan el agotamiento rápido del oxígeno y la pérdida del exceso en forma de amoníaco, tóxico para la población microbiana. La relación carbono nitrógeno es de especial importancia en la fase termófila, ya que el carbono aportará la energía a los microorganismos. El nitrógeno es

esencial para la síntesis de nuevas moléculas como proteínas y ácidos nucleicos (Mora, 2013).

La humedad deberá estar entre 40 y 60% debido a que el agua distribuye los nutrientes por la masa (carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, boro, calcio, magnesio, sodio, entre otros) y la ventilación debe ser adecuada sobre todo en las tres primeras etapas, pero nunca excesiva, porque al igual que el sol, puede secar demasiado la pila y alterar el proceso de descomposición (Stofella & Khan, 2004).

1.4.2.3.3 Etapa termófila

En la etapa termófila, la temperatura asciende a 75°C, las poblaciones de bacterias y hongos mesofílicos mueren o permanecen en estado de dormancia mientras que las bacterias termofílicas, actinomicetos (*Micromonospora*, *Streptomyces* y *Actinomyces*) y hongos termofílicos (Golueke, 1977) realizan el proceso de degradación de los polímeros y hemicelulosa, generando incluso más calor que los mesófilos (Mora, 2013).

La degradación de los ácidos provoca el incremento del pH desde 5.5 hasta 7.5 y permanecerá casi constante hasta el final del proceso, el color del compost se pone más oscuro paulatinamente y el olor original se comienza a sustituir por olor a tierra. Es en esta etapa cuando comienza la esterilización del compost debido a las altas temperaturas. La mayoría de las semillas y patógenos como *E. coli* mueren al estar sometidos durante varios días a temperaturas superiores a 55°C (Valdivia, 2012).

1.4.2.3.4 Etapa mesófila de enfriamiento

En la etapa mesófila de enfriamiento, los nutrientes, energía comienzan a escasear y la actividad de los microorganismos termofílicos disminuye. En

consecuencia, la temperatura en la pila desciende desde los 75°C hasta la temperatura ambiente. Se realiza la degradación de celulosa y lignina por bacterias y hongos (*Aspergillus* y *Mucor*). Reaparecen los microorganismos mesofílicos que dominarán el proceso hasta que toda la energía sea utilizada (Mora, 2013).

1.4.2.3.5 Fase de maduración

En la fase de maduración se estabiliza y polimeriza el humus a temperatura ambiente, desciende el consumo de oxígeno y desaparece la fitotoxicidad. Se produce la madurez y el enfriamiento del compostaje después de tres a seis meses según las condiciones atmosféricas (Pérez, Céspedes, & Nuñez).

1.4.3 Factores que condicionan el proceso de compostaje

El control a establecer en el proceso de compostaje se refiere a parámetros de seguimiento que han de ser medidos y seguidos durante todo su desarrollo así como a los parámetros relativos a la naturaleza del sustrato que también serán medidos y adecuados a los valores correctos, fundamentalmente al inicio del proceso (Madejón, Díaz, López, & Cabrera, 2001).

1.4.3.1 Parámetros de seguimiento

1.4.3.1.1 Temperatura.

En el proceso de compostaje, las condiciones de temperatura juegan un papel importante debido a su aumento que es el síntoma más claro de la actividad microbiana, por lo que han sido consideradas como las variables decisivas en el control del compostaje (Liang, Das, & McClendon, 2003). Existe una

relación directa entre la temperatura y la magnitud de la degradación de la materia orgánica. Pequeñas variaciones de temperatura afectan más a la actividad microbiana que pequeños cambios de la humedad, pH o C/N desestabilizando el proceso.

Se observan tres fases en el proceso de descomposición aeróbica: fase mesófila inicial hasta temperaturas de 45°C; y fase mesófila final, considerándose finalizado el proceso cuando se alcanza de nuevo la temperatura inicial. Cada especie de microorganismo tiene un intervalo de temperatura óptima en el que su actividad es mayor y más efectiva: 15-40°C para mesófilos y 40-70°C para los termófilos. Hay una relación directa entre el proceso de degradación y el tiempo durante el cual la temperatura ha sido alta. A veces la temperatura puede llegar a ser tan alta que inhibe el crecimiento de los propios microorganismos termófilos, conociéndose este fenómeno como suicidio microbiano (Suler & Finstein, 1977).

1.4.3.1.2 Humedad

La presencia de agua es imprescindible para las necesidades fisiológicas de los microorganismos, es el medio de transporte de las sustancias nutritivas solubles y de los productos de desecho de las reacciones químicas en el metabolismo. El compostaje es un proceso biológico de descomposición de la materia orgánica (Haug, 1993; Jeris & Regan, 1973). Se considera que la humedad de los materiales es la variable más importante en el proceso y ha sido calificada como criterio de decisión para su optimización.

La importancia de una humedad apropiada en el proceso de compostaje fue demostrada por Shulze en 1962. Se determinó la variación de la cantidad de oxígeno consumido por una masa inicial durante el compostaje, en un reactor cerrado a una temperatura constante, en función de la humedad. Pequeñas variaciones de humedad provocaban grandes cambios en la temperatura. La humedad de la masa de compostaje debe ser tal que el agua

no llegue a ocupar totalmente los poros de dicha masa (Miyatake & Iwabuchi, 2006), para que permita la circulación tanto del oxígeno, como la de otros gases producidos en la reacción.

La humedad óptima para el crecimiento microbiano está entre el 50 y 70%; la actividad biológica decrece mucho cuando la humedad se encuentra por debajo del 30%; por encima del 70% el agua desplaza al aire en los espacios libres existentes entre las partículas, reduciendo la transferencia de oxígeno y produciéndose anaerobiosis. Cuando las condiciones se hacen anaerobias, se originan malos olores y disminuye la velocidad del proceso. El exceso de humedad puede ser reducido con mayor aireación (Haug, 1993).

Con buen control de la humedad y de la aireación, puede llevarse a cabo el control de la temperatura. Esto se debe a que durante el proceso de compostaje, se debe mantener un equilibrio en las condiciones, evitando que las partículas se llenen de aire o de agua. Por lo tanto, la humedad óptima depende del tipo de residuo; así se ha encontrado que, para la paja de cereales está entre 75 y 85%, para astillas de madera entre 75 y 90% y para residuos sólidos urbanos (RSU) entre 50 y 55% (Haug, 1993).

1.4.3.1.3 Potencial Hidrógeno (pH)

La dinámica de los microorganismos en los procesos del compostaje está directamente relacionada con el pH, evolucionando durante las tres fases. En la fase mesófila inicial existe una disminución del pH debido a la acción de los microorganismos sobre la materia orgánica más lábil; se liberan ácidos orgánicos. En la fase termófila se produce una progresiva alcalinización del medio, debido a la pérdida de los ácidos orgánicos y a la generación de amoníaco procedente de la descomposición de las proteínas (Sánchez-Monedero, Roig, Paredes, y Bernal, 2001).

En la fase de maduración, el pH tiende a la neutralidad debido a la formación de compuestos húmicos que tienen propiedades tampón (Suler & Finstein, 1977). Se mantiene relación entre los cambios de pH y la aireación de la mezcla, concluyendo que un compostaje con la aireación adecuada conduce a productos finales con un pH entre 7 y 8; valores más bajos del pH son indicativos de fenómenos anaeróbicos y de inmadurez del abono orgánico. Si el pH se mantiene por encima de 7,5 durante el proceso es síntoma de una buena descomposición.

1.4.3.1.4 Aireación

La presencia de oxígeno juega un rol importante en el proceso del compostaje, debido a que los microorganismos que en él intervienen son aerobios. La parte más externa contiene entre 18-20% de oxígeno, y en el interior el contenido de oxígeno va disminuyendo, mientras que el de dióxido de carbono va aumentando, hasta el punto de que a una profundidad mayor de 60 cm, el contenido de oxígeno puede estar entre 0,5 y 2% (Ekinci, Keener, & Elwell, 2004).

Una aireación insuficiente provoca una sustitución de los microorganismos aerobios por anaerobios, con el consiguiente retardo en la descomposición, la aparición de sulfuro de hidrógeno y la producción de malos olores (Bidligmaier, 1996).

1.4.3.2 Parámetros relativos a la naturaleza del sustrato

1.4.3.2.1 Tamaño de partícula

Entre más pequeño sea el tamaño de las partículas del material, más fácil es el ataque de los microorganismos y el aumento de la velocidad del proceso. El tamaño inicial de las partículas que componen la masa a compostar es una importante variable para la optimización del proceso, ya que cuanto mayor sea la superficie expuesta al ataque microbiano por unidad de masa, más rápida y completa será la reacción (Haug, 1993).

Si el tamaño de partícula es pequeño provoca una gran superficie de contacto para el ataque microbiano, también se reduce el espacio entre partículas y se incrementan las fuerzas de fricción (Haug, 1993); esto limita la difusión de oxígeno hacia el interior y de dióxido de carbono hacia el exterior, lo cual restringe la proliferación microbiana y puede dar lugar a un colapso microbiano al ser imposible la aireación por convección natural.

Por otra parte, un producto muy fino no es aconsejable por riesgos de compactación. Las dimensiones consideradas óptimas son distintas según los criterios de diferentes autores, variando entre 1 y 5 cm (Haug, 1993), entre 2 y 5 cm (Kiehl, 1985), o entre 2,5 y 2,7 cm (Tchobanogolus, Theisen, & Vigil, 1994).

1.4.3.2 Relaciones carbono nitrógeno (C/N) y carbono fósforo (C/P)

La relación C/N en el compostaje totalmente maduro se da cuando es mayor a 20/1, aunque es una condición necesaria pero no suficiente. Si los productos que se compostan poseen una relación C/N baja, menor a 18-19/1, el compostaje se lleva a cabo con mayor rapidez (Golueke & Díaz, 1987), pero se desprende como amoníaco el exceso de nitrógeno, produciéndose una autorregulación de la relación C/N (Jhorar, Phogat, & Malik, 1991).

Para un correcto compostaje en el que se aproveche y retenga la mayor parte del carbono y del nitrógeno, la relación C/N del material de partida debe ser la adecuada. Los microorganismos utilizan generalmente 30 partes de carbono por cada una de nitrógeno; por esta razón se considera que el intervalo de C/N teóricamente óptimo para el compostaje de un producto es de 25-35/1 (Jhorar, Phogat, & Malik, 1991).

La relación C/N es un importante factor que influye en la velocidad del proceso y en la pérdida de amonio durante el compostaje; si la relación C/N es mayor a 40/1, la actividad biológica disminuye y los microorganismos deben oxidar el exceso de carbono con la consiguiente ralentización del proceso, debido a la deficiente disponibilidad de N para la síntesis proteica de los microorganismos. Con el fin de eliminar el exceso de carbono (en forma de anhídrido carbónico), es necesaria la aparición sucesiva de diversas especies microbianas. Al morir estos microorganismos, el nitrógeno contenido en su biomasa se recicla y la relación C/N tiende a disminuir (Bueno & Díaz, 2008).

Por otra parte, el fósforo es el nutriente más importante, tras el C y el N, por lo que también debe estar presente en cantidades mínimas para que el proceso se lleve a cabo eficazmente. Una buena relación entre los principales nutrientes provoca una adecuada capacidad para la proliferación microbiana, al tener todos las nutrientes principales cantidades óptimas y estar en formas disponibles para la síntesis microbiana (Singh & Amberger, 1990).

1.4.3.2.3 Nutrientes

Los nutrientes poseen las características químicas necesarias en su composición elemental como son carbono, nitrógeno y fósforo, que son macronutrientes fundamentales para el desarrollo microbiano. El carbono es necesario en la síntesis celular para la formación del protoplasma, así como

lípidos, grasas y carbohidratos; durante el metabolismo se oxida para producir energía y anhídrido carbónico; es el elemento que debe estar presente en mayor cantidad puesto que constituye el 50% de las células de los microorganismos y el 25% del anhídrido carbónico que se desprende en la respiración. El nitrógeno es un elemento esencial para la reproducción celular debido a la naturaleza proteica del protoplasma y composición de ácidos nucleicos; se ha demostrado que la calidad de un compost como fertilizante está directamente relacionada con su contenido de nitrógeno. El fósforo desempeña un papel fundamental en la formación de compuestos celulares ricos en energía, siendo necesario para el metabolismo microbiano (Moreno & Moral, 2007).

Los microorganismos sólo pueden aprovechar compuestos simples, por lo que las moléculas más complejas se rompen en otras más sencillas como las proteínas en aminoácidos y estos en amoníaco, para poder ser asimiladas (Castaldi , Alberti, & Melis , 2005). La utilidad de los compostajes en la agricultura dependerá de la disponibilidad de los elementos nutritivos que posean (Kiehl, 1985).

Se comprueba que, en general, entre el inicio y el final de la incubación se produce un aumento de las concentraciones de los distintos nutrientes, debido a la pérdida de materia orgánica de la masa a compostar (Díaz, Jiménez, Cabrera, & De Bertoldi, 2004). Además de carbono, nitrógeno y fósforo existen otros nutrientes presentes en menor cantidad como los micronutrientes. Estos tienen un importante papel en la síntesis de las enzimas, en el metabolismo de los microorganismos y en los mecanismos de transporte intra y extracelular (Miyatake & Iwabuchi, 2006).

1.4.3.2.4 Materia orgánica

La calidad agronómica dependerá del contenido de materia orgánica del compost (Kiehl, 1985). Durante el compostaje, la materia orgánica tiende a disminuir debido a su mineralización y a la consiguiente pérdida de carbono en forma de anhídrido carbónico; estas pérdidas pueden llegar a representar casi el 20% del peso de la masa compostada (Zucconi & De Bertoldi, 1987).

La reducción de materia orgánica transcurre en dos etapas: en la primera se produce un rápido decrecimiento de los carbohidratos, transformándose las cadenas carbonadas largas en otras más cortas con la producción de compuestos simples; algunos de los cuales se reagrupan para formar moléculas complejas dando lugar a compuestos húmicos. En la segunda etapa, una vez consumidos los compuestos lábiles, otros materiales más resistentes como las ligninas se van degradando lentamente en compuestos húmicos (Tomati, Madejon, & Galli, 2000), generalmente este último cambio no finaliza durante el tiempo que dura el compostaje.

Algunos compuestos procedentes de la materia orgánica son utilizados por los microorganismos para formar sus tejidos y otros son transformados en anhídrido carbónico y agua. Los nuevos materiales formados poseen propiedades distintas a las de los materiales originales, confiriéndole a la masa unas características físicas y químicas distintas (Haug, 1993). La velocidad de transformación de materia orgánica depende de su naturaleza física y química, de los microorganismos que intervienen y de las condiciones fisicoquímicas del proceso humedad, aireación, temperatura y pH (Michel et al., 2004; Michel, Pecchia, & Rigot, 2004).

1.4.3.2.5 Conductividad Eléctrica (CE)

La conductividad eléctrica de un compost está determinada por la naturaleza y composición del material de partida, fundamentalmente por su concentración de sales y, en menor grado, por la presencia de iones amonio

o nitrato formados durante el proceso (Sánchez- Monedero, Roig, Paredes y Bernal, 2001).

La CE tiende generalmente a aumentar durante el proceso de compostaje debido a la mineralización de la materia orgánica, hecho que produce un aumento de la concentración de nutrientes. Un exceso de salinidad en la solución del suelo dificulta la absorción del agua por las raíces de las plantas, de modo que en algunos casos, en esas condiciones, sólo prosperan las especies resistentes. A veces ocurre un descenso de la CE durante el proceso, lo que puede deberse a fenómenos de lixiviación en la masa, provocados por el aumento de humedad. La dosis de compost que puede añadirse a un suelo debe ser proporcional a la CE del compost (Bueno y Díaz, 2008).

1.4.4 Lombricultura

En la década de los 70, la Universidad Agrícola de California inició programas de investigación para la aplicación de lombrices en la agricultura, y posteriormente, el gobierno de los EE.UU. estableció subvenciones para aquellas personas que deseaban iniciar el negocio. En 1979 habían 1500 explotaciones comerciales de lombrices en los EE.UU. Los principales países productores de lombricompost en América Latina son Chile, Brasil, Colombia, Argentina y Ecuador. Estos países cuentan con grandes explotaciones industriales de lombriz roja californiana. Filipinas es uno de los mayores productores de harina de lombriz para consumo humano, ya que la ausencia de olor y sabor la hace competitiva con la harina de pescado, tanto en calidad como en precio (Cristales, 1997).

Ocampo, 1999, sostiene que el humus de lombriz es el resultado de la digestión de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*), sustancia de color oscuro liviana totalmente inodora (Manual de lombricultura y compostaje). Es

un sustrato de gran uniformidad, contenido nutricional y excelente estructura física, porosidad, aireación, drenaje y capacidad de retención de la humedad durante un tiempo prolongado, lo que proporciona a las plantas todas las sustancias nutritivas para su desarrollo y máximo rendimiento; también es un fertilizante orgánico asimilable por plantas.

El humus de lombriz es uno de los mejores abonos orgánicos, porque posee un alto contenido en nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio, elementos esenciales para el desarrollo de las plantas. Ofrece a las plantas una alimentación equilibrada con elementos básicos utilizables y asimilables por sus raíces (FAMA, 2004).

En las plantas de lombricultura, se siembran varios tipos de lombrices para apoyar el proceso de compostaje:

Lumbricus rubellus, *Eisenia foetida* (lombriz roja Californiana) y *Eisenia andrei*.

Entre los tipos de lombrices, la más utilizada, a gran escala, en Cuba, Argentina, Chile, Perú y en el sur del Ecuador, es la lombriz roja californiana. Esta clase de lombriz ingiere grandes cantidades de materia orgánica. Excretan un 60% en forma de vermicompuesto, que constituye un sustrato ideal para la proliferación de microorganismos. Las lombrices transforman los minerales no asimilables presentes en los desechos y residuos animales, en nitratos y fosfatos directamente asimilables por las plantas (Roben, 2002).

1.4.4.1 *Eisenia foetida*

E. foetida es la especie más usada para compostaje. Se la conoce como “lombriz roja” o “californiana”, tolera factores ambientales, es potencial reproductor y tiene capacidad de apiñamiento, es de color rojo oscuro, respira

por medio de su piel, mide entre 6 y 8 cm, su peso puede alcanzar 0.8 y 1.4 g, no tolera la luz solar, si se la expone a la luz muere en pocos minutos, vive aproximadamente 4.5 años y pueden llegar a producir 1300 lombrices al año.

El humus de lombriz es muy concentrado (una tonelada de humus de lombriz equivale a 10 toneladas de estiércol), tiene un alto contenido de microorganismos y enzimas que ayudan en la desintegración de la materia orgánica. Así también, su alto contenido de auxinas y hormonas vegetales influye de manera positiva en el crecimiento de las plantas. El pH del humus es estable entre 7 y 7.5 (AGROLANZAROTE, 2013).

1.4.5 Takakura

El método de Takakura, inventado por el Dr. Koji Takakura, desde el 2005, es un tipo de compost que utiliza microorganismos aerobios que descomponen la basura orgánica en menor tiempo que otros métodos de compostaje. Esta alternativa reduce la cantidad de desechos orgánicos que se producen en los hogares cotidianos y en las labores que se realizan en el campo.

El método Takakura se originó en Asia, en la ciudad de Surabaya, Indonesia, donde el tratamiento de la basura orgánica e inorgánica fue grave problema ya que su producción sobrepasó la capacidad de la comunidad para gestionarla (Gaschk, Tamai, Vu, & Wisniewski, 2011).

Para descomponer los residuos orgánicos, el Método Takakura utiliza principalmente los microorganismos aerobios, lo que necesita un proceso de volteo para la aireación. Estos microorganismos se alojan en alimentos como el yogurt, levadura y vino, así como hojarasca (FONAG, 2010).

1.4.6 Bioabono

La producción de biofertilizantes constituye el ejemplo más representativo de la aplicación de la biotecnología enfocada a la obtención de productos metabólicos útiles a partir de materiales vivos. El proceso implica el desarrollo de dos fases: la fermentación y la recuperación de productos (Mateos, 2007).

Los bioabonos son biofertilizantes formulados con uno o varios microorganismos, mejorando la disponibilidad de los nutrientes cuando se aplican en los cultivos. Algunos son solubilizadores, ocupan el 10% de la población del suelo y se encuentran en la rizosfera. Ejemplos son los géneros *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Azotobacter* y *Actynomices* (Acuña, s/a).

1.5 Calidad del Abono Orgánico

Los abonos orgánicos son utilizados para mejorar y fertilizar los suelos agrícolas (Noriega & Altamirano, 1993; Jeavons, 2002; Cuesta, 2002; Paneque & Calaña, 2004). La calidad de las enmiendas orgánicas se evalúan a través de las propiedades físicas, químicas y biológicas (Lasaridi et al., 2006). Según (Leblanc, Cerrato, Miranda, & Valle, 2007.), la calidad de los abonos orgánicos se determina a partir de su contenido nutricional y de su capacidad de proveer nutrientes a un cultivo.

Para analizar la calidad de los biosólidos, la Normativa EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos) ha regulado a los residuos sólidos biológicos, su uso y disposición, bajo el *Code of Federal Regulations* (CFR), Código de Regulaciones Federales: 40 CFR, parte 503. La Norma EPA 503 Biosólidos, determina los niveles de patógenos permitidos (Tabla 1).

Tabla 1

Límites de población de microorganismos patógenos establecidos por la EPA, en la norma 503, para biosólidos que serán dispuestos en suelos.

Clasificación del Abono	Patógenos	Límites de población
Clase A	<i>Salmonella</i>	< 3 UFC/g
	Coliformes fecales	< 1x10 ³ UFC/g
	Virus entéricos	<1 PFU/g
	Huevos viables de helmintos	<1
Clase B	Coliformes fecales	2x10 ⁶ UFC/g

Fuente:(EPA, 2003).

1.5.1 Enfermedades humanas causadas por bacterias patógenas encontradas en el Compost

Según Prescott, 2009, de todas las especies bacterianas conocidas, tan solo unas pocas son patógenas para los seres humanos. La aplicación de compostaje puede representar un riesgo de contaminación por microorganismos si la fase termofílica no se desarrolla adecuadamente. Si el compost se elabora con la fracción orgánica de RSU es posible encontrar materiales derivados de animales o cadáveres de animales, restos vegetales y residuos de alimentos, donde previo al compostaje proliferan microorganismos patógenos.

Debido a la presencia de microorganismos patógenos, el compostaje puede ocasionar problemas de salud, de tal manera que los individuos que laboran en plantas de compostaje se encuentran en riesgo de adquirir enfermedades o presentar problemas de salud por los polvos orgánicos con esporas y microorganismos. Entre los posibles padecimientos están la inflamación pulmonar, asma ocupacional y bronquitis crónica, además de infecciones por virus, bacterias, hongos y protozoarios (Domingo & Nadal, 2009). La mayor parte de los microorganismos patógenos prefieren temperaturas por debajo de los 42°C ya que normalmente viven a la temperatura corporal del ser humano y animales o temperatura ambiente a las plantas. La mayoría parte morirán si se exponen durante un tiempo a condiciones más severas que las de su ambiente habitual (Trivierge & Seito, 2005).

1.5.1.1 Microorganismos patógenos encontrados en compostaje

El contacto con los microorganismos patógenos presentes en el compostaje ocurre por dos vías fundamentales, contacto directo y contacto indirecto. El contacto directo tiene lugar al caminar a través del área donde ha sido aplicado el compost, al tocar con las manos la tierra tratada y por inhalación de las bacterias durante la aplicación y diseminación de los productos.

El contacto indirecto puede ocurrir por ingestión de los alimentos cultivados en las áreas fertilizadas con el compost, al consumir productos lácteos obtenidos a partir de la leche de animales que se alimentan en suelos tratados y al ingerir agua contaminada con los microorganismos patógenos producto del escurrimiento de la tierra fertilizada (Gómez, 2004).

1.5.1.2 Bacterias patógenas en el compost.

El tratamiento realizado al compost para su aplicación como biofertilizante va dirigido a destruir las bacterias patógenas y mantener condiciones desfavorables para su crecimiento. El incremento de bacterias patógenas es limitado ya que las condiciones ambientales no son óptimas para su desarrollo y son incapaces de competir por los nutrientes con la microbiota autóctona del suelo, aunque su vigilancia y control es de vital importancia (Gómez, 2004).

Investigaciones realizadas recientemente indican que algunos patógenos tienen un umbral térmico más alto que otros. Además el tiempo y la temperatura necesaria para eliminar o reducir los peligros microbianos en el compost u otras materias orgánicas varían según el clima de la región y las prácticas concretas de gestión ambiental aplicadas en cada caso. FAO, 2000 planteó que los organismos patógenos pueden sobrevivir hasta 60 días en el compost.

En el Cuadro 1 se muestran los microorganismos patógenos que pueden encontrarse en el compost tratado inadecuadamente y las enfermedades causadas por cada uno de ellos.

Cuadro 1

Se muestran los microorganismos patógenos que pueden encontrarse en el compostaje, las enfermedades y síntomas.

Bacterias patógenas	Enfermedades/Síntomas
<i>Salmonella</i> sp.	Salmonelosis, gastroenteritis, fiebre tifoidea.
<i>Shigella</i> sp.	Disentería bacilar.
<i>Yersinia</i> sp.	Gastroenteritis.
<i>Vibrio cholerae</i> .	Cólera.
<i>Campylobacter jejuni</i> .	Gastroenteritis.
<i>Escherichia coli</i> .	Gastroenteritis.

Fuente:(Gómez, 2004).

1.5.1.2.1 Salmonella

Salmonella es uno de los géneros bacterianos patógenos entéricos más estudiados encontrados en el compost. Es conocido que la temperatura de 55°C por una hora es letal para los miembros de este grupo (Sorber y Moore, 1998).

La salmonelosis (gastroenteritis por *Salmonella*) está causada por cerca de 2000 serovariedades de *Salmonella*. En base a los estudios de homología del ADN, se piensa que todas las salmonelas conocidas pertenecen a una única especie, *S. enterica*, aunque su taxonomía es polémica. Las serovariedades de *Salmonella* aisladas con mayor frecuencia de los seres humanos son *thyphimurum* y *enteritidis* (Prescott, 2009).

El género *Salmonella* morfológicamente corresponde a bacilos, son Gram negativos, no fermentan lactosa, son anaerobios facultativos, de 0.7-1.5x 2-5 mm, no esporulados, generalmente móviles por flagelos peritricos (Caffer, Terragno, & Binztein, 2008).

Salmonella se encuentra en el tracto intestinal de aves, de otros animales y en los seres humanos. Se adquiere a partir de alimentos contaminados. Una vez que la bacteria entra en el cuerpo, el periodo de incubación tan solo es de ocho a 48 horas.

La enfermedad se produce como consecuencia de una infección alimentaria, ya que las bacterias se multiplican e invaden la mucosa intestinal, donde generan enterotoxinas y citotoxinas que destruyen las células epiteliales. Los síntomas son dolor abdominal, calambres, diarreas, nauseas, vómitos y fiebre, y suelen persistir de 2 a 5 días pero pueden llegar a durar varias semanas.

Durante la fase aguda de la enfermedad se encuentran hasta 1000 millones de salmonelas por gramo de heces. La mayoría de los pacientes adultos se recuperan, pero la pérdida de líquidos puede causar problemas en los niños y ancianos (Prescott, 2009).

Una de las enfermedades que causa *Salmonella enterica* serovariedad *typhi* es la fiebre tifoidea y se adquiere por alimentos y aguas contaminadas con heces de individuos infectados o por el contacto entre individuos (Prescott, 2009).

1.5.1.2.2 Shigella

La incidencia de *Shigella* en la población está relacionada con la calidad sanitaria del agua. Su destrucción tiene lugar en un período de tiempo más corto que para *Salmonella* y coliformes fecales (Feachem *et al.*, 1983).

La shigelosis, o disentería bacilar, es una enfermedad diarreica que se produce como consecuencia de una reacción inflamatoria aguda en el tracto intestinal causados por las cuatro especies de bacterias del género *Shigella*, que se caracteriza por ser bacilos Gram negativos, facultativos, inmóviles y no esporulantes. En los Estados Unidos de Norteamérica se registran aproximadamente entre 20000 y 25000 casos anuales, y en todo el mundo, la disentería bacilar causa aproximadamente 600000 muertes anuales (Prescott, 2009).

Shigella tan solo se encuentra en los seres humanos. *S. sonnei* es el patógeno habitual en los Estados Unidos y en Gran Bretaña, pero *S. flexneri* también es bastante común. Estos microorganismos se transmiten vía oral y fecal, principalmente desde los alimentos, dedos, heces y moscas. Su prevalencia es mayor en los niños.

Shigella es un parásito intracelular, anaerobio facultativo, que se multiplica en el interior de las células vellosas epiteliales del colon. Las bacterias inducen su fagocitosis por las células de la placa de Peyer; una vez fagocitadas, las bacterias desorganizan la membrana del fagosoma y se liberan en el citoplasma, donde se reproducen (Prescott, 2009).

En la evolución de la enfermedad participan tanto endotoxinas como exotoxinas, pero las bacterias no suelen diseminarse más allá del epitelio del colon. Las heces acuosas a menudo contienen sangre, mucus y pus (Prescott, 2009).

1.5.1.2.3 Coliformes

La presencia de organismos patógenos se presenta en el compost de mala calidad como consecuencia de una excesiva aireación, con la consiguiente reducción de temperatura. Los microorganismos que indican la presencia de patógenos son las bacterias coliformes (Puerta s/a).

Los coliformes, incluyendo *E. coli*, son miembro de la familia Enterobacteriaceae. Representan el 10% de los microorganismos intestinales del ser humano y otros animales; se han usado ampliamente como organismos indicadores. Pierden viabilidad en el agua dulce a menor velocidad que la mayoría de patógenos bacterianos intestinales. El grupo de coliformes incluye *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*, entre otros.

Los coliformes se definen como bacterias aerobias, Gram negativas, no productoras de esporas, bacilares fermentadoras de lactosa con la formación de gas en 48 horas a 35°C (Prescott, 2009).

Los microorganismos patógenos que proliferan en ambientes acuáticos pueden provocar cólera, fiebre tifoidea, disenterías, poliomielitis, hepatitis, salmonelosis, entre otros (FDA, 2002). La Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó que la morbilidad y mortalidad derivadas de las enfermedades más graves están asociadas a coliformes.

1.5.1.2.4 *Escherichia coli*

La inocuidad de los abonos orgánicos se refiere a eliminar, en la medida de lo posible, la posibilidad de que un abono orgánico ocasione daños a la salud humana. Los principales riesgos provienen de la presencia de microorganismos patógenos como *Escherichia coli* (Soto, 2004).

Es la bacteria mejor estudiada y el microorganismo de experimentación elegido por muchos microbiólogos, debido a que es un residente del colon de los seres humanos y de otros animales de sangre caliente. Algunas cepas producen gastroenteritis o infecciones de las vías urinarias (Prescott, 2009).

E. coli fue descrita por primera vez en 1885 por Theodor von Escherich, bacteriólogo alemán, quién la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor (Koneman, Allen, & Janda, 1999; Prescott, 2009). *E. coli* es una especie que pertenece a la familia de las Enterobactereaceae y cuyo hábitat natural es el suelo, el agua, la materia en descomposición y el tubo intestinal del hombre (principalmente intestino grueso) y los animales; por lo que han recibido el nombre de “bacilos género”. A esta familia pertenecen algunos de los microorganismos responsables y causantes de enfermedad gastrointestinal (Sánchez & Zavala, 2003).

Se estima que cada gramo de heces humanas contiene hasta 10^8 células de *E. coli*. Crece muy bien en medios simples; tiene movilidad y flagelos

perítricos; fermenta lactosa y forma un brillo verdoso sobre el agar de eosina y azul de metileno así como color rosa-rojo en agar MacConkey. Tiene actividad de descarboxilasa de lisina; utiliza el acetato como única fuente de carbono e hidroliza el triptófano para formar indol (Stuart, 2000; Rodríguez, 2002).

1.6 Métodos de identificación de los microorganismos.

La identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales, basados en las características fenotípicas. Los métodos genotípicos suelen reservarse para las bacterias que no pueden identificarse con métodos convencionales.

La identificación preliminar o definitiva de los microorganismos se basa en (1) morfología de la muestras, (2) estudio del crecimiento y características bioquímicas de los microorganismos aislados cultivos puros (3) pruebas inmunológicas que detectan anticuerpos o antígenos microbianos, (4) fagotipado y (5) técnicas moleculares (Prescott, 2009).

Según García, Fernández y Paredes, 1997, los criterios para la identificación de los microorganismos son:

- **Criterios morfológicos.**- Actualmente, estos aspectos son solo una forma primaria para identificarlos y se basan en la distinción celular y colonial de los microorganismos.
- **Tinciones diferenciales.**- son técnicas de rigor en la identificación de microorganismos, ya que las diferentes coloraciones que toman las bacterias u hongos, permiten definirlos por grupos. Ayudan a detectar con mayor facilidad la morfología celular bajo el microscopio.

- **Tipificación de fagos.**- Se basa en la interacción de un fago con una bacteria, apreciando la lisis que el fago ocasiona sobre la célula bacteriana a través de los receptores específicos.
- **Ensayos serológicos.**- Se basan en la reacción del anticuerpo presente en una preparación, con el antígeno que posee la célula microbiana. El ensayo por inmuno absorción ligado a las enzimas ELISA, ha sido empleado para la detección de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), *Escherichia coli*, entre otros.
- **Pruebas Bioquímicas.**- Se basan en la detección de un microorganismo a través de reacciones químicas específicas, de acuerdo a su metabolismo. Es un método ampliamente utilizado en el laboratorio y los patrones de identificación para cada microorganismo se han refinado con el pasar de los tiempos.
- **Biología molecular.**- Corresponde a la identificación de microorganismos mediante a la detección de su material genético. Para ello, es necesario el aislamiento de los microorganismos, la extracción de sus ácidos nucleicos, la amplificación del material genético, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de las bases de los nucleótidos.

1.7 Metales pesados

Algunos son micronutrientes esenciales para las plantas como cobre y el zinc, pero otros como el cadmio, plomo, cromo, níquel, mercurio y cobalto, no lo son y pueden a partir de una determinada concentración, resultar tóxicos para algún componente de la cadena trófica, suelo, plantas, animales y ser humano. La acumulación de metales pesados puede ocurrir en tallos, hojas y

frutos, causando problemas variados. El cadmio, níquel, cobre y zinc son los metales más problemáticos debido a su efecto negativo sobre el metabolismo y la fisiología de la planta, como baja actividad nitrogenasa y fosfatasa, disminución de la respiración mitocondrial, daños en los cloroplastos, cierre en los estomas, baja tasa de transpiración y fotosíntesis, reducción de turgencia y clorosis, entre otros (Acosta, Gutiérrez, & Ramírez, 2003). Algunas de las características de los metales pesados resumidas por Martínez, 2003, se presenta en el (Cuadro 2).

Al implementar a los residuos orgánicos urbanos al proceso de compostaje pueden tener efectos favorables debido a la adición de la materia orgánica y de nutrientes. También existen ciertos riesgos, en especial cuando se aplican en dosis masivas, considerando que los materiales básicos que los forman incorporan sustancias peligrosas, entre las cuales están los metales pesados lo que en mayor o menor grado pueden limitar su uso (Costa, García, Hernández, y Polo, 1991).

1.7.1 Características de los metales pesados

Cuadro 2

Las características de los metales pesados.

Metal	Características
Arsénico	Metaloide de amplia distribución como conservador de la madera, en los plaguicidas y en la fabricación de algunos medicamentos. Se acumula en los cuerpos de agua, en la cadena trófica. Su ingestión, aún en dosis bajas, produce desórdenes gastrointestinales, afectación del tejido dérmico y alteraciones del sistema nervioso central.
Plomo	Elemento ampliamente distribuido en la naturaleza, fabricación de pinturas, insecticidas, vidrios y baterías eléctricas, antidetonante de la gasolina y emisiones peligrosas al ambiente. El plomo afecta a los microorganismos retardando la degradación de la materia orgánica. En los animales superiores afectan los glóbulos rojos, hígado y riñones, causando diversidad de padecimientos.
Níquel	Se utiliza como catalizador en la industria metalúrgica y en la fabricación de cerámica. Inhibe la actividad biológica de los microorganismos. En el hombre afecta los pulmones.
Zinc	Se usa en metalúrgica como recubrimiento de otros metales; tiene toxicidad leve.
Cadmio	Subproducto de la explotación de otros metales como cobre, zinc y plomo. Se utiliza en el electroplateado, fabricación de pinturas, plásticos y en la fabricación de baterías. Su forma tóxica es el ion Cd^{+2} . Su acumulación afecta al hígado y riñones.
Cobre	Elemento muy abundante en la naturaleza, es micronutriente esencial, en dosis pequeñas.
Cromo	Se utiliza en la industria del cromado, fabricación de acero y curtido de pieles. Es tóxico y puede llevar a la muerte.
Mercurio	Es uno de los metales más peligrosos, se usa en la fabricación de los componentes eléctricos y electrónicos, en la industria del papel y en la agricultura. Su ingestión altera el sistema nervioso.
Selenito	Se considera un no metal. Normalmente se produce durante el refinamiento del cobre o la creación del ácido sulfúrico. A pesar de que es tóxico en grandes dosis, es un micronutriente esencial en el cuerpo como micronutriente.

Fuente: (Martínez , 2003).

Para determinar la calidad de los biosólidos como el compost, la Norma EPA 503 Biosolids, determina los límites permisibles de metales pesados permitidos (Tabla2).

Tabla 2

Valores de los límites permisibles de metales pesados establecidos por la EPA en la norma 503 para biosólidos dispuestos en suelos.

ELEMENTOS	Valores Límite (mg/Kg mat. Seca)	Tasa de carga acumulativa del elemento, (Kg/Ha)	Concentración del componente para una calidad excepcional (mg/Kg)	Tasa de carga anual del elemento (kg/Ha/año)
Arsénico	75	41	41	2
Cadmio	85	39	39	1.9
Cromo	-	-	-	-
Plomo	840	300	300	15
Mercurio	57	17	17	0.85
Molibdeno	75	-	-	-
Níquel	420	420	420	21
Selenito	100	100	100	5
Zinc	7500	2800	2800	140

Fuente: (EPA, 2003).

1.8 Fitotoxicidad de los vermicompostajes

La fitotoxicidad es un efecto detrimental, que a largo plazo puede ser nocivo o dañino de una sustancia química y podrá expresarse en distintos órganos de la planta. Es una característica indeseable, no siempre evitada en

el desarrollo de un nuevo compuesto químico (Carmona, Gassen, & Scandiani, 2009). Las sustancias tóxicas de determinadas plantas se pueden clasificar en alcaloides, fitotoxinas, resinoides y oxalato de calcio. Algunas plantas poseen proteínas tóxicas, ácidos orgánicos (ácido oxálico, y ácido monofluoracético), los cuales se pueden localizar ya sea en sus vesículas o el citoplasma de células embrionarias, entre otras partes funcionales de las plantas (Gómez, 1998).

Los altos niveles de Zn y Cu son considerados elementos tóxicos para las semillas (Page & y Chang, 1994). Además los elevados niveles de amonio son perjudiciales para las semillas (Olsthoorn, Keltjens, Van Baren, & Hopman, 1991). Zn, Pb y Cd son elementos potencialmente tóxicos (EPT) según Ye, Yang, Chang , & Wong, 2001.

Las enmiendas y los abonos orgánicos pueden ser fitotóxicos cuando el proceso no está estabilizado y es inmaduro. Afectan el crecimiento de las plantas y provocan daños en los cultivos. Los principales efectos que producen las sustancias tóxicas en las plantas son: reducción del crecimiento de la planta, enrollamiento foliar, manchas, clorosis y necrosis internerval, lesiones, caída de flores y frutos, así como reducción de la producción (Carmona, Gassen, & Scandiani, 2009). La toxicidad en semillas causa daños como la reducción de la germinación por muerte de semillas, plántulas deformadas, de menor altura, con hipocotíleos engrosados, vítreos y frágiles, hojas en forma de hoz que finalmente se atrofian, u hojas “cucharita”, hojas trifoliadas con encrespamiento (Bowers, Pratt, Beeson, & Lewis, 1997).

Esta situación se ha atribuido a la presencia de sustancias tóxicas por la biodegradación insuficiente de la materia orgánica (Keeling, Paton, & Mullett, 1994). El índice de germinación (IG) representa un indicador robusto para describir el potencial fitotóxico de un material orgánico y se obtiene integrando el porcentaje relativo de germinación y el crecimiento relativo de raíces. Existen tres niveles de fitotoxicidad: severa, moderada y baja o nula, lo cual es determinante, cuando se incorporan los materiales en pequeños

contenedores, ya que se maximiza la zona de retención (efecto maceta) adquiriendo mayor relevancia el potencial fitotóxico (Varnero, Orellana, & Santibañes, 2006).

1.9 Hipótesis

El análisis fisicoquímico y microbiológico de los abonos orgánicos de lombricultura, Takakura y bioabono de la planta de lombricultura del Centro de Gestión Ambiental de la Ciudad de Loja determina su calidad.

2 CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

Las empresas auspiciantes del proyecto de tesis fueron el Ministerio del Ambiente MAE, AGROCALIDAD y el Gobierno Autónomo de Loja (Anexo A).

En el estudio participó como director, Andrés Izquierdo Romero Ph.D, docente de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología y en calidad de tesista, Lic. Jessica Cristina Maisincho Asqui, egresada de la Maestría en Sistemas de Gestión Ambiental XII de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.

2.2 Zona de estudio

2.2.1 Trabajo de campo

La fase de campo fue llevada a cabo en la Planta de Lombricultura del Centro de Gestión Integral de los residuos sólidos en el sector Chontacruz (calles Llacurco y Cazaderos), sector sur-occidental de la ciudad de Loja-Ecuador, a una altitud de 2334 m.s.n.m, donde se recolectaron las muestras de los tres abonos orgánicos para el análisis en el laboratorio.

2.2.2 Trabajo de laboratorio

La fase de laboratorio fue desarrollada en el Laboratorio de Microbiología Ambiental perteneciente al Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Ecuador, Provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, Sangolquí, ubicación geográfica: 0°18'53",52 ° S, en donde se llevó a cabo el análisis microbiológico.

El análisis físico-químico de las muestras fue realizado en los Laboratorios de Suelos de Agrocalidad ubicado en Tumbaco, Av. Interoceánica Km. 141/2, Provincia de Pichincha, Ecuador.

2.3 Periodo de tiempo de investigación

La investigación se inició en septiembre del 2014 y se finalizó en marzo del 2015.

2.4 Procedimientos

2.4.1 Recolección de muestras

Se realizó el muestreo en la Planta de Lombricultura del Centro de Gestión Integral de los residuos sólidos en el sector Chontacruz de la ciudad de Loja, en referencia a la Normativa Técnica Ecuatoriana NTE INEN 220:2013. Fertilizantes o Abonos. Muestreo (Tabla 3).

Tabla 3

Número de muestras elementales de fertilizantes.

Tamaño del lote (Kg)	Número mínimo de muestras elementales
Hasta 15	3
16 -25	4
26-50	5
51-90	7
91-150	10
151-280	15
281-400	20
401-500	25
501-1200	35
1201-3200	50
3201-10000	75
100001-35000	100
35001-150000	150
Mayor a150000	200

Fuente: INEN, Normativa Técnica Ecuatoriana INEN 220: Fertilizantes y abonos muestreo, 2013.

El abono orgánico se encontraba en sacos ya empacados, y correspondían a la producción del mes de noviembre de 2014, que fue de 500 quintales/mes de humus de lombriz. Se tomaron cuatro quintales al azar por cada 100 quintales y 100 submuestras que fueron agrupadas en muestras compuestas de cuatro kilogramos. Para el abono orgánico Takakura y bioabono, la producción fue de 200 quintales/mes; se tomaron 12 sacos al azar y 75 submuestras para formar muestras complejas de cuatro kilogramos.

Para los análisis microbiológicos, las muestras se colocaron en recipientes estériles etiquetados, y fueron transportadas en un termorefrigerado al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Para los análisis físico-químicos, las muestras se colocaron en fundas plásticas estériles y fueron transportadas en un termo refrigerado al Laboratorio de Suelos de Agrocalidad (Figura 1).



Figura 1: Muestreo para el análisis microbiológico y físico-químico de los abonos Humus, Takakura y bioabono.

2.4.2 Pruebas de campo

En la Planta de Lombricultura del Centro de Gestión Integral de los Residuos Sólidos de la Ciudad de Loja. Se realizaron las pruebas físicas de campo para determinar olor, color, tamaño de las composteras, temperatura del área, proceso de los abonos, humedad relativa y contenido de materias externas (vidrios, plásticos, alambre y otros), mediante una encuesta al técnico encargado (Anexo B).

2.4.3 Fase de Laboratorio

2.4.3.1 Análisis Microbiológicos

Para determinar la inocuidad de los abonos orgánicos se buscó la existencia o ausencia de bacterias patógenas como: *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *Escherichia coli*, según las Normativa Técnica Ecuatoriana INEN.

2.4.3.2 Fase analítica

2.4.3.2.1 Aislamiento e identificación de *Salmonella* sp.

El aislamiento e identificación del género *Salmonella* se realizaron según la norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-15: Control microbiológico de los Alimentos. Aislamiento e identificación de *Salmonella*. (INEN, 2009). Además, se añadieron medios de cultivo selectivos y diferenciales que han demostrado buenos resultados en la recuperación de las bacterias objetivo de la investigación (Anexo C).

2.4.3.2.2 Pre-enriquecimiento

Se pesó 10 g de la muestra compuesta de cada abono orgánico (humus, Takakura y bioabono) en 90mL de agua de peptona tamponada estéril. Se homogenizó por 5 min, dejó reposar 60 min a temperatura ambiente y luego se incubó a 37°C, durante 18 h.

2.4.3.2.3 Enriquecimiento selectivo

Pasadas las 18 h de incubación correspondientes al pre-enriquecimiento de la muestra, se tomó 5mL y se colocó en 50 mL de caldo tetracionato verde brillante. Se incubó a 42°C durante 48 h. Además se puso 10 mL en 100 mL de caldo selenito y se incubó a 37° por 48 h.

2.4.3.2.4 Aislamiento primario en medios selectivos y diferenciales

Cumplido el periodo de enriquecimiento selectivo, a partir de los caldos se inoculó la muestra en medios sólidos selectivos y diferenciales, agar verde

brillante rojo fenol, agar *Salmonella – Shigella*, así como agares MacConkey y Hektoen. Se incubaron a 37°C por 24 h.

2.4.3.2.5 Selección y purificación de las colonias confirmativas

De cada medio selectivo y diferencial, se seleccionaron cinco colonias sospechosas bien separadas y se procedió a realizar los cultivos puros en agar nutriente inclinado. Se incubaron a 37°C por 24 h. Luego se realizó una tinción Gram para verificar su pureza y volver a repicar en nuevos tubos de agar nutriente inclinado.

2.4.3.2.6 Identificación bioquímica

A partir de los cultivos puros, se inocularon las bacterias en medio primario para reacciones bioquímicas de metabolismo como triple sugar iron agar (TSI). Se incubaron 37°C por 24h. De las presuntas salmonelas, se sembraron las colonias en los medios secundarios de identificación bioquímica como urea, caldo lisina decarboxilasa, prueba de beta galactosidasa, Voges Proskauer, prueba de indol, prueba de fenilalanina, citrato Simmons, entre otros. Los resultados se verificaron según la norma técnica ecuatoriana INEN para la determinación del género *Salmonella*.

2.4.3.2.7 Aislamiento e identificación de *Shigella* sp.

El aislamiento e identificación de *Shigella* se realizó según la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-16: Control microbiológico de los alimentos. Aislamiento e identificación de *Shigella* (INEN, 1996). También se consideraron otros medios de cultivo selectivos y diferenciales propicios para robustecer los resultados (Anexo D).

2.4.3.2.8 Pre-enriquecimiento

Se pesó 10 g de cada abono orgánico (humus, Takakura y bioabono) en 90 mL en agua de peptona estéril al 0.1% y se homogenizó. Se dejó reposar 1 h a temperatura ambiente.

2.4.3.2.9 Enriquecimiento selectivo

Pasadas las dos horas de incubación del pre-enriquecimiento de la muestra, se tomó 10 mL y se colocó en 100 mL de caldo Hajna para cumplir con el enriquecimiento selectivo. Se incubó a 37°C por 16 a 18 h.

2.4.3.2.10 Aislamiento primario en medios selectivos y diferenciales

Cumplido el periodo de enriquecimiento selectivo, se sembraron por estriado para obtener colonias aisladas en los medios sólidos selectivos y diferenciales XLD, MAC y SS. Se incubaron a 37°C por 24 h.

2.4.3.2.11 Selección y purificación de las colonias sospechosas

De cada placa de medio selectivo y diferencial, se seleccionaron colonias aisladas sospechosas para *Shigella*, se realizaron cultivos puros en agar nutriente inclinado y se incubaron a 37°C por 24 h. Luego se realizó una tinción Gram para verificar su pureza y volver a repicar en nuevos tubos de agar nutriente inclinado.

2.4.3.2.12 Identificación bioquímica

A partir de los cultivos puros, se inoculó en los medios primarios de identificación bioquímica, triple sugar Iron (TSI) y movilidad. Se incubaron a 37°C por 24 h. De las presuntas shigelas, se sembró en los medios

secundarios de urea, caldo lisina decarboxilasa, malonato, salicina, Voges Proskauer, prueba de indol, prueba de fenilalanina y citrato Simmons. Los resultados se verificaron según la Norma Técnica Ecuatoriana para determinar el género *Shigella*.

2.4.3.3 Fase analítica

2.4.3.3.1 Aislamiento e identificación de *Echerichia coli* y Coliformes

El aislamiento e identificación de *E. coli* y coliformes fue realizado según la norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-8, NTE INEN 1529-6, NTE INEN 1529-7 Control microbiológico de los alimentos. Aislamiento e identificación de *E. coli*. Para mayor seguridad de los resultados, se añadieron otros medios de cultivo selectivos y diferenciales (Anexo E).

2.4.3.3.2 Pre-enriquecimiento

Se pesó 10 g del abono orgánico de cada uno (humus, Takakura y bioabono) en 90mL en agua de peptona 0.1% y se homogenizaron. Se los dejó reposar durante 2 h a temperatura ambiente.

2.4.3.3.3 Aislamiento primario en medios selectivos y diferenciales

Concluida la hora de pre-enriquecimiento, se realizaron diluciones (10^{-1} hasta 10^{-7}). A partir de ellas, se inoculó en cajas Petri con medio de cultivo agar cristal violeta-rojo neutro-bilis. Se incubó a 30°C por 48 h.

2.4.3.3.4 Selección y purificación de las colonias confirmativas

De cada placa de medio selectivo y diferencial, se seleccionaron colonias aisladas sospechosas para *E.coli* para obtener cultivos puros. Las colonias fueron sembradas en agar nutriente inclinado y se incubaron a 35°C por 24 h. Luego se realizó una tinción Gram para verificar su pureza y volver a repicar en nuevos tubos de agar nutriente inclinado.

2.4.3.3.5 Identificación bioquímica

Para la identificación bioquímica, se siguió el método IMVIC, pruebas de indol, MR, VP y Citrato Simmons. Los resultados se interpretaron según las Normas Técnicas INEN para la identificación de *Echerichia coli*.

2.4.4 Placas Petrifilm Coliformes (3M)

El análisis de recuento total de coliformes fue hecho pesando 10 g de los abonos orgánicos (humus, Takakura y bioabono) y colocándolos en 90 mL de caldo de lactosa estéril. Se realizaron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-7} . Se inoculó 1 mL de la muestra en las placas de petrifilm según las instrucciones. Se incubaron las placas a 35°C por 24 h. Posteriormente se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC/mL) que presentaron color rojo y presencia de gas (Anexo F).

2.4.5 Identificación bioquímica y confirmación con pruebas API

Los resultados obtenidos de las pruebas morfológicas y bioquímicas se confirmaron mediante la ejecución de pruebas miniaturizadas API, siguiendo

las instrucciones de siembra y lectura de resultados, con el Índice Analítico de PerfilAPI 20E Medium, para Enterobacteriaceae (Benson, 2005).

2.5 Análisis físico-químicos

Los análisis físico-químicos de las muestras de los abonos orgánicos obtenidas en Loja fueron analizadas en el Laboratorio de Suelos, Foliar y Aguas de la Dirección de Servicios de Laboratorio de AGROCALIDAD, por la autora de esta tesis. Se determinaron los contenidos óptimos de nitrógeno, fósforo, así como la capacidad de intercambio catiónico, relación C/N, humedad, materia orgánica, macro y micronutrientes, presencia y concentración de metales pesados, pH, y conductividad eléctrica. Todos los métodos utilizados en el laboratorio están basados en el Standard Methods y en la RELASE (Red de Laboratorios de Suelos del Ecuador), corresponden a procesos certificados y son confidenciales.

2.5.1 Análisis de muestras de suelo

2.5.1.1 Preparación de las muestras

Las muestras de los abonos orgánicos colectadas (humus, Takakura y bioabono) fueron secadas en una estufa 70°C por 48 h. Fueron molidas y tamizadas a través de un tamiz de 2mm y almacenadas en fundas plásticas transparentes identificadas, para los respectivos análisis excepto el de densidad aparente (Figura 2).



Figura 2: Proceso de preparación de las muestras de los abonos orgánicos.

2.5.1.2 Determinación de las características fisicoquímicas de los abonos orgánicos

La caracterización físico-química de humus, Takakura y bioabono se basó en la determinación de los contenidos de niveles óptimos de los parámetros mencionados anteriormente.

2.5.1.2.1 Características físicas

La caracterización física de las tres muestras de abonos orgánicos se realizó según los procedimientos estandarizados por los Laboratorios de Suelos de Agrogalidad (Cuadro 3). No son detallados en esta tesis por confidencialidad.

Cuadro 3

Determinación física de las tres muestras de abonos orgánicos; procedimientos estandarizados por los Laboratorios de suelos de Agrogalidad.

Parámetro utilizado	Códigos de protocolos	Método
Determinación de humedad	PEE/SFA/35	Método suelos



Relación C/N	---	Cálculo
CIC	PEE/SFA/22	Absorción Atómica
Densidad real	PEE/SFA/	Picnómetro

2.5.1.2.2 Características químicas

Para realizar la caracterización química de las muestras de suelo, se llevaron a cabo los siguientes análisis (Cuadro 4):

- Materia orgánica (MO), por el método de titulación Walkey- Black.
- Nitrógeno (N), mediante el cálculo a partir de la materia orgánica.
- Fósforo (P), por colorimetría con extracción en Olsen modificado.
- Potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), cobre (Cu), manganeso (Mn), hierro (Fe) y zinc (Zn) por absorción atómica con extracción en Olsen modificado.

Cuadro 4

Determinación química de las tres muestras de abonos orgánicos; procedimientos estandarizados por los Laboratorios de suelos de AgroGalidad.

Parámetro utilizado	Referencia	Método
Determinación de pH	PEE/SFA/06	Potenciométrico
Conductividad Eléctrica	PEE/LS/05	Conductímetro
Ceniza	PEE/SFA/42	Gravimétrico
Materia orgánica	PEE/SFA/09	Gravimétrico
Nitrógeno total	PEE/SFA/09	Dumas
Fósforo	PEE/SFA/37	Colorimétrico
Potasio	PEE/SFA/38	Absorción atómica
Calcio	PEE/SFA/38	Absorción atómica
Magnesio	PEE/SFA/38	Absorción atómica
Hierro	PEE/SFA/39	Absorción atómica
Manganeso	PEE/SFA/39	Absorción atómica

2.5.2 Determinación de metales pesados

La determinación de metales pesados en los tres abonos orgánicos se hizo según los procedimientos estandarizados de los laboratorios de suelos de Agrocalidad, no se presenta su detalle por razones de confidencialidad (Cuadro 5).

Cuadro 5

Determinación de metales pesados de las tres muestras de abonos orgánicos; procedimientos estandarizados por los Laboratorios de suelos de Agrocalidad.

Parámetro utilizado	Referencia	Método
Cobre	PEE/SFA/39	Absorción atómica
Zinc	PEE/SFA/39	Absorción atómica
Cadmio	PEE/SFA/24	Absorción atómica/(Llama)
Plomo	PEE/SFA/56	Absorción atómica/(Llama)

2.6 Determinación de fitotoxicidad de los abonos orgánicos

La determinación de fitotoxicidad se realizó por el método de determinación del índice de germinación propuesto por Zucconi, Forte, & De Bertoldi, 1985, empleando semillas de quinua y el extracto de los abonos. El procedimiento consistió en mezclar 8 g de abono en 100 mL de agua, llevar a agitación por una hora, centrifugar y filtrar para obtener así el extracto acuoso (Tiquia, 2000).

En una cámara húmeda con papel toalla, se colocaron 10 semillas de quinua (*Chenopodium quinoa*) en cada caja Petri con 1mL del extracto del abono diario por siete días. Se mantuvieron a 25°C y en cámara de luz/oscuridad, ciclo 12/12 h.

Se realizó un diseño experimental en bloques completamente al azar con cuatro repeticiones por muestras de abono. Para el testigo se colocaron 10 semillas y 1 mL de agua destilada según Tiquia, 2000.

Se midió el porcentaje de germinación relativo (PGR), crecimiento de la radícula relativo (CRR) e índice de germinación (IG), según Tiquia (2000):

$$PGR = \frac{\text{Número de semillas germinadas (extracto)}}{\text{Número de semillas germinadas (control)}} * 100$$

$$CRR = \frac{\text{Enlogación de las radículas (extracto)}}{\text{Número de semillas germinadas (control)}} * 100$$

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

2.6.1.1 Análisis estadístico

Se obtuvieron las gráficas descriptivas de los datos del porcentaje de germinación, crecimiento radicular relativo y del índice de germinación mediante Microsoft Excel 2013. Para el análisis comparativo entre los abonos orgánicos y el testigo, se utilizó el software libre estadístico InfoStat, aplicando la prueba de T student.

3 CAPÍTULO3: RESULTADOS

Se presentan primero los resultados de los análisis microbiológicos de bacterias patógenas indicadoras *Salmonella* sp., *Shigella* sp., y *Echerichia coli* de los abonos orgánicos humus, Takakura y bioabono. En segundo lugar los resultados de los análisis físico-químicos y, por último, los de la prueba de fitotoxicidad.

3.1 Fase de Laboratorio

3.1.1 Análisis microbiológicos

3.1.1.1 Aislamiento de colonias del género *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *E. coli*.

Se aislaron cinco colonias bacterianas que presentaron características macroscópicas y microscópicas similares a las reportadas por bibliografía para *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*.

3.1.1.2 Descripción macroscópica celular

Las características macroscópicas más evidentes para *Salmonella* sp., fueron, color negro brillante, con borde entero, elevada y convexa, superficie lisa. Las colonias de *Shigellas* sp., color beige, translúcidas, lisas, con borde entero, convexa. *Echerichia coli*., color negro oscuro y con un brillo verde metálico en el medio Eosina y azul de metileno, superficie lisa, con bordo entero y convexa (Figura 3).



Figura 3: Características macroscópicas celular observadas de las colonias sospechosas: a) *Salmonella*, b) *Shigella* y c) *E. coli*. En medios de cultivo selectivos y diferenciales.

3.1.1.3 Descripción morfológica celular

Los cinco aislamientos presuntivos para *Salmonella*, *Shigella*, y *E. coli* fueron bacilos Gram negativos (Figura 4).



Figura 4: Tinción Gram de las colonias presuntivas: a) *Salmonella*, b) *Shigella* y c) *E. coli* (100x).

3.1.2 Análisis bioquímico

Las claves bibliográficas de identificación microbiana (Bergey's Manual y Normativa INEN) permitieron la caracterización de las colonias aisladas del bioabono, pertenecientes a los géneros *E. coli*. Para *Shigella* y *Salmonella* no se dieron coincidencias con dicha clave. Los resultados de algunas pruebas bioquímicas se muestran en la Figura 5. Las claves de identificación realizadas a cada colonia se detallan en el (Anexo G).

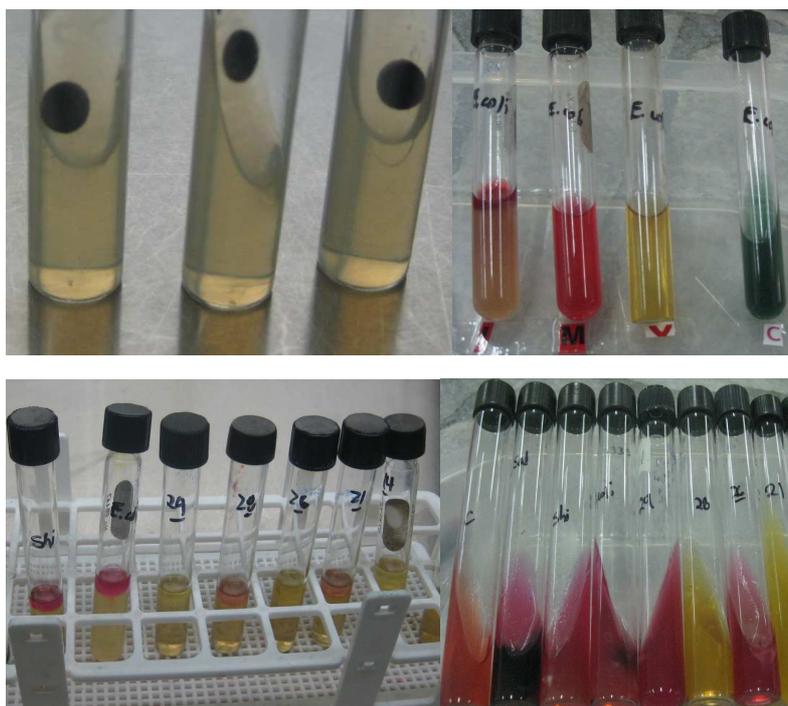


Figura 5: Pruebas bioquímicas realizadas a las colonias presuntivas aisladas de los tres abonos orgánicos: a) Oxidasa negativa para *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*, b) Pruebas IMVC para *E. coli*, c) Prueba de Voges Proskauer para *Shigella*, d) Fermentación.

3.1.2 Análisis confirmativo

El análisis confirmativo con pruebas miniaturizadas API corrobora la identificación bioquímica primaria y secundaria de las colonias pertenecientes a *E. coli*. El código de referencia fue 5144572 (Figura 6).



Figura 6: Análisis confirmativo de *E. coli* de la colonias, aisladas del bioabono.

En la Tabla 4 se muestran los resultados de los análisis microbiológicos de los abonos orgánicos para determinar las bacterias presuntas *Salmonellas*

sp., *Shigellas* sp. y *E. coli*. Los tres abonos orgánicos cumplieron con la norma para ausencia de *Salmonella* sp. y ausencia de *Shigella* sp. Humus y Takakura no presentan *E. coli*. En el bioabono se encontró *E. coli*, contraviniendo la norma. En cuanto a coliformes, los tres abonos lo presentan; sin embargo, no superan los límites permisibles por la norma internacional EPA 503.

Tabla 4

Análisis microbiológico y límites máximos permisibles según la EPA 503.

Patógenos	Norma EPA	Humus	Takakura	bioabono
<i>Salmonella</i>	Presencia o ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Shigella</i>	-	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>E.coli</i>	-	Ausencia	Ausencia	Presencia
Coliformes fecales	<1X10 ³ UFC/g	2,1x10 ² UF C/g	2,3x10 ² UF C/g	4,5X10 ² UFC/g

3.2 Análisis fisicoquímico

3.2.1 Resultados de las características fisicoquímicas

Los resultados de las características fisicoquímicas de los tres abonos orgánicos humus, Takakura y bioabono se presentan en la Tabla 5 y en el Anexo 8.

Los valores de humedad para los abonos orgánicos fueron: humus, 43,87 %, Takakura, 50.55 y bioabono, 55.86% La C.I.C para Abono humus con 65.77 cmol, Takakura fue 75.84 cmol Mg/Kg suelo, seguida por el Bioabono 67.5 cmol Mg/Kg suelo. Los valores del tamaño de la partícula para Takakura se encuentra en 1.23 cm, Bioabono 1.01 cm y humus con 1.2 cm. La relación de

C/N en el humus es de 17.66%, y para el Takakura fue el más bajo de 13.93% y para el Bioabono es de 20.78% como se muestra en la (Tabla 5).

Tabla 5

Características físicas de los abonos orgánicos (humus, Takakura, bioabono).

PARÁMETRO ANALIZADO	UNIDAD	Humus	bioabono	Takakura
Humedad	%	43,87	55,86	50,55
Densidad Real	g/mL	1,2	1,01	1,23
CIC	cmol/Kg	65,77	67,5	76,82
Relación C/N	---	17.66	20.78	13.93

Los resultados de los análisis químicos de los abonos orgánicos mostraron valores de pH para el humus el 7.42, Takakura es de 7.3 para Bioabono 8, de y La Conductividad Eléctrica (CE) para el Humus fue 9.6dS/m, para Takakura de 7.74 dS/m de mineralización y para el Bioabono de 7.36 dS/m. La materia orgánica para el humus fue del 20.07%, para el Takakura del 20.38% y para el Bioabono del 35.08%. El nivel óptimo en el compostaje estuvo en el 25%. El porcentaje de cenizas en el humus fue 79.93%, y para Takakura del 64.92 y para el bioabono del 79.62 % (Tabla 6).

Tabla 6

Características químicas de los abonos orgánicos (Humus, Takakura y bioabono).

PARÁMETRO ANALIZADO	UNIDAD	Humus	bioabono	Takakura
pH	---	7,42	8	7,3
Conductividad Eléctrica	ds/m	9,6	7,36	7,74
Cenizas	%	79,93	64,92	79,62
Materia orgánica	%	20,07	35,08	20,38
Nitrógeno	%	1,172	1,687	1,463
Fósforo	%	0,25	0,45	0,27
Potasio	%	0,52	0,95	0,4
Calcio	%	4,35	7,53	4,14
Magnesio	%	1,44	1,48	1,44
Hierro	ppm	1,09	0,78	1,12
Manganeso	ppm	129.66	288.74	107.48

3.2.1.1 Macro y micronutrientes

Los porcentajes de macronutrientes encontrados en los abonos orgánicos para potasio (K) en el humus fue del 0.52 % y Takakura del 0.4%. bioabono fue del 0.95%, La cantidad de micronutrientes encontrada en los tres abonos se presenta en un porcentaje inferior al 1%.

3.3 Metales pesados

La concentración de metales pesados evaluados en los tres abonos orgánicos fue menor a los establecidos en la legislación internacional (Tabla 7 y Figura 7).

Tabla 7

Resultado de los análisis fisicoquímicos para determinar metales pesados de los abonos orgánicos (humus, Takakura, bioabono).

PARÁMETRO ANALIZADO	UNIDAD	Humus	bioabono	Takakura	NIVEL ÓPTIMO	REFERENCIA
Cobre	Ppm	38,1	50,11	79,54	70-600	EPA-2003
Zinc	Ppm	199,78	338,88	197,57	210-4000	EPA-2003
Cadmio	mg/kg	0,09	0,15	0,1	0.7-1	EPA-2003
Plomo	mg/kg	62,43	12,748	57,02	70-1000	EPA-2003

Valores de concentración de los metales pesados de los tres abonos orgánicos

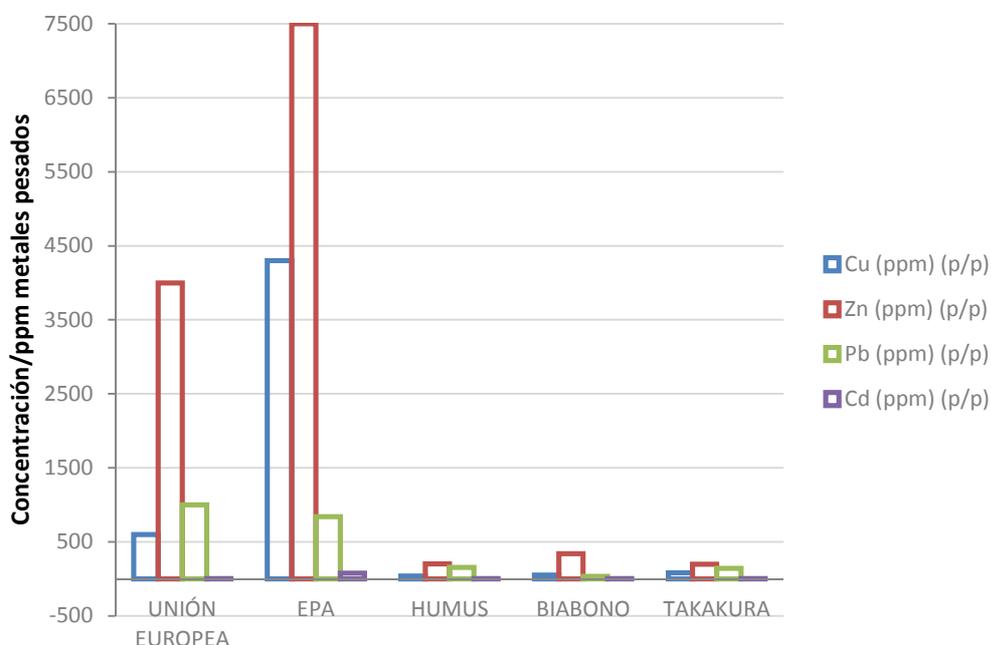


Figura 7: Comparación límites permisibles de metales pesados de la EPA 503, La Unión Europea con los abonos orgánicos humus, Takakura y bioabono.

3.4 Resultados de fitotoxicidad

Los valores del Índice de germinación para los abonos orgánicos son: humus 85.48%, Takakura está 85.23% y 86.98% para bioabono, Estos valores de $IG \geq 80$ indican que no hay sustancias fitotóxicos (Figura 8).

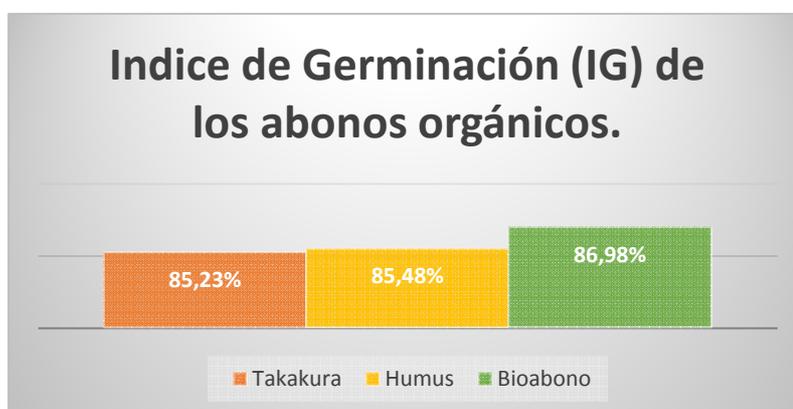


Figura 8: Porcentaje de Índice de Germinación de los Abonos Orgánicos.

3.4.1 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante la Prueba de t tomando como nivel de significancia $p < 0.05$ para comparar medias. Para ello se utilizó el programa infoStat.

Entre los abonos orgánicos humus, Takakura y bioabono no existen diferencias significativas en cuento al testigo ($p < 0.0005$) para el índice de germinación (Tabla 8).

Tabla 8

Índice de germinación en la aplicación de abonos orgánicos. Prueba de t.

Prueba t para una media							
Valor de la media bajo la hipótesis nula: 0							
Variable	n	Media	DE	LI(95)	LS(95)	T	p(Bilateral)
Control	4	7,75	0,50	6,95	8,55	31,00	0,0001
Takakura	4	6,50	0,58	5,58	7,42	22,52	0,0002
Humus	4	9,50	0,58	8,58	10,42	32,91	0,0001
Bioabono	4	8,25	0,96	6,73	9,77	17,23	0,0004

4 CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Identificación microbiológica de *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Escherichia coli*.

La ausencia de las bacterias *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *Echerichia coli* en el humus, Takakura y bioabono cumple con las normas de calidad (INEN y EPA) en cuanto a ausencia de patógenos intestinales. La ausencia se podría deber a que según Trivierge & Seito, 2005, la temperatura es uno de los factores que mejor indica el desarrollo eficiente del proceso de descomposición de la materia orgánica. El incremento de temperatura en los procesos de compostaje tiene dos efectos importantes: acelerar la descomposición y eliminar o disminuir las poblaciones de los microorganismos patogénicos existentes, además de eliminar a través de altas temperaturas huevos y larvas de las moscas, así como parásitos presentes en los materiales utilizados en el proceso.

4.2 Identificación físico-química

Para considerar la madurez de los abonos orgánicos, el material debe ser inocuo, es decir, libre de patógenos y de sustancias fitotóxicas, además de estar constituido por materia orgánica estabilizada (Costa, García, Hernández y Polo, 1991). Tales especificaciones indican que la cantidad de materia orgánica deberá tener entre 25 y 45% de peso seco; la relación C/N menor a 20 o cercana a 15; contenido mínimo de nutrientes en porcentaje de peso seco: N= 0.6; P=0.5; K=0.3; Ca=2.0 y Mg=0.3 (Zucconi & De Bertoldi, 1987). El nitrógeno debe estar principalmente en forma de nitratos (NO_4^-), ya que el amonio no debe exceder de 0.04%; los valores de pH entre 6.5 y 8; y el contenido de metales pesados debe tener ciertos límites establecidos. Los abonos orgánicos humus, Takakura y bioabono analizados en la investigación cumplen con estas características, excepción de la conductividad eléctrica

que sobrepasa los niveles óptimos. La conductividad eléctrica que presentan los tres abonos orgánicos son mayores a 1.5 ds/m debido a que en el compost de Residuos Sólidos Urbanos se pueden alcanzar niveles de salinidad considerables por la presencia de sales en los materiales originales y a su concentración relativa durante la mineralización parcial de los mismos (Cereijo, Ferro, Villar, Rodríguez, y Mato(2007). Lo recomendado es mantener valores de por debajo de 1.50 dS/cm de conductividad eléctrica porque cuando se presenta una cantidad excesiva de sales en el suelo, se impide la absorción del agua por la planta y, por ende, se modifica la adsorción de nutrientes (Portal, 2003).

Los abonos orgánicos humus, Takakura y bioabono son elaborados con residuos orgánicos municipales los cuales tienen un pH inicial bajo, de alrededor de 5, debido a los altos contenidos de ácidos grasos de cadena corta. En el compost terminado, el pH puede estar entre 8 y 9 por pérdidas de CO₂ en la respiración de los microorganismos. La presencia de ácidos orgánicos bajo condiciones de acidez y su ausencia cuando el compost se torna alcalino, es un indicador de que son un factor clave para la evolución del pH (Sundberg, 2005). Los microorganismos pueden tolerar factores ambientales extremos, por ejemplo altas temperaturas o bajos pH, pero no ambos al mismo tiempo. Otra posibilidad es la existencia de diferentes grupos de microorganismos: unos mesofílicos, ácido tolerantes y otros termofílicos, intolerantes a condiciones de acidez (Grau, 2002).

4.3 Identificación de Metales Pesados

Los metales pesados evaluados en el humus, Takakura y bioabono se encontraron en bajas concentraciones en relación a los límites permisibles, lo cual puede deberse a la amplia diversidad microbiana; existen microorganismos resistentes y tolerantes a metales. También es posible que durante el proceso de compostaje se diera un mecanismo de intercambio

iónico, donde el microorganismo actúa de modo semejante a una resina de intercambio iónico (Davis y col, 2003; Veglio y Beolchini, 1997; Vullo, 2003; Whiteley y Lee, 2006). La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos ambientes contaminados con metales pesados, tales como cadmio, cromo, plomo, níquel, cinc y cobre.

4.4 Prueba de fitotoxicidad

Diversos autores como Zucconi et al., (1981), Tiquia, (2000) y Emino y Warman (2004) determinan el índice de germinación (IG), integrando el porcentaje relativo de germinación y el crecimiento relativo de raíces como medida de la madurez. Esto permite establecer tres niveles de fitotoxicidad: severa, moderada y baja o nula. Según el criterio de interpretación de Zucconi (1985) valores de $IG \geq 80$ indican la ausencia de sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración; si el $IG \leq 50$ indica que hay una fuerte de sustancias fitotóxicas y si se obtiene un valor entre 50 y 80 se interpreta como la presencia moderada de estas sustancias. Para el caso del humus, Takakura y bioabono, los valores de $IG \geq$ son superiores al 80%, lo que indica que no existen sustancias peligrosas.

5 CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. En los abonos orgánicos humus, Takakura y bioabono se reporta ausencia de *Salmonella* sp., y *Shigella* sp.
2. Existe presencia de coliformes fecales (<1000 UFC/g) dentro del rango permitido por la norma internacional EPA 503, en los abonos orgánicos humus, Takakura y bioabono.
3. Los abonos orgánicos humus, Takakura y bioabono, en cuanto a sus características microbiológicas, se encuentran dentro de los límites permisibles comparados con la Normativa Internacional EPA 503.
4. Los parámetros físicos-químicos de los abonos orgánicos humus, Takakura y bioabono se encuentran dentro de los rangos de madurez y estabilidad comparados por las normativas internacionales NTAE-006-SMA-2006, MNX-FF-109-SCFI,2007, FAO,2013, y entre otros.
5. La conductividad eléctrica se encuentra en valores superiores a la MNX-FF-109-SCFI, 2007 (<4 ds/cm).
6. Los niveles de metales pesados en los abonos orgánicos humus, Takakura y bioabono, se encuentran dentro de los límites permisibles comparados con la EPA 503.
7. Los valores del índice de germinación IG en los extractos del humus, Takakura y bioabono son superiores al 80% de germinación, lo que indican ausencia de sustancias fitotóxicas, por lo que se define como abonos orgánicos maduros y estables.

6 CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Se debe realizar un monitoreo de la calidad de los abonos fisicoquímicos y microbiológicos en cada lote de producción.

Determinar la madurez de los abonos orgánicos en la planta de tratamiento de lombricultura de la ciudad de Loja, en la adquisición de un peachimetro y termómetro para realizar un monitoreo durante el proceso y mantener registros de medición.

Se debería complementar el estudio en el monitoreo de la temperatura y pH durante el proceso para determinar el tiempo de maduración del compostaje.

Determinar las proporciones y/o cantidades de residuos orgánicos, materias primas para equilibrar el CE y la relación carbono nitrógeno.

Se debería normar la calidad físico químico y microbiológico de los abonos orgánicos, en especial los que provienen de los residuos orgánicos municipales.

7 CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- ABAD, M. (1998). *Limitaciones y riesgos del uso agrícolas de los residuos orgánicos*. Colombia.
- Acosta, Y., Gutiérrez, E., & Ramírez, E. (2003). *Poder fertilizante de los lodos residuales proveniente de los tratamientos de aguas servidas*. Venezuela.
- AGROLANZAROTE. (2013). *Manual Practico para la Lombricultura*. AGROLANZAROTE.
- Álvarez, J. (2006). *Manual del compostaje para la Agricultura ecológico*.
- Benson´s. (2005). *Microbiological Applications*.
- BENZING, A. (2001). *Agricultura Orgánica. Fundamentos para la región Andina*. Alemania.
- Bidligmaier, W. (1996). Odour emissions from composting plants. *The Science of composting*, 71-79.
- Bowers, N., Pratt, J., Beeson, D., & Lewis, M. (1997). *Comparative Evaluation of Soil Toxicity using Lettuce Seeds and Soil Ciliates*.
- Brechelt, A. (2004). *Manejo ecológico del suelo*. República Dominicana.
- Caffer , M., Terragno, R., & Binztein, N. (2008). *Diagnóstico y caracterización de Salmonella*.
- Carmona, M., Gassen, D., & Scandiani, M. (2009). *Síntomas de fitotoxicidad en soja*. Argentina.
- Castaldi , P., Alberti, G., & Melis , P. (2005). *Study of the organic matter evolution during municipal solid waste composting aimed at identifying suitable parameters for the evaluation of compost maturity*.
- Cereijo, D., Ferro, J., Villar, A., Rodríguez, A., & Mato, S. (2007). *Estudio comparativo sobre la aptitud para el compostaje de la fracción orgánica de RSU separa en origen y la recuperación por separación mecánica a partir de la fracción inerte*.
- Costa, F., García, C., Hernández, T., & Polo, A. (1991). *Residuos orgánicos Urbanos. Manejo y utilización. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura*. Murcia. España.
- Cristales, O. (1997). *Sistema de crianza de lombriz de tierra, Alternativas de uso para el manejo de desechos sólidos. Fundación para el fomento de empresas para la recolección y tratamiento ambiental de sólidos*. El Salvador.

- Cuesta, M. (2002). *La Agricultura Orgánica y las dimensiones del desarrollo. XIII Congreso del INCA. Universidad Agraria de la Habana. La Habana.*
- Dalzell, H., Biddlestone, A., Gray, K., & Thurairajan, T. (1991). *Manejo. del suelo: producción y uso del compostaje en ambientes tropicales y subtropicales. Italia.*
- Díaz, M., Jiménez, L., Cabrera, F., & De Bertoldi, M. (2004). *Using a second order polynomial model to determine the optimum vinasse/grape marc ratio for in vessel composting.*
- Ekinci, K., Keener, H., & Elwell, D. (2004). *Effects of aeration strategies on the composting process: Part I. Experimental studies. .*
- EPA. (2003). *EPA part 503 Biosolids Rule. Estados Unidos.*
- FAO. (2003). *Food and Drug Administration center for food Safety and Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic Natural Toxins Handbook. USA.*
- FAO. (2013). *Manual del compostaje del agricultor. Santiago de Chile.*
- FDA. (2002). *Administración de drogas y limentos. Riesgos de enfermedades transmitidas por el agua en zonas rurales.*
- FONAG. (2010). Fondo para la Protección del Agua. Manual técnico Abonos Orgánicos protegen el suelos y garantizan alimentación sana.
- FONAG. (2013). *Fondo para la Protección del Agua. Método Takakura, una alternativa para el manejo responsable de la Basura orgánica. Quito.*
- FORSU. (s.f.). *Ganaderos Vegetales.*
- García, C. (2001). *Fertilización de los suelos y fertilización de los cultivos. Nicaragua.*
- García, P., Fernández, M., & Paredes, F. (1997). *Microbiología Clínica Aplicada. Madrid-España.*
- Gaschk, D., Tamai, A., Vu, H., & Wisniewski, D. (2011). *Waste Management Devikulam.*
- Golueke, C. (1977). *Biological Reclamation of solid Wastes. Rodale Press, Emmaus. USA.*
- Golueke, C., & Díaz, L. (1987). *Composting and the Limiting Factors Principle. Biocycle.*
- Gómez, R. (1998). *La toxicidad de las plantas ornamentales. Barcelona-España.*
- Grau, C. (2002). *Sistemas de compostaje en pilas volteadas. Estudio de la planta de compost de Jorda. Barcelona.*

- Haug, R. (1993). *The practical Handbook of Compost Engineering*. Florida.
- Jeavons, J. (2002). *Cultivo biointensivode alimentos*. .
- Jeris, J., & Regan, R. (1973). *Controlling Enviromental Parameterw fro optimun Composting*.
- Jhorar, B., Phogat, V., & Malik, E. (1991). *Kinetics of composting rice straw with glue waste atdifferent C/N ratios in a semiarid environmet*.
- Kaas, D. (1996). *Fertilidad de los suelos* . Costa Rica.
- Keeling, A., Paton, I., & Mullett, J. (1994.). *Germination and growth of plants in media containing unstable refuse-derived compost*.
- Kiehl, F. (1985). *Fertilizantes orgânicos*. Editora Agronômica Ceres Ltda, São Paulo. San Paulo.
- Kolmas, E; Vásquez, D;. (1996). *Estiércol y compost. Manual de Agroecología Ecológica*.
- Koneman , E., Allen, S., & Janda, W. (1999). *Diagnóstico Microbiológico*. Médica Panamericana.
- L., M. (2003). *Lombricultura*.
- Lasaridi, K., Protopapa, I., Kotsou, M., Pilidis, G., Manios, T., & Kyriacou, A. (2006). Quality assessment of composts in the Greek market: The need for standasds and quality assurance. *Journal of Enviromental Management.*, 58-65.
- Leblanc, H., Cerrato, M., Miranda, A., & Valle, G. (2007.). Determinación de la calidad de los abonos orgánicos a través de bioensayos. *Tierra Tropical.*, 97-107.
- Liang, C., Das, K., & McClendon, R. (2003). *he influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend*.
- Madejón, E., Díaz, M., López, R., & Cabrera, F. (2001). *New approaches to establish optimun moisture content for compostable materials*.
- MAE-PNGIDS. (s.f.). *Programa Nacional para Gestión Integral de los Desechos Sólidos*. Quito- Ecuador.
- Martínez , D. (2003). *Análisis comparativo de siseño de lagunas de estabilización para ciudades, pequeñas y medianas* . México.
- Martinez, R. (2003). *Lombricultura : Manual Práctico*. La habana.
- Mateos, P. (2007). *Biotecnología y organismos trangénicos*. Salamanca.

- Meléndez, G., & Soto, G. (2003). *Taller de abonos orgánicos*. Nicaragua.
- Michel, F., Pecchia, J., & Rigot, J. (2004). *Mass and nutrient losses during the composting of dairy manure amended with sawdust or straw*.
- Miyatake, F., & Iwabuchi, K. (2006). *Effect of compost temperature on oxygen uptake rate, specific growth rate and enzymatic activity of microorganisms in dairy cattle manure*.
- Mora, B. (2013). *Control Biológico de olores en la parte pecuaria con el kit bioremediador (Subtilin Pseudobio)*.
- Moreno, J. (2008). *Compostaje*. España.
- Moreno, J., & Moral, R. (2007). Madrid-España.
- Nakasaki, K; Nag, K; Karita, S;. (2005). *Microbial succession associated with organic matter decomposition during thermophilic composting of organic waste*.
- Noriega, G., & Altamirano, A. (1993). *Manual de Lombricultura*. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- Ocampo, C. (1999). *Proyecto de Factibilidad técnica económica para la producción de Humus en el altiplano de Bolivia*.
- Olsthoorn, A., Keltjens, W., Van Baren, B., & Hopman, M. (1991). *Influence of ammonium on fine root development and rhizosphere pH of Douglas-fir seedlings in sand*.
- OPS. (s.f.). *Organización Panamericana de la Salud. Manual para la elaboración del Compost. Bases conceptuales y procedimientos*.
- Page, A., & y Chang, A. (1994). *Overview of the past 25 years: Technical perspective*. Sewage sludge: Land Utilization and the Environment. ASA, CSSA & SSSA, Madison, WI.
- Paneque, V., & Calaña, J. (2004). *Abonos orgánicos, conceptos prácticos para su evaluación y aplicación*. Habana.
- Peña, E. (2002). *Producción de los abonos orgánicos para la agricultura urbana*. Habana.
- Pérez, A., Céspedes, C., & Nuñez, P. (s.f.). *Caracterización de enmiendas orgánicas en cultivos agrícolas*. República Dominicana.
- Pirque., E. A. (s.f.). *Manual de lombricultura y compostaje*.
- Prescott. (2009). *Microbiología*. Madrid: Séptima edición.
- Prescott. (2009). *Microbiología*. Madrid: Séptima edición.

- Puerta, S. (s.f.). Los residuos sólidos municipales como acondicionadores de suelos. *Lasallista de investigación-Vol I No I*.
- Restrepo, J., & Rodríguez, J. (2002). *El suelo, la vida y los abonos orgánicos*. Nicaragua.
- Roben, E. (2002). *Manual del compostaje para municipios*. Loja-Ecuador.
- Rodríguez, G. (2002.). *Principales características y Diagnóstico de los grupos Patógenos de Escherichia coli*.
- Rodríguez, M. (2010). *Evaluación de los contenidos de metales en Abonos orgánicos, sustratos y plantas*. La Habana.
- Ruiz, C; Russian, T; Tua, D;. (2007). Efecto de la fertilización orgánica en el cultivo de cebolla. *Agronomía tropical*, 8p.
- Sánchez- Monedero, M., Roig, A., Paredes, C., & Bernal, M. (2001). *Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH. Ec and maturity of the composting mixtures*.
- Sánchez, J., & Zavala, J. (2003.). *Fundamentos de la Microbiología Médica*.
- Shulze, K. (1962). *Continuous Thermophilic Composting*. *Appl. Microbiol.*, .
- Singh, C., & Amberger, A. (1990). *Humic substances in straw compost with rock phosphate*.
- Soto G. Melendez G. (2004). Cómo medir la calidad de los abonos orgánicos. *Manejo Integrado de Plagas y agroecología*, 91-97.
- Soto, M. (2003). Soto, M.G. (2003). *Abonos orgánicos: definiciones y procesos. Abonos orgánicos: definiciones y procesos. Abonos Orgánicos: principios, aplicaciones e impactos en la agricultura*. San José - Costa Rica: Ed.Meléndez.
- Stuart, W. (2000.). *Microbiología*.
- Suler, D., & Finstein, S. (1977). *Effect of Temperature, Aeration, and Moisture on CO₂ Formation in Bench-Scale, continuously Thermophilic Composting of Solid Waste*. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Sundberg, C. (2005). *Improving Compost Process Efficiency by Controlling Aeration, Temperature and pH*.
- Sundberg, C., Smars, S., & Jonsson, H. (2004). *Low pH as an inhibiting factor in the transition from mesophilic to thermophilic phase in composting*.
- Tchobanogolus, G., Theisen, H., & Vigil, S. (1994). *Gestión integral de residuos sólidos*. Madrid: McGrawHill.

- Tierra, A. d. (s.f.). *Manual de Compostaje*. Madrid.
- Tiquia, S. (2000.). *Evaluating phytotoxicity of pig manure from the pig on litter system*.
- Tomati, U., Madejon, E., & Galli, E. (2000). *Evolution of humic acid molecular weight as an index of compost stability*.
- Trautmann, T; Olynciw, E;. (2000). *Cornell Composting Science & Engineering*.
- Trivierge, C., & Seito, M. (2005). *Nuevas Tecnologías de vivero en Nicaragua, bandejas y sustratos mejorados compost*. Nicaragua.
- Vansintjan, G., & Vega, E. (1992). *La materia orgánica en el suelo y la aplicación de los abonos orgánicos*. Nicaragua.
- Varnero, M., Orellana, R., & Santibañes, C. (2006.). *Evaluación de especies sensibles a metabolitos fitotóxicos mediante bioensayos de germinación*. España.
- Varnero, M., Rojas, A., & Orellana, R. (2006). *Indices de Fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje*.
- Vásquez, J., & Cabral, M. (2001). *La inocuidad alimentaria. realidad y reto mundial*.
- Yanque, L. (2014). Importancia de los abonos en la Agricultura. *Revista de Investigación Universitaria* , 67-75.
- Ye, Z., Yang, Z., Chang , G., & Wong, M. (2001). *Growth response of Sesbania rostrata and Sesbania cannabina to sludge-amended lead/zinc mine tailings, A greenhouse study*.
- Zucconi, F., & De Bertoldi, M. (1987). *Specifications for solid waste compost*.
- Zucconi, F., Forte, M., & De Bertoldi, M. (1985). *Phytotoxins during the stabilization of organic matter*. . London, England.: Composting of agricultural and other wastes. Elsevier Applied Science.