

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN**

**APROVECHAMIENTO Y MANEJO DE DESECHOS ORGÁNICOS DE  
COCINA UTILIZANDO MICROORGANISMOS EFICIENTES DE MONTAÑA  
(MEM) AISLADOS DE DOS BOSQUES SECUNDARIOS DE COSTA RICA**

**Nathalie Cruz Mora**

**LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO DEL CENTRO NACIONAL  
ESPECIALIZADO EN AGRICULTURA ORGÁNICA  
(INSTITUTO NACIONAL DE APRENDIZAJE)**

**CARTAGO ENERO 2010**

# **APROVECHAMIENTO Y MANEJO DE DESECHOS ORGÁNICOS DE COCINA UTILIZANDO MICROORGANISMOS EFICIENTES DE MONTAÑA (MEM) AISLADOS DE DOS BOSQUES SECUNDARIOS DE COSTA RICA**

Nathalie Cruz Mora\*

## **RESUMEN**

Aproximadamente del 30 al 70% del total de la basura generada por el ser humano está constituida por desechos orgánicos. La hipótesis de este estudio fue comprobar si los microorganismos eficientes de montaña (MEM) eran una herramienta biotecnológica eficaz para manejar desechos orgánicos de cocina. Las actividades que comprendieron esta investigación fueron: 1) El estudio microbiológico de la hojarasca de montaña en su estado natural proveniente de dos zonas (La Chinchilla y Cedral), 2) La reproducción de los microorganismos presentes en la hojarasca con una variante en el medio de cultivo (con carbón o sin carbón), 3) El análisis microbiológico de los diferentes lotes de MEM, 4) La aplicación de los MEM en la degradación de desechos orgánicos de cocina, bajo dos condiciones: aerobiosis y anaerobiosis, 5) El análisis microbiológico de los tres mejores tratamientos para el manejo de olores. Los tratamientos más efectivos resultaron ser los provenientes de los medios sin carbón vegetal. La utilización de MEM tuvo efectividad para manejar desechos sólidos orgánicos, sin embargo, debido a la alta acidez y humedad excesiva de los desechos, únicamente se logró una etapa de precompostado.

**Palabras clave:** microorganismos eficientes, tratamiento/manejo de desechos orgánicos, biodiversidad, pH, hojarasca de montaña.

\*INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2009.

## ABSTRACT

Approximately 35-70% of total waste generated by human activities is constituted by organic waste. This research had the objective to investigate if mountain effective microorganisms (EM) were a good biotechnology tool for managing organic kitchen waste. The activities of this research were: 1) A microbiological analysis of soil leaves collected from two mountain areas (La Chinchilla and Cedral), 2) Reproduction of the microorganisms in the leaves with a variant in the medium culture (with or without charcoal or carbonless), 3) Microbiological analysis of the different batches of EM, 4) Application of EM in the degradation of organic waste from kitchen, under two conditions: aerobic and anaerobic conditions, 5) Microbiological analysis of the three best treatments for the management of odors. The most effective treatments were those from the medium without charcoal. The EM was used effectively to manage organic solid waste. However, low pH and excessive humidity did affect the results. We recommend to perform a molecular characterization of the EM isolated to be more certain of what microorganisms are involved in successful composting of kitchen organic waste.

**Keywords:** Effective Microorganisms, organic waste management, biodiversity, pH, mountain soil leaves.

**APROVECHAMIENTO Y MANEJO DE DESECHOS ORGÁNICOS DE  
COCINA UTILIZANDO MICROORGANISMOS EFICIENTES DE MONTAÑA  
(MEM) AISLADOS DE DOS BOSQUES SECUNDARIOS DE COSTA RICA**


**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico  
de Costa Rica como requisito parcial**

**para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología**

**Miembros del Tribunal**

  
Ing. Pablo Monge Monge  
Profesor Asesor INA

  
Ing. Olga Rivas Solano  
Profesora Asesora-ITCR

  
Dr. Miguel Rojas Chávez  
Lector ITCR

## ***DEDICATORIA***

Dedico la culminación de esta meta inicial a la energía motivadora sobre todo orden, mi Santo Señor, el único inspirador de mi capacidad, entendimiento y felicidad.

A mis padres: Luz y Manuel, y hermanos: Dan y Roy, quienes con su enseñanza amorosa y comprensión incondicional, serán siempre viento favorable debajo de mis alas.

A Aurelia, mi mejor amiga, por los muchos éxitos que aún debemos cosechar.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, agradezco a mi Dios por allanar siempre el camino bajo mis pies.

Un profundo agradecimiento al Ing. Pablo Monge Monge, cogestor de este proyecto, por su gran capacidad y paciencia como formador, por los muchos aportes acertados que generó para esta investigación.

Agradezco a la Ing. Olga Rivas Solano, quien con su cordialidad, comprensión, excelencia y gran vocación como educadora ha alimentado este estudio.

Dedico un sincero agradecimiento a la Ing. Carmen Durán Ruíz, quien me dio la oportunidad de realizar este trabajo final en el Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica-INA. Extiendo la gratitud hasta todo el personal administrativo, educativo y de mantenimiento, que en todo momento me brindaron un apoyo sincero y desprendido. Principalmente a Adrián, encargado de bodegas, sin cuya cooperación la parte práctica del experimento no habría sido posible. Además, debo destacar el acompañamiento de mis colegas: Ing. Ronny Cortés Paniagua y el Ing. Romel Vega Obando, quienes con sus contribuciones, apertura y disponibilidad en el Laboratorio de Controladores Biológicos dieron validez a esta investigación, además al asistente de laboratorio Claudio Orozco Solano quien con su experiencia permitió la fácil identificación de muchos microorganismos.

Al Dr. Miguel Rojas Chávez por su valiosa participación como lector de esta documento.

Sin la participación de cada uno y una de ustedes esta espora jamás hubiese germinado.

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>ACREDITACIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>5</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>6</b>
<b>INDICE GENERAL</b> .....	<b>7</b>
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	<b>9</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
A. <b>MICROORGANISMOS EFICIENTES Ó “EFFECTIVE MICROORGANISMS”</b> .....	<b>20</b>
B. <b>CULTIVO Y EXTRACCIÓN DE MEM</b> .....	<b>24</b>
C. <b>EL PROCESO DE COMPOSTAJE</b> .....	<b>25</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>28</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>28</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
A. <b>MUESTRAS</b> .....	<b>29</b>
B. <b>CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA</b> .....	<b>30</b>
C. <b>REPRODUCCIÓN DE LOS MEM</b> .....	<b>30</b>
D. <b>MANEJO DE DESECHOS DE COCINA</b> .....	<b>31</b>
E. <b>MEDICIÓN Y ESTIMACIÓN DE VARIABLES</b> .....	<b>33</b>

<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
A. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA .....	34
B. MANEJO DE DESECHOS DE COCINA .....	39
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
A. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS LOTES .....	47
B. MANEJO DE DESECHOS DE COCINA .....	50
C. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS TRATAMIENTOS .....	54
D. OTRAS VARIABLES.....	56
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>57</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>58</b>
<b>LITERATURA CONSULTADA</b> .....	<b>59</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>66</b>
ANEXO 1 .....	66
ANEXO 2 .....	69
ANEXO 3 .....	70
<b>APÉNDICES</b> .....	<b>73</b>
APÉNDICE 1 .....	73



## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Materiales a utilizar para la reproducción de MEM procedentes de La Chinchilla y Cedral .....	31
Cuadro 2. Tratamientos utilizados en la elaboración de compost mediante MEM .....	32
Cuadro 3. Resumen de los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos aplicados a los lotes .....	36
Cuadro 4. Medición de variables de a los 21 días de montados los tratamientos .....	39
Cuadro 5. Resumen de los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos aplicados a los tres mejores tratamientos .....	44
Cuadro 6. Valores de pH de los lixiviados generados por los tratamientos a cada semana del experimento durante las tres mediciones correspondientes .....	46
Cuadro 7. Tipos de medios de cultivo utilizados para el análisis biológico de microorganismos .....	67

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis microbiológicos de los diferentes lotes .....	35
Figura 2. Tinciones de Gram visualizadas a 100X .....	38
Figura 3. Fotografías de los 10 tratamientos a los 21 días .....	41
Figura 4. Análisis microbiológico de los tres mejores tratamientos .....	43
Figura 5. <i>Oidiodendron</i> sp. 40 X. Micelio y esporas .....	45
Figura 6. Proceso de montaje de los Lotes .....	73
Figura 7. Proceso de montaje de los tratamientos .....	74
Figura 8. Comparación entre los lixiviados de los tratamientos .....	75

## INTRODUCCIÓN

Durante siglos, uno de los problemas más constantes que el ser humano ha enfrentado es el dilema de cómo disponer de la basura que genera. Para el próximo siglo se espera el incremento de la población mundial en unos diez billones, por lo que nunca antes en la historia el tema del depósito de la basura ha ejercido tanta presión (Freitag, 2000).

La basura orgánica generada por la producción animal, agrícola, marina, industrial, así como la basura municipal, se ha convertido en la principal fuente de contaminación tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Higa & Farr, *sf*).

Solo en La Unión Europea la producción anual de basura ronda las 3.5 toneladas per cápita. A parte, unas  $700 \times 10^6$  toneladas de basura agrícola incrementan la magnitud del problema. Un alto porcentaje de la basura producida es incinerada o utilizada como material de relleno, dando consecuencias ambientales que arriesgan los ecosistemas y la salud humana, aunado a la expulsión de gases de efecto invernadero (European Commission, 2006; Domene, 2007).

Para el 2005, la Comisión Europea estimó que 4.5 millones de toneladas de basura semisólida o “sludge” fueron aplicadas en los suelos. De esa cifra, alrededor del 90% de los desechos agrícolas fueron compostados, predominantemente de excretas animales, desechos de comida, aguas de cañería y basura semisólida de papel (European Commission, 2006; Domene, 2007).

Sin embargo, en nuestro país la tecnología de manejo de desechos sólidos es casi inexistente, sumado a una carente voluntad municipal para resolver el apremiante dilema de la basura. Para el 2009, el Ministerio de Salud estimó que diariamente se producen 11.000 toneladas de desperdicios, de las cuales el 80% pudieron haberse reciclado o reutilizado. No está claro cuánto porcentaje de la basura total generada en Costa Rica está constituido por desechos orgánicos, sin embargo, un estimado podría ser de un 30 a un 70%.

Este panorama expone la inminencia de que la sociedad encuentre nuevas maneras no solo para reducir, reutilizar y reciclar los desechos, sino también detoxificar las aguas contaminadas, suelos, y el medioambiente.

La respuesta podría encontrarse en el adoptado y ampliamente difundido uso de Microorganismos Eficientes (ME), para descontaminar los campos, purificar el medioambiente y promover una alta sostenibilidad. Pues, además de acortar ciclos agrícolas, es un método de tratamiento de desechos orgánicos mundialmente validado (Freitag, 2000).

Como es sabido, la basura orgánica, incluyendo las excretas de animales, los residuos de las cosechas, los lixiviados orgánicos, la basura municipal (compostada o no compostada), contienen sus propias poblaciones de microorganismos que a menudo poseen amplias capacidades fisiológicas. Aquellos microorganismos que tienen una utilización benéfica, para el ser humano o sus sistemas productivos, son llamados EM “Effective Microorganisms” (Higa & Farr, *sf*). Por su parte, aquellos que se extraen de zonas boscosas pueden ser llamados Microorganismos de Montaña activados (MM) (Referencia personal<sup>1</sup>, 2009). En este estudio se le llamarán Microorganismos Eficientes de Montaña (o sus siglas MEM).

Se puede tener acceso a los MEM recolectando y multiplicando dichos microorganismos descomponedores y fermentadores presentes en los bosques o zonas de vida diversas. Estos microorganismos una vez colectados, se colocan en un sustrato rico en nutrientes, con humedad adecuada y en condiciones anaeróbicas para lograr su multiplicación masiva y poder utilizarlos en la solución de múltiples problemas ambientales (Pacheco, *sf*).

Los Microorganismos de Montaña activados constituyen un producto que respeta la ecología microbiana de los sistemas de producción agrícola, debido a que la producción de MM se realiza en el área de aplicación, por lo tanto los microorganismos colectados son los que se encuentran presentes en la misma biorregión donde serán aplicados (Pacheco, *sf*).

Inicialmente, los EM fueron desarrollados y usados como un inoculante para reacondicionar los suelos productores de granos, vegetales y frutales. Posteriormente, las investigaciones llevadas a cabo demostraron que su efectividad alcanzaba al manejo y control de los microorganismos en los más complejos y diversos sistemas ecológicos, ejerciendo una gran influencia en la calidad química y biológica de procesos naturales tales como putrefacción, fermentación, enfermedades y oxidación (Higa, 1993).

A mediados de los años 80, las investigaciones llevadas a cabo con animales, permitieron comprobar la eficacia de los ME como desodorizantes y control de residuos orgánicos. Los ME han sido encontrados sumamente efectivos como probióticos y como agentes de control biológico. Una de los más importantes resultados de los ME como desodorizante se obtuvo en el manejo de corrales para aves, eliminando los olores a través del control microbiano efectuado con microorganismos productores de fermentación que evitaron la formación de gases olorosos (Raut, 2007).

Por otra parte, la tecnología de los ME puede tener muchas otras aplicaciones que incluyen: ganadería, jardinería y paisajismo, biorremediación, limpieza de tanques sépticos, y usos domésticos, además de compostaje en general (Szymanski & Patterson, 2003).

Costa Rica posee el 5% de la diversidad biológica mundial, a pesar de que su tamaño es el 0,01 por ciento de la superficie de la Tierra (Barrantes, 2000), la viabilidad para el estudio, producción y utilización de los Microorganismos Eficientes (ME) es de gran amplitud.

Se estima que el 99 % de los microorganismos en Costa Rica no han podido ser caracterizados (Inbio, 2009). Es entonces cuando la bioprospección se vislumbra como una importante y efectiva herramienta biotecnológica, con la cual enfrentar los problemas ambientales que están deteriorando el planeta Tierra y la calidad de vida de sus habitantes.

La presente investigación se planteó la hipótesis de comprobar la efectividad de los Microorganismos Eficientes de Montaña para el reciclaje de la basura de cocina, obteniendo además el beneficio de generar insumos agrícolas con una mínima inversión, y aminorando problemáticas como olores desagradables, contaminación de depósitos acuíferos por lixiviados y proliferación de organismos patógenos. En este estudio no solo se les dará a los MEM un uso como degradadores de desechos orgánicos domésticos, sino también buscará la caracterización morfológica de algunas especies causantes del efecto de descomposición y de las propiedades beneficiosas que aportan los MEM.

Se ha seleccionado para la realización de este proyecto al Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica del INA, pues tal institución ha alcanzado amplios resultados en biotecnología, entre ellos en controladores biológicos, aplicación de metabolitos secundarios de plantas medicinales, producción de biogás e insumos agrícolas. Por otro lado, se han generado estudios específicos sobre la capacidad de los MEM para el reciclaje de desechos de cocina obteniendo un precompost en dos a tres semanas, sin la presencia de moscas y olores desagradables (Referencia personal, 2009).

Este trabajo constó de las siguientes actividades: 1) Estudio microbiológico de la hojarasca en su estado natural, 2) Reproducción de los microorganismos presentes en la hojarasca con una variante en el medio de cultivo (con carbón o sin carbón), 3) Análisis microbiológico de los diferentes lotes de MEM, 4) Aplicación de los MEM en la degradación de desechos orgánicos de cocina, bajo dos condiciones: aerobiosis y anaerobiosis, 5) El análisis microbiológico de los tres mejores tratamientos para el manejo de olores.

La sencillez de esta técnica de cultivo de MEM permite plantear la siguiente conjetura: si esta tecnología se pudiera maximizar, al grado de que cada individuo manejara los desechos orgánicos que genera en su propia casa, con materiales de bajísimo costo económico, encontrando fácilmente la fuente de microorganismos, y que esto además le aporte un abono orgánico para sus plantas, aminorando el uso de agroquímicos, el impacto positivo sobre la salubridad nacional y sobre el manejo de la basura sería indiscutible.



## JUSTIFICACIÓN

Para comprender la magnitud del problema que conlleva el inadecuado manejo de desechos sólidos, a continuación se hará una revisión de información sobre el impacto negativo que provoca en el equilibrio ecológico.

De acuerdo a una proyección de las Naciones Unidas para el 2025 el 67% de la contaminación mundial residirá en áreas urbanas, comparado con el 50% reportado en el 1995 (UNFPA, 1996). En los países europeos, la producción promedio de basura fue de alrededor 3 a 5 Kg per cápita para 1996. En los países industrializados las cantidades de basura fueron más reducidas, rondando de 1 a 1,5 kg diarios (Holmer *et al.*, 1997).

Para 1996, se estimó que el porcentaje de materiales orgánicos en la basura de las ciudades en países desarrollados sobrepasó el 80% (Katzir, 1996), los cuales podrían ser usados para la producción de fertilizantes orgánicos si se tuviera a disponibilidad las tecnologías apropiadas (Holmer *et al.*, 1997). Sin embargo, la cantidad de basura orgánica presente en los desechos de los botaderos dependerá de diversos factores, por lo que se estima que el contenido de basura puede rondar del 30 % al 70%.

El estado de la basura en los Estados Unidos para el 2006 reportó que se generó un estimado de 413, 014,732 toneladas de desechos municipales (en 50 estados y el Distrito de Columbia). Tal estimado fue de basura sólida municipal, la reciclada/compostada, la incinerada y la depositada en rellenos sanitarios. Los 413 millones de toneladas reflejan un incremento de 25 millones en desechos sólidos entre el 2006 y el 2008. La generación per cápita fue de 1.38 toneladas por año, más alto que 1.3 toneladas por persona reportadas para el 2006 (Arsova *et al.*, 2008).

El compostaje de desechos domésticos orgánicos *in situ* se ha convertido en una verdadera alternativa para resolver el vasto problema de los desechos en las áreas urbanas (Pacheco, 2009). El manejo de los desechos sólidos se resume a un ciclo que comienza con su generación y acumulación temporal, continuando con su recolección, transporte y transferencia y termina con la acumulación final de los mismos. Es a partir de esta acumulación cuando comienzan los verdaderos problemas ecológicos, ya que los basureros se convierten en focos permanentes de contaminación (Méndez *et al.*, 2002).

Los basureros causan problemas ambientales que afectan el suelo, el agua y el aire, la capa vegetal originaria de la zona desaparece, hay una erosión del suelo y contaminación la atmósfera con materiales inertes y microorganismos. Con el tiempo, alguna parte de ellos se irán descomponiendo y darán lugar a nuevos componentes químicos que provocarán la contaminación del medio, y harán que el suelo pierda muchas de sus propiedades originales, como su friabilidad, textura, porosidad, permeabilidad, intercambio catiónico, concentración de macro y micronutrientes (Méndez *et al.*, 2002).

Los residuos de la descomposición orgánica son principalmente el biogás y los lixiviados. En la elaboración de biogás intervienen hongos y bacterias aeróbicas cuyos subproductos finales son el bióxido de carbono, el amoníaco y el agua. Durante el proceso, se produce una cantidad considerable de gas metano, además de bióxido de carbono y etano, propano, fosfina, ácido sulfhídrico, nitrógeno y óxidos nitrosos, todos estos compuestos son altamente tóxicos para la vegetación y otros organismos (Pacheco, 2009).

También los lixiviados pueden tener un movimiento vertical, que penetre el subsuelo y en muchas ocasiones, alcance los mantos freáticos y acuíferos, lo que causa grandes problemas de contaminación del agua subterránea, principal fuente de abastecimiento de agua potable en nuestras ciudades. Los lixiviados propician un pH de 9 y la presencia de una gran cantidad de sales, lo que se refleja en una alta conductividad, en ausencia de oxígeno y en alto contenido de metales pesados, como el cadmio, cromo, cobre, fierro, plomo y zinc cuyas concentraciones rebasan los límites de toxicidad (AM & C, *sf.*, Pellini, L., *sf.*).

Tomando en cuenta que en nuestro país el problema de la basura no está siendo abordado debidamente por las autoridades competentes, el presente proyecto aplicado a gran escala podría representar una solución concreta y viable para hacer frente a la problemática en el ámbito de los desechos orgánicos en Costa Rica.

Tal objetivo es posible de cumplir apegándose a proyectos ya consolidados, por ejemplo, el realizado por la Mancomunidad de Pamplona, quienes han implementando un programa para sumar familias en el manejo de sus desechos orgánicos. Parte de su estrategia se ha basado en distribuir diferentes modelos de unidades para el compostaje a las familias interesadas en este tipo de práctica de manejo residuos orgánicos en sus hogares (Pacheco, 2009).

## REVISIÓN DE LITERATURA

### ***a. Microorganismos Eficientes o “Effective Microorganisms”***

Los ME (o EM, por sus siglas en inglés) fueron descubiertos por el Dr. Teruo Higa, un microbiólogo y agricultor orgánico de la Universidad de el Ryukyus en Okinawa, Japón, quien hizo una observación accidental mientras buscaba los variados aspectos benéficos de aislar cepas de microorganismos en la composición del suelo y el crecimiento de las plantas.

En 1982, él descubrió que cuando se combinaba en un estado de balance, ciertas mezclas de microorganismos benéficos promovían “un crecimiento saludable de las plantas resultando en cosechas más abundantes y de mejor sabor. Después de meses de probar dichas mezclas en plantaciones de naranjas mandarina con resultados enteramente positivos, el Dr. Higa estuvo seguro de que había hecho un descubrimiento asombroso (Higa, 1993).

Los ME consisten de una mezcla de varios microorganismos benéficos, tanto aeróbicos como anaeróbicos que tienen diferentes funciones (Villagra *et al.*, 2006). Tales cepas de microorganismos se encuentran naturalmente se en suelos no intervenidos por el ser humano (Higa, 1993).

La utilización de preparados microbianos como aceleradores de la degradación de materia orgánica en el compostaje es una práctica que viene siendo implementada en diversos sistemas agropecuarios alrededor del mundo. Incluso existen diversas marcas comerciales registradas como el EM® las cuales se venden a nivel internacional para acelerar procesos de compostaje y reducir los problemas de mal olor en sistemas agropecuarios o en el manejo de desechos orgánicos en general (Pacheco, 2009).

Aún no se comprende bien el desempeño y paradero final de los microorganismos en la mayoría de estos aditivos. Por lo tanto, es importante realizar esfuerzos en comprender las formas y mecanismos en que se pueda maximizar la eficacia de los inóculos microbianos una vez que son utilizados en campo así como poder cuantificar su grado de eficacia a la hora de ser utilizados (Pacheco, 2009).

Algunos estudios reflejan que el destino de los microorganismos inoculados procedentes de productos comerciales en composteras, muchas veces no corresponden a los microorganismos que realmente intervienen en el proceso de compostaje (Shiho *et al.*, 2008).

En el campo de inóculos o aceleradores microbiológicos en América Latina se ha venido desarrollando un tipo de producto casero denominado como Microorganismos de Montaña Activados (MM). La producción del inóculo se basa en la colecta de sustratos que estén siendo degradados por microorganismos en ecosistemas silvestres (hojarasca de la montaña) para posteriormente colocarlos en un determinado medio que proporcione una elevada y diversa calidad nutricional para su multiplicación y posterior utilización como inóculo (Pacheco, 2009).

Los EM utilizan ciertos mecanismos para interactuar con el medio ambiente del complejo suelo-planta. Se establece que los materiales orgánicos adicionados al suelo permanecen aún luego de la descomposición por microorganismos, y los minerales (nutrientes) son liberados y se vuelven disponibles para las plantas. La materia orgánica es fermentada por especies acidolácticas, esto convierte los aminoácidos y sacáridos a compuestos orgánicos solubles que son absorbidos intactos por las plantas para ser utilizados favorablemente en varias rutas metabólicas (Higa & Wididana, 1991).

Por otra parte, se sugiere que los microorganismos en el suelo son importantes degradadores de materiales orgánicos, y reciclan sus nutrientes inorgánicos para las plantas. A menudo, la productividad de los suelos disminuye conforme disminuye la cantidad de materia orgánica presente. Cuando esto pasa, la población microbiana total y su biodiversidad tienden a desaparecer (Higa & Wididana, 1991).

Las especies de EM incluyen poblaciones predominantes de bacterias acidolácticas (*Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *Streptococcus lactis*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*), bacterias fotosintéticas (*Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter spaeroides*), actinomicetes (*Streptomyces albus*, *S. griseus*), hongos fermentativos (*Aspergillus oryzae*, *Mucor hiemalis*) y otros tipos de microorganismos. Todos ellos son mutuamente compatibles entre sí y pueden coexistir en un cultivo mixto (Higa & Farr, *sf*; Szymanski & Patterson, 2003; Diver, 2001).

Debido a la habilidad de los microorganismos para antioxidar los sistemas radiculares y purificar los suelos tóxicos, creciendo en suelos inoculados en abundancia con EM, las plantas pueden enfocar su energía en un desarrollo saludable, más que en la defensa contra patógenos, producción de frutas y vegetales de la más alta calidad y mejor sabor (Freitag, 2000; Higa, 1993). Además, pueden inoculados para cambiar el equilibrio microbiológico, físico y químico del suelo (Correa, 2001).

También, se ha encontrado que los EM sirven para la disminución de la frecuencia de enfermedades de los animales y reducción del estrés en el ganado. Indistintamente, puede mejorar la eficiencia alimenticia, así como la calidad de las pasturas, heno y ensilaje, mejorando la productividad de los animales (Gallo y Mera, 2001; Villagra *et al.*, 2006).

### ***b. Cultivo y extracción de los MEM***

Los EM se pueden obtener o cultivar de dos maneras. La primera es en forma líquida, los Microorganismos Efectivos se hacen crecer en una solución con un pH de 3.5, que se obtiene bajo un tratamiento a alta presión por la interacción de un grupo muy diverso de microorganismos aeróbicos y anaeróbicos que se encuentran en el medio ambiente en forma natural. Ellos incluyen altas concentraciones de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* y *Pedicoccus*), levaduras (Sacaromicetes) y menores concentraciones de bacterias fotosintéticas, actinomicetes y otros organismos naturales (Guim *et al.*, 1995).

La segunda es en forma sólida (el medio de cultivo es la hojarasca de bosque) y consiste en una mezcla simbiótica de microorganismos encontrados en suelos poco alterados, como la montaña. Los primeros grupos activos son un grupo de bacterias fotosintéticas, las cuales cuando se alimentan de una dieta simple de melaza y humedad, producen un lixiviado de un alto poder nutritivo (Freitag, 2000).

El principio básico es que cuando los MEM se introducen dentro de un ambiente de biodegradación anaerobia, ellos rápidamente degradan la contaminación metanógena y tóxica (Freitag, 2000).

Ambas formas de aplicación de los Microorganismos Eficientes pueden acelerar el proceso de descomposición de los desperdicios de cocina (Anexo 3) (Referencia personal<sub>1</sub>, 2009).



### ***c. El proceso de compostaje***

El compostaje bajo condiciones naturales es básicamente un proceso para la descomposición de desechos sólidos orgánicos (Holmer *et al.*, 1997; Airan & Bell, 1980). La descomposición es completada por varios microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y actinomicetes. En el proceso de compostaje los microorganismos descomponen la materia orgánica y producen dióxido de carbono, agua, y un producto orgánico final relativamente estable (Holmer *et al.*, 1997; Rynk *et al.*, 1992).

El compostaje normal o natural puede acelerarse adicionando ciertas fuentes de energía a los desechos y dando condiciones adecuadas de humedad. Debido a ello, el proceso de compostaje pasa a través de cuatro fases: la fase mesófila, la fase termófila, la fase de enfriamiento y la fase final o de maduración (Tuomela *et al.*, 2000; Holmer *et al.*, 1997).

No obstante, la degradación utilizando microorganismos eficientes carece de la fase termófila, pues la descomposición de los desechos se da por la acción de microorganismos mesófilos (temperaturas menores de 45°), por lo que se le llama un proceso de precompostado. Los desechos tratados a este nivel pueden ser adicionados a otros tipos de abonos orgánicos, por ejemplo, vermicompost, bokashi, compost casero, entre otros, donde se concluya su biodegradación (Referencia personal<sub>1</sub>, 2009).

Factores importantes en el proceso de biodegradación por composteo son la humedad y el pH. La literatura reporta que el contenido de humedad para un proceso adecuado de compostaje debe variar en un rango de 45 a 70% (Díaz *et al.*, 1996; Sauri *et al.*, 2002). Por su parte, un pH entre 5.5 y 8.5 es óptimo para los microorganismos responsables del compostaje. Como las bacterias y hongos digieren materia orgánica se producen ácidos orgánicos (Holmer *et al.*, 1997; De Bertoldi *et al.*, 1989).

En etapas avanzadas del compost, esos ácidos a menudo son acumulados acidificando el medio (Holmer *et al.*, 1997; De Bertoldi *et al.*, 1989). Si el sistema se vuelve anaeróbico, sin embargo, los ácidos acumulados pueden alcanzar pH más bajos de 4.5 limitando muchas veces la actividad microbiana (Holmer *et al.*, 1997; De Bertoldi *et al.*, 1989).

Sin embargo, el factor más importante en la degradación de la materia orgánica en el proceso del compostaje son las comunidades microbianas. A través de diferentes tipos de enzimas hidrolíticas, los microorganismos realizan la degradación de materiales orgánicos. Se cree que diversas enzimas hidrolíticas controlan parte de la velocidad a la que los sustratos orgánicos son degradados (Pacheco, 2009). Dentro de las enzimas más importantes que intervienen en el proceso de degradación de la materia orgánica, Mondini *et al.* (2004), menciona a las celulasas, despolimerasa celulasa, B-glucosidasa que hidroliza glucósidos, ureasa que participan en la mineralización del Nitrógeno, fosfatasas y arilsulfatasa que eliminan respectivamente los grupos fosfato y sulfato de los compuestos orgánicos.

En sus estudios iniciales, el Dr. Higa (1982) halló que las pilas de compost mezclado con EM y expuesto a condiciones anaeróbicas no producía olores ofensivos o dañinos y descomponía rápidamente, generando un compost rico en nutrientes, el cual orientado a la agricultura orgánica produjo resultados maravillosos (Higa, 1993).

## **OBJETIVO GENERAL**

Manejar desechos sólidos por medio del precompostaje de desperdicios domésticos (de cocina), utilizando Microorganismos Eficientes de Montaña con el fin de producir un insumo orgánico de reducido costo económico y ambiental.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Aislar, cultivar y caracterizar microbiológicamente Microorganismos Eficientes de Montaña provenientes de dos zonas geográficas de Costa Rica con alta biodiversidad (Bosque secundario).
  
- ✓ Manejar desechos orgánicos de cocina utilizando MEM para generar material orgánico precompostado.

## MATERIALES Y MÉTODO

La presente investigación se realizó en el Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica del Instituto Nacional de Aprendizaje, ubicado en La Chinchilla de Oreamuno, Cartago. Los análisis microbiológicos fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Controladores Biológicos del CNEAO.

El experimento tuvo una duración de cuatro meses, de agosto a noviembre de 2009.

### ***a. Muestras***

Las muestras estuvieron constituidas por hojarasca de montaña de dos zonas catalogadas como Bosque Secundario. Se recolectó hojarasca y humus de lugares no transitados.

La primera recolección se realizó en las inmediaciones del Río La Chinchilla que cruza el CNEAO (Oreamuno, Cartago) (09°59' 54 " latitud norte y 83°52' 28" longitud oeste), la segunda recolecta se hizo en una finca privada ubicada en Cedral Abajo de Aserrí, San José (09°44' 50" latitud norte y 84°08' 43" longitud oeste).

### ***b. Caracterización microbiológica***

A la hojarasca se le realizó un análisis microbiológico por triplicado, utilizando el protocolo comúnmente usado en el Laboratorio de Controladores Biológicos (CNEAO) (Anexos 1 y 2).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de los platos, se procedió a aislar aquellas colonias bacterianas que presentaban un crecimiento diferenciado y se les realizó una tinción de Gram (Anexo 2).

### ***c. Reproducción de los MEM***

Seguidamente, se procedió a cultivar y reproducir los MEM de las dos procedencias, para lo cual se escogieron dos medios de crecimiento:

A) Semolina y melaza diluida en agua.

B) Semolina, melaza diluida en agua y carbón.

La hojarasca fue mezclada con las fuentes de energía según correspondiera, y fueron llevadas a una humedad del 35% (Cuadro 1). Se almacenaron los cuatro lotes en estañones bajo condiciones de anaerobiosis durante cuatro semanas.

**Cuadro 1. Materiales utilizados para la reproducción de MEM procedentes de La Chinchilla y Cidral.**

<b>MATERIALES</b>	<b>CANTIDAD/LOTE</b>	<b>TOTAL</b>
Hojarasca	1 saco <sup>1</sup>	4 sacos (2 de cada sitio) <sup>1</sup>
Semolina	½ saco	2 sacos
Carbón	¼ saco	½ saco (para el medio B)
Melaza	2 L diluidos en agua	8 L diluidos en agua

Fuente: CNEAO-INA, 2009.

Una vez obtenidos los MEM activados en la materia orgánica parcialmente descompuesta, se le aplicó el mismo análisis microbiológico (Anexos 1 y 2).

***d. Manejo de desechos de cocina***

Desperdicios orgánicos provenientes de la soda-comedor del ITCR fueron compostados mediante los MEM previamente cultivados. Para esto se cortaron los desechos orgánicos recolectados el mismo día y se mezclaron bien.

En recipientes cilíndricos se vertieron los desperdicios de cocina y se les agregó MEM en relación 2:1. Disponiendo de un balde testigo, al que no se

---

<sup>1</sup> Se manejó un parámetro de volumen de los materiales en sacos que al estar vacíos tuvieran dimensiones de 58 cm de ancho por 90 cm de alto.

le adicionó MEM, solamente los desperdicios. Dividiendo las cubetas según su origen y condiciones de presencia y ausencia de oxígeno (Cuadro 2).

Los baldes fueron pesados con una balanza y se obtuvo el promedio de la masa en gramos.

**Cuadro 2. Tratamientos utilizados en la elaboración de precompost mediante MEM (CNEAO-INA, 2009).**

TRATAMIENTO	COMPOSICIÓN	CONDICIONES
1	Desperdicios (testigo)	Anaeróbicas
2	Desperdicios + ME-Chinchilla	Anaeróbicas
3	Desperdicios + MEM-Chinchilla + Carbón	Anaeróbicas
4	Desperdicios + MEM-Cedral	Anaeróbicas
5	Desperdicios + MEM-Cedral + Carbón	Anaeróbicas
6	Desperdicios (testigo)	Aeróbicas
7	Desperdicios + MEM-Chinchilla	Aeróbicas
8	Desperdicios + MEM-Chinchilla + Carbón	Aeróbicas
9	Desperdicios + MEM-Cedral	Aeróbicas
10	Desperdicios + MEM-Cedral + Carbón	Aeróbicas

Fuente: CNEAO-INA, 2009.



### ***e. Medición y estimación de variables***

Las variables consideradas para determinar un adecuado manejo de desechos sólidos fueron: olor, tamaño de las partículas, humedad, coloración, masa (Kg). Tales variables fueron medidas a los 21 días luego de montados los tratamientos.

Además, a los lixiviados recogidos de cada tratamiento se le realizaron mediciones de acidez cada siete días, utilizando papel indicador de pH universal. Finalmente, al compost obtenido de cada tratamiento se le aplicó una caracterización microbiana (Anexos 1 y 2).

## RESULTADOS

### ***a. Caracterización microbiológica***

Los lotes analizados microbiológicamente estuvieron constituidos de la siguiente manera:

Lote 1: Hojarasca de La Chinchilla.

Lote 2: Hojarasca de Cedral.

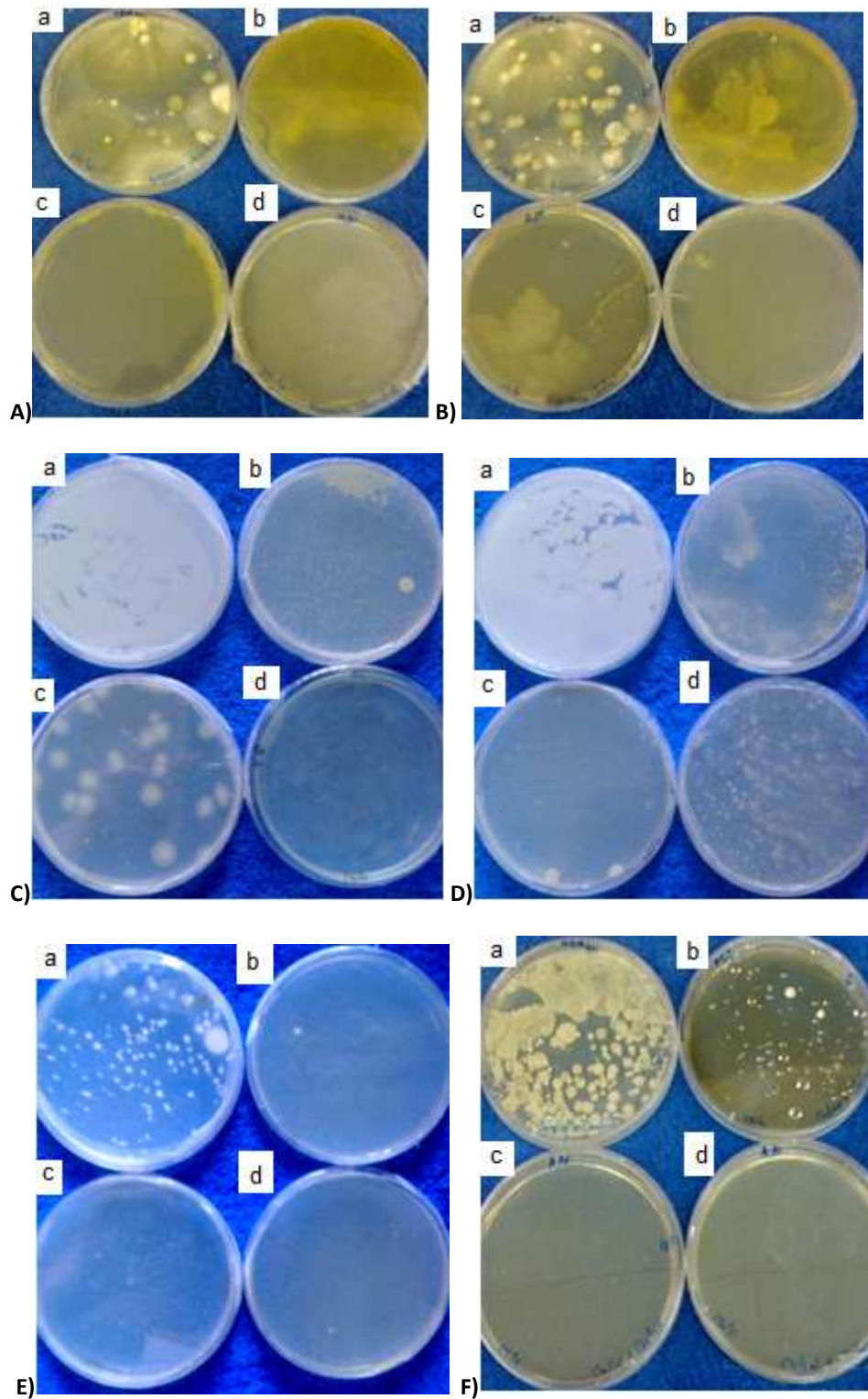
Lote 3: Hojarasca de la Chinchilla+ melaza y semolina.

Lote 4: Hojarasca de Cedral + melaza y semolina.

Lote 5: Hojarasca de la Chinchilla+ melaza y semolina + Carbón.

Lote 6: Hojarasca de la Chinchilla+ melaza y semolina + Carbón.

En la figura 1 se observa el crecimiento microbiano obtenido en los diferentes medios de cultivo selectivos según el lote de hojarasca cultivado. Los lotes corresponden a: A) Lote 1. B) Lote 2. C) Lote 3. D) Lote 4. E) Lote 5. F) Lote 6.



**Figura 1. Análisis microbiológicos de los diferentes lotes. Definiendo el orden de las placas siguiente: a. PDA acidificado, crecimiento de levaduras y hongos. b. Agar Actinomycte, crecimiento de actinomicetes. c. Agar Nutritivo, crecimiento de bacterias aeróbicas. d. Agar Nutritivo, crecimiento de bacterias anaeróbicas.**

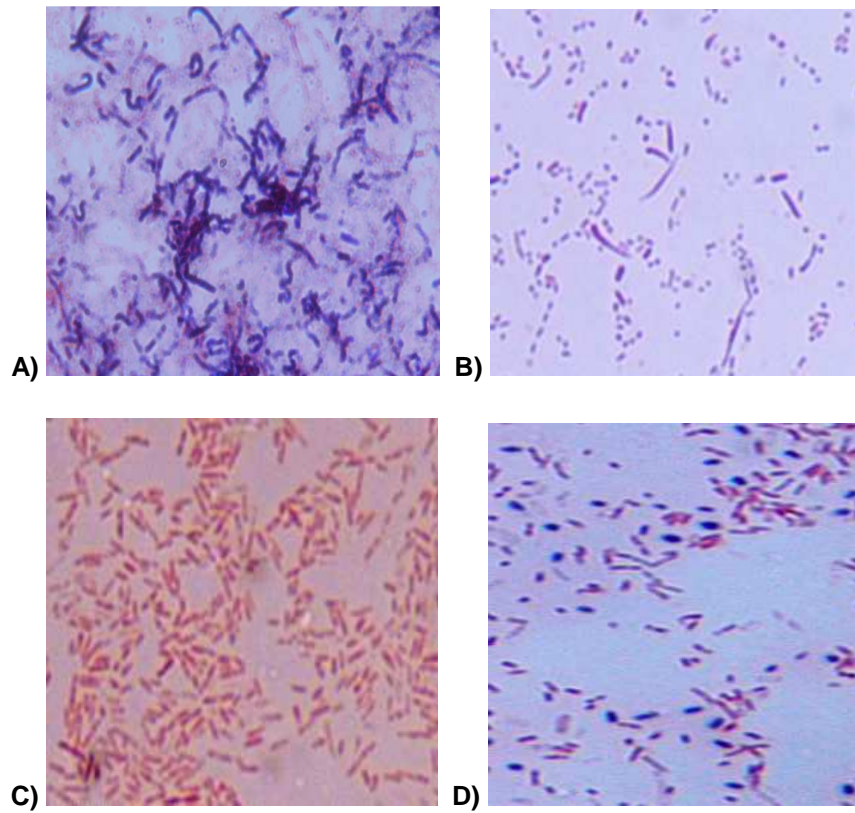
En el cuadro 3 se resumen los resultados de los análisis microbiológicos realizados a los diferentes lotes de hojarasca evaluados.

**Cuadro 3. Resumen de los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos aplicados a los lotes.**

MEDIO SELECTIVO PARA:	LOTE	CRECIMIENTO	CARACTERÍSTICAS	MORFOLOGÍA MICROBIANA
<b>Hongos levaduras</b>	y 1	29,5*10 <sup>3</sup> UFC/g de sustrato	Posible presencia de <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Clonostachis</i>	-
	2	93,5*10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Posible presencia de <i>Penicillium</i> , <i>Rizhoctonia</i> , <i>Claudiosporum</i> , <i>Lecanicillium</i> , <i>Trichoderma</i>	-
	3	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Únicamente levaduras	-
	4	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Únicamente levaduras	-
	5	81*10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Únicamente levaduras	-
	6	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Únicamente levaduras	-
<b>Bacterias Anaerobias</b>	1	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Olor putrefacto, color blanco casi transparente	-
	2	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Olor putrefacto, color blanco casi transparente	-
	3	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Olor putrefacto	Bacilos G- Cocos G+
	4	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Olor putrefacto, color blanco casi transparente	-
	5	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Conjunto de colonias traslúcidas	-
	6	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Olor putrefacto, color blanco casi transparente	-
<b>Actinomycetes</b>	1	1*10 <sup>4</sup> UFC/g sustrato	Presencia de bacterias	-
	2	Nulo para actinomycetes	Presencia de bacterias	Cocobacilos G+ Bacilos G-

	3	Nulo para actinomycetes	Presencia de bacterias rizoides	Bacilos G-
	4	1*10 <sup>4</sup> UFC/g sustrato	Presencia de bacterias	-
	5	Nulo para actinomycetes	Presencia de bacterias	-
	6	2*10 <sup>4</sup> UFC/g sustrato	Bacterias blancas	-
<b>Bacterias Aerobias</b>	1	Confluyente >10 <sup>6</sup> UFC/g sustrato	Color blanco	Bacilos G+ Cocos G-
	2	Confluyente >10 <sup>6</sup> UFC/g sustrato	Posible <i>Bt</i> Gran variedad de colonias	Bacilos G+ Cocos G+ Bacilos G-
	3	Confluyente >10 <sup>6</sup> UFC/g sustrato	Colonias color blanco	Bacilos G- Cocobacilos G+
	4	Confluyente >10 <sup>6</sup> UFC/g sustrato	Colonias color blanco	Cocobacilos G+ Bacilos G-
	5	Confluyente >10 <sup>6</sup> UFC/g sustrato	Conjunto de colonias pequeñas traslúcidas	Cocos G-
	6	Confluyente >10 <sup>6</sup> UFC/g sustrato	Ninguna colonia sobresaliente	-

De acuerdo a la morfología macroscópica, se seleccionaron algunas colonias microbianas para ser visualizadas al microscopio por medio de una tinción de Gram, observándose principalmente cocobacilos Gram positivos y bacilos Gram negativos (Figura 2 y cuadro 3).



**Figura 2. Tinciones de Gram visualizadas a 100X: A) Posible *B. thuringiensis*. B) Bacilos Gram + y Cocos Gram +. C) Bacilos Gram-. D) Cocobacilos Gram+ y Bacilos Gram-.**

### **b. Manejo de desechos de cocina**

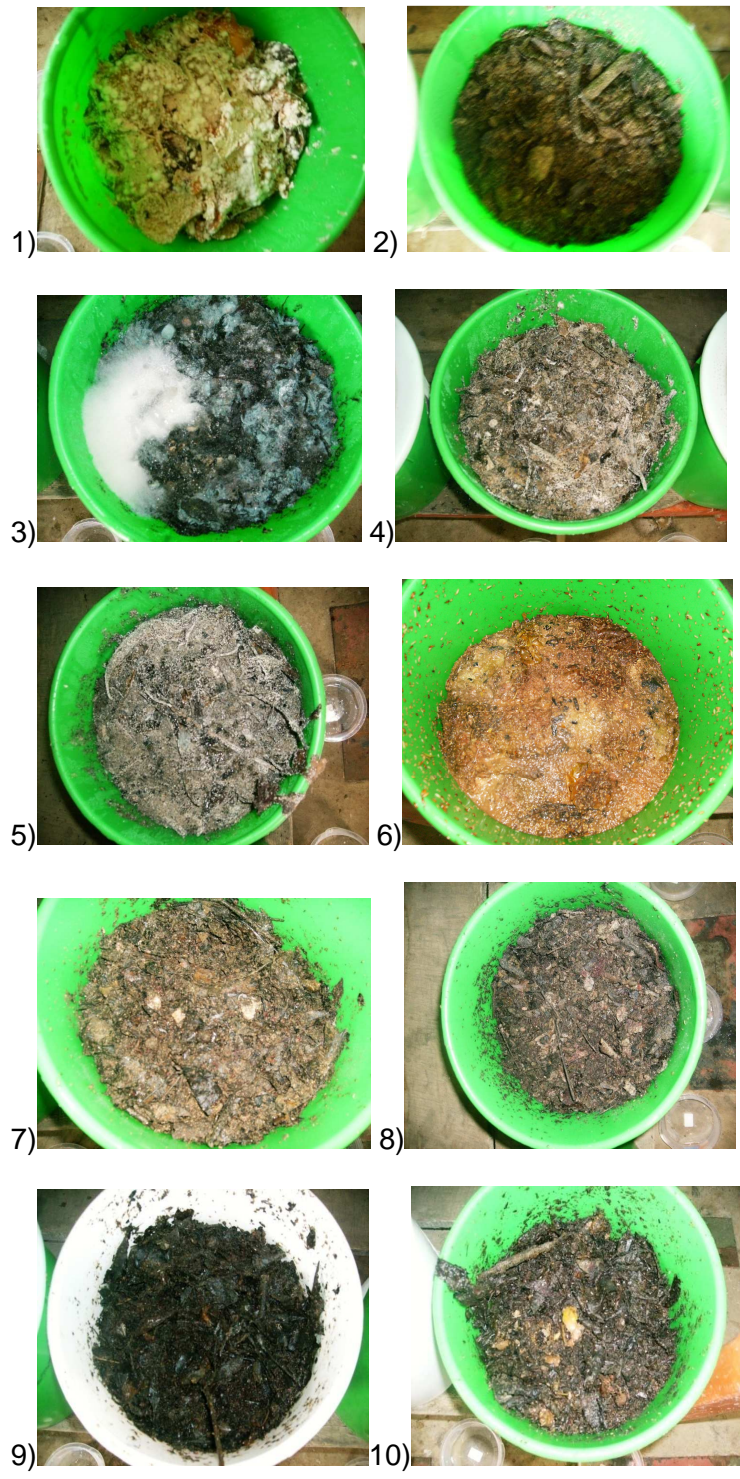
Se realizó una única medición a las tres semanas luego de montados los tratamientos, constatándose en todos ellos una reducción en la masa y en la humedad (Cuadro 4), respecto a la semana cero (masa: 7Kg, humedad: 90%).

**Cuadro 4. Medición de variables a los 21 días de montados los tratamientos.**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>OBSERVACIONES</b>	<b>MASA (KG)</b>	<b>HUMEDAD</b>
1	Mal olor a materia orgánica descompuesta. Hongos blancos de apariencia espumosa	6 kg	90%
2	Olor agradable a frutas.	5 kg	50%
3	Olor a moho, hongos grisáceos.	6 kg	65%
4	Olor a frutas más intenso, hongos pequeños blancos.	6 kg	55%
5	Olor a frutas intenso, coloración blanquecina.	6,5 kg	65%
6	Olor putrefacto, larvas blancas, insectos cafés.	5 kg	90%
7	Olor a tierra húmeda y amoníaco, libre de larvas, presencia de <i>Drosophila</i> sp	5,5 kg	75%
8	Olor a tierra húmeda, libre de larvas, presencia de <i>Drosophila</i> sp	5,5 kg	70%
9	Olor a tierra húmeda, libre de larvas, presencia de <i>Drosophila</i> sp	5 kg	75%
10	Olor a tierra húmeda, libre de larvas, presencia de <i>Drosophila</i> sp	5,5 kg	70%

En la figura 3 se puede apreciar la apariencia de los 10 diferentes tratamientos. En el tratamiento 1 (Desechos sin MEM anaeróbico), se puede observar un crecimiento de hongos blancos. El tratamiento 6 presenta en las paredes del balde huevos y larvas de moscas (Desechos sin MEM aeróbico). Estos dos tratamientos correspondieron a los testigos.





**Figura 3. Fotografías de los 10 tratamientos a los 21 días. Todos presentaron presencia de microorganismos de coloración blanquecina. El olor a frutas es característico de procesos fermentativos.**

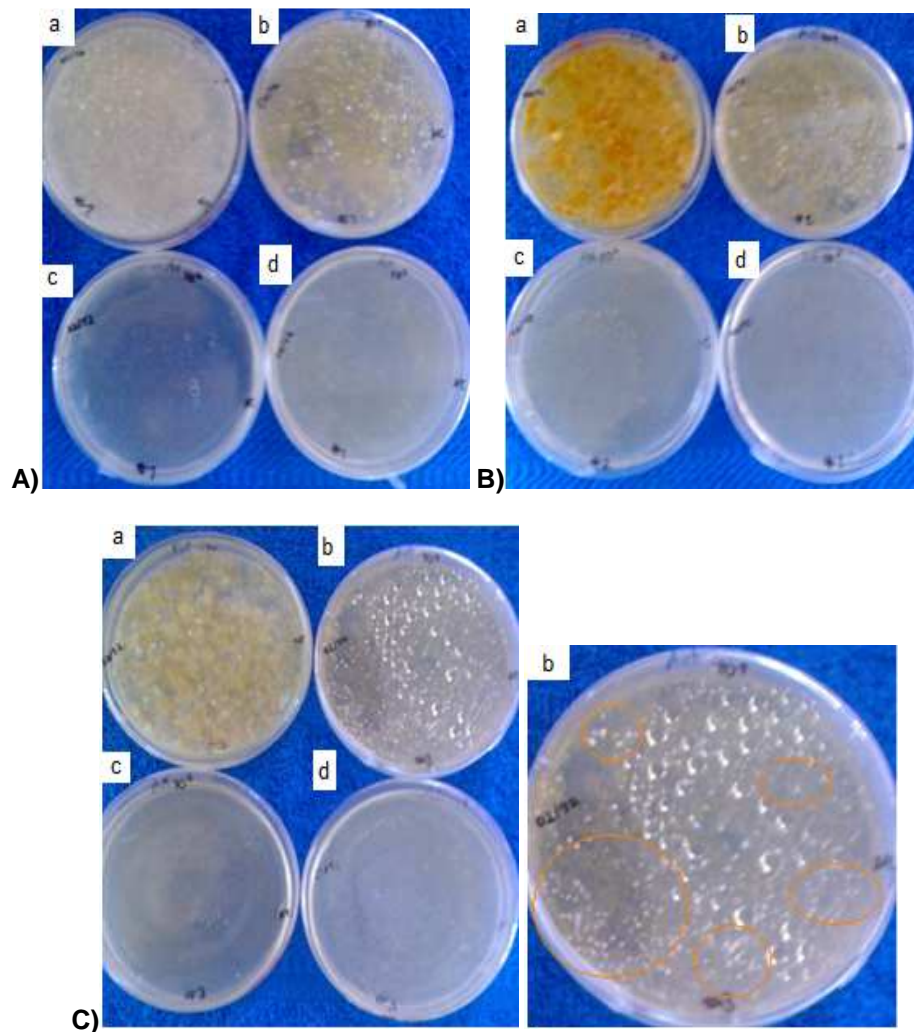
De los 10 tratamientos totales, se seleccionaron aquellos que mostraron un mejor manejo de los desechos orgánicos de cocina. Los tres mejores tratamientos según el control de olores, en orden de prioridad fueron los siguientes (Figura 3):

Tratamiento 2 (Desperdicios + MEM-Chinchilla. Condiciones anaeróbicas).

Tratamiento 4 (Desperdicios + MEM-Cedral. Condiciones anaeróbicas).

Tratamiento 7 (Desperdicios + MEM-Chinchilla. Condiciones aeróbicas).

A dichos tratamientos se les realizó un análisis microbiológico, cuyos resultados se presentan a continuación (Figura 4).



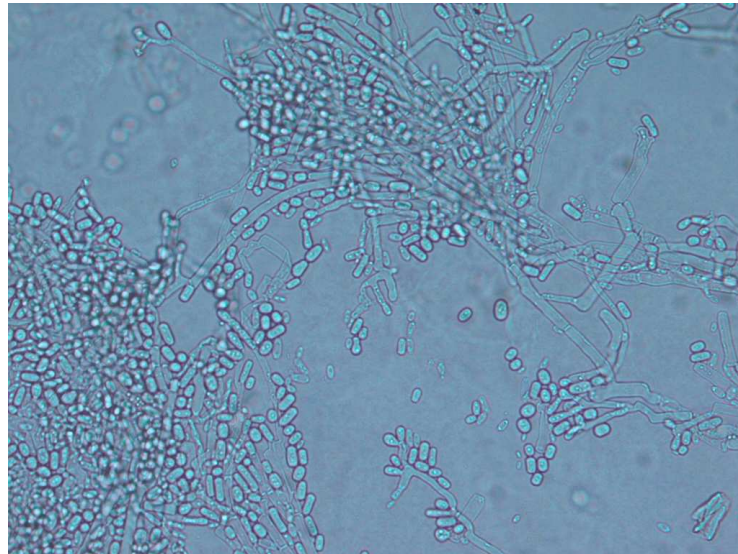
**Figura 4. Análisis microbiológico de los tres mejores tratamientos. A) Tratamiento 2. B) Tratamiento 4. C) Tratamiento 7. Detalle de los actinomicetes, se observa un crecimiento confluyente de los actinomicetes, su visibilidad se obstruye por gotas de agua condensadas en la tapa del plato Petri.**

Los detalles del estudio microbiológico de los mejores tratamientos y las comparaciones entre ellos se describen en el cuadro 5.

**Cuadro 5. Resumen de los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos aplicados a los tres mejores tratamientos.**

<b>MEDIO SELECTIVO PARA</b>	<b>LOTE</b>	<b>CRECIMIENTO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<b>Hongos y levaduras</b>	2	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Posible presencia únicamente de levaduras y <i>Oidiodendron</i> (Figura 5)
	4	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Presencia únicamente de levaduras color naranja, <i>Geotrichum</i> y <i>Oidiodendron</i>
	7	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Levaduras blancas y <i>Rhizopus</i>
<b>Bacterias Anaerobias</b>	2	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Olor putrefacto, color blanco casi transparente
	4	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Olor putrefacto, color blanco casi transparente
	7	Confluyente >10 <sup>3</sup> UFC/g sustrato	Olor putrefacto
<b>Actinomycetes</b>	2	1*10 <sup>4</sup> UFC/g sustrato	Presencia de bacterias
	4	2*10 <sup>4</sup> UFC/g sustrato	Presencia de bacterias
	7	Confluyente >10 <sup>4</sup> UFC/g sustrato	Figura 5
<b>Bacterias Aerobias</b>	2	Confluyente >10 <sup>6</sup> UFC/g sustrato	Colonias color blanco
	4	Confluyente >10 <sup>6</sup> UFC/g sustrato	Colonias color blanco
	7	Confluyente >10 <sup>6</sup> UFC/g sustrato	Colonias color blanco

En la figura 5 se puede observar el cuerpo vegetativo del hongo, a parte de sus hifas y esporas.



**Figura 5. *Oidioidendron* sp. 40 X. Micelio y esporas.**

Respecto al pH de los lixiviados, los resultados de las tres mediciones se resumieron en el cuadro siguiente (Cuadro 6). Cada una de las líneas corresponde a un tratamiento diferente. Manteniéndose únicamente para el tratamiento 3 el pH constante en 4. El tratamiento 7 se mantuvo en un rango de pH de 7 a 8. Los lixiviados de los demás tratamientos oscilaron el pH entre 4 y 5.5. El tratamiento 4 y el 6 tuvieron las mismas mediciones: 4, 5 y 5.

**Cuadro 6. Valores de pH de los lixiviados generados por los tratamientos a cada semana del experimento durante las tres mediciones correspondientes.**

	I	II	III
TRATAMIENTO	(7 DÍAS)	(14 DÍAS)	(21 DÍAS)
1	4.5	4.0	4.0
2	4.0	5.5	4.0
3	4.0	4.0	4.0
4	4.0	5.0	5.0
5	5.0	4.0	4.5
6	4.0	5.0	5.0
7	7.5	7.0	8.0
8	4.0	4.0	5.0
9	4.0	4.5	4.5
10	5.0	4.0	4.0

## DISCUSIÓN

### ***a. Caracterización microbiológica de los lotes***

Los análisis microbiológicos de las hojarasca de ambas procedencias permitieron plantear un punto de partida para observar la presencia de las poblaciones microbianas en su estado natural de bosque, pues los patrones de actividad de grupos funcionales específicos de organismos asociados a la hojarasca, descomposición de la materia orgánica y suelo (saprófitos, simbioses, nitrificantes, entre otros) constituyen una herramienta efectiva para analizar la diversidad de respuestas fisiológicas, permitiendo describir el funcionamiento del componente biótico, como una explicación causal de los flujos de nutrientes en el ecosistema (Valenzuela *et al.* 2001; Cárcamo *et al.* 2004; Rivas *et al.*, 2007).

Sin embargo, es importante rescatar que las poblaciones visualizadas son solo unas cuantas de la biodiversidad real presente en dichas muestras, debido a que muchas poblaciones microbianas no pueden crecer bajo condiciones de laboratorio. Por ello es más efectivo realizar análisis genéticos de metagenoma que permitan dilucidar más específicamente la carga biológica responsable de la descomposición de la materia orgánica.

En cuanto a la presencia de levaduras y hongos, el crecimiento de levaduras fue reducido, mientras que en hongos se vio una variedad biológica considerable en ambas muestras. De los posibles hongos encontrados *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. son saprófitos que crecen solo sobre materia orgánica en procesos fermentativos y/o de descomposición, mientras que *Fusarium* es saprófito facultativo. *Trichoderma* sp. es un controlador biológico que funge como antagonista. El posible *Lecanicillium* sp. encontrado si se tratara de *L. lecanii* podría actuar otro controlador biológico entomopatógeno, que también puede comportarse como antagonista y nematófago (Obregón, 2009). Solamente *Fusarium* sp., *Clonostachis* sp., *Rizhoctonia* sp., *Claudiosporium* sp. se consideran como patógenos de las plantas, sin embargo, *Trichoderma* sp. y *Lecanicillium* sp., pueden combatirlos (Obregón, 2009).

Con tales resultados se evidencia el equilibrio ecológico que permite un desarrollo óptimo de las plantas, ya que los Microorganismos activados constituyen un producto que respeta la ecología microbiológica de los agroecosistemas (Pacheco, sf.), donde los microorganismos controladores biológicos pueden contrarrestar los efectos nocivos de los patógenos.

Respecto al comportamiento de las bacterias anaerobias, en estos lotes se presentó un crecimiento confluyente sin diferencias visibles, por lo que no se procedió a realizar tinciones de Gram. En cuanto a las bacterias aeróbicas, se presentó más variedad en la hojarasca de Cedral. En Cedral se halló una colonia que presentaba las características morfológicas de un *Bacillus thuringiensis*, el cual actúa como un controlador biológico, siendo el entomopatógeno más utilizado contra insectos plaga del orden Lepidóptera (Carmona, 2002).



En cuanto a los actinomicetes, para ambas muestras el crecimiento fue despreciable, lo que difiere con lo reportado en la literatura, según la cual es común hallarlos en los suelos en poblaciones entre 100 - 1000 kg/Ha, tales son controladores biológicos debido a su producción de sustancias antimicrobianas que suprimen hongos dañinos y bacterias patógenas (PASE, 2007).

La confluencia en el crecimiento morfología microbianas evidencia una biodiversidad vasta, que es lo establecido como característico de los bosques secundarios donde el ser humano no ha tenido mayor influencia sobre el equilibrio ecológico (Rivas *et al.*, 2007).

Se deduce esto pues a las diluciones correspondientes se supone que se puedan contar las UFC, sin embargo, predominó el crecimiento confluyente en el 87.5 % de las placas analizadas, lo que hace ver una presencia excesiva de microorganismos, inclusive en las placas de agar actinomicete hubo confluencia de crecimiento bacteriano.

Una vez transcurrido el proceso de cultivo de los lotes 3 al 6, los análisis microbiológicos muestran diferencias considerables respecto a la hojarasca en estado natural. En todas las placas de PDA acidificado crecieron únicamente levaduras, debido a que el proceso de reproducción se da bajo condiciones de anaerobiosis y estimulado con carbohidratos principalmente, por lo que los hongos permanecen en latencia, esperando condiciones óptimas para su desarrollo (Madigan *et al.*, 1999).

Con respecto a las bacterias anaeróbicas, se presentaron diferencias solamente el tratamiento 3, cuyas tinciones resultaron evidenciar dos morfologías microbianas: bacilos Gram negativos, cocos Gram positivos. Por su parte, las bacterias aeróbicas mostraron más diversidad en la forma de la colonia en el lote 3. Sus respectivas tinciones de Gram mostraron una morfología cocobacilos Gram positivos. La misma morfología se presentó en el lote 4, pues ambos lotes proceden de la Chinchilla. Además de presencia de bacterias Gram negativas en ambos lotes. Ante la ausencia de más características diferenciantes no se puede conjeturar con certeza de cuales microorganismos se trata.

De igual manera que en los lotes 1 y 2, en el agar actinomicete de los análisis restantes el crecimiento de dichos organismos fue despreciable por su condición de aeróbicos (PASE, 2007). No obstante, se dio crecimiento de bacterias rizoides en el lote 3, las cuales son también consideradas como controladores biológicos por su generación de antibióticos (Referencia personal<sub>2</sub>, 2009).

### ***b. Manejo de desechos de cocina***

Los tratamientos se dividieron en dos condiciones, la primera con oxígeno y la segunda sin oxígeno, para observar el efecto de esta variable sobre el resultado final, los MEM mostraron más efectividad en anaerobiosis (Higa & Chinen, 1998).

Los tratamientos sin MEM que fungieron como testigos, presentaron los problemas característicos de un proceso de descomposición de materia orgánica. El Tratamiento 1 (Figura 3) durante la primera semana emanó un exceso de lixiviados, con una nata blanca probablemente de levaduras, su olor a los 21 días fue muy desagradable. Esto debido a que sin el suficiente oxígeno en un proceso de descomposición normal, sin la adición de inóculos microbianos o fuentes de energía, se producen olores desagradables, incluyendo el olor característico del gas sulfuro de hidrógeno, el cual es altamente corrosivo (Holmer *et al.*, 1997).

Por su parte, el Tratamiento 6 (Figura 3) a los 7 días también mostró un cantidad alta de lixiviados, y a los 21 días presentó una alta carga de larvas de mosca, olor a putrefacción, humedad muy alta. Luego de tres semanas los desechos no mostraron mayor avance en su descomposición para ambos tratamientos.

Estos procesos son los que ocurren normalmente la descomposición de los desechos orgánicos en los botaderos de basura o rellenos sanitarios, lo que acarrea proliferación de insectos como las moscas y enfermedades humanas (Holmer *et al.*, 2007).

En general, todos los tratamientos a los que se les adicionó MEM, mostraron una considerable reducción de malos olores y cantidad de lixiviados expelidos, lo que demostró efectividad en el manejo de desechos orgánicos, pues con su aplicación se evitaría la presencia de malos olores y se podrían mantener por más tiempo antes de ser llevados a la compostera (Pacheco, *sf.*). Sin embargo, los tratamientos aeróbicos tuvieron presencia de larvas de moscas y otros insectos, aparte de mostrar humedades elevadas (Cuadro 6). No obstante, estos mostraron tener una leve mejoría en la descomposición de la materia orgánica en comparación con los tratamientos en anaerobiosis.

Los tratamientos anaeróbicos (del 2 al 5) mostraron olores aceptables, ausencia de insectos y se evidenció una reducción en humedad. Se esperaba que para la tercera semana los desechos estuvieran convertidos en compost (Referencia personal<sub>1</sub>, 2009). Sin embargo, la descomposición fue parcial lo que se atribuyó a una heterogeneidad en la materia orgánica en cuanto a dos aspectos, por un lado, el tamaño, pues se carecía la maquinaria para uniformar los trozos, y la alta acidez y humedad de los desechos.

Los desperdicios provenían de la soda comedor y correspondían a la hora del desayuno, por lo que se tuvo una presencia alta de cáscara de frutas (mayoritariamente piña y papaya frescas), así como pocos residuos de comida (arroz y frijoles), por lo que no se reflejó realmente el comportamiento de los desechos orgánicos de cocina que podían darse en una casa de habitación.

La acidez de las cáscaras frescas de frutas pudo afectar la descomposición, pues generó ácidos orgánicos que pudieron llevar el pH del tratamiento a valores inhibitorios para el desarrollo microbiano. El pH del sustrato afecta también la solubilidad del fósforo, un nutriente importante para los microorganismos. La solubilidad del fósforo se maximiza a niveles de pH de 6.5 y el transporte de metales se minimiza a valores de pH superiores a 6 (Pellini, *sf*; Eweis *et al.*, 1999).

Los rangos de humedad ideales para procesos controlados de compostaje son 45 a 70% (Díaz *et al.*, 1996; Sauri *et al.*, 2002), sin embargo, las humedades iniciales de los desechos fueron mucho más elevadas que eso, además de reportarse igualmente elevadas aún a los 21 días, lo que entorpece la actividad microbiana (Cuadro 6).

En general, no se observó que el carbón fuera determinante para el adecuado manejo de desechos sólidos orgánicos, pues más bien los tratamientos que dieron mejores resultados no provinieron de ningún lote con carbón. Según lo reportado por Holmer y colaboradores (1997) de los muchos elementos que se requieren para la descomposición microbiana, el carbono y el nitrógeno son los más importantes. El carbono representa un bloque de construcción básico que concentra cerca del 50% de células de masa microbiana. El nitrógeno es un componente crucial de las proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, enzimas y coenzimas necesarias para el crecimiento y función celular.

No obstante, quedó demostrado que para el manejo de desechos bajo las condiciones de este experimento, el carbón adicional al medio en el que se logran multiplicar los MEM, no es determinante y se da un óptimo crecimiento microbiano con un medio de únicamente melaza (esqueletos de carbono) y semolina.

Por otro lado, y aunque no se realizara un estudio microbiológico de los MEM, luego de ser expuestos al aire tras el proceso de fermentación, se puede conjeturar que el carbón vegetal está relacionado con la presencia de actinomicetes, quienes tienen un olor característico a moho y aportan una coloración grisácea a la hojarasca (Apéndice 1, Figura 6, F) (Referencia personal<sub>1</sub>, 2009).

### ***c. Caracterización microbiológica de los tratamientos***

Para la escogencia de los tres mejores tratamientos se tomó como parámetro principal su capacidad para manejar olores, debido a que la fermentación con EM suprime la putrefacción, y la condición antioxidante resultante del metabolismo de algunos de los microorganismos presentes en EM elimina la propagación de otros microorganismos principalmente aquellos que son patogénicos (Higa y Chinen, 1998).

Los respectivos análisis microbiológicos para hongos y levaduras demostraron que hubo un crecimiento confluyente, lo mismo que sucedía en la mayoría de los análisis de los lotes, con la diferencia de que hubo presencia de microorganismos no observados anteriormente.

En el tratamiento 2 se vio un crecimiento característico del hongo *Oidiodendron* sp., asociado a suelos y abonos orgánicos como bokashi (EM Lab P&K, 2009), así como presencia de levaduras blancas las cuales podrían tratarse de *Saccharomyces cerevisiae* o *Candida utilis* (Higa & Farr, sf; Szymanski & Patterson, 2003; Diver, 2001).

En el tratamiento 4, hubo presencia de una levadura color naranja amarillento que no pudo ser identificada, así como presencia de *Geotrichum* sp. y *Oidiodendron* sp., ambos hongos son característicos de suelos (EMLab P&K, 2009). Finalmente, en el tratamiento 7 se observó el crecimiento de levaduras blancas y el hongo *Rhizopus* sp., característico de suelos y bokashi (EMLab P&K, 2009).

Respecto al comportamiento de las bacterias (anaeróbicas y aeróbicas) presentaron un crecimiento confluyente, lo que coincide con los análisis aplicados a los lotes (Cuadro 4). No obstante, las formas de las colonias no mostraron diferencias por lo que no se procedió a una revisión de su morfología microbiana.

El crecimiento de los actinomicetes en los tratamientos anaeróbicos no fue significativo, a diferencia del tratamiento aeróbico (T7), donde se vio la única placa de todos los análisis donde se dio un crecimiento confluyente de los actinomicetes, pues tales son hongos aeróbicos, que pueden tener propiedades como controladores biológicos (Referencia personal<sub>1</sub>, 2009).

#### **d. Otras variables**

Las mediciones de pH de los lixiviados mostraron un comportamiento que se podría llamar constante a largo de las tres mediciones realizadas. Los pH de todos los tratamientos se ubicaron en rangos de 4 a 5.5. Equiparando la medición de los pH de los lixiviados con el pH real del compost, se podría deducir que el hecho de que la descomposición de la materia orgánica no haya sido óptima, se debe principalmente a la alta acidez inicial de los desechos, pues el crecimiento de muchos microorganismos, particularmente del suelo, es máximo a pH aproximadamente neutro, es decir en un intervalo de 6.5 a 8 (Pellini, *sf*; Eweis *et al.*, 1999).

Tomando en cuenta lo anterior se podría conjeturar que el único tratamiento que mostró los mejores rangos de pH fue el T7, tal comportamiento se explica pues la aireación usualmente es suficiente para retornar al compost a un pH aceptable (Holmer *et al.*, 1997).

Las coloraciones de los lixiviados también variaron mucho a lo largo de las semanas, lo que evidenció la actividad de una diversa cantidad de microorganismos (Apéndice 1, Figura 8).



## CONCLUSIÓN

Los Microorganismos Eficientes aislados de dos bosques secundarios mostraron ser efectivos para el manejo de desechos orgánicos de cocina, en cuanto a reducción de olores y disminución de lixiviados expelidos. Por su parte, el carbón vegetal no fue un componente determinante en la reproducción de MEM para fines de manejo de desechos orgánicos sólidos. Aunque en los análisis microbiológicos se presentaron algunos microbios fitopatógenos, también se hallaron posibles controladores biológicos para contrarrestar su efecto perjudicial, lo que evidencia el equilibrio de los ecosistemas poco interferidos por el ser humano. Dos factores determinantes para el adecuado precomposteo de los desechos orgánicos provenientes de la Soda-Comedor del ITCR fueron la baja acidez y la excesiva humedad de los desperdicios que afectaron significativamente la actividad microbiana. A pesar de que el crecimiento confluyente en las placas de los análisis microbiológicos demostró un vasto desarrollo de microorganismos eficientes activados. Finalmente, la fácil reproducción de esta técnica de multiplicación y obtención de MEM, facilita la utilización de dichos microorganismos no solo para la generación de un precompost, sino también de muchos otros usos, con excelentes resultados comprobados.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar una medición de pH y una reducción de humedad de los desechos orgánicos de cocina antes de aplicar los MEM para un mejor desempeño microbiano.

Se recomienda estudiar los microorganismos que crecen sobre los lixiviados, para estimar su efecto sobre el ambiente y los humanos.

Se recomienda la caracterización molecular de los microorganismos aislados, pues con ello se tendrá una mayor certeza de cuáles organismos son los que inciden directamente en la descomposición de la materia orgánica.

Se sugiere tomar los tres mejores tratamientos y continuar con su estudio, pues en ellos puede residir la verdadera solución al manejo de los desechos sólidos orgánicos.

## LITERATURA CONSULTADA

Airan D. S. and J. H. Bell. 1980. Natl. Waste Process. Conf.,pp 121-129. Washington D.C. Am. Soc. Mech. Eng., New York.

AGROINDUSTRIAL MANAGEMENT & CONSULTING S.A. *sf.* Biorecuperación de Lixiviados en Rellenos Sanitarios. Disponible en: <<http://www.agroindustrial-amc.com/files/Proyecto%20para%20el%20Tratamiento%20de%20Lixiviados%20en%20Rellenos%20Sanitarios.htm>>. Consultado el 11 de diciembre de 2009.

Arsova, L.; Van Haaren, R.; Goldstein, N.; M. Kaufman, S. and Themelis, N. 2008. The State Of Garbage In America. BioCycle December 2008, Vol. 49, No. 12, p. 22.

Barrantes, G. 2000. Aplicación de incentivos a la conservación de la biodiversidad en Costa Rica. Disponible en: <<https://www.inbio.ac.cr/EN/es/biod/estrategia/Paginas/PDF/Pago%20de%20Servicios%20Ambientales/PSA%20Estudio%20Caso%20CR.pdf>>. Consultado el 30 de julio de 2009.

Cárcamo, A.; Puentes, L.; Godoy, R.; Oyarzún, C. & E. Valenzuela. 2004. Actividad biológica del suelo en un bosque de *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst., Centro-sur de Chile. Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal (Chile). 4: 14-25.

Carmona, A. 2002. Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* tóxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). Bioagro: 14: (1): 3-10.

Correa, M. 2001. Effective Microorganisms (EM). Disponible en: <[http://www.auroville.org/environment/EM\\_impact.pdf](http://www.auroville.org/environment/EM_impact.pdf)>. Consultado el 30 de Julio de 2009.

De Bertoldi, M.; Ferranti, M.; L'Hermite, P. & Zucconi, F. 1989. Elsevier Applied Science, London.

Díaz L. F., Savage G. M., Eggerth L. L. & Golueke C. G. 1996. Solid Waste Management for Economically Developing Countries. ISWA. California, USA.

Diver, S. 2001. Nature Farming and Effective Microorganisms. Disponible en: <<http://ncatark.uark.edu/~steved/Nature-Farm-EM.html>>. Consultado el 30 de Julio de 2009.

Domene, X. 2007. Methodologies using soil organisms for the ecotoxicological assessment of organic waste. Disponible en: <[http://www.tesisenxarxa.net/TESIS\\_UAB/AVAILABLE/TDX-1126107-102442/xdc1de1.pdf](http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1126107-102442/xdc1de1.pdf)>. Consultado el 30 de Julio de 2009.

EMLab P&K (TestAmerica Environmental Microbiology Laboratory, Inc.). 2009. *Oidiodendron* sp. Disponible en: <<http://www.emlab.com/app/fungi/Fungi.po?event=fungi&species=93&type=primary>>. Consultado el 10 de diciembre de 2009.

European Commission. 2001. Disposal and Recycling Routes for Sewage Sludge. Part 3. Scientific and technical sub-component report. SEDE - Arthur Andersen, Directorate-General Environment. Brussels, Belgium.

European Commission. 2006. Soil protection- The Story behind the Strategy. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Eweis J., Ergas S., Chang D. y Schroeder E. (1999) *Principios de Biorrecuperación*. Mac Graw Hill. España.

Freitag, D. 2000. The Use of Effective Microorganisms (EM) in Organic Waste Management. Disponible en: <<http://emtrading.org/em/papers/emwasterepfreitag.pdf>>. Consultado el 29 de Julio de 2009.

Gallo, M.; Mera, M. 2001. Evaluación de ensilaje de cáscara de banano maduro para consumo de ganado bovino. Proyecto de Graduación Licenciatura Ingeniero Agrónomo. Universidad EARTH. Guácimo, CR. 31 p.

Guim, A.; Ruggieri, A.; Andrade, P. 1995. Efeito de inoculante microbiano sobre consumo, degradação *in situ* e digestibilidade aparente das silagens de capim-elefante cv. Napier (*Pennisetum purpureum* Schum). Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, v.24, n.6, p.1054-1061, 1995.

Higa, T. 1993. An Earth Saving Revolution: A Means to Resolve Our World's Problems through Effective Microorganisms (EM). Tokyo: Sunmark Publishing, Inc.

Higa, T. & Farr, J. *sf*. Beneficial and Effective Microorganisms for a Sustainable Agriculture and Environment. Disponible en: <[http://www.infric.or.jp/english/KNF\\_Data\\_Base\\_Web/PDF%20KNF%20Conf%20Data/C1-5-015.pdf](http://www.infric.or.jp/english/KNF_Data_Base_Web/PDF%20KNF%20Conf%20Data/C1-5-015.pdf)>. Consultado el 28 de Julio de 2009.

Higa, T.; Chinen, N. 1998. EM treatments of odor, waste water and environmental problems.

Higa, T. & Wididana, G. 1991. The Concept and Theories of Effective Microorganisms. Disponible en: <<http://www.emproducts.co.uk/downloads/EM.pdf>>. Consultado el 28 de Julio de 2009.

Holmer, R.; Gabutin, L.; Schnitzler, H. 1997. Organic Fertilizer Production from City Waste : A Model Approach in a Southeast Asian Urban Environment. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 32 : 50 – 53.

INBIO. 2009. Biodiversidad. Disponible en: <<http://www.inbio.co.cr/Biodiversidad>>. Consultado el 30 de julio de 2009.

Katzir R. 1996. Workshop on Market Gardening, Farm Associations, and Food Provision in Urban and Peri-Urban Africa. Netanya, Israel, June 23-28,1996.

Madigan, M.; Martinko, J. & Parker, J. 1999. Brock: Biología de los microorganismos. 8<sup>o</sup> edición, Editorial Prentice Hall, Madrid.

Marmo, L; 2002. Current Management of Biodegradable Waste and future perspectives. European Commission - DG ENV.A.2, Brussels, 8-10 April 2002.

Méndez, R.; Medina, E.; Quintal, C.; Castillo, E. y Sauri M. 2002. Tratamiento de lixiviados con carbón Activado. Ingeniería 6-3 (2002) 19-27.

- Mondini, C.; Fornasier, F.; Sinicco, T. 2004. Enzymatic activity as a parameter for the characterization of the composting process. *Soil Biology & Biochemistry*. 36:1587–1594.
- Muñoz, R. y Madriñán, R. *sf*. Efecto de lixiviados del raquis de plátano sobre la actividad y biomasa microbiana en floración y cosecha del tomate. Disponible en: Consultado el 24 de noviembre de 2009.
- Obregón, M. 2009. Trichoderma. Disponible en: <<http://doctor-obregon.com/Trichoderma.aspx>>.
- Pacheco, F. *sf*. Lactofermentos. Una alternativa en la producción de abonos orgánicos líquidos fermentados. Disponible en: <<http://webs.chasque.net/~rapaluy1/organicos/articulos/Lactofermentos.pdf>>. Consultado el 29 de Julio de 2009.
- Pacheco, F. 2009. Evaluación de la eficacia de la aplicación de inóculos microbiales y de *Eissenia fetida* en el proceso de compostaje doméstico de desechos urbanos. Universidad Pública de Navarra. Tesis de grado para convertirse en MASTER EN AGRO BIOLOGÍA AMBIENTAL. Facilitada por el autor.
- PASE. 2007. Manual para la producción de compost con microorganismos eficaces. Disponible en: < [http://www.em-la.com/archivos-de-usuario/base\\_datos/manual\\_para\\_elaboracion\\_de\\_compost.pdf](http://www.em-la.com/archivos-de-usuario/base_datos/manual_para_elaboracion_de_compost.pdf)>. Consultado el 10 de diciembre de 2009.
- Pellini, L.*sf*. Biorremediación estimulada por efluentes cloacales tratados de suelos contaminados con hidrocarburos. Disponible en: Consultado el 03 de diciembre de 2009.

Primavesi, A. 1982. Manejo ecológico do solo: Agriculture en Regioes Tropicais. 5 ed. Sao Paulo: Nobel. 541 p.

Raut, M; 2007. Microbial dynamics and enzyme activities during rapid composting of municipal solid waste – A compost maturity analysis perspective. *Bioresource Technology* 99: 6512–6519.

Referencia Personal<sub>1</sub>. 2009. Curso de Abonos Orgánicos del CNEAO-INA impartido por el Ing. Pablo Monge Monge. Febrero - Marzo de 2009.

Referencia Personal<sub>2</sub>. 2009. Material del Curso Controladores Biológicos del CNEAO-INA impartido por el Ing. Ronny Cortés Paniagua. Abril-Mayo de 2009.

Rynk R., M. van de Kamp, G.B.Wilson, M.E. Singley, T.L. Richard, J.J. Kolega, F.R. Gouin, L. Laliberty, Jr., K. Day, D.W. Murphy, H.A.J. Hoitink and W.F. Brinton. 1992. NRAES, Cornell University, Ithaca, NY.

Rivas, Y.; Godoy, R.; Valenzuela, E.; Leiva, J.; Oyarzún, C. & Alvear, M. 2007. Actividad biológica del suelo en dos bosques de *Nothofagus* del centro sur de Chile. *Gayana Bot.* 64(1): 81-92.

Sauri, M.; Nájera, H.; Ramírez, J. y Mejía, G. 2002. Aplicación de composteo como método de tratamiento de los residuos de frutas producidos en zonas de alta generación. En: *Ingeniería* 6-1 (2002) 13-20.



Shiho, W; Hiraku, S; Kenichi, O; Osamu, K; Jun, N; Masaaki, S; Takako, S; Yutaka, N. 2008. Investigation of the microbial community in a microbiological additive used in a manure composting process *Bioresource Technology*. 99: 2687–2693

Szymanski, N. & Patterson, R. 2003. Effective Microorganisms (EM) and wastewater systems. Disponible en: <<http://www.envismadrasuniv.org/pdf/effective%20microorganisms%20and%20waste%20water.pdf>>. Consultado el 30 de Julio de 2009.

Tuomela, M.; Vikman, M.; Hatakka, A.; Itävaara, M.; 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. En: *Bioresour. Technol.* 72: 169–183.

UNFPA. 1996. United Nations, Geneva.

Valenzuela, E.; Leiva, S. & Godoy, R. 2001. Variación estacional y potencial enzimático de microhongos asociados con la descomposición de hojarasca de *Nothofagus pumilio*. En: *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 737-749.

Villagra, C.; Botero, R. y Quiroga, V. 2006. Evaluación del efecto que tienen los Microorganismos Eficaces (EM) sobre la composición nutritiva y el consumo de los Bloques Multinutricionales (BMN). En: *Tierra Tropical* (2006) 2 (2): 105-112.

## ANEXOS

### ***Anexo 1. Análisis microbiológico***

#### Tomado de Referencia Personal<sub>2</sub>

#### **Diluciones seriadas**

1. Trabajando con la técnica aséptica, esterilizar una pinza y flamear el cuello de una botella que contenga 100 ml de agua estéril.
2. Colocar la botella sobre la balanza y tarar la balanza.
3. Pesar 10 g de suelo e introducirlos en la botella (dilución 10:1).
4. Tapar la botella y agitar durante 5 min.
5. Preparar 5 tubos de ensayos cada uno con 9 ml de agua destilada estéril.
6. En la cámara de flujo laminar apagada y con los mecheros encendidos, tomar 1 ml de la solución del suelo y traspasarlo a un tubo de ensayo, agitarlo (dilución 10:2).
7. De la dilución  $10^2$ , tomar 1 ml y traspasarlo a otro tubo de ensayo, agitarlo (dilución 10:3).
8. De la dilución  $10^3$ , tomar 1 ml y traspasarlo a otro tubo de ensayo, agitarlo (dilución 10:4).
9. De la dilución  $10^4$ , tomar 1 ml y traspasarlo a otro tubo de ensayo, agitarlo (dilución 10:5).
10. De la dilución  $10^5$ , tomar 1 ml y traspasarlo a otro tubo de ensayo, agitarlo (dilución 10:6).

## Siembra en medios de cultivo selectivos

1. De la dilución  $10^3$ , tomar 0.5 ml (factor de dilución) en un plato petri con medio PDA acidificado y otros 0.5 ml en otro plato con Agar Nutritivo, esparcirlo con una espátula de Digalski
2. De la dilución  $10^4$ , tomar 0.5 ml y esparcirlo con una espátula de Digalski en un plato petri con medio Actinomicete.
3. De la dilución  $10^6$ , tomar 0.5 ml y esparcirlo con una espátula de Digalski en un plato petri con medio Agar Nutritivo.
4. Sellar los platos manteniéndolos en dirección horizontal. Rotular.
5. Colocarlas en las condiciones adecuadas (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Tipos de medios de cultivo utilizados para el análisis biológico de microorganismos (CNEAO-INA, 2009).**

MEDIO DE CULTIVO	CRECIMIENTO DE	CONDICIONES	TIEMPO
Agar Nutritivo	Bacterias aeróbicas	30° C, 12 h luz	2 días
Agar Nutritivo	Bacterias anaeróbicas	Jarra de anaerobiosis, 25°C, 12 h luz	2 días
Actinomycete	Actinomycetes	30° C, 12 h luz	3 días
<i>PDA acidificado</i>	Hongos aerobios	28° C, 12 h luz, 80% HR	7 días

Fuente: Laboratorio de Controladores Biológicos- CNEAO.

## **Estudio y conteo microbiano**

Los microorganismos crecidos en los medios selectivos fueron estudiados anotando sus características de olor y aspecto. A algunos de los hongos se les hizo una observación de esporas al microscopio a 100 X, utilizando una muestra del micelio esparcida en una gota de agua en un portaobjetos limpio.

Las unidades formadoras de colonias se estimaron utilizando la fórmula:

$$\frac{\text{\# UFC contadas}}{\text{\# Repeticiones}} * \text{Factor de dilución} * \text{Dilución} = \text{UFC totales en 1 g de sustrato}$$

## **Anexo 2. Pasos para la Tinción de Gram**

### Tomado de Referencia Personal<sub>2</sub>

#### **Extensión o Frotis**

1. Utilizando la técnica aséptica, flamear un portaobjetos limpio.
2. Colocar una gota de agua estéril en el portaobjetos.
3. Tomar una muestra de la colonia con un asa bacteriológica estéril.
4. Realizar un frotis sobre la gota de agua.
5. Dejar secar la muestra.

#### **Tinción utilizando los reactivos de Gram**

1. Adicionar sobre la extensión cristal violeta de Hucker (colorante inicial), dejando actuar por 1-2 min.
2. Se fija el cristal violeta con una solución de lugol (mordiente), durante 1-2 min.
3. Se decolora el lugol con alcohol de 70° durante 1-2 min, se elimina el exceso de alcohol.
4. Se adiciona safranina (colorante de contraste), y se deja actuar 1-2 min.
5. Se lava el portaobjetos con agua corriente.
5. Se deja secar y se observa al microscopio con el objetivo de inmersión.

### **Anexo 3. Otros protocolos de producción de MEM**

*Tomado de Pacheco, sf.*

#### **Pasos para preparar un Inóculo Sólido Activado**

1) Ir a un ecosistema natural cercano (bosques de preferencia) y recolectar medio saco de mantillo de bosque (capa de materia orgánica en descomposición que se encuentra entre las hojas superficiales y el suelo del bosque). Este mantillo es una fuente rica de múltiples microorganismos.

2) Seguidamente se prepara un sustrato que tenga óptimas características físicas y nutricionales para que se desarrollen los microorganismos recolectados. Dentro de los materiales a utilizar para crear el sustrato se encuentran:

- ❖ 3 a 5 litros de melaza (se diluye en agua dentro de una regadera antes de mezclarla con los demás ingredientes)
- ❖ 2 litros de leche o 4 de suero,
- ❖ ½ saco de semolina de arroz,
- ❖ ½ saco de salvado de trigo,
- ❖ ½ saco de carbón vegetal molido,
- ❖ 1 saco de granza de arroz,
- ❖ 1 saco de aserrín de madera blanca
- ❖ Agregar agua hasta alcanzar un 30 % de humedad.

3) Mezclar muy bien todos estos componentes. Opcionalmente se le puede agregar junto con el mantillo, medio litro de yogurt así como 500 gramos de levadura diluida en agua tibia, esto para aumentar la riqueza microbiológica del producto final.

4) Se coloca la mezcla en un tanque plástico sellado con capacidad de 200 litros que presente una válvula de escape con un sello de agua. Es importante que no entre oxígeno en el sistema ya que se busca desarrollar la fermentación anaeróbica.

5) Dejar tapado en un lugar fresco y a la sombra por un periodo lunar (30 días). Una vez pasado un periodo lunar el sustrato dentro del barril ya se encuentra colonizado por cientos de miles de microorganismos que se alimentan de la materia orgánica en descomposición.

6) Verificar la calidad: El sustrato debe de tener un olor agradable similar a una fermentación alcohólica.

### ***Forma de aplicación***

El inóculo se mezcla con los desechos orgánicos que se quieran tratar, se puede colocar a razón de 1Kg por metro cuadrado sobre el aserrín o la burucha de los suelos en los sistemas de producción pecuaria.

Puede colocar un puñado de este inóculo dentro de los recipientes que se utilizan para manejar los desperdicios orgánicos de las cocinas y comedores. Cada capa de 10 centímetros de desperdicios en la cubeta (cubeta con capacidad de 20 Litros con tapa) debe ser cubierta con un puñado de este inóculo.

También se puede colocar en las letrinas a razón de un puñado (200 a 300 gramos) cada vez que se utiliza. Esto ayuda a eliminar el olor a putrefacción de forma rápida en las letrinas.

## **Presentación Líquida del Inóculo Activado**

Esta se elabora a partir del inóculo activado sólido.

- 1) Se deben utilizar unos 25 kilogramos del inóculo sólido, colocarlos en otro tanque igual al primero (sistema anaeróbico). Este otro tanque debe llenarse con una solución de melaza al 5% en agua (sin cloro).
- 2) Seguidamente se debe agitar muy bien y dejar reposar unos tres días. Finalmente obtenemos el inóculo líquido activado. Producto que contiene millones de microorganismos listos para degradar de forma efectiva los desechos orgánicos eliminando así los malos olores.

### ***Forma de aplicación***

El inóculo se mezcla con los desechos orgánicos que se quieran tratar, se puede colocar a razón de 1Kg por metro cuadrado sobre el aserrín o la burucha de los suelos en los sistemas de producción pecuaria.

Puede colocar un puñado de este inóculo dentro de los recipientes que se utilizan para manejar los desperdicios orgánicos de las cocinas y comedores. Cada capa de 10 centímetros de desperdicios en la cubeta (cubeta con capacidad de 20 Litros con tapa) debe ser cubierta con un puñado de este inóculo. Esto evitará la presencia de malos olores y permitirá mantener más tiempo los desperdicios en el recipiente antes de ser llevados a la compostera.

También se puede colocar en las letrinas a razón de un puñado (200 a 300 gramos) cada vez que se utiliza. Esto ayuda a eliminar el olor a putrefacción de forma rápida en las letrinas.



## APÉNDICES

### *Apéndice 1. Fotografías adicionales del experimento.*



**Figura 6. Proceso de montaje de los Lotes. A) Hojarasca de montaña adicionada con melaza, semolina y carbón (si requiere), llevada a una humedad del 35%. B) Hojarasca introducida en un estañón. C) Condiciones anaeróbicas que se logran con una tapa de cierre hermético, adaptada con una manguera que desemboca en un recipiente con agua. D) Cuatro lotes de ME. E) Producto final luego del proceso fermentativo, MEM sin carbón. F) Microorganismos Eficientes con carbón, nótese la coloración grisácea que le aportan los actinomycetes una vez que se expone a condiciones aeróbicas.**



**Figura 7. Proceso de montaje de los tratamientos. A) Desechos de cocina mezclados y cortados. B) Balde adaptado con una manguerilla para expulsión de lixiviados. C) Filtro de carbón envuelto en sarán. D) Balde con filtro colocado en la manguerilla. E) Tapa agujereada para las condiciones aeróbicas de la mitad de los tratamientos. F) Cinco tratamientos en anaerobiosis (tapas sin agujeros).**



**Tratamiento 1**



**Tratamiento 2**



**Tratamiento 3**



**Tratamiento 4**



**Tratamiento 5**



**Tratamiento 6**



**Tratamiento 7**



**Tratamiento 8**



**Tratamiento 9**



**Tratamiento 10**

**Figura 8. Comparación entre los lixiviados de los tratamientos. Durante las tres mediciones correspondientes (izquierda: 7 días, centro: 14 días, derecha: 21 días).**