

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Departamento de Ambiente y Desarrollo**  
**Ingeniería en Ambiente y Desarrollo**



Proyecto Especial de Graduación

**Uso de microorganismos de montaña (MM) para el tratamiento de  
aguas residuales de la Planta de Lácteos de Zamorano**

Estudiante

Hannah Elizabeth Robalino Avilés

Asesores

Victoria Cortés Matamoros, D.C.A.

Luis Huevo Sánchez, Ph.D.

Lourdes Espinal Cabrera, Ing.

Honduras, agosto 2023

**Autoridades**

**SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO**

Rector

**ANA M. MAIER ACOSTA**

Vicepresidenta y Decana Académica

**ERIKA TENORIO MONCADA**

Directora Departamento Ambiente y Desarrollo

**HUGO ZAVALA MEMBREÑO**

Secretario General

### **Agradecimientos**

Agradezco a las personas del Departamento de Ambiente y Desarrollo, por su apoyo durante todo el proceso de investigación, al personal de campo de la Unidad de Riego y Drenaje, por su ayuda en la elaboración de los tapones de cemento para poder realizar el aforo en la fosa séptica y a la Planta de Lácteos de Zamorano.

## Contenido

Agradecimientos .....	3
Índice de cuadros .....	6
Índice de Figuras .....	7
Índice de Anexos .....	8
Resumen .....	9
Abstract .....	10
Introducción .....	11
Metodología .....	14
Sitio de Estudio .....	14
Protocolo para la Activación de los Microorganismos de Montaña Solidos (MMS) .....	14
Cuantificación de los Microorganismos de Montaña (MM) .....	16
Evaluar el Efecto de la Dosificación de Microorganismos de Montaña (MM), en la Reducción de Materia Orgánica (MO) Presente en Fluente de la Planta de Lácteos .....	18
Toma de Muestras y Caracterización del Agua Residual .....	18
Montaje de los Biorreactores .....	19
Cuantificación de los Microorganismos de Montaña (MM) .....	21
Resultados y Discusión .....	23
Protocolo Sistemático para la Activación de los Microorganismos de Montaña Solidos (MMS) .....	23
Efecto de la Dosificación de MM en la Reducción de Materia Orgánica .....	26
Cuantificación del Volumen del Efluente .....	26
Caracterización Físicoquímica del Efluente .....	27
Monitoreo de los Biorreactores .....	28

	5
Cuantificación de Microorganismos en Biorreactores.....	32
Conclusiones .....	35
Recomendaciones.....	36
Referencias.....	37
Anexos.....	40

**Índice de cuadros**

Cuadro 1 Variables Control y Respuesta.....	15
Cuadro 2 Análisis de Laboratorio.....	19
Cuadro 3 Ensayos para la Caracterización de los Reactores.....	20
Cuadro 4 Método para Cuantificación de Microorganismos.....	21
Cuadro 5 Requerimientos para la Activación de MMS.....	26
Cuadro 6 Caudal Promedio de Entrada a la Fosa Séptica.....	27
Cuadro 7 Caracterización de las Muestras Recolectadas de Agua Residual.....	28
Cuadro 8 ANDEVA de Sólidos Totales por Dosis mg/L.....	29
Cuadro 9 ANDEVA de Sólidos Volátiles por Dosis mL/L.....	30
Cuadro 10 Valores Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	31
Cuadro 11 Eficiencia de Remoción de Sólidos Totales (ST), Sólidos Volátiles (SV) y Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	32
Cuadro 12 Crecimiento de Bacterias y Levaduras.....	32

## Índice de Figuras

Figura 1 Tratamientos Usados para la Activación de los Microorganismos de Montaña Solidos (MMS) .....	15
Figura 2 Esquema de Inoculación de Muestra en el Medio de Cultivo.....	17
Figura 3 Diagrama Experimental para la Toma de Muestras y Dosificación.....	20
Figura 4 Esquema de Inoculación de Muestra en el Medio de Cultivo. ....	21
Figura 5 Vista Desde el Microscopio de los Bacilos Gram Positivos .....	23
Figura 6 Crecimiento de Microorganismos de Montaña Activados (MMA) en UFC/mL .....	24
Figura 7 Crecimiento de Microorganismos de Montaña Activados (MMA) UFC/mL y pH .....	25
Figura 8 Valores de Sólidos Totales (mg/L) por Cada Tratamiento a lo Largo del Experimento .....	29
Figura 9 Valores de Solidos Volátiles (mg/L) por Cada Tratamiento a lo Largo del Experimento .....	30
Figura 10 Crecimiento de Bacterias UFC/mL por Cada Tratamiento a lo Largo del Experimento.....	33
Figura 11 Crecimiento de Levaduras y Hongos UFC/mL por Cada Tratamiento a lo Largo del Experimento.....	34

**Índice de Anexos**

Anexos A Imágenes de la Fosa Séptica de la Planta de Lácteos de Zamorano .....	40
Anexos B Protocolo Detallado para la Activacion de los Microorganismos de Montaña.....	41

## Resumen

Las grandes industrias contribuyen a la generación de efluentes residuales, los cuales, si no cuentan con un adecuado tratamiento, contribuyen con el deterioro de los recursos hídricos debido a la descarga de contaminantes. El efluente generado en la Planta de Lácteos de Zamorano se caracteriza por presentar altas concentraciones de materia orgánica, lo que representa un riesgo de contaminación para los suelos y cuerpos de agua receptores, requiriendo de metodologías de tratamiento apropiadas. El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de la adición de microorganismos de montaña (MM) para la reducción de materia orgánica presente en el agua residual de la Planta de Lácteos de Zamorano. Se desarrolló un protocolo para la activación de MM y se evaluó el incremento en la eficiencia de remoción de materia orgánica del efluente seleccionado, aplicando tres diferentes dosis de MM a biorreactores anaerobios. Al combinar 0.44 kg de MM con 22 mL de melaza en una mezcla acuosa de 4 L, se obtuvo un crecimiento de  $2.55 \times 10^7$  UFC/mL luego de 3 días de período de activación (unidad formada de colonia [UFC]). Sin embargo, al evaluar el efecto de la adición de MM sobre el efluente, no se registró una diferencia en la eficiencia de reducción de demanda química de oxígeno (DQO) y Sólidos Volátiles de las diferentes dosis aplicadas de MM y el control negativo, indicando que este consorcio de microorganismos no contribuirá a la mejora significativa del tratamiento.

*Palabras clave:* Agua residual, bioaumentación, biotecnología, tratamiento anaeróbico

### Abstract

Large industries contribute to the generation of waste effluents, which if not adequately treated, contribute to the deterioration of water resources due to the discharge of pollutants. The effluent generated by Zamorano Dairy Plant is characterized by high concentration of organic matter, which represents a risk of contamination to soils and receiving waters and requires appropriate treatment methodologies. The objective of this study is to analyze the effect of the addition of mountain microorganisms (MM) for the reduction of organic matter present in the wastewater of the Zamorano Dairy Plant. A protocol for the activation of MM was developed, and the increase in organic matter removal efficiency of the selected effluent was evaluated by applying three different doses of MM to anaerobic bioreactors. By combining 0.44 kg of MM with 22 mL of molasses in a 4 L aqueous mixture, a growth of  $2.55 \times 10^7$  UFC/mL was obtained after 3 days of activation period. However, when evaluating the effect of the addition of MM to the effluent, there was no difference in the chemical oxygen demand (COD) and Volatile Solids reduction efficiency between the different doses of MM applied and the effluent without MM addition, indicating that this consortium of microorganisms will not contribute to the significant improvement of the treatment.

*Keywords:* Anaerobic treatment, bioaugmentation, biotechnology, wastewater

## Introducción

En la actualidad, la ingeniería se enfrenta a importantes desafíos directamente relacionados con el manejo inadecuado de los recursos naturales (Haapala et al., 2013). Tal es el caso de la contaminación de los recursos hídricos por la descarga de efluentes residuales sin un tratamiento adecuado, particularmente el sector agroindustrial se caracteriza por la generación de efluentes con elevado contenido de materia orgánica y otros nutrientes.

En la industria láctea, la cantidad de agua utilizada por unidad de leche procesada varía de acuerdo con la tecnología aplicada en una relación de 5 a 10 L de agua por cada litro de leche (Gaibor, 2014). La demanda diaria se asocia con la limpieza de silos, tanques, intercambiadores de calor, homogeneizadores, tuberías y otros equipos (Ahmad et al., 2019). Esta actividad genera efluentes con elevadas concentraciones de la demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno (DBO), nitrógeno y fósforo por encima de los estándares de calidad para descarga a cuerpos receptores (Brião y Tavares, 2007, p. 487).

La implementación de un tratamiento adecuado es requerida para reducir el impacto en el entorno. Entre las alternativas disponibles, la biorremediación es una tecnología eficiente donde se incorporan microorganismos con la capacidad de degradar y aprovechar metabólicamente los contaminantes (Cardoso et al., 2022). Al emplear microorganismos benéficos ayuda a disminuir enfermedades, mediante la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas. Estos microorganismos mantienen y mejoran la calidad del agua mediante la reducción de concentraciones materia orgánica presente en el agua (Campo-Martínez, 2014, p. 81).

En este contexto, diversos estudios reportan que los microorganismos de montaña (MM) están constituidos por colonias de hongos, bacterias, levaduras y otros organismos benéficos que se encuentran de manera natural en diferentes ecosistemas, promoviendo la descomposición de materia orgánica (Campo-Martínez, 2014, p. 81). Estos se han aplicado en la agricultura como biofertilizantes y abono orgánico en el suelo (Raby, 2017; Umaña et al., 2017; Zeballos Heredia, 2017). Además,

contribuyen con la fijación de nitrógeno en el suelo y a solubilizar los nutrientes como el fósforo y potasio, para que estos sean disponibles para las plantas. Particularmente, se encuentran en áreas donde no se registra el uso de agroquímicos en los últimos 3 años y sin intervención de actividades antropogénicas (Rodríguez y Tafur, 2020).

Este consorcio de microorganismos cuenta con aproximadamente 80 especies de 10 géneros diferentes divididos en cuatro grupos: bacterias fotosintéticas, bacterias ácido lácticas, actinomicetos, hongos y levaduras (Higa y Wididana, 1991). Todos ellos son mutuamente compatibles y pueden coexistir en un cultivo líquido (Higa y Parr, 1994). Las propiedades de este consorcio de microorganismos varían desde su adaptación y crecimiento como los diferentes microorganismos que la conforman (Parra Huertas, 2010).

El uso de los microorganismos de montaña se ha convertido en un auge en los últimos años, para la reducción de materia orgánica en tratamiento de aguas residuales, en aguas residuales domésticas, así mismo son una tecnología que promueve la sostenibilidad del ambiente, por ser una alternativa de naturaleza biológica y viable (Díaz y Chules, 2019). Un estudio realizado por Lopez y Nina (2022) reporta los resultados de la aplicación de microorganismos de montaña en fosas sépticas de agua residual doméstica, obteniendo una remoción de 92.7% de DBO5 y 75.7% de DQO frente a la operación convencional del sistema.

La Planta de Lácteos de Zamorano procesa actualmente en promedio 4,500 L de leche diariamente para la producción de leche fluida, cremas, yogur, helado, queso frescos y madurados. El estudio realizado por Rocha (2015), reportó la generación de un efluente promedio de 30.16 m<sup>3</sup>/día en la caja de registro, con variaciones dentro de un rango de 19.95 - 40.41 m<sup>3</sup>/día, obteniendo una relación consumo: efluente de 1.1:1 m<sup>3</sup>. Por otra parte, según Pua (2010) en la Planta de Lácteos de Zamorano, se registró el ingreso de 6,523 L de leche diarios, con un consumo de agua de 49,001 L diarios para los años del 2002 al 2010, por consiguiente, se gastaba en promedio 7.5 L de agua/L de leche procesada.

El efluente de la Planta de Lácteos se dirige a una fosa séptica, la cual es un sistema de tratamiento a pequeña escala utilizado para el procesamiento de aguas grises y aguas residuales domésticas (Lucho et al., 2015). Está diseñada para tratar el agua residual por un tiempo de retención hidráulica (TRH) de un mínimo de 36 a 72 horas, lo cual posibilita la separación de los sólidos suspendidos, aceites y grasas, reteniendo en la superficie o favoreciendo su sedimentación. La materia orgánica que se acumula en el tanque atraviesa un proceso biológico de descomposición, alcanzando una reducción en sólidos de hasta 50% cuando se opera en condiciones óptimas (Mendez-Novelo y et al., 2012). Así mismo, este proceso tiende a producir metano ( $\text{CH}_4$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (Lucho et al., 2015).

La fosa séptica de la Planta de Lácteos se ha mantenido funcionando alrededor de 35 años. Según (Vásquez, 2014) “la acumulación de sólidos es de  $95.05 \text{ m}^3$ , que no han sido degradados en su totalidad por las bacterias anaeróbicas”. Los sólidos se encuentran estancados, y el lado izquierdo de la fosa séptica se ha deshabilitado por fallos en la infraestructura, como la oxidación en las barrillas y las compuertas. Por esta razón, se recomienda realizar limpieza del sistema cada 3 a 5 años. (Lucho et al., 2015).

Considerando la problemática previamente descrita, por medio de esta investigación se propone la aplicación de microorganismos de montaña como alternativa para el tratamiento del efluente residual generado en la Planta de Lácteos de Zamorano, para lo cual se plantean los siguientes objetivos específicos: 1) Desarrollar un protocolo sistemático para la activación de los microorganismos de montaña y 2) evaluar el efecto de la dosificación de microorganismos de montaña (MM) en la reducción de materia orgánica (MO) presente en el efluente residual seleccionado.

## Metodología

### Sitio de Estudio

El estudio se realizó en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ubicada en el municipio de San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, Honduras. En el área de estudio se registra una temperatura ambiental promedio anual de 24 °C y una humedad relativa del 70%. Las muestras recolectadas fueron analizadas y procesadas en el Laboratorio del Departamento de Ambiente y Desarrollo. La recolección de los microorganismos de montaña se llevó a cabo en la Finca Agroecológica de Zamorano y el agua residual se obtuvo de la fosa séptica de la Planta de Lácteos de Zamorano.

### Protocolo para la Activación de los Microorganismos de Montaña Sólidos (MMS)

Los microorganismos de montaña (MM) provenientes de la Finca Agroecológica de Zamorano se presentan de forma sólidas y a los 30 días de fermentación deben presentar un crecimiento de hongos y para su posterior activación y mantenimiento previo a la aplicación en el sitio deseado. Para la primera fase del estudio, se obtuvo una mezcla de 6 L de MMS con más de 30 días de fermentación que fue almacenada en bolsas con cierre hermético para preservar el ambiente anaeróbico durante su transporte hacia el laboratorio del Departamento de Ambiente y Desarrollo.

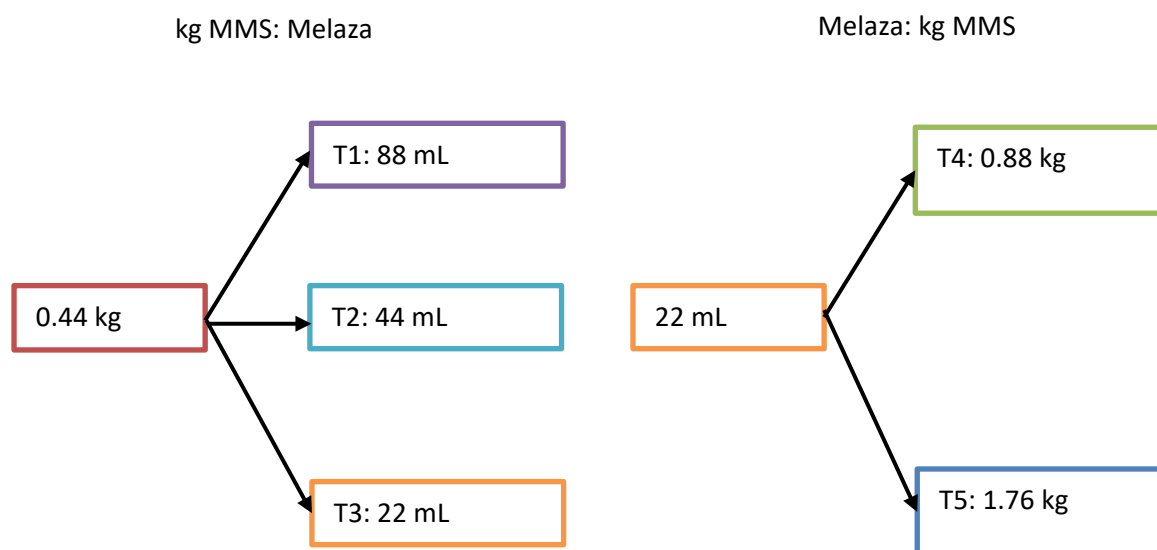
Una vez en el laboratorio, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiental y bajo sombra (Rodríguez y Tafur, 2020). Según Kondo et al. (2012) para la re-suspensión de los microorganismos de montaña sólidos (MMS) se mezclan 12 L de MMS con 180 L de agua no clorada y un galón de melaza previo a su aplicación en el suelo. Sin embargo, para fines de esta investigación se debe limitar la dosis de melaza, debido a que su aporte en materia orgánica puede interferir con los procesos de eficiencia esperados al ser combinados con el efluente residual.

A diferencia de su aplicación en suelo, se espera que la principal fuente de nutrientes para los MM sea el residuo que se desea tratar y en este caso, es el efluente de la Planta de Lácteos de Zamorano. Es por esto que se realizaron tres tratamientos con una relación de 0.44 kg de MMS y vario

la cantidad de melaza suministrada disminuyendo 88 mL, 44 mL y 22 mL, así mismo dos tratamientos con una menor cantidad que es 22 mL de melaza y vario la cantidad de kg de MMS 0.88 kg y 1.76 kg aumentando la cantidad de kg a comparación de mis primero tres tratamientos (Figura 1).

**Figura 1**

*Tratamientos Usados para la Activación de los Microorganismos de Montaña Sólidos (MMS)*



Para seleccionar el protocolo apropiado (Cuadro 1), se realizó una activación en laboratorio de 0.44 kg MM mezclados con 4 L de agua y diferentes dosis de melaza (88 mL, 44 mL y 22 mL). El T1 (0.44 kg/ 88 mL) corresponde al tratamiento control preparado con las proporciones de melaza y microorganismos de montaña sólidos (MMS) descritos en la literatura, para su mezcla en 4 L de agua. Esta formulación se realiza para aplicación de MM en suelos agrícolas (Higa y Parr, 1994).

**Cuadro 1**

*Variables Control y Respuesta*

Variables Control	Variable respuesta	Criterios para evaluar
Volumen de agua: 4 L		
Volumen de melaza: 88, 44 y 20 mL		
kg de MMS: 0.44, 0.88 y 1.76	UFC/mL: $> 1 \times 10^6$	Mayor crecimiento (UFC) - Menor disponibilidad de nutriente
Tiempo: 4 días	pH: 3 – 5 pH	Mayor crecimiento (UFC) - Menor tiempo
Temperatura: Ambiental		
Oxígeno: 0 mg/L		

Además, se prepararon tratamientos adicionales, en los cuales se modificó el peso inicial de MMS al mezclar 4 L de agua y 22 mL de melaza, con 0.88 kg y 1.76 kg respectivamente. Por otro lado, se mantuvo un pH de 5.5 en la mezcla final, con el fin de favorecer la proliferación y el crecimiento de los microorganismos de montaña sólidos (MMS). El proceso de activación se realizó a temperatura ambiente, registrando una variación entre los 23 °C hasta los 26 °C desde los meses de febrero hasta abril.

Para verificar la eficacia del proceso de activación, se realizó el monitoreo de la abundancia de microorganismos en la mezcla líquida, registrando en tiempo requerido para alcanzar un conteo de  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^8$  UFC/mL. Según Castro y González (2021) durante la activación de los MM se debe realizar un monitoreo de la proliferación de los microorganismos. Esto garantiza que el inóculo que será utilizado para su posterior adición a procesos de tratamiento cuente con la abundancia de microorganismos necesaria para la reducción de los contaminantes de interés.

El proceso de activación de los MMS fue monitoreado diariamente durante cuatro días. En este lapso se realizaron cuantificaciones diarias de los microorganismos presentes en las mezclas preparadas, para determinar cuál de los tratamientos reportaba un mayor crecimiento de microorganismos en un menor tiempo y con la menor cantidad de nutrientes posible. Estas variables serán favorables en caso de que el proceso se deba escalar a un mayor volumen, optimizando los costos de activación de los MMS.

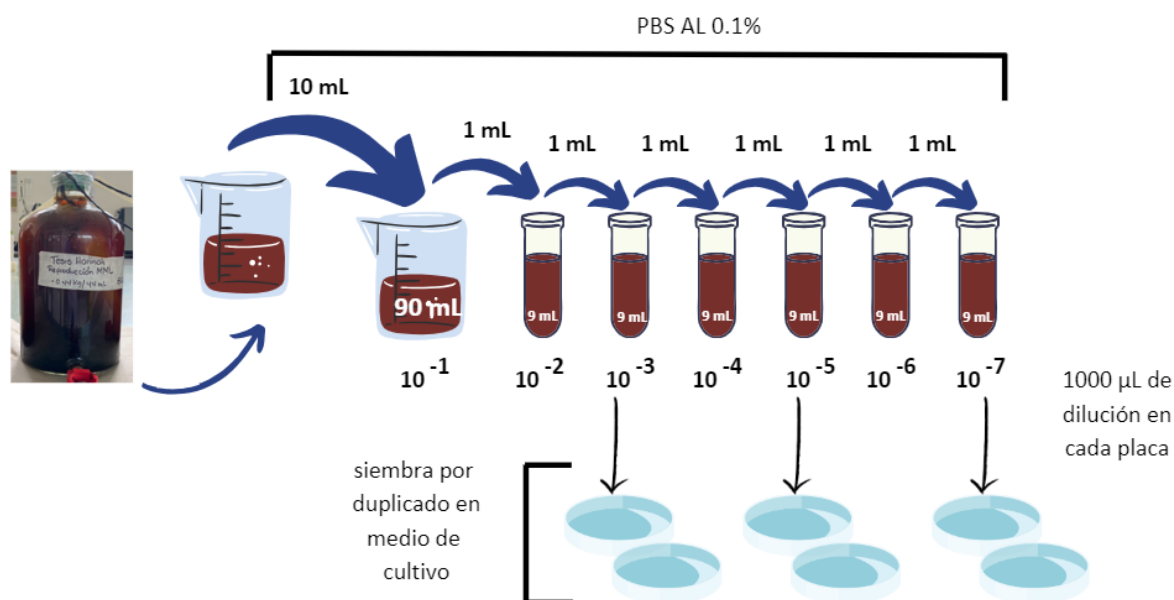
#### ***Cuantificación de los Microorganismos de Montaña (MM)***

Para la cuantificación de los microorganismos de montaña activados (MMA) (Figura 2) se homogenizó la mezcla y se extrajo una alícuota de 50 mL. A partir de esta submuestra, se realizaron diluciones de 10 mL en 90 mL de solución tampón fosfato salino (PBS) al 0.1 %. A partir de este inóculo se realizaron diluciones seriadas 1:10 ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$ ) utilizando la misma solución. A partir de las diluciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ ) se inoculó por duplicado 1000  $\mu$ L en placas Petri con Agar nutritivo (AN), con la metodología de vaciado en placa (Wilson et al., 2017), que posteriormente se incubaron a una

temperatura de 35 °C durante 24 horas previo a su lectura. Se seleccionaron las placas que presentaron conteos entre 30 y 300 UFC para el reporte de resultados.

**Figura 2**

*Esquema de Inoculación de Muestra en el Medio de Cultivo*



Se llevó a cabo un análisis de datos que se centró en la variable de tiempo, el crecimiento de los microorganismos de montaña (MM) y el pH. Este análisis se basó en técnicas estadísticas descriptivas y se utilizó una única repetición para cada uno de los cinco tratamientos. El criterio de selección para definir el protocolo final de activación, fue el que mejor se adaptó a las condiciones que se querían replicar en el laboratorio, siguiendo el protocolo de la activación que se realiza en campo según Kondo et al. (2012), cambiando las variables de kilogramo de MMS y cantidad de melaza suministrada.

## **Evaluar el Efecto de la Dosificación de Microorganismos de Montaña (MM), en la Reducción de Materia Orgánica (MO) Presente en Fluentes de la Planta de Lácteos**

### ***Toma de Muestras y Caracterización del Agua Residual***

Se recolectó un total de cinco muestras del efluente de la Planta de Lácteos de Zamorano entre los martes, miércoles y jueves del mes de marzo de 2023, en donde la planta procesa una mayor cantidad de leche y se realiza la elaboración de quesos, yogurt, crema, entre otros productos lácteos. Para el montaje de los biorreactores se recolectó 5 L del efluente en la jornada de la mañana y tarde, teniendo una muestra compuesta del día de trabajo. En cada toma de muestra se tomó un aforo indirecto de la entrada de la fosa séptica y caudal promedio diario del agua residual que ingresa al sistema, aplicando la Ecuación 1:

$$Q = \frac{V}{T} \quad [1]$$

Donde:

Q = Caudal L/min

V = Volumen de entrada en litros

T = Tiempo en minutos

Por cada aforo se recolecto 1 L de agua residual que al final dio 5 L por la mañana o 5 L por la tarde, realizando una muestra compuesta de la jornada. La recolecta se realizó en envases de plástico preservados a 4 °C. Los análisis fisicoquímicos se desarrollaron conforme a los métodos descritos en el Cuadro 2.

## Cuadro 2

### *Análisis de Laboratorio*

Ensayo	Metodología
Sólidos Totales	2540 B. Método de sólidos totales secados a 103 – 105 °C
Sólidos Volátiles	2540 E. Método de sólidos fijos y volátiles 550 °C
Temperatura	2550 B. Método de laboratorio y campo
pH	4500-H <sup>+</sup> B. Método electrométrico
DQO	5220 D. Reflujo cerrado, método colorimétrico

### **Montaje de los Biorreactores**

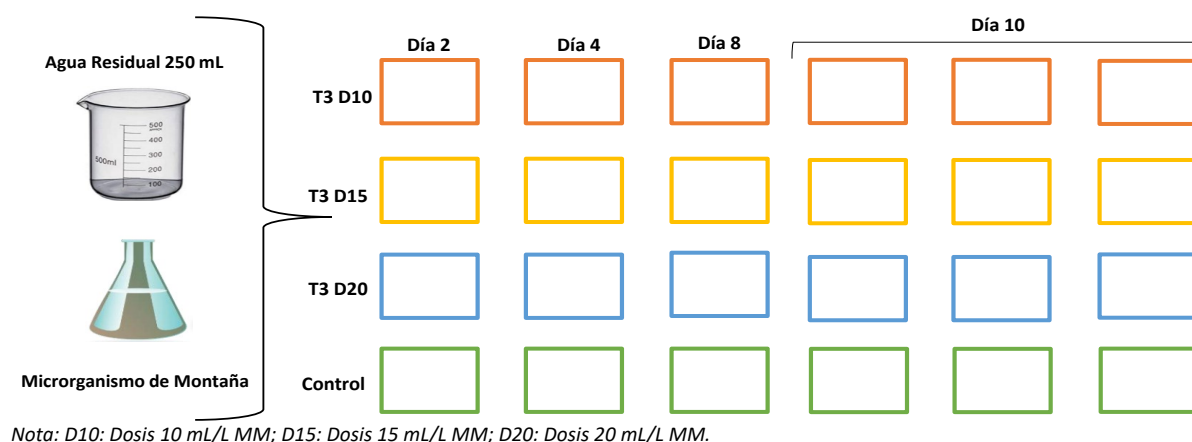
Se utilizaron 24 frascos de suero en los que se adicionaron 250 mL del efluente residual recolectado. El proceso de inoculación se realizó con la mezcla de MMA formulada a partir de 22 mL de melaza y 0.44 kg de MMS. Las dosis aplicadas fueron de 10, 15 y 20 mL de MM/L efluente (Díaz y Chules, 2019; Noles, 2016). Además, se realizó el montaje de un control al cual no se realizó ninguna adición de MM, y solamente se incluyó el efluente en las mismas proporciones de los demás tratamientos.

Luego de completar el proceso de inoculación, los reactores fueron sellados herméticamente con un tapón de goma y metálico para garantizar la permanencia de un medio anaeróbico. El ensayo se mantuvo a temperatura ambiente por espacio de 10 días para simular condiciones de operación de la fosa séptica.

Se utilizaron seis reactores para los diferentes tratamientos que fueron los siguientes: Control, sin adición de microorganismos (Control), T3 dosificación de 10 mL/L (T3 D10), T3 dosificación de 15 mL/L (T3 D15) y T3 dosificación de 20 mL/L (T3 D20) en el agua residual (Figura 3). Durante los días del experimento se monitorearon distintas variables para optimizar la eficiencia de los microorganismos de montaña, las cuales son temperatura, irradiancia y pH.

**Figura 3**

*Diagrama Experimental para la Toma de Muestras y Dosificación*



Se realizaron ensayos de caracterización de los reactores al inicio del experimento (día cero), y en los días 2, 4, 8 y 10. Para los días intermedios solo se abrió una réplica de los reactores por tratamiento con el fin de monitorear la concentración de sólidos totales y sólidos volátiles, y el comportamiento de los microorganismos en el tiempo. Por otro lado, en el día 10 se analizaron tres repeticiones con el fin de conocer la eficiencia global de los tratamientos en la reducción de la materia orgánica presente en el agua residual evaluada conforme a los ensayos descritos en el Cuadro 3. Se extrajo una alícuota de 100 mL homogenizada de cada biorreactor por tratamiento. Antes de abrir un frasco se registró la presencia de nata, sedimentos, producción de gas que había en cada biorreactor durante los 10 días.

**Cuadro 3**

*Ensayos para la Caracterización de los Reactores*

Ensayo	Metodología
Solidos Totales	2540 B. Método de solidos totales secados a 103 – 105 °C
Solidos Volátiles	2540 E. Método de solidos fijos y volátiles 550 °C
Temperatura	2550 B. Método de laboratorio y campo
pH	4500-H <sup>+</sup> B. Método electrométrico
DQO	5220 D. Reflujo cerrado, método colorimétrico
Cuantificación de microorganismos	Cuantificación de UFC por mL de muestra

### **Cuantificación de los Microorganismos de Montaña (MM)**

Se realizó la cuantificación de los microorganismos de montaña desde el día cero en el agua residual y las diferentes inoculaciones realizadas para los diferentes tratamientos hasta alcanzar el periodo de retención de 10 días. Los procesos de cuantificación se realizaron conforme a los ensayos descritos en el Cuadro 4. Para el crecimiento de bacterias se usó agar nutritivo (AN), para estimular el crecimiento de bacterias y para el crecimiento de hongos y levaduras en el medio de Agar de extracto de levadura, pepona y dextrosa (APD) con kanamicina y ampicilina (Figura 4). Se aplicó estos dos antibióticos para inhibir el crecimiento de bacterias en el medio de cultivo. Para la siembra de bacterias se usó el método de vaciado en placa y para levaduras y hongos se aplicó la extensión en superficie. Todos los platos de cultivo se incubaron a una temperatura de 35 °C durante 24 horas.

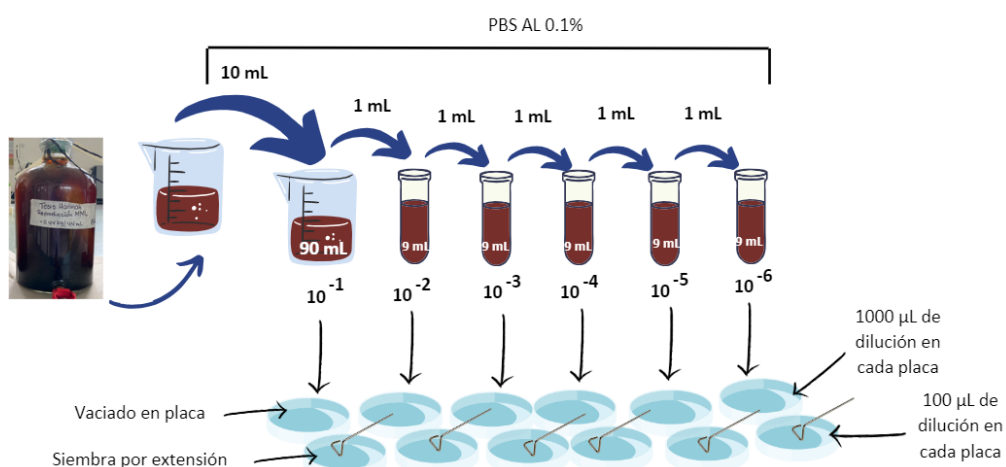
#### **Cuadro 4**

##### *Método para Cuantificación de Microorganismos*

Nome del ensayo	Medio de cultivo	Referencia
Recuento por vaciado en placa	Agar nutriente	(Wilson et al., 2017)
Recuento por extensión en placa	Agar de extracto de levadura, pepona y dextrosa con kanamicina y ampicilina	(Wilson et al., 2017)

#### **Figura 4**

##### *Esquema de Inoculación de Muestra en el Medio de Cultivo.*



Con el fin de conocer cuál de las diferentes dosificaciones tuvo una mejor remoción de la materia orgánica, se estimó la eficiencia de reducción de los mg/L de sólidos volátiles contenidos en cada reactor aplicando la Ecuación 2:

$$N = \frac{VI - VF}{VI} \times 100 \quad [2]$$

Donde:

N = Eficiencia de remoción.

VI = Valor inicial del experimento.

VF = Valor al final del experimento.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante técnicas estadísticas descriptivas. Para determinar si existe diferencia entre las dosis aplicadas y la reducción de la materia orgánica en el efluente residual. Además, se realizó un análisis del experimento llevado a cabo el día 10, el cual constaba de tres tratamientos y un grupo de control con tres repeticiones cada uno. Para este caso, se aplicó una estadística inferencial mediante el uso de un análisis de varianza (ANDEVA) y para los datos que no presentaron diferencia significativa se realizó el análisis de "Kruskal Wallis", y a su vez se realizó una separación de medias utilizando el análisis de "Tukey" para identificar que grupos difieren significativamente. Estos métodos permitieron obtener información detallada sobre las características del agua residual y evaluar las diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Estos análisis se realizaron mediante el "software" estadístico de JMP ("Java Memory Profiler").

## Resultados y Discusión

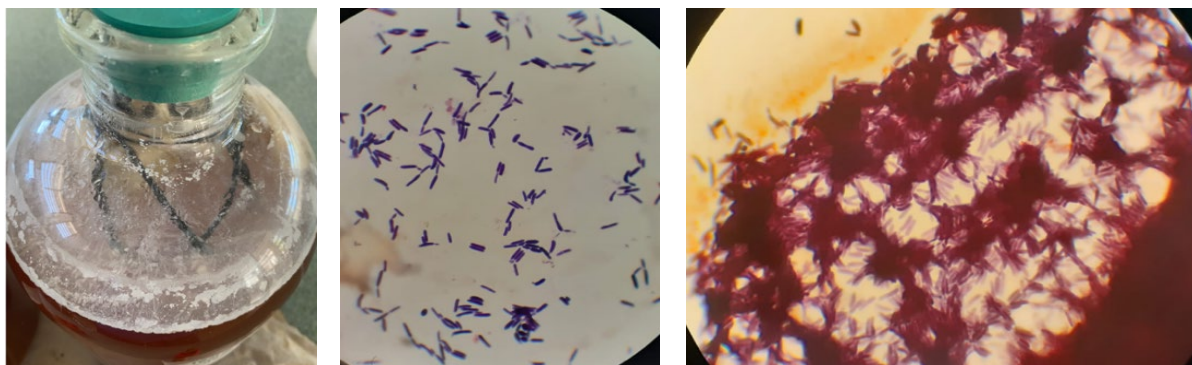
### Protocolo Sistemático para la Activación de los Microorganismos de Montaña Sólidos

#### (MMS)

Durante el proceso de activación de los MM, se consideró el monitoreo de factores como el tiempo requerido para el proceso de activación, el crecimiento de microorganismos, la verificación de su género mediante una tinción de "Gram" y el conteo de la abundancia mediante conteos en placa. Lo anterior es de importancia ya que tanto la mezcla como la abundancia promueve un mayor consumo de nutrientes, y la competencia entre las bacterias y levaduras presentes en el consorcio de MM (Figura 5). Para la extracción de una muestra homogénea de los biorreactores no se tomó la capa superior formada durante el proceso de activación, ya que generalmente se compone de bacilos y puede alterar la composición de la mezcla líquida.

#### Figura 5

*Vista Desde el Microscopio de los Bacilos Gram Positivos*

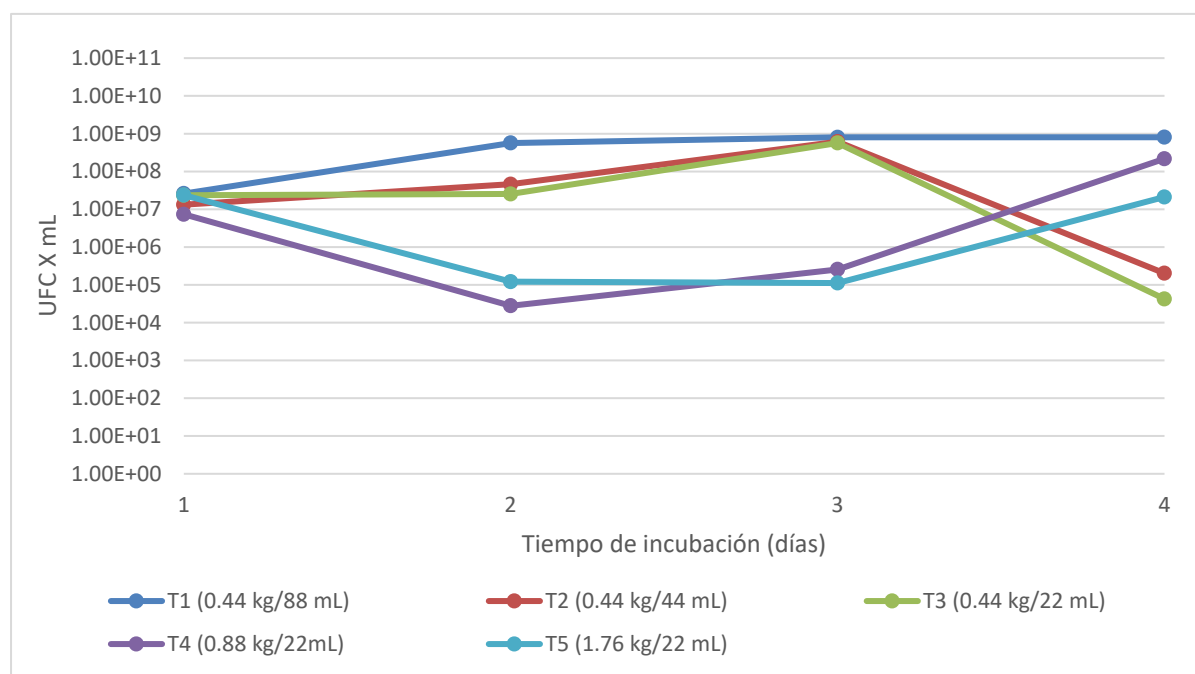


En los T1, T2 y T3 (Figura 6) se reporta un mayor crecimiento al segundo día, alcanzando valores de superiores a  $1 \times 10^6$  UFC/mL. El estudio de Castro y González (2021), demostró que para procesos de bioaumentación se requiere un aporte que se encuentre en un rango de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  UFC/mL. El crecimiento obtenido en estos tres tratamientos se encuentra dentro de este rango y luego de alcanzar el límite inferior el inóculo se considera apto para aplicar a los procesos de bioaumentación. Por otro lado, los T4 y T5, tuvieron un crecimiento superior a  $1 \times 10^6$  UFC/mL hasta

el día 4, al no tener una mayor fuente de nutrientes, los MM estuvieron un mayor tiempo en estado de latencia para adaptarse al medio. Por esta razón el protocolo que mostro las mejores condiciones para la preparación de la mezcla de MM previo a su aplicación en el residuo fue el T3 (0.44 kg MMS/ 22 mL melaza) que tuvo un máximo crecimiento de  $5.66 \times 10^8$  UFC/mL, en un tiempo de 3 días y añadiendo una menor dosis de nutrientes favoreciendo el uso del residuo como sustrato por parte de los microorganismos.

**Figura 6**

*Crecimiento de Microorganismos de Montaña Activados (MMA) en UFC/mL*

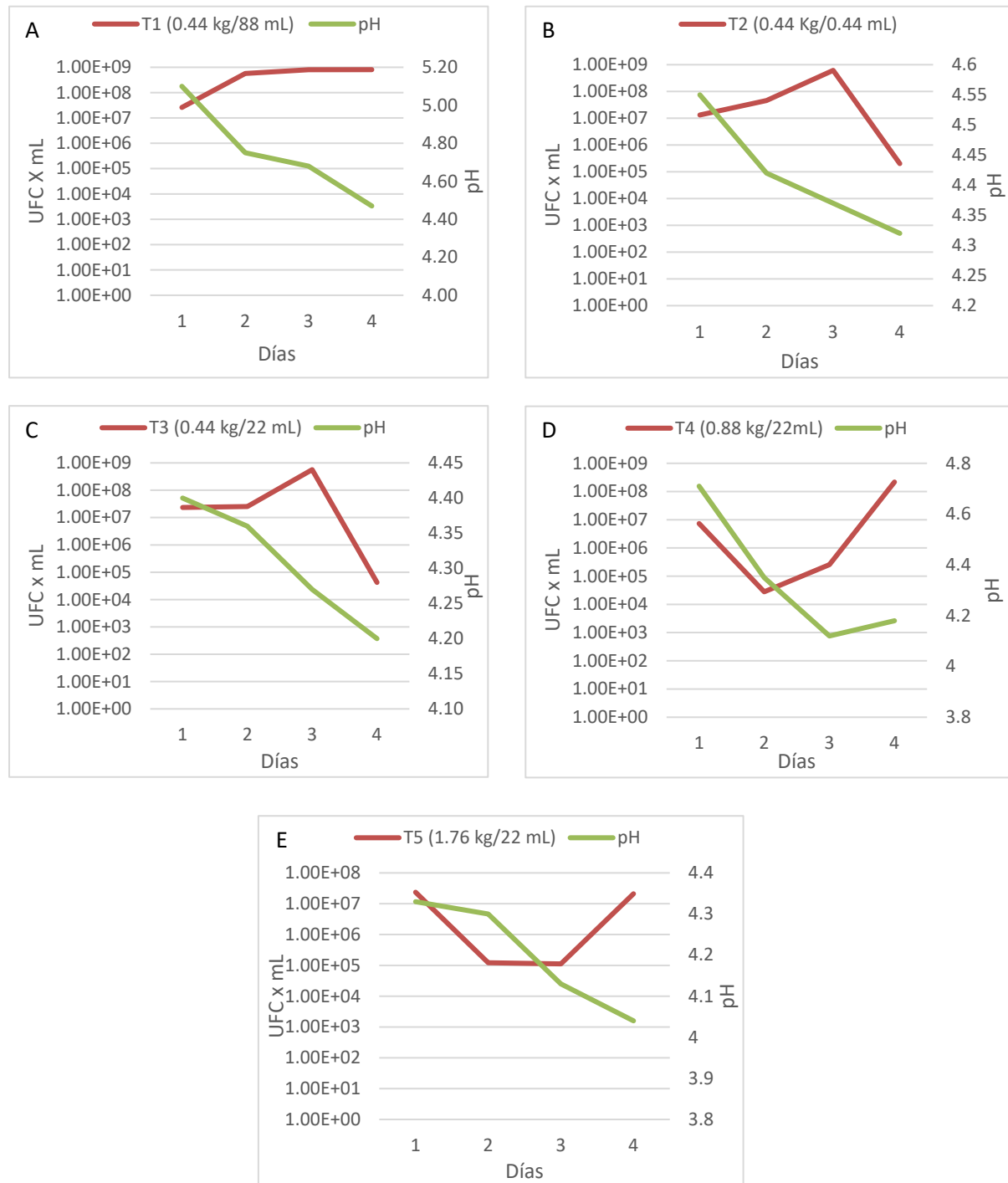


Por otra parte (Figura 7. A, B, C, D y E), a medida que los microorganismos aumentan durante el periodo de activación de los MMS, se registra una disminución en el valor del pH. Este proceso puede atribuirse a la liberación de ácidos orgánicos y otros metabolitos producidos durante su actividad biológica. En la investigación realizada por Castro y González (2021), se pudo demostrar que a medida que los MMA experimentan un mayor crecimiento, se produce una disminución en el pH, esa investigación tuvo una duración aproximada de 136 días, en los cuales se observó que cuando los microorganismos ingresaban a la fase exponencial, el pH disminuía. Por otro lado, cuando los

microorganismos entraban en la fase de muerte celular, el pH aumentaba, llegando incluso a alcanzar un valor de 6.

**Figura 7**

*Crecimiento de Microorganismos de Montaña Activados (MMA) UFC/mL y pH*



Con respecto a crecimiento microbiano y el pH, el tratamiento que obtuvo mejores resultados fue el T3 (0.44 kg/ 22 mL). Se resumen las variables para la activación de los MM que proporcionaron el desempeño conforme a los criterios de selección (Cuadro 5), para lo cual se mantienen las etapas descritas en la metodología de activación (Anexo B).

### **Cuadro 5**

#### *Requerimientos para la Activación de MMS*

Variable	Especificación
MMS	0.44 kg
Agua	4 L
Melaza	22 mL
Temperatura	Ambiental
Tiempo	3 días
Oxígeno	0 mg/L (medio anaerobio)
pH	3 – 5
Crecimiento microbiano	$1 \times 10^6 - 1 \times 10^8$ UFC/mL

### **Efecto de la Dosificación de MM en la Reducción de Materia Orgánica**

#### ***Cuantificación del Volumen del Efluente***

Se cuantifico un efluente promedio de 32 m<sup>3</sup>/día, con fluctuaciones entre 0.04 – 1.93 m<sup>3</sup>/h (Cuadro 6), los mismos varían dependiendo de la jornada de trabajo. Se encontró que durante la jornada matutina, la Planta de Lácteos de Zamorano presentó mayores caudales de entrada entre las 7:00 a.m. hasta las 8:30 a.m. durante este tiempo dentro de la planta se realiza limpieza de los equipos, así como indica Ahmad et al. (2019) la demanda diaria de agua en la industria láctea se debe a la limpieza de los equipos. Por otro lado, durante el horario en el que se llevaron a cabo los aforos, dentro de la Planta de Lácteos hubo producción de crema ácida, queso crema, leche entera, descremada y semidescremada, así como agua de limpieza.

## Cuadro 6

### *Caudal Promedio de Entrada a la Fosa Séptica*

Días	Q m <sup>3</sup> /h Mínimo	Q m <sup>3</sup> /h Máximo	Q m <sup>3</sup> /h Promedio
Martes – Semana 1	0.04	1.50	0.474
Miércoles – Semana 1	0.17	1.41	0.501
Miércoles – Semana 2	0.30	1.07	0.511
Jueves – Semana 2	0.51	1.93	1.326
Jueves – Semana 3	0.15	0.46	0.335

### **Caracterización Físicoquímica del Efluente**

Las características físicoquímicas, así como la concentración de contaminantes presentes en un efluente residual, se encuentran directamente asociadas a la actividad o proceso que lo generó. En el caso de la Planta de Lácteos se observa una alta variabilidad en la composición del efluente, lo cual se vincula al desarrollo de actividades productivas puntuales como la limpieza de equipo e instalaciones o la elaboración de queso, en donde se registran descargas de suero en el efluente residual.

De acuerdo con el Cuadro 7, las mayores concentraciones de sólidos totales son de 12,061.11 mg/L y los sólidos volátiles 8,593.33 mg/L se registraron en la muestra compuesta por dos jornadas de trabajo. Según la Baird et al. (2017) la concentración de sólidos volátiles proporciona una aproximación de la cantidad de materia orgánica presente en los sólidos de las aguas residuales industriales.

Por otra parte, las muestras 2, 3 y 4 reportaron pH alcalinos (pH > 7.0); esto se debe a que durante el muestreo se estaba realizando limpieza de equipo e instalaciones. Según Martínez y Sánchez (2002), los productos de limpieza presentan valores de pH de hasta 13, lo cual impacta en la calidad de los efluentes residuales generados. En adición, el volumen de agua generado durante los procesos de limpieza tiene un efecto de dilución sobre el contenido de sólidos y materia orgánica presente en el agua residual.

**Cuadro 7***Caracterización de las Muestras Recolectadas de Agua Residual*

Muestra	pH	Temperatura °C	Sólidos totales (mg/L)	Sólidos volátiles (mg/L)	DQO (mg/L)
Muestra 1 (mañana y tarde)	6.26	25.00	12,061.11	8,593.33	12,040
Muestra 2 (mañana)	11.63	25.00	1,096.67	623.33	744
Muestra 3 (mañana)	9.34	25.00	1,112.22	907.78	460
Muestra 4 (tarde)	10.69	25.00	2,846.67	2,577.78	3,500

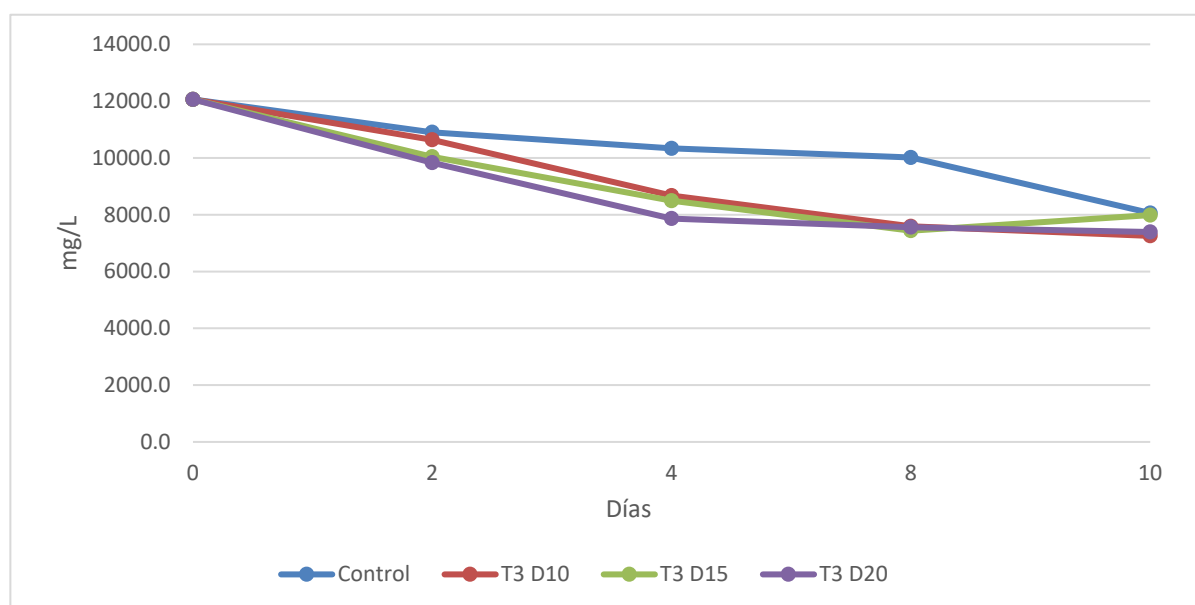
**Monitoreo de los Biorreactores**

Durante el proceso de tratamiento mediante el uso de los biorreactores anaerobios, se observaron diferentes características vinculadas con la actividad de los microorganismos. En primer lugar, cada biorreactor acumuló un volumen diario de gas que era liberado del sistema para evitar incrementos en la presión interna. Además, para los sedimentos y natas se observó que durante los 10 días estos iban disminuyendo.

Se presentan los valores de sólidos totales (ST mg/L) (Figura 8) para cada tratamiento a lo largo del experimento. Todos los tratamientos y el control tuvieron la misma dinámica de remoción de los sólidos totales y se observa que en el día cero tenían un valor de sólidos totales de 1,200 mg/L y para el día 10 el valor fue de 800 mg/L. Se hace notar que entre los días 4 y 8 se observa que los tratamientos con la inoculación de MM alcanzan una menor concentración de sólidos totales, lo cual podría impactar de forma positiva la reducción del tiempo de retención requerido para la reducción de este componente.

**Figura 8**

Valores de Sólidos Totales (mg/L) por Cada Tratamiento a lo Largo del Experimento



Como resultado del análisis de varianza (ANDEVA) (Cuadro 8) se observa que el valor de la probabilidad asociada a la razón F (Prob > F) es de 0.3248. Este valor indica que no se encontraron diferencias significativas entre las medias de sólidos totales correspondientes a los diferentes tratamientos, indicando que la adición de MM no contribuye al incremento en la eficiencia de remoción de este componente.

### Cuadro 8

ANDEVA de Sólidos Totales por Dosis mg/L

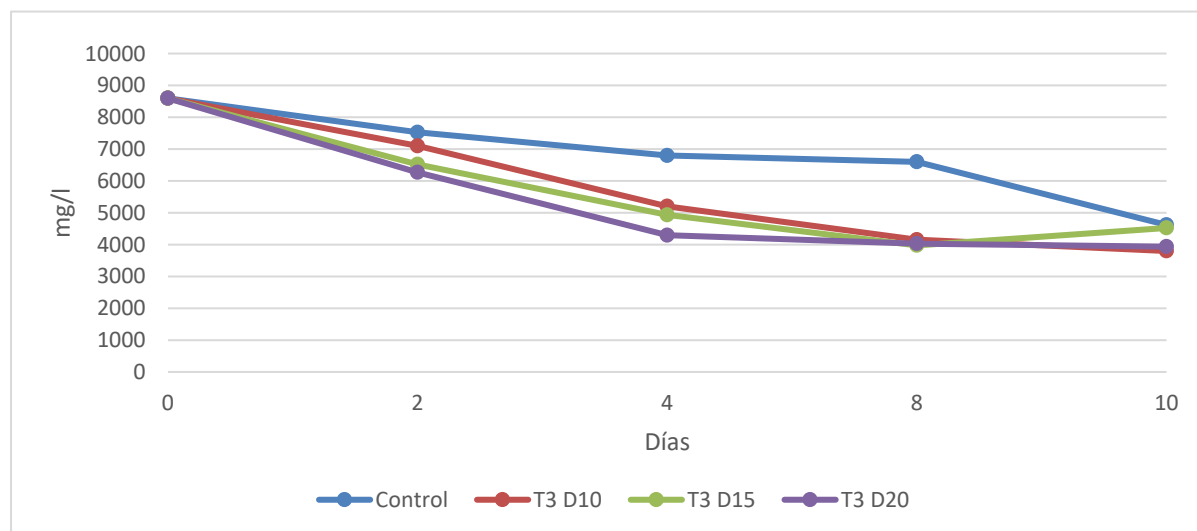
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Dosis mL/L	3	1'506,547.3	502,182	1.3519	0.3248
Error	8	2'971,730.3	371,466		
Total	11	4'478,277.6			

Para el análisis de reducción de materia orgánica, expresada en término de los Sólidos Volátiles (SV mg/L) (Figura 9) se observa el mismo comportamiento que con la reducción de los sólidos

totales. Asimismo, no se encontró diferencias significativas entre las concentraciones de sólidos volátiles de los biorreactores al finalizar el periodo de tratamiento de 10 días.

**Figura 9**

*Valores de Sólidos Volátiles (mg/L) por Cada Tratamiento a lo Largo del Experimento*



A pesar de que se reportan eficiencias de reducción de sólidos volátiles superiores al 45%, para evaluar el efecto de los MM se espera alcanzar una diferencia significativa (Cuadro 9) entre el control negativo y los biorreactores con adición de MM. El porcentaje de remoción de los tratamientos con MM no difiere del desempeño encontrado en el control negativo, dado que los microorganismos que se encuentran en el efluente residual ya realizan un proceso de remoción sin necesidad de requerir un proceso de bioaumentación.

**Cuadro 9**

*ANDEVA de Sólidos Volátiles por Dosis mL/L*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Dosis mL/L	3	1'527,296.7	509,099	1.3657	0.3210
Error	8	2'982,139.1	372,767		
Total	11	4'509,435.8			

El Cuadro 10, proporciona los valores de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en (mg/L) para diferentes muestras incluyendo el valor inicial de 12,040 mg/L, hasta los valores finales que se tomaron en el día 10. Para lo cual, el tratamiento que presentó una mayor reducción de DQO fue el T3 D10 que registra 2,679 mg/L con respecto al control que tuvo 1,910 mg/L.

### **Cuadro 10**

*Valores Demanda Química de Oxígeno (DQO)*

Muestra	DQO mg/L O <sub>2</sub>
DQO inicial	12,040
Control	10,130
T3 D10	9,370
T3 D15	10,250
T3 D20	9,775

En el Cuadro 11 se observan valores numéricos de los porcentajes de remoción de sólidos totales y sólidos volátiles y DQO para los diferentes tratamientos. Los valores expresan el grado de eficiencia en la reducción de materia orgánica presente en el agua residual de la Planta de Lácteos de Zamorano. Se observa que los microorganismos anaerobios presentes en el control actuaron para ayudar a la reducción de la materia orgánica, en la bioaumentación es decir a los tratamientos que se les adiciono microorganismos si hubo una remoción de la materia orgánica pero no es significativa con respecto al control, puesto que las bacterias ácido lácticas encontradas en el efluente residual de la Planta de Lácteos contribuyen con la reducción de la materia orgánica presente al estar en un medio anaeróbico estricto. Además, este consorcio de microorganismos se encuentra adaptados al efluente, lo cual hace que la remoción sea eficiente.

Por otro lado, el tratamiento T3 D10 tuvo la mayor eficiencia en la remoción de sólidos totales, sólidos volátiles y DQO, lo valores registrados son 43.93, 61.57 y 22.18% respectivamente. Sin embargo, al comparar este desempeño frente al control solamente se obtiene un incremento en la eficiencia de remoción de 9.66% para SV y 6.32% para DQO. Considerando, el costo adicional que representaría la incorporación de MM en la escala requerida para la Planta de Lácteos y la posible

variación en la calidad del efluente, esta modificación en el proceso de tratamiento no tendrá un impacto relevante en el incremento de la eficiencia de depuración del efluente. En el estudio de Noles (2016) usaron la misma relación de 10 mL/L para agua doméstica y se demostró que este tratamiento tuvo una mayor remoción de sólidos totales a comparación de los otros tratamientos.

### **Cuadro 11**

*Eficiencia de Remoción de Sólidos Totales (ST), Sólidos Volátiles (SV) y Demanda Química de Oxígeno (DQO)*

Muestras	% ST	% SV	% DQO
Control	36.55	51.91	15.86
T3 D10	43.93	61.57	22.18
T3 D15	32.14	45.20	14.87
T3 D20	33.16	46.99	18.81

### **Cuantificación de Microorganismos en Biorreactores**

Para evaluar la actividad de los MM durante el proceso de degradación de materia orgánica en los biorreactores, se realizó el conteo de bacterias y levaduras al inicio del experimento y en intervalos de 2 días. Los conteos de bacterias y levaduras al inicio del experimento para el efluente de agua residual y el inóculo T3 (0.44 kg/ 22 mL) se presentan en el Cuadro 12. Se hace notar que el efluente residual cuenta con una población de bacterias y levaduras comparable a la del inóculo de MM. Lo anterior se debe a que el efluente lácteo posee bacterias ácido lácticas, utilizadas para el proceso de leche, queso y yogurt entre otros productos de esta Planta.

### **Cuadro 12**

*Crecimiento de Bacterias y Levaduras*

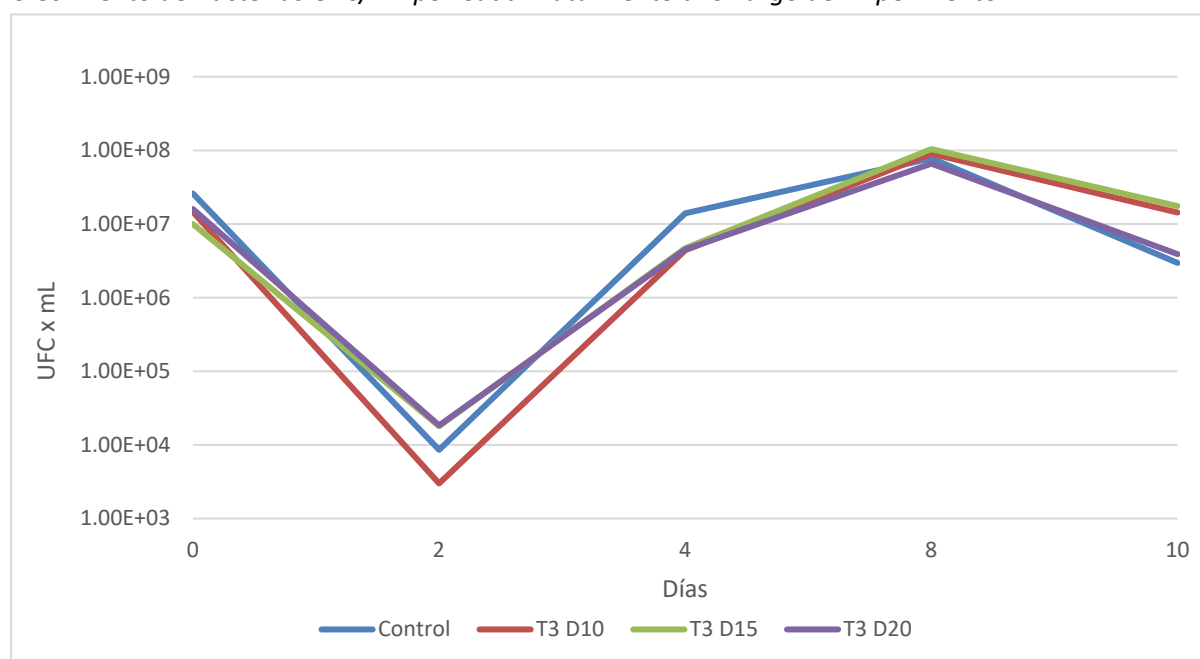
Muestra	Bacterias UFC/mL	Levaduras UFC/mL
Muestra 1 (efluente)	$2.60 \times 10^7$	$1.00 \times 10^4$
T3 (0.44 kg/22 mL) (inóculo)	$1.02 \times 10^8$	$2.00 \times 10^4$

La dinámica de crecimiento de bacterias UFC/mL por cada tratamiento se presenta en la Figura 10, en donde se observa la disminución del UFC/mL durante los primeros 2 días, lo cual

concuera con el periodo de adaptación de los microorganismos a las condiciones anaerobias estrictas del biorreactor. Por otra parte, el inóculo de MM se sometió a un medio con pH neutro, lo cual puede inhibir el desempeño de este consorcio de bacterias. Sin embargo, luego del 4 día se alcanza un crecimiento con valores superiores a  $1.00 \times 10^7$  UFC/ mL.

**Figura 10**

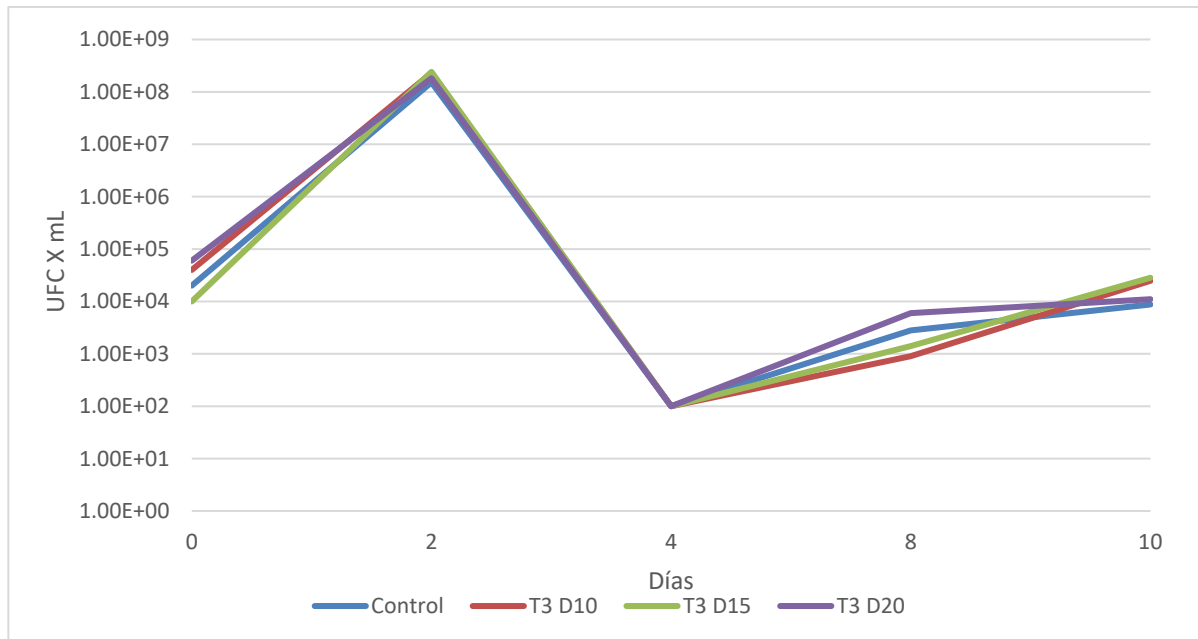
*Crecimiento de Bacterias UFC/mL por Cada Tratamiento a lo Largo del Experimento.*



Para el caso de la población de levaduras y hongos filamentosos (UFC/mL) (Figura 11) por cada tratamiento, se registra un crecimiento exponencial durante los primeros dos días del experimento, alcanzando un valor de  $1.00 \times 10^8$  UFC/mL. Esto denota la existencia de una relación inversamente proporcional entre el crecimiento de bacterias con respecto a las levaduras y hongos, que se verifica al incrementar la población de bacterias en el medio, resultando paralelamente en la reducción del conteo de hongos y levaduras. Sin embargo, esta dinámica se observa en todos los tratamientos incluyendo el control negativo. Lo anterior puede indicar que una gran parte de los MMA no logró adaptarse al medio y prevalecieron los microorganismos presentes en el efluente residual.

**Figura 11**

*Crecimiento de Levaduras y Hongos UFC/mL por Cada Tratamiento a lo Largo del Experimento.*



### **Conclusiones**

El protocolo que reporta mejores resultados para la activación de los microorganismos de montaña (MM) fue al combinar 0.44 kg de MM y 22 mL de melaza en un volumen total de 4 L de solución. Al presentar una menor disponibilidad de nutrientes, luego de completarse el periodo de activación inicia la curva de decaimiento, favoreciendo que el residuo a tratar sea el principal sustrato para suplir sus requerimientos.

Al aplicar diferentes dosis de MM a biorreactores anaerobios con el efluente de la Planta de Lácteos de Zamorano, luego de 10 días de retención no se registra una diferencia significativa entre las eficiencias de remoción de materia orgánica de los tratamientos con adición de MM y el efluente sin la adición de estos. Lo anterior sugiere una limitada adaptabilidad del consorcio de microorganismos de montaña a este residuo, ya sea por sus características fisicoquímicas o por la competencia con la población de microorganismos presente en el efluente.

### Recomendaciones

Se recomienda la aplicación del tratamiento óptimo ( $T_3 = 0.44 \text{ kg}/22 \text{ mL}$ ) en residuos con población reducida de microorganismos para conocer el comportamiento de los MM en procesos de biorremediación.

Se recomienda la incorporación de mecanismos de agitación en los biorreactores para favorecer la homogenización del efluente y el contacto con el consorcio de microorganismos.

Evaluar la eficacia de los MM para el tratamiento de residuos sólidos para identificar nuevos campos de aplicación de estos microorganismos.

Realizar una investigación en la fosa séptica de la Planta de Lácteos de Zamorano para conocer el tiempo de retención hidráulica (TRH) y realizar análisis fisicoquímicos tanto a la entrada y salida, para cuantificar la remoción de materia orgánica del sistema.

## Referencias

- Ahmad, A., Amirreza, S. y Kourosh, R. (2019). A Review on Different Aerobic and Anaerobic Treatment Methods in Dairy Industry Wastewater. *Journal of Environmental Treatment Techniques*, 7(1).
- Baird, R., Eaton, A. D., Rice, E. W. y Bridgewater, L. (Eds.). (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (23rd edition). American Public Health Association.
- Brião, V. B. y Tavares, C. R. G. (2007). Effluent generation by the dairy industry: preventive attitudes and opportunities. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 24(4), 487–497. <https://doi.org/10.1590/s0104-66322007000400003>
- Campo-Martínez, e. a. (2014). Evaluación de microorganismos de montaña (MM) en la producción de acelga en la meseta de Popayán. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 12(1), 79–87. <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v12n1/v12n1a10.pdf>
- Cardoso, N. L. L., Silva, F. F., Silva, A. K. M., Ribeiro, J. A. T., Valinhas, R. V. e., Penido, W. D., Souza, I. B. S. de, Da Silva, J. A., Granjeiro, P. A., Magalhães, J. T. de y Gonçalves, D. B. (2022). Bioremediation of dairy wastewater using bacteria: A panoramic review. *Research, Society and Development*, 11(7), e30311729830. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i7.29830>
- Castro, L. y González, J. (2021). Factores relacionados con la activación líquida de microorganismos de montaña (MM). *Agronomía Costarricense*, 1(45), 81–92. <https://doi.org/10.15517/rac.v45i1.45703>
- Díaz, T. y Chules, C. (2019). *Determinación de la efectividad del uso de microorganismos de montaña para el tratamiento de las aguas residuales in vitro en el caserío de Chontamuyo - San Martín 2018* [Tesis de pregrado]. Universidad Peruana Unión. [https://repositorio.upeu.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12840/1944/Tito\\_Tesis\\_Licenciatura\\_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.upeu.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12840/1944/Tito_Tesis_Licenciatura_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Gaibor, J. (2014). Caracterización del agua residual generada en la planta de lácteos El Salinerito - parroquia Salinas - cantón Guaranda para el diseño de la planta de tratamiento. *Investigación Talentos*, 1(1), 1. <https://talentos.ueb.edu.ec/index.php/talentos/article/download/92/121>
- Haapala, K. R., Zhao, F., Camelio, J., Sutherland, J. W., Skerlos, S. J., Dornfeld, D. A., Jawahir, I. S., Clarens, A. F. y Rickli, J. L. (2013). A Review of Engineering Research in Sustainable Manufacturing. *Journal of Manufacturing Science and Engineering*, 135, Artículo 041013. <https://doi.org/10.1115/1.4024040>
- Higa, T. y Parr, J. (1994). Beneficial and Effective Microorganisms for a Sustainable Agriculture and Environment. *Environmental Chemistry Letters*. Publicación en línea avanzada. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0465-3>
- Higa, T. y Wididana, G. (1991). The Concept and Theories of effective Microorganisms. *In Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming.*, 118–124. <https://feedprotz.co.tz/wp-content/uploads/2019/10/CONCEPT-THEORIES-OF-EM-1.pdf>
- Kondo, S., Molina de Cuellar, Elizabeth del Carmen, Alcantar, J. G., Nelson Ramos, H., Núñez, M. d. J., Palacios, F. J., García Ortiz, Á. y Campos, María de los Ángeles (2012). Microorganismos. *Centro Nacional De Tecnología Agropecuaria Y Forestal (CENTA)*. [https://www.jica.go.jp/project/elsalvador/0603028/pdf/production/vegetable\\_04.pdf](https://www.jica.go.jp/project/elsalvador/0603028/pdf/production/vegetable_04.pdf)

- Lopez, E. y Nina, D. (2022). *Remoción de carga orgánica en aguas residuales con microorganismos de montaña y comercial* [Tesis de pregrado, Universidad Peruana Unión; PE]. repositorio.upeu.edu.pe. <https://repositorio.upeu.edu.pe/handle/20.500.12840/6135>
- Lucho, Medina, Beltrán, Juárez, Vázquez y Lizárraga. (2015). Diseño de fosas sépticas rectangulares mediante el uso de herramienta FOSEP. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 14(3), 757–765. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v14n3/v14n3a18.pdf>
- Martinez, A. y Sanchez (2002). Análisis químicos realizados en casos de intoxicaciones por detergentes y limpiadores. *Toxicol*, 19(2), 79–84. <https://www.redalyc.org/pdf/919/91919205.pdf>
- Noles, P. (2016). *Eficiencia in vitro de microorganismos (EM) en aguas residuales de lagunas de oxidación de la ciudad de Calceta, Bolívar, Manabí* [Tesis grado de magister]. Universidad de Guayaquil. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/35514/1/PATRICIO%20NOLES%20AGUILAR.pdf>
- Parra Huertas, R. A. (2010). Bacterias Ácido-Lácticas: Papel Funcional Nos Alimentos. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 8(1). <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>
- Pua, A. (2010). *Caracterización del consumo de agua de la planta de lácteos, Zamorano* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/14f9c32c-f9f8-4e32-b20d-ed3da9d07f0c/content>
- Raby, S. (2017). *Biological treatment of Monteverde gray water using effective microorganisms and mountain microorganisms* [Tesis de pregrado]. University of South Florida. [https://digitalcommons.usf.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1197&context=tropical\\_ecology](https://digitalcommons.usf.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1197&context=tropical_ecology)
- Rocha, L. (2015). *Aplicación de la digestión anaerobia para el tratamiento del efluente de la planta de lácteos de Zamorano y evaluación de su potencial energético* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/674293b9-26f5-470a-92d3-4a7a520408fa/content>
- Rodríguez, N. y Tafur, Z. (2020). Producción de Microorganismos de Montaña para el Desarrollo de una Agricultura Orgánica, 4, 1. [https://estaticos.qdq.com/swdata/files/950/950904418/CIIn\\_3256.pdf](https://estaticos.qdq.com/swdata/files/950/950904418/CIIn_3256.pdf)
- Umaña, S., Rodríguez, K. y Rojas, C. (2017). ¿Funcionan realmente los microorganismos de montaña (MM) como estrategia de biofertilización? Un enfoque de ingeniería de biosistemas. *Revista De Ciencias Ambientales*, 51(2), 133. <https://doi.org/10.15359/rca.51-2.7>
- Wilson, C., Lukowicz, R., Merchant, S., Valquier-Flynn, H., Caballero, J., Sandoval, J., Okuom, M., Huber, C., Brooks, T. D., Wilson, E., Clement, B., Wentworth, C. D. y Holmes, A. E. (2017). Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Research & Reviews. Journal of Engineering and Technology*, 6(4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6133255/>

Zeballos Heredia, M. F. (2017). *Caracterización de microorganismos de montaña (MM) en biofertilizantes artesanales* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/32881915-2d77-496a-b7cd-00bffb2a2eff/content>

**Anexos**

**Anexos A**

*Imágenes de la Fosa Séptica de la Planta de Lácteos de Zamorano*



## Anexos B

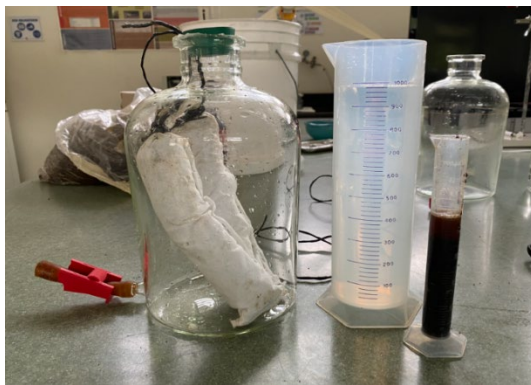
### *Protocolo Detallado para la Activación de los Microorganismos de Montaña*

Reactivos	Materiales
Agar Nutritivo	Balanza meter Toledo
Ampicilina	Tijera
Kanamicina	Melaza
YPD Agar	Grapas y grapadora
	Soga y cabuya
	Papel film y Parafilm
	Agua no clorada
	Microorganismos de Montaña Sólidos (MMS)
	Probeta de 100 mL
	Probeta de 1000 mL
	Tela o papel filtrante
	Biorreactores de 4L
	Tapón
	Micropipeta de 100 $\mu$ L y 1000 $\mu$ L
	Frascos de vidrio para dilución
	Asa
	Puntas de 1 mL y 0.1 mL
	Pipeta
	Microtubo
	Tubos de ensayo

#### Procedimiento para la activación

- Pesar los kg de MMS en la balanza meter Toledo.
- Con el papel filtrante hacer una bolsa y con ayuda de las grapas asegurarla.
- Colocar los MMS dentro de la bolsa, cerrarla y asegurarla con la cabuya.
- Medir la cantidad de melaza 22 mL en la probeta de 100 mL y en la probeta de 1,000 mL colocar agua y realizar una mezcla homogénea.
- Colocar la bolsa que contiene microorganismos de montaña dentro del biorreactor y verter la mezcla de agua y melaza.
- Después colocar 3,000 mL de agua en el biorreactor hasta el tope.
- Colocar el tapón en el biorreactor y asegurar con Parafilm, papel film y cinta.
- Colocarle una identificación al biorreactor con la cinta.

- Dejar los biorreactores a temperatura ambiente por 5 a 7 días.
- Realizar cuantificación de MM todos los días.



### Preparación de medios

- Agar nutritivo, preparar según las indicaciones del fabricante, pesando el polvo adecuado y añadir agua destilada en un matraz estéril.
- Agar YPD, preparación se debe tener extracto de levadura, peptona, dextrosa y agar, pesar cada uno dependiendo de las indicaciones del fabricante y añadir agua destilada en un matraz estéril.
- Colocar en el autoclave por 15 min.
- Para preparar kanamicina y ampicilina utilizando una dosis de 50 mg de dilución en 1 mL de PBS por L de medio. Añadir el antibiótico directamente en el microtubo y diluir posteriormente con 1 mL de PBS. Añadir la kanamicina y ampicilina al medio de YPD después de la esterilización del medio según lo preparado, es 0.1 mL de kanamicina y ampicilina por cada L de medio.

**Preparación de muestra**

- Extraer una alícuota de 100 mL de los MM activados (MMA) con una pipeta.
- Diluir 10 mL de MMA en 90 mL de PBS.
- Realizar un dilución seriada con tubos de ensayo de 9 mL de PBS, agregar 1 mL de la dilución realizada previamente con puntas de 1 mL y por cada dilución usar una punta nueva.

**Siembra por vaciado en placa**

- Colocar con la micropipeta 1000  $\mu$ L las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  en placas previamente esterilizada respectivamente
- Colocar en cada placa con la muestra, el medio agar nutritivo.
- Dejar reposar hasta solidificar y colocar en la incubadora a 35 °C por 24 horas.

**Siembra por extensión en placa**

- En placas estériles colocar de 20 a 25 mL del medio YPD anteriormente preparado y dejar reposar hasta solidificar.
- Colocar con la micropipeta de 100  $\mu$ L las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  en las placas previamente preparadas.
- Dejar reposar y colocar las placas en la incubadora a 35 °C por 24 horas.

**Cuantificación de microorganismos**

- Al transcurrir 24 horas en la incubadora sacar las placas y contar la cantidad de UFC en los medios de YPD y agar nutritivo.