

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE  
MICROORGANISMOS EFECTIVOS EN LA CALIDAD DEL BIOL EN  
UN PROCESO DE BIODIGESTIÓN ANAERÓBICA”**

Presentado por:

**HUGO RICARDO ROJAS PÁRRAGA**

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:

**INGENIERO AMBIENTAL**

**Lima – Perú**

**2014**

## **DEDICATORIA**

A Jehová, mi Padre, Amigo y Dios; quien me dio la vida y un propósito para la misma, quien me sostiene en la adversidad y me hace pisar en el camino que debo andar.

A mis queridos padres, Hugo y Gladys; quienes, con su enorme amor, cariño y cuidado; me convirtieron en quien soy.

## **AGRADECIMIENTO**

Al profesor Lawrence Quipuzco, por su valiosísima asesoría sin la cual habría sido imposible la realización de este proyecto.

A los señores miembros del jurado, por sus sugerencias y observaciones; que contribuyeron a realizar este trabajo de la mejor forma posible.

A la Oficina de Investigación de la Universidad Nacional Agraria la Molina, por su apoyo económico para la realización del proyecto.

Al Departamento de Ingeniería Ambiental, Física y Meteorología de la Universidad Nacional Agraria la Molina, por permitir el uso de las instalaciones y equipos del Laboratorio de Ingeniería Ambiental.

Al señor Sergio Paulo Morales, por su valiosa asistencia.

## ÍNDICE GENERAL

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
	2.1. Biodigestión anaeróbica.....	3
	2.2. Microorganismos Efectivos.....	15
	2.3. Biol.....	18
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
	5.1 Color.....	29
	5.2 Olor.....	30
	5.3 pH.....	31
	5.4 Sólidos Totales.....	34
	5.5 Conductividad Eléctrica.....	37
	5.6 Coliformes Fecales.....	39
	5.7 DBO5.....	43
	5.8 Nitratos.....	46
	5.9 Índice de Germinación.....	49
	5.10 Análisis General de Resultados.....	53
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1: Composición química de diferentes bioles.....	19
Cuadro N° 2: Composición bioquímica de un biol específico.....	21
Cuadro N° 3: Códigos de los tratamientos.....	25
Cuadro N° 4: Resultados de pH.....	31
Cuadro N° 5: Resultados de Sólidos Totales.....	34
Cuadro N° 6: Resultados de Conductividad Eléctrica.....	37
Cuadro N° 7: Resultados de Coliformes Fecales.....	39
Cuadro N° 8: Resultados de Coliformes Fecales (log).....	40
Cuadro N° 9: Resultados de DBO5.....	43
Cuadro N° 10: Resultados de Nitratos.....	46
Cuadro N° 11: Resultados de Índice de Germinación.....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Proceso de biodigestión anaeróbica.....	6
Figura N° 2: Biodigestor tipo Batch.....	9
Figura N° 3: Biodigestor modelo hindú.....	10
Figura N° 4: Biodigestor modelo chino.....	11
Figura N° 5: Biodigestor de polietileno.....	12
Figura N° 6: Bioles de los tratamientos A (izquierda) y E (derecha).....	29
Figura N° 7: Resultados de pH.....	32
Figura N° 8: pH vs. Dosis de EM.....	32
Figura N° 9: Resultados de Sólidos Totales.....	35
Figura N° 10: Sólidos Totales vs. Dosis de EM.....	35
Figura N° 11: Resultados de Conductividad Eléctrica.....	37
Figura N° 12: Conductividad Eléctrica vs. Dosis de EM.....	38
Figura N° 13: Resultados de Coliformes Fecales (log).....	40
Figura N° 14: Coliformes Fecales (log) vs. Dosis de EM.....	40
Figura N° 15: Resultados de DBO5.....	44
Figura N° 16: DBO5 vs. Dosis de EM.....	44
Figura N° 17: Resultados de Nitratos.....	46
Figura N° 18: Nitratos vs. Dosis de EM.....	47
Figura N° 19: Resultados de Índice de Germinación.....	50
Figura N° 20: Índice de Germinación vs. Dosis de EM.....	50
Figura N° 21: Semillas de lechugas tratadas con los bioles de los tratamientos A (izquierda) y E (derecha) tras 96 horas.....	51

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1: Ficha técnica EM-1.....	61
Anexo N° 2: Análisis estadísticos de pH.....	65
Anexo N° 3: Análisis estadísticos de Sólidos Totales.....	67
Anexo N° 4: Análisis estadísticos de Conductividad Eléctrica.....	69
Anexo N° 5: Análisis estadísticos de Coliformes Fecales.....	71
Anexo N° 6: Análisis estadísticos de DBO <sub>5</sub> .....	73
Anexo N° 7: Análisis estadísticos de Nitratos.....	74
Anexo N° 8: Análisis estadísticos de Índice de Germinación.....	67

## RESUMEN

Las actividades agropecuarias generan numerosos residuos orgánicos, los cuales no suelen ser reaprovechados adecuadamente. Los biodigestores constituyen una tecnología relativamente sencilla y práctica para el tratamiento y reaprovechamiento de los residuos agropecuarios. Por lo tanto, es pertinente realizar investigaciones en busca de optimizar el proceso y beneficios. Esta investigación se centró en un producto conocido a nivel mundial y en numerosos ámbitos, pero que ha sido muy poco aplicado a la biodigestión anaeróbica: Los Microorganismos Efectivos (EM). Se trata de una mezcla de microorganismos benéficos con numerosas aplicaciones. La presente investigación tuvo por objetivo medir sus efectos en el proceso de biodigestión anaeróbica, centrándose en su producto líquido: el biol. Para tal fin, se realizó un experimento con biodigestores a escala cargados con agua, estiércol de vacuno, paja de trigo y solución de Microorganismos Efectivos en cuatro diferentes dosis. Asimismo, se dispuso un grupo control sin solución EM. Tras un período de 45 días, se tomó una muestra de biol de cada biodigestor y se realizaron análisis de olor, color, pH, conductividad eléctrica, sólidos totales, DBO<sub>5</sub>, nitratos, coliformes fecales e índice de germinación. Los resultados fueron muy positivos, pues las muestras con una mayor concentración de Microorganismos Efectivos mostraron valores menores de sólidos totales, conductividad eléctrica, nitratos y coliformes fecales; así como un menor olor fecal y un color más verdoso el cual indica un mayor grado de degradación. Además, presentaron un nivel significativamente alto de índice de germinación en semillas de lechuga. Dicho valor fue casi 250% mayor en el biol con la mayor dosis de Microorganismos Efectivos con respecto al grupo control, demostrando su potencialidad como fertilizante. En base a los resultados, se concluyó que la aplicación de Microorganismos Efectivos en un biodigestor mejora la calidad del biol resultante, así como su poder fertilizante.

**Palabras clave:** Microorganismos Efectivos, biodigestión anaeróbica, biol.



## **ABSTRACT**

Agricultural activities generate numerous wastes that are not always properly exploited. Biodigesters are simple and cheap technology for treatment and exploitation of agricultural waste. For that reason, it's important to investigate ways to improve the process of biodigestion and its benefits. This investigation used a world wide known product, with many benefits: the Effective Microorganisms (EM). The EM is a mixture of beneficial microorganisms with many applications. The objective of this investigation was to study the effects of EM in anaerobic biodigestion process, mainly on its liquid product: the biol. For this purpose, an experiment was made with biodigesters charged with water, cow dung, wheat straw and EM solution in four different doses. Also, a control group was made with no EM solution. After a 45 days digestion process, a sample from each biodigester was taken for analysis. The analysis made were odor, color, pH, electrical conductivity, total solids, DOB<sub>5</sub>, nitrates, fecal coliforms and germination development. The results were very positive, with a higher dose of EM the samples showed less odor, total solids, electrical conductivity, nitrates and fecal coliforms. Also, the germination development increased significantly the EM dose; demonstrating its potential as fertilizer. After studying the results, the investigation's conclusion was that the application of Effective Microorganisms improved the biol's quality, and its fertilizing power.

**Key words:** Effective Microorganisms, anaerobic biodigestion, biol.

## I. INTRODUCCIÓN

De las actividades humanas se desprenden numerosos residuos sólidos, tanto orgánicos como inorgánicos. En algunos casos, sea por falta de conocimientos, recursos o voluntad, estos residuos son desechados en su totalidad sin ser reaprovechados o reutilizados, desperdiciando una potencial fuente de ingresos y/o insumos.

Esto es particularmente aplicable en el ámbito rural, en donde se produce una gran cantidad de residuos orgánicos, incluyendo heces de los animales y residuos de los cultivos; los cuales contienen numerosos nutrientes que pueden ser reaprovechados, con el fin de reducir la contaminación, aumentar la producción y reducir la dependencia de los fertilizantes químicos, los monocultivos, y otras prácticas agrícolas poco amigables con el medio ambiente.

La biodigestión anaeróbica es un sistema de tratamiento de residuos orgánicos que ofrece una alternativa a corto plazo para el tratamiento y reaprovechamiento de los residuos agrícolas. Consiste en un contenedor hermético, llamado biodigestor; el cual es cargado con materia orgánica. Si esta última es sólida, se añade también agua. En ausencia de oxígeno, los microorganismos anaeróbicos presentes descomponen la materia orgánica para producir biogás.

El biogás puede ser usado como una fuente energética de alta eficiencia. Puede reemplazar como combustible a la leña o a la bosta (estiércol seco), comúnmente utilizados en las zonas rurales. La primera es extraída de los bosques, lo que conlleva a la deforestación y pérdida de la biodiversidad y suelos, que implica a su vez disminución de la producción agrícola, desaparición de acuíferos y riesgos por desastres naturales. La bosta, por su parte, libera gases tóxicos al ser combustionada, lo que a mediano y largo plazo puede provocar enfermedades respiratorias graves en los usuarios. (López, Solá, 2008).

Este sistema tiene una alta rentabilidad económica, pues la inversión inicial es baja, sus gastos de operación escasos y la materia prima utilizada es gratuita suponiendo que el usuario se dedique a la ganadería y la agricultura. Los productos que no se utilicen pueden ser vendidos para maximizar las ganancias del usuario.

En vista de los beneficios económicos y ambientales de la biodigestión anaeróbica, es pertinente fomentar la investigación sobre formas de mejorar la eficiencia de dicho proceso.

Con el fin de acelerar el proceso de biodigestión y mejorar la calidad de los productos, suele aplicarse inóculos cargado de microorganismos al momento de la carga inicial. Comúnmente se utilizan purines, aguas de lavado de las granjas o vísceras de animales. Sin embargo, existe un inóculo con una gran potencialidad para usarse en los biodigestores: los *Microorganismos Efectivos (EM)*.

Los Microorganismos Efectivos son un cultivo mixto de microorganismos benéficos con numerosas aplicaciones (Higa, 1998).

En todos los casos, su uso controlado ha dado lugar a mejoras en la calidad y/o cantidad de los productos obtenidos, demostrando ser un preparado biológico con muchas potencialidades científicas.

Sin embargo, se ha realizado poca investigación sobre sus efectos en la biodigestión anaeróbica y sus productos. Miyashiro y Meggs (2007) demostraron que la aplicación de Microorganismos Efectivos en un biodigestor aumenta la calidad y cantidad del biogás producido. Por lo tanto, en esta investigación se analizará el efecto que tiene este mismo inóculo en la calidad del biol producto de la biodigestión.

El objetivo de esta investigación será evaluar el efecto de la aplicación de Microorganismos Efectivos en la calidad fisicoquímica, microbiológica y organoléptica del biol producto de un proceso de biodigestión anaeróbica.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 BIODIGESTIÓN ANAERÓBICA**

#### **2.1.1 ASPECTOS GENERALES**

La biodigestión anaeróbica es un proceso llevado a cabo en un contenedor cerrado, hermético e impermeable (llamado reactor), dentro del cual se deposita el material orgánico a fermentar en determinada dilución de agua para que a través de la descomposición anaerobia se produzca gas metano y fertilizantes orgánicos ricos en nitrógeno, fósforo y potasio. Sin embargo, la concentración exacta de nutrientes y su calidad en comparación con otros fertilizantes dependen en gran manera de los insumos con que se cargue el biodigestor. Puede decirse, por lo tanto; que cada biol es “único” (Aparcana, 2008).

Esta tecnología se está expandiendo rápidamente gracias a sus beneficios ambientales, energéticos y económicos.

En el Perú, la biomasa del sector agrario es una fuente tradicional de energía que satisface necesidades de cocción de alimentos y calefacción de los agricultores peruanos y representa aproximadamente el 18% de la energía primaria consumida en el país, lo que se da principalmente a través del consumo de leña, bosta y yareta a través de procesos de combustión directa. Asimismo, la biomasa del sector agrario también representa una alternativa económica y ambientalmente factible para la expansión de la capacidad eléctrica instalada (bagazo y residuos agrarios) ya sea por proyectos aislados o por proyectos conectados a la red eléctrica (MINAG, 2011).

El fenómeno de biodigestión ocurre gracias a un grupo de microorganismos bacterianos anaeróbicos presentes en el material fecal que, gracias a las condiciones anaeróbicas del

contenedor cerrado, actúan sobre los desechos orgánicos de origen vegetal y animal, produciendo una mezcla de gases con alto contenido de metano (CH<sub>4</sub>) llamada biogás, que es utilizado como combustible. Como resultado de este proceso genera residuos con un alto grado de concentración de nutrientes y materia orgánica ideales como fertilizantes (aunque, nuevamente se recalca el hecho de que su calidad depende en gran manera de los insumos de la biodigestión); que pueden ser aplicados frescos, pues el tratamiento anaerobio elimina los malos olores, la proliferación de moscas y los microorganismos patógenos (Martí, 2009).

Hay tres fases básicas en la biodigestión anaeróbica, y hay tres grupos de bacterias esencialmente diferentes que intervienen en cada una de estas fases. El primer grupo consiste en una mezcla de bacterias acidogénicas, que hidrolizan las moléculas complejas de materia orgánica para originar ácidos grasos de cadena corta y alcohol. El segundo grupo es el de las bacterias acetogénicas, que producen acetato e hidrógeno. El tercer grupo de microorganismos se suele denominar metanogénicos, y convierte los productos ya degradados a metano y dióxido de carbono. La operación estable de los biodigestores requiere que todos estos grupos bacterianos estén en un equilibrio dinámico armonioso. Cualquier cambio en las condiciones ambientales puede influir en este equilibrio, y resultar en la formación desproporcionada de compuestos intermedios que pueden inhibir todo el proceso (Marchain, 1982).

### **2.1.2 BENEFICIOS DE LOS BIODIGESTORES**

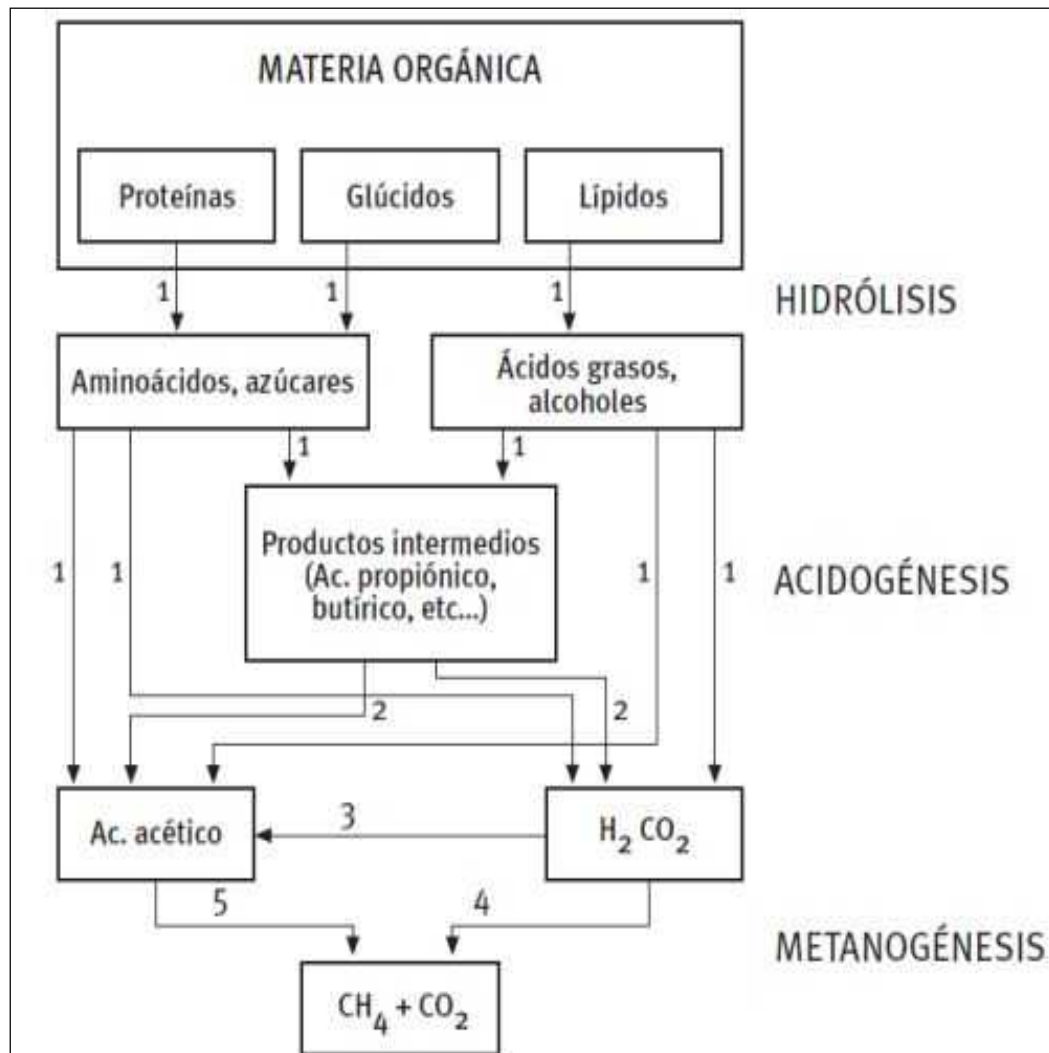
Filmtex (2008), destaca los siguientes beneficios del sistema de biodigestión anaeróbica, sobre todo en medios rurales:

- Reducción de la producción de gas metano. El excremento en estado natural expulsa grandes cantidades al espacio de este gas, que es uno de los más perjudiciales para la capa de ozono.
- Evita los malos olores entre el 90 y 100%.

- Se evita en un 100% la contaminación de suelos y agua. Los excrementos constituyen uno de los elementos más contaminantes de nuestro medio ambiente.
- Se evita la tala de árboles para ser utilizados en la cocción; los biodigestores son una de las grandes posibilidades para evitar la tala desmedida que se está dando.
- Producción de fertilizante orgánico; es una opción para cambiar la agricultura tradicional por una orgánica, el afluyente del biodigestor es una excelente alternativa.
- No produce contaminantes tóxicos, como el monóxido de carbono, que es muy dañino e incluso letal para las amas de casa.
- No se da la proliferación de insectos por la eliminación efectiva de las excretas. En las actividades pecuarias abundan los insectos, especialmente moscas y zancudos.
- La leña que se utilizaría en la cocción de los alimentos se deja en el campo y tiene gran importancia como abono orgánico, a la vez también retiene la escorrentía del agua y permite mejorar las condiciones del suelo.
- No hay peligro de explosiones, un cilindro de gas tradicional siempre es un peligro constante; pero un biodigestor no es una amenaza.
- Mejora la economía familiar.
- La instalación y mantenimiento son de bajo costo.

### **2.1.3 ETAPAS DEL PROCESO**

En la Figura N° 1 se pueden apreciar gráficamente las etapas del proceso de biodigestión anaeróbica.



**Figura N° 1: Proceso de biodigestión anaeróbica.**

Fuente: Biodisol, 2010

### **a. Etapa Hidrolítica**

Consiste en la degradación de moléculas orgánicas complejas como lípidos, proteínas, ácidos grasos constituyentes de la biomasa, originando moléculas más simples. En esta etapa, la materia orgánica se encuentra normalmente en estado sólido, para luego ser “digerida” hasta disolverse. Las bacterias que producen la hidrólisis pueden ser anaerobias estrictas o facultativas, son muy numerosas, y se desarrollan fácilmente en el medio cuando

las condiciones son favorables, o bien pueden pertenecer a la flora de la sustancia orgánica a digerir.

Realizan un amplio espectro de actividades enzimáticas sobre los polímeros orgánicos, desdoblándolos en los correspondientes monómeros o fragmentos más sencillos, permitiendo una posterior degradación a compuestos más simples por parte de otras especies de microorganismos.

La importancia de la presencia de este grupo de bacterias no solo radica en el hecho que producen el alimento para los grupos de bacterias que actúan posteriormente, sino que, además, eliminan cualquier traza del oxígeno disuelto del sistema (Tsagarakis, 2006).

#### **b. Etapa acidogénica**

Los compuestos solubles obtenidos de la etapa anterior son degradados por bacterias acidogénicas hasta transformarse en ácidos grasos de cadena corta (ácidos grasos volátiles), como por ejemplo, ácido acético, propiónico, butírico y valérico, principalmente y en menor proporción, anhídrido carbónico e hidrógeno. Estas bacterias son muy resistentes a variaciones en las condiciones dentro del biodigestor. Por ejemplo, aunque el pH óptimo para el desarrollo de la actividad metabólica es 5-6, los procesos anaerobios generalmente son conducidos a pH 7, y aún en estas condiciones su actividad metabólica no decae (Montes, 2008).

#### **c. Etapa acetogénica**

Durante esta etapa actúan las bacterias productoras de hidrógeno, las cuales producen ácido acético, además de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> a partir de ácido propiónico, butírico y otros ácidos de cadena más larga.



A esta altura del proceso, la mayoría de las bacterias anaerobias han extraído la mayor parte de los nutrientes de la materia orgánica y, como resultado de su metabolismo, deben eliminar los productos de su propio metabolismo. Estos productos, ácidos volátiles sencillos, son los que van a utilizar como sustrato las bacterias metanogénicas en la etapa siguiente (Rodríguez, 2010).

#### **d. Etapa metanogénica**

Constituye la etapa final del proceso, en el que compuestos como el ácido acético, hidrogeno y dióxido de carbono son transformados a CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. Se distinguen dos tipos principales de microorganismos, los que degradan el ácido acético (bacterias metanogénicas acetoclásicas) y los que consumen hidrogeno (metanogénicas hidrogenófilas). La principal vía de formación del metano es la primera, con alrededor del 70% del metano producido, en promedio (Hilbert, 1999).

A continuación se muestra ambos mecanismos de formación de metano por ambos tipos de bacterias:

- Acetoclásticas:  $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$
- Hidrogenófilas:  $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$

### **2.1.4 SISTEMAS DE BIODIGESTIÓN**

#### **a. Sistema batch**

Estos biodigestores se cargan una única vez, y una vez transcurrido el tiempo de retención, cuando ha dejado de producir gas, se descarga completamente. Normalmente consiste en tanques herméticos con una salida de gas conectada a un gasómetro flotante, donde se almacena el biogás. Este sistema es aplicable cuando la materia a procesar está disponible

en forma intermitente. En este tipo de sistemas se usa una batería de digestores que se cargan a diferentes tiempos para que la producción de biogás sea constante.



**Figura N° 2: Biodigestor tipo Batch.**

Fuente: PRIGEDS, 2009

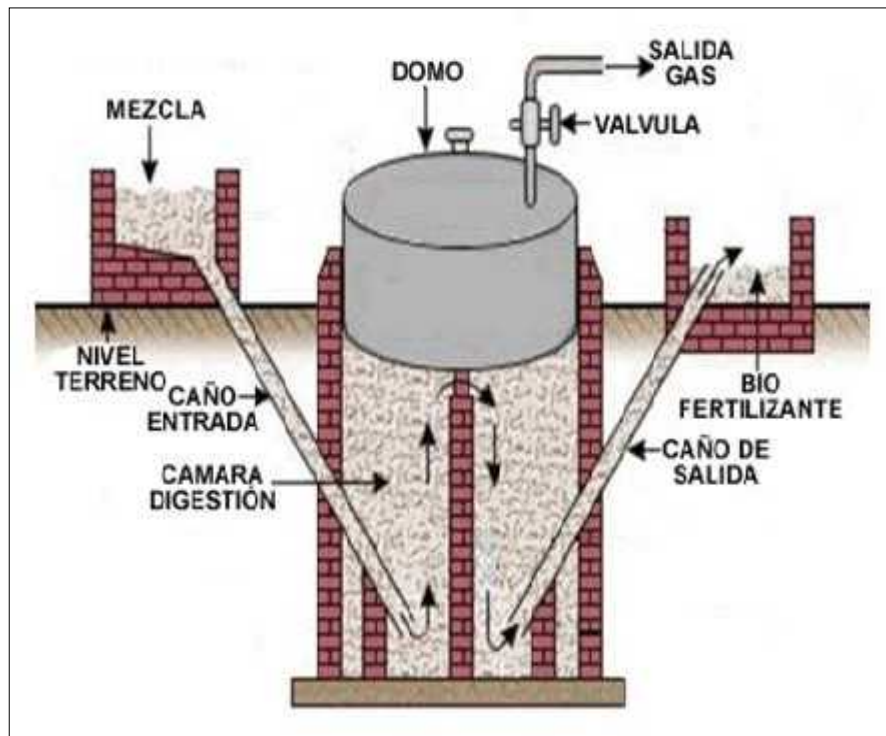
### **b. Sistema continuo**

Es el más usado en el ámbito rural. Este biodigestor se alimenta con una carga inicial y luego del tiempo de retención se carga una determinada cantidad y se descarga la misma cantidad (biol). Periódicamente se debe hacer una limpieza para extraer el biosol y evitar que taponee la entrada y salida del reactor. Lugones (2003) describe los principales modelos de biodigestores continuos:

- Modelo hindú (de cúpula móvil):

Se distingue por el uso de una campana móvil, que asciende al aumentar la presión del gas dentro de ella; esta puede ser de metal, hormigón o plástico. Además, el digestor está compuesto por un tanque de almacenamiento en forma cilíndrica, que puede ser construido de piedra, ladrillo y hormigón. Para permitir la entrada de la materia orgánica y la salida del

biofertilizante se emplean dos tubos (de plástico, fibrocemento, cerámica u otros) que conectan el tanque de almacenamiento con el de carga y descarga; también cuenta con tuberías, válvulas de corte y seguridad que garantizan el buen funcionamiento del biodigestor.

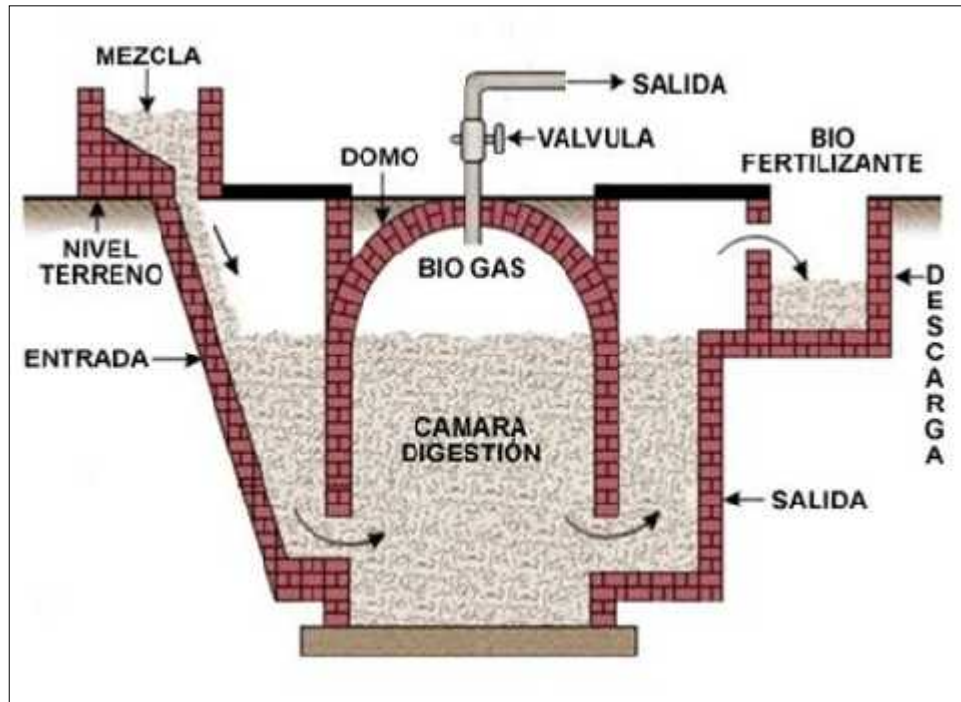


**Figura N° 3: Biodigestor modelo hindú**

Fuente: PRIGEDS, 2009

- Modelo chino (de cúpula fija)

Este modelo utiliza para el almacenamiento del biogás una cúpula fija unida al tanque de almacenamiento, que puede ser de ladrillo o de elementos prefabricados de hormigón.

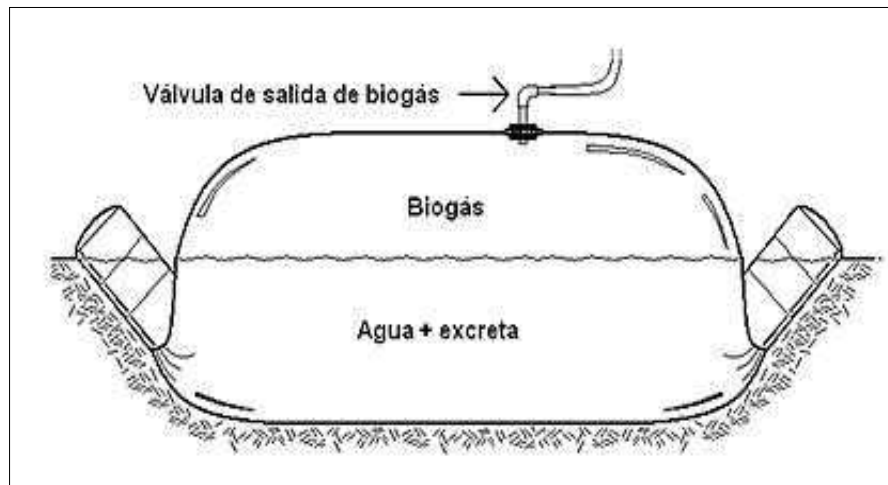


**Figura N° 4: Biodigestor modelo chino.**

Fuente: PRIGEDS, 2009

- De polietileno

Este sistema puede tener distintas configuraciones: alargado, en forma de gusano o en forma de saco, y es de fácil instalación. Los componentes fundamentales de este biodigestor son: un bolso de polietileno de película delgada capaz de soportar las presiones normales de trabajo del biogás y donde se almacena la excreta mezclada con agua; siempre se debe dejar el volumen necesario para almacenar el biogás; con el fin de lograr el buen funcionamiento de la instalación son necesarios otros accesorios como: válvulas de corte, de seguridad, tuberías y adaptadores.



**Figura N° 5: Biodigestor de polietileno.**

Fuente: Bioero, 2009

### **2.1.5 FACTORES QUE AFECTAN EL PROCESO**

#### **a. pH**

El pH afecta fundamentalmente la actividad enzimática de los microorganismos (Campos, 2001). El valor óptimo de pH para el proceso de digestión anaeróbica está en el rango de 6.6 a 7.6. Un pH mayor o menor puede inhibir la actividad de los microorganismos presentes. Los ácidos grasos generados durante la fase acidogénica pueden disminuir sustancialmente el pH si se acumulan, sobre todo si no hay una actividad metanogénica significativa que elimine los ácidos del reactor. Hay dos modos operacionales principales para corregir una condición desbalanceada de bajo pH en el biodigestor. La primera forma es detener la carga del biodigestor y permitir durante cierto tiempo que la población metanogénica reduzca la concentración acídica. Esto también reduce la actividad bacteriana y la producción de ácidos grasos. Un segundo método involucra la adición de sustancias tampones o buffer para elevar el pH sin cambiar el ritmo de carga del digestor. El más usado es el carbonato de calcio. (Yongfu, 1989).

## **b. Temperatura**

La velocidad de las reacciones químicas y bioquímicas se incrementa normalmente cuando se eleva la temperatura. La velocidad de las reacciones involucradas depende de la velocidad del metabolismo y crecimiento de los microorganismos presentes, las cuales a su vez dependen de la temperatura. Además, la solubilidad de la mayoría de las sales aumenta con la temperatura, haciendo que la materia orgánica este más disponible para los microorganismos, y aumenta la velocidad del proceso. Sin embargo, temperaturas muy altas pueden ser letales para los microorganismos presentes. En la temperatura del reactor influyen tanto las reacciones bioquímicas en el interior del reactor como la temperatura ambiental. El rango ideal es de 35 a 55 °C (Gunnerson, Stuckey, 1986).

La producción de biogás, en ausencia de inhibidores, aumenta con la temperatura, puesto que aumenta la tasa de crecimiento de los microorganismos; temperaturas más bajas implican tiempos de retención más largos, y por tanto mayores volúmenes de reactor. La tasa de hidrólisis también aumenta con la temperatura (Veeken y Hamelers, 1999)

## **c. Nutrientes**

El proceso anaerobio se caracteriza, frente a procesos aerobios, por los bajos requerimientos de nutrientes, debido fundamentalmente a los bajos índices de producción de biomasa. A pesar de ello, la biomasa necesita para su desarrollo el suministro de una serie de nutrientes minerales, además de una fuente de carbono y de energía (Campos, 2001).

Junto con una fuente de energía en forma de carbono orgánico, los microbios requieren nitrógeno, fósforo y otros factores de crecimiento que originan efectos complejos. La principal variable que afecta el desempeño de la digestión es la relación carbono-nitrógeno (C/N). La relación carbono nitrógeno ideal es de 25-30 (Yongfu, 1989). . Se puede obtener

este rango combinando excretas de animales con residuos agrícolas en proporciones previamente calculadas con el valor C/N de cada uno de los insumos a utilizar.

#### **d. Tiempo de retención hidráulico**

El TRH es el tiempo promedio que el sustrato pasa en el reactor desde la carga hasta la descarga. Es un factor muy importante pues determina la efectividad de la degradación de la materia orgánica y la producción de biogás.

La fracción de materia orgánica degradada aumenta al aumentar el tiempo de retención hidráulico, sin embargo la producción volumétrica de metano (producción por unidad de reactor) disminuye, una vez superado el óptimo. Es por tanto necesario determinar para cada tipo de residuo y de digestor el tiempo de retención que optimiza el proceso (Campos, 2001).

Los tiempos de retención usuales tratando residuos ganaderos varían mucho dependiendo del tipo de sustratos, el tipo de sistema y el clima; pudiendo ser de apenas 10 días, o superar los dos meses (Hobson, 1990).

#### **e. Concentración de sólidos**

La concentración de sólidos es importante para el proceso. Se recomienda diluir los insumos en agua hasta aproximadamente 6-12% de concentración de sólidos. La concentración ideal puede variar con la temperatura. Se ha estimado que en zonas cálidas (25-27°C), la concentración ideal es de 6%, mientras que a temperaturas más bajas (18-23°C) la concentración óptima es de 12% (Yongfu, 1989). Sin embargo, estas son sólo estimaciones no aplicables a todos los casos, por lo que se debe elegir cuidadosamente la concentración adecuada para cada experiencia.

## **2.2 MICROORGANISMOS EFECTIVOS**

### **2.2.1 Aspectos generales**

Los microorganismos Efectivos (EM) fueron desarrollados en la década de los 70, por el profesor Teruo Higa de la Facultad de Agricultura de la Universidad de Ryukyus en Okinawa, Japón. Este producto comercial se encuentra conformando por diferentes tipos de organismos, las cuales desarrollan una sinergia metabólica que permite su aplicación en diferentes campos de la ingeniería.

El EM se produce en tinas de cultivos de unas 80 variedades de microorganismos. Los microorganismos pertenecen a diez géneros de cinco familias distintas e incluye especies aeróbicas y anaeróbicas (de bacterias fototrópicas, bacterias ácido lácticas, levaduras, actinomicetos y hongos filamentosos). Dicho producto es el resultado de la coexistencia entre dos grupos de microorganismos con diferentes condiciones de vida, microorganismos aeróbicos que necesitan del aire para sobrevivir y microorganismos anaeróbicos donde el oxígeno no es necesario. Esta amplia diversidad de microorganismos le confiere al producto propiedades muy características que le han hecho ganar muchos seguidores alrededor del mundo. Entre estas características está aplicado a la agricultura y permite incrementar los rendimientos de los cultivos en dos o tres veces la producción actual. También permite degradar rápidamente contaminantes orgánicos. (Miyashiro, Meggs, 2007).

Gran parte del éxito del EM se debe a la filosofía con la que es promovido. Esta, según Higa (2002), se basa en la armonía y el equilibrio entre los seres vivos, siendo así el producto una coexistencia y cooperación casi perfecta entre microorganismos de diferentes especies. Por la importancia de la actividad microbiológica en la mayoría de los procesos naturales y artificiales, EM Research Organization (EMRO) viene creando una serie de productos para la agricultura (mejora de cultivos, manejo de plagas, descomposición de



materia orgánica); para el manejo de desechos y contaminantes (compostaje, tratamiento de aguas), entre otros fines.

### **2.2.2 BENEFICIOS**

Según Higa (1998), el uso de Microorganismos Efectivos ofrece numerosos beneficios en los siguientes campos:

- **Compostaje:** Aceleran el proceso de compostaje y mejoran la calidad del producto final, reduciendo los malos olores, los agentes patógenos y aumentando los nutrientes disponibles. Además, los Microorganismos Efectivos permanecen en el compost beneficiando a los cultivos.
- **Producción animal:** Mejoran la digestión de los animales y evitan la intoxicación. Asimismo, reducen la presencia de patógenos y sustancias tóxicas en orines y heces, así como los malos olores.
- **Agricultura:** Actúan como rizobacterias. Mejoran el crecimiento, la floración, la fructificación y la resistencia a las plagas de los cultivos.
- **Tratamiento de aguas:** Aceleran el proceso y mejora la calidad fisicoquímica y microbiológica del efluente.
- **Limpieza industrial y doméstica:** Aceleran la descomposición de contaminantes orgánicos y favorecen la eliminación de patógenos.

### **2.2.3 MICROORGANISMOS PRESENTES**

Según su creador, Higa (1998); la solución EM contiene las siguientes clases de microorganismos:

- Bacterias fototrópicas (Rhodopseudomonas)

Estas bacterias sintetizan sustancias útiles de secreciones de raíces, materia orgánica y/o gases dañinos como el ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) con el uso de luz solar y calor del suelo como fuentes de energía. Estas sustancias útiles son aminoácidos, ácidos nucleicos, sustancias bioactivas y azúcares, los cuales promueven el crecimiento y desarrollo de las planta (Miyashiro, Meggs, 2007).

En ambientes sin luz, como un biodigestor; las bacterias fototrópicas tienen una relación sinérgica con las bacterias productores de ácidos orgánicos (levaduras y ácido lácticas). Estas dos clases de bacterias proveen de alimento a las fototrópicas, explicando así porque el EM es eficiente incluso en ambientes si luz. (Fioravanti, Vega; 2003).

- Bacterias de ácido láctico (Lactobacillus)

Las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico de azúcares y otros carbohidratos, producidos por las bacterias fototrópicas y levaduras. El ácido láctico es un compuesto desinfectante que suprime microorganismos dañinos y ayuda a la descomposición de materiales como la lignina y la celulosa fermentándolos, removiendo efectos no deseables de la materia orgánica no descompuesta (Fujisawa, 1999; Carrillo, 2003). También tienen la propiedad de suprimir algunos patógenos para las plantas, como la bacteria Fusarium.

- Levaduras (Saccharomycetes)

Las levaduras sintetizan sustancias antimicrobiales y otras útiles a partir de aminoácidos y azúcares secretados por las bacterias fototrópicas, raíces de plantas y materia orgánica. Los productos de estos microorganismos promueven la división activa y radical. Esta propiedad beneficia también a los otros microorganismos del EM (Miyashiro, Meggs, 2007).

- Actinomicetos

Los Actinomicetos funcionan como antagonistas de muchas bacterias y hongos patógenos presentes en las plantas y en la materia orgánica en descomposición debido a que producen antibióticos (efectos biostáticos y biácidas). Benefician el crecimiento y actividad del Azotobacter y de las micorrizas, contribuyendo al desarrollo y crecimiento de los cultivos (APNAN, 2003).

- Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos como el Aspergillus actúan descomponiendo rápidamente la materia orgánica para producir alcohol, ésteres y sustancias antimicrobianas. Esto es lo que produce la desodorización y previene la aparición de insectos perjudiciales; así como la reducción de agentes patógenos (APNAN, 2003).

### **2.2.3 ACTIVACIÓN DEL EM**

Generalmente los microorganismos del EM se encuentran en estado latente. Si se utilizan sin un tratamiento previo, su acción puede ser lenta. Debido a esto, es necesario “activarlos” antes de utilizarlos, dando lugar al EM activado (EMa). Esto se logra mezclando el EM con agua y melaza, esta última como nutriente para activar el metabolismo microbiano y acelerar su reproducción. Se recomienda una proporción de 90%

agua, 5% EM y 5% melaza, para luego llevarlo a incubación hermética por 5 días a por lo menos 25 °C. Se debe procesar en un recipiente cerrado para ofrecer un ambiente anaeróbico y la solución estará finalizada cuando alcance un pH de 3,5. Además, debe presentar un color café claro y un olor agridulce. De presentar un color café oscuro y un olor a putrefacción, esto indica que la activación fracasó y la solución debe ser desechada (Miyashiro, Meggs, 2007).

Se utiliza melaza como fuente de energía para la activación de EM, ya que además contiene proteínas y minerales útiles para los microorganismos, a diferencia del azúcar refinada que solo contiene sacarosa. La temperatura óptima de activación es entre 25 °C y 37 °C, ya que fuera de estos rangos la velocidad de reproducción de estos microorganismos se reduce considerablemente. (Miyashiro, Meggs, 2007).

## **2.3 BIOL**

### **2.3.1 ASPECTOS GENERALES**

El biol es la parte líquida del efluente resultante del proceso de biodigestión anaeróbica. Aproximadamente el 90% del material que ingresa al biodigestor se transforma en biol. En promedio, el 90% del efluente es biol, y el resto biosol (Aparcana, 2008). Su composición depende de la materia orgánica usada y de las características del proceso, por lo que podría decirse que no existen dos bioles iguales. Aun así, comúnmente siempre contiene una gran concentración de macro y micronutrientes, en relación a fertilizantes orgánicos no degradados (como las excretas), cuya disponibilidad para las plantas mejora notablemente con el proceso de biodigestión. En el cuadro N° 1 se aprecian la composición de cuatro distintos tipos de biol.

**Cuadro N° 1: Composición química de diferentes bioles.**

<b>Componente</b>	<b>Biol 1</b>	<b>Biol 2</b>	<b>Biol 3</b>	<b>Biol 4</b>
pH	7.96	8.1	No menciona	6.7 - 7.9
Materia Seca	4.18%	4.20%	No menciona	1.40%

Nitrógeno Total	2.63 g/Kg	2.4 g/Kg	0.2 g/Kg	0.9 g/Kg
NH4	1.27 g/Kg	1.08 g/Kg	No menciona	No menciona
Fósforo	0.43 g/Kg	1.01 g/Kg	0.076 g/Kg	0.048 mg/Kg
Potasio	2.66 g/Kg	2.94 g/Kg	4.2 g/Kg	0.29 mg/Kg
Calcio	1.05 g/Kg	0.50 g/Kg	0.056 g/Kg	2.1 g/Kg
Magnesio	0.38 g/Kg	No menciona	0.131	0.14%
Sodio	0.404 g/Kg	No menciona	2.1	No menciona
Azufre	No menciona	No menciona	6.4	0.33 mg/l
Carbono	No menciona	No menciona	1.1	0.23 - 0.30
Aluminio	No menciona	No menciona	0.04	No menciona
Boro	No menciona	No menciona	0.56	No menciona
Zinc	No menciona	No menciona	No menciona	0.05 mg/l

Fuente 1: Biol de estiércol de vacuno (Potsch, 2004)

Fuente 2: Biol de estiércol de vacuno y restos de comida casera (Zethner, 2002)

Fuente 3: Biol de hojas, tallos y frutos de banano (Clark, 2007)

Fuente 4: Biol de estiércol de vacuno (ITINTEC, 1980)

Todas las fuentes citadas por Aparcana (2008)

Como se puede apreciar, la composición de un biol depende de los sustratos que ingresen al biodigestor; así como del proceso de biodigestión en sí. Por lo tanto, puede decirse que cada biol es “único”.

De los datos mostrados en la tabla anterior se puede apreciar que por lo general, el biol presenta una baja concentración de materia seca (sólidos totales), que varía entre 1-5%. Respecto a la cantidad de nutrientes, estos varían dependiendo del tipo de sustratos que hayan sido fermentados. El ratio de N-P-K y el resto de nutrientes ingresantes al biodigestor, con respecto al saliente en forma de biol es de casi 1:1, aunque la disponibilidad de estos nutrientes aumenta notablemente con la degradación de la materia orgánica en la que se encuentran (Aparcana, 2008). Además, como puede verse en el siguiente cuadro, presenta hormonas vegetales de crecimiento, las cuales son desechos de las bacterias involucradas en la biodigestión anaeróbica, por lo que no se producen en el compostaje.

**Cuadro N° 2: Composición bioquímica de un biol específico.**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Ácido indol acético	9.0 ng/g
Giberelina	8.4 ng/g
Purinas	9.3 ng/g
Citoquininas	No detectado
Tiamina (Vit B1)	259.0 ng/g
Riboflavina (Vit B2)	56.4 ng/g
Adenina	No detectado
Ácido fólico	6.7 ng/g
Ácido pantoténico	142.0 ng/g
Triptofano	26.0 ng/g
Inositol	No detectado
Biotina	No detectado
Niacin	No detectado
Cianocobalamina (Vit B12)	4.4 ng/g
Piridoxina (Vit B6)	6.6 ng/g

Fuente: Aparcana, 2005; Siura 2008

Las hormonas vegetales o fitohormonas son fitorreguladores del desarrollo producidas por las plantas. Hay cinco grupos hormonales: Adeninas, Purinas, Auxinas, Giberelinas y Citoquinas. Todas estas estimulan la formación de nuevas raíces y su fortalecimiento. También estimulan la floración, la fructificación, el crecimiento de tallos y hojas. El biol, cualquiera sea su origen, cuenta con estas fitohormonas, por lo que encuentra un lugar muy importante en la práctica de la agricultura orgánica, al tiempo que abarata costos y mejora la productividad y calidad de los cultivos. En el cuadro N° 2 se aprecia la composición bioquímica de un biol específico.

### **2.3.1 BENEFICIOS DEL BIOL**

Aparcana (2008) destaca los siguientes beneficios del biol en la agricultura:

- El uso de biol permite mejorar la capacidad de intercambio catiónico del suelo. Con ello se amplía la disponibilidad de nutrientes en el mismo, que puedan ser aprovechados directamente por los cultivos.

- Ayuda a mantener la humedad del suelo y a crear un microclima adecuado para las plantas.
- Por ser líquido, se puede aplicar junto con el agua de riego, principalmente en sistemas tecnificados de irrigación.
- Siendo una fuente orgánica de fitorreguladores en pequeñas cantidades es capaz de promover actividades fisiológicas y estimular el desarrollo de las plantas, sirviendo para: enraizamiento (aumenta y fortalece la base radicular), mejora la floración y activa el vigor y poder germinativo de las semillas, traducándose todo esto en un aumento significativo de las cosechas.
- Puede usarse para tratar las semillas antes de ser plantadas, aumentando su velocidad y probabilidades de germinación.
- Pruebas realizadas con diferentes cultivos muestran que usar sólo biol sería suficiente para lograr la misma o mayor productividad del cultivo que empleando fertilizantes químicos.

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1 UBICACIÓN**

La investigación se realizó en la Universidad Nacional Agraria La Molina, específicamente en la parte posterior de los laboratorios de Ingeniería Ambiental.

#### **3.2 EXPERIMENTO**

Se llevó a cabo un experimento con biodigestores con sistema batch (una sola alimentación) a escala de 20 litros alimentados con estiércol de vacuno de los establos de la Universidad, paja de trigo triturada, agua y *Microorganismos Efectivos* (excepto el grupo control). Todos los biodigestores fueron cargados con el mismo sustrato en la misma concentración, siendo la única diferencia entre los tratamientos del experimento la dosis de *Microorganismos Efectivos*.

#### **3.3 ACTIVACIÓN DE EM**

La solución EM utilizada fue la EM-1 de la empresa BIOEM Perú S.A.C. Se seleccionó dicha solución debido a que la empresa no ofrece un producto formulado especialmente para la biodigestión anaeróbica, debido a que, como ya se mencionó; aún no se ha investigado lo suficiente sobre sus efectos en dicho proceso. Sin embargo, aunque el EM-1 está diseñado para usarse en la agricultura; contiene muchos de los microorganismos que intervienen directa e indirectamente en la biodigestión anaeróbica (bacterias ácido lácticas, fototróficas, levaduras, actinomicetos y hongos filamentosos), por lo que es la más indicada entre las soluciones ofrecidas por la empresa (EM-1, EM-Compost y EM-Agua).

Antes de usar los *Microorganismos Efectivos (EM)* deben ser activados, convirtiéndose en *Microorganismos Efectivos activados (EMa)*. Para esto, siguiendo las instrucciones del proveedor de la solución EM-1, se mezcló un litro de la solución de *Microorganismos*



*Efectivos* con un litro de melaza, y se añadió agua hasta completar los 20 litros. La mezcla fue almacenada en un contenedor cerrado herméticamente y almacenada en un ambiente oscuro y a temperatura ambiente. Durante los siguientes siete días se abrió diariamente el recipiente para liberar el gas producido, así como para monitorear el pH. La solución se consideró activada una vez que su pH fue menor a 4, su color fue anaranjado oscuro y presentaba un olor agríndice agradable.

Durante la incubación de los microorganismos, se adaptó 15 galoneras de 20 litros para el experimento. Con ayuda de un taladro, se realizó una perforación en cada una de las galoneras, así como en las tapas de 15 botellas de plástico de 3 litros. Las galoneras fueron conectadas con las botellas mediante mangueras de silicona, para luego hermetizar las uniones usando silicona. El propósito de este paso fue poder drenar el gas generado durante la biodigestión fuera de las galoneras para evitar que la presión afecte el desarrollo de los microorganismos. Según López (2009), la presión interna es un factor que puede afectar negativamente el proceso de biodigestión.

### **3.4 CARGA Y TRATAMIENTOS**

Finalmente, se procedió a la carga de los biodigestores. En cada uno de los biodigestores se agregó 1300 gramos de estiércol de vacuno seco, 200 gramos de paja de trigo triturada y 10 gramos de cal apagada para evitar la excesiva acidificación. Esto último se realizó debido a que, tratándose de un sistema batch, no es posible realizar un recambio periódico de sustrato. Esto puede llevar a una excesiva acidificación, lo que a su vez puede anular todo el proceso de biodigestión por ser letal para los microorganismos involucrados.

Además, se agregaron diferentes dosis de la solución de Microorganismos Efectivos (0, 0.2, 0.5, 1 y 2 litros; tres repeticiones cada uno). Finalmente, se agregó agua hasta completar el volumen de 20 litros, tras lo cual se homogenizó la mezcla. Cada biodigestor fue tapado herméticamente y colocado en la parte posterior del laboratorio de Ingeniería Ambiental para el proceso de biodigestión. En el cuadro N° 3 se aprecia la codificación de los tratamientos.

**Cuadro N° 3: Códigos de los tratamientos.**

Concentración EM (%)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
0 (grupo control)	A-1	A-2	A-3
1	B-1	B-2	B-3
2.5	C-1	C-2	C-3
5	D-1	D-2	D-3
10	E-1	E-2	E-3

Durante la biodigestión, la temperatura fue baja considerando la época del año (primavera). En la mayoría de los días no superó los 20°C, y en ocasiones bajó hasta los 15°C (SENHAMI, 2013).

Para esta temperatura, se suele recomendar un tiempo de retención de dos meses. Sin embargo, con el propósito de averiguar si los Microorganismos Efectivos son capaces de acelerar el proceso de biodigestión, se optó por un tiempo de retención de 45 días. De esta forma, podría apreciarse de una forma más clara el beneficio, o no; de la aplicación de EM en los biodigestores.

Lo que garantizó que el proceso sería una biodigestión anaeróbica, en lugar de un proceso de ensilado; será los sustratos utilizados. El ensilaje requiere de una relación C/N mucho mayor que la biodigestión para promover el desarrollo de las bacterias epifíticas de ácido láctico (BAC) que llevan a cabo la fermentación láctica (Weinberg y Muck, 1996). Debido a esto, se suele realizar casi en su totalidad con residuos vegetales, que contienen una concentración de carbono muy superior a los residuos animales. Por el contrario, en el presente experimento se utilizará tanto insumos vegetales como animales en una proporción tal que la relación C/N se encuentre entre 25 y 30, parámetro que favorece la actividad de las bacterias acetogénicas y metanogénicas. (Yongfu, 1989). Además, la biodigestión anaeróbica requiere la presencia de bacterias metanogénicas, las cuales se encuentran en las heces animales (Lugones, 2003). Por lo tanto, el uso de estiércol fresco de vacuno en una

adecuada proporción, como se mencionó anteriormente; contribuirá a que se lleve a cabo el proceso de biodigestión anaeróbica.

### **3.5 MUESTREO Y ANÁLISIS**

Una vez finalizado el tiempo de retención establecido, se procedió al muestreo del biol. Se tomó una muestra de dos litros de cada biodigestor en las de polietileno para llevar a cabo los análisis correspondientes. Se realizaron análisis de olor, color, pH, conductividad eléctrica, sólidos totales, DBO<sub>5</sub>, nitratos (no planificado, ver resultados), coliformes fecales e índice de germinación. Los siguientes análisis fueron ejecutados en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la UNALM.

Los parámetros de olor y color fueron analizados subjetivamente.

Para analizar el pH se utilizó un pHímetro portátil. La determinación es instantánea, colocando el electrodo del equipo en la muestra a analizar.

Para el caso de la conductividad eléctrica, se utilizó un conductímetro. Al igual que en el caso anterior, la determinación es instantánea.

Para la determinación de sólidos totales se pesaron quince cápsulas petri vacías en una balanza analítica y se registraron los valores. Se colocó 50ml de cada muestra de biol en cada una de las cápsulas, las cuales fueron colocadas en la estufa a 105°C durante 24 horas para ser secadas. Una vez secadas, las cápsulas fueron retiradas de la estufa y pesadas nuevamente en la balanza analítica para calcular la diferencia de peso, la cual corresponde a los sólidos presentes en las muestras.

Los análisis de coliformes fecales, DBO<sub>5</sub> y nitratos fueron encargados al laboratorio especializado de la empresa DELTALAB S.A.C.

Finalmente, se realizó un ensayo de biogerminación con semillas de lechuga (*Lactuca Sativa*) para evaluar el desempeño de los bioles como fertilizantes y su potencial efectividad en la agricultura. El ensayo se llevó a cabo utilizando el método de Sobrero y Ronco (2004). Se utilizaron semillas de la variedad Duett, obtenidas en la oficina de Hidroponía de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Para cada muestra de biol, se colocó un papel filtro dentro de un recipiente plástico previamente desinfectado. A continuación, se humedeció el papel filtro con cinco mililitros del biol y se colocaron veinte semillas de lechugas sobre el mismo. A pesar de que se recomienda diluir el biol, debido a que las semillas de lechuga son muy delicadas y los patógenos presentes pueden ser dañinos o incluso letales para ellas, se aplicó el biol puro con el fin de apreciar mejor el contraste entre los resultados de los distintos tratamientos. Los recipientes fueron tapados, guardados dentro de bolsas de polietileno para evitar la pérdida de humedad y almacenados en un ambiente oscuro a temperatura ambiente durante 96 horas.

Una vez concluido el período de germinación, se extrajeron las semillas de los recipientes y se midieron cuidadosamente las radículas con una regla. También se observaron cuántas de las semillas colocadas consiguieron germinar en cada uno de los recipientes. En este tipo de ensayos el índice de germinación normalmente es relativo, con respecto al control. Sin embargo, dado que en este caso cada uno de los tratamientos, incluido el control; tuvo tres repeticiones, se optó por utilizar un índice de germinación absoluto, mediante la fórmula:

$$IG = L \times G$$

Donde:

IG: Índice de germinación (adimensional).

L: Longitud promedio de las radículas, tomando en cuenta únicamente a las semillas germinadas (mm).

G: Número de semillas germinadas.

Una vez obtenidos todos los resultados de los ensayos, se analizaron estadísticamente utilizando el Software Minitab. Se realizaron pruebas de correlación, análisis ANOVA y pruebas de Tukey.

La razón por la que no se analizó macro y micro nutrientes es que la cantidad de nutrientes del efluente suele ser casi el mismo que el de la carga (Aparcana, 2008). Dado que todos los biodigestores recibieron exactamente la misma carga, siendo la única diferencia la concentración de EM; la cantidad de nutrientes sería la misma para todos. La diferencia radicaría en la proporción de dichos nutrientes que están disponibles para las plantas, lo que a su vez depende del grado de degradación de la materia orgánica. Debido a esto se seleccionó los parámetros antes mencionados, por ser indicadores directos e indirectos del grado de degradación de la materia orgánica presente.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 COLOR

Los bioles del grupo control presentaron un color marrón claro, muy similar al de la carga inicial, indicando una escasa degradación de la materia orgánica.

Por el contrario, los bioles de los tratamientos restantes mostraron una coloración marrón verdosa oscura. Numerosas experiencias en investigaciones con biodigestores, como la de Salazar (2012) y la de Wood (2002) demuestran que, cuando se utiliza materia fecal como sustrato para una biodigestión, los colores oscuros, principalmente el verde oscuro y el negro, indican un estado avanzado de degradación, sobre todo si el color se contrasta de forma visible con el de la carga inicial.

En la figura N° 6 se resalta el contraste que existió entre el color del grupo control, sin Microorganismos Efectivos (izquierda), y el tratamiento E, con 10% EM (derecha):



**Figura N° 6: Bioles de los tratamientos A (izquierda) y E (derecha).**

Puede además apreciarse a simple vista que el biol del grupo control presenta grumos de estiércol flotantes e incluso trozos de paja de trigo enteros aún sin degradar, mientras que en los bioles del tratamiento E los sólidos no son apreciables a simple vista. Esto demuestra el contraste que existe en el nivel de degradación entre ambos tratamientos.

## **4.2 OLOR**

Los bioles del grupo control presentaron un olor fecal y de putrefacción relativamente intenso. El olor de los bioles de los tratamientos B, C y D fue mucho menos intenso, pero aún perceptible. Aun así, no fue un olor de putrefacción, sino de fermentación. Finalmente, el olor del tratamiento E fue muy leve, casi imperceptible.

Nuevamente, este parámetro subjetivo demuestra a simple vista la diferencia del nivel de descomposición de los tratamientos. El principal causante de los malos olores provenientes de la materia fecal es el amoníaco, además de otros compuestos nitrogenados derivados de la descomposición microbiana. Debido a que es una sustancia oxidativa, apoya la putrefacción, los malos olores y el desarrollo de microorganismos indeseables y patógenos (Ramírez, 2006). El amoníaco, además; es tóxico para las bacterias metanogénicas y en concentraciones altas puede inhibir el proceso de biodigestión (López, 2009). Los Microorganismos Eficaces aceleran la descomposición del amoníaco y disminuyen su volatilización, disminuyendo o hasta suprimiendo los malos olores. Este resultado apoya lo señalado por Higa (1998), quién señaló que gracias a su efecto catalizador, los Microorganismos Efectivos garantizan que se lleve a cabo una fermentación en lugar de una putrefacción durante la descomposición de la materia orgánica.

En el caso del primer tratamiento, la degradación fue muy deficiente; lo que generó putrefacción y un olor muy desagradable. Ya en los siguientes tratamientos la acción de los Microorganismos Efectivos aceleró la degradación del amoníaco, reduciendo de manera significativa los malos olores. Y, como ya se mencionó; en el último tratamiento (10% EM) el olor fue casi imperceptible, demostrando así la efectividad de la mencionada solución

microbiana para el control de los malos olores y la aceleración de la descomposición de la materia orgánica.

Aunque los resultados obtenidos de color y olor fueron totalmente subjetivos, son casi tan importantes para los fines de la investigación que el resto de los resultados. Esto es debido a mostraron a simple vista el efecto visible que tuvo la aplicación de Microorganismos Efectivos en los bioles de los tratamientos, efecto que se confirmó de forma más objetiva con los resultados siguientes.

### 4.3 PH

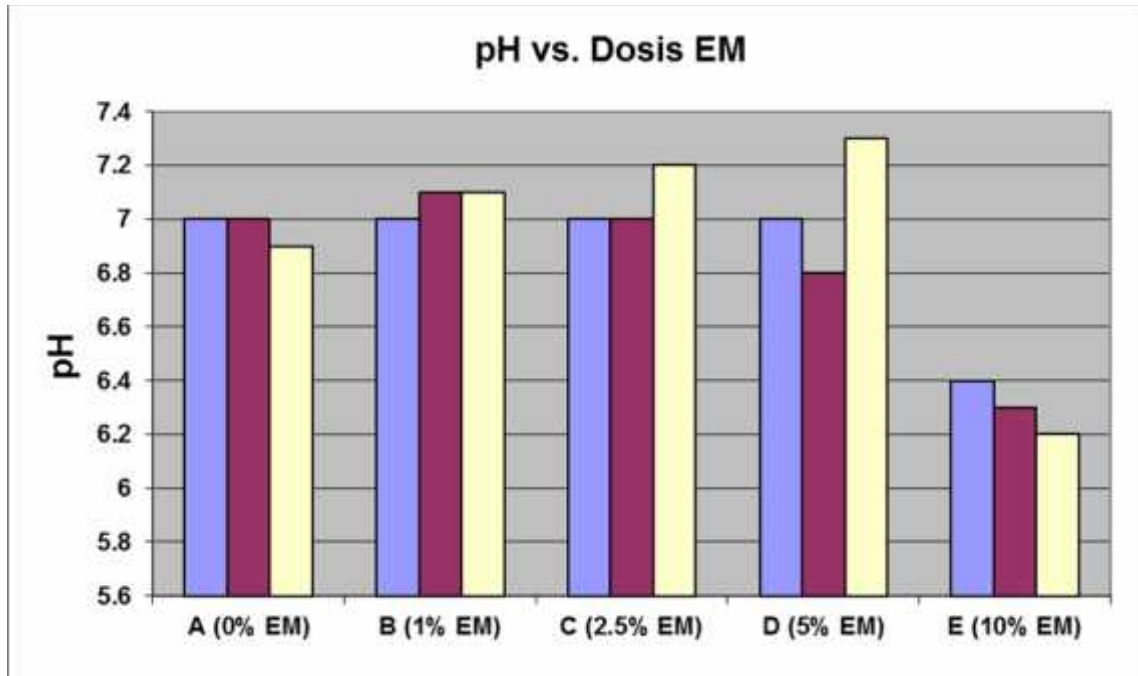
En el cuadro N° 4 se aprecian los resultados de pH.

**Cuadro N° 4: Resultados de pH.**

	<b>A (0% EM)</b>	<b>B (1% EM)</b>	<b>C (2.5% EM)</b>	<b>D (5% EM)</b>	<b>E (10% EM)</b>
Repetición 1	7.0	7.0	7.0	7.0	6.4
Repetición 2	7.0	7.1	7.0	6.8	6.3
Repetición 3	6.9	7.1	7.2	7.3	6.2
<b>Promedio</b>	<b>6.96</b>	<b>7.05</b>	<b>7.06</b>	<b>7.03</b>	<b>6.30</b>

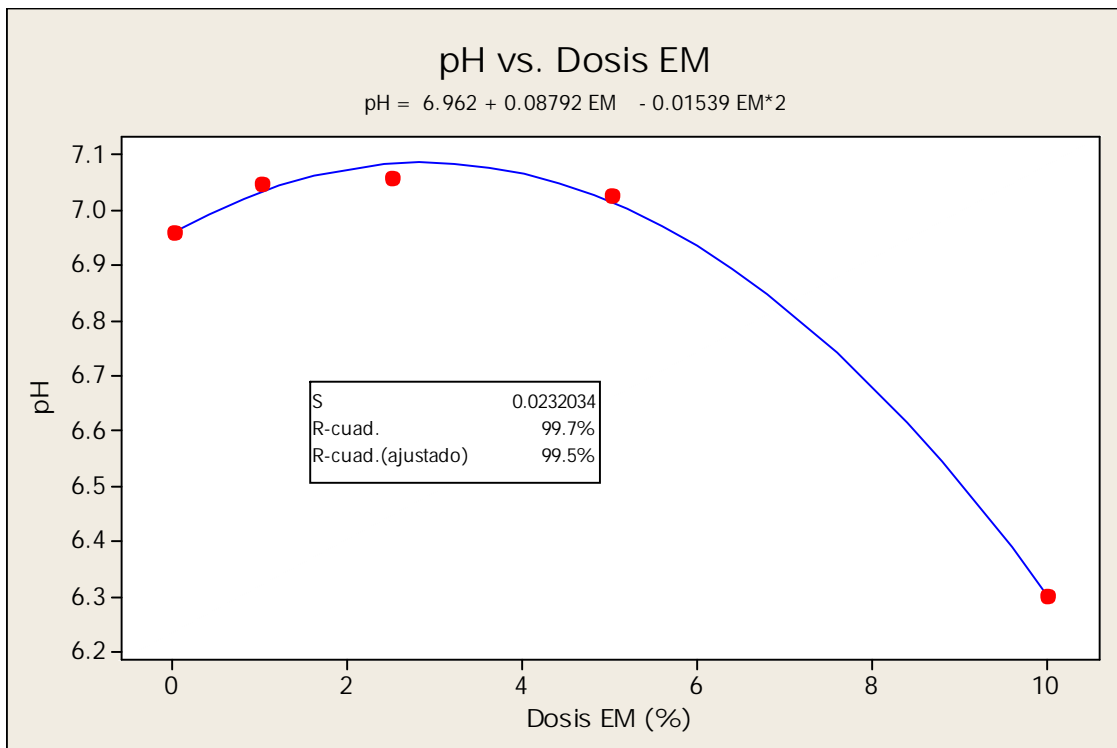
En la figura N° 8 puede apreciarse mejor el contraste entre los valores de los tratamientos:





**Figura N° 7: Resultados de pH.**

En la figura N° 8. se muestra un cuadro de regresión utilizando los valores promedio de los tratamientos.



**Figura N° 8: pH vs. Dosis de EM.**

La correlación entre el pH y la dosis de EM es cuadrática, con un  $R^2$  de 99.7% (muy significativo). El análisis estadístico utilizando la prueba de Tukey (ver anexos) confirmó lo que se puede apreciar a simple vista: Los cuatro primeros tratamientos resultaron estadísticamente similares, mientras que el quinto fue muy significativamente diferente ( $p > 0.01$ ).

Como puede apreciarse, el valor de pH es casi el mismo para los primeros cuatro tratamientos. En el caso del primer tratamiento, sin Microorganismos Efectivos; el proceso de fermentación no se vio acelerado por ningún inóculo microbiano. Como ocurre en todo biodigestor, la materia orgánica fue hidrolizada para ser convertida en ácidos orgánicos, cuya acumulación provoca una caída en el pH, la cual, si es excesiva; puede afectar negativamente o incluso suprimir el proceso de biodigestión. Sin embargo, al final del proceso de fermentación los ácidos orgánicos son convertidos en metano por las bacterias metanogénicas. Esto estabiliza el pH de la solución del reactor y evita una excesiva acidificación. Aunque normalmente el biol tiene un pH ácido, en este caso fue neutro; posiblemente debido a la cal apagada que se añadió al momento de la carga para evitar la excesiva acidificación.

En el caso de los tratamientos B, C y D; con dosis de EM 1, 2.5 y 5% respectivamente, el pH final también fue neutro al igual que el tratamiento control. Sin embargo, como demuestran los resultados de los análisis posteriores, la degradación de la materia orgánica fue superior, lo que debió haber generado una mayor concentración de ácidos orgánicos en la mezcla. Aunque entre los Microorganismos Efectivos no existen especies metanogénicas, las que se encontraban presentes en la materia orgánica con la cual se cargó el biodigestor al parecer fueron suficientes para transformar el exceso de ácidos orgánicos en metano, equilibrando el pH de la mezcla y permitiendo así que permaneciera neutro al igual que el del tratamiento control.

Por otro lado, las mezclas del tratamiento E, con 10% de EM; fueron ligeramente ácidas. Esto se debió a que, al haber una concentración tan alta de Microorganismos Efectivos en el

biodigestor, estos degradaron rápidamente la materia orgánica; generando ácidos orgánicos más rápido de lo que las bacterias metanogénicas podían transformarlos en metano, provocando que los primeros de acumularan, disminuyendo el pH de la mezcla.

Integrando estos resultados con el objetivo principal de la investigación, que es mejorar la calidad del biol resultante; la disminución del pH en el último tratamiento significa más que la simple confirmación de la aceleración de la degradación de la materia orgánica. El pH tiene un efecto muy importante en cuanto al combate de microorganismos patógenos, en el sentido de que su disminución favorece la eliminación de estos (Atlas, Bartha; 2002). Los resultados de coliformes fecales confirman esta afirmación.

Debido a que se trabajó con un sistema batch, no se llevó a cabo un monitoreo periódico de los valores de pH. Sin embargo, integrando demás resultados de la presente investigación, puede afirmarse que el proceso de biodigestión sí se llevó a cabo, sobre todo en los biodigestores con una mayor concentración de Microorganismos Efectivos.

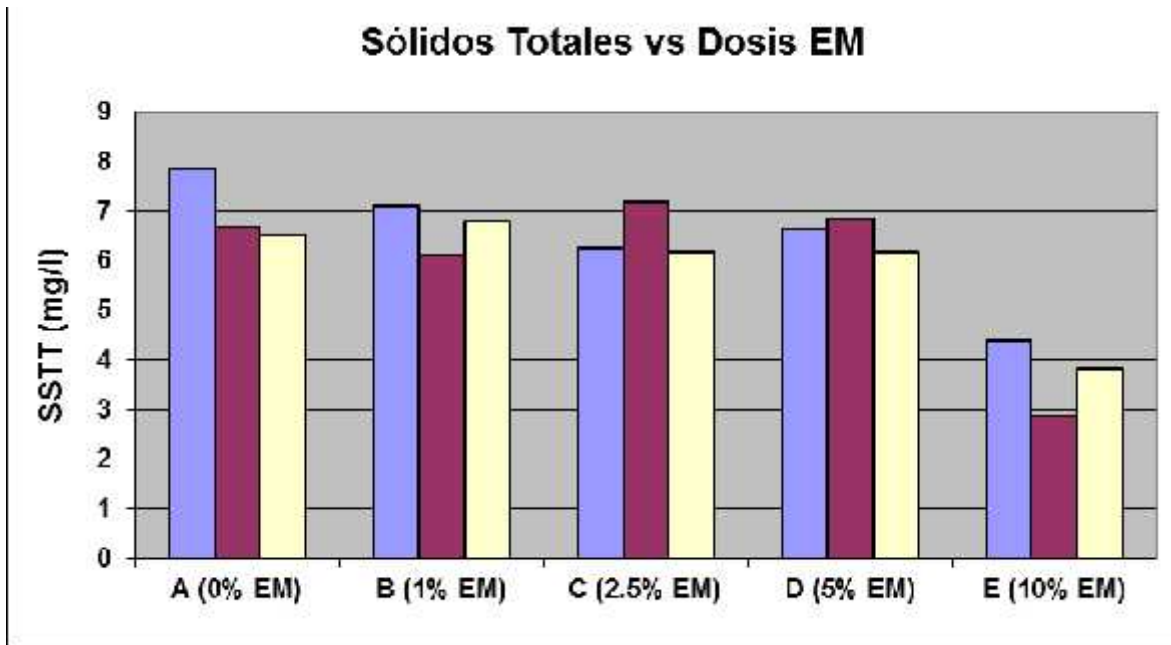
#### 4.4 SÓLIDOS TOTALES

Los valores de sólidos totales (en mg/l) para cada uno de los biodigestores se registran en el cuadro N° 5.

**Cuadro N° 5: Resultados de Sólidos Totales**

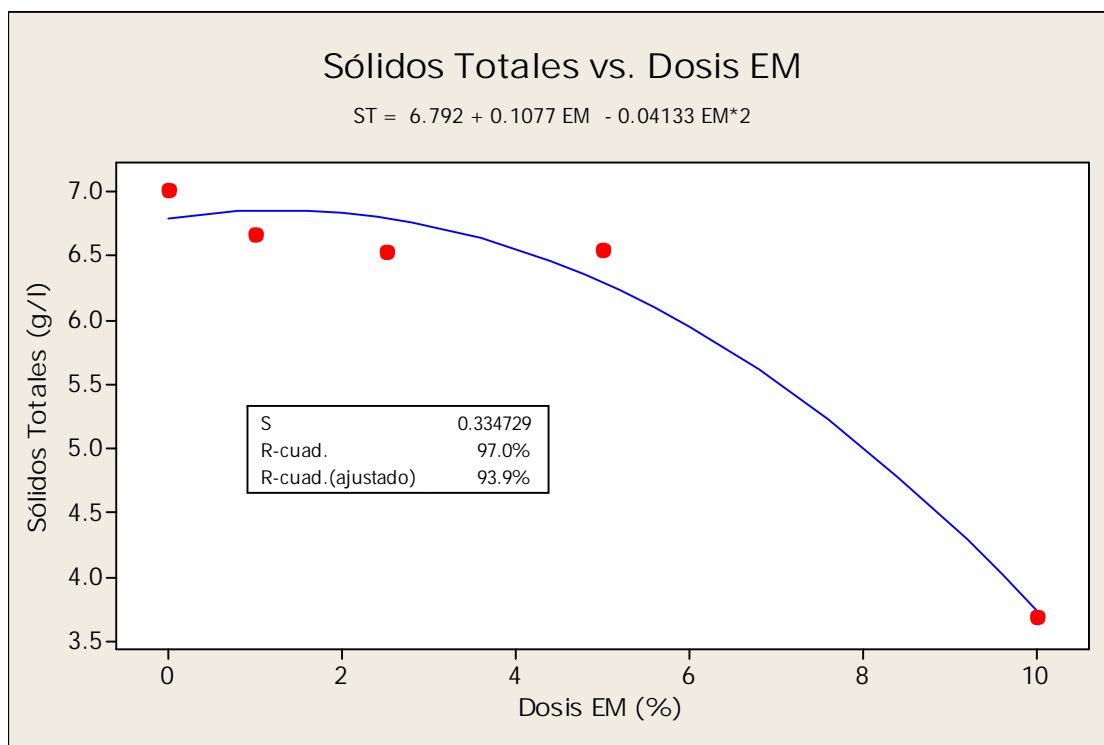
	<b>A (0% EM)</b>	<b>B (1% EM)</b>	<b>C (2.5% EM)</b>	<b>D (5% EM)</b>	<b>E (10% EM)</b>
Repetición 1	7.87	7.12	6.26	6.65	4.40
Repetición 2	6.69	6.14	7.18	6.86	2.87
Repetición 3	6.52	6.80	6.18	6.17	3.82
<b>Promedio</b>	<b>7.02</b>	<b>6.68</b>	<b>6.54</b>	<b>6.56</b>	<b>3.69</b>

En la figura N° 10 puede apreciarse mejor el contraste entre los resultados de los distintos tratamientos.



**Figura N° 9: Resultados de Sólidos Totales.**

En la figura N° 10 se muestra un cuadro de regresión utilizando los valores promedio de los tratamientos.



**Figura N° 10: Sólidos Totales vs. Dosis EM.**

La correlación entre la concentración de sólidos totales y la dosis de EM es cuadrática, con un  $R^2$  de 97% (muy significativo). La prueba estadística de Tukey (ver anexos) señaló a los cuatro primeros tratamientos como estadísticamente similares, y al quinto como muy significativamente diferente ( $p < 0.01$ ).

Como puede apreciarse claramente, el comportamiento de la concentración de sólidos totales es muy similar al del pH, manteniéndose aproximadamente constante en los cuatro primeros tratamientos, pero presentando una caída pronunciada en el quinto tratamiento.

Las primeras dosis de Microorganismos Efectivos no tuvieron un efecto significativo en la concentración de sólidos totales. Aun así, como demuestran el resto de los análisis, la degradación de la materia orgánica fue mayor en los tratamientos con Microorganismos Efectivos.

Sin embargo, cabe resaltar que, tal como se observó en la Imagen N° 1, en los bioles del primer tratamiento se observaron pequeños grumos de estiércol flotantes, e incluso trozos de paja de trigo enteros aún sin degradar; mientras que en los tratamientos restantes no se observaron dichos elementos. Esto muestra a simple vista que, aunque los primeros cuatro tratamientos con EM presentaron una menor concentración de sólidos suspendidos totales. Esto se confirmó con el análisis de conductividad eléctrica.

Por otro lado, la concentración de sólidos totales para el quinto tratamiento (10% EM) fue menor a los restantes. La diferencia fue muy significativa, siendo el valor promedio de dicho tratamiento cercano a la mitad de los valores promedio de los tratamientos restantes. La alta concentración de la solución de Microorganismos Efectivos en la mezcla del biodigestor permitió una muy superior eliminación de los sólidos presentes.

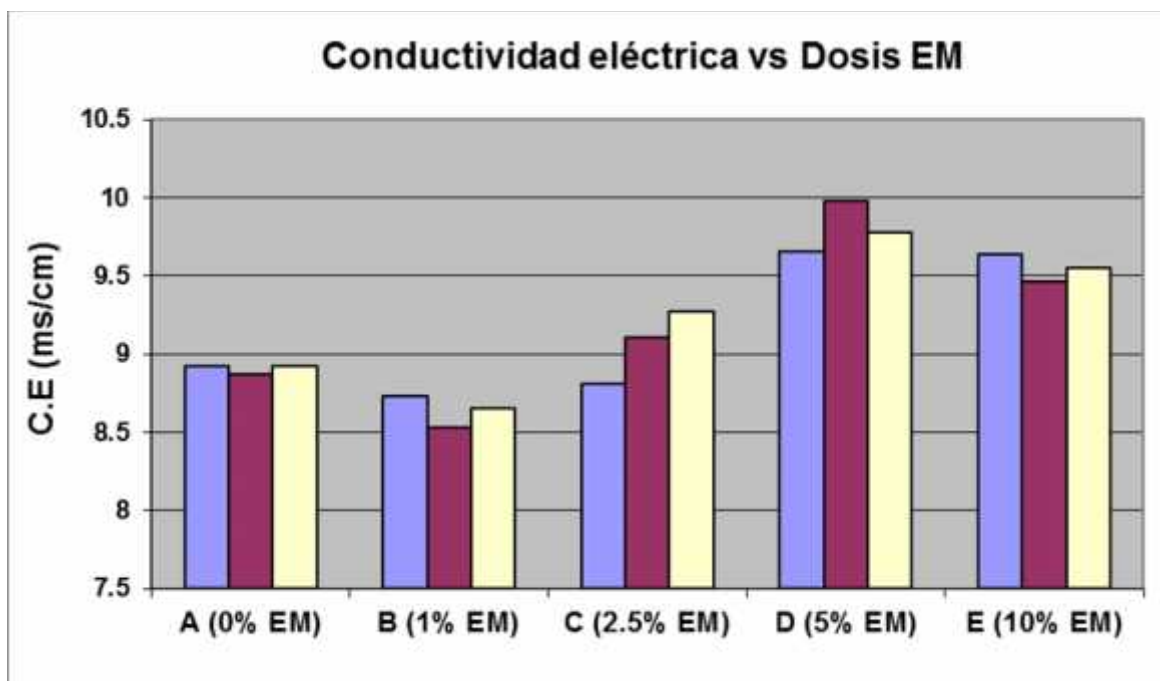
## 4.5 CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

Los valores de conductividad eléctrica (en ms/cm) para cada uno de los biodigestores se aprecian en el Cuadro N° 6.

**Cuadro N° 6: Resultados de Conductividad Eléctrica**

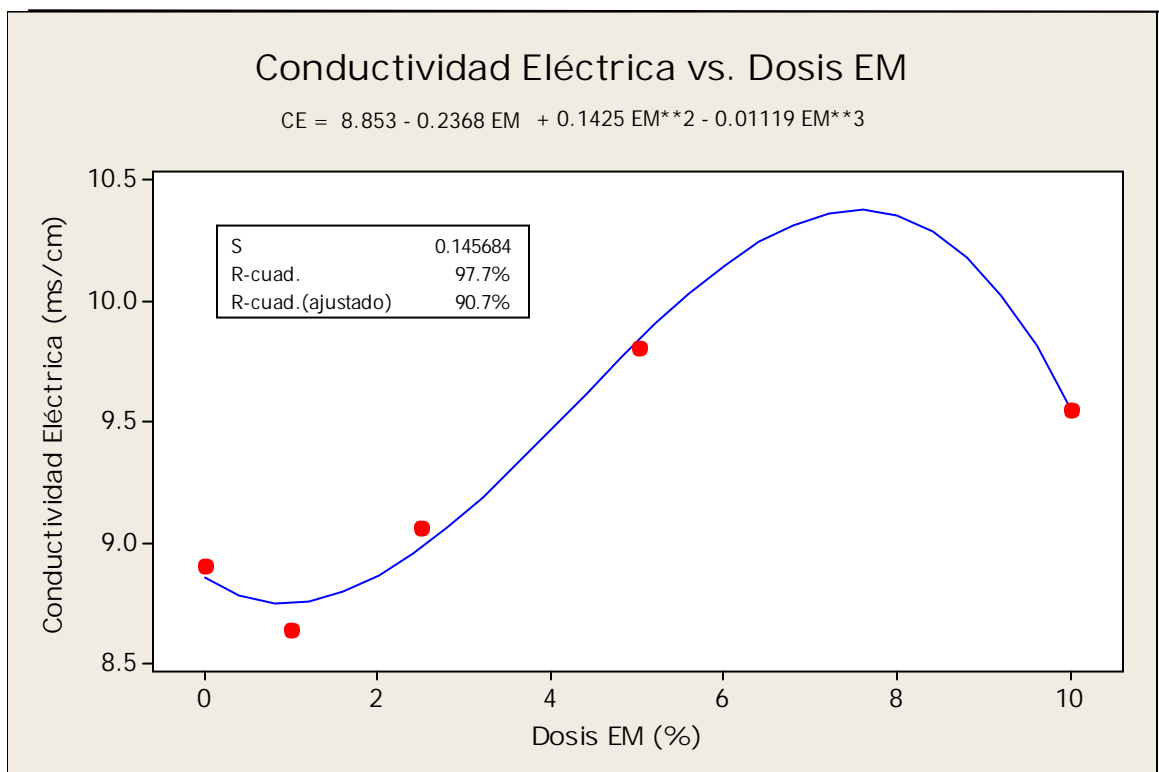
	<b>A (0% EM)</b>	<b>B (1% EM)</b>	<b>C (2.5% EM)</b>	<b>D (5% EM)</b>	<b>E (10% EM)</b>
Repetición 1	8.92	8.73	8.81	9.66	9.64
Repetición 2	8.87	8.53	9.11	9.98	9.46
Repetición 3	8.92	8.65	9.27	9.78	9.55
<b>Promedio</b>	<b>8.90</b>	<b>8.64</b>	<b>8.06</b>	<b>8.81</b>	<b>9.55</b>

En la Figura N° 11 puede apreciarse mejor el contraste entre los resultados de los distintos tratamientos.



**Figura N° 11: Resultados de Conductividad Eléctrica.**

En la Figura N° 12 se muestra un cuadro de regresión utilizando los valores promedio de los tratamientos:



**Figura N° 12: Conductividad Eléctrica vs. Dosis EM.**

La correlación entre la concentración de sólidos totales y la dosis de EM es cúbica, con un  $R^2$  de 97.7% (muy significativo). La prueba de estadística de Tukey (ver anexos) señaló a los tratamientos D y E como estadísticamente similares entre sí y diferentes del resto. Lo mismo fue para los tratamientos A y C; y para A y B.

Puede apreciarse en la gráfica un inicial aumento en la conductividad eléctrica en los cuatro primeros tratamientos. Dicho parámetro es un indicador indirecto de los sólidos disueltos totales (Dezuane, 1997). El análisis de sólidos totales mostró que los valores de los cuatro primeros tratamientos eran similares. Por lo tanto, al comparar los resultados de conductividad eléctrica con los de sólidos totales, puede afirmarse que, a pesar de que los cuatro primeros tratamientos la cantidad de sólidos totales fue similar; en los tratamientos

con Microorganismos Efectivos una mayor fracción de los sólidos totales estaba en la fase disuelta, indicando un mayor grado de degradación.

Por otro lado, entre la cuarta y quinta dosis se inicia una caída en la conductividad eléctrica y, por tanto; en la concentración de sólidos disueltos totales. Como se apreció en los resultados del análisis de sólidos totales, el quinto tratamiento (10% EM), presentó un valor mucho menor que el resto de los tratamientos, de ahí que la concentración de sólidos disueltos no continúe aumentando. Aun así, la conductividad eléctrica es similar para el cuarto y quinto tratamiento. Esto muestra que en el caso del quinto tratamiento el porcentaje de sólidos disueltos con respecto a los sólidos totales es mucho mayor, indicando un mayor grado de degradación.

A esto se le suma el hecho de que, como explicaron Higa y Chinen (1998), la catálisis de los Microorganismos Efectivos genera un medio antioxidante que favorece la separación líquido-sólidos. De esta forma, los sólidos suspendidos sedimentables se precipitan más fácilmente, reduciendo la cantidad de sólidos en la fase líquida del reactor.

#### **4.6 COLIFORMES FECALES**

Los valores de coliformes fecales (en NMP/100ML) para cada uno de los biodigestores se aprecian en el Cuadro N° 7.

**Cuadro N° 7: Resultados de Coliformes Fecales**

	<b>A (0% EM)</b>	<b>B (1% EM)</b>	<b>C (2.5% EM)</b>	<b>D (5% EM)</b>	<b>E (10% EM)</b>
Repetición 1	160000	160000	54000	7900	4900
Repetición 2	160000	92000	35000	4700	2200
Repetición 3	920000	92000	35000	24000	1700

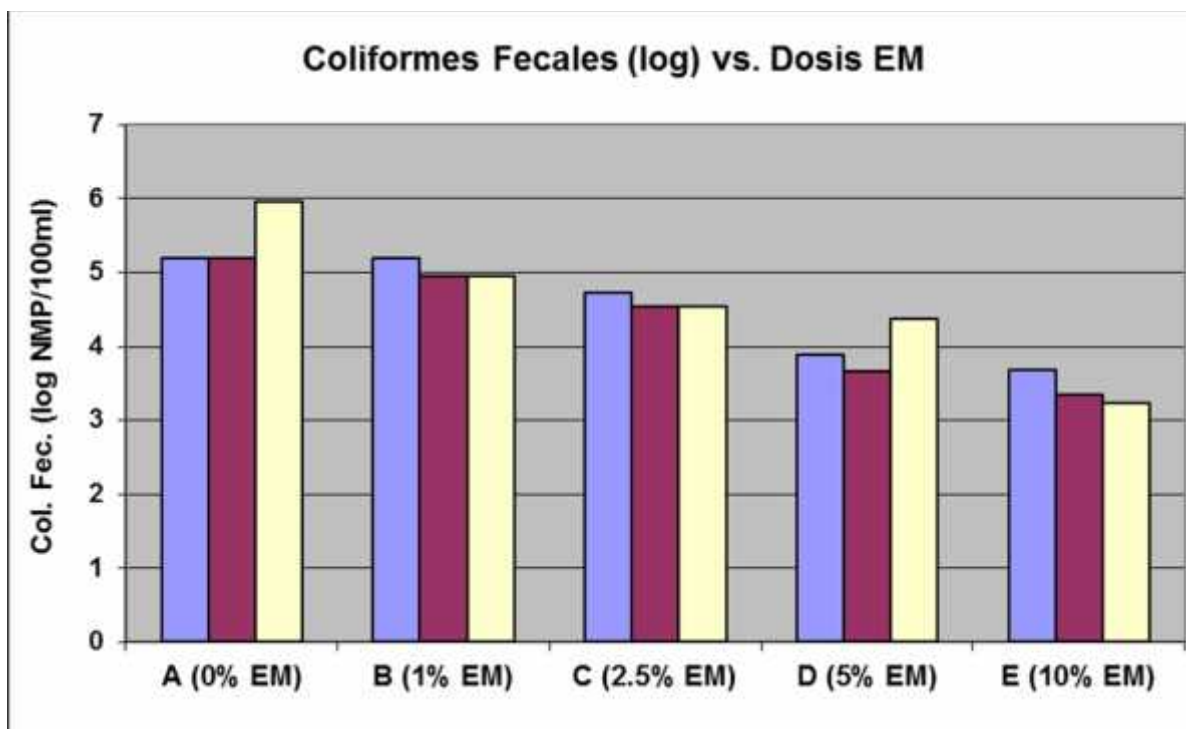


Para facilitar el análisis de los datos, los valores fueron convertidos a unidades logarítmicas (log), los cuales se presentan el cuadro N° 8.

**Cuadro N° 8: Resultados de Coliformes Fecales (log)**

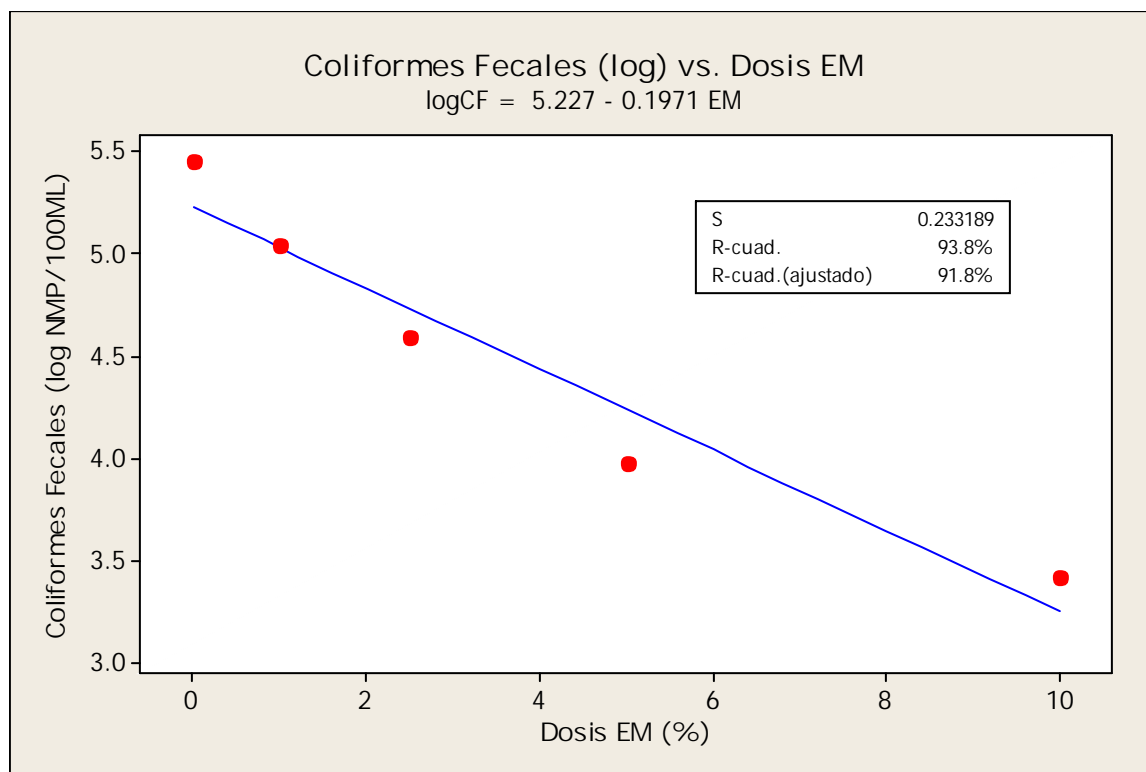
	<b>A (0% EM)</b>	<b>B (1% EM)</b>	<b>C (2.5% EM)</b>	<b>D (5% EM)</b>	<b>E (10% EM)</b>
Repetición 1	5.20	5.20	4.73	3.89	3.69
Repetición 2	5.20	4.96	4.54	3.67	3.34
Repetición 3	5.96	4.96	4.54	4.38	3.23
<b>Promedio</b>	<b>5.45</b>	<b>5.04</b>	<b>4.60</b>	<b>3.98</b>	<b>3.42</b>

En la Figura N° 13 puede apreciarse mejor el contraste entre los resultados de los distintos tratamientos:



**Figura N° 13: Resultados de Coliformes Fecales.**

En la Figura N° 14 se muestra un cuadro de regresión utilizando los valores promedio de los tratamientos:



**Figura N° 14: Coliformes Fecales vs. Dosis EM**

La correlación entre la concentración de coliformes fecales (log) y la dosis de EM es lineal, con un  $R^2$  de 93.8% (muy significativo). La prueba estadística de Tukey (ver anexos) agrupó los tratamientos en pares y en tres grupos, es decir; A y B, C y D; y D y E.

Los resultados muestran un claro y constante descenso de la concentración de coliformes fecales al aumentar la dosis de Microorganismos Efectivos.

En primer lugar, como ya demostraron los resultados de los análisis anteriores; los Microorganismos Efectivos aceleraron la degradación de la materia orgánica orgánica fecal, lo cual a su vez genera la reducción de los coliformes presentes en dicha materia.

Además, como ocurre en todo biodigestor; durante la fase acidogénica de la fermentación anaeróbica la acumulación de ácidos orgánicos provoca una caída abrupta del pH, la cual no es tolerada por muchos de los microorganismos patógenos presentes en la materia fecal. Por ejemplo, la *Escherichia Coli*, el principal representante del grupo de los coliformes; requiere de un pH entre 6 y 7 para desarrollarse de manera óptima (Atlas, Bartha; 2002). Sin embargo, como ya se mencionó; debido a la acción de los EM la degradación de la materia orgánica y, por lo tanto; la generación de ácidos orgánicos, fue superior. Esto habría dado lugar a una caída más pronunciada de pH, la cual llevó a una mayor reducción de coliformes fecales. Esto último fue particularmente importante en el tratamiento E (10% EM), cuyo valor de pH mostró que la generación de ácidos orgánicos fue significativamente superior, a pesar de haberse aplicado cal al momento de la carga.

También, y posiblemente más importante; se encuentra el efecto de las bacterias ácido lácticas, una especie muy importante presente en el EM. Dichas bacterias sintetizan ácido láctico a partir de azúcares y otros productos del metabolismo de las demás especies microbiológicas presentes en el EM. El ácido láctico tiene la propiedad de suprimir los microorganismos patógenos, incluyendo al *Escherichia Coli* (Miyashiro, Meggs; 2007).

A todo esto se le suma las condiciones antioxidantes generadas por el EM (Higa, Chinen; 1998), que desfavorecen el desarrollo de los agentes patógenos presentes en la materia orgánica.

Cabe mencionar, además; que la solución de EM-1 activada es de por sí ácida (3-4 pH). La aplicación de dicha solución en los biodigestores debió reducir directamente la presencia de microorganismos patógenos al reducir súbitamente el pH de la solución. Sin embargo, debido al diseño del experimento no es posible determinar exactamente que porcentaje de la reducción de coliformes fue producto de la caída del pH y que porcentaje de la acción directa de los Microorganismos Efectivos.

No se alcanzó el estándar de calidad ambiental establecido por el MINAM para aguas de riego (1000 NMP/ml o 3 unidades logarítmicas). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que

se utilizó un tiempo de retención menor al recomendado. Además, se utilizó un sistema batch, el cual es menos efectivo que el sistema semi-continuo. De haber utilizado un mayor tiempo de retención y/o un sistema más efectivo muy posiblemente se hubiera alcanzado el estándar establecido. A esto se le suma el hecho de que se aplicó cal a la mezcla líquida de los reactores para evitar la excesiva acidificación. Dado que la acidificación no fue más intensa, el efecto antimicrobiano de la acidez fue menor. Aun así, el biol del tratamiento E (10%) podría utilizarse en la agricultura siendo diluido en agua.

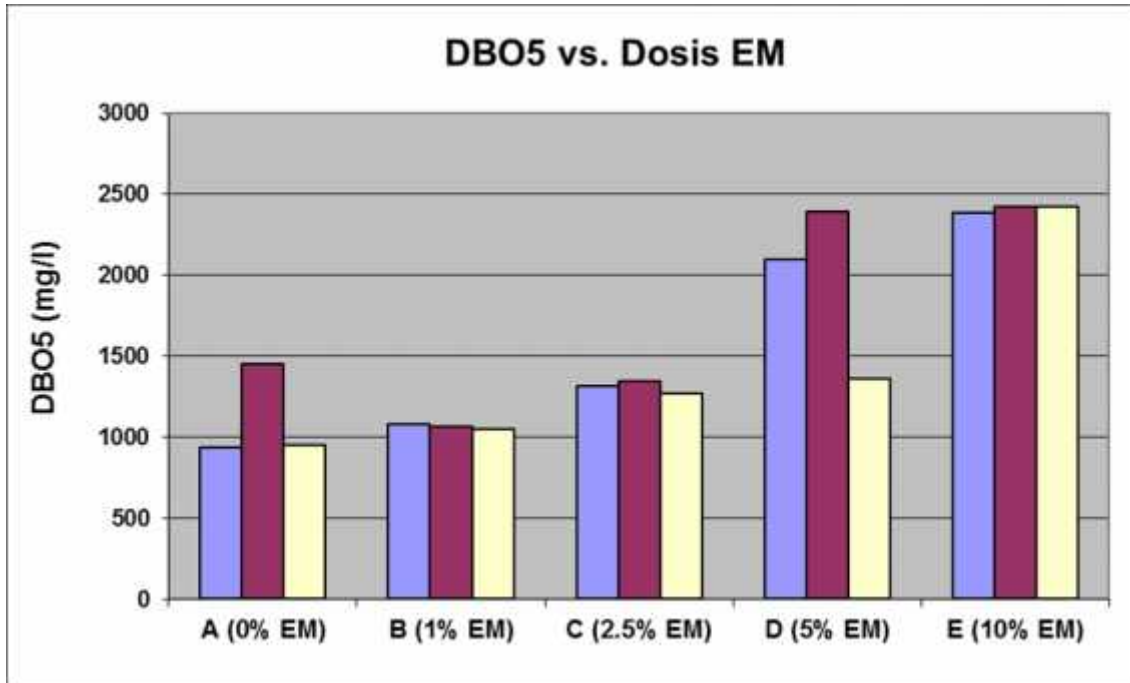
#### 4.7 DBO<sub>5</sub>

Los valores de DBO<sub>5</sub> (en mg/l) para cada uno de los biodigestores se exponen en el Cuadro N° 9.

**Cuadro N° 9: Resultados de DBO<sub>5</sub>**

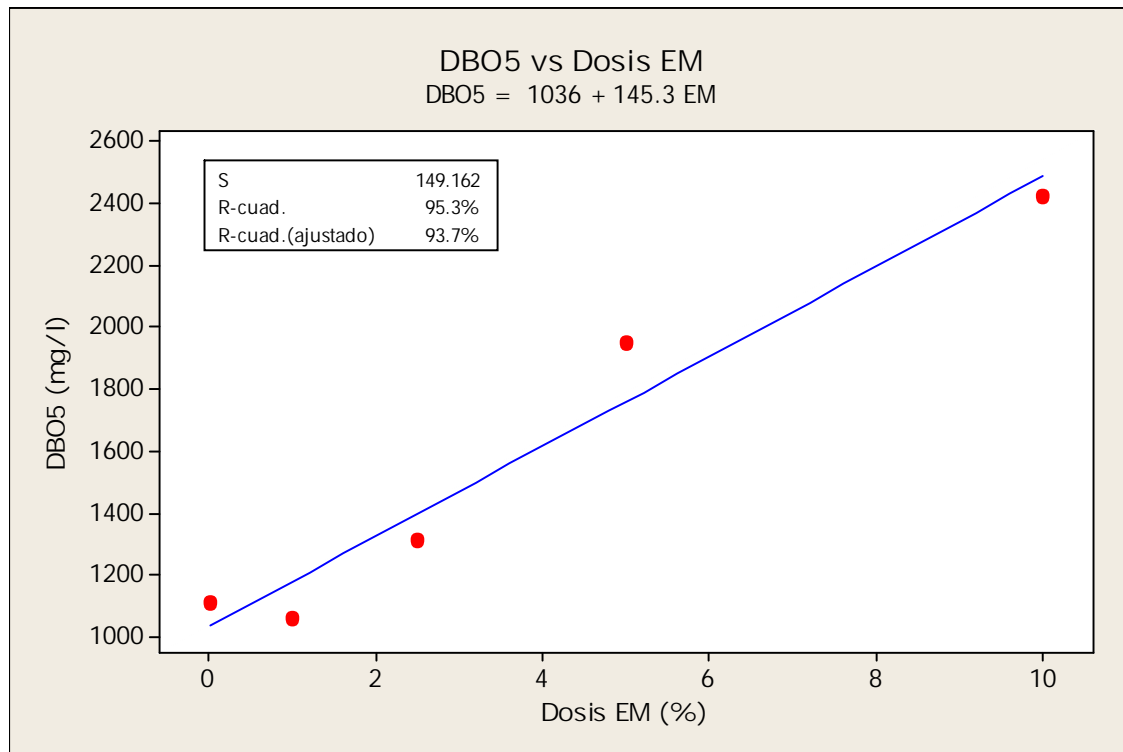
	<b>A (0% EM)</b>	<b>B (1% EM)</b>	<b>C (2.5% EM)</b>	<b>D (5% EM)</b>	<b>E (10% EM)</b>
Repetición 1	933	1080	1317	2100	2382
Repetición 2	1449	1065	1347	2397	2427
Repetición 3	948	1050	1272	1362	2427
<b>Promedio</b>	<b>1110</b>	<b>1065</b>	<b>1312</b>	<b>1953</b>	<b>2412</b>

En la Figura N° 15 puede apreciarse mejor el contraste entre los resultados de los distintos tratamientos:



**Figura N° 15: Resultados de DBO<sub>5</sub>**

En la Figura N° 16 se muestra un cuadro de regresión utilizando los valores promedio de los tratamientos.



**Imagen N° 16: DBO<sub>5</sub> vs. Dosis EM.**

La correlación entre la concentración de  $\text{DBO}_5$  y la dosis de EM es lineal, con un  $R^2$  de 95.3% (muy significativo).

Como puede apreciarse claramente, hay un aumento de la  $\text{DBO}_5$  al aumentar la dosis de Microorganismos Efectivos. Este resultado es opuesto a lo esperado, y aparentemente contradictorio con los resultados del resto de los análisis, pues dado que el  $\text{DBO}_5$  se utiliza comúnmente como un indicador de la cantidad de materia orgánica presente, se esperaba que se redujera dado que la biodigestión fue superior en los biodigestores inoculados con EM, como demostraron los resultados anteriores.

Como ya se explicó, dado que en el Perú no existe una solución EM específicamente formulada para ser utilizada en procesos anaeróbicos, se utilizó el EM-1, que aunque está formulado para ser utilizado en la agricultura, contiene microorganismos anaeróbicos y facultativos que favorecen el proceso de biodigestión anaeróbica. Pero además, contienen Hongos Filamentosos y Actinomicetos, microorganismos predominantemente aerobios facultativos. Estos, junto con las levaduras (microorganismos anaerobios facultativos) consumen rápidamente el oxígeno presente, creando condiciones anaeróbicas.

Al realizar la prueba de  $\text{DBO}_5$ , los microorganismos antes mencionados debieron consumir rápidamente el oxígeno para consumir la materia orgánica nitrogenada mediante procesos de nitrificación. Al ser mayor la dosis de EM, fue mayor el consumo de oxígeno y por lo tanto el valor de  $\text{DBO}_5$ .

Otra característica de los Microorganismos Efectivos que influyó en el resultado es que son auto sostenibles, pues los productos del metabolismo de unos microorganismos son los insumos del metabolismo de otros, por lo que pueden permanecer y reproducirse en un sistema por un largo período de tiempo, incluso de forma indefinida en caso de contar con suficientes nutrientes (Higa, 1993). A esto se le suma el hecho que se utilizó un sistema batch, por lo que no se retiraron microorganismos del sistema en lo que duró la biodigestión; pudiéndose aumentar en número y acumularse. Esta acumulación de microorganismos favoreció el rápido consumo de oxígeno al momento de ejecutar la prueba

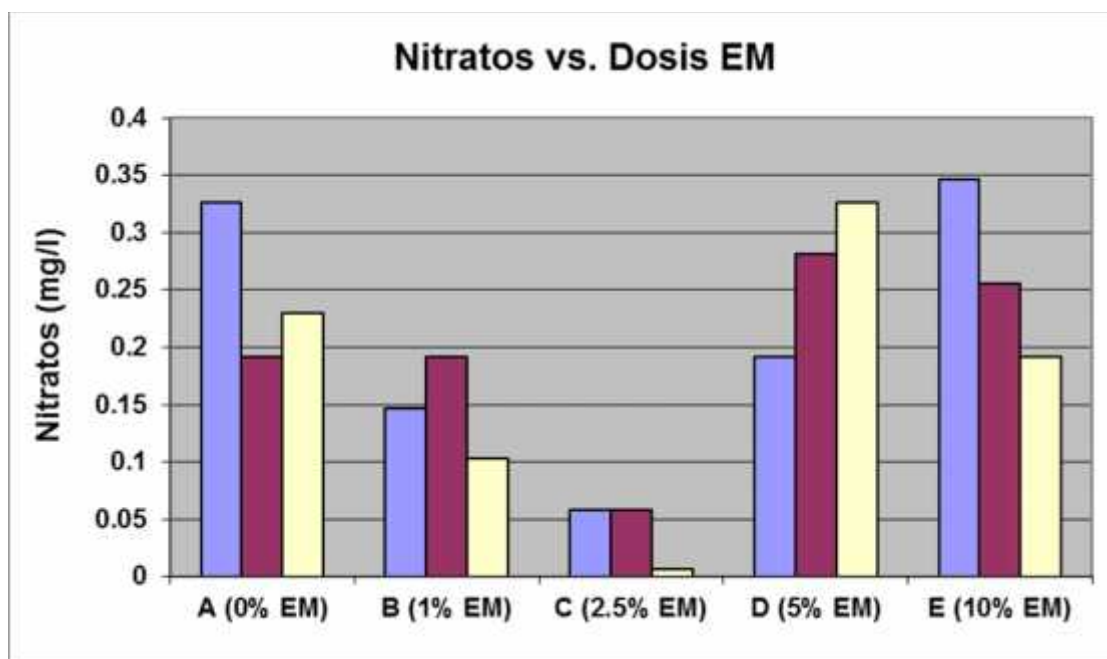
## 4.8 NITRATOS

Los valores de nitratos (en mg/l) para cada uno de los biodigestores se exponen en el Cuadro N° 10.

**Cuadro N° 10: Resultados de Nitratos**

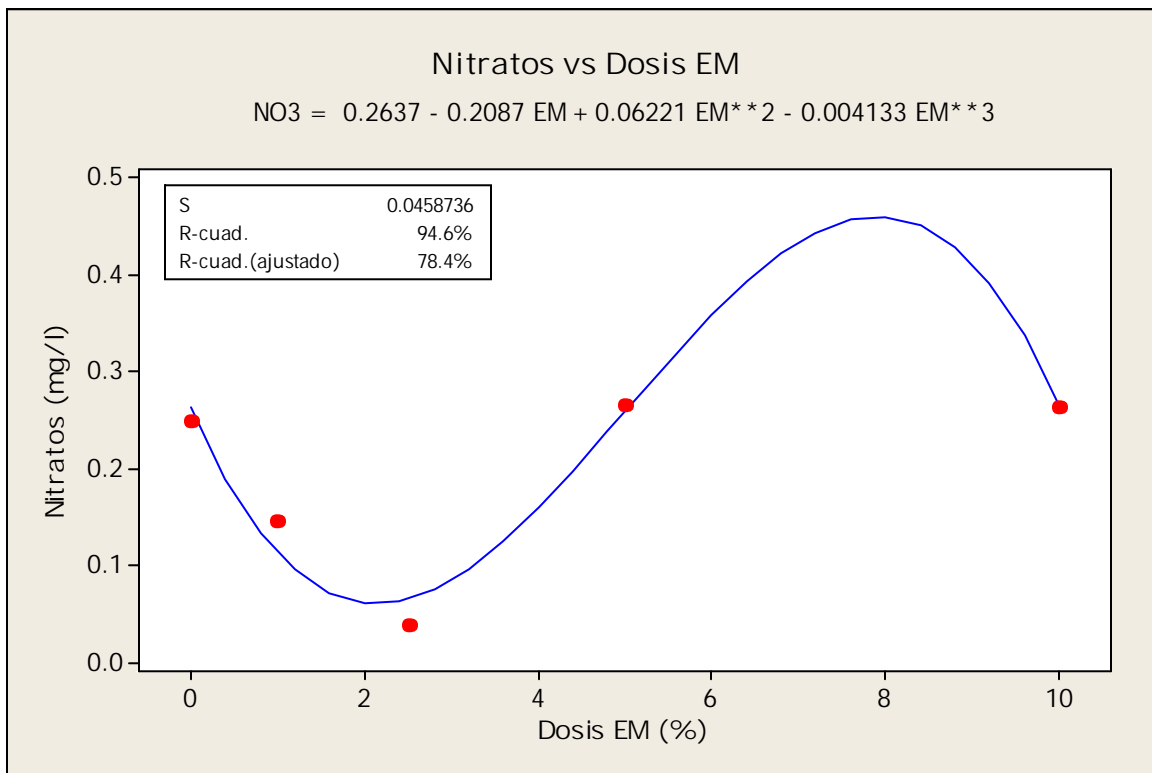
	<b>A (0% EM)</b>	<b>B (1% EM)</b>	<b>C (2.5% EM)</b>	<b>D (5% EM)</b>	<b>E (10% EM)</b>
Repetición 1	0.326	0.147	0.058	0.192	0.346
Repetición 2	0.192	0.192	0.058	0.281	0.256
Repetición 3	0.230	0.103	0.006	0.326	0.192
<b>Promedio</b>	<b>0.249</b>	<b>0.147</b>	<b>0.040</b>	<b>0.266</b>	<b>0.264</b>

En la Figura N° 17 puede apreciarse mejor el contraste entre los resultados de los distintos tratamientos:



**Figura N° 17: Resultados de Nitratos.**

En la Figura N° 19, se muestra un cuadro de regresión utilizando los valores promedio de los tratamientos:



**Figura N° 18: Nitratos vs. Dosis EM**

La correlación entre la concentración de nitratos y la dosis de EM es cúbica, con un  $R^2$  de 94.6% (muy significativo). La prueba estadística de Tukey mostró que sólo los tratamientos B y C son estadísticamente diferentes al resto.

Entre los tres primeros tratamientos se puede apreciar una reducción de la concentración de nitratos al aumentar la dosis de Microorganismos Efectivos, llegando a casi cero en el tercer tratamiento. Tal como explicaron Higa y Chinen (1998) al hablar acerca del tratamiento de aguas residuales utilizando EM, los microorganismos de dicha solución favorecen la nitrificación y posterior desnitrificación de la materia orgánica liberando nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ). Aunque la desnitrificación no es realizada directamente por los Microorganismos Efectivos, si es favorecida por el medio antioxidante creado por esto últimos.



Por otro lado, se aprecia un incremento y un posterior descenso en la concentración de nitratos en el cuarto y quinto tratamiento respectivamente, aunque estadísticamente hablando la diferencia entre ambos no es significativa. Al parecer, la nitrificación en los reactores con una mayor dosis de EM fue mayor que la desnitrificación, aunque no a tal punto que provocara la acumulación desfavorable de nitratos en el reactor.

Todos los tratamientos cumplieron con el estándar de calidad ambiental de nitratos establecido por el MINAM para aguas de riego (10 mg/l).

Complementando estos resultados con los de olor, color, sólidos totales y coliformes fecales, se puede afirmar que los Microorganismos Efectivos aceleraron la descomposición de la materia orgánica, pese a los resultados de DBO<sub>5</sub>, que como ya se explicó; no son representativos en este caso.

La razón por la que no se analizaron micro y macro nutrientes fue que, debido a que los insumos utilizados para cada biodigestor fueron exactamente los mismos, la concentración de elementos sería la misma pues esta apenas cambia tras el proceso de biodigestión (Aparcana, 2008). Sin embargo, la concentración de nitratos, que es la porción del nitrógeno disponible para las plantas, si cambia, como quedó evidenciado en los resultados anteriormente expuestos.

#### **4.9 ÍNDICE DE GERMINACIÓN**

Como ya se mencionó, la fórmula utilizada para calcular el índice de germinación absoluto fue:

$$\mathbf{IG = L \times G}$$

Donde:

IG: Índice de germinación.

L: Longitud promedio de las radículas, tomando en cuenta únicamente a las semillas germinadas (mm).

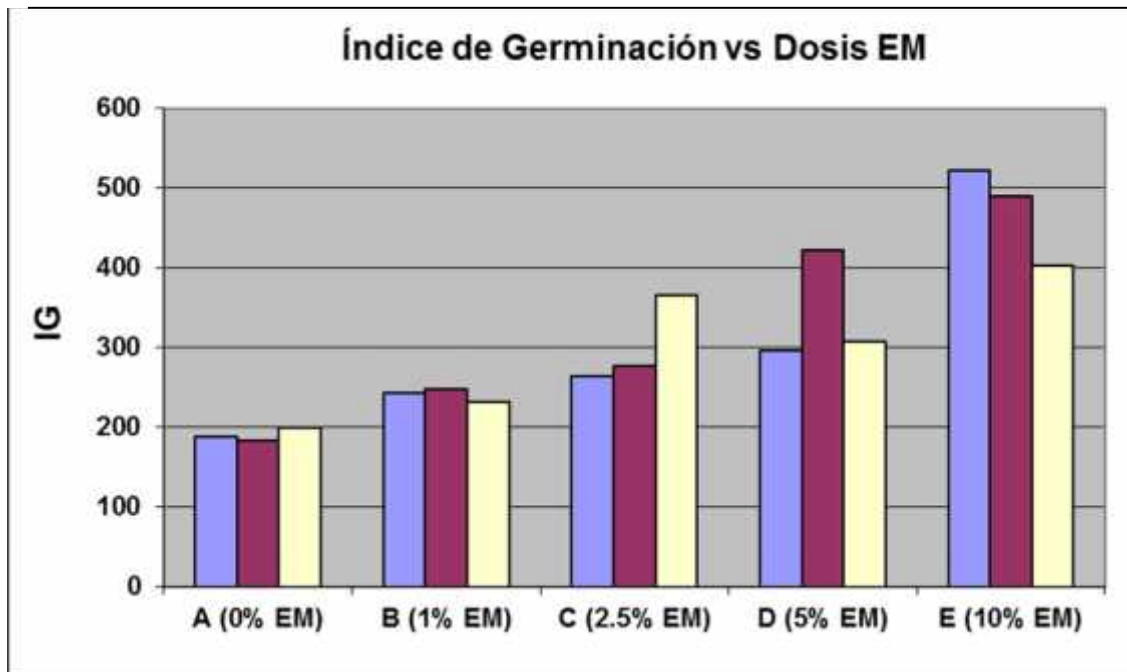
G: Número de semillas germinadas.

Los índices de germinación para cada uno de los bioles se exponen en el Cuadro N° 11.

**Cuadro N° 11: Resultados del Índice de germinación**

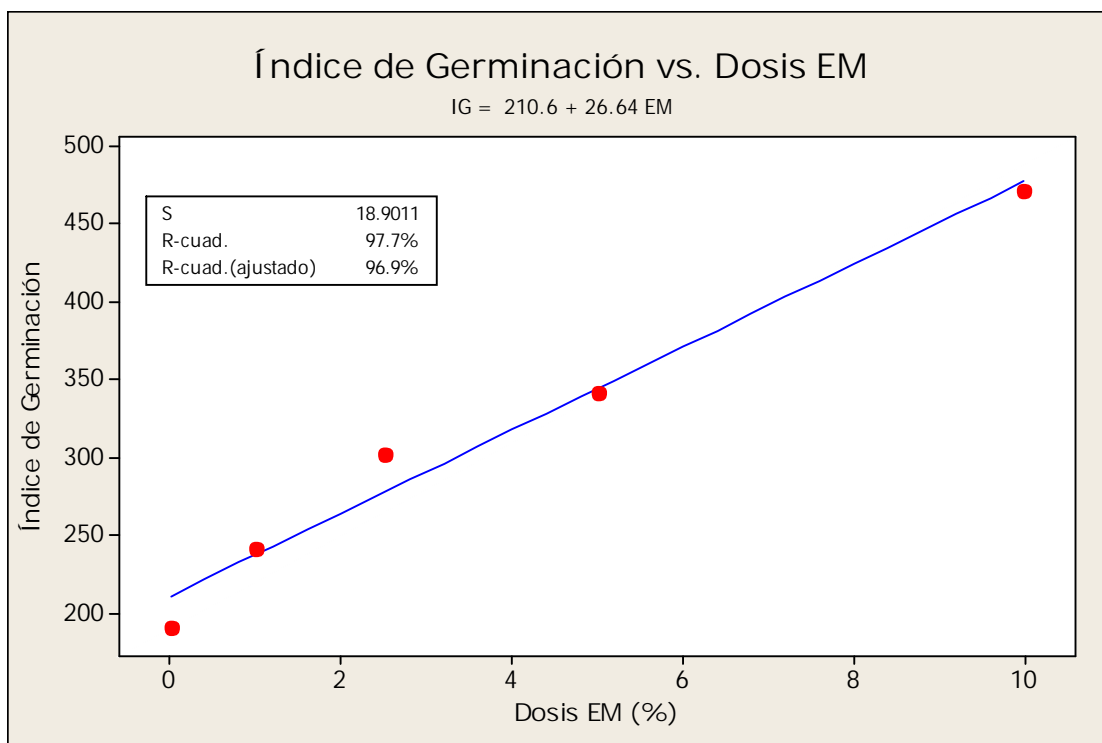
	<b>A (0% EM)</b>	<b>B (1% EM)</b>	<b>C (2.5% EM)</b>	<b>D (5% EM)</b>	<b>E (10% EM)</b>
Repetición 1	188.86	242.82	263.91	296	522
Repetición 2	182.97	248.00	277.00	422	490
Repetición 3	198.93	230.91	364.99	307	403
<b>Promedio</b>	<b>190.25</b>	<b>240.58</b>	<b>301.97</b>	<b>341.67</b>	<b>471.67</b>

En la Figura N° 20 puede apreciarse mejor el contraste entre los resultados de los distintos tratamientos:



**Figura N° 19: Resultados de Índice de Germinación**

En la Figura N° 21 se muestra un cuadro de regresión utilizando los valores promedio de los tratamientos:



**Figura N° 20: Índice de Germinación vs. Dosis EM.**

La correlación entre el índice de germinación y la dosis de EM es lineal, con un  $R^2$  de 97.7% (muy significativo). La prueba estadística de Tukey señaló al grupo control como estadísticamente diferentes del resto de tratamientos, mientras que el resto de tratamiento fueron divididos en dos grupos de tres cada uno (B,C,D y C,D,E).

Los resultados muestran un claro y pronunciado incremento del índice de germinación al aumentar la dosis de Microorganismos Efectivos. El valor promedio del quinto tratamiento (10% EM) es casi el 250% del grupo control (sin EM). La Figura N° 22 muestra el claro contraste entre las semillas tratadas con el biol del grupo control (izquierda) y las tratadas con el biol con 10% EM (derecha):



**Figura N° 21: Semillas de lechugas tratadas con los bioles de los tratamientos A (izquierda) y E (derecha) tras 96 horas**

Posiblemente el factor que más limitó el desarrollo de las semillas tratadas con el biol del grupo control fue el alto contenido de coliformes fecales, dada la vulnerabilidad de las semillas de lechuga ante los agentes patógenos (Sobrero, Ronco; 2004).

El incremento del índice de germinación en los tratamientos con EM puede atribuirse a dos factores.

En primer lugar, lo que contribuyó al desarrollo de las semillas fue un biol de mejor calidad, con menos coliformes fecales y mayor cantidad de nutrientes disponibles debido a una mayor degradación de la materia orgánica. El resultado de este ensayo no hizo otra cosa que respaldar los resultados de calidad obtenidos en los ensayos anteriores, confirmando el efecto positivo del EM sobre la calidad de los bioles.

En segundo lugar se encuentra el efecto directo de los Microorganismos Efectivos sobre las semillas. Como ya se mencionó, el EM-1 está formulado específicamente para ser utilizado en la agricultura, aunque fue seleccionado para esta investigación por contener muchas de los microorganismos que intervienen en la biodigestión anaeróbica. Entre los beneficios de los EM en las plantas se encuentran la estimulación de la producción de fitohormonas, actuación como rizobacterias, consumo de exudados, estimulación de germinación, crecimiento y fructificación, entre otros. Los resultados muestran claramente estos beneficios en acción al incrementarse el índice de germinación conforme se aumenta la dosis de Microorganismos Efectivos.

Este doble mecanismo de acción es muy similar al del abono *bokashi* (compost inoculado con EM), otro fertilizante con muchos beneficios. En ambos casos, una disponibilidad de nutrientes superior debido a una mayor degradación de la materia orgánica y el efecto directo de los Microorganismos Efectivos sobre las plantas generan un impacto muy positivo. Por lo tanto, el biol producto de una biodigestión catalizada por Microorganismos Efectivos tiene un gran potencial para ser utilizado en la agricultura.

Cabe mencionar, además; que la solución de Microorganismos Efectivos fue activada utilizando melaza de caña de azúcar, la cual contiene abundantes nutrientes, por lo que debió influir en el resultado de Índice de Germinación. Sin embargo, debido al diseño del experimento, no es posible en este caso determinar que porcentaje del incremento del Índice de Germinación se debió a los nutrientes presentes en la solución y que porcentaje fue debido a la acción directa de los Microorganismos Efectivos y de los nutrientes presentes en la materia orgánica de carga.

#### **4.10 ANÁLISIS GENERAL DE RESULTADOS**

Como dato final, podemos agregar las razones por la que existe la certeza de que la variación de los resultados entre los distintos tratamientos se debió a la acción de los Microorganismos Efectivos, y no a otro factor no relacionado con el experimento.

En primer lugar, se encuentra el diseño del experimento. Como ya se mencionó en la metodología, todos los biodigestores fueron cargados con los mismos sustratos en la misma concentración. La única diferencia entre los tratamientos fue la dosis de EM, por lo que sería la única fuente importante de variación.

Esto fue confirmado por los resultados de los análisis estadísticos de correlación. Como pudo apreciarse anteriormente, en todos los resultados el índice de correlación  $R^2$  entre el parámetro analizado y la dosis de Microorganismos Efectivos fue en todos los casos mayor al 90%, en algunos casos incluso superando el 98%. Esto confirma que casi toda la variación en los resultados fue consecuencia de la dosis de EM. El resto de la variación, como se puede apreciar en los análisis ANOVA (ver anexos), provino del error experimental y la aleatoriedad, que están presentes en todo experimento.

## V. CONCLUSIONES

1. La aplicación de Microorganismos Efectivos en los biodigestores tuvo un efecto positivo en la calidad fisicoquímica, microbiológica y organoléptica del biol, reduciendo el olor, la concentración de sólidos totales, los coliformes fecales y la materia orgánica presente.
2. Los resultados del ensayo de biogerminación mejoraron notablemente conforme aumentaba la dosis de EM aplicada.
3. Mayores dosis de Microorganismos Efectivos tuvieron resultados diferenciados en la mayoría de los casos.
4. Los análisis estadísticos confirmaron que casi la totalidad de la variación de los resultados entre los distintos tratamientos provino de la aplicación de los Microorganismos Efectivos, y no de otros factores ajenos a los objetivos de esta investigación.
5. El quinto tratamiento (10% EM) tuvo el mejor desempeño del experimento, principalmente en el ensayo de biogerminación.
6. El biol producto de un proceso de biodigestión anaeróbica catalizado por Microorganismos Efectivos es comparable en sus efectos y beneficios al abono bokashi. Por lo tanto, tiene grandes potencialidades para ser utilizado con grandes beneficios en la agricultura, dadas las bondades del EM tanto sobre el biol, como sobre los cultivos.

7. Los nutrientes presentes en la solución de Microorganismos Efectivos activados tuvieron un efecto en los resultados, además del efecto directo de los Microorganismos propiamente dichos.



## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Realizar experimentos sobre el efecto del EM sobre procesos de biodigestión alimentados con otros tipos de inóculos.
2. Llevar a cabo pruebas de germinación y crecimiento en diferentes tipos de cultivos con biol catalizado con Microorganismos Efectivos para probar su efectividad en otros cultivos y en las distintas etapas del crecimiento vegetal, con el fin de utilizarse en la agricultura.
3. Realizar análisis microbiológicos para comprobar la capacidad de subsistencia de los Microorganismos Efectivos en distintas condiciones.
4. Realizar experimentos con otras variedades de Microorganismos Efectivos, como el EM-Agua.
5. Realizar experimentos similares con soluciones EM pasteurizadas, con el fin de evaluar el efecto directo de los nutrientes presentes en la solución, sin la intervención de los microorganismos.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APARCANA, S. 2008. Estudio sobre el valor fertilizante de los productos del proceso “Fermentación anaeróbica” para la producción de biogás. Professional energy and environmental consultancy. Perú.

APNAN. 2003. Red de Agricultura natural de para la Región Asia/Pacífico. Manual de Aplicación.

ATLAS, R; BARTHA, R, 2002. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Cuarta Edición. Pearson Educación S.A. Madrid, España.

CAMPOS, E. 2001. Optimización de la biodigestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. Universidad de Lérida. Lérida, España.

CARRILLO, L. 2003. Microbiología Agrícola. Universidad Nacional de Salta. ISBN 987-9381-16-5. Argentina.

DE ZUANE, J. 1997. Handbook of drinking water quality. 2da edición, John Wiley & Sons, Inc. New York. New York, Estados Unidos.

FILMTEX. 2008. Manual para la generación de biogás y bioabono a partir del estiércol en la industria Agropecuaria. Bogotá, Colombia.

FIORAVANTI, M., VEGA, N. 2003. Eficiencia de los Microorganismos Eficaces en la estabilización de lodos sépticos para su reuso agrícola. Tesis de grado, Universidad Earth. Costa Rica.

FUJISAWA, A. 1999. Kyusei nature farming and the technology of effective microorganisms: guidelines for practical use. Japón.

GUNNERSON, C., STUCKEY, D. 1986. Anaerobic digestion: Principles and practice of biogas systems. World Bank Technical Paper No. 49. EEUU. Sin ISBN..

HIGA, T. 1993. Una revolución para salvar la Tierra. Traducido por M Riera. Okinawa, Japón.

HIGA, T., CHINEN, N. 1998. EM treatments of odor, waste water and environmental problems. College of Agriculture, University of Ryukyus. Okinawa, Japón.

HILBERT J. 1999. Manual Para la Producción de Biogás. Instituto de ingeniería rural. Argentina.

HOBSON, P. 1990. The treatment of agricultural wastes. Elsevier applied science LTD, Vol. 31. Holanda.

MARCHAIN U. 1992. Biogas Processes for Sustainable Development. FAO Agricultural Services Bullerin. Roma. ISBN 92-5-103126-6.

MARTÍ, J. 2009. Biodigestores: Guía de diseño y manual de instalación. Guatemala. Sin ISBN.

MINISTERIO DE AGRICULTURA. 2011. Biodigestores en el Perú. Guía de principales experiencias desarrolladas en el país. Perú.

MIYASHIRO, G., MEGGS, J. 2007. Medición del efecto de la aplicación de Microorganismos Eficaces (EM) en la generación de gas metano (CH<sub>4</sub>) en los sistemas biodigestores a escala. Tesis M.Sc. Universidad Earth. Costa Rica.

MONTAÑA, M. 2009. Causas y efectos del mal manejo de los insecticidas sobre la Salud del agricultor. Venezuela.

MONTES M. 2008. Estudio Técnico-Económico de la Digestión Anaerobia Conjunta de la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos y Lodos de Depuradora Para la Obtención de Biogás. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España.

LÓPEZ, C. 2009. Diseño, construcción y puesta en operación de un biodigestor anaerobio continuo para el laboratorio de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.

LÓPEZ, SOLÁ. 2008. Sistematización y cuantificación de biodigestores, Áreas e impactos: social, económica y ambiental. Programa de Pequeñas Donaciones del Fondo para el Medio Ambiente Mundial. Costa Rica.

LUGONES B. 2003. Análisis de biodigestores. Cubaenergía. Cuba.

REYES, B. 2004. Estabilización de los lodos sépticos que provienen de una comunidad pequeña con Microorganismos Eficaces (EM). Tesis de grado, Universidad Earth. Costa Rica.

RODRÍGUEZ J. 2010. Estudio Comparativo de Diferentes Tecnologías de Higienización de Lodos de Depuradora Con Fines Para su Reutilización. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España.

SALAZAR, J. 2012. Producción de biogás y biol a partir de excretas de ganado: Experiencias en la ciudad de Tacna. Tacna, Perú.

SOBRERO, M., RONCO, A. 2004. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Canadá.

TSAGARAKIS K. 2006. Technical and Economic Evaluation of the Biogas Utilization for Energy Production at Iraklio Municipality, Greece". *Energy Conversion and Management*. Holanda.

VEEKEN, A., HAMELERS, B. 1999. Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. *Bioresource technology*, Vol. 29. Holanda.

WEINBERG, Z.G., & MUCK, R.E. 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology*.

WOOD, M; HIGA, T. 2002. EM Projects in USA. Proceedings of the 7<sup>th</sup> international conference of Kyusei Nature Farming. Estados Unidos.

YOUNGFU, Y. 1989. The biogas technology en China. Agricultural Publishing House. China. ISBN 7-109-01777-X.

## ANEXOS

### ANEXO 1: FICHA TÉCNICA EM-1

#### Effective Microorganisms™ (Microorganismos Eficaces)

EM-1® es un producto biológico descubierto en 1980 por el Doctor Teruo Higa profesor de la Universidad de Ryukyus, Okinawa, Japón. Este es un cultivo mixto de microorganismos benéficos naturales, sin manipulación genética, presentes en ecosistemas naturales, fisiológicamente compatibles unos con otros. Los Microorganismos Eficaces EM® son una mezcla de bacterias fototrópicas, ácido lácticas y levaduras.

La Tecnología EM® al principio era considerada una alternativa como agro insumo, ahora es utilizada en áreas de salud, medio ambiente y sector de la construcción. EM® es producido en más de 120 países alrededor del mundo en los cuales esta la República Dominicana.

EM-1® Está registrado En la secretaria de estado de Industria y Comercio de Republica Dominicana con el Numero 176991. Además del producto EM-1®, la empresa fabrica otros derivados como son EM-Integrado, EM-5 Repelente de plagas, EM-Crop, Potencializador para el control de enfermedades. Estos cuatro productos están certificados por IMO CARIBE para ser utilizado en la agricultura orgánica o ecológica.

## ¿Cómo funcionan los EM?

Los diferentes tipos de microorganismos presentes, toman sustancias orgánicas y sustancias generadas por otros organismos. Durante su desarrollo los Microorganismos Eficaces sintetizan aminoácidos, ácidos nucleicos, vitaminas, hormonas y otras sustancias bioactivas, beneficiosas para cualquier ecosistema.

Cuando los Microorganismos Eficaces incrementan su población en el medio, la actividad con los microorganismos naturales benéficos presentes es también incrementada y la microflora en general se enriquece, balanceando los ecosistemas, inhibiendo la proliferación de microorganismos patógenos, perjudiciales que causan putrefacción, evitando enfermedades, la generación de malos olores y haciendo más eficiente el tratamiento y manejo de los residuos orgánicos.

## Microorganismos presentes

### **Bacterias fototrópicas**

Concentración en EM-1®  $1 \times 10^4$  UFC/ml

Son bacterias autótrofas que sintetizan sustancias útiles a partir de materia orgánica y gases dañinos, usando la luz solar y el calor como fuentes de energía. Las sustancias sintetizadas comprenden aminoácidos, ácidos nucleicos, sustancias bioactivas y azúcares.

### **Bacterias ácido lácticas**

Concentración en EM-1®  $1 \times 10^4$  UFC/ml

Estas bacterias producen ácido láctico a partir de azúcares y otros carbohidratos sintetizados por bacterias fototrópicas y levaduras. El ácido láctico es un fuerte esterilizador, suprime microorganismos patógenos e incrementa la rápida descomposición de la materia orgánica. Así mismo, las bacterias ácido lácticas aumentan la fragmentación de materia orgánica, fermentando estos materiales sin causar influencias negativas en la descomposición del resto de la fracción orgánica.

## Levaduras

Concentración en EM-1®  $1 \times 10^4$  UFC/ml

Estos microorganismos sintetizan sustancias antimicrobiales y útiles a partir de aminoácidos y azúcares secretados por bacterias fototrópicas, materia orgánica. Sus secreciones son sustratos útiles para microorganismos eficaces como bacterias ácido lácticas y hongos actinomicetos.

## Actinomicetos

Concentración en EM-1®  $1 \times 10^3$  UFC/ml

Los Actinomicetos funcionan como antagonistas de muchas bacterias y hongos patógenos presentes en las plantas y en la materia orgánica en descomposición debido a que producen antibióticos (efectos biostáticos y biácidas). Benefician el crecimiento y actividad del Azotobacter y de las micorrizas, contribuyendo al desarrollo y crecimiento de los cultivos

## Hongos Filamentosos

Concentración en EM-1®  $1 \times 10^3$  UFC/ml

Los hongos de filamentosos como el Aspergillus actúan descomponiendo rápidamente la materia orgánica para producir alcohol, esteres y sustancias antimicrobianas. Esto es lo que produce la desodorización y previene la aparición de insectos perjudiciales; así como la reducción de agentes patógenos

<b>Nombre del Producto</b>	EM-1
<b>Materias Primas</b>	Bacterias Ácido Lácticas Levaduras Bacterias Fototrópicas Actinomicetos Hongos Filamentosos Melaza de caña de azúcar Agua
<b>Aplicación</b>	Agricultura, ganadería y medio ambientes
<b>Dosis</b>	De 1/100-1000 diluido en agua
<b>Modo de aplicación</b>	Por pulverización fina sobre el medio a tratar
<b>Caducidad</b>	12 meses después de la fecha de fabricación 3 meses después de abrir el envase
<b>Conservación</b>	En un lugar oscuro y seco



El producto está certificado por INTERECO para su utilización en Agricultura Ecológica según Reglamento (CEE) 2092/91 del Consejo de Unión Europea, de 24 de Junio de 1991, sobre la producción agraria ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimentos.  
Nº certificación: CHJ-01

## ANEXO 2: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE PH

### ANOVA unidireccional: A, B, C, D, E - pH

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	4	1.3107	0.3277	17.55	0.000
Error	10	0.1867	0.0187		
Total	14	1.4973			

S = 0.1366    R-cuad. = 87.53%    R-cuad.(ajustado) = 82.55%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	ICs
A	3	6.9667	0.0577	(-----*-----)
B	3	7.0667	0.0577	(-----*-----)
C	3	7.0667	0.1155	(-----*-----)
D	3	7.0333	0.2517	(-----*-----)
E	3	6.3000	0.1000	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----+  
6.30                  6.60                  6.90                  7.20

Desv.Est. agrupada = 0.1366

Agrupar información utilizando el método de Tukey

	N	Media	Agrupación
C	3	7.0667	A
B	3	7.0667	A
D	3	7.0333	A
A	3	6.9667	A
E	3	6.3000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%  
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 99.18%

Se restó A a:

	Inferior	Centro	Superior	ICs
B	-0.2668	0.1000	0.4668	(-----*-----)
C	-0.2668	0.1000	0.4668	(-----*-----)
D	-0.3001	0.0667	0.4335	(-----*-----)
E	-1.0335	-0.6667	-0.2999	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----+  
-0.60                  0.00                  0.60                  1.20

Se restó B a:

	Inferior	Centro	Superior	ICs
C	-0.3668	0.0000	0.3668	(-----*-----)
D	-0.4001	-0.0333	0.3335	(-----*-----)
E	-1.1335	-0.7667	-0.3999	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+  
 -0.60 0.00 0.60 1.20

Se restó C a:

	Inferior	Centro	Superior	-----+-----+-----+-----+ (-----*-----)
D	-0.4001	-0.0333	0.3335	
E	-1.1335	-0.7667	-0.3999	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+ -0.60 0.00 0.60 1.20

Se restó D a:

	Inferior	Centro	Superior	-----+-----+-----+-----+ (-----*-----)
E	-1.1001	-0.7333	-0.3665	
				-----+-----+-----+-----+ -0.60 0.00 0.60 1.20

## Regression Analysis: pH versus EM, EM^2

The regression equation is  
 $pH = 6.96 + 0.0879 EM - 0.0154 EM^2$

10 cases used, 6 cases contain missing values

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	6.96178	0.01019	683.37	0.000
EM	0.087919	0.005892	14.92	0.000
EM^2	-0.0153905	0.0005559	-27.69	0.000

S = 0.0175401 R-Sq = 99.7% R-Sq(adj) = 99.7%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	0.85105	0.42552	1383.11	0.000
Residual Error	7	0.00215	0.00031		
Total	9	0.85320			

Source	DF	Seq SS
EM	1	0.61520
EM^2	1	0.23585

## ANEXO 3: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### ANOVA unidireccional: A, B, C, D, E – Sólidos Totales

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	4	22.152	5.538	15.21	0.000
Error	10	3.642	0.364		
Total	14	25.794			

S = 0.6035    R-cuad. = 85.88%    R-cuad.(ajustado) = 80.23%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
A	3	7.0267	0.7353	(----*----)
B	3	6.6867	0.4997	(-----*-----)
C	3	6.5400	0.5557	(-----*-----)
D	3	6.5600	0.3537	(-----*-----)
E	3	3.6967	0.7724	(-----*-----)

Desv.Est. agrupada = 0.6035

Agrupar información utilizando el método de Tukey

	N	Media	Agrupación
A	3	7.0267	A
B	3	6.6867	A
D	3	6.5600	A
C	3	6.5400	A
E	3	3.6967	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%  
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 99.18%

Se restó A a:

	Inferior	Centro	Superior	
B	-1.9601	-0.3400	1.2801	(-----*-----)
C	-2.1068	-0.4867	1.1335	(-----*-----)
D	-2.0868	-0.4667	1.1535	(-----*-----)
E	-4.9501	-3.3300	-1.7099	(-----*-----)

Se restó B a:

	Inferior	Centro	Superior	
C	-1.7668	-0.1467	1.4735	(-----*-----)
D	-1.7468	-0.1267	1.4935	(-----*-----)
E	-4.6101	-2.9900	-1.3699	(-----*-----)

Se restó C a:

	Inferior	Centro	Superior	
D	-1.6001	0.0200	1.6401	+-----+-----+-----+-----
E	-4.4635	-2.8433	-1.2232	(-----*-----)
				+-----+-----+-----+-----
				-5.0        -2.5        0.0        2.5

Se restó D a:

	Inferior	Centro	Superior	
E	-4.4835	-2.8633	-1.2432	+-----+-----+-----+-----
				(-----*-----)
				+-----+-----+-----+-----
				-5.0        -2.5        0.0        2.5

## Regression Analysis: C8 versus C7

### Polynomial Regression Analysis: pH versus EM

The regression equation is

$$\text{pH} = 6.962 + 0.08792 \text{ EM} - 0.01539 \text{ EM}^2$$

S = 0.0232034    R-Sq = 99.7%    R-Sq(adj) = 99.5%

#### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	0.425523	0.212762	395.18	0.003
Error	2	0.001077	0.000538		
Total	4	0.426600			

#### Sequential Analysis of Variance

Source	DF	SS	F	P
Linear	1	0.307600	7.75	0.069
Quadratic	1	0.117923	219.03	0.005

## ANEXO 4: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

### ANOVA unidireccional: A, B, C, D, E - Conductividad Eléctrica

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	4	2.7428	0.6857	34.38	0.000
Error	10	0.1995	0.0199		
Total	14	2.9422			

S = 0.1412    R-cuad. = 93.22%    R-cuad.(ajustado) = 90.51%

ICs de 95% individuales para la media  
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	Intervalo
A	3	8.9033	0.0289	(----*----)
B	3	8.6367	0.1007	(----*----)
C	3	9.0633	0.2335	(----*----)
D	3	9.8067	0.1617	(---*-----)
E	3	9.5500	0.0900	(----*----)

-----+-----+-----+-----+  
8.80            9.20            9.60            10.00

Desv.Est. agrupada = 0.1412

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Nivel	N	Media	Agrupación
D	3	9.8067	A
E	3	9.5500	A
C	3	9.0633	B
A	3	8.9033	B C
B	3	8.6367	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

Nivel de confianza individual = 99.18%

Se restó A a:

Nivel	Inferior	Centro	Superior	Intervalo
B	-0.6458	-0.2667	0.1125	(----*----)
C	-0.2192	0.1600	0.5392	(----*-----)
D	0.5242	0.9033	1.2825	(---*-----)
E	0.2675	0.6467	1.0258	(----*-----)

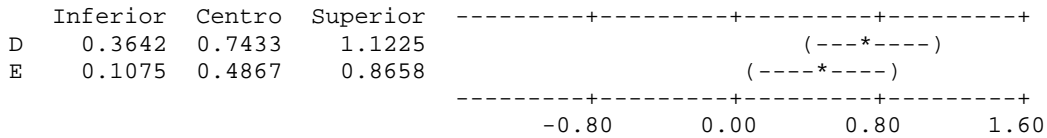
-----+-----+-----+-----+  
-0.80            0.00            0.80            1.60

Se restó B a:

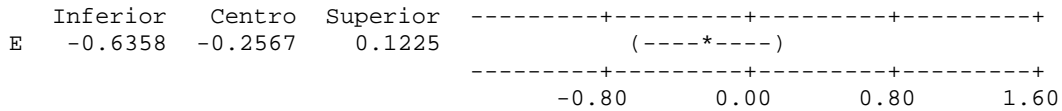
Nivel	Inferior	Centro	Superior	Intervalo
C	0.0475	0.4267	0.8058	(---*-----)
D	0.7908	1.1700	1.5492	(----*-----)
E	0.5342	0.9133	1.2925	(---*-----)

-----+-----+-----+-----+  
-0.80            0.00            0.80            1.60

Se restó C a:



Se restó D a:



### Regression Analysis: CE versus EM, EM^2, EM^3

The regression equation is

$$CE = 8.85 - 0.237 EM + 0.142 EM^2 - 0.0112 EM^3$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	8.8534	0.1380	64.14	0.010
EM	-0.2368	0.1836	-1.29	0.420
EM^2	0.14248	0.05327	2.67	0.228
EM^3	-0.011186	0.003669	-3.05	0.202

S = 0.145684 R-Sq = 97.7% R-Sq(adj) = 90.7%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	0.89626	0.29875	14.08	0.193
Residual Error	1	0.02122	0.02122		
Total	4	0.91748			

Source	DF	Seq SS
EM	1	0.52509
EM^2	1	0.17389
EM^3	1	0.19727

Unusual Observations

Obs	EM	CE	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
5	10.0	9.5500	9.5483	0.1457	0.0017	1.00 X

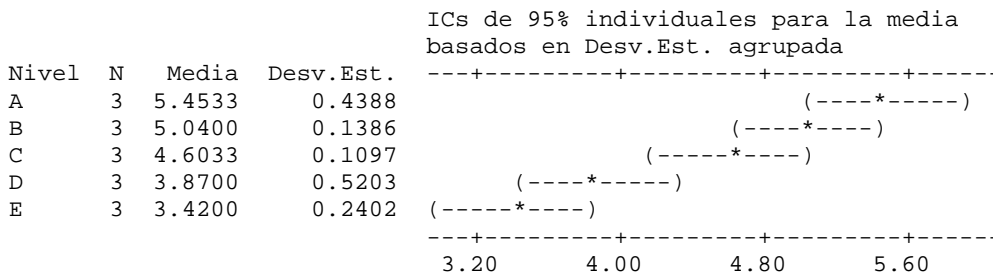
X denotes an observation whose X value gives it large leverage.

## ANEXO 5: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE COLIFORMES FECALES (LOG)

### ANOVA unidireccional: C11, C12, C13, C14, C15

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	4	8.316	2.079	18.82	0.000
Error	10	1.104	0.110		
Total	14	9.420			

S = 0.3323 R-cuad. = 88.28% R-cuad.(ajustado) = 83.59%



Desv.Est. agrupada = 0.3323

Agrupar información utilizando el método de Tukey

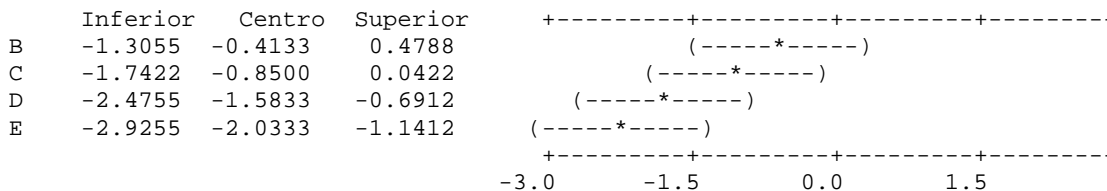
	N	Media	Agrupación
A	3	5.4533	A
B	3	5.0400	A
C	3	4.6033	B
D	3	3.8700	B C
E	3	3.4200	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

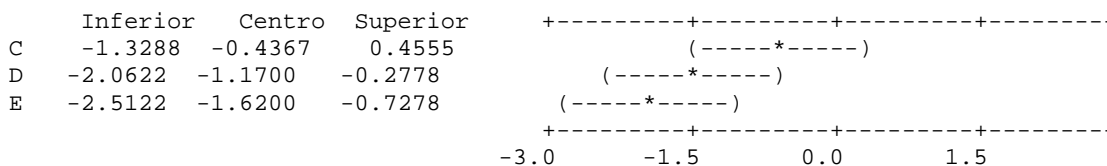
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

Nivel de confianza individual = 99.18%

Se restó A a:

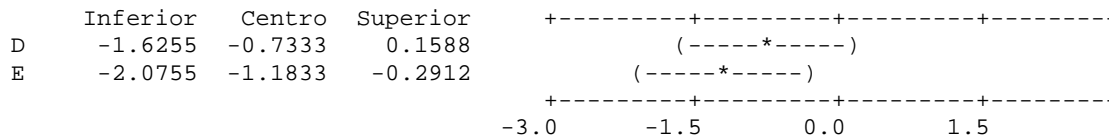


Se restó B a:

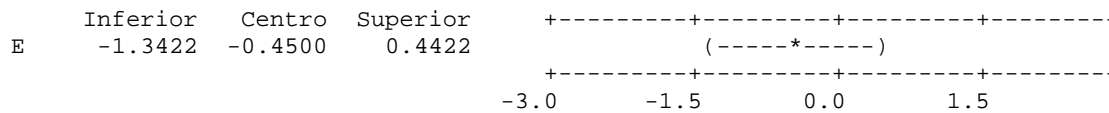


Se restó C a:





Se restó D a:



### Análisis de regresión: C10 vs. C7

La ecuación de regresión es  
 $\log CF = 5.227 - 0.1971 EM$

S = 0.233189    R-cuad. = 93.8%    R-cuad.(ajustado) = 91.8%

#### Análisis de varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	2.47775	2.47775	45.57	0.007
Error	3	0.16313	0.05438		
Total	4	2.64088			

## ANEXO 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DBO5

### Análisis de regresión: C7 vs. C8

La ecuación de regresión es

$$DBO5 = 1036 + 145.3 EM$$

S = 149.162    R-cuad. = 95.3%    R-cuad.(ajustado) = 93.7%

Análisis de varianza

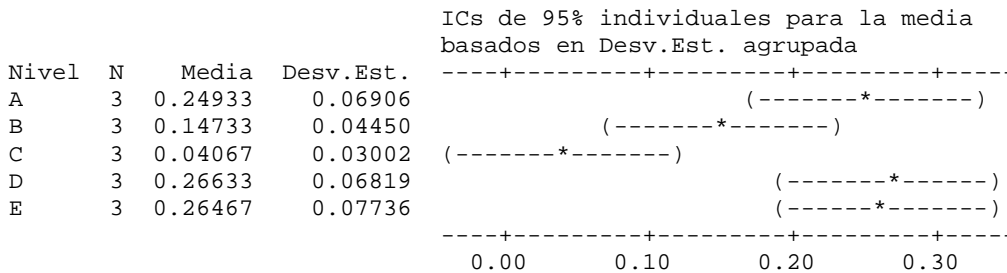
Fuente	GL	SC	CM	F	P
Regresión	1	1347521	1347521	60.56	0.004
Error	3	66748	22249		
Total	4	1414269			

## ANEXO 7: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE NITRATOS

### ANOVA unidireccional: C1, C2, C3, C4, C5

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	4	0.11693	0.02923	7.99	0.004
Error	10	0.03657	0.00366		
Total	14	0.15350			

S = 0.06048    R-cuad. = 76.17%    R-cuad.(ajustado) = 66.64%



Desv.Est. agrupada = 0.06048

Agrupar información utilizando el método de Tukey

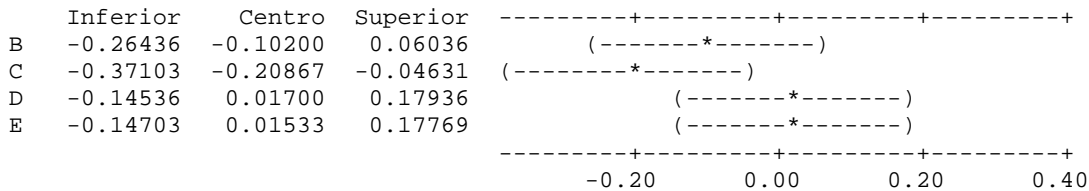
	N	Media	Agrupación
D	3	0.26633	A
E	3	0.26467	A
A	3	0.24933	A
B	3	0.14733	A B
C	3	0.04067	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

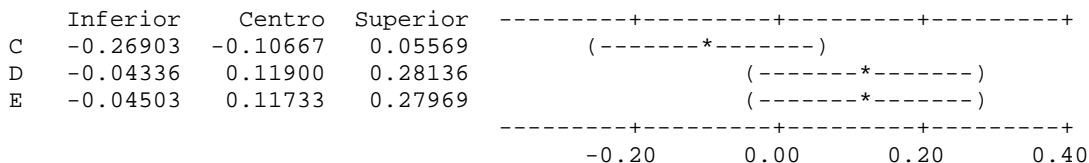
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

Nivel de confianza individual = 99.18%

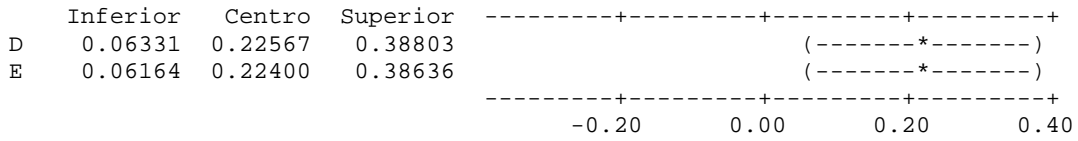
Se restó A a:



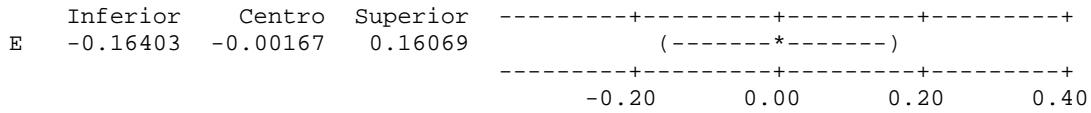
Se restó B a:



Se restó C a:



Se restó D a:



### Regression Analysis: NO3 versus EM, EM^2, EM^3

The regression equation is

$$\text{NO}_3 = 0.264 - 0.209 \text{ EM} + 0.0622 \text{ EM}^2 - 0.00413 \text{ EM}^3$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0.26368	0.04346	6.07	0.104
EM	-0.20872	0.05783	-3.61	0.172
EM^2	0.06221	0.01677	3.71	0.168
EM^3	-0.004133	0.001155	-3.58	0.174

S = 0.0458736    R-Sq = 94.6%    R-Sq(adj) = 78.4%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	0.036926	0.012309	5.85	0.293
Residual Error	1	0.002104	0.002104		
Total	4	0.039031			

Source	DF	Seq SS
EM	1	0.006476
EM^2	1	0.003522
EM^3	1	0.026928

Unusual Observations

Obs	EM	NO3	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
5	10.0	0.2640	0.2645	0.0459	-0.0005	-1.00 X

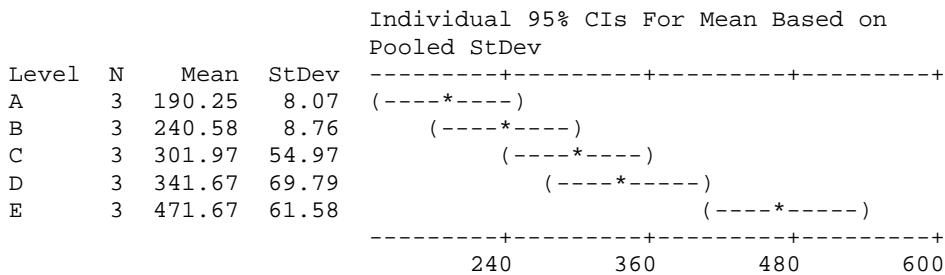
X denotes an observation whose X value gives it large leverage.

## ANEXO 8: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ÍNDICE DE GERMINACIÓN

### One-way ANOVA: A, B, C, D, E

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	139078	34769	14.70	0.000
Error	10	23653	2365		
Total	14	162731			

S = 48.63    R-Sq = 85.47%    R-Sq(adj) = 79.65%



Pooled StDev = 48.63

### Grouping Information Using Tukey Method

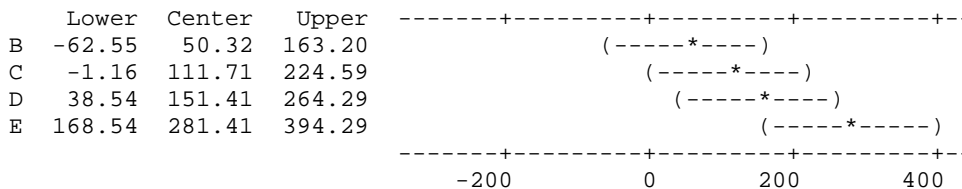
	N	Mean	Grouping
E	3	471.67	A
D	3	341.67	B
C	3	301.97	B C
B	3	240.58	B C
A	3	190.25	C

Means that do not share a letter are significantly different.

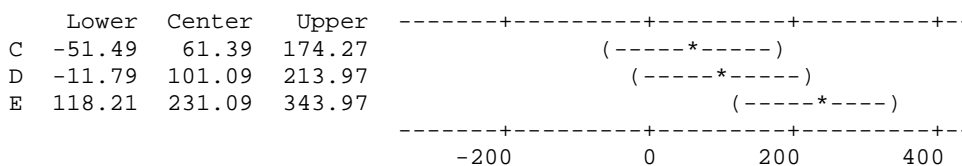
### Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals

Individual confidence level = 98.25%

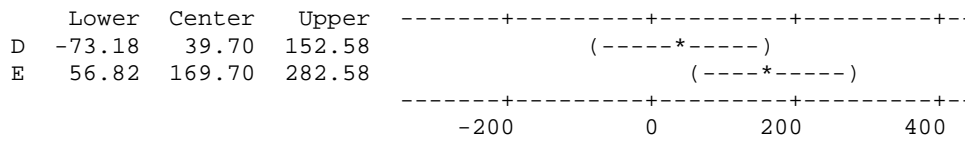
A subtracted from:



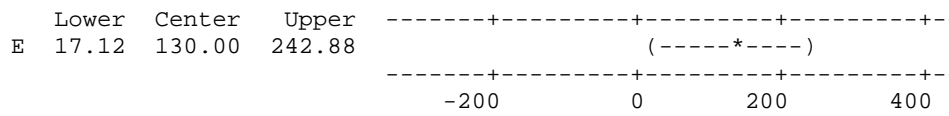
B subtracted from:



C subtracted from:



D subtracted from:



### Análisis de regresión: C8 vs. C7

La ecuación de regresión es

$$IG = 210.6 + 26.64 EM$$

S = 18.9011    R-cuad. = 97.7%    R-cuad.(ajustado) = 96.9%

Análisis de varianza

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Regresión	1	45289.1	45289.1	126.77	0.002
Error	3	1071.8	357.3		
Total	4	46360.9			