

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN BIOFERTILIZANTE ELABORADO A
PARTIR DEL LODO RESIDUAL DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE
AGUAS DE LA CIUDAD DE IBARRA POTENCIADO CON *Trichoderma sp.*
APLICADO EN *Phaseolus vulgaris*.**

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR/AS:

Bastidas Cevallos Nataly Lorena
Martínez Quimbiulco Alison Dayana

DIRECTOR:

Ing. Santiago Mauricio Salazar Torres. MSc

Ibarra – Ecuador
2022



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
UNIVERSIDAD ACREDITADA RESOLUCIÓN Nro. 001-073-CEAACES-2013-13
Ibarra-Ecuador

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES

CERTIFICACIÓN TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE
TITULACIÓN

Ibarra, 9 de mayo de 2022

Para los fines consiguientes, una vez revisado el documento en formato digital el trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN BIOFERTILIZANTE ELABORADO A PARTIR DEL LODO RESIDUAL DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS DE LA CIUDAD DE IBARRA POTENCIADO CON *Trichoderma sp.* APLICADO EN *Phaseolus vulgaris***, de autoría de las señoritas Bastidas Cevallos Nataly Lorena y Martínez Quimbiulco Alison Dayana estudiantes de la Carrera de **INGENIERÍA BIOTECNOLOGÍA** el tribunal tutor **CERTIFICAMOS** que el/la autor/a o autores ha procedido a incorporar en su trabajo de titulación las observaciones y sugerencia realizadas por este tribunal.

Atentamente,

TRIBUNAL TUTOR

Ing. Santiago Salazar, MSc.
DIRECTOR TRABAJO TITULACIÓN

Ing. Carla Sandoval, MSc.
MIEMBRO TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN

Ing. Pedro Barba, MSc.
MIEMBRO TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN

FIRMA

Misión Institucional:

Contribuir al desarrollo educativo, científico, tecnológico, socioeconómico y cultural de la región norte del país. Formar profesionales críticos, humanistas y éticos comprometidos con el cambio social.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1005127525		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Bastidas Cevallos Nataly Lorena		
DIRECCIÓN:	Av. Rafael Miranda 2-25 y Argentina		
EMAIL:	nlbastidasc@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	-	TELÉFONO MÓVIL:	0988354204

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1004371504		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Martínez Quimbiulco Alison Dayana		
DIRECCIÓN:	Pelícano y Babahoyo		
EMAIL:	admartinezq@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	062611669	TELÉFONO MÓVIL:	0967910358

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Evaluación del efecto de un biofertilizante elaborado a partir del lodo residual de la Planta de tratamiento de aguas de la ciudad de Ibarra potenciado con <i>Trichoderma sp.</i> aplicado en <i>Phaseolus vulgaris</i> .
AUTOR (ES):	Nataly Lorena Bastidas Cevallos; Alison Dayana Martínez Quimbiulco
FECHA:	28 de abril de 2022
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	MSc. Santiago Salazar Torres MSc. Pedro Barba Estrella MSc. Carla Sandoval Guano

2. CONSTANCIAS

Los autores manifiestan que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que son los titulares de los derechos patrimoniales, por lo que asumen la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrán en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 6 días del mes de mayo del 2022

AUTORES



.....

Nataly Lorena Bastidas Cevallos

C.I.: 1005127525



.....

Alison Dayana Martínez Quimbiulco

C.I.: 1004371504

AGRADECIMIENTO

Le damos gracias a Dios por habernos permitido culminar nuestros estudios de tercer nivel, por darnos sabiduría en el transcurso de nuestra vida universitaria.

Agradecemos a nuestros padres quienes con sacrificio nos han formado como personas con valores, gracias por el apoyo constante y su compañía que nos ha permitido poder culminar esta etapa en la Educación Superior.

Gracias a nuestros familiares que con su apoyo han influido en nosotros para ser constantes y perseverantes, pudiendo alcanzar nuestros propósitos.

Agradecemos a nuestro director de tesis MSc. Santiago Salazar y a nuestros asesores MSc. Pedro Barba y MSc. Carla Sandoval, quienes nos brindaron sus conocimientos para poder formarnos como buenas profesionales con un pensamiento crítico y responsables.

Gracias a la Empresa Pública de Agua Potable y alcantarillado de Ibarra, por su disposición y apertura para poder cumplir con la investigación, en especial a la Tnlg. Sara Junco responsable de la Planta de Tratamiento de Aguas de la ciudad de Ibarra por su buena gestión y apoyo.

Finalmente queremos agradecer a Gabriela González por su amistad incondicional y por su apoyo en cuanto a la vida estudiantil y personal, por ser una persona con la que siempre podemos contar.

Nataly Lorena Bastidas Cevallos

Alison Dayana Martínez Quimbiulco

DEDICATORIA

Este esfuerzo se lo dedico a Yahweh mi Elohim por forjar mí carácter, guiar mi camino, darme sabiduría, entendimiento y discernimiento, por su fidelidad, misericordia y amor infinito durante el transcurso de toda mi vida, porque a Él le debo todo el honor y la gloria por siempre.

A mis Padres Marco Bastidas y Elizabeth Cevallos por su amor incondicional y enseñarme a ser la mujer que cuando se propone algo puede lograrlo, sin menospreciar a nadie, a caminar siempre con humildad y valentía. Gracias al Padre por darme los padres que tengo porque en todo momento lo hicieron bien y todos los valores inculcados en casa ha sido lo más valioso que me pudieron dar.

A mi hermana Yomaira Bastidas por ser la persona más buena, fiel y amorosa que puedo tener, por ser el ejemplo para seguir, por apoyarme, cuidarme y estar pendiente de mí.

A la razón de mis alegrías, a mi primogénito Salvatore Daniel mi orgullo más grande, por ser el impulso y la motivación de ser mejor cada día. *Hijo mío, no desprecies la disciplina de YAHWEH ni te ofendas ni desmayes cuando seas reprendido por Él, porque el Adón solo corrige a los que ama, así como corrige un padre a su hijo querido.* Proverbios 3;11-12

A mí compañero de vida, Daniel Puetate que, con su amor, con sus palabras de aliento y su impulso me ha ayudado a no rendirme y seguir adelante siempre.

A mis segundos Padres, mis tíos Marcelo Cevallos e Ima Sánchez por ser como unos ángeles en mi vida, mi mayor ejemplo. A mis abuelitos: Cecilia, Eduardo y Beatriz, por quererme tanto, por consentirme y dejar huellas en mi alma que nadie, ni el tiempo podrán borrar jamás, a toda mi familia por demostrarme la unión, apoyo incondicional, el amor y calidez de Familia, porque eso es lo más importante.

Gracias por todo lo que hacen por mí.

Nataly Lorena Bastidas Cevallos

DEDICATORIA

En primer lugar quiero dedicar este trabajo a Dios por haberme dado la vida y permitido culminar las metas que me he propuesto, gracias a su bondad me permitió cumplir cada uno de nuestros objetivos.

A mis padres Hernán Martínez y Dora Quimbiulco, que me han apoyado constantemente y me han demostrado su cariño en cada etapa de mi vida, han sido el pilar fundamental para que pueda crecer como una persona con valores y ahora como profesional, quienes me han enseñado que a pesar de los obstáculos es siempre importante seguir adelante, sin su apoyo, compañía, consejos no me sería posible culminar esta meta.

A mi hermana Anett quien siempre me acompañado y apoyado a pesar de las diferencias, este logro lo comparto contigo.

A mis abuelitos, Carlos, Rosa, Olga y Rodolfo que con su sabiduría estuvieron conmigo apoyándome durante toda mi etapa estudiantil y que de una u otra manera siempre han estado presentes cuando más los necesité, a toda mi familia quienes me aconsejaron y me dieron ánimos para seguir adelante en cualquier momento pudiendo terminar con éxito esta etapa.

A Bryan Checa quien ha estado conmigo durante todos estos años apoyándome y ayudándome en lo que he necesitado para cumplir este objetivo, es una persona importante a quien también dedico este logro.

Muchas gracias a todos mis seres queridos que han contribuido para el cumplimiento de esta meta.

Alison Dayana Martínez Quimbiulco

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
CAPÍTULO I	17
INTRODUCCIÓN	17
1.1. Antecedentes	17
1.2. Planteamiento del problema.....	18
1.3. Justificación	19
1.4. Pregunta directriz	21
1.5. Objetivos	21
1.5.1. Objetivo general.	21
1.5.2. Objetivos específicos	21
1.6. Hipótesis	21
CAPÍTULO II	22
2. MARCO TEÓRICO	22
2.1. Aguas residuales	22
2.1.1. Sistemas de tratamiento de aguas residuales	22
2.1.2. La problemática del manejo de aguas residuales en el Ecuador.....	25
2.2. Lodos residuales	26
2.2.1. Métodos comunes de aprovechamiento de lodos.	27
2.2.2. Estabilización de lodos residuales	28
2.3. Fertilizantes.....	32
2.3.1. Conceptos generales	32
2.3.2. Tipos de biofertilizantes	33
2.3.3. Biofertilizantes de lodos residuales	35

2.4.	Cultivos de importancia económica y social en el Ecuador	35
2.4.1.	El fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	35
2.5.	Principales problemáticas actuales en la agricultura	36
CAPÍTULO III		37
3.	METODOLOGÍA	37
3.1.	Descripción del área de estudio	37
3.2.	Procedimiento de la investigación	38
3.3.	Recolección de muestras	39
3.4.	FASE 1: Aislamiento e identificación de microorganismos ácido-lácticos del lodo residual de la EPFYPROCAI.....	39
3.4.1.	Identificación morfológica	39
3.4.2.	Identificación molecular	40
3.5.	FASE 2: Caracterización microbiológica de lodos residuales de la PTAR-I. .	40
3.5.1.	Determinación de sólidos totales	40
3.5.2.	Cuantificación de coliformes fecales.....	40
3.5.3.	Método de cuantificación de <i>Salmonella sp.</i>	41
3.6.	FASE 3: Estabilización de lodo residual	42
3.6.1.	Diseño de biodigestor	42
3.6.2.	Inoculación de BAL en el biodigestor.....	44
3.6.3.	Monitoreo del biodigestor	43
3.6.4.	Análisis microbiológico posterior a la estabilización de lodo de PTAR..	45
3.7.	FASE 4: Bioensayos de biofertilizante en fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	45
3.7.1.	Ensayo de toxicidad del biofertilizante estabilizado en semillas de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	45
3.7.2.	Preparación de tratamientos	47
3.7.3.	Siembra de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	47
CAPÍTULO IV.....		50
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50

4.1. Aislamiento e identificación morfológica y molecular de bacterias ácido lácticas (BAL).....	50
4.2. Caracterización del lodo residual de la Planta de Tratamiento de Aguas de la ciudad de Ibarra (PTAR-I).....	54
4.3. Evaluación de la aplicación de microorganismos ácido lácticos para la remoción de patógenos del lodo residual de la planta de tratamiento de aguas.....	57
4.3.1. Evaluación de la remoción de patógenos (Coliformes fecales y <i>Salmonella sp</i>) del blanco respecto a los tres tratamientos.....	57
4.3.2. Elección del mejor tratamiento para la reducción de patógenos: Coliformes fecales y <i>Salmonella sp</i>).....	61
4.4. Análisis del efecto del biofertilizante obtenido (lodo residual estabilizado) en la fase vegetativa de <i>Phaseolus vulgaris</i>	63
4.4.1. Evaluación de la Fitotoxicidad del biofertilizante (Lodo residual estabilizado) en semillas de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	63
4.4.2. Evaluación del biofertilizante en parámetros de crecimiento de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	63
CAPÍTULO V	71
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	71
5.1. Conclusiones	71
5.2. Recomendaciones	72
REFERENCIAS	73
ANEXOS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de rejillas del tratamiento preliminar. Procedente de: Allende, (2001).	23
Figura 2. Métodos comunes de aprovechamiento de lodos residuales. Adaptado de Colomer y Gallardo (2007).....	27
Figura 3. Ubicación de la PTAR-I (A) y de la EPFYPROCAI (B).....	37
Figura 4 Diagrama del procedimiento seguido durante la investigación.	38
Figura 5. Diluciones seriadas para cuantificación de coliformes fecales.	41
Figura 6. Diseño de biodigestor.....	43
Figura 7. Esquema de porcentaje de germinación de semilla.	46
Figura 8. Tratamientos aplicados para evaluar el efecto del biosólido en <i>Phaseolus vulgaris</i>	47
Figura 9. Distribución de los tratamientos (DBCA).....	49
Figura 10 Caracterización morfológica de <i>Bacillus</i> . A) Crecimiento de colonias de <i>Bacillus</i> en agar MRS y B) colonias vistas al microscopio 100x , observándose bacilos largos.	51
Figura 11 Caracterización morfológica de <i>Lactobacillus</i> . A) Crecimiento de colonias de <i>Lactobacillus</i> en agar MRS y B) colonias vistas al microscopio 100x , observándose bacilos cortos.	52
Figura 12 Presencia de gas en campanas Durham con medio EC, indica positivo para CF.	55
Figura 13 Prueba confirmatoria de <i>Escherichia coli</i> en placa con TBX, se determinó la imagen A como ausencia de <i>E.coli</i> , mientras que la B como presencia de <i>E.coli</i>	55
Figura 14 Cambio de coloración a anaranjado intenso indica positivo para presencia de <i>Salmonella sp.</i>	56
Figura 15 Prueba confirmatoria en placa con Agar SS, la imagen indica la presencia de <i>Salmonella sp.</i>	56
Figura 16 Comparación de la reducción de patógenos del lodo residual de la PTAR-I del blanco respecto a los tres tratamientos a) coliformes fecales y b) <i>Salmonella sp.</i> Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.	58
Figura 17 Gráfica de la variación del pH del tratamiento control y los tres tratamientos con respecto al tiempo. (T1: Lodo residual + <i>Bacillus</i> , T2: Lodo residual + <i>Lactobacillus</i> , T3: Lodo residual + <i>Bacillus</i> + <i>Lactobacillus</i>).	59

Figura 18. Variación de la temperatura del tratamiento control y los tres tratamientos con respecto al tiempo.	60
Figura 19. Gráfica de la producción de biogas del tratamiento control y los tres tratamientos con respecto al tiempo.	61
Figura 20 Comparación de la reducción de patógenos del lodo residual de la PTAR-I de los tres tratamientos, a) coliformes fecales y b) Salmonella sp. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras diferentes....	62
Figura 22 Incidencia del blanco y los tres tratamientos en la longitud de la raíz (cm). T1 (Biofertilizante +Tierra negra) T2 (Biofertilizante+ Trichoderma sp +Tierra negra) T3 (Lodo seco PTAR-I +Tierra negra).	65
Figura 23 Área foliar (cm ²) del blanco y los tres tratamientos.....	66
Figura 24 Número de hojas de la planta de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) del blanco y los tres tratamientos.....	67
Figura 25 Altura de la planta de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) del blanco y los tres tratamientos.	69
Figura 26 Peso fresco (g) de la planta de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) del blanco y los tres tratamientos.	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición físico-química de los lodos residuales.....	26
Tabla 2. Clasificación de lodos según contenido microbiano Norma oficial Mexicana	27
Tabla 3 Métodos de estabilización de lodos residuales	29
Tabla 4. Parámetros climáticos del invernadero.....	37
Tabla 5 Características del reactor.....	42
Tabla 6. Métodos de monitoreo de condiciones de operación del reactor.....	43
Tabla 7. Tratamientos evaluados para estabilización de lodo residual de la PTAR-I...	44
Tabla 8. Metodología para evaluar las variables de la etapa vegetativa de la planta de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	48
Tabla 9 Características macroscópicas y microscópicas de la cepa AL1 aislada de lodo residual de la EPFYPROCAI	50
Tabla 10. Identificación molecular de <i>Bacillus sp.</i> aislada del lodo residual de la EPFYPROCAI.....	51
Tabla 11 Características macroscópicas y microscópicas de la cepa AL2 aislada de lodo residual de la EPFYPROCAI.	52

Tabla 12 Identificación molecular de <i>Lactobacillus sp.</i> aislada del lodo residual de la EPFYPROCAI.....	53
Tabla 13 Caracterización de coliformes fecales mediante la técnica del NPM del lodo residual de la PTAR-I.	54
Tabla 14 Cuantificación de <i>Salmonella sp.</i> mediante la técnica del NPM del lodo residual de la PTAR-I.....	56

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Visualización en gel de agarosa 1% de fragmentos de aproximadamente 1200pb, amplificados con primers 27F/1492R. M: Marcador de peso molecular ABM 100pb Opti-DNA Marker.....	80
Anexo 2 Biomasa obtenida de <i>Bacillus sp</i> y <i>Lactiplantibacillus argetoratensis</i>	80
Anexo 2 Reactores e invernadero utilizado para la fermentación anaerobia.	81
Anexo 3 Análisis de la Varianza para cuantificación de <i>Salmonella spp</i> (NMP/g seco) para los diferentes tratamientos.	81
Anexo 4 Resultados de la prueba de Tukey de la cuantificación de <i>Salmonella spp</i> (NMP/g seco) para los diferentes tratamientos.	81
Anexo 5 Análisis de la Varianza para cuantificación de Coliformes fecales (NMP/g seco) para los diferentes tratamientos.	81
Anexo 6 Resultados de la prueba de Tukey de la cuantificación de coliformes fecales (NMP/g seco) para los diferentes tratamientos.	81
Anexo 7 Concentraciones para determinar fitotoxicidad del lodo estabilizado.....	82
Anexo 8 Análisis de la Varianza para el índice de germinación (IG).....	82
Anexo 9 Prueba de Tukey de los valores del índice de germinación (IG).....	82
Anexo 10 Crecimiento de plantas de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	82
Anexo 11 Análisis de varianza de la variable área foliar.	83
Anexo 12 Prueba de Tukey de la variable área foliar.	83
Anexo 13 Análisis de varianza de la variable número de hojas por planta.	83
Anexo 14 Prueba de Tukey de la variable número de hojas por planta.	83
Anexo 15 Análisis de varianza de la variable peso fresco.	84
Anexo 16 Prueba de Tukey de la variable peso fresco.....	84
Anexo 17 Análisis de varianza de la variable longitud de raíz.	84
Anexo 18 Prueba de Tukey de la variable longitud de raíz.....	84

Anexo 19 Análisis de varianza de la variable altura de la planta.....	84
Anexo 20 Prueba de Tukey de la variable altura de la planta.	84

RESUMEN

El río Tahuando es un lugar de descarga del alcantarillado de la ciudad de Ibarra, por esto las autoridades crearon un sistema de depuración de aguas para eliminar la carga orgánica y mitigar la contaminación, se generan aproximadamente 60 a 80 m³ mensuales de lodos residuales que no tienen un adecuado método de biodigestión. Para la biorremediación de fangos existen microorganismos que inhiben el crecimiento de patógenos, por ello el objetivo fue aislar bacterias productoras de ácidos para aplicarlas en un proceso de fermentación y reducir coliformes fecales y *Salmonella sp.* en lodo residual y evaluar el efecto en el crecimiento de fréjol (*Phaseolus vulgaris*). Se identificó dos bacterias del lodo residual del camal de Ibarra (EPFYPROCAI) utilizando técnicas morfológicas y moleculares, una del género de *Bacillus* y otra de la especie de *Lactiplantibacillus argetoratis*, mediante el NMP se determinó la carga microbiana presente en el lodo residual de la PTAR-I, se obtuvo un promedio de 3.52x10⁶ NMP/g seco de coliformes fecales y 4.9 x10⁴ NMP/g seco de *Salmonella sp.*, el lodo residual fue sometido a una fermentación anaerobia empleando los microorganismos aislados para reducir estos patógenos, siendo el mejor tratamiento que contenía la combinación de *Bacillus* y *Lactobacillus argetoratis*, la caracterización microbiológica mostró que redujo coliformes fecales y *Salmonella sp* para ser clasificado como un lodo clase C que puede ser utilizado en la agricultura según la Norma Oficial Mexicana. La aplicación del biofertilizante potenciado con *Trichoderma sp* mejoró características de longitud de raíz, altura, área foliar y peso fresco de la planta de fréjol (*Phaseolus vulgaris*). En conclusión bacterias como *Bacillus* y *Lactiplantibacillus argetoratis* disminuyen patógenos del lodo residual para su posterior aprovechamiento como biofertilizante en la agricultura.

Palabras clave: Lodos residuales, bacterias antimicrobianas, *Bacillus*, biofertilizantes, fermentación.

ABSTRACT

The Tahuando river is a discharge site for the sewage system of Ibarra city, based on that, the authorities created a water purification system to eliminate organic load and mitigate contamination. Approximately 60 m³ or 80 m³ of sewage sludge are monthly generated and it doesn't have an acceptable biodigestion method. There are microorganisms that inhibit the growth of pathogens in sludge, because of this the objective was isolated acid-producing bacteria to apply them in a fermentation process and reduce fecal coliforms and *Salmonella sp* in sewage sludge, although to evaluate the effect on the growth of bean (*Phaseolus vulgaris*). Two bacteria were identified from the sewage sludge of the camal from Ibarra's city (EPFYPROCAI) for molecular techniques, one was *Bacillus*, and the other was *Lactiplantibacillus argetoratis*. The microbial load presented in the residual sludge of the PTAR-I was determined by NMP, on the other side, the sewage sludge had an average of 3.52x10⁶ NMP/g dry of fecal coliforms and 4. 9 x10⁴ NMP/g dry of *Salmonella sp*. The residual sludge was submitted to anaerobic fermentation using the isolated microorganisms to reduced pathogenic microorganisms, the best treatment was the combination of *Bacillus* and *Lactobacillus argetoratis*. The microbiological characterization showed that it reduced fecal coliforms and *Salmonella sp* to be classified as a class C sludge, which can be used in agriculture according to the Mexican Official Standard. The application of the biofertilizer enhanced with *Trichoderma sp* improved characteristics of root length, height, leaf area and fresh weight of the bean plant (*Phaseolus vulgaris*). In conclusion, bacteria such as *Bacillus* and *Lactiplantibacillus argetoratis* reduce pathogens of the residual sludge, to the following use as biofertilizer in agriculture.

Keywords: Sewage sludge, antimicrobial bacteria, *Bacillus*, biofertilizers, fermentation.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Las actividades cotidianas del ser humano generan aguas residuales ya sean de origen doméstico o industrial. Cada municipio ha implementado diversos procesos tecnológicos para la remoción de los contaminantes presentes, siendo aprovechados y que contribuyan con el ecosistema (Pérez, 2016), procurando generar una mínima cantidad de productos nocivos que pongan en riesgo al medio ambiente.

El gobierno descentralizado de la ciudad de Ibarra en conjunto con la empresa pública municipal de agua potable y alcantarillado (EMAPA-I) (Valverde, 2019) planificaron la construcción de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR-I), misma que se inauguró el 27 de septiembre del 2018. Según EMAPA-I, 2018 el diseño, tecnología y procesos que se emplean para la remoción de las aguas servidas que van al río Tahuando, lo convierte en una de las más modernas del Ecuador y América del Sur.

Su funcionamiento consta de varias etapas: pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario, desinfección y tratamiento de lodos (Limón, 2013), en este procedimiento se generan diversos subproductos. En la primera y segunda fase de la depuración de aguas se originan lodos residuales, ya sea aplicando un método físico-químico o biológico.

Según Galvis, Ximena, & Guerrero (2013), “los lodos son un residuo sólido, semisólido o líquido proveniente del tratamiento de agua y están constituidos de microorganismos que remueven la materia orgánica del agua residual que emplean como alimento”. Los desechos generados en este tratamiento son conocidos como biosólidos que tiene una gran cantidad de propiedades nutricionales para los organismos, pero también tienen un contenido microbiológico patógeno como: coliformes fecales, *Salmonella*, *Escherichia coli*, huevos de helminto (Pérez, 2016), que deben ser estabilizados.

Al tener los lodos residuales aptos y estabilizados se puede dar un manejo diferente a este subproducto generado en la PTAR-I, para evitar que sea desechado dándole un valor agregado, utilizando las propiedades beneficiosas que le pueden proporcionar al cultivo

estos residuos. En este caso se lo utilizaría como un biofertilizante para la planta de fréjol (*Phaseolus vulgaris*).

En la PTAR-I se está empleando este lodo residual como un abono para la agricultura ya que mediante pruebas realizadas en un laboratorio certificado de la ciudad de Quito se determinó que estos lodos son ricos en nutrientes como nitrógeno y fósforo. Estos elementos revitalizan el suelo y actúan en el proceso de crecimiento de las plantas (EMAPA-I, 2018).

Sin embargo, en el Ecuador no existe una normativa que detalle el uso adecuado y eficiente de dichos lodos ni tampoco existen amplios estudios que garanticen que los lodos residuales ayudan a mejorar las condiciones del suelo y la planta.

1.2. Planteamiento del problema

La población global ha aumentado en las últimas cinco décadas, este incremento demográfico ha tenido consecuencias en el nivel de contaminantes generados. Estos han afectado a los recursos naturales necesarios para la vida entre ellos el agua. Grandes volúmenes de aguas residuales tanto de origen doméstico e industrial se depositan diariamente en ríos y quebradas, generando efectos adversos en la vida y salud de los seres humanos (Demir y Firat Cabalar, 2017). Una de las alternativas para mitigar la influencia negativa de estos contaminantes es la implementación de plantas tratamiento.

Las plantas de tratamiento son instalaciones utilizadas para la remediación del agua, con el objetivo de que este recurso pueda disponerse sin causar riesgo a la salud o al medio ambiente (Torres, 2017). Durante este proceso se generan diferentes subproductos como: grasas, arenas, basuras y lodos.

Los lodos residuales es uno de los desechos más importantes del tratamiento de aguas servidas, debido al volumen que se genera durante el proceso. Estos son producidos fundamentalmente en el tratamiento primario y secundario. Puede contener microorganismos patógenos que podrían convertirse en una amenaza para la población y el medio ambiente (Remis y Mendoza Espinosa, 2011).

Los microorganismos que se encuentran en los lodos pueden ser coliformes fecales, totales y algunas enterobacterias, que están asociadas a diversas enfermedades en el ser humano sobre todo intestinales y urinarias (Guerrero et al., 2014), convirtiéndose en una preocupación para los sistemas de salud a nivel nacional e internacional. Por lo que, para

poder disponerlos, es imprescindible utilizar un método de estabilización que reduzca la atracción de vectores y su volumen (Limón, 2013).

En la actualidad se han desarrollado diversos tipos de métodos para la reducción de contaminantes, y que, además, no causen altos impactos ambientales. Una de las técnicas comúnmente utilizadas es el secado térmico solar que es dependiente de heliofanía por lo tanto el tiempo para llevar a cabo este proceso es largo. En esta metodología tampoco se logra alcanzar valores por encima de la temperatura óptima que no permitan el crecimiento de los microorganismos patógenos y la proliferación en los lodos (Al-Gheethi et al., 2018). Otra alternativa es la utilización de procesos biológicos como la biorremediación.

En el Ecuador un 8% de las aguas residuales tiene algún tipo de tratamiento (Política Pública Nacional Del Agua, 2012). En la ciudad de Ibarra se encuentra la planta para depurar aguas servidas de uso doméstico e industrial (PTAR-I), las mismas que son desechadas en un 95% en el río Tahuando (EMAPA-I, 2018) y generan aproximadamente de 60 a 80 m³ mensuales de lodos durante su funcionamiento.

Los lodos generados en este proceso por la PTAR-I se utilizan como abono orgánico para diferentes cultivos. Sin embargo, no existen estudios que demuestren el efecto en el crecimiento de las plantas. Si no se tiene un aprovechamiento adecuado de estos sólidos residuales constituyen un problema ambiental para la planta de tratamiento en general.

1.3. Justificación

Debido a la problemática mencionada anteriormente, así como los antecedentes descritos, es necesario realizar un análisis microbiológico de los lodos de la planta de Tratamiento de aguas residuales de Ibarra. Ya que se tratan de efluentes del río Tahuando donde desembocan las aguas servidas de uso doméstico, industrial, y además este recurso es contaminado por las actividades agrícolas, por ello es trascendental buscar alternativas que garanticen la inocuidad de estos sólidos.

El estudio realizado por Cabreja (2020), demuestra que una alternativa efectiva es a través de la digestión de los microorganismos ácido-lácticos, proceso en el que se lleva a cabo la oxidación de los lodos y reducción de microorganismos patógenos, garantizando que se cumplan con los parámetros de calidad para su beneficio en la agricultura. Igualmente, enfocándonos en el término de una “Sola Salud” que relaciona a los seres humanos, plantas, animales y entorno en general, para prevenir y controlar las enfermedades,

buscando medidas que disminuyan la presencia de patógenos, que se podría supervisar desde el cultivo (Zinsstag, Schelling, Waltner-Toews, y Tanner, 2011).

Obteniendo una manera de poder inspeccionar estos sólidos residuales que están siendo utilizados en la parte agrícola, para asegurar que estos subproductos no se encuentran enterobacterias, coliformes fecales y totales, evitando la propagación de microorganismos patógenos a través de estos biosólidos que son obtenidos del proceso de remediación de aguas servidas.

Estudios realizados por Demir y Fırat Cabalar (2017) demuestra que el empleo de estos sólidos es beneficioso ya que aumenta su capacidad productiva, demostrando la eficacia de utilizar esta materia prima como abono, por la presencia de altas cantidades de macro y micronutrientes, que son asimilados por los microorganismos benéficos que se encuentran en el suelo estimulando el crecimiento de la planta, siendo una materia prima que pueda ser aprovechada.

Al ser utilizados los lodos como materia prima en la producción de abonos orgánicos se puede generar nuevos ingresos económicos y promover alternativas que ayuden al medio ambiente, evitando que terminen en rellenos sanitarios sin ningún tipo de beneficio. Siendo el indicio para el desarrollo de una agricultura sustentable donde se minimizan los impactos ambientales y que además no perjudiquen a los productores y a la sociedad. Además estos biosólidos se le puede dar un valor agregado a través de hongos benéficos.

Un microorganismos benéfico es *Trichoderma sp*, un hongo que beneficia a las plantas como control biológico, por la producción de secreciones tóxicas que evitan la proliferación de microorganismos patógenos que compiten por oxígeno, nutrientes y espacios (Chirino-Valle et al., 2016). Además, por ser promotor del desarrollo vegetal al inducir la respuesta de las plantas a patógenos y de su capacidad de estimular el crecimiento de las raíces, provocando una mejor absorción de los nutrientes presentes en el suelo y lodos, por lo que incrementa la biomasa y el rendimiento en la planta (Topolovec-Pintarić, 2019).

Con la investigación también se pudo comprobar la eficacia del aprovechamiento de lodos residuales en la agricultura, permitiendo dar indicios para la generación de políticas o normas que se enfoquen en el manejo y disposición de biosólidos utilizados para fertilizantes en el Ecuador, tal como existe en otros países.

1.4. Pregunta directriz

¿Cómo incide en el crecimiento del cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) utilizar un biofertilizante obtenido del lodo residual de la planta de tratamiento de aguas de la ciudad de Ibarra potenciado con *Trichoderma sp.*?

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto de un biofertilizante, elaborado a partir del lodo residual de la planta de tratamiento de aguas de la ciudad de Ibarra potenciado con *Trichoderma sp.* aplicado en *Phaseolus vulgaris*.

1.5.2. Objetivos específicos

- Identificar bacterias ácido lácticas del lodo residual de la Empresa Pública Municipal de Faenamiento de Ibarra por técnicas morfológicas y moleculares.
- Caracterizar el lodo residual de la planta de tratamiento de aguas de la ciudad de Ibarra.
- Evaluar la aplicación de microorganismos ácido lácticos para la remoción de patógenos del lodo residual de la planta de tratamiento de aguas.
- Analizar el efecto del biofertilizante en variables morfológicas de *Phaseolus vulgaris* mediante bioensayos.

1.6. Hipótesis

Los microorganismos ácido-lácticos tienen la capacidad de disminuir la cantidad de patógenos en lodos residuales.

El lodo residual estabilizado potenciado con *Trichoderma sp.* mejorará el crecimiento del cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris*).

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Aguas residuales

Son aguas que han sido utilizadas o consumidas por el ser humano, en las cuales se han incorporado sustancias que deterioran su calidad original disminuyendo su potencialidad de uso (Belzona Inc, 2010), tienen diferentes orígenes:

Aguas residuales domésticas o aguas negras: Proceden de servicios sanitarios del ser humano, que contienen heces, orina, nutrientes y materia orgánica, incluso pueden existir contaminantes emergentes provenientes de productos farmacéuticos, las cuales llegan a redes de saneamiento como alcantarillado. (Bokova and Ryder, 2017)

Aguas blancas: Son aquellas que se originan de infiltraciones de lluvia y presentan un nivel de contaminación bajo, aunque pueden contener polvo, fango y ramas (Del Pino y Calderón, 2017).

Aguas residuales industriales: Se generan por los procesos realizados en fábricas o establecimientos industriales, tiene una composición heterogénea ya que sus características dependen del sector en las que son producidas (Carrera and Suárez, 2019).

Aguas residuales agrícolas: Son generados en zonas rurales por las labores agrícolas que se realizan, sus contaminantes principales son nutrientes de insecticidas, pesticidas y fertilizantes químicos usados para mejorar la calidad del suelo (Bokova and Ryder, 2017).

Las aguas residuales de origen diferente generan contaminación en los efluentes de agua naturales, por lo que es importante la remoción de los contaminantes y materia orgánica antes de ser eliminados, para lo cual se creó las Plantas de Tratamiento de aguas residuales.

2.1.1. Sistemas de tratamiento de aguas residuales

Son instalaciones para el tratamiento de las aguas servidas que constan de las siguientes etapas:

Tratamiento preliminar

El pretratamiento es un proceso físico que consiste en recolectar sólidos de gran tamaño mediante cribas o rejillas para poder retener el material flotante como: plásticos, trozos de cristales y ramas que se arrojan por los inodoros y fregaderos urbanos, ya que puedan causar daños a las máquinas que intervienen en todo el proceso de remoción de contaminantes (Belzona Inc, 2010).

En esta rejilla se quedarán retenidos todos aquellos cuerpos voluminosos, flotantes y en suspensión, arrastrados por el agua. Luego se colocan tamices, con aberturas menores para remover un porcentaje más alto de sólidos, con el fin de evitar atascamiento de tuberías y filtros biológicos (UDEP, 2012), como se muestra en la Figura 1.

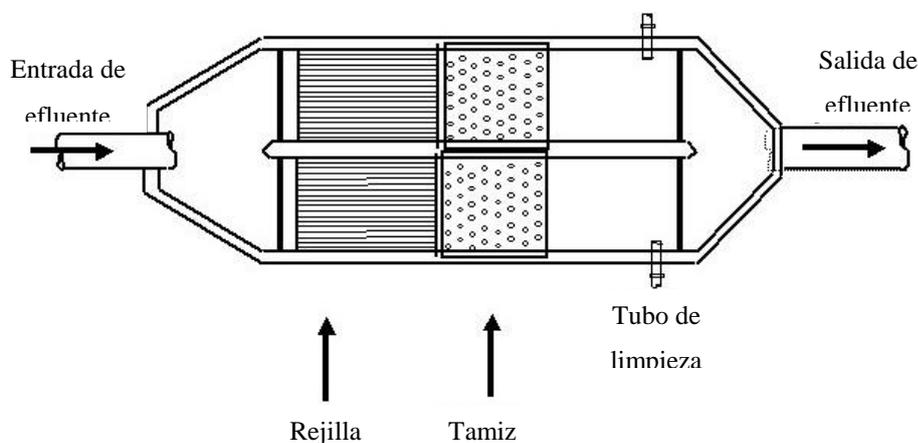


Figura 1. Sistema de rejillas del tratamiento preliminar. Procedente de: Allende, (2001).

Tratamiento Primario

Después de pasar por el pretratamiento se procede a eliminar parcialmente en unidades de sedimentación. El tratamiento primario tiene como objetivo la eliminación de aquellos contaminantes que puedan sedimentarse como: sólidos en suspensión, sólidos sedimentables, sólidos flotantes, grasas como se muestra en la Figura 2. Toda la serie de pasos que componen el tratamiento primario es conocida como clarificación (Belzona Inc, 2010).

Sedimentación

Debido al tamaño muy reducido o densidad de sustancias en suspensión y disoluciones en las aguas se realiza una sedimentación o también llamada decantación. Estos tanques pueden ser circulares o rectangulares, en donde se lleva a cabo la separación de los sólidos

y líquidos mediante la gravedad (Belzona Inc, 2010), removiendo aproximadamente el 65% de los sólidos suspendidos y el 35% de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) presente en las aguas residuales (Yaulema, 2015).

La decantación se lleva a cabo por las variaciones de la velocidad de circulación de las aguas residuales, en donde las partículas en suspensión se depositan en el fondo del decantador (UDEP, 2012).

Los lodos primarios producidos están conformados por partículas orgánicas, los cuales se recogen del fondo con rastrillos para luego ser sometidos a una digestión. Las grasas y espumas que se forman sobre la superficie del sedimentador primario son removidas por un barrido superficial continuo (Belzona Inc, 2010).

Tratamiento Secundario o biológico

El Tratamiento Secundario es la fase final antes de la desinfección y el regreso del agua al ecosistema. Un tanque de tratamiento secundario (clarificador secundario) recibe las aguas residuales del clarificador primario y del aireador después de que tuvo lugar la evacuación de lodos e impurezas de la superficie (Belzona Inc, 2010).

El objetivo principal del tratamiento secundario es la eliminación de la materia orgánica, en este proceso se elimina el 90% de sólidos contaminantes que está presente en las siguientes formas:

- Materia orgánica disuelta (soluble o filtrada DBO) aquella que no se ha eliminado por los métodos físicos que se realiza en los tratamientos antes mencionados (Yaulema, 2015).
- La materia orgánica en suspensión (partículas suspendidas o DBO), se elimina en gran medida en el tratamiento primario, pero en algunos casos los sólidos con sedimentabilidad más lenta (sólidos más finos) permanecen en la masa líquida (Yaulema, 2015).

El tratamiento secundario es la parte más importante del proceso, ya que por medio de microorganismos como: bacterias, protozoos, hongos y otros, se remueve la materia orgánica contenida en el agua residual. Esta etapa puede llevarse a cabo de forma aerobia (Belzona Inc, 2010).

La base de todo el proceso biológico es el contacto eficaz entre estos organismos y la materia orgánica contenida en las aguas residuales ya que puede ser utilizado como fuente

de alimento, convirtiendo la materia orgánica en dióxido de carbono, agua y material celular, monitoreando parámetros tales como temperatura, pH, tiempo de contacto (Yaulema, 2015) para el correcto metabolismo de los microorganismos.

Tratamiento Terciario

Este tratamiento consiste en un proceso físico-químico que utiliza la precipitación, la filtración o la cloración para reducir los niveles de nutrientes inorgánicos, especialmente fosfatos y nitratos del efluente final (Belzona Inc, 2010).

Como resultado de la remoción de contaminantes, en los procesos de tratamiento se producen diferentes subproductos, siendo el más importante los lodos que provienen de las etapas de tratamiento primario y tratamiento secundario. (Yaulema, 2015).

2.1.2. La problemática del manejo de aguas residuales en el Ecuador

En el Ecuador aproximadamente el 70% de las aguas servidas son evacuadas a las redes de alcantarillado de las cuales el 12% reciben algún tipo de tratamiento, mientras que el 88% se descarga hacia ríos y quebradas (Torske, 2019). El desembocar el agua residual a los ríos generan impactos negativos ecológicos y en la salud humana (Alarcón, 2019).

Uno de los impactos ecológicos es que el agua se contamina y se vuelve no apta para ser utilizada en actividades como el riego. Además, se altera la biodiversidad del ecosistema ya que altas cantidades de materia orgánica se acumulan en este recurso natural, las cuales provocan la disminución del oxígeno y por ende que los organismos no sobrevivan a las nuevas condiciones (Alarcón, 2019). Mientras que, para la salud de los seres humanos el agua de los ríos contaminada se convierte en un vector para transmisión de enfermedades por la presencia de microorganismos patógenos como coliformes fecales, *Salmonella* y virus (Llive, 2020).

Para reducir estos impactos en los ríos, en el Ecuador se han creado plantas de Tratamiento de Aguas residuales contando con 421 plantas a nivel nacional en 133 GADS municipales, de los cuales disponen el agua tratada en un 56,39% en ríos, el 26,32% en quebradas y un 19,55% en otros sitios como mar y pantano (INEC, 2016).

En la actualidad más del 50% de los GADS municipales a nivel Nacional ya cuentan con una planta de tratamiento de remediación de aguas enfocándose en la recuperación de los ríos para la protección de los recursos hídricos (Alarcón, 2019).

2.2.Lodos residuales

Los lodos residuales son sólidos generados en las plantas de tratamiento de aguas residuales, específicamente en los tratamientos primarios y secundarios, los cuales contienen altas cantidades de materia orgánica lo que significa a una alta concentración de microorganismos y metales pesado (Pérez, 2016). Los lodos producidos en el tratamiento de aguas residuales dependiendo del tipo de planta de tratamiento y de la operación de ésta.

Caracterización físico-química

La composición físico química de los lodos producidos se muestran en la Tabla 1 antes del tratamiento de depuración de aguas, como también los valores posteriores al proceso (Pérez, 2016).

Tabla 1.

Composición físico-química de los lodos residuales. Procedente de Pérez, (2016).

CONCEPTO	UNIDADES	LODO PRIMERIO	LODO PRIMARIO DIGERIDO	LODO SECUNDARIO
Concentración de sólidos	%	5-6	2-5	0.8-1.2
Sólidos volátiles	% de ST	60-80	30-60	59-88
Proteínas	% de ST	20-30	15-20	32-41
Nitrógeno	% de ST	1,5-4	1.6-3	2.4-5
Fosforo	% de ST	0.8-2.8	1.5-41.5-4	2.8-11
Óxido de potasio	% de ST	0-1	0-30.3	0.5-0.7
Celulosa	% de ST	8-15	8-15	-
Hierro	% de ST	2-4	3-8	-
Óxido de silicio	% de ST	15-20	10-20	-
pH	u. pH	5-8	6.5-7.5	6.5-8
Alcalinidad	Mg CaCO ₂ /l	500-1500	2500-3500	580-1100
Ácidos orgánicos	Mg HAc/l	200-2000	100-600	1100-1700
Contenido energético	KJ ST/kg	23000-29000	9000-14000	19000-23000

Caracterización microbiológica

Según la Norma Oficial Mexicana, protección ambiental de lodos y biosólidos clasifica a los lodos según su contenido microbiano de patógenos. Están los de clase A, B y C como se menciona en Tabla 2.

Tabla 2.

Clasificación de lodos según contenido microbiano de la norma oficial Mexicana. Adaptado de SEMARNAT, (2003).

Parámetro	Lodo clase A (NMP/g base seca)	Lodo clase B (NMP/g base seca)	Lodo clase C (NMP/g base seca)
Coliformes fecales	<1000	<1000	<2000000
<i>Salmonella</i>	<3	<3	<300

NMP: Número más probable

Como se muestra en la Tabla 2 existe tres clases de lodos de acuerdo con el contenido microbiológico. Los de clase A son lodos que no tienen niveles detectables de agentes patógenos, satisfacen a los requerimientos de reducción de vectores, para usos urbanos con contacto directo con el público mientras es aplicado (SEMARNAT, 2003a), mientras que los de clase B tienen restricciones al público durante es aplicado y los de clase C para aplicación en forestales y agrícolas, así como mejoramiento de suelos. Sin embargo, aún contienen niveles detectables de agentes patógenos (Pérez, 2016).

2.2.1. Métodos comunes de aprovechamiento de lodos.

Los lodos obtenidos durante las etapas del tratamiento de aguas residuales pueden ser utilizado de diferentes maneras. Tradicionalmente se dispone en vertederos municipales, sin tener ningún beneficio. En la actualidad se buscan alternativas de aprovechamiento que sean amigables con el medio ambiente porque representan una enorme cantidad de biomasa potencialmente valiosa (Anisley et al., 2015). Surge así la idea de la reutilización de estos subproductos considerados como desechos en diferentes áreas, como se muestra en la Figura 2.

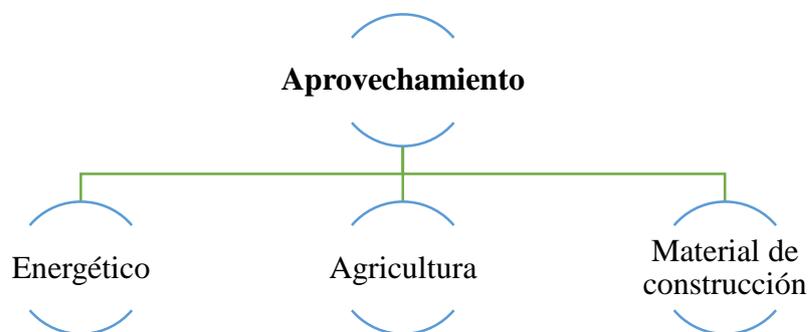


Figura 2. Métodos comunes de aprovechamiento de lodos residuales. Adaptado de Colomer y Gallardo (2007)

- *Energético:* Por la presencia de microorganismos y sus actividades metabólicas en condiciones anaerobias se origina un subproducto conocido como biogas, además de la liberación de energía y conversión de materia orgánica en metano, CO₂ y agua (Torres, 2017).

El lodo que ha tenido una transformación puede ser utilizado en la producción de electricidad, convirtiendo así la energía química del biogas entre un 38%-39% de energía eléctrica (Limon, 2013).

- *Material de construcción:* Se propone el uso de los lodos residuales como materia prima para materiales como cemento, acero, hierro y ladrillos. Ayudando así reforzar su estructura mecánica al incorporarse en ellos. Se eliminan los metales pesados ya que para la elaboración de estos materiales es necesaria la cocción a niveles altos de temperatura, lo cual puede ser un riesgo que se debe manejar durante la elaboración (Anisley et al., 2015).

- *Agricultura:* Los lodos estabilizados no presentan elementos tóxicos, metales pesados o microorganismos patógenos que pongan en riesgo a la planta y por ende a los seres humanos. En la composición de estos sólidos se encuentran minerales que favorecen el crecimiento, reproducción y producción de frutos de la planta, pudiendo ser utilizados como abonos naturales para que los cultivos tengan un ambiente óptimo para su desarrollo, mejorando la producción y disminuyendo el uso de fertilizantes químicos que causen un efecto negativo en el medio ambiente. Por lo que se utilizará como materia prima para la elaboración de un biofertilizante (Hue, 1988).

Los nutrientes contenidos en los lodos estabilizados (biosólidos) de origen orgánico tienen menos probabilidad de ser arrastrados por el agua superficial o lixiviarse hacia aguas subterráneas, al ser menos solubles (gracias al tipo de enlace covalente), una ventaja más frente a los fertilizantes inorgánicos (Limon, 2013).

2.2.2. Estabilización de lodos residuales

Los lodos residuales generados por la planta de tratamiento de agua se consideran residuos nocivos por lo que la etapa más importante del tratamiento es la estabilización, durante la cual se reduce en masa y volumen, además se disminuye los organismos patógenos, olores y la atracción de vectores (Peñaherrera, 2015).

La estabilización tiene como objetivo ser reutilizados en favor del medio ambiente como mejoradores de suelo en la agricultura al mejorar sus características y proveer nutrientes esenciales para el crecimiento vegetal como nitrógeno, fósforo, níquel, zinc y cobre, por lo que los biosólidos pueden utilizarse como sustituto de fertilizantes químicos (Limón, 2013).

Existen diversos métodos para la estabilización de suelos dependiendo en lo que sea aplicado como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Métodos de estabilización de lodos residuales

Método	Características	Ventajas	Desventajas	Fuente
Desinfección alcalina	-Incrementa el pH del lodo sobre 12 por dos horas. -Se agrega óxido de calcio (CaO) o cal hidratada. - Evita que se produzcan fermentaciones ácidas.	-Bajo costo -Menos olores -Usado para plantas con producción de bajos volúmenes de lodos. -Fácil operación	-Cambia las características físico químicas del lodo. -Disminuye los nutrientes. -Se necesita un constante monitoreo del pH. - No se aplica en suelos con pH alcalino. -No disminuye masa del lodo.	(Bina et al., 2004) (Wang, 2012) (Peñaherrera, 2015) (Gualoto, 2016)
Desinfección térmica	-Se emplea la temperatura dependiendo el tipo de biosólido que se desee obtener. - Temperatura de 77°C por media hora o de 52°C por 12 horas.	-No se usan químicos. -No hay generación de malos olores. -Poco tiempo -Bajo costo -Fácil operación	-Ciertos patógenos como <i>Salmonella</i> no se reducen en su totalidad. -Pérdida de nutrientes. -Perdida de microorganismos benéficos propios del lodo.	(Wang, 2012) (Peñaherrera, 2015) (Gualoto, 2016)
Compostaje	-Degradación biológica aerobia a 45°C - 60°C. - Se necesita ventilación y humedad. -Combinación de lodo con desechos orgánicos.	-Producto de alta calidad para la agricultura. -Bajo costo -Mejora en las características del suelo.	- Es necesario grandes áreas . -Producción de malos olores. -Reducción de patógenos baja.	(Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, 2009) (Vicencio et al., 2011)

	-Generación de composta estable.	-Reducción de patógenos a un lodo clase C.	-Proceso que necesita bastante tiempo.	(Calderón et al., 2014)
Vermi estabilización	-Proceso de descomposición aplicando lombrices. -Movimiento de lombrices permite entrada de aire al lodo. -Se requiere temperaturas de 19°C-20°C. -Se necesita baja cantidad de luz.	-Producto de alta calidad. -Menor cantidad de nitrógeno y potasio. -No produce contaminación. -Bajo costo -Fácil operación	-Se necesita agregar compuestos y materia orgánica para desarrollo de lombrices. -Monitoreo de temperatura y humedad. -Sensible a metales pesados	(Vicencio et al., 2011) (Peñaherrera, 2015) (Gualoto, 2016) (Malińska et al., 2016)
Digestión aerobia	-Oxidación de sólidos biológicos con microorganismos aerobios. - Mantenimiento de las condiciones necesarias como temperatura, presión, humedad para el desarrollo de los microorganismos	-Fácil operación. -Reduce masa y volumen - Eliminación de malos olores. -Corto tiempo de tratamiento.	-Es necesario grandes cantidades de energía. -Alto contenido de humedad. -Sensible a altas temperaturas y cambios de pH. -No se genera biogas.	(Cain, 2010) (Peñaherrera, 2015) (Calderón et al., 2014)
Digestión anaerobia	-Proceso biológico con presencia de microorganismos. -Desarrollo en un recipiente hermético (biodigestor) con ambiente anóxico. - Mantenimiento de las condiciones necesarias como temperatura, presión, humedad para el desarrollo de los microorganismos	-Reducción de masa de lodo residual. -Se obtiene un lodo con alta cantidad de nutrientes. -Eliminación de olores entre un 50% y 70%. -Método para grandes volúmenes. -Producción de biogas. -Reducción de patógenos.	-Alto costo -Personal especializado -Monitoreo constante -Producción de gas inflamable. - Largo tiempo. -Durante el proceso se genera mal olor.	(Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, 2009) (Szucs et al., 2011) (Anderson et al., 2015) (Gualoto, 2016)

La aplicación de biodigestión anaerobia para el saneamiento de lodos residuales es uno de los métodos más aplicados a nivel mundial. Estudios demuestran que el emplear microorganismos con capacidad antimicrobiana como *Bacillus* y *Lactobacillus* en este

tratamiento a través de la fermentación de los compuestos producidos logra reducir los patógenos.

Lactobacillus: Los lactobacillus presentan un crecimiento relativamente lento y dependen directamente de la temperatura es necesario un período de incubación de 3 días a 37°C o 5 días a 30°C, además crecen fácilmente en un pH ácido (Cardona y García, 2008).

Se encuentran distribuidos en la naturaleza y se han aislado principalmente de suelo, alimentos, agua, lodos entre otros. Se encuentran dentro del tipo de homofermentadoras de las BAL ya que generan ácido láctico como producto principal (Cardona y García, 2008). Este grupo de microorganismos producen ácido láctico a partir de azúcares como parte de su metabolismo que generan una variedad de metabolitos antagonistas conocidos como bacteriocinas que tienen un espectro específico de inhibición sobre microorganismos Gram positivos como patógenos (Klaenhammer, 1988) provoca una disminución del pH durante la reacción, lo cual dificulta el crecimiento de patógenos (Cardona y García, 2008).

Bacillus: Son microorganismos aerobios o anaerobios facultativos que crecen en un amplio intervalo de temperatura y además presentan un crecimiento óptimo tanto en pH neutro como ácido dependiendo de la especie (Calvo and Zúñiga, 2010).

Varias especies de este género se encuentran distribuidas en suelo, rocas, polvos, alimentos, tracto gastrointestinal de varios insectos y animales de donde han sido aislados (Sharma et al., 2018). Se ha demostrado la capacidad de producir sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica como bacteriocinas que pueden actuar contra microorganismos patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella*, ya que inhiben su crecimiento al formar poros en su superficie celular e interfieren en la síntesis de su pared celular (Sharma et al., 2018)(Sierra Vázquez, 1998).

2.3. Fertilizantes

2.3.1. Conceptos generales

El fertilizante es una sustancia orgánica, inorgánica o química que se utiliza como una alternativa para aumentar la fertilidad del suelo y la producción de cultivos en la agricultura. Contienen los nutrientes esenciales que requieren las plantas, incluidos nitrógeno, potasio y fósforo. Mejoran la capacidad de retención de agua del suelo y también aumentan su fertilidad (Ju, Bang, Sila, Onyimba, y Egbere, 2018). De acuerdo con su obtención los fertilizantes pueden ser de dos tipos :

- *Fertilizantes químicos*: son fabricados por el ser humano de origen sintético o se encuentran en yacimientos naturales contienen nutrientes fundamentales para el suelo como son nitrógeno, fósforo y potasio.
- *Fertilizantes inorgánicos*: El abono inorgánico, también conocido como fertilizante sintético, se fabrica artificialmente y contiene minerales o químicos. Por ejemplo, los fertilizantes nitrogenados sintéticos se fabrican típicamente a partir de petróleo o gas natural. El fósforo, el potasio y otros oligoelementos de estos se extraen a menudo de la tierra. Los fertilizantes inorgánicos balanceados, ricos en los tres macronutrientes, comúnmente incluyen productos como nitrato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de potasio (potasa), superfosfato triple y sulfato de magnesio (Hera, 1995).
- *Fertilizantes orgánicos o biofertilizantes*: Los fertilizantes orgánicos contienen solo materiales de origen vegetal o animal que son un subproducto o un producto final de procesos naturales, como abonos, hojas. El aprovechamiento de microorganismos benéficos como biofertilizantes se ha vuelto de suma importancia en el sector agrícola por su papel potencial en la seguridad alimentaria y la producción sostenible de cultivos (Torres, 2017).
- Dentro de este grupo existen dos tipos fertilizantes orgánicos sólidos aquellos generados de la estabilización de residuos vegetales, animales o residuos sólidos urbanos y los fertilizantes orgánico-minerales sólidos son aquellos subproductos del tratamiento de aguas residuales, que pueden ser estabilizados y aprovechados (Torres, 2017).

2.3.2. Tipos de biofertilizantes

Los biofertilizantes o bionoculantes principales de acuerdo con su naturaleza son:

Bioinoculantes: Son aquellos que en su composición tienen microorganismos latentes, se agrega al cultivo para que faciliten la disponibilidad de los nutrientes a la planta utilizados como control biológico y para mejora del crecimiento (FAO, 2018). En este grupo encontramos a bacterias y hongos como:

- ***Azotobacter*:** Es elaborado en base a varias especies de este género que tienen la capacidad de fijar nitrógeno en el suelo, además protege a las raíces de la planta de patógenos que pueden existir en el suelo (Gautam et al., 2021).
- ***Rhizobium*:** Bacteria que fija el nitrógeno mediante simbiosis con los nódulos de las raíces de las plantas (Afanador, 2019).
- ***Azospirillum*:** Fijan nitrógeno a la planta y brinda resistencia a enfermedades y tolerancia a sequías, realiza simbiosis con plantas gramíneas (Afanador, 2019).
- **Solubilizadores de fosfato y silicato:** Microorganismos que hidrolizan compuestos de fósforo y silicato insolubles, mediante la disminución de pH y secreción de ácidos orgánicos para que puedan ser asimilados por la planta (Afanador, 2019).
- **Tricho-car:** Biofertilizante compuesto por el hongo *Trichoderma* que es un hongo que resiste a amplios rangos de temperatura y se adaptan fácilmente a pH 5,5 a 8,5 del sustrato. Para su desarrollo es necesario la humedad con un valor óptimo del 60%, funciona como control biológico y acelera el crecimiento del sistema radicular, por ende que la planta se vuelva resistente a estrés, mejora la absorción de nutrientes inorgánicos estimulando su crecimiento (Martínez, Infante, y Reyes, 2013), tiene la capacidad de actuar sobre los patógenos de manera indirecta a través de mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos involucrando diferentes mecanismos de acción como la desactivación de los factores de patogenicidad de *Trichoderma* contra hongos fitopatógenos (Méndez, Meza y Peña, 2015), además mejora la absorción de nutrientes inorgánicos estimulando su crecimiento (Martínez, Infante, y Reyes, 2013). Como menciona Méndez, Meza y Peña (2015), en su investigación titulada “Disminuir el uso excesivo de agroquímicos” identificó que algunas especies de *Trichoderma* pueden degradar diversos agroquímicos y convertirlos en sustancias no tóxicas, con un efecto de biorremediación.

Abonos verdes: Plantas que se siembran en la etapa de floración en el suelo para que exista un aumento de la materia orgánica y aporte nutrientes así como mejore la actividad de los microorganismos benéficos. Se emplean principalmente cultivos de gramíneas, leguminosas y crucíferas (Guzmán, 2018).

Cenizas: Polvo mineral producido por la incineración de materia proveniente de plantas que poseen elevadas cantidades de nutrientes esenciales como sodio y fósforo indispensable para el desarrollo de las plantas, al estar en contacto con humus mejora la biodisponibilidad de los nutrientes en los cultivos (Guzmán, 2018).

Carbón vegetal: Producido por la pirólisis de la madera que ayuda a mejorar la fertilidad del suelo al retener los nutrientes por su porosidad y su alta capacidad de absorción, posee la ventaja de permanecer por largos períodos de tiempo en el suelo (Guzmán, 2018).

Estiércol: Son obtenidos de excrementos de animales como bovinos, porcinos, caprinos, aves; son los de mayor utilidad para la recuperación y mejoramiento del suelo (Guzmán, 2018).

Bio compost: Es uno de los biofertilizantes amigable con el medio ambiente ya que este compuesto de materiales de desecho de diferentes industrias o vegetales, los cuales sufren descomposición a través de diversos microorganismos como bacterias y hongos para obtener un producto estable con altas cantidades de nutrientes y estimular el desarrollo de las plantas (Gautam et al., 2021).

Vermicompost: Se producen de la aplicación de lombrices en materia en descomposición como en compostas utilizándolo como fuente de alimentación para el cumplimiento de sus funciones vitales para estimular el crecimiento de las plantas y contribuir en la asimilación de los nutrientes de la planta (Guzmán, 2018).

Guanos: Se originan por la acumulación de excrementos de animales como murciélagos, aves marinas y focas por las altas cantidades de fósforo y potasio que contienen (Guzmán, 2018).

Los biofertilizantes mencionados forman parte del humus que resulta de la descomposición de la materia orgánica en el suelo debido a factores como aire, agua y microorganismos (FAO, 2018). Todos los biofertilizantes estimulan el desarrollo de las plantas por contener nutrientes esenciales que son asimilados por la rizosfera, facilitan la

asimilación de nutrientes, también mejoran la fertilidad del suelo evitando que se compacte y retenga el agua, entre otras funciones

2.3.3. *Biofertilizantes de lodos residuales*

El tratamiento de aguas residuales genera altas cantidades de lodos diarios, por lo que varios países han visto la necesidad de aprovecharlos en la agricultura, debido a sus altas cantidades de materia orgánica así como macro y micronutrientes. Se han planteado ser utilizados como abono o mejorador del suelo. (Torres, 2017)

Este aprovechamiento a nivel mundial se ha ido incrementando ya que actúa como un fertilizante de liberación lenta al ser biológico y además los nutrientes presentes son liberados de manera eficaz y asimilados por las plantas, además es una alternativa económicamente viable (Remis and Mendoza Espinosa, 2011).

Las diferentes normativas muestran los valores máximos permisibles tanto para metales pesados y microorganismos patógenos de acuerdo con las características del lodo residual se especifica el aprovechamiento que se le puede atribuir.

En el Ecuador no existe una normativa que especifique las aplicaciones sin embargo algunas plantas de tratamiento ya se encuentran empleando estos lodos en la agricultura como es el caso de la PTAR-I ya que se tiene en cuenta el programa Nacional para la Gestión de Desechos sólidos del Ministerio del Ambiente buscando dar un valor agregado a estos residuos.

2.4. Cultivos de importancia económica y social en el Ecuador

Según el INEC en el 2018, la superficie en el país para la agricultura alcanzó los 5,3 millones de hectáreas, siendo esta actividad agrícola una de las principales fuentes de ingresos económicos del país, tal es el caso de cultivos como: caña de azúcar, banano, palma africana, arroz, papa y maíz y además de otros. Dentro de estos tenemos a los cultivos de corto plazo como es el fréjol (*Phaseolus vulgaris*).

2.4.1. *El fréjol (Phaseolus vulgaris)*

El fréjol a nivel mundial es la leguminosa más importante para cerca de 300 millones de personas entre ellos mujeres y niños, que, en su mayoría, viven en países en desarrollo, debido a su alto contenido nutricional y además de eso por su bajo costo, lo que lo hace asequible para consumidores de bajos recursos (Torres Navarrete et al., 2013). Además,

tiene gran importancia económica, ya que genera ingresos para millones de pequeños agricultores. En Ecuador las provincias más productoras del cultivo de *Phaseolus vulgaris* son: Imbabura, Azuay y Loja. (Galvez, 2015)

2.5.Principales problemáticas actuales en la agricultura

El desarrollo de la agricultura representa la mayor proporción de uso de la tierra lo que conlleva a que esto tiene genere varios efectos sobre suelo, ya que por el mal manejo de diversos componentes se convierten en la principal fuente de contaminación y pérdida de la biodiversidad. Esto ocurre por la presencia de nitratos, fosfatos y plaguicidas. Adicional a esto también son la mayor fuente gases responsables del efecto invernadero que contribuyen a la contaminación del aire y del agua. Lo que puede ocurrir es la que se degrade de la tierra y se vuelva inutilizable debido a la salinización, el exceso de extracción de agua y la reducción de la diversidad genética agropecuaria.(FAO, 2015)

Los fertilizantes, el estiércol, los plaguicidas y residuos agroquímicos es una de las principales causas de contaminación. Ya que el uso excesivo de varios compuestos químicos hace que los cultivos no pueden degradar todos estos productos y son eliminados por acción del agua o del viento de la superficie del suelo antes de que puedan ser absorbidos. Los excesos de nitrógeno y fosfatos pueden infiltrarse en las aguas subterráneas o ser arrastrados a cursos de agua. Esta sobrecarga de nutrientes provoca la eutrofización de lagos, embalses y estanques y da lugar a una explosión de algas que suprimen otras plantas y animales acuáticos (Espinosa, Navarra, 2014). También puede provocar la contaminación del agua dulce con compuestos carcinógenos y otros venenos que afectan al ser humano y a muchas formas de vida silvestre.

Si se utilizan más métodos de producción sostenible, se podrán atenuar los efectos de la agricultura sobre el medio ambiente. Ya que es evidente que la acción agrícola desempeña una función importante es por ellos importante la inversión para reducir estos efectos, por ejemplo, almacenando carbono en los suelos, mejorando la filtración del agua y conservando los paisajes rurales y la biodiversidad (FAO, 2015).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1. Descripción del área de estudio

La investigación fue realizada en la ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura, Ecuador, que se encuentra localizada a $0^{\circ}21'46''$ N, $78^{\circ}7'48''$ y a una altura de 2225 m.s.n.m. Su clima es cálido templado con una temperatura media anual de 17° C aproximadamente. El muestreo del lodo residual se realizó en la planta de tratamiento de agua de la EPFYPROCAI y de la PTAR-I, ubicación que se detalla en la Figura 3.

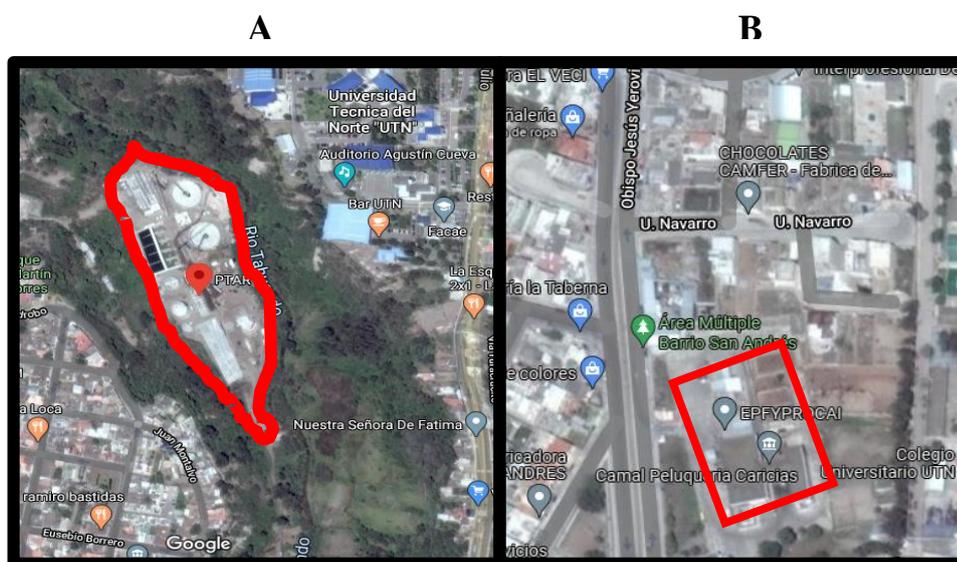


Figura 3. Ubicación de la PTAR-I (A) y de la EPFYPROCAI (B)

La fase experimental se realizó en dos lugares, el aislamiento de microorganismos productores de ácidos se realizó en la EPFYPROCAI ubicado en la Obispo Jesús Yeroivi y los análisis y pruebas in vitro se desarrollaron en el Laboratorio de investigación de la PTAR-I, ubicado en la Av. Carchi y María Angélica Idrobo a orillas del río Tahuando. La fase de campo se realizó en un invernadero localizado en la parroquia San Francisco de Azaya, barrio Vista al lago ubicado a una latitud de $0^{\circ}22'37.4''$ N y longitud de $78^{\circ}07'33.4''$ W. Las características climáticas del invernadero se detallan en la Tabla 4 .

Tabla 4.

Parámetros climáticos del invernadero

Parámetro climático	Promedio
Temperatura promedio	25 °C
Humedad relativa	71%

3.2. Procedimiento de la investigación

Como se muestra en la Figura 4 la investigación se llevó a cabo en 4 fases. Durante la Fase 1 se aisló e identificó del lodo residual de la EPFYPROCAI bacterias que producen ácidos, utilizando técnicas morfológicas y moleculares. En la fase 2 se caracterizó el lodo residual previamente biodigerido y centrifugado de la PTAR- I, utilizando la técnica de tubos de fermentación múltiple (NMP), para la Fase 3 se estabilizó el lodo residual utilizando las bacterias aisladas en la Fase 1 en un proceso de fermentación, después de 31 días se caracterizó el biosólido obtenido por la técnica del NMP y en la fase 4 se evaluó la toxicidad a diferentes concentraciones y el efecto del lodo estabilizado en fréjol (*Phaseolus vulgaris*). El procedimiento de cada una de las fases se encuentra detallado en los apartados a continuación.

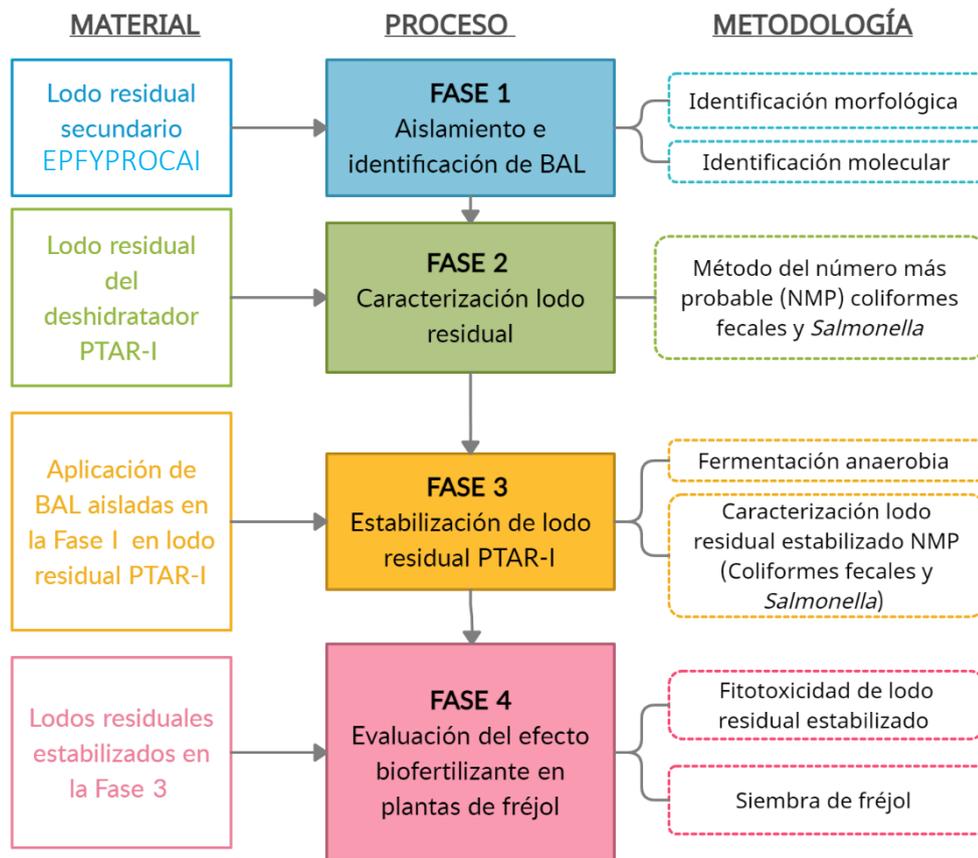


Figura 4 Diagrama del procedimiento seguido durante la investigación.

3.3.Recolección de muestras

Para el aislamiento de los microorganismos ácido-lácticos se recolectó una muestra de 500 ml de lodo residual secundario de la Planta de Tratamiento de Aguas de la EP-FYPROCAI en frascos estériles; mientras que para la caracterización microbiológica del lodo residual de la PTAR-I se recolectó en frascos estériles una vez por mes durante cuatro meses una muestra de 20 g de lodo residual del deshidratador (centrifuga) de la PTAR-I. Las dos muestras fueron almacenadas en frío a 3°C, etiquetadas y transportadas al laboratorio de la PTAR-I para su análisis.

3.4.FASE 1: Aislamiento e identificación de microorganismos ácido-lácticos del lodo residual de la EPFYPROCAI.

3.4.1. Identificación morfológica

Se siguió el protocolo establecido por Díaz, Iglesias y Cabrera, (2014), se realizó un preparado microbiano (PM) de 1000 ml que contenía el 45% de agua estéril, 33% lodos, melaza de caña 20%, 1% de urea y 1% de sal mineral, se homogenizó la muestra y se dejó fermentar 4 días a temperatura ambiente y se agitó diariamente por 30 segundos.

Posteriormente se prepararon diluciones seriadas por triplicado del PM en agua peptona hasta 10^{-6} , de cada dilución se inoculó una alícuota de 1 ml en Agar MRS se dejó incubar a 35°C durante 72 horas. Para la purificación de BAL se tomó el cultivo que tenía entre 30 y 300 colonias aisladas y aquellas que presentaban diferente morfología se hizo una resiembra en agar MRS mediante la técnica de estriado por agotamiento, se incubó a 35°C durante 24 horas.

Para la identificación fenotípica se determinaron las características macroscópicas de acuerdo a los rasgos planteados en el manual de Bou, Fernández, García, Sáez, y Valdezate (2011) para bacterias ácido lácticas, quienes determinan que las colonias presentan tamaño entre 2 y 4 mm, forma circular, borde irregular, textura viscosa, color blanco o crema y con una superficie lisa; mientras que las características microscópicas se determinaron por tinción de Gram, seleccionando las que sean gram positivas, presenten forma bacilar con bordes redondeados y tengan disposición aislada o en cadenas. Para la conservación del cultivo se realizó una resiembra en agar MRS cada 15 días.

3.4.2. Identificación molecular

Para la identificación molecular las muestras se enviaron a un laboratorio certificado de la ciudad de Quito ID-gen, aplicando el método de ADN barcoding: la extracción de ADN fue realizada por métodos convencionales, la amplificación por la técnica de reacción en cadena polimerasa (PCR) utilizando el primer universal 27F/1492R, los productos de PCR se secuenciaron por el método SANGER en la empresa Macrogen, las secuencias obtenidas fueron ensambladas y se compararon en la base de datos de nucleótidos de acceso público del Gen-Bank del NCBI con el software BLAST para obtener el porcentaje de similitud y la especie de los microorganismos aislados.

3.5.FASE 2: Caracterización microbiológica de lodos residuales de la PTAR-Ibarra.

3.5.1. Determinación de sólidos totales

Se determinó el contenido de sólidos totales del lodo residual de acuerdo con el protocolo establecido por la EPA (2014), se introdujo la cápsula en la estufa por 30 minutos a 105°C y se dejó enfriar en el desecador, para posteriormente pesar la cápsula una vez fría.

Se añadió una cantidad indeterminada de lodo residual a la cápsula y se volvió a medir el peso de la misma, se procedió a secar en la estufa a 105°C durante 24 horas, pasado este tiempo se enfrió la cápsula en el desecador y se volvió a pesar.

Para el cálculo del porcentaje de sólidos totales se utilizó la ecuación 1.

$$\%ST = \frac{(C - A)}{(B - A)} * 100 \quad (1)$$

Siendo:

A: Peso de la cápsula en gramos.

B: Peso de la cápsula más el fango húmedo.

C: Peso de la cápsula más el residuo seco a 105°C en gramos.

3.5.2. Cuantificación de coliformes fecales.

Se preparó 37 g de medio EC en forma deshidratada en un litro de agua destilada, se esterilizó en una autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Para cuantificar coliformes fecales se siguió el protocolo del Número más probable (NMP) establecido en la EPA (2014), se preparó una dilución (Solución Madre) con razón

1:9, para ello se colocó 10 g de muestra de lodo residual en 90 ml de agua peptona (dilución 10^{-1}) y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} . Posteriormente se inoculó una alícuota de 1ml de cada dilución en tubos de ensayo que contenía una campana Durham y 10 ml de medio EC, se realizaron 5 repeticiones y se incubó durante 48 h a 45°C . Para determinar los tubos positivos para coliformes fecales se observó los tubos con producción de gas a partir de la fermentación de la lactosa del medio EC.

Para la interpretación de los resultados se determinó la producción de gas en la campana de Durham y la turbidez en el medio EC. Se obtuvo el código de los tubos con resultados positivos de las cinco series consecutivas. Además, como prueba confirmatoria de *Escherichia coli* se inoculó una alícuota de 1 ml en placas con medio TBX de cada repetición como se muestra en la Figura 5. Es importante destacar que se realizó 1 ensayo por mes durante 4 meses consecutivos.

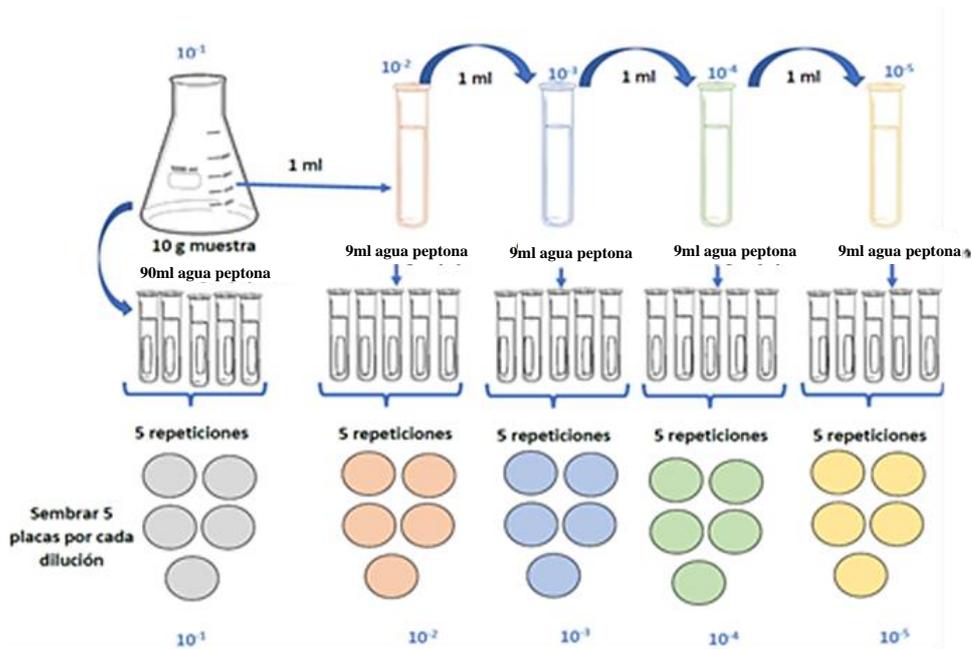


Figura 5. Diluciones seriadas para cuantificación de coliformes fecales.

Para la cuantificación de los datos se aplicó la ecuación 2:

$$\frac{\text{NMP}}{\text{gseco}} = \frac{\text{NMP/ml}}{(\text{dilución significativa de mayor volumen})(\text{sólidos totales})} \quad (2)$$

El valor para el NMP/ml se obtiene de la tabla del Número más probable establecida en el método 1680 de la EPA (2014); a partir del código compuesto obtenido de las diluciones significativas de las cinco series consecutivas.

3.5.3. Método de cuantificación de *Salmonella sp.*

Para cuantificar *Salmonella spp* se siguió el protocolo del Número más probable (NMP) establecido en la (EPA,2014), se realizó un enriquecimiento para promover el crecimiento bacteriano de *Salmonella sp*, preparando una dilución con razón 1:9 (1 ml de lodo residual y 9 ml de caldo tetrionato), siendo esta la dilución 10^{-1} , se agitó hasta tener una solución homogénea y se incubó a 35° C durante 24 horas. Luego se preparó diluciones seriadas hasta 10^{-6} en agua peptona.

Posteriormente, se inoculó una alícuota de 1 ml de cada dilución en tubos de ensayo con 10 ml de caldo selenito cistina y se incubó durante 24 horas a 35°C. Para cada dilución se realizaron 5 repeticiones. La interpretación de los resultados se observó mediante el cambio de coloración a anaranjado intenso considerándolo como positivo. Se obtuvo el código de los tubos con resultados positivos de las cinco series consecutivas.

Además, como prueba confirmatoria se inoculó una alícuota de 1 ml en placas de agar SS durante 24 horas a 35°C. Las colonias con centro negro verifican la presencia de *Salmonella spp*. Es importante destacar que se realizó 1 ensayo de manera mensual durante 4 meses. Para la cuantificación de los datos se aplicó la Ecuación 2.

El valor para el NMP/ml se obtiene de la tabla del NMP a partir del código compuesto obtenido de las diluciones significativas de las cinco series consecutivas.

3.6.FASE 3: Estabilización de lodo residual

3.6.1. Diseño de biodigestor

Se elaboró un biodigestor anaerobio tipo discontinuo (Batch) que presentó las características de la Tabla 5.

Tabla 5

Características de biodigestor.

CARACTERÍSTICAS DE BIODIGESTOR	
Volumen	0.03 m ³
Altura	0.485 m
Diámetro	0.12m
Volumen ocupado por los gases	0,01 m ³
Volumen ocupado de lodos	0.02 m ³

En el biodigestor se utilizó el lodo residual del deshidratador (centrifuga) y se inoculó la suspensión de microorganismos aislados; el 75% del biodigestor fue ocupado por lodo residual para que el 25% sea aprovechado en la fase gaseosa.

El diseño tuvo accesorios de PVC y acero, en su estructura es un tanque hermético de 0.03 m³ (1), con una conexión de salida en el centro con una válvula de 1/2 pulgada para la toma de muestra (7), un agitador tipo rejilla (6) para mantener la homogeneidad de la muestra, en la parte superior de la tapa del biorreactor presentó un rulimán (3) para facilitar la agitación, una válvula de salida de 1/2 pulgada unido a una manguera (4) que se encuentra dentro de un galón de plástico invertido con agua (5) y un cierre metálico (2), como se muestra en la Figura 6.

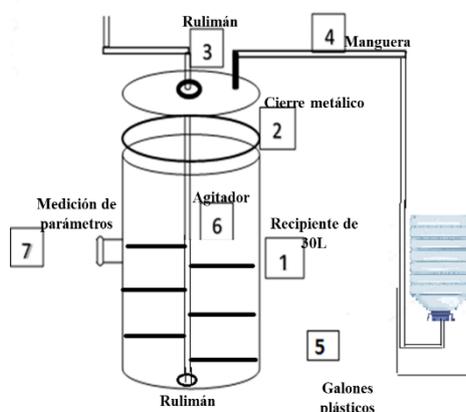


Figura 6. Diseño de biodigestor

3.6.2. Condiciones de operación del biodigestor

Es importante en el biorreactor mantener controlados diferentes parámetros como agitación, temperatura y pH para un correcto desarrollo de los microorganismos, para ello se aplicaron diferentes métodos que permitan controlar que se mantengan constantes como los especificados en la Tabla 6.

Tabla 6.

Métodos de control de las condiciones de operación de biodigestor

Parámetro	Método	Frecuencia
Agitación	Agitación manual con agitador tipo rejilla, al final de la operación del biorreactor se determinó a través de la observación que existió un sistema homogéneo en el proceso .	2 veces al día cada 8 horas
Temperatura	-Medidor digital marca YIER YI modelo TPH01809. -Medidor digital para determinar la temperatura ambiental dentro del invernadero.	1 vez al día 12 am -13 am

Humedad ambiental	Medidor digital	1 vez al día
Cuantificación de gases	El gas se desplaza por la manguera hasta la botella invertida que se encuentra llena de agua, las burbujas desplazan el agua del recipiente permitiendo cuantificar el volumen de biogas producido.	10 veces al día cada 3 horas
pH	- Medidor digital marca YIERI modelo TPH01809.	1 vez al día
Fugas	-Se usó una solución jabonosa diluida en agua esparcida en cada biorreactor para determinar posibles salidas de gases.	1 vez por semana

Los parámetros fueron evaluados durante 30 días, la temperatura se mantuvo en rangos mesofílicos de 25°C a 30°C. Se evaluó la capacidad de las bacterias aisladas para reducción de patógenos como *E.coli* y *Salmonella*, obteniéndose un total de cuatro tratamientos como se muestra en la Tabla 7 de cada uno tres repeticiones, con un total de doce unidades experimentales.

Tabla 7.

Tratamientos evaluados para estabilización de lodo residual de la PTAR-I

Tratamiento	Código	Descripción
B	LR	Lodo residual
T1	LR+AL1	Lodo residual+ <i>Bacillus sp</i>
T2	LR+ AL1	Lodo residual + <i>Lactobacillus</i>
T3	LR+AL1+AL2	Lodo residual+ <i>Bacillus sp</i> + <i>Lactobacillus</i>

3.6.3. Inoculación de BAL en el biodigestor.

Después de aislar e identificar las bacterias, estas se utilizaron para el proceso de estabilización del lodo residual en un biodigestor.

Para la obtención de biomasa de BAL se inoculó varias colonias en tubos de ensayo con 5 ml de caldo MRS y se dejó incubar por 24 h a 35°C, luego se transfirió los 5 ml de caldo MRS en frascos volumétricos de 1000 ml y se dejó incubar durante 72h a 35°C, Se inoculó en el reactor en proporción 1:50 de acuerdo a lo establecido por Anderson et al., (2015), es decir que por cada 1 kg de lodo se colocó 50 ml de caldo MRS con biomasa obtenida, no se logró determinar la concentración inicial de los inóculos bacterianos utilizados en la investigación.

Cada unidad experimental (reactor) presentó las siguientes características:

- Lodo residual: 83%
- Melaza: 10%
- Agua: 3%
- Microorganismo: 4%

3.6.4. Análisis microbiológico posterior a la estabilización de lodo de la PTAR.

Después de los 30 días de la estabilización del lodo residual se procede a caracterizar microbiológicamente el lodo estabilizado siguiendo la metodología del apartado 3.4.

Para la elección del mejor tratamiento se tomó en cuenta la reducción de coliformes fecales y *Salmonella spp*, así como los criterios planteados por Peña, (2008) que especifica: el lodo residual estabilizado no debe presentar olores fuertes, presencia de capas de microorganismos, sean mohos o levaduras y el pH debe ser ácido (≤ 4.5) ya que si el lodo residual estabilizado presenta un pH básico contribuye a la pérdida de amoníaco gaseoso lo que disminuye el valor fertilizante del biosólido, además este compuesto puede resultar tóxico para las plantas y compuestos orgánicos presentes en el suelo.

3.7.FASE 4: Bioensayos de biofertilizante en fréjol (*Phaseolus vulgaris*).

Para los ensayos de fitotoxicidad y la siembra se utilizó la variedad de fréjol centenario (*Phaseolus vulgaris* var. centenario.).

*3.7.1. Ensayo de toxicidad del biofertilizante estabilizado en semillas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*).*

Para detectar la incidencia en la germinación y el crecimiento de las plantas se realizó un bioensayo con semillas de fréjol, mismo que se efectuó previo a la aplicación del biofertilizante en el suelo. Se utilizó lo establecido por Martínez y Sánchez, (2012) se realizó una desinfección de las semillas en una solución de cloro al 4% por 10 minutos, se enjuagó 6 veces con agua estéril y se colocaron en alcohol al 70% durante 10 minutos, se enjuagó nuevamente con agua estéril.

Posteriormente se preparó 1 testigo con agua destilada y 6 extractos en proporción 2,5,10, 25, 50, 75% en relación biofertilizante/agua destilada como se muestra en la Figura 7.

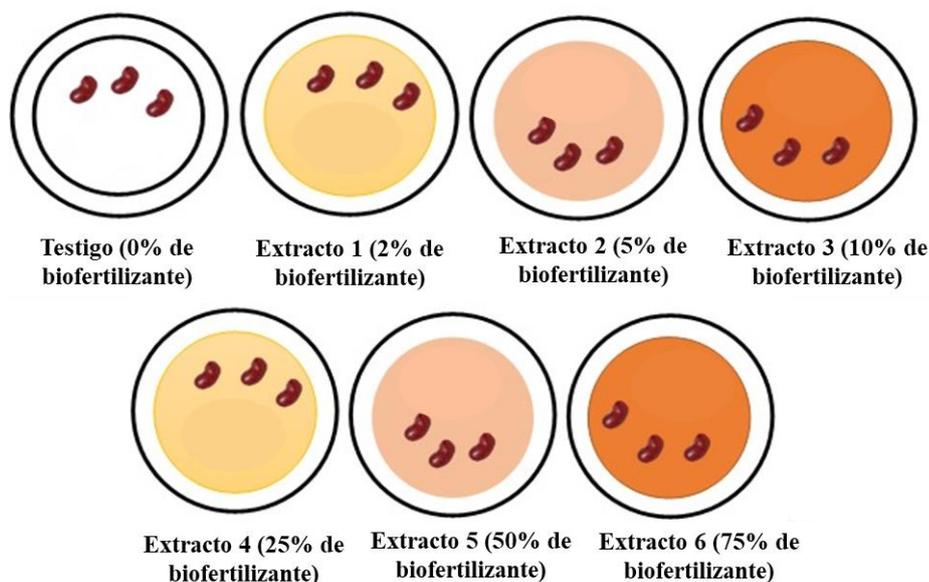


Figura 7. Esquema de porcentaje de germinación de semilla.

Se colocaron 10 ml de cada extracto en recipientes plásticos con algodón, se depositaron 3 semillas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) y se humedecieron con 2 ml de agua. Se colocaron en una caja oscura durante 24 horas, posteriormente se sometió a un intervalo de 16:8 horas luz: oscuridad por 5 días.

Los resultados se reportan mediante el índice de germinación, según la metodología descrita por Cupe y Juscamaita (2018) se calcula el Porcentaje de Germinación Relativo (PGR) y el Crecimiento de Radícula Relativo (CRR) teniendo al tratamiento control como testigo con las ecuaciones 3,4 y 5.

$$\text{PGR}(\%) = \frac{\text{N}^\circ \text{ de semillas germinadas con biofertilizante}}{\text{N}^\circ \text{ de semillas germinadas con agua}} * 100 \quad (3)$$

$$\text{CRR}(\%) = \frac{\text{Longitud de la radícula de semillas con biofertilizante}}{\text{Longitud de la radícula de semillas con agua}} * 100 \quad (4)$$

$$\text{IG}(\%) = \frac{\text{PGR} * \text{CRR}}{100} \quad (5)$$

Para la elección de la concentración del biofertilizante que presenta menor toxicidad y es óptimo para la germinación de semillas de fréjol se utilizó un (ANOVA) y prueba de Tukey.

3.7.2. Preparación de tratamientos

Se seleccionó la concentración de biofertilizante que presentó un porcentaje de índice de germinación de las semillas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) mayor al 80%. Se realizaron 4 tratamientos como se muestra en la Figura 8.

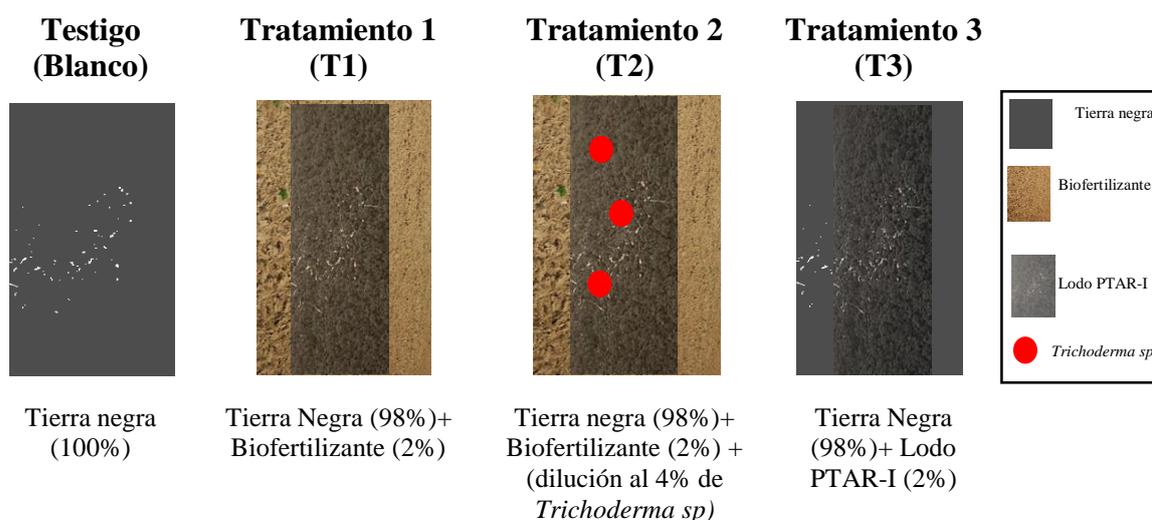


Figura 8. Tratamientos aplicados para evaluar el efecto del biosólido en *Phaseolus vulgaris*

Se homogeniza de forma manual los componentes de cada tratamiento en fundas (unidad experimental) que tenían las siguientes características:

- Ancho: 0.25 m
- Altura: 0.30 m
- Área: 0.02 m²
- kg de sustrato por recipiente: 2 kg
- Número de plantas por funda 1

En el tratamiento 2 se aplicó en el riego con la siembra el producto comercial BioTric que contiene 4×10^9 esporas/ml de dos cepas puras de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, se preparó una dilución del 4% del producto (475 de agua y 25 ml de Biotric) colocada en cada unidad experimental.

3.7.3. Siembra de fréjol (*Phaseolus vulgaris*).

La siembra se realizó manualmente depositando tres semillas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) por funda que contenía el sustrato. Las fundas se colocaron dentro de un

invernadero para que no exista interferencia de factores externos. El riego se realizó de acuerdo con las necesidades del cultivo, hasta que este alcance la capacidad de campo.

Para el análisis de los resultados se determinó el efecto en las variables morfológicas del cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) en la etapa vegetativa (42 días). Las variables que se analizaron en el estudio fueron: Longitud de raíz, número de hojas por planta, área foliar, peso fresco de la planta y altura de la planta.

Para evaluar las variables vegetativas del crecimiento de fréjol se utilizó el procedimiento establecido en la Tabla 8.

Tabla 8.

Metodología para evaluar las variables de la etapa vegetativa de la planta de fréjol (Phaseolus vulgaris).

Variables medidas	Método	Técnica	Instrumento
Longitud de raíz	Medir la raíz principal desde el cuello hasta la cofia	Observación	Cinta métrica
Número de hojas	Contar las hojas del fréjol en el período de crecimiento	Observación	Conteo manual
Área Foliar	Medir el área de tres hojas de cada planta y obtener un promedio.	Observación	Aplicación petiole
Peso fresco	Pesar la planta en una balanza.	Observación	Balanza
Altura	Medir la planta de fréjol desde el cuello de la raíz hasta la última hoja trifoliada.	Observación	Cinta métrica

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar (DBCA), por lo que se distribuyó las fundas de los 4 tratamientos con 3 repeticiones (1 planta por funda) en 4 bloques y utilizando un nivel de significación del 95% como se muestra en la Figura 9.

T2	T3	T1	T4	B1
T4	T2	T1	T3	B2
T4	T1	T3	T2	B3
T2	T3	T4	T1	B4

Figura 9.Distribución de los tratamientos (DBCA)

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento e identificación morfológica y molecular de bacterias ácido lácticas (BAL).

La fase de muestreo permitió aislar siete cepas bacterianas, de las cuales se seleccionaron dos que presentaron características macroscópicas y microscópicas presuntivas para BAL especificadas en el apartado 3.4.1 de la metodología.

El estudio se centró en el aislamiento de bacterias del género *Lactobacillus*, por lo que se utilizó el medio selectivo MRS, no obstante, se pueden aislar cepas que no pertenecen a esta clase de microorganismos como *Bacillus*.

Las dos cepas (AL1 y AL2) se observaron al microscopio para determinar su morfología y arreglo celular, en la Tabla 9 se presentan las características macroscópicas y microscópicas de la cepa AL1.

Tabla 9

Características macroscópicas y microscópicas de la cepa AL1 aislada de lodo residual de la EPFYPROCAI.

Características cepa AL1		
Macroscópicas	Tamaño	3 mm
	Forma	Circular
	Borde	Irregular
	Textura	Viscoso
	Color	Crema
	Superficie	Elevación convexa
Microscópicas	Tinción	Gram positiva
	Forma	Bacilar
	Tamaño	Largos
	Extremos	Redondeados
	Disposición	Cadenas

El primer microorganismo aislado AL1 formó colonias que mostraron tamaño entre 2 y 4 mm a las 24 h de cultivo, forma redonda, superficie lisa, borde irregular y textura cremosa (Figura 10A), coincidiendo con las características macroscópicas reportadas por Cuervo (2010) para el género de *Bacillus*, por otra parte las características microscópicas descritas por Realpe, Hernández y Agudelo (2002) para *Bacillus* fueron: bacilos gram positivos, con bordes cuadrados o redondeados que forman cadenas largas (Figura 10B), lo que concuerda con los resultados obtenidos para la cepa codificada como AL1.

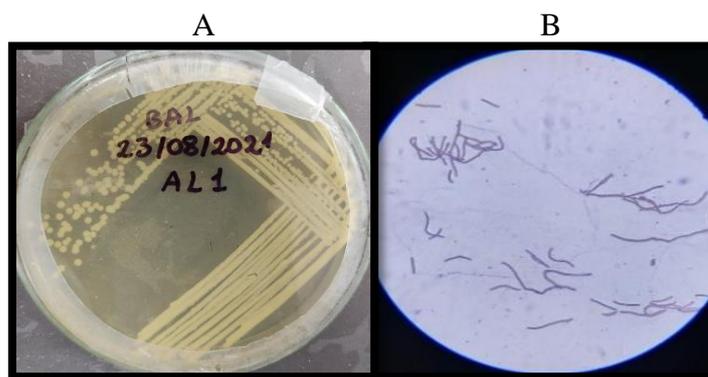


Figura 10 Caracterización morfológica de *Bacillus*. A) Crecimiento de colonias de *Bacillus* en agar MRS y B) colonias vistas al microscopio 100x , observándose bacilos largos.

También dentro del análisis molecular se realizó la técnica de ADN barcoding amplificando la región del gen 16S/27F, análisis que fue realizado por el laboratorio certificado ID Gen ubicado en la ciudad de Quito.

Con el programa bioinformático BLAST se demostró que la secuencia amplificada de la cepa AL1 pertenece al género de *Bacillus sp* y comparte similitud con *Bacillus cereus* presentando un porcentaje de identidad de 98.44% y un e-value de 0.0, como se describe en la Tabla 10 al ser un porcentaje menor al 99% no permite asegurar que la cepa aislada pertenezca a la especie planteada, es decir que no se llegó a determinar su identidad a nivel de especie.

Tabla 10.

Identificación molecular de Bacillus sp. aislada del lodo residual de la EPFYPROCAI.

Muestra	Organismo	Longitud	Fragmento	% de homología
AL1	<i>Bacillus sp.</i> <i>Bacillus cereus</i>	577	16S 27F	98.44

Por otro lado, la cepa AL2 presentó características macroscópicas y microscópicas típicas del género *Lactobacillus*, como se evidencia en la Tabla 11.

Tabla 11.

Características macroscópicas y microscópicas de la cepa AL2 aislada de lodo residual de la EPFYPROCAI

Características cepa AL2		
Macroscópicas	Tamaño	1.5 mm
	Forma	Circular
	Borde	Liso
	Textura	Ligero
	Color	Blanca
	Superficie	Lisa
Microscópicas	Tinción	Gram positiva
	Forma	Bacilar
	Tamaño	Cortos
	Extremos	Redondeados
	Disposición	Aislado

Se observó una relación con la descripción fenotípica realizada por Garcia, Alonso y García (2016) y Cutiño et al., (2017) para el género de *Lactobacillus*, debido a la presencia de colonias blancas, de borde liso, circular y de tamaño entre 1 y 2 mm (Figura 11A). Además, AL2 presentó similitud respecto a las características microscópicas planteadas por Ramírez (2010) para el género de *Lactobacillus* como: bacilos gram positivos, con bordes redondeados que forman cadenas cortas (Figura 11B).

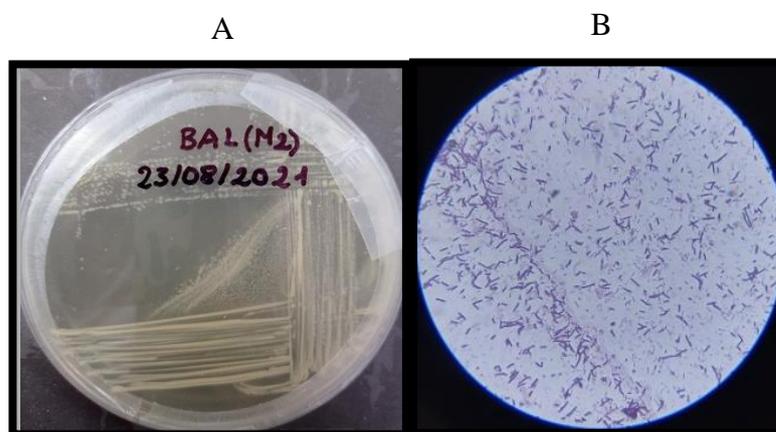


Figura 11 Caracterización morfológica de *Lactobacillus*. A) Crecimiento de colonias de *Lactobacillus* en agar MRS y B) colonias vistas al microscopio 100x , observándose bacilos cortos.

Adicionalmente, se comparó las secuencias obtenidas del análisis molecular mediante un BLAST dando como resultado que la cepa AL2 corresponde a *Lactiplantibacillus argentoratensis* con un porcentaje de identidad de 100% y con un e-value 4×10^{-174} como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12

Identificación molecular de *Lactiplantibacillus argentoratensis* aislada del lodo residual de la EPFYPROCAI.

Muestra	Organismo	Longitud	Fragmento	% de homología
AL2	<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i>	361	16S 27F	100

De acuerdo con las características macroscópicas y microscópicas de los dos aislados obtenidos, se logró determinar que AL1 pertenece al género de *Bacillus*, mientras que AL2 corresponde al género de *Lactobacillus*.

En distintos estudios demuestran que en la sangre y la microbiota intestinal de los animales presentan cepas nativas de *Lactobacillus* y *Bacillus*, los cuales muestran actividad antimicrobiana frente a patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella sp* (Zbrun et al, 2013 ; Reuben, Roy, Sarkar, Alam, y Jahid, 2019). En la EPFYPROCAI se manejan estos tipos de desechos líquidos como sangre y agua del lavado del contenido ruminal que son trasladados mediante una tubería a la planta de tratamiento; siendo posible que varios microorganismos originarios de estos desechos se encuentren en el lodo residual generado (GADM I 2018), razón por la cual se logró aislar estas dos cepas bacterianas.

Existe evidencias de que especies de *Bacillus* han sido aisladas del lodo residual (Vásquez Perea, Villamil Poveda, Sánchez Leal, y Lancheros Diaz, 2014), mientras que de la subespecie *Lactiplantibacillus argentoratensis* hay información limitada de su aislamiento, sin embargo de la especie de *Lactobacillus plantarum* se ha aislado a partir de desechos orgánicos, microbiota intestinal y sangre de animales así lo demuestra Zbrun et al.,(2013) y Reuben, Roy, Sarkar, Alam, y Jahid, (2019). Diferentes estudios indican que *Bacillus* y *Lactiplantibacillus argentoratensis* inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella sp*. (Ray Mohapatra, Lakshmanan, Mahesh, Suchiang, y Jeevaratnam, 2021) atribuyéndole la acción antimicrobiana por la producción de metabolitos bioactivos (Anderson et al., 2015).

4.2. Caracterización del lodo residual de la Planta de Tratamiento de Aguas de la ciudad de Ibarra (PTAR-I).

La caracterización microbiológica del lodo residual de la PTAR-I se efectuó con el lodo previamente biodigerido y centrifugado, las muestras se analizaron de acuerdo con lo planteado en el apartado 3.4 de la metodología para la cuantificación de:

- Coliformes fecales (CF)
- *Salmonella sp*

Las coliformes fecales y *Salmonella sp* son un buen indicador de contaminación considerando que niveles bajos es evidencia de ausencia de organismos patógenos, además de que su concentración en aguas residuales es más alta que otros microorganismos. Siendo estos dos organismos los principales causantes de enfermedades intestinales graves en los seres humanos (García, 2016).

Se cuantificó coliformes fecales una vez por mes durante agosto, septiembre, octubre y noviembre del 2021, determinando un valor promedio de $3.52 \times 10^6 \pm 2.3 \times 10^6$, como muestra la Tabla 13.

Tabla 13

Caracterización de coliformes fecales mediante la técnica del NPM del lodo residual de la PTAR-I.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Media	Desviación estándar	SEMARNAT 2003
	Coliformes fecales				\bar{X}	σ	
Fecha	30/08/2021	22/09/2021	11/10/2021	27/11/2021			
NMP/ g seco	5.3×10^6	3×10^6	5.3×10^6	4.7×10^5	3.52×10^6	2.3×10^6	$>2 \times 10^6$

En el medio EC se evidenció el crecimiento de CF como lo muestra la Figura 12 indicando la producción de gas en las campanas Durham y turbidez del medio.



Figura 12 Presencia de gas en campanas Durham con medio EC, indica positivo para CF.

En la Figura 13 se evidenció colonias con coloración azul verdoso, mostrando un crecimiento bacteriano característico de *Escherichia coli* en medio TBX, lo que confirmó los resultados de la fermentación de tubos múltiples. Se determinó la presencia de *E.coli* debido a que es la especie que se encuentra en mayor porcentaje del grupo de coliformes fecales que causan enfermedades infecciosas como hepatitis, gastroenteritis, entre otras (García, 2016).

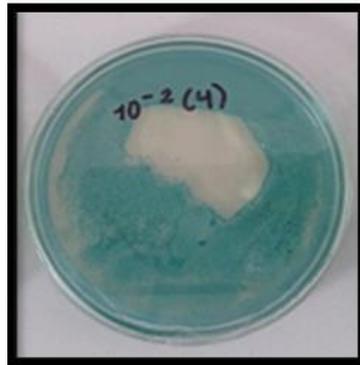


Figura 13 Prueba confirmatoria de *Escherichia coli* en placa con TBX, se determinó la imagen A como ausencia de *E.coli*, mientras que la B como presencia de *E.coli*.

Por otra parte, se cuantificó la población microbiana de *Salmonella sp* por cuatro meses consecutivos obteniendo un promedio de $4.9 \times 10^4 \pm 9.1 \times 10^3$ como indica la Tabla 14.

Tabla 14

Cuantificación de Salmonella sp. mediante la técnica del NPM del lodo residual de la PTAR-I.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Media \bar{X}	Desviación estándar σ	SEMARNAT 2003
	<i>Salmonella sp.</i>						
Fecha	18/08/2021	15/09/2021	13/10/2021	21/10/2021			
NMP (Código)	5-4-1	5-3-2	5-3-3	5-3-1	4.9×10^4	9.1×10^3	>300
NMP/g seco	5.6×10^4	4.6×10^4	5.6×10^4	3.7×10^4			

En el caldo selenito cistina se evidenció el crecimiento de *Salmonella sp* como lo muestra la Figura 14 por el cambio de coloración a anaranjado intenso.



Figura 14 Cambio de coloración a anaranjado intenso indica positivo para presencia de *Salmonella sp.*

En el medio Salmonella- Shigella (SS) se observó colonias de color negro debido a la producción de ácido sulfhídrico, obteniendo un crecimiento bacteriano característico de *Salmonella sp.* como indica la Figura 15. Confirmando los resultados de la fermentación de tubos múltiples.



Figura 15 Prueba confirmatoria en placa con Agar SS, la imagen indica la presencia de *Salmonella sp*

Las muestras analizadas presentaron concentraciones diferentes de coliformes fecales y *Salmonella sp*, las cuales varían de acuerdo con el mes de muestreo, ya que existe un flujo de entrada de aguas residuales del río Tahuando diario a la PTAR-I, donde los residuos son desembocados de forma continua en el transcurso del día, provocando variaciones en la carga microbiana del agua residual y por ende del lodo generado.

Los valores más altos de CF se encuentran elevados a la sexta potencia (10^6) y el valor más bajo elevado a la quinta potencia (10^5), mientras que para *Salmonella sp*, se encuentran elevados a la cuarta potencia (10^4), esto nos indican que la cantidad de CF y *Salmonella sp*. del lodo residual de la centrifuga de la PTAR-I previo al secado solar no cumple con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana para el aprovechamiento de lodos residuales de clase C que puede ser utilizado para mejoramiento de suelos, usos forestales y agrícolas (SEMARNAT, 2003b).

A pesar de que la concentración promedio de CF encontrada en la investigación de 3.52×10^6 NMP/ g seco no cumple con el valor de $< 2 \times 10^6$ NMP/g seco para CF establecido en la Norma Oficial Mexicana para el aprovechamiento de los lodos, este valor se aproxima, esto se debe a que posiblemente ya que los lodos utilizados en la investigación son previamente digeridos por lo que algunas bacterias benéficas propias como *Bacillus*, ácido lácticas y acéticas podrían reducir los patógenos al ingresar al biodigestor (García, 2016), como se lo realiza en la PTAR-I.

4.3. Evaluación de la aplicación de microorganismos ácido lácticos para la remoción de patógenos del lodo residual de la planta de tratamiento de aguas.

4.3.1. Evaluación de la remoción de patógenos (Coliformes fecales y Salmonella sp) del blanco respecto a los tres tratamientos.

Estudios como el de Anderson et al (2015) y Cupe y Juscamait (2018) plantean que las bacterias del género *Bacillus* y *Lactobacillus* tienen propiedades antimicrobianas por los metabolitos bioactivos que producen en un proceso fermentativo. Por ello, se evaluó la capacidad de reducción de patógenos de las dos cepas aisladas mediante una fermentación anaerobia.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el blanco y los tres tratamientos, obteniendo un p-valor de 0,0001 de CF ($F= 74,29$; $gl= 8$) y de *Salmonella sp* un p-valor $< 0,0001$ ($F= 37,01$; $gl= 8$), es decir que el aplicar un inóculo bacteriano

independientemente del género microbiano utilizado es más efectivo para la reducción de patógenos que dejar al lodo sin ningún inóculo como se puede observar en la Figura 16.

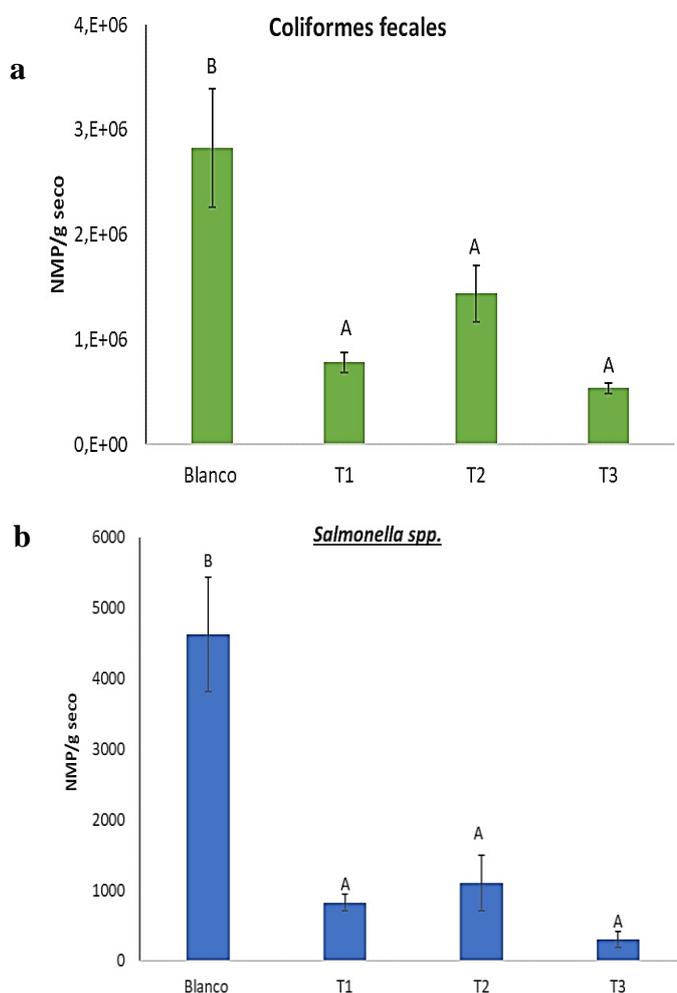


Figura 16 Comparación de la reducción de patógenos del lodo residual de la PTAR-I del blanco respecto a los tres tratamientos a) coliformes fecales y b) *Salmonella sp.* Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

La concentración inicial de coliformes fecales en el tratamiento control (Blanco) fue de 3.52×10^6 NMP/g seco de y luego de 31 días se logró reducir a 2.8×10^6 NMP/g seco $\pm 5.7 \times 10^5$, mientras que de *Salmonella sp* la carga microbiana inicial fue de 4.9×10^4 NMP/g seco y posterior a los 31 días tuvo un valor promedio de 4.6×10^3 NMP/g seco ± 810.29 . A diferencia de los tres tratamientos que a los 31 días uno de ellos (T3) logró disminuir de 3.52×10^6 NMP/g seco hasta 9.2×10^5 NMP/g seco de coliformes fecales y de *Salmonella sp* desde 4.9×10^4 NMP/g seco a 270.37 NMP/g seco, permitiendo cumplir con lo establecido en la Normativa Oficial Mexicana para aprovechamiento de biosólidos.

Peña (2012) manifiesta que para el desarrollo de coliformes fecales y *Salmonella spp.* se requiere un pH neutro, en el tratamiento control que obtuvo un promedio de 7.4 ± 0.3 , el cual al ser un valor de pH neutro es el adecuado para el crecimiento de la microbiota patógena del lodo residual. Según Betance, Gonzalez, Aguirre y Cueva (2010) un pH alcalino permite que los microorganismos involucrados en la acetogénesis y metanogénesis se desarrollen correctamente y mantengan el equilibrio ácido-base para la transformación de ácidos orgánicos en gas metano en un proceso de biodigestión anaerobia.

Mientras que en los tres tratamientos (T1, T2, T3) respecto al pH mostraron resultados similares como se evidencia en la Figura 17, al alcanzar un valor promedio de 4.3 con una desviación estándar de 0,3. La acidificación del medio (lodo residual) de los tres tratamientos indicó que las bacterias aplicadas del género *Lactobacillus* y *Bacillus* fermentaron los carbohidratos y la melaza produciendo metabolitos ácidos que inhiben el crecimiento de patógenos como coliformes fecales y *Salmonella* (Zbrun et al., 2013), esto coincide con los resultados de Anderson et al (2015) quienes registraron que al utilizar bacterias como *Lactobacillus* y *Bacillus* se puede reducir el pH aproximadamente a 4,5 lo que influyen en la actividad metabólica de los microorganismos, afectando a las exoenzima y enzimas que se encuentran unidas a su membrana plasmática limitando el desarrollo de los patógenos, además el pH ácido provoca que el equilibrio ácido-base se altere y permanezca en la etapa de acidificación de la digestión anaerobia, impidiendo la proliferación de bacterias del lodo residual involucradas en la digestión anaerobia y proceso de alcalinización.

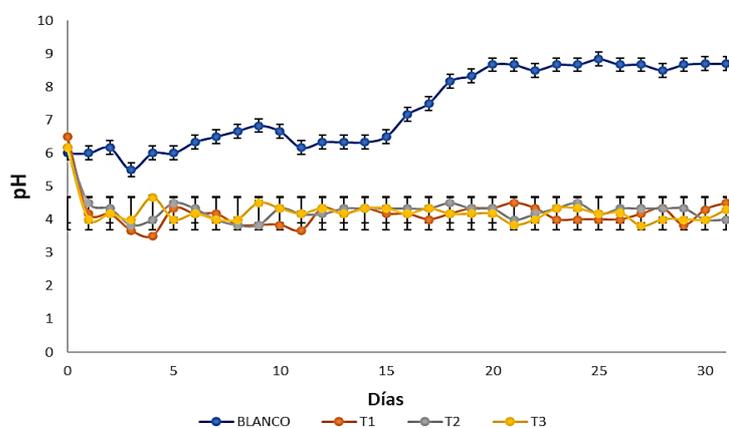


Figura 17 Gráfica de la variación del pH del tratamiento control y los tres tratamientos con respecto al tiempo. (T1: Lodo residual + *Bacillus*, T2: Lodo residual + *Lactobacillus*, T3: Lodo residual + *Bacillus* + *Lactobacillus*).

En el testigo y los tres tratamientos (T1,T2,T3) la temperatura osciló entre 24°C y 32°C como se muestra en la Figura 18, valores que según FAO, MINENERGIA, PNUD y GEF,(2011) se encuentran en el intervalo óptimo de 25°C y 35°C para el desarrollo de microorganismos mesofílicos como *Lactobacillus*, *Bacillus* y los que participan en la digestión anaerobia, sin embargo, no se mantuvo una temperatura constante debido a las condiciones ambientales variables.

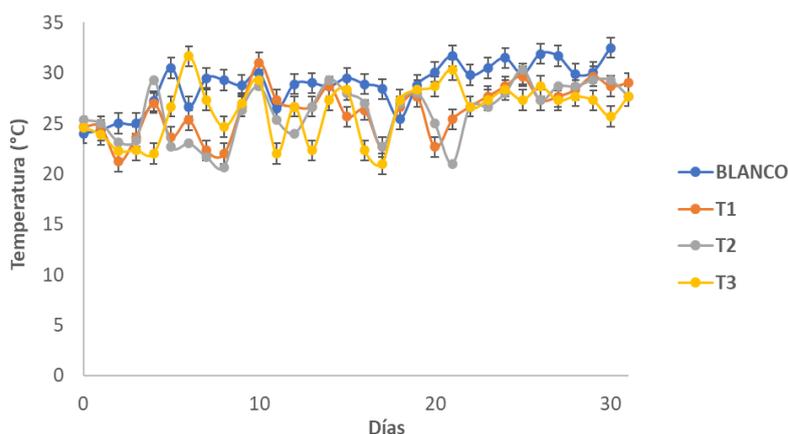


Figura 18. Variación de la temperatura del tratamiento control y los tres tratamientos con respecto al tiempo.

La producción de biogás permite comprobar el crecimiento de la microbiota que se relaciona con el proceso de biodigestión anaerobia (Suárez, López y Álvarez, 2019). En el blanco existió una producción máxima de 31L de gas lo que confirma el desarrollo de diferentes microorganismos, por otra parte, en los tres tratamientos (T1, T2, T3) disminuyó la producción de gas respecto al tiempo generando 4,8 L al finalizar la fermentación como se muestra la Figura 19. Reuben et al (2019) expone que la reducción de gas es un indicador de que no existió un proceso de biodigestión anaerobia, debido a que, el equilibrio entre la cantidad microorganismos metanogénicos y acidogénicos es alterado por la inoculación de bacterias productoras de ácidos orgánicos como *Bacillus* y *Lactiplantibacillus argentoratensis*, dificultando el paso a las siguientes etapas de la digestión anaerobia: acetogénesis y metanogénesis. Betance et al., (2010) sugiere que la producción máxima de gas es un indicador de que se ha alcanzado el estado estacionario en la operación, ya que se ha obtenido el máximo crecimiento o concentración de los microorganismos en el reactor equilibrándose el crecimiento bruto con la muerte celular, posiblemente porque el sustrato que contiene los nutrientes esenciales como hidratos de carbono necesarios para su desarrollo se agotaron.

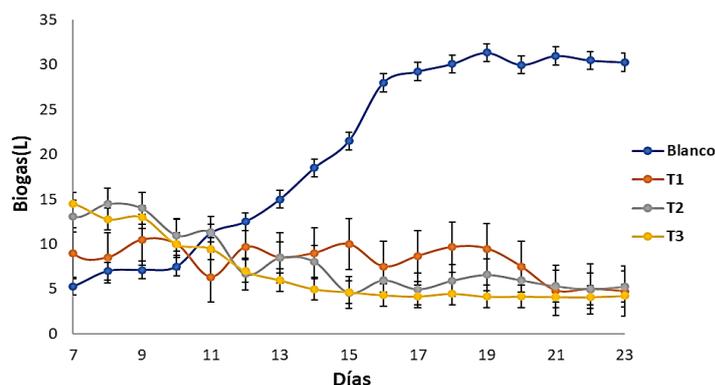


Figura 19. Gráfica de la producción de biogas del tratamiento control y los tres tratamientos con respecto al tiempo.

4.3.2. Elección del mejor tratamiento para la reducción de patógenos: *Coliformes fecales* y *Salmonella sp*).

Como se muestra en la Figura 20, el Tratamiento T3 logró disminuir una mayor cantidad de patógenos en comparación a los otros dos tratamientos (T1,T2) obteniendo un promedio de 5.4×10^5 NMP/g seco $\pm 5.2 \times 10^4$ en lo que respecta a coliformes fecales, mientras que de *Salmonella sp* obtuvo un valor de 270.37 NMP/g seco ± 92.72 . Existen diferencias significativas ($F=5,29$; $gl=6$ p -valor= $<0,047$) entre los tres tratamientos, es decir que el aplicar distintos inóculos bacterianos producen diferente efecto en la reducción de coliformes fecales y *Salmonella*, obteniendo que el tratamiento 3 que contenía un inóculo de *Bacillus* y *Lactiplantibacillus* redujo en mayor cantidad los patógenos respecto al NMP/g seco, autores como Díaz, Iglesias y Cabrera (2014) y Villa et al (2013) plantean que microorganismos del género *Bacillus* y *Lactobacillus* pueden coexistir en un mismo ecosistema sin competir entre sí, adaptándose al medio y produciendo metabolitos bioactivos que ayuden en la remoción de patógenos como coliformes fecales y *Salmonella sp*, probablemente por esta razón el tratamiento T3 que es la combinación de inóculos de *Bacillus* y *Lactobacillus* resultó el mejor de los tres.

De la misma manera, el Tratamiento 3 (T3) cumplió con los parámetros microbiológicos establecidos en la Normativa Oficial Mexicana (SEMARNAT, 2003) para el aprovechamiento de biosólidos para ser clasificado como lodo de clase C, ya que redujo $<2 \times 10^6$ NMP/g seco de coliformes fecales y <300 NMP/g seco de *Salmonella sp*. Es decir, que el lodo residual obtenido puede ser utilizado para el mejoramiento de suelos, usos agrícolas y forestales limitando su aplicación en áreas como parques, y áreas recreativas que tenga un contacto directo con el ser humano. Además, cumplió con los

criterios establecidos por Méndez, Meza y Peña (2015) para ser considerado como un buen tratamiento estabilizado ya que obtuvo un pH menor a 4,5 evitando que compuestos gaseosos tóxicos para la planta se desarrollen, existió ausencia de mal olor y no presentó capas de hongos y levaduras.

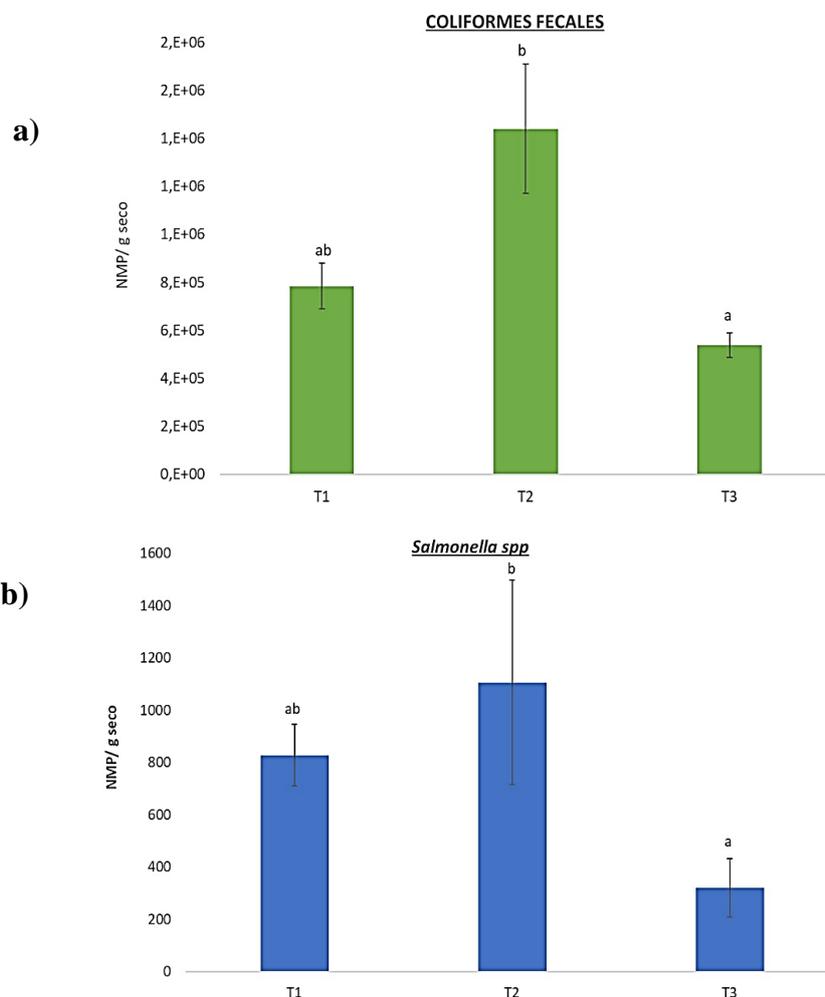


Figura 20 Comparación de la reducción de patógenos del lodo residual de la PTAR-I de los tres tratamientos, a) coliformes fecales y b) *Salmonella sp.* Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras diferentes.

Es importante destacar que el lodo residual estabilizado que cumplió con los parámetros microbiológicos de la Normativa Oficial Mexicana es el del Tratamiento 3 que contiene la combinación de las cepas aisladas (*Bacillus* y *Lactiplantibacillus argenteratensis*) y melaza, esto debido a que los dos microorganismos inoculados tuvieron una fuente de carbono adicional como es la melaza la que contiene azúcares que son fácilmente metabolizados permitiéndoles su rápido desarrollo para que surjan como dominantes en el medio para la producción de ácidos y otros metabolitos que posiblemente produjeron

la reducción del pH del lodo residual que contribuyó a la reducción de patógenos como coliformes fecales y *Salmonella*. Este es el biofertilizante obtenido en esta investigación, el cuál será utilizado para el cumplimiento de apartado 4.4.

4.4. Análisis del efecto del biofertilizante obtenido (lodo residual estabilizado) en la fase vegetativa de *Phaseolus vulgaris*.

4.4.1. Evaluación de la Fitotoxicidad del biofertilizante (Lodo residual estabilizado) en semillas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*).

Se encontró diferencias estadísticamente significativas ($F=53,28$; $gl=12$; $p\text{-valor} < 0,0001$) entre las concentraciones del lodo residual (%) respecto al IG, es decir que las concentraciones de biofertilizante evaluadas producen un efecto diferente en el índice de germinación de semillas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*), como se muestra en la Figura 21, encontrándose que el índice de germinación del grupo B correspondiente a las concentraciones de 2,5,10 y 25% fue superior al determinado para el grupo A de concentraciones de 50 y 75%, demostrando que el grupo A presenta elementos fitotóxicos que impiden la germinación de las semillas.

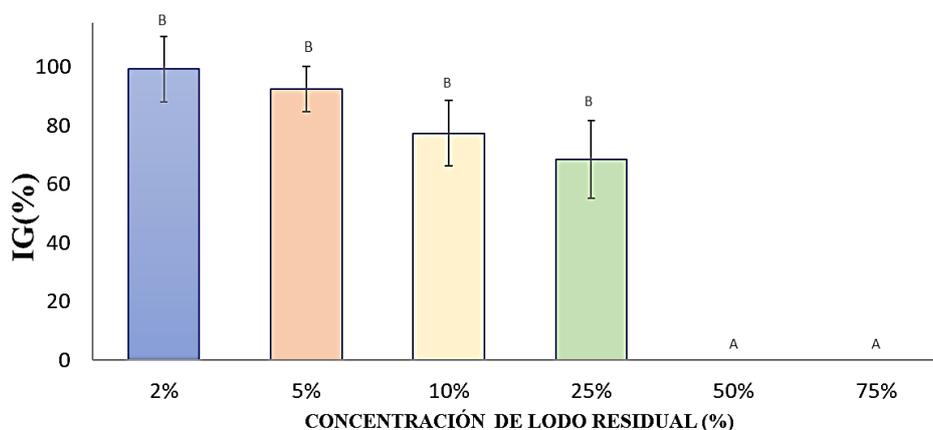


Figura 21. Efecto de diferentes concentraciones del lodo residual estabilizado sobre el índice de germinación (IG).

Varnero , Rojas y Orellana (2007) señalan que el índice de germinación (IG) debe encontrarse sobre el 80% para considerar que la sustancia utilizada no tiene elementos fitotóxicos, valores entre el 80 y 50% muestran una presencia moderada de fitotoxinas, mientras que, valores menores a 50% indican una alta presencia. De acuerdo con estos criterios el biofertilizante obtenido es menos tóxico en concentraciones de 2 y 5% con un IG de 99.32 y 92.47 % respectivamente, mientras que el de 10 y 25 % presentaron un IG

de 77,40 y 68.49 % mostrando una toxicidad moderada y el de 50 y 75% tuvieron un IG de 0%, lo que demuestra una alta fitotoxicidad impidiendo la germinación de semillas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*).

Analizando los resultados se observó que la dilución de 2% es al que mejor favorece a la germinación de las semillas de fréjol (*Phaseolus vulgariza*) con un IG de 99.32% lo que significa que no hay efectos fitotóxicos del biofertilizante en esta concentración. Sin embargo, Escobar, Martinez y Sánchez (2012) encontraron que usando lodo residual se produjo un IG aceptable de 87% empleando una del concentración del 1%.

4.4.2. Evaluación del biofertilizante en parámetros de crecimiento de fréjol (*Phaseolus vulgaris*).

Existe información limitada en el que se haya realizado la aplicación conjunta de lodo residual con *Trichoderma sp*, es por ello que la discusión de los resultados está enfocada en los beneficios en forma separada del biosólidos y aplicación de *Trichoderma sp*.

Los resultados de las variables: longitud de raíz, número de hojas por planta, área foliar, altura y peso fresco de la planta, que fueron cuantificados al final de la etapa vegetativa del fréjol (*Phaseolus vulgaris*).

Longitud de la raíz

Se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F= 93.55$; $gl=44$; $p\text{-valor} = <0.001$), es decir, que la aplicación de biosólidos como biofertilizante muestran superioridad de elongación radicular en comparación al tratamiento control como muestra la Figura 22. Al analizar la longitud de la raíz de las plantas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*), se determinó que la longitud máxima fue de 60cm, valor obtenido en el tratamiento 2, mientras que la longitud mínima fue de 28 cm que se evidenció en el tratamiento control.

Entre los tratamientos T1 y T3 se encontró que no existieron diferencias en sus medias por lo que el aplicar lodos residuales estabilizados por diferentes métodos (secado y biodigestores) influyen de la misma manera en la longitud de la raíz, mientras que para el tratamiento T2 en comparación a los otros dos tratamientos y el blanco existieron diferencias estadísticamente significativas porque generó la mayor longitud de la raíz.

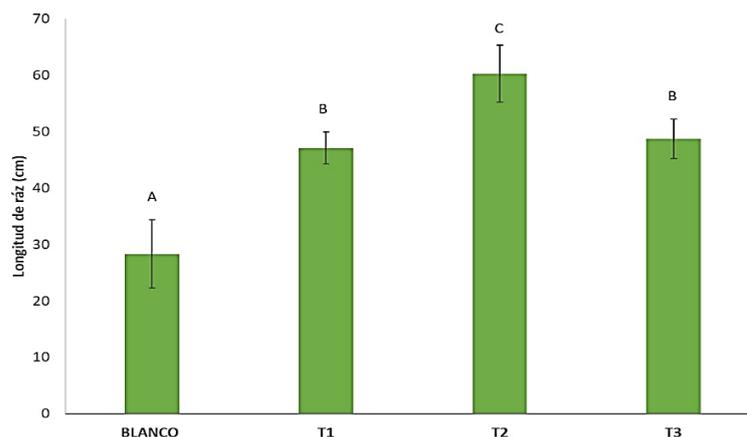


Figura 22 Incidencia del blanco y los tres tratamientos en la longitud de la raíz (cm). **T1** (Biofertilizante +Tierra negra) **T2** (Biofertilizante+ *Trichoderma sp* +Tierra negra) **T3** (Lodo seco PTAR-I +Tierra negra).

Es decir que el tratamiento en el que se aplicó biofertilizante y *Trichoderma sp* (T2) tiene el efecto más favorable en la longitud de raíz, esto se debe a la aplicación de microorganismos benéficos como *Trichoderma sp*. en cultivo de fréjol que acelera el alargamiento de las raíces ya que al estar colonizadas por el hongo produce auxinas y otros compuestos difusibles que pueden modular el crecimiento de la raíz mejorando la absorción de nutrientes minerales en el suelo, induciendo al crecimiento de un mayor sistema de raíces y mejorando la absorción del agua, lo que fue demostrado por Romero, García, Hernández, y Sánchez (2016) en su estudio. Resultados similares se obtuvieron en diferentes cultivos como de arveja (*Pisum sativum*), maracuyá (*Passiflora edulis*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) (Pelagio et al., 2017).

Además la elongación de la raíz principal se debe a que los lodos residuales inducen en el desarrollo de las raíces de las plantas de fréjol, debido al aporte de altos niveles de nutrientes y materia orgánica presente en los biosólidos, los cuales son asimilables por las raíces de los cultivos influyendo en su crecimiento (Korboulewsky, Bonin y Massiani, 2002).

Área foliar

El área foliar es importante en la fisiología de la planta por la superficie fotosintética, favoreciendo a la producción de carbohidratos que junto al agua y minerales absorbidos intervienen en el aumento de biomasa de las plantas (Utria et al., 2008).

Se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos respecto al área foliar, al presentar un p-valor <0.05 ($F= 114.89$; $gl=44$; $p\text{-valor}= <0.001$), es decir, que la aplicación del biofertilizante, *Trichoderma sp* y el lodo seco de la PTAR-I influyeron respecto a esta variable, como se puede observar en la Figura 23.

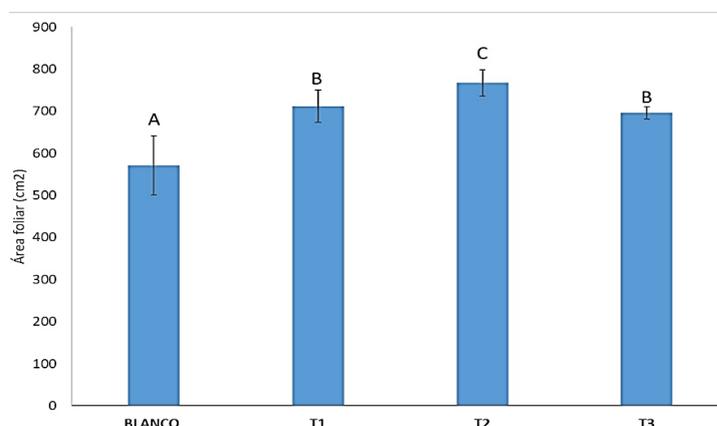


Figura 23 Área foliar (cm²) del blanco y los tres tratamientos

El T3 y T1 no son significativamente diferentes obteniéndose un promedio para el área foliar de 70.4 cm², ya que se aplica únicamente el lodo residual estabilizado por diferentes métodos pero que posiblemente contienen concentraciones similares nutrientes (Utria et al 2008), pero el T2 donde se empleó lodo residual y se potenció con *Trichoderma* se obtuvo el mayor valor detectado para la variable (76.7 cm²), mientras que en el tratamiento control se obtuvo el valor más bajo de área foliar (57.1 cm²) porque no se aplicó ningún tipo de biofertilizante, que promueva el crecimiento de la planta de fréjol.

En el T2 donde se inoculó adicionalmente *Trichoderma sp* se evidenció que la variable evaluada respondió significativamente a la combinación de biofertilizante con *Trichoderma sp*. ello indica que el hongo se encuentra modulando la respuesta en la planta de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) a la presencia del compost (Peña, 2008).

Varios estudios se han centrado en comprobar la efectividad del lodo residual en el crecimiento de plantas así lo demuestra Utria et al (2008) al evaluar en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*), encontró que la magnitud del área foliar se incrementó en el cultivo tratado con biosólidos, obteniendo un valor máximo aproximado de 70 cm², coincidiendo con los resultados obtenidos en esta investigación que al aplicar biosólidos favorece al desarrollo del área foliar.

Otro de los estudios es el de Başdınc y Çirka, (2021) donde evaluó las concentraciones de lodos residuales en el crecimiento de las plantas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) encontraron resultados contrarios a los obtenidos, determinando que los lodos no tienen un efecto positivo en el área foliar en comparación con el control, esta discrepancia entre los dos resultados puede deberse a la aplicación de concentraciones altamente tóxicas de lodos residuales impidiendo el desarrollo óptimo del cultivo (Guerrero et al., 2018).

Número de hojas por planta

El número de hojas en las plantas de fréjol es importante ya que a medida que la planta se desarrolla puede perder hojas por la falta de nutrientes, provocando que la tasa fotosintética disminuya generando menor cantidad de nutrientes para el crecimiento de la planta e induciendo que la biomasa se reduzca (Ortiz, 2012).

Respecto al número de hojas existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos en comparación con el blanco ($F= 165.88$; $gl=44$; $p\text{-valor}= <0.001$) como se muestra en la Figura 24, es decir, que la aplicación del biofertilizante y el lodo seco de la PTAR-I influyen en el número de hojas, sin embargo entre los tres tratamientos T1, T2 y T3 no presentaron diferencias entre sus medias, es decir que aplicar cualquiera de los tres tratamientos incrementaría esta variable.

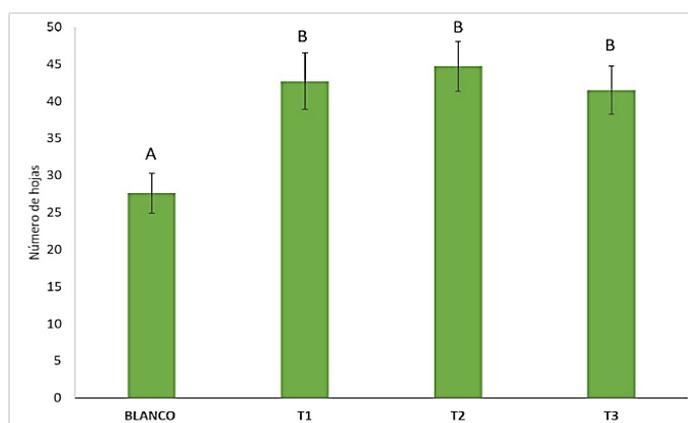


Figura 24 Número de hojas de la planta de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) del blanco y los tres tratamientos.

Estos resultados se deben a que los lodos residuales contribuyen a incrementar el número de hojas ya que dispone de altas cantidades de nitrógeno, estimulando el desarrollo vegetativo, lo que le permite a la planta producir hojas hasta que alcance su máximo

crecimiento (Lobo y Filho, 2009). Bařđinç y Çirka, (2021) evaluó que al aplicar lodos residuales en el cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) presentan diferencias estadísticamente significativas del número de hojas en comparación al control, por otra parte Ruiz (2011) al comparar los tratamientos aplicando concentraciones distintas de biosólidos observó que no hay diferencias en el número de hojas por planta. Resultados que constatan con los obtenidos en la investigación.

Además, estudios realizados por Khalifa et al (2010) que analizó el número de hojas al inocular *Trichoderma sp* en cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) como en el T2 , observó que solamente el tratamiento que contenía el hongo se diferenció del control negativo, también Camargo y Ávila (2014) y Cubillos y Valero (2009) reportaron el incremento en números de hojas al inocular cepas de *Trichoderma sp* en cultivos de arveja (*Pisum sativum*) y maracuyá (*Passiflora edulis*); estos hallazgos posiblemente se deben a la capacidad que posee el hongo de acidificar el medio alrededor de las raíces y para producir metabolitos quelantes, este mecanismo vuelve solubles a algunos minerales y compuestos como: manganeso, zinc y fosfato del calcio, lo cuales pueden ser aprovechados como nutrientes por la planta, lo que explica la capacidad de *Trichoderma sp* de incrementar la biomasa vegetal (Altomare et al., 1999).

Altura de la planta

La altura de planta es una característica fisiológica importante para el crecimiento, se determina por la elongación del tallo donde se acumula los nutrientes originados durante la fotosíntesis, variable que se puede ver afectada por falta de nutrientes asimilables por la planta (Ortiz, 2012).

La Figura 25 indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F= 277.28$; $gl=44$; $p\text{-valor}= <0.001$), es decir, que los tratamientos evaluados presenta distinta influencia respecto a la altura de la planta, comprobándose a través de la comparación de las medias que todas son significativamente diferentes incluyendo el testigo es decir, es decir que el no aplicar biosólidos (blanco) , aplicar únicamente lodos residuales (T1 y T3) inocular *Trichoderma sp* y biosólidos (T2) influyen de manera diferente en la altura de la planta, siendo el T2 que contenía lodos residuales y *Trichoderma sp* el que presentó la máxima altura.

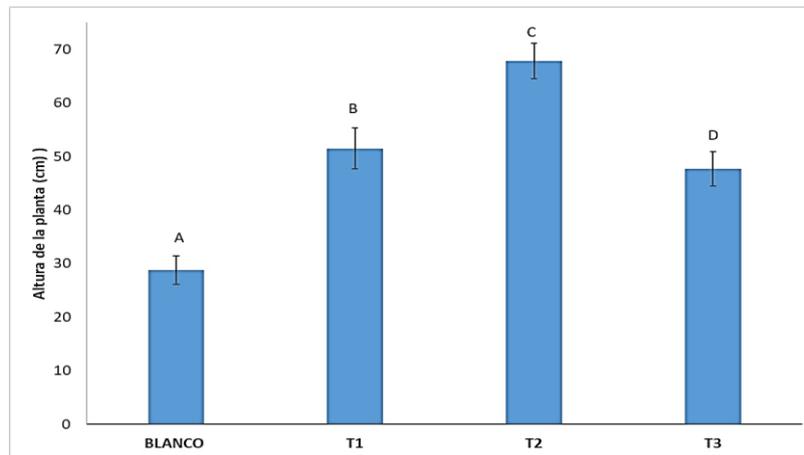


Figura 25 Altura de la planta de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) del blanco y los tres tratamientos.

Frente al control los tratamientos tuvieron un mejor resultado en cuanto a la altura de la planta, lo que indica que el uso de biosólidos podría mejorar esta variable, resultados similares a los de Negrín y Jiménez (2012) quienes obtuvieron un valor máximo de 65 cm en la altura de la planta al aplicar biosólidos, lo que evidencia el efecto beneficioso sobre el desarrollo fisiológico. Siendo el mejor el T2 donde se inoculó adicionalmente *Trichoderma sp*, cuya altura máxima fue de 67,8 cm frente a los 28,8 cm del control.

Esta diferencia de altura entre los tratamientos y el control podría atribuirse a los componentes del biofertilizante, especialmente materia orgánica y oligoelementos esenciales para el crecimiento de las plantas (Belmeskine et al., 2020).

Mientras que, en el T2 se obtiene la mayor altura, ya que además de aplicar biosólidos se potencia con *Trichoderma sp* que actúa como un estimulante que permite un mayor desarrollo en el sistema radical por la secreción de hormonas reguladoras de crecimiento, influyendo en una mejor asimilación de nutrientes y por ende una mayor altura de la planta (Cubillos y Valero, 2009). Autores como Peña y Pavone (2020) señalan que además pueden producir sideróforos que podrían contribuir en el incremento de la altura. En este sentido, Khalifa et al (2010). informó el incremento en el crecimiento de las plantas provocada por la aplicación de microorganismos en el suelo.

Peso fresco de la planta

El peso fresco permite estimular el volumen, determinando el contenido de agua presente, como respuesta a la capacidad fotosintética y nutrición de la planta, directamente relacionado con la producción. La aplicación de biofertilizante permite corregir la ausencia de nutrientes que pueden tener las plantas, evitando que no se produzcan frutos, al conocer el peso fresco se logra determinar que la planta tuvo una correcta nutrición y por ende el suelo y biofertilizante proporcionaron los nutrientes necesarios para su crecimiento (Ortiz, 2012).

Se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados (Figura 26), es decir, que el peso fresco de la planta depende de los factores en estudio (biofertilizante y lodo residual PTAR-I). Teniendo como resultado un peso máximo 54,3g en el T2 y un valor mínimo de 22,3g en el tratamiento testigo.

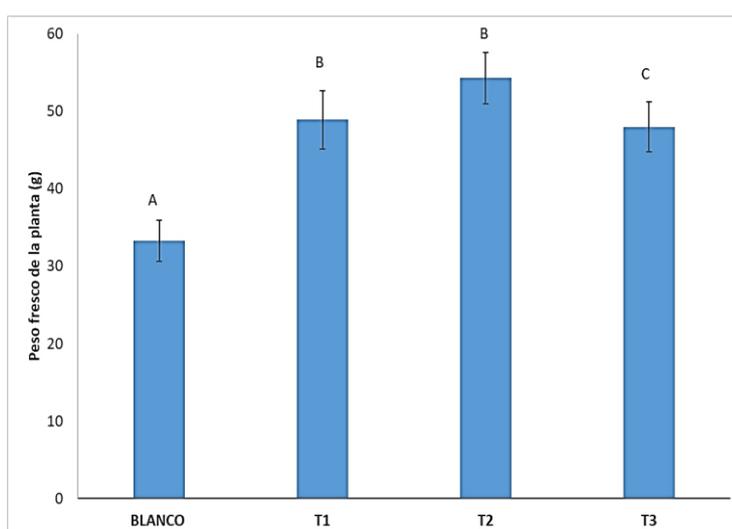


Figura 26 Peso fresco (g) de la planta de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) del blanco y los tres tratamientos.

Başdıñ y Çirka (2021) demostraron que el aplicar biosólidos tienen efecto positivo en el peso fresco de la planta, aumentando el rendimiento en comparación con el tratamiento control, también Camargo y Ávila (2014) mostró que el fréjol (*Phaseolus vulgaris*) tiene una reacción favorable al aplicar *Trichoderma sp.*, estos resultados concuerdan con lo reportado en diferentes cultivos como melón, papa y aguacate.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Mediante técnicas macroscópicas y microscópicas se identificaron dos cepas bacterianas en las muestras del lodo residual analizado pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus*. Además, se determinó mediante la técnica de ADN barcoding que uno de los microorganismos corresponde a la especie de *Lactiplantibacillus argentoratensis*.
- Las características microbiológicas de las muestras de lodo de la centrifuga de la PTAR-I presentó un promedio de 3.52×10^6 NMP/g seco de coliformes fecales y una concentración media de 4.9×10^4 NMP/g seco de *Salmonella sp.* En base a estos resultados se determinó, que las muestras no cumplieron con los límites permisibles respecto a los parámetros microbiológicos establecidos en la Normativa Oficial Mexicana para su aprovechamiento en la agricultura.
- El inóculo compuesto por la combinación de *Lactiplantibacillus argentoratensis* y *Bacillus* logró reducir la carga microbiana de coliformes fecales y *Salmonella sp.* este tratamiento resultó ser el mejor ya que disminuyó a un promedio de 5.4×10^5 NMP/g seco de coliformes fecales y 270.37 NMP/g seco para *Salmonella sp.*, además presentó un pH de 4,2, sin mal olor y sin presencia de hongos y levaduras, cumpliendo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana para lodos de tipo C que pueden ser aprovechados en la agricultura.
- El biofertilizante presentó una concentración óptima al 2 % la cual no generó efectos tóxicos en las semillas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*), mostrando un índice de germinación de 99,32%.
- La aplicación de biosólidos (T2) y *Trichoderma sp* promueven significativamente el desarrollo de las plantas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*), mostrando incrementos en todas las variables evaluadas como: longitud de raíz (60,3 cm), área foliar (76,7 cm²), altura de la planta (67.8 cm), peso fresco (54,3 g) y números de hojas por planta (44,7); esto indica la conveniencia de utilizar microorganismo benéficos y biofertilizantes por su mejor adaptación y su alto contenido de nutrientes.

5.2. Recomendaciones

- Incrementar análisis para la caracterización del lodo residual como parámetros físico-químicos, que permitan conocer cómo influyen los microorganismos en la composición de los nutrientes del lodo residual de la PTAR-I.
- Utilizar otro primer que amplifique la región *rpoB*, con el fin de identificar la especie de *Bacillus sp* aislado.
- Determinar la concentración de los microorganismos productores de ácido antes, durante y al final del proceso de biodigestión a través de UFC/ml, para conocer como varía su crecimiento durante todo el proceso.
- Extraer los metabolitos producidos por *Bacillus sp.* y *Lactiplantibacillus argetoratensis* de un extracto crudo de cultivo celular para separar e identificar por cromatografía y espectrometría de masas e identificar si presentan efecto antimicrobiano en los patógenos.
- Colocar a los digestores en lugares cerrados para que la temperatura ambiental se pueda mantener constante, evitando variaciones diarias mayores a 1,2°C en los reactores provocadas por efecto de las condiciones climáticas.
- Establecer alianzas con instituciones que permitan la identificación de especies con otras técnicas como la de MALDI-TOF.
- Comprobar la efectividad antimicrobiana de los metabolitos producidos por *Bacillus sp.* y *Lactiplantibacillus argetoratensis* por el método de difusión en disco (Kirby-Bahuer) en la disminución de patógenos del agua y lodo residual.
- Realizar un muestreo más amplio de diferentes lodos residuales como el primario, secundario o terciario de la EPFYPROCAI, para aislar un mayor número de microorganismos con capacidad antimicrobiana.

REFERENCIAS

- Afanador, L. (2019). Biofertilizantes: conceptos , beneficios y su aplicación en Colombia (Biofertilizers : concepts , benefits and its application in Colombia). *Universidad Central . Facultad de Ingeniería y Ciencias Básicas., March*.
- Al-Gheethi, A. A., Efaq, A. N., Bala, J. D., Norli, I., Abdel-Monem, M. O., and Ab. Kadir, M. O. (2018). Removal of pathogenic bacteria from sewage-treated effluent and biosolids for agricultural purposes. *Applied Water Science*, 8(2). <https://doi.org/10.1007/s13201-018-0698-6>
- Alarcón, I. (2019, August). *Aguas servidas, un riesgo para los ríos del país*. El Comercio.
- Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T., and Harman, G. E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth- promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2926–2933. <https://doi.org/10.1128/aem.65.7.2926-2933.1999>
- Anderson, C., Malambo, D. H., Perez, M. E., Nobela, H. N., De Pooter, L., Spit, J., Hooijmans, C. M., De Vossenber, J. V, Greya, W., Thole, B., Van Lier, J. B., and Brdjanovic, D. (2015). Lactic Acid Fermentation, Urea and Lime Addition: Promising Faecal Sludge Sanitizing Methods for Emergency Sanitation. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 12, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/ijerph121113871>
- Anisley, A., Veliz, E., and Bataller, M. (2015). Tratamiento de lodos, generalidades y aplicaciones. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 46, 1–10.
- Başdınc, T., and Çirka, M. (2021). Effects of urban sewage sludge on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedling emergence rate and development. *Journal of Elementology*, 26(1), 181–197. <https://doi.org/10.5601/jelem.2020.25.4.2062>
- Belmeskine, H., Ouameur, W., Dilmi, N., and Aouabed, A. (2020). The vermicomposting for agricultural valorization of sludge from Algerian wastewater treatment plant: impact on growth of snap bean *Phaseolus vulgaris* L. *Heliyon*, 6(8), e04679. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04679>
- Belzona Inc. (2010). *Tratamiento de Aguas Residuales*.
- Betance, V., Gonzalez, G., Aguirre, B., and Cueva, G. (2010). *Sistema mixto de tanques anerobios y fitoremediación como una alternativa de bajo costo para el tratamiento de aguas residuales en centros recreativos*. Centro de Investigación en Materiales Avanzados.
- Bina, B., Movahedian, H., and Kord, I. (2004). *The effect of lime stabilization on the microbiological quality of sewage sludge*.
- Bokova, I., and Ryder, G. (2017). Aguas Residuales el Recurso Desaprovechado. In *Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura* (Vol. 3).
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., and Valdezate, S. (2011).

- Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Cabreja, A. (2020). *Biodigestor*. EcoInventos.
- Cain, G. D. (2010). Sanitizing Sewage Sludge: The Intersection of Parasitology, Civil Engineering, and Public Health. *Journal of Parasitology*, 96(6), 1037–1040. <https://doi.org/10.1645/GE-2631.1>
- Calderón, E. J. H., Rodríguez, M. I. M., de la Rosa, M. G. V., and de Casas, M. del S. M. (2014). Lodos residuales: métodos de tratamiento, estabilización y aprovechamiento. *Índice*, 61.
- Calvo, P., and Zúñiga, D. (2010). Caracterización Fisiológica De Cepas De Bacillus Spp. Aisladas De La Rizósfera De Papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1–2), 31. <https://doi.org/10.21704/rea.v9i1-2.393>
- Camargo, D., and Ávila, E. R. (2014). *Efectos del Trichoderma UR UQDTG GN ETGEKOKGPVQ [desarrollo de la arveja (Pisum sativum . Effects of Trichoderma sp . on the pea (Pisum sativum L .) growth and development. 11, 91–100.*
- Cardona, J., and García, L. (2008). *Evaluación del efecto de los microorganismos eficaces (EM®) sobre la calidad de un agua residual doméstica*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Carrera, J., and Suárez, M. (2019). *Aguas residuales industriales en Iberoamérica*.
- Chirino-Valle, I., Kandula, D., Littlejohn, C., Hill, R., Walker, M., Shields, M., Cummings, N., Hettiarachchi, D., and Wratten, S. (2016). Potential of the beneficial fungus *Trichoderma* to enhance ecosystem-service provision in the biofuel grass *Miscanthus × giganteus* in agriculture. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep25109>
- Cubillos, J., and Valero, N. (2009). *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombiana*, 27(1), 81–86.
- Cuervo, J. (2010). Aislamiento y Caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. *Pontificia Universidad Javeriana*, 1–35.
- Cupe, B., and Juscamaita, J. (2018a). Tratamiento De Lodos Residuales De Una Industria Cervecera A Través De Fermentación Homoláctica Para La Producción Acelerada De Abono Orgánico Treatment Of Sewage Sludge From A Brewing Industry Through Homolactic Fermentation For The Accelerated Production. *Ecología Aplicada*, 17(1). <https://doi.org/10.21704/rea.v17i1.1179>
- Cupe, B., and Juscamaita, J. (2018b). Tratamiento de lodos residuales de una industria cervecera a través de fermentación homoláctica para la producción acelerada de abono orgánico. *Ecología Aplicada*, 17(1), 22.
- Cutiño, E., Urueñas, C., María, A., Nistal, R., Alonso, G., Jiménez, F., Reyes, B., Irais, N., and Franco, G. (2017). *PROCEDENTES DE GALLOS PLUMA DE LEÓN Y PERDICES (Characterization and bal ' sidentification appropriate of roosters pen of leon and partridges)*.

- Del Pino, S. J. L., and Calderón, S. M. (2017). *Depuración de aguas residuales*. Editorial Elearning, SL.
- Demir, S., and Fırat Cabalar, A. (2017). *Use of Sewage Sludge ash in soil improvement*.
- Díaz, B., Iglesias, A., and Cabrera, E. (2014). Microbial Consortiums with Promissory Lactic Acid Activity, Isolated from Native Bacterial Inoculants for Silages. *Ciencia y Agricultura*, 11, 17.
- EMAPA-I. (2018, September). *PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES*
- EPA. (2014). Method 1680: Fecal Coliforms in Lauryl Tryptose Broth (LTB) and EC Multiple-Tube Fermentation using Sewage Sludge (Biosolids) by Medium. In *Angewandte Chemie International Edition*.
- Espinosa, E., and Navarra, E. (2014). *Problemática de la agricultura en el momento actual.pdf*.
- FAO. (2015). *Estructura y funcionamiento de mataderos medianos en países en desarrollo*. <http://www.fao.org/3/T0566S/T0566S14.htm>
- FAO. (2018, February). *Agricultura orgánica*. Team Portal.
- FAO, MINENERGIA, PNUD, and GEF. (2011). Manual del Biogás. *Proyecto CHI/00/G32*, 120.
- GADM Ibarra. (2018). *Centro de faenamiento y planta procesadora de Cárnicos de Ibarra*. 0(0), 419.
- Galvez, G. (2015). Programa Regional de Frijol para la Zona Andina. *Centro Internacional de Agricultura Tropical*, 31.
- Galvis, J., Ximena, T., and Guerrero, R. (2013). *Caracterización fisicoquímica y microbiológica de lso lodos presentes en la planta de tratamiento de aguas residuales industriales (PTARI) de la empresa jugos hit d ela ciudad de Periera*.
- Garcia, A., Alonso, M., and García, C. (2016). *Aislamiento, caracterización y determinación del potencial probiótico de bacterias lácticas de pollos*. 24.
- Garcia, M. (2016). *Tratamiento de lodos residuales procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales mediante procesos electroquímicos para la disminución de concentración de coliformes fecales y totales*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Gautam, K., Sirohi, C., Singh, N. R., Thakur, Y., Jatav, S. S., Rana, K., Chitara, M., Meena, R. P., Singh, A. K., and Parihar, M. (2021). Chapter 1 - Microbial biofertilizer: Types, applications, and current challenges for sustainable agricultural production. In A. Rakshit, V. S. Meena, M. Parihar, H. B. Singh, & A. K. B. T.-B. Singh (Eds.), *Biofertilizers* (pp. 3–19). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821667-5.00014-2>
- Gualoto, J. (2016). *Escuela Politécnica Nacional Facultad De Ingeniería Civil Y Ambiental Propuesta De Gestión De Lodos Residuales Municipales. Caso De Estudio: Planta De Tratamiento De Agua Residual De La Parroquia Rural De Nono Proyecto Previo a La Obtención Del Título De*. Universidad Politécnica Nacional.

- Guerrero, D., Liliana, M., Cuevas, R., and Sánchez, J. (2018). *Evaluación de la fitotoxicidad del lixiviado de rellenos sanitarios en frijol (Phaseolus vulgaris L) variedad Junio*.
- Guerrero, P., Galan, F., Gutiérrez, D., and Guerrero, I. (2014). Infecciones por enterobacterias. In *Medicine* (Vol. 11, Issue 55).
- Guzmán, J. (2018). Fertilizantes químicos y biofertilizantes en México. *Boletines Cámara de Diputados*, 37.
- Hera, C. (1995). The role of inorganic fertilizers and their management practices. *Fertilizer Research*, 43(1), 63–81. <https://doi.org/10.1007/BF00747684>
- Hue, N. V. (1988). Residual effects of sewage-sludge application on plant and soil-profile chemical composition. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 19(14), 1633–1643. <https://doi.org/10.1080/00103628809368040>
- INEC. (2016). Estadística de información ambiental económica en Gobiernos Autónomos Descentralizados Municipales 2015 (Agua y Alcantarillado). *Instituto Nacional de Estadística y Censos INEC, 2015*, 30.
- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. (2009). *Operación y Mantenimiento de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales: Lodos Activados*.
- Ju, I., Bang, J., Sila, M., Onyimba, I., and Egbere, O. (2018). A review: Biofertilizer - A key player in enhancing soil fertility and crop productivity. *Journal of Experimental and Clinical Microbiology*, 0(0).
- Khalifa, M., Khaer, A., and Haggag, K. (2010). *Effect of Trichoderma species on damping off diseases incidence, some plant enzymes activity and nutritional status of bean plants*. 6(9), 486–497.
- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. In *Biochimie* (Vol. 70).
- Korboulewsky, N., Bonin, G., and Massiani, C. (2002). Biological and ecophysiological reactions of white wall rocket (*Diplotaxis eruroides* L.) grown on sewage sludge compost. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 117(2), 365–370. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(01\)00165-8](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(01)00165-8)
- Limon, J. (2013). *Los lodos de las plantas de tratamiento de aguas residuales, ¿Problema o recurso?*
- Limón, J. G. (2013). Los lodos de las plantas de tratamiento de aguas residuales, ¿problema o recurso? In *Academia de Ingeniería México*.
- Llive, P. (2020, March). *Aguas Servidas, un riesgo para los ríos del país*. Chavezolutions.
- Lobo, T. F., and Filho, H. G. (2009). *Sewage Sludge Levels on the Development*. 9(3), 245–255.
- Malińska, K., Zabochnicka-Świątek, M., Cáceres, R., and Marfà, O. (2016). The effect of precomposted sewage sludge mixture amended with biochar on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* during laboratory vermicomposting. *Ecological Engineering*, 90, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.042>
- Martínez, B., Infante, D., and Reyes, Y. (2013). *Trichoderma spp. y plagas en cultivos*.

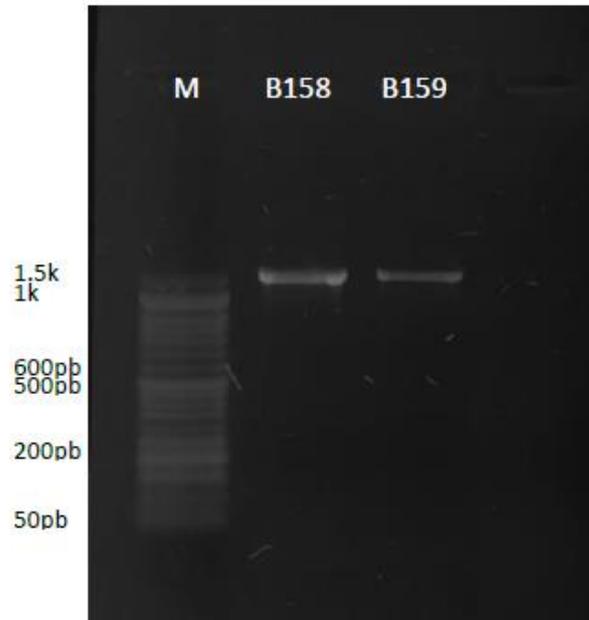
- Martinez, Y., and Sánchez, N. (2012). *EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD DE LODOS RESIDUALES DE INDUSTRIAS ALIMENTICIAS Y PAPELERAS*. <https://doi.org/10.13140/2.1.3001.6007>
- Méndez, A., Meza, G., and Peña, L. (2015). *Trichoderma spp. como alternativa para disminuir el uso excesivo de agroquímicos en México*.
- Negrín, A., and Jiménez, Y. (2012). ANAEROBIA DE RESIDUALES PECUARIOS EN EL CULTIVO DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L .) Evaluation of the agronomic effect of biosolids from a wastewater treatment by anaerobic digestion of livestock waste in bean (*Phaseolus vulgaris* L .) crop Alejandro Neg. *Cultivos Tropicales*, 33(2), 13–19.
- Ortiz, N. (2012). *Láminas de riego y su efecto en la producción de semilla de frijol común en la estación experimental La Compañía, San Marcos, Carazo*.
- Pelagio, R., Esparza, S., Garnica, A., López, J., and Herrera, A. (2017). Trichoderma-induced acidification is an early trigger for changes in Arabidopsis root growth and determines fungal phytostimulation. *Frontiers in Plant Science*, 8(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00822>
- Peña, E., and Pavone, D. (2020). *Efecto de Trichoderma spp. sobre el desarrollo de plántulas de Capsicum annum L. (pimentón) y el biocontrol del hongo fitopatógeno Sclerotium sp. c*, 45–55.
- Peña, N. (2008). *Utilización de residuos de paja (Dioscorea gigas), para la obtención de un fertilizante orgánico líquido*. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Perú). Facultad de Pesquería.
- Peña, P. (2012). *Alternativas de revalorización de lodos residuales provenientes de planta de lodos activados celulosa arauco y constitución S.A., planta Constitución*. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Peñaherrera, M. (2015). *Estabilización de lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas mediante digestión anaerobia*. Universidad de las Américas.
- Pérez, E. (2016). *Tratamiento de lodos residuales procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales mediante procesos electroquímicos para la disminución de metales pesados (Pb)*. 114.
- Ramírez, F. (2010). *Aislamiento de bacterias Lactobacillus s.p y levaduras a partir de productos lácteos artesanales y evaluación de la capacidad antagónica in vitro*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Ray Mohapatra, A., Lakshmanan, D., Mahesh, R., Suchiang, K., and Jeevaratnam, K. (2021). Characterization and Cytotoxic Evaluation of Bacteriocins Possessing Antibiofilm Activity Produced by *Lactobacillus plantarum* SJ33. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(3), 1783–1797. <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10210-2>
- Realpe, M. E., Hernández, C. A., and Agudelo, C. I. (2002). Species of the Bacillus strain: macroscopic and microscopic morphology. *Biomédica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 22(2), 106–109. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i2.1148>

- Remis, R. R., and Mendoza Espinosa, L. G. (2011). *Hacia la sustentabilidad: Los residuos sólidos como fuente de energía y materia prima El potencial de generación de energía eléctrica empleando biosólidos como fuente de materia prima: El caso de la ciudad de Ensenada, Baja California*.
- Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, R. U., and Jahid, I. K. (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1626-0>
- Romero, V., García, V., Hernández, J., and Sánchez, J. (2016). Phaseolus vulgaris response to plant growth promoting microorganisms. *Scientia Agropecuaria*, 7(3), 313–319. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.20>
- Ruiz, F. (2011). *Utilización De Los Lodos Generados En El Proceso De Potabilización Del Agua De La Planta De Tratamiento “Casigana”, Como Aditivo Para Suelos De Cultivo*. 20.
- Secretaría del agua. (2016). Estrategia Nacional de calidad de agua, Quito (Ecuador), 6-72
- SEMARNAT. (2003). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002, Protección ambiental. Lodos y biosólidos. Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. *Diario Oficial de La Federación*, 1–37.
- Sharma, G., Dang, S., Gupta, S., and Gabrani, R. (2018). Antibacterial Activity, Cytotoxicity, and the Mechanism of Action of Bacteriocin from Bacillus subtilis GAS101. *Medical Principles and Practice*, 27(2), 186–192. <https://doi.org/10.1159/000487306>
- Sierra Vázquez, A. (1998). La conservación de los recursos genéticos animales en México. *Archivos de Zootecnia*, 47(178), 149–152.
- Suárez, V. D., López, I., and Álvarez, M. (2019). Estimación De La Producción De Biogás a Partir De Un Modelo De Simulación De Procesos. *Centro Azúcar*, 46(1), 73–85.
- Szucs, B. R., Simon, M., and Füleky, G. (2011). Effect of anaerobic pretreatment by dry batch technology on aerobic degradability of sewage sludge. *Anaerobic Digestion: Processes, Products and Applications*, 49–75.
- Topolovec-Pintarić, S. (2019). Trichoderma: Invisible Partner for Visible Impact on Agriculture. *IntechOpen*, 20.
- Torres, C. (2017). *Propuesta para el aprovechamiento de los lodos generados en la PTAR de la empresa regional Aguas del Tequendama*. Universidad de América.
- Torres Navarrete, E., Quisphe Caiza, D., Sánchez Laiño, A., Reyes Bermeo, M., González Osorio, B., Torres Navarrete, A., Cedeño Briones, A., Haro Chong, A., María, L., Quevedo-El Empalme P, vía C., Ríos, L., Haz Álvarez, M., and Santo Domingo de los Tsáchilas P, vía C. (2013). Caracterización De La Producción De Frijol En La Provincia De Cotopaxi Ecuador: Caso Comuna Panyatug Characterization of Production of Bean in Ecuador Cotopaxi Province: Case Commune Panyatug. *Ciencia y Tecnología*, 1–9.

- Torske, M. (2019). *La realidad de las aguas servidas en Ecuador*. Yakunina.
- UDEP. (2012). *Naturaleza del agua residual domestica y su tratamiento*. 1–23.
- Utria, E., Cabrera, J., Escobar, R., Morales, D., Fernández, A., and Toledo, E. (2008). Utilización agraria de los biosólidos y su influencia en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 14(1), 33–39. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2006.02.009>
- Valverde, D. (2019). *Elaboración de un manual de procesos de manenimeinto para los equipos electromecánicos de la línea de agua de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ibarra*.
- Varnero M, M. T., Rojas A, C., and Orellana R, R. (2007). Índices De Fitotoxicidad En Residuos Orgánicos Durante El Compostaje. *Revista de La Ciencia Del Suelo y Nutrición Vegetal*, 7(1), 28–37. <https://doi.org/10.4067/S0718-27912007000100003>
- Vásquez Perea, Y. M., Villamil Poveda, J. C., Sánchez Leal, L. C., and Lancheros Diaz, A. G. (2014). Evaluación de un sistema de medio fijo como soporte para una película microbiana capaz de reducir Cr (VI) de lodos residuales de curtiembres. *Nova*, 12(21), 57. <https://doi.org/10.22490/24629448.996>
- Vicencio, G., Pérez, E., Medina, E., and Martínez, A. (2011). Producción de composta y vericomposta a partir de los lodos de la planta de tratamiento de aguas residuales de un Rastro. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 27(3), 263–270.
- Villa, A., Aragão, M., dos Santos, E., Mazotto, A., Zingali, R., de Souza, E., and Vermelho, A. (2013). Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: Effect on hair fiber. *BMC Biotechnology*, 13. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-15>
- Wang, J. (2012). Fundamentals of Biological Processes for wastewater treatment. In E. Paul & Y. Liu (Eds.), *Biological Sludge Minimization and Biomaterials/Bioenergy Recovery Technologies* (p. 64).
- Yaulema, N. (2015). Dimensionamiento de una Planta de tratamiento de Aguas Residuales para la Cabecera Parroquial de Juan de Velasco. In *Facultad de Ciencias: Vol. Bachelor*.
- Zbrun, M. V., Altina, M. G., Bonansea, E., Frizzo, L. S., Soto, L. P., Romero-Scharpen, A., Rosmini, M. R., Sequeira, G. J., and Signorini, M. L. (2013). Identification of lactic acid bacteria with bio-preservative potential isolated from contaminated avian blood obtained at the slaughterhouse. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 45(3), 273–282. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2013000300007>
- Zinsstag, J., Schelling, E., Waltner-Toews, D., and Tanner, M. (2011). From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. *Preventive Veterinary Medicine*, 101(3–4), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.07.003>

ANEXOS

Anexo 1 Visualización en gel de agarosa 1% de fragmentos de aproximadamente 1200pb, amplificados con primers 27F/1492R. M: Marcador de peso molecular ABM 100pb Opti-DNA Marker.



Anexo 2 Biomasa obtenida de *Bacillus sp* y *Lactiplantibacillus argetoratis*.



Biomasa obtenida para M1(*Bacillus*) y M2(*Lactiplantibacillus argetoratis*)

Anexo 3 Reactores e invernadero utilizado para la fermentación anaerobia.



Distribución de tratamientos en el invernadero



Diseño de reactor

Anexo 4 Análisis de la Varianza para cuantificación de *Salmonella spp* (NMP/g seco) para los diferentes tratamientos.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	34834435,30	3	11611478,43	37,01	<0,0001
Tratamiento	34834435,30	3	11611478,43	37,01	<0,0001
Error	2510084,84	8	313760,61		
Total	37344520,14	11			

Anexo 5 Resultados de la prueba de Tukey de la cuantificación de *Salmonella spp* (NMP/g seco) para los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T3	319,80	3	323,40	A
T1	827,09	3	323,40	A
T2	1106,00	3	323,40	A
B	4631,47	3	323,40	B

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

Anexo 6 Análisis de la Varianza para cuantificación de Coliformes fecales (NMP/g seco) para los diferentes tratamientos.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9486057373454,09	3	3162019124484,70	20,86	0,0004
Tratamiento	9486057373454,09	3	3162019124484,70	20,86	0,0004
Error	1212431529909,52	8	151553941238,69		
Total	10698488903363,60	11			

Anexo 7 Resultados de la prueba de Tukey de la cuantificación de coliformes fecales (NMP/g seco) para los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
T3	538160,90	3	224762,05	A
T1	784634,18	3	224762,05	A
T2	1439580,41	3	224762,05	A
B	2827947,55	3	224762,05	B

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

Anexo 8 Concentraciones para determinar fitotoxicidad del lodo estabilizado.



Semillas de fréjol a las 24 horas



Semillas de fréjol germinadas a 96 horas

Anexo 9 Análisis de la Varianza para el índice de germinación (IG)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	29481,97	5	5896,39	53,28	<0,0001
CONCENTRACION	29481,97	5	5896,39	53,28	<0,0001
Error	1327,95	12	110,66		
Total	30809,93	17			

Anexo 10 Prueba de Tukey de los valores del índice de germinación (IG)

CONCENTRACION	Medias	n	E.E.	
C5	0,00	3	6,07	A
C6	0,00	3	6,07	A
C4	70,78	3	6,07	B
C3	77,40	3	6,07	B
C2	87,67	3	6,07	B
C1	99,32	3	6,07	B

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

Anexo 11 Crecimiento de plantas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*)



Crecimiento de plantas de fréjol a los 25 días de los tratamientos



Plantas de fréjol del mejor tratamiento



Raíz de fréjol a los 42 días del mejor tratamiento

Anexo 12 Análisis de varianza de la variable área foliar.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2457,51	3	819,17	39,24	<0,0001
TRATAMIENTO	2457,51	3	819,17	39,24	<0,0001
Error	918,64	44	20,88		
Total	3376,16	47			

Anexo 13 Prueba de Tukey de la variable área foliar.

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
BLANCO	57,12	12	1,32	A
T3	69,60	12	1,32	B
T1	71,20	12	1,32	B
T2	76,67	12	1,32	C

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

Anexo 14 Análisis de varianza de la variable número de hojas por planta.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5850,23	3	1950,08	165,88	<0,0001
Columnal	5850,23	3	1950,08	165,88	<0,0001
Error	517,25	44	11,76		
Total	6367,48	47			

Anexo 15 Prueba de Tukey de la variable número de hojas por planta.

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BLANCO	17,58	12	0,99	A
T3	41,50	12	0,99	B
T1	42,67	12	0,99	B
T2	44,67	12	0,99	B

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

Anexo 16 Análisis de varianza de la variable peso fresco.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7364,25	3	2454,75	114,89	<0,0001
BLANCO	7364,25	3	2454,75	114,89	<0,0001
Error	940,07	44	21,37		
Total	8304,32	47			

Anexo 17 Prueba de Tukey de la variable peso fresco.

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BLANCO	22,33	12	1,33	A
T3	47,98	12	1,33	B
T1	48,90	12	1,33	B
T2	54,29	12	1,33	C

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

Anexo 18 Análisis de varianza de la variable longitud de raíz.

Tratamiento	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6302,54	3	2100,85	93,55	<0,0001
BLANCO	6302,54	3	2100,85	93,55	<0,0001
Error	988,06	44	22,46		
Total	7290,60	47			

Anexo 19 Prueba de Tukey de la variable longitud de raíz.

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BLANCO	28,31	12	1,37	A
T1	47,10	12	1,37	B
T3	48,65	12	1,37	B
T2	60,28	12	1,37	C

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

Anexo 20 Análisis de varianza de la variable altura de la planta.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9243,75	3	3081,25	277,28	<0,0001
Tratamiento	9243,75	3	3081,25	277,28	<0,0001
Error	488,94	44	11,11		
Total	9732,69	47			

Anexo 21 Prueba de Tukey de la variable altura de la planta.

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BLANCO	28,76	12	0,96	A
T3	47,69	12	0,96	B
T1	51,47	12	0,96	C
T2	67,78	12	0,96	D

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