



Evaluación del efecto de las lombrices *Eisenia* spp. en la reducción de bacterias patógenas presentes en el proceso de vermicompostaje hecho a partir de residuos orgánicos domésticos

Curipoma Chamba, Adrián Josué

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo M. Sc.

Sangolquí, 10 de marzo de 2022



Curipoma_UIC Copyleaks.docx

Scanned on: 14:25 April 29, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	26
Words with Minor Changes	9
Paraphrased Words	4
Omitted Words	0





Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Evaluación del efecto de las lombrices *Eisenia* spp. en la reducción de bacterias patógenas presentes en el proceso de vermicompostaje hecho a partir de residuos orgánicos domésticos”** fue realizado por el señor **Curipoma Chamba, Adrián Josué**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 10 de marzo de 2022



Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo

C. C. 1708200538



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Curipoma Chamba, Adrián Josué**, con cédula de ciudadanía n° 075091358-4, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Evaluación del efecto de las lombrices *Eisenia* spp. en la reducción de bacterias patógenas presentes en el proceso de vermicompostaje hecho a partir de residuos orgánicos domésticos** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 10 de marzo de 2022

Curipoma Chamba, Adrián Josué

C.C.: 075091358-4



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Curipoma Chamba, Adrián Josué**, con cédula de ciudadanía n° 075091358-4, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Evaluación del efecto de las lombrices *Eisenia* spp. en la reducción de bacterias patógenas presentes en el proceso de vermicompostaje hecho a partir de residuos orgánicos domésticos** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 10 de marzo de 2022

Curipoma Chamba, Adrián Josué

C.C.: 075091358-4

Dedicatoria

Dedico este trabajo principalmente a Dios, que me permitió llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres, Amán y Adela, que me han dado su apoyo incondicional; esta es la recompensa de todo el sacrificio hecho.

A mi hermana, Lorena, que me alentó en todo momento.

Adrián Josué Curipoma Chamba

Agradecimiento

Agradecimiento al cuerpo de docentes de la carrera de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, que han aportado con sus conocimientos y consejos para forjar mi carrera profesional.

Al Ing. Rafael Vargas y a la M. Sc. Karina Pone, que guiaron el proyecto a través de sus conocimientos para culminar con éxito esta investigación.

A mis padres, Amán y Adela, por ser el pilar más importante en mi vida, por todo su amor infinito y apoyo incondicional brindado durante la carrera y la vida, por sus sabios consejos y su confianza depositada en mí.

A mi hermana Lorena, por todo el cariño y apoyo que me dio durante mi etapa universitaria, por su soporte emocional y su impulso a no desfallecer.

A mis tías, Elva y Lorena, que compartieron su hogar conmigo y no dudaron en brindarme ese apoyo.

A mis amigos que han sido un soporte durante la carrera y que me alentaron en todo momento.

Adrián Josué Curipoma Chamba

Índice de contenidos

Índice de tablas	10
Índice de figuras	11
Resumen.....	12
Abstract	13
Capítulo I: Introducción	14
Formulación del problema	14
Justificación del problema	15
Objetivos de la investigación	16
<i>Objetivo general</i>	16
<i>Objetivos específicos</i>	16
Hipótesis	16
Capítulo II: Marco Teórico	17
Generalidades.....	17
Compostaje.....	18
Vermicompostaje.....	18
<i>Lombrices empleadas en el vermicompostaje</i>	20
<i>Características de las lombrices del género Eisenia</i>	20
<i>Mecanismos de defensa frente a patógenos</i>	22
Ventajas y desventajas del vermicompostaje	24
Microorganismos patógenos en el vermicompostaje.....	25
<i>Escherichia coli</i>	25
Capítulo III: Materiales y Métodos.....	28
Participantes.....	28
Zona de estudio.....	28
Período de tiempo de investigación.....	28

Diseño experimental y análisis de datos	28
Procedimiento	29
<i>Preparación del sustrato</i>	29
<i>Preparación de inóculos bacterianos</i>	30
<i>Toma de muestra de vermicompost</i>	30
<i>Caracterización del vermicompostaje</i>	30
Temperatura	30
pH	30
Porcentaje de humedad	31
<i>Recuento bacteriano</i>	31
<i>Disección de lombrices y recuento bacteriano</i>	33
Capítulo IV: Resultados	35
Caracterización del vermicompost	35
Reducción de bacterias patógenas	35
Presencia de <i>E. coli</i> en los intestinos de las lombrices de tierra	39
Capítulo V: Discusión	40
Capítulo VI: Conclusiones	42
Capítulo VII: Recomendaciones	43
Capítulo VIII: Bibliografía	44
Capítulo IX: Apéndices	51

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Características que presenta E. coli</i>	27
Tabla 2. <i>Medidas de pH del vermicompost</i>	35
Tabla 3. <i>ANOVA de 2 vías con nivel de confianza $\alpha= 0,05$</i>	38
Tabla 4. <i>Prueba de Duncan aplicada a los tratamientos</i>	38
Tabla 5. <i>Prueba de Duncan aplicada al factor de bloque</i>	39

Índice de figuras

Figura 1. <i>Esquema del manejo de residuos</i>	17
Figura 2. <i>Esquema general del proceso de vermicompostaje</i>	19
Figura 3. <i>Estructura interna de las lombrices de tierra</i>	21
Figura 4. <i>Comparación entre las lombrices de tierra y un reactor de flujo pistón</i>	22
Figura 5. <i>Esquema del factor citolítico celómico</i>	24
Figura 6. <i>Esquema del diseño experimental</i>	29
Figura 7. <i>Método de diluciones seriadas</i>	32
Figura 8. <i>Técnica de extensión en placa</i>	32
Figura 9. <i>Diseción de lombrices de tierra</i>	34
Figura 10. <i>Reducción de E. coli en el vermicompost a través del tiempo</i>	36
Figura 11. <i>Boxplot aplicado a cada tratamiento</i>	37
Figura 12. <i>Recuento bacteriano de la muestra de intestino a la semana 3</i>	39

Resumen

El vermicompostaje es un proceso de degradación de residuos orgánicos y surge como una alternativa ecológica y sustentable para su aprovechamiento. Al no contar con un proceso termofílico, no es posible eliminar patógenos que pueden afectar a la salud humana, sin embargo, la respuesta inmunitaria con que cuentan las lombrices de tierra y su entorno digestivo hacen que esto sea posible. Para evaluar el efecto de las lombrices de tierra en la reducción de patógenos en el vermicompost se inocularon sustratos de residuos orgánicos domésticos con *Escherichia coli* y se cuantificó su concentración cada semana mediante el recuento bacteriano. La concentración de *E. coli* disminuyó en un 97% a las 5 semanas de su inoculación en el tratamiento con lombrices, al igual que en el tratamiento sin lombrices, pero no representa una reducción significativa entre los tratamientos ($p=0,2342$) debido a una falla en el control de la humedad y aireación, sin embargo, la diferencia recae en el tiempo de reducción, pues se encontró que a la semana 2 se logró reducir en un 45 % la concentración de *E. coli* y a la semana 3 la reducción fue del 36% ($p<0,0001$). Estos resultados no permiten afirmar si las lombrices logran una disminución representativa de los patógenos en este tipo de sustrato.

Palabras clave: residuos orgánicos, vermicompostaje, lombrices *Eisenia* spp., *E. coli*, reducción

Abstract

Vermicomposting is a process of organic waste degradation and emerges as an ecological and sustainable alternative for its use. Due to the lack of a thermophilic process, it cannot eliminate pathogens that can affect human health; however, the immune response of earthworms and their digestive environment make this possible. To evaluate the effect of earthworms in reducing pathogens in vermicompost, household organic waste substrates were inoculated with *Escherichia coli* and their concentration was quantified every week by bacterial counts. The concentration of *E. coli* decreased by 97% 5 weeks after inoculation in the treatment with worms, as in the treatment without worms, but it does not represent a significant reduction between treatments ($p=0.2342$) due to a failure in the control of humidity and aeration, however, the difference lies in the time of reduction, since it was found that at week 2 the concentration of *E. coli* was reduced by 45% and at week 3 the reduction was 36% ($p<0.0001$). These results do not allow us to affirm if the worms achieve a representative reduction of pathogens in this type of substrate.

Keywords: organic waste, vermicomposting, *Eisenia* spp. earthworms, *E. coli*, reduction

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

La población mundial ha crecido exponencialmente durante los últimos años, lo que conduce a una mayor producción de alimentos para satisfacer sus necesidades, como consecuencia, se generan millones de toneladas de desechos orgánicos que no son tratados adecuadamente, contribuyendo a la contaminación ambiental (Scherhauser et al., 2018).

En Ecuador, el acelerado crecimiento poblacional que ha tenido en los últimos años, además de un incremento de las actividades comerciales y una rápida urbanización, ha ocasionado que se genere más basura (Solíz et al., 2020), y esto se ve reflejado en la producción *per cápita* de residuos, cuyo valor es de 0,86 Kg/hab/día, mientras que la cantidad de residuos sólidos recolectados al día ha incrementado con los años, pasando de 12,3 ton/día en el 2017, a 12,7 ton/día en 2018 (INEC, 2020). Esto provoca una sobrecarga en los sistemas de disposición de basura municipales.

Los sistemas de gestión de residuos municipales son los encargados de la disposición final de los residuos generados en la ciudad, pero aplican tratamientos convencionales, como rellenos sanitarios o vertederos a cielo abierto, que no son sostenibles (Chen et al., 2020), por ello es imperativo proponer y aplicar nuevas alternativas ecológicas que permitan darles una nueva utilidad y así lograr una disminución de la contaminación generada por estos.

Una alternativa que se presenta para mejorar el tratamiento de estos residuos es el vermicompostaje y consiste en un proceso de degradación de residuos biológicos mediante las interacciones entre lombrices y microorganismos (Procházková et al., 2018). Al ser una técnica sumamente sencilla, se puede aplicar desde los hogares, logrando que la población saque provecho de esta tecnología.

El vermicompost obtenido es rico en nutrientes, con una alta capacidad de retención de agua y actividad microbiana, características que han llamado la atención de los agricultores como una alternativa a los fertilizantes inorgánicos comerciales que contaminan y degradan la

calidad de los suelos, mejorando su fertilidad y el rendimiento de las plantas (Durak et al., 2017), pero al ser un proceso mesófilo, no es sometido a una estabilización termofílica para el control de microorganismos patógenos, propiciando su proliferación (Swati & Hait, 2018), esto provoca una baja calidad de saneamiento y un riesgo potencial para la salud (Soobhany et al., 2017).

Se ha encontrado que las lombrices de tierra mejoran la microbiota beneficiosa en el vermicompost y a su vez suprimen los microorganismos patógenos debido a la presencia de enzimas intestinales que actúan sobre la pared celular (Josková et al., 2009; Procházková et al., 2006), un entorno de oxígeno reducido dentro de los intestinos (Monroy et al., 2009) y por medio de receptores de reconocimiento de patrones solubles y de membrana, como el factor citolítico celómico (CCF), proteínas de unión a polisacáridos y receptores de tipo Toll (Škanta et al., 2013), que activan una respuesta inmunitaria (Roubalová et al., 2019). Sin embargo, esto no es una garantía de la inocuidad del vermicompost final.

Justificación del problema

Varios microorganismos patógenos se pueden encontrar en los alimentos utilizados para la cocina, ocasionando enfermedades, principalmente gastrointestinales, que pueden afectar a las personas. Algunas de las bacterias que generan este tipo de enfermedades incluyen *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y coliformes, y se encuentran principalmente en alimentos mal cocidos, verduras contaminadas con heces fecales, ente otras. Aplicar un proceso de descomposición para obtener un abono orgánico y que además ayude a eliminar estos patógenos es de vital importancia.

Dentro de la agricultura, el vermicompost, al ser utilizado por los agricultores, pueden exponerse a las enfermedades causadas por patógenos mencionadas anteriormente, además de contaminar el suelo con estos microorganismos. Ecuador no cuenta con una normativa que garantice la calidad de un vermicompost, pero países como Australia, Bélgica, Canadá, Reino Unido, cuentan con regulaciones ambientales y de calidad del vermicompost, donde se

delimitan los parámetros característicos de este producto, tanto fisicoquímicos como microbiológicos (Calahorrano, 2015), de ahí la importancia de asegurar la utilidad, seguridad e inocuidad del vermicompost para su uso en la agricultura y en la vida cotidiana.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

- Evaluar el efecto de las lombrices *Eisenia* spp. en la reducción de bacterias patógenas presentes en el proceso de vermicompostaje hecho a partir de residuos orgánicos domésticos

Objetivos específicos

- Construir y caracterizar una vermicompostera a partir de residuos orgánicos domésticos.
- Inocular la bacteria *Escherichia coli* sobre la vermicompostera a partir de un cultivo líquido.
- Analizar la reducción de la bacteria *E. coli* en la vermicompostera mediante el recuento bacteriano en medio selectivo.

Hipótesis

La bacteria *Escherichia coli* inoculada en el vermicompostaje hecho a partir de residuos orgánicos domésticos es reducida en forma significativa por el efecto de las lombrices *Eisenia* spp.

Capítulo II: Marco Teórico

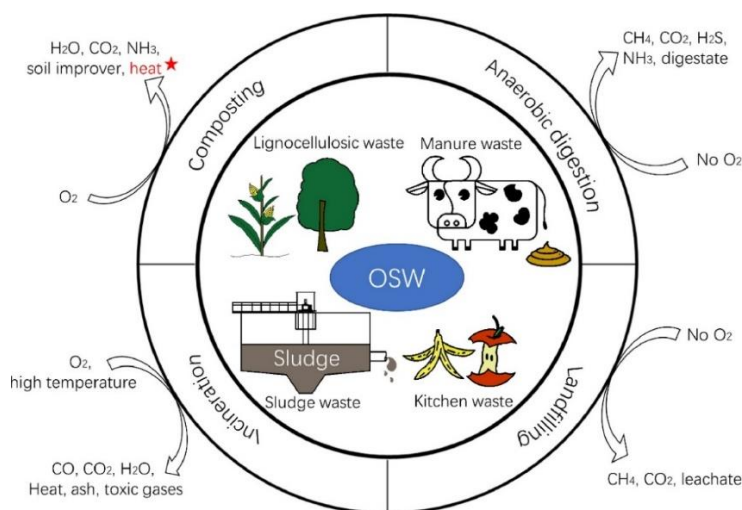
Generalidades

Se denominan residuos orgánicos a aquellos originados en organismos vivos e incluyen desperdicios alimenticios, residuos de la agricultura, desechos forestales, la fracción orgánica de los residuos municipales y se generan principalmente por la actividad de la vida humana (Du et al., 2020). Tienen la característica de ser biodegradable, pero su acumulación y falta de tratamiento generan un problema latente.

Para la gestión de estos residuos se aplican diferentes técnicas, como el vertido, la incineración y el tratamiento biológicos (Figura 1). El vertido consiste en la disposición de los residuos en un espacio del suelo (Vallero & Blight, 2019). La incineración es una técnica en la que se queman los residuos y ayuda a reducir su volumen, pero se generan gases como NOx, CO y partículas finas (Q. Wang et al., 2019). Los tratamientos biológicos, que incluyen la digestión anaerobia y el compostaje aerobio, son técnicas amigables con el medio ambiente y requiere de mucha humedad para que los microorganismos crezcan y descompongan el material (Fan et al., 2021).

Figura 1

Esquema del manejo de residuos



Nota: Recuperado de Fan et al. (2021)

Cuando estos residuos son sometidos a procesos de descomposición se puede obtener una materia orgánica rica en nutriente que puede agregarse al suelo, denominado abono orgánico, y ayuda al mejoramiento de sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Taylor, 2014). Las técnicas que generalmente se aplican para la descomposición de residuos son el compostaje y el vermicompostaje.

Compostaje

El compostaje es una técnica de degradación biológica de materia orgánica en el que se obtiene un material estable bajo condiciones aerobias y controladas de pH, humedad y temperatura (Lobo & Dorta, 2019). La temperatura es un punto crítico del proceso pues, al inicio, los microorganismos presentes empezarán a descomponer la materia orgánica en una etapa mesofílica y producto de esto, la temperatura comenzará a elevarse y se estabilizará hasta que los nutrientes disponibles se agoten y después disminuirá; cuando la temperatura se encuentra elevada, puede ser letal para algunos microorganismos patógenos, por lo que se puede garantizar la inocuidad del producto final (Q. Wang et al., 2019).

En Ecuador, específicamente en la ciudad de Quito, han nacido varias iniciativas con el fin de aprovechar estos recursos a través del compostaje, como la Iniciativa *Operaciones de Anuna*, que se encarga de proveer a las familias voluntarias un contenedor para que depositen los residuos orgánicos y luego son dispuestos a una compostera en el sector de Machachi para su descomposición; *Ayllu* es un servicio pagado en el que las familias pagan por el servicio y les proveen de los contenedores para separar estos residuos y finalmente llevarlos hasta la ciudad de Latacunga para su proceso de compostaje: las familias también pueden acercarse a sus instalaciones para dejar sus residuos de forma gratuita (Alarcón, 2020).

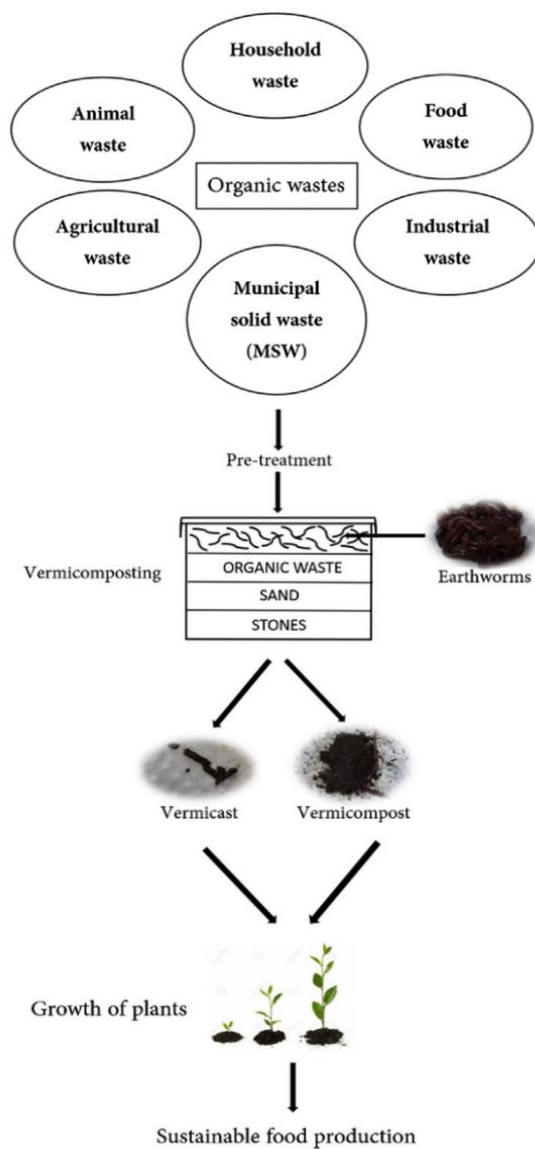
Vermicompostaje

El vermicompostaje es un proceso similar al compostaje, con la diferencia que la lombriz de tierra es la protagonista. Es un proceso oxidativo donde las lombrices ingieren los residuos orgánicos, rompiendo sus estructuras complejas en moléculas sencillas de asimilar para luego

eliminar lo que no logró digerir en forma de humus, un material rico en minerales y microorganismos benéficos que puede ser usado en la agricultura para un mayor crecimiento de las plantas (Kiyasudeen et al., 2020).

Figura 2

Esquema general del proceso de vermicompostaje



Nota: Recuperado de Kiyasudeen et al. (2020)

En comparación con el compostaje, este proceso es netamente mesofílico, es decir, la temperatura promedio a la que ocurre la transformación orgánica es a los 35°C, por lo que no

se logra una eliminación de patógenos (Aira et al., 2011). Los patógenos que se puedan encontrar en los residuos orgánicos pueden ser eliminados por la acción de las lombrices de tierra.

Lombrices empleadas en el vermicompostaje

Las lombrices utilizadas para el proceso de vermicompostaje se denominan epigeas, comúnmente conocidas como *habitantes de la basura*, se caracterizan por utilizar la materia orgánica para su alimentación, un alto metabolismo y reproducción, capacidad de adaptarse a las diferentes condiciones ambientales, además de un ciclo de vida corto (Kiyasudeen et al., 2020). En este grupo destacan las lombrices del género *Eisenia*.

Características de las lombrices del género Eisenia

Estas lombrices pertenecen al grupo de los anélidos oligoquetos, tienen un color marrón y su cuerpo se encuentra segmentado, tienen una longitud promedio de 35-130 mm y un diámetro de 3-5 mm, son hermafroditas, pero no pueden autofecundarse, por lo que se reproducen por fecundación cruzada (Shahnawaz et al., 2011). Para su correcto desarrollo, necesitan que el ambiente sea templado, con temperaturas que oscilen entre 19 y 20 °C (Edwards & Lofty, 1972), un porcentaje de humedad cercano al 80% (Gómez et al., 2007), no deben exponerse a la luz solar ya que son fotofóbicas y requieren de aireación para que puedan asimilar la materia orgánica con la que se alimentan (Barbado, 2003), además, su respiración se da por la piel (Kiyasudeen et al., 2020).

Su reproducción se da durante todo el año, cada 7 días, donde se obtienen hasta 2 cápsulas que se incuban hasta por 73 días y de cada cápsula pueden nacer hasta 4 lombrices (Saavedra, 2007; Shahnawaz et al., 2011). Cuando nacen las nuevas lombrices, tienen un color blanco que cambia con el tiempo hasta adquirir el color rojo oscuro característico; a los 40 días alcanzan su madurez sexual, por lo que ya se pueden reproducir (Edwards & Lofty, 1972).

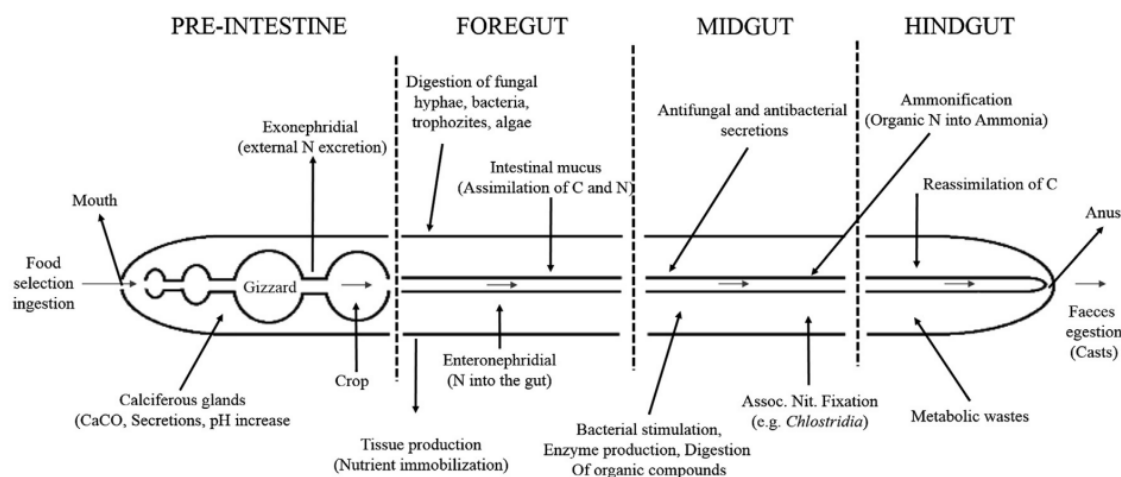
Las lombrices cuentan con estructuras nerviosas, circulatorias, digestivas, excretorias y reproductivas, cuentan con un prostomio lobulado y su cuerpo termina en el orificio anal; las setas

que se encuentran en cada segmento, junto con la secreción de moco, ayuda a la lombriz con su locomoción (Edwards & Lofty, 1972).

La estructura digestiva que tienen las lombrices permite que la materia orgánica ingerida sufra diferentes modificaciones, tanto físicas, químicas como biológicas (Ordóñez, 2016). Inicia en la boca, que se encarga de digerir los residuos orgánicos, la faringe, que interviene en la primera digestión de proteínas, el esófago, que conduce el alimento hacia la molleja, donde se va a triturar el alimento gracias a la contracción de los músculos circulares, el estómago se encarga de acelerar la digestión, el intestino, donde se procede a absorber los nutrientes requeridos por la lombriz, y el ano, que permite evacuar la materia orgánica parcialmente digerida (Edwards & Lofty, 1972; Kiyasudeen et al., 2020).

Figura 3

Estructura interna de las lombrices de tierra



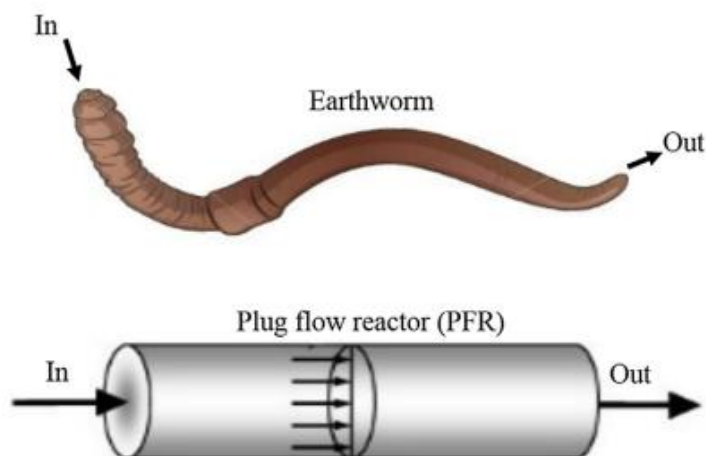
Nota: Recuperado de Kiyasudeen et al. (2020)

El trabajo realizado por los intestinos de las lombrices puede ser modelado siguiendo el esquema de un reactor de flujo pistón, debido a la similitud de su estructura con este tipo de reactores, un flujo continuo del material orgánico por parte de las lombrices, un gradiente de concentración de los nutrientes que se van absorbiendo en el intestino, y las condiciones dentro

del intestino prácticamente son neutras y van incrementando conforme se avanza en el tracto intestinal (Kiyasudeen et al., 2020).

Figura 4

Comparación entre las lombrices de tierra y un reactor de flujo pistón



Nota: Recuperado de Kiyasudeen et al. (2020)

Mecanismos de defensa frente a patógenos

Las lombrices de tierra presentan una inmunidad innata conservada que participa en la defensa de estos animales, incluyen la reparación de heridas, respuestas de coagulación y coagulación, y factores antimicrobianos como cascada de activación de enzimas (Bilej et al., 2013), pero también cuentan con una respuesta humoral como las moléculas de reconocimiento de patrones, aunque reconocen ciertas estructuras conservadas en los microorganismos (Schulenburg et al., 2007).

La respuesta celular es la primera línea de defensa en activarse cuando la lombriz entra en contacto con patógenos, inicia en la piel, que está constituida de mucopolisacáridos que actúan como antimicrobianos, y las células basales que intervienen en el proceso de cicatrización de heridas, generando una actividad fagocítica (Rahemtulla & Løvtrup, 1974). Como esta barrera puede ser falible, el siguiente punto de control es la cavidad celómica, que

cuenta con un gran número de células potencialmente fagocíticas llamadas celomocitos y puede evitar que microorganismos patógenos crezcan en este sitio (Bilej et al., 2013).

Otras formas que tienen las lombrices para eliminar a los patógenos incluyen la excreción del material por el nefridio (Cameron, 1932), expulsión de material fagocitado a través de los poros dorsales (Cameron, 1932) y mediante la encapsulación, proceso parecido a la fagocitosis, donde los celomocitos rodean al cuerpo extraño y luego de varios días se forma una cápsula densa llamada cuerpo marrón debido a su contenido de melanina, resultado de la cascada de profenoloxidasa (Bilej et al., 2013), y cuando alcanza un tamaño de 1-2 mm, se desplaza hacia los segmentos posteriores de la cavidad celómica y posteriormente es expulsada (S. Gupta & Yadav, 2016).

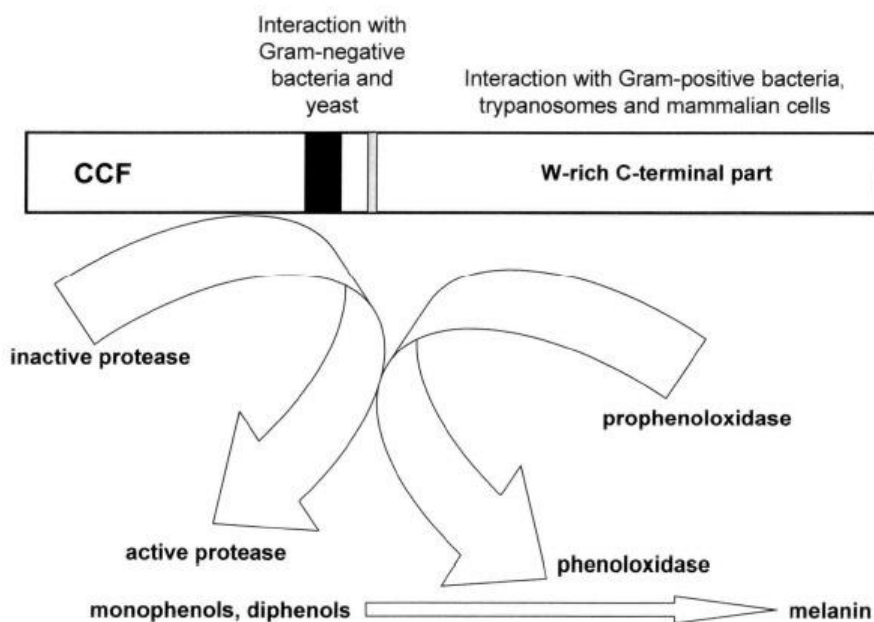
La respuesta humoral que presentan las lombrices de tierra incluye factores antimicrobianos como las lisozimas y los péptidos antimicrobianos (Bilej et al., 2013). Las lisozimas protegen a las lombrices de infecciones causadas por bacterias Gram positivas ya que se encargan de hidrolizar los polímeros presentes en su pared celular y se encuentran principalmente en el líquido celómico (Quaglino et al., 1996). Los péptidos antimicrobianos son un conjunto de moléculas efectoras que actúan sobre los microorganismos para su eliminación (Bilej et al., 2013). Se han reportado pocos péptidos en los anélidos, en *Eisenia fetida* se encontró un péptido de 5 aminoácidos, denominado OEP3121 y tiene un potencial para destruir líneas celulares de cáncer humano (X. Wang et al., 2003).

El factor citolítico celómico (CCF) se presenta como una molécula de reconocimiento de patrones y es un mecanismo sumamente importante en la defensa de las lombrices de tierra (Bilej et al., 2013). Estas moléculas tienen una alta especificidad gracias a los dos dominios similares a lectinas de reconocimiento de patrones diferentes espacialmente (Figura 5): el primer dominio se ubica en la parte central y presenta una homología con los motifs de polisacáridos y glucanasa de la β -1,3-glucanasas, y el segundo dominio que es rico en triptófano C-terminal (Bilej et al., 2001). Este CCF permite defender a la lombriz de las

bacterias, ya sean Gram positivas o Gram negativas, contribuyendo en la opsonización de estos por parte del líquido celómico, además, interviene en reacciones citotóxicas que potencian la actividad lítica del líquido celómico frente a eritrocitos de otras especies (Bilej et al., 2013).

Figura 5

Esquema del factor citolítico celómico



Nota: Recuperado de Bilej *et al.* (2013)

Ventajas y desventajas del vermicompostaje

El vermicompostaje se muestra como una alternativa a la actual gestión de residuos sólidos y permite obtener derivados de alto valor agrícola. A diferencia del compostaje convencional, esta técnica acelera la descomposición de la materia orgánica, convirtiéndolo en vermicompost en un menor tiempo (Pathma & Sakthivel, 2012).

El vermicompost ayuda a potenciar los nutrientes presentes en el suelo, incrementa la disponibilidad y conservación de estos nutrientes para las plantas (C. Gupta et al., 2019), cuenta con una alta porosidad, aireación y capacidad de retención de agua (Thakur et al., 2021), proliferación de microorganismos benéficos que contribuyen en la degradación de la

materia orgánica (Pierre et al., 1982), tiene una mayor disponibilidad de nitrógeno en forma de nitratos (Atiyeh et al., 2000) y puede actuar como biocontrol al evitar ataques de plagas en las plantas (C. Gupta et al., 2019).

Las desventajas que presenta esta técnica son: el tiempo que toma transformar los residuos orgánicos es de 2 meses o más (Pierre et al., 1982), el material a degradar es susceptible al ataque de animales, requiere de una constante aireación del material para evitar que la temperatura incremente y controlar la humedad, ya que un exceso o falta de agua en el material puede ser letal para las lombrices (C. Gupta et al., 2019).

Microorganismos patógenos en el vermicompostaje

Los residuos orgánicos que son desechados presentan una cantidad abundante de microorganismos patógenos que ponen en peligro la salud humana, por ello, se han seleccionado algunos de estos organismos como indicadores, que se caracterizan por una sobrevivencia en condiciones extremas y su eliminación de los residuos se puede correlacionar con la eliminación de patógenos (Swati & Hait, 2018).

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) tiene como indicadores a patógenos como *Salmonella*, virus entéricos, óvulos de helmintos viables y coliformes fecales y han establecido límites permisibles que se deben llegar en el proceso de estabilización de desechos (Environmental Protection Agency, 2003). Los estándares BSI-PAS difieren de los estipulados por la EPA y consideran como indicadores a *Escherichia coli*, al igual que la CCME que incluye a *Shigella* como otro indicador patógeno (Swati & Hait, 2018).

Escherichia coli

E. coli es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, del orden Enterobacteriales; son bacilos Gram negativos dispuestos individualmente, en pares o en cadenas cortas, que no generan esporas, presentan movilidad gracias a flagelos peritricos y en medios de cultivo se presenta como colonias mucoides, además, cuentan con una cápsula de naturaleza polisacárida que le permite resistir la defensa del huésped en una fase temprana de

infección (Samanta & Bandyopadhyay, 2020). Esta bacteria es anaerobia facultativa y generan gas por la fermentación de carbohidratos y presentan fimbrias hidrofóbicas de estructura variable que le ayuda a adherirse a superficies del huésped o de un órgano de éste (Percival & Williams, 2014).

E. coli tiene un origen fecal y se la puede encontrar en el tracto intestinal de los animales homeotermos y también puede encontrarse en el medio ambiente (Percival & Williams, 2014). Existen diferentes cepas de *E. coli* y la mayoría de ellas no son patógenas, pero algunas de ellas pueden provocar enfermedades diarreicas, principalmente por su presencia en los sistemas de agua potable; Entre las cepas más estudiadas se encuentra la O157:H7 o enterohemorrágica, que ha causado numerosos brotes (Gordon, 2013).

La mayoría de sus cepas pueden fermentar la lactosa y en su presencia también manifiestan una reacción positiva a O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) por actividad de la β -galactosidasa, además, pero su característica particular que la diferencia de las bacterias entéricas es la producción de indol a partir del triptófano ya que cuentan con la enzima triptofanasa (Chu et al., 2012). *E. coli* no puede hidrolizar la úrea ni pueden producir gelatinasas, además, no crece en caldo KCN de Muller ya que su crecimiento es inhibido por el cianuro presente en este medio (Percival & Williams, 2014).

Para su aislamiento, se pueden utilizar medios de cultivos diferenciales. En agar sangre se pueden visualizar como colonias lisas o rugosas de 2-3 mm de diámetro, con forma convexa, húmedas, brillantes y margen entero, y la hemólisis varía según la cepa (Samanta & Bandyopadhyay, 2020). En agar MacConkey, las colonias toman una coloración rosa debido a que el medio contiene lactosa y las bacterias la fermentan, acidificando el medio, mientras que en agar eosina azul de metileno (EMB), las colonias se visualizan con un brillo metálico verdoso en su superficie como consecuencia de la fermentación de la lactosa y de la combinación de la eosina y el azul de metileno en pH ácido (Wanger et al., 2017).

El aislamiento de *E. coli* en agar Chromocult permite obtener colonias de entre color azul oscuro y violeta debido a la escisión del X-glucorónido y el Salmon-GAL (sustratos disponibles en el medio) por las enzimas β -D-glucoronidasa y β -D-galactosidasa, respectivamente, presentes en esta bacteria (Milipore, 2020).

Percival y Williams (2014) resume las principales características que tiene *E. coli* en la siguiente tabla:

Tabla 1

Características que presenta E. coli

Características	Reacción
Tinción Gram	Negativa
Crecimiento aerobio y anaerobio	+
Motilidad	+
Oxidasa	+
Catalasa	+
Crecimiento en agar MacConkey	+
Fermentación de manitol	+, producción de gas
Lactosa, 37°C	Ácido +, gas +
Lactosa, 44°C	Ácido +, gas +
Adonitol	Rara vez fermentado
Inositol	Rara vez fermentado
Indol a 37°C	Usualmente producido
Indol a 44°C	Usualmente producido
Reacción a rojo de metilo	+
Reacción de Voges-Proskauer	-
Úrea	No es hidrolizada
Deaminación de PHE	-
H ₂ S en medio triple azúcar hierro (TSI)	No hay ennegrecimiento
Crecimiento en medio potasio cianuro (KCN)	Crecimiento inhibido
Oxidación de gluconato	-

Nota: Recuperado de Percival y Williams (2014)

Capítulo III: Materiales y Métodos

Participantes

El presente proyecto “Evaluación del efecto de las lombrices *Eisenia* spp. en la reducción de bacterias patógenas presentes en el proceso de vermicompostaje hecho a partir de residuos orgánicos domésticos” fue realizado en colaboración con el Laboratorio de Enzimología del CICTE, perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicado en Sangolquí, en la Av. General Rumiñahui s/n y Ambato. El tutor del proyecto fue Rafael Eduardo Vargas Verdesoto M. Sc., docente de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología.

Zona de estudio

El proyecto de investigación se llevó a cabo en dos lugares: el trabajo de campo, realizado en el Barrio Reino de Quito, ubicado en las calles Toylla y Vicente Angos, de la ciudad de Quito, y el trabajo de laboratorio efectuado en el Laboratorio de Enzimología del CICTE, de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Período de tiempo de investigación

La investigación inició en el mes de noviembre de 2021 y finalizó en el mes de febrero de 2022, teniendo una duración de 3 meses.

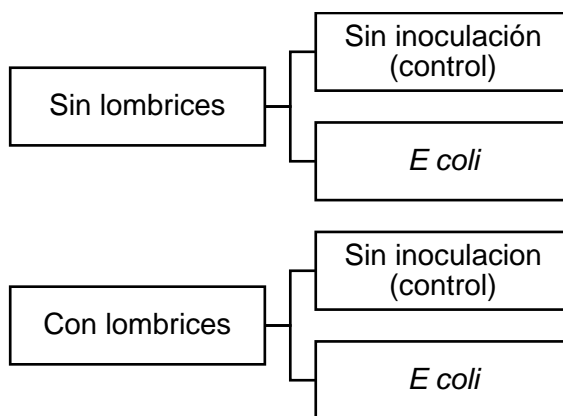
Diseño experimental y análisis de datos

Para determinar el papel de las lombrices en la eliminación de los patógenos en el vermicompostaje, se planteó un diseño en bloque completamente al azar, donde se realizó la comparación de sustratos con y sin lombrices de tierra, y en muestras control y sustratos inoculados con *E. coli* (Figura 6); se tomó en cuenta al tiempo en semanas como factor de bloque. Las muestras fueron tomadas para su análisis cada 7 días a partir de la semana 2 y todas las muestras se tomaron por triplicadas, además, se consideró tres repeticiones del experimento. La cepa bacteriana fue proporcionada por el Laboratorio de Enzimología del CICTE-ESPE.

Los factores que se controlaron en la experimentación fueron el pH, la temperatura y la humedad del vermicompost, la unidad experimental fue la muestra de vermicompost y la variable de respuesta es la concentración de microorganismos por gramo de sustrato (UFC/g) y para su medición se aplicó un recuento bacteriano.

Figura 6

Esquema del diseño experimental



El análisis estadístico comprendió un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías y la comparación de tratamientos y factor de bloque mediante una prueba de Duncan que se realizó con la ayuda del software InfoStat con un nivel de significancia de 0.05; para obtener los gráficos se empleó GraphPad Prism.

Procedimiento

Preparación del sustrato

El vermicompostaje fue elaborado a partir de residuos orgánicos domésticos proporcionados por los hogares del Barrio Reino de Quito, ubicado en las calles Toylla y Vicente Angos, de la ciudad de Quito, y del Mercado Mena 2, ubicado en la Avenida Angamarca. El material recolectado fue precompostado durante quince días con el fin de facilitar la aceptación del mismo por parte de las lombrices. Se excluyó material cítrico ya que pueden modificar el pH del compost y afectar la actividad de las lombrices.

Se colocó una mezcla de material precompostado (75%) y material fresco (25%) en contenedores de 19 L y se añadió 15 g de lombrices de tierra del género *Eisenia*. Los contenedores fueron ubicados en un lugar ventilado y oscuro para evitar que las lombrices se vean afectadas.

Preparación de inóculos bacterianos

Las cepas bacterianas fueron cultivadas en caldo triptona soja (TSB) y posteriormente se esparció aproximadamente 62,5 mL del cultivo sobre el sustrato, tratando de homogeneizar todo. Para determinar la concentración inicial presente en los sustratos se realizó un recuento bacteriano de *E. coli* en medio selectivo agar Chromocult, las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 48 horas y solo las colonias de color azul oscuro a violeta fueron cuantificadas para definir las UFC/g del vermicompost.

Toma de muestra de vermicompost

La toma de muestra se realizó en tres puntos al azar de la vermicompostera y se tomó aproximadamente 10 g de vermicompost. La muestra fue depositada en un frasco estéril y trasladada de inmediato al laboratorio para los análisis respectivos.

Caracterización del vermicompostaje

Temperatura

La temperatura de cada tratamiento fue determinada con un termómetro de punta metálica, fue introducida en el vermicompost durante 2 minutos y se tomó la lectura correspondiente.

pH

Para la medición del pH se tomó una muestra de vermicompost y se diluyó en agua destilada en una proporción de 1:1. Una vez que se mezcló, se utilizó un pH-metro para realizar la medición de la solución resultante.

Porcentaje de humedad

Para determinar el porcentaje de humedad del vermicompost se empleó el método gravimétrico, para ello, se tomó 20 g de vermicompost (P_s) en un recipiente de aluminio de peso conocido (P_b), luego se llevó la muestra a una estufa a 105°C por 24 horas y se registró su peso. El resultado se obtuvo con la ayuda de la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{(P_b + P_{sh}) - (P_b + P_{ss})}{(P_b + P_{ss}) - P_b} * 100$$

Donde:

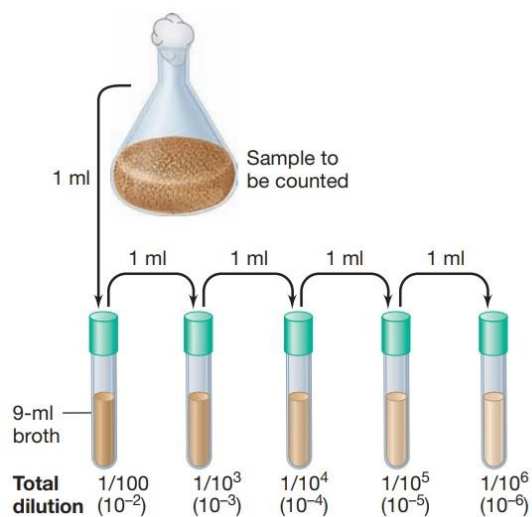
- P_b : peso del recipiente (g)
- P_{sh} : peso de la muestra húmeda (g)
- P_{ss} : peso de la muestra seca (g)

Recuento bacteriano

El recuento bacteriano se realizó siguiendo el protocolo expuesto en la norma NTE INEN 1 529-5:2006. Para ello, se tomó una muestra de 10 g de sustrato y se colocó en 90 mL de agua destilada (10^{-1}), de la cual se tomó 1 mL y fue colocado en 9 mL de agua destilada (10^{-2}), y así hasta llegar a una dilución de 10^{-6} (Figura 7). Cada dilución se realizó por duplicado. El recuento bacteriano se realizó por el método de extensión en placa (Figura 8): se tomó una alícuota de 100 μ L de la dilución y se depositó en una caja Petri que contiene medio de cultivo selectivo Chromocult, que permite discriminar *E. coli* del resto de bacterias. La muestra se esparció por toda la placa con la ayuda de una espátula de Digralsky. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 48 horas y para determinar los UFC/g se tomaron en cuenta solo las placas que contenían de 30 a 300 colonias y aquellas colonias de color azul oscuro a morado.

Figura 7

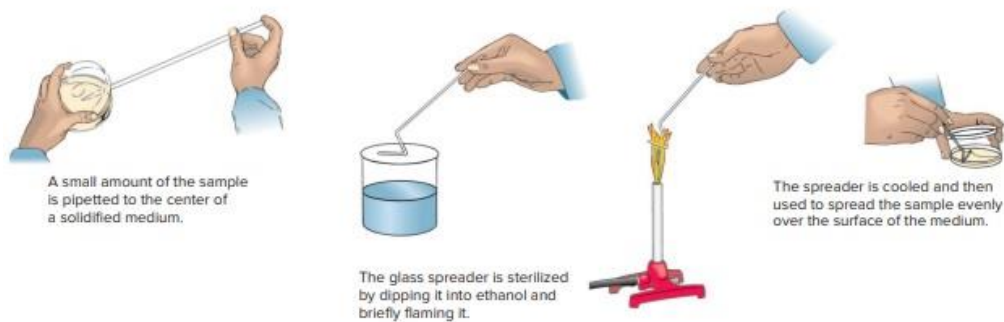
Método de diluciones seriadas



Nota: Recuperado de Madigan et al. (2015)

Figura 8

Técnica de extensión en placa



Nota: Recuperado de Willey et al. (2020)

Para reportar el número de colonias por gramo de sustrato, se realizó el cálculo a partir de la siguiente ecuación:

$$UFC/g = \frac{NC * FD}{V}$$

Donde:

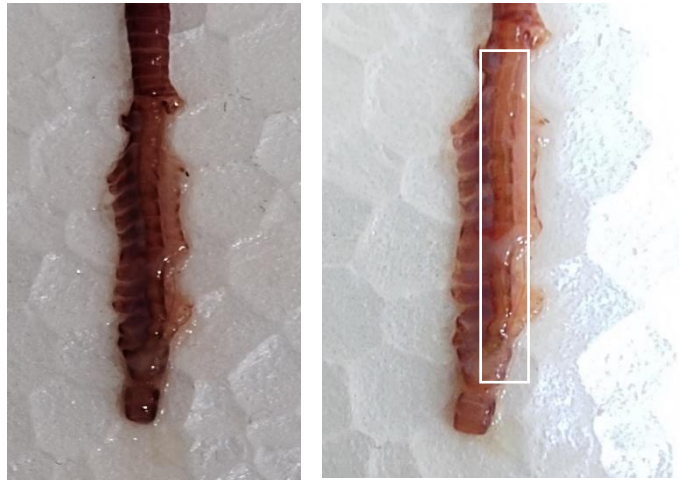
- NC: número de colonias en una placa
- FD: factor de dilución correspondiente a la dilución de donde se tomó la muestra con la que se inoculó la placa
- V: volumen inoculado

Disección de lombrices y recuento bacteriano

Se tomaron 5 lombrices aleatoriamente de cada tratamiento y fueron colocadas en un recipiente estéril para realizar un proceso de desinfección. Este proceso se realizó para discriminar entre los microorganismos presentes en el intestino. Las lombrices fueron lavadas con agua destilada más Povidyn durante 30 minutos, luego se realizó un segundo lavado con etanol al 70% por 3 minutos. Terminado el proceso de desinfección, se inmovilizó a la lombriz sobre una superficie de espumaflex y se realizó un corte en la zona ventral, aproximadamente 15 segmentos de longitud, a partir de clitelo, para dejar expuesto el intestino (Figura 9). La piel se inmovilizó con agujas para tener un mayor manejo del animal. Los intestinos fueron removidos con cuidado y suspendidos en 10 mL de agua estéril (Lów et al., 2016). Se realizó el recuento bacteriano a partir de la muestra de intestino siguiendo la metodología expuesta en la norma NTE INEN 1 529-5:2006.

Figura 9

Disección de lombrices de tierra



Nota: El recuadro blanco muestra el tracto intestinal de la lombriz

Capítulo IV: Resultados

Caracterización del vermicompost

Para la medición del pH solo se consideraron los tratamientos que contenían lombrices en el sustrato. El pH se midió cada 7 días después de la segunda semana de incluir las lombrices de tierra en el sustrato. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 2

Medidas de pH del vermicompost

	Semana 2	Semana 3	Semana 5
Con lombrices			
Control	7,2	7,1	7,2
<i>E. coli</i>	7,3	7,2	7,3

El ensayo arrojó un porcentaje de humedad de 541%, un valor exorbitante debido a la falta de control de humedad en la experimentación. La temperatura promedio entre los tratamientos osciló entre los 15-20°C.

Reducción de bacterias patógenas

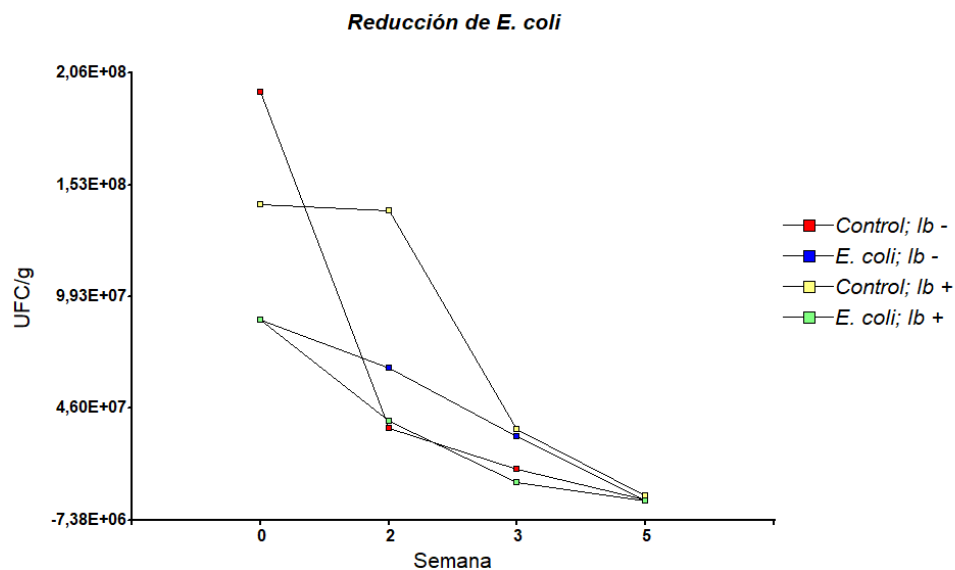
La cantidad total de microorganismos presentes en los sustratos iniciales inoculados con *E. coli* fue de $8,8 \times 10^7$ UFC/g, mientras que en los sustratos iniciales que no fueron inoculados tuvieron un total de $1,97 \times 10^8$ UFC/g para el tratamiento control, y $1,43 \times 10^8$ UFC/g para el tratamiento control con lombrices de tierra (Ver Apéndice 1).

A las dos semanas de inocular *E. coli* sobre el sustrato, se evidenció un descenso en su concentración en los sustratos con lombrices, mientras que en el sustrato sin lombrices con inoculación de *E. coli* hubo un incremento en su concentración que luego fue disminuyendo. A las tres semanas hubo una notable disminución de la concentración de *E. coli* en todos los tratamientos, mientras que las 5 semanas, la concentración de *E. coli* fue similar en todos los tratamientos y con una tendencia a la baja (Figura 10). El porcentaje de reducción total de *E. coli* en el tratamiento con lombrices fue del 97%, al igual que en el tratamiento sin lombrices.

Respecto al factor de bloque, a la semana 2 se obtuvo una reducción del 45%, mientras que a la semana 3 se logró un 36% de reducción de *E. coli*.

Figura 10

Reducción de E. coli en el vermicompost a través del tiempo

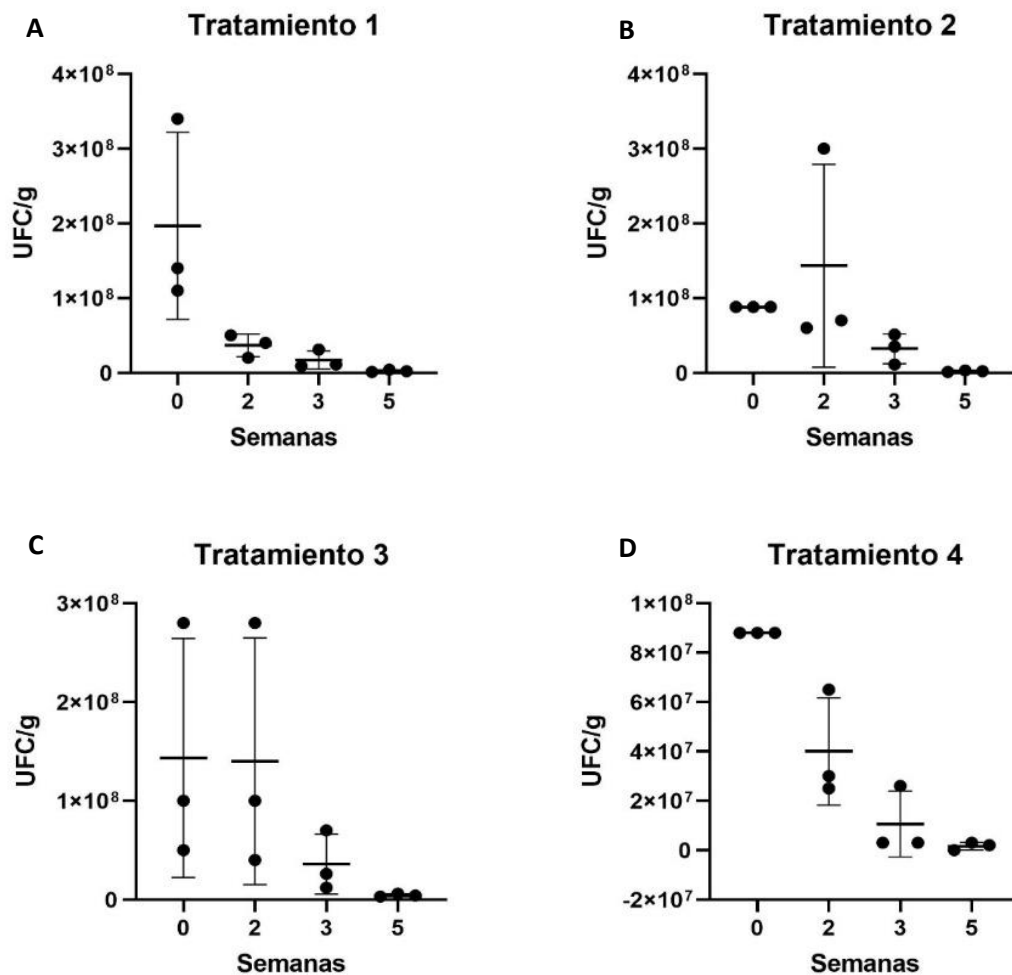


Nota: lb: lombrices. No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos ($p=0,2342$). El factor de bloque muestra una diferencia significativa en los UFC/g a través del tiempo ($p<0,0001$).

La figura 11 muestra los datos obtenidos de cada tratamiento y refleja una dispersión de los mismos, especialmente en el tratamiento 3 (Figura 11A), que presenta un dato atípico, por lo que no se tomó en cuenta para el análisis estadístico. Además, en las semanas 0 y 2 la dispersión de los datos es mayor.

Figura 11

Boxplot aplicado a cada tratamiento



Nota: Tratamiento 1: Control-lb; Tratamiento 2: *E. coli*-lb; Tratamiento 3: Control+lb;

Tratamiento 4: *E. coli*+lb. lb: lombrices

Para comparar los diferentes tratamientos se aplicó un ANOVA de 2 vías con una significancia de 0,05, el cual determinó que no hay una diferencia significativa entre los tratamientos ($p=0,2342$), mientras que, al analizar el factor de bloque, se encontró que los UFC/g disminuyen con el paso del tiempo de forma significativa ($p<0,0001$).

Tabla 3ANOVA de 2 vías con nivel de confianza $\alpha = 0,05$

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	127218358957323000,00	6	21203059826220500,00	6,59	0,0001
Tratamiento	14301972056413100,00	3	4767324018804380,00	1,48	0,2342
Semana	112619282597474000,00	3	37539760865824600,00	11,66	<0,0001
Error	128751853695996000,00	40	3218796342399900,00		
Total	255970212653319000,00	46			

Nota: Los tratamientos no tienen una diferencia significativa entre ellos ($p=0,2342$), mientras que el factor de bloque mostró una diferencia significativa ($p<0,0001$)

Para corroborar lo expuesto en el ANOVA, se aplicó una prueba de Duncan con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ y mostró que todos los tratamientos redujeron la concentración de UFC/g de manera similar, por lo que no hay una diferencia significativa entre ellos (Tabla 4). Por el contrario, la prueba de Duncan aplicado al factor de bloque arrojó una diferencia significativa, obteniendo una mayor reducción de *E. coli* a las semanas 3 y 5, frente a la semana 2 (Tabla 5).

Tabla 4*Prueba de Duncan aplicada a los tratamientos***Test:Duncan Alfa=0,05**

Error: 3218796342399900,0000 gl: 40

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Tratamiento 4	35083333,42	12	16377821,24	A
Tratamiento 2	46418699,18	11	17158149,80	A
Tratamiento 1	63166666,67	12	16377821,24	A
Tratamiento 3	80916666,67	12	16377821,24	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 5

Prueba de Duncan aplicada al factor de bloque

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 3218796342399900,0000 gl: 40

Semana	Medias	n	E.E.	
5	2583333,42	12	16377821,24	A
3	24000000,00	12	16377821,24	A B
2	70002032,52	11	17158149,80	B
0	129000000,00	12	16377821,24	C

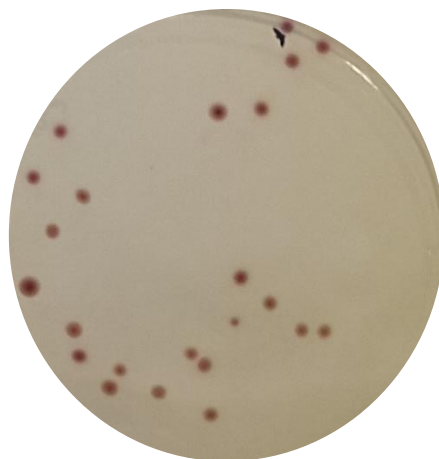
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Presencia de *E. coli* en los intestinos de las lombrices de tierra

La disección de las lombrices de tierra permitió identificar la presencia de *E. coli* producto de su reducción en el sustrato. A las dos semanas de inocular *E. coli*, se encontró evidencia de la presencia de *E. coli* en el tracto intestinal, lo cual es indicativo que las lombrices redujeron su concentración en el vermicompost. A la semana 3 de la inoculación, se recuperó $2,4 \times 10^5$ UFC/g *E. coli* de los intestinos, lo que corrobora la digestión de microorganismos por parte de las lombrices. Además, también hubo presencia de coliformes debido a la coloración rojo salmonado de las colonias que crecieron en agar Chromocult.

Figura 12

Recuento bacteriano de la muestra de intestino a la semana 3



Capítulo V: Discusión

Las lombrices de tierra del género *Eisenia* son ampliamente utilizadas para realizar vermicompostaje y contribuyen en la reducción de patógenos que puedan encontrarse en los sustratos (Procházková et al., 2018), además, tienen una alta tasa de consumo, digestión y asimilación de materia orgánica, tolerancia a cambios ambientales, una tasa de reproducción alta y un ciclo de vida corto, lo que las convierte en aptas para este tipo de trabajo (Domínguez & Edwards, 2011).

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del vermicompost mostraron valores de pH promedio de 7 en los tratamientos que contenían lombrices, acorde a lo reportado por Maisincho (2015) que obtuvo un pH de 7,42, mientras que Calahorrano (2015) reportó valores promedio de 5,6, y Tutillo (2018) obtuvo un pH de 7,98. Los valores obtenidos en la investigación cumplen con los valores permitidos por las normativas internacionales como la NTEA-006-SMA-RS-2006 y NMX-FF-109-SCFI-2007, pertenecientes a México, sin embargo, no es un factor que afecte a la calidad del vermicompost final, pues este abono no puede llegar a alcalinizar o acidificar el suelo agrícola, principal destino de estos abonos (Calahorrano, 2015).

El porcentaje de humedad obtenido fue de 541%, extremadamente alto pues, según la normativa NMX-FF-109-SCFI-2007, el porcentaje de humedad permitido está en un rango de 20-40%. Este elevado porcentaje puede deberse a las grandes cantidades de agua que contienen las frutas y verduras, que son los residuos domésticos típicos y también por un mal manejo en el drenaje de los lixiviados generados por la descomposición del material.

Analizando la reducción de *E. coli* inoculada en los sustratos, se encontró una disminución progresiva a través del tiempo, teniendo una mayor reducción a la semana 3. Si bien esta reducción fue significativa a lo largo de las semanas ($p=0,0001$), el descenso de los UFC/g de *E. coli* entre los tratamientos fue similar, por lo que el efecto de las lombrices no fue

relevante estadísticamente ($p=0,3957$). La prueba Duncan aplicada a los tratamientos corroboró que el efecto de las lombrices no fue significativo.

Rouvalova *et al.* (2019) reportó una disminución significativa de *E. coli* en sustratos de orujo de uva con lombrices frente a sustratos sin lombrices, ya que el proceso fue más lento. Procházková *et al.*, (2018) determinó que la reducción de bacterias patógenas, como *E. coli*, se vio acelerada por efecto de las lombrices de tierra con respecto a los sustratos sin lombrices. Aira *et al.* (2011) realizó una experimentación a escala industrial, logrando una reducción aceptable de los niveles de *E. coli* presentes en el vermicompost ($p=0,042$). Una de las razones por las que el efecto de las lombrices de tierra no influyó en una reducción exponencial de patógenos en esta investigación es por la humedad de los tratamientos ya que, como se mencionó anteriormente, el porcentaje sobrepasó el 100%, esto hace que las lombrices no realicen la degradación del sustrato, haciendo que la reducción generada sea netamente por el efecto directo del propio compostaje (Procházková *et al.*, 2018). La aireación de los sustratos con lombrices no se pudo realizar correctamente ya que, por el mismo proceso de degradación, atrajo a insectos, por lo que se optó por mantener cierto tiempo abiertos los contenedores y luego cubrirlos para evitar una mayor atracción de insectos.

Por otro lado, hay que mencionar que al solo tener 3 réplicas no se logra una buena robustez para realizar el análisis estadístico, ya que, por factores externos, no se pudo realizar más repeticiones, por lo que es importante tomar en cuenta incrementar el número de réplicas para obtener un mayor volumen de datos.

Capítulo VI: Conclusiones

El vermicompost obtenido durante la experimentación tuvo un pH promedio de 7 y un porcentaje de humedad de 541%, valor que no corresponde con un correcto proceso de vermicompostaje.

Al evaluar el efecto de las lombrices en la reducción de bacterias patógenas, se encontró una disminución significativa de estas a lo largo de las semanas, teniendo un 45% de reducción a la semana 2 y un 36% a la semana 3 ($p < 0,0001$), sin embargo, no hubo una diferencia significativa entre los tratamientos ($p = 0,2342$), por lo que no es posible afirmar si las lombrices tuvieron un efecto en la reducción de los patógenos.

El recuento bacteriano de los intestinos de lombrices *Eisenia* spp. mostró la presencia de *E. coli*, logrando una recuperación de $2,4 \times 10^5$ UFC/g, lo que evidencia la ingesta de los microorganismos por parte de las lombrices de tierra.

Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda mantener una humedad en un rango de 60-80% para que el trabajo de las lombrices no se vea afectado.

Es importante mantener un ambiente aireado por lo que se puede optar por tapas con rejillas metálicas para evitar la llegada de insectos y el proceso se lleve a cabo sin perturbaciones.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Aira, M., Gómez-Brandón, M., González-Porto, P., & Domínguez, J. (2011). Selective reduction of the pathogenic load of cow manure in an industrial-scale continuous-feeding vermireactor. *Bioresource Technology*, *102*(20), 9633–9637.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.115>
- Alarcón, I. (2020). *Recolección de orgánicos se potencia en Quito*. El Comercio.
<https://www.elcomercio.com/tendencias/ambiente/recoleccion-organicos-potencia-quito-ambiente.html>
- Atiyeh, R. M., Subler, S., Edwards, C. A., Bachman, G., Metzger, J. D., & Shuster, W. (2000). Effects of vermicomposts and composts on plant growth in horticultural container media and soil. *Pedobiología*, *44*(5), 579–590. [https://doi.org/10.1078/S0031-4056\(04\)70073-6](https://doi.org/10.1078/S0031-4056(04)70073-6)
- Barbado, J. L. (2003). *Cria de lombrices*. Albatros.
- Bilej, M., De Baetselier, P., Van Dijck, E., Stijlemans, B., Colige, A., & Beschin, A. (2001). Distinct Carbohydrate Recognition Domains of an Invertebrate Defense Molecule Recognize Gram-negative and Gram-positive Bacteria *. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(49), 45840–45847. <https://doi.org/10.1074/JBC.M107220200>
- Bilej, M., Procházková, P., Šilerová, M., & Josková, R. (2013). *Earthworm Immunity*. Nih.Gov.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45034/>
- Calahorrano, L. (2015). *Evaluación fisicoquímica e identificación de Salmonella spp., Shigella spp., y Escherichia coli del vermicompost producido por el Gobierno Autónomo Descentralizado (GAD) de Pujilí en la Provincia de Cotopaxi* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/10995/1/T-ESPE-049036.pdf>
- Cameron, G. R. (1932). Inflammation in earthworms. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, *35*(6), 933–972. <https://doi.org/10.1002/PATH.1700350613>
- Chen, T., Zhang, S., & Yuan, Z. (2020). Adoption of solid organic waste composting products: A

critical review. *Journal of Cleaner Production*, 272, 122712.

<https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.122712>

Chu, W., Zere, T. R., Weber, M. M., Wood, T. K., Whiteley, M., Hidalgo-Romano, B., Valenzuela, E., & McLean, R. J. C. (2012). Indole production promotes *Escherichia coli* mixed-culture growth with *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum signaling. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 411–419.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1128/aem.06396-11>

Domínguez, J., & Edwards, C. A. (2011). Biology and ecology of earthworm species used for vermicomposting. In C. A. Edwards, N. Q. Arancon, & R. L. Sherman (Eds.), *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Waste and Environmental Management* (1st edition, pp. 25–37). CRC Press.

Du, C., Munir, S., Abad, R., & Lu, D. (2020). Valorization of organic waste into biofertilizer and its field application. In T. Bhaskar, A. Pandey, E. R. Rene, & D. C. W. Tsang (Eds.), *Waste Biorefinery* (pp. 179–198). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818228-4.00007-1>

Durak, A., Altuntaş, Ö., Kutsal, İ. K., Işık, R., & Karaat, F. E. (2017). The Effects of Vermicompost on Yield and Some Growth Parameters of Lettuce. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 5(12), 1566–1570.

<https://doi.org/10.24925/TURJAF.V5I12.1566-1570.1461>

Edwards, C. A., & Lofty, J. R. (1972). Biology of Earthworms. In *Biology of Earthworms*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6912-5>

Environmental Protection Agency, U. (2003). *Environmental Regulations and Technology: Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge*.

<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-07/documents/epa-625-r-92-013.pdf>

Fan, S., Li, A., ter Heijne, A., Buisman, C. J. N., & Chen, W. S. (2021). Heat potential, generation, recovery and utilization from composting: A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 175, 105850. <https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2021.105850>

- Gómez, S., Espinosa, J., González, T., & Salazar, G. (2007). *Alternativas para el reciclaje de excretas animales: Producción de humus de lombriz*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP.
- Gordon, D. M. (2013). The ecology of *Escherichia coli*. In M. S. Donnenberg (Ed.), *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis: Second Edition* (2nd edition, pp. 3–20). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397048-0.00001-2>
- Gupta, C., Prakash, D., Gupta, S., & Nazareno, M. A. (2019). Role of Vermicomposting in Agricultural Waste Management. *Sustainable Green Technologies for Environmental Management*, 283–295. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2772-8_15
- Gupta, S., & Yadav, S. (2016). Immuno-defense Strategy in Earthworms: A Review Article. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(4), 1022–1035. <https://doi.org/10.20546/IJCMAS.2016.504.117>
- INEC. (2020). *Boletín Técnico N°-01-2020-GADM RESIDUOS SÓLIDOS Gestión de Residuos Sólidos*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Municipios_2018/Residuos_solidos_2018/Boletin_Tecnico_Residuos_2018.pdf
- INEN. (2006). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos*. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-5.pdf>
- Josková, R., Šilerová, M., Procházková, P., & Bilej, M. (2009). Identification and cloning of an invertebrate-type lysozyme from *Eisenia andrei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(8), 932–938. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2009.03.002>
- Kiyasudeen, K., Ibrahim, M. H., & Ismail, S. A. (2020). Vermicomposting of organic wastes and the production of vermicompost. In N. K. Rathinam & R. K. Sani (Eds.), *Biovalorisation of Wastes to Renewable Chemicals and Biofuels* (pp. 277–285). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817951-2.00014-6>

- Lobo, M. G., & Dorta, E. (2019). Utilization and Management of Horticultural Waste. In E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest Technology of Perishable Horticultural Commodities* (pp. 639–666). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813276-0.00019-5>
- Lów, P., Molnár, K., & Kriska, G. (2016). Atlas of Animal Anatomy and Histology. In *Anticancer research* (Vol. 36, Issue 8). Springer Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25172-1>
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (14th edition). Pearson Education, Inc.
- Maisincho, J. (2015). *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* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/11582/1/T-ESPE-049542.pdf>
- Milipore. (2020). *Chromocult® Coliform Agar: Simultaneous detection of bacteria and E. coli in water*. https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-JP-Site/ja_JP/-/JPY/ShowDocument-File?ProductSKU=MM_NF-C164546&DocumentId=201410.002.ProNet&DocumentType=DS&Language=EN&Country=NF&Origin=PDP
- Monroy, F., Aira, M., & Domínguez, J. (2009). Reduction of total coliform numbers during vermicomposting is caused by short-term direct effects of earthworms on microorganisms and depends on the dose of application of pig slurry. *Science of The Total Environment*, 407(20), 5411–5416. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2009.06.048>
- Ordóñez, F. (2016). *Roles enzimáticos asociados a la anatomía intestinal de la lombriz de tierra Eisenia fétida (Savigny, 1826)*. El Colegio de la Frontera Sur ECOSUR.
- Pathma, J., & Sakthivel, N. (2012). Microbial diversity of vermicompost bacteria that exhibit useful agricultural traits and waste management potential. *SpringerPlus*, 1(1), 1–19.

<https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-26/TABLES/2>

- Percival, S. L., & Williams, D. W. (2014). *Escherichia coli*. In S. L. Percival, M. V Yates, D. W. Williams, R. M. Chalmers, & N. F. Gray (Eds.), *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks: Second Edition* (2nd edition, pp. 89–117). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00006-8>
- Pierre, V., Phillip, R., Margnerite, L., & Pierrette, C. (1982). Anti-bacterial Activity of the Haemolytic System from de Earthworms *Eisenia foetida andrei*. *Invertebrate Pathology*, 40(1), 21–27.
- Procházková, P., Hanč, A., Dvořák, J., Roubalová, R., Drešlová, M., Částková, T., Šustr, V., Škanta, F., Pacheco, N. I. N., & Bilej, M. (2018). Contribution of *Eisenia andrei* earthworms in pathogen reduction during vermicomposting. *Environmental Science and Pollution Research* 2018 25:26, 25(26), 26267–26278. <https://doi.org/10.1007/S11356-018-2662-2>
- Procházková, P., Šilerová, M., Felsberg, J., Josková, R., Beschin, A., De Baetselier, P., & Bilej, M. (2006). Relationship between hemolytic molecules in *Eisenia fetida* earthworms. *Developmental & Comparative Immunology*, 30(4), 381–392. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2005.06.014>
- Quaglino, D., Cooper, E. L., Salvioli, S., Capri, M., Suzuki, M. M., Ronchetti, I. P., Franceschi, C., & Cossarizza, A. (1996). Earthworm coelomocytes in vitro: cellular features and “granuloma” formation during cytotoxic activity against the mammalian tumor cell target K562. *European Journal of Cell Biology*, 70(3), 278–288.
- Rahemtulla, F., & Løvtrup, S. (1974). The comparative biochemistry of invertebrate mucopolysaccharides—II. nematoda; annelida. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 49(4), 639–646. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(74\)90250-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(74)90250-8)
- Roubalová, R., Procházková, P., Hanč, A., Dvořák, J., & Bilej, M. (2019). Mutual interactions of *E. andrei* earthworm and pathogens during the process of vermicomposting. *Environmental*

Science and Pollution Research 2019 27:27, 27(27), 33429–33437.

<https://doi.org/10.1007/S11356-019-04329-5>

Saavedra, M. (2007). *Biodegradación de alperujo utilizando hongos del género Pleurotus y anélidos de la especie Eisenia foetida*. Universidad de Granada.

Samanta, I., & Bandyopadhyay, S. (2020). *Escherichia coli*. In *Antimicrobial Resistance in Agriculture: Perspective, Policy and Mitigation* (pp. 171–193). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815770-1.00015-8>

Scherhauer, S., Moates, G., Hartikainen, H., Waldron, K., & Obersteiner, G. (2018).

Environmental impacts of food waste in Europe. *Waste Management*, 77, 98–113.

<https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2018.04.038>

Schulenburg, H., Boehnisch, C., & Michiels, N. K. (2007). How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? *Molecular Immunology*, 44(13), 3338–3344.

<https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2007.02.019>

Shahnawaz, A., Andleeb, S., & Ali, S. (2011). Isolation and Identification of *Eisenia foetida* associated *Pseudomonas aeruginosa* and its control. *Punjab Univ. J. Zool.*, 26(1), 31–44.

Škanta, F., Roubalová, R., Dvořák, J., Procházková, P., & Bilej, M. (2013). Molecular cloning and expression of TLR in the *Eisenia andrei* earthworm. *Developmental & Comparative Immunology*, 41(4), 694–702. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2013.08.009>

Solíz, M., Durango, J., Solano, J., & Yépez, M. (2020). *Cartografía de los residuos sólidos en Ecuador 2020*. Universidad Andina Simón Bolívar.

Soobhany, N., Mohee, R., & Garg, V. K. (2017). Inactivation of bacterial pathogenic load in compost against vermicompost of organic solid waste aiming to achieve sanitation goals: A review. *Waste Management*, 64, 51–62. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2017.03.003>

Swati, A., & Hait, S. (2018). A Comprehensive Review of the Fate of Pathogens during Vermicomposting of Organic Wastes. *Journal of Environmental Quality*, 47(1), 16–29.

<https://doi.org/10.2134/JEQ2017.07.0265>

- Taylor, J. (2014). *Advances in biorefineries*. Woodhead Publishing.
- Thakur, A., Kumar, A., Kumar, C., Kiran, B., Kumar, S., & Athokpam, V. (2021). A review on vermicomposting: By-products and its importance. *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol*, 22, 156–164.
- Tutillo, A. (2018). *Evaluación fisicoquímica e identificación microbiológica de Salmonella SP., Shigella SP., y Escherichia coli del compostaje producido por el Gobierno Autónomo Descentralizado (GAD) de la ciudad de Cuenca* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/15158/1/T-ESPE-057975.pdf>
- Vallero, D. A., & Blight, G. (2019). The Municipal Landfill. In T. M. Letcher & D. A. Valleron (Eds.), *Waste: A Handbook for Management* (2nd edition, pp. 235–258). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815060-3.00012-8>
- Wang, Q., Awasthi, M. K., Zhang, Z., & Wong, J. W. C. (2019). Sustainable Composting and Its Environmental Implications. In M. J. Taherzadeh, K. Bolton, J. Wong, & A. Pandey (Eds.), *Sustainable Resource Recovery and Zero Waste Approaches* (pp. 115–132). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64200-4.00009-8>
- Wang, X., Wang, X., Zhang, Y., Qu, X., & Yang, S. (2003). An antimicrobial peptide of the earthworm *Pheretima tschiliensis*: cDNA cloning, expression and immunolocalization. *Biotechnology Letters*, 25(16), 1317–1323. <https://doi.org/10.1023/A:1024999206117>
- Wanger, A., Chavez, V., Huang, R. S. P., Wahed, A., Actor, J. K., & Dasgupta, A. (2017). Media for the Clinical Microbiology Laboratory. In *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology* (pp. 51–60). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805351-5.00004-1>
- Willey, J., Sandman, K., & Wood, D. (2020). *Prescott's Microbiology* (11th edition). McGraw-Hill Education.

Capítulo IX: Apéndices