

PROYECTO TERMINADO

Universidad	Universidad libre seccional Pereira
Programa Académico	Microbiología
Nombre del Semillero	
Nombre del Grupo de Investigación (si aplica)	Microbiotec, Microbiología y Biotecnología COL: GRUPO C
Línea de Investigación (si aplica)	Seguridad Alimentaria Biotecnología
Nombre del Tutor del Semillero	MSc. Elizabeth Castaño. MSc. Duverney Gaviria Arias.
Email Tutor	ecastano@unilibrepereira.edu.co
Título del Proyecto	Evaluación y formulación de microorganismos eficaces para el tratamiento de aguas residuales generadas por la industria porcícola en Risaralda.
Autores del Proyecto	MSc. Elizabeth Castaño. MSc. Duverney Gaviria Arias.
Ponente (1)	Elior Muñoz Tobón
Documento de Identidad	4516886
Email	emunoz.microbiologia@unilibrepereira.edu.co
Ponente (2)	Oscar Javier Montealegre Palma
Documento de Identidad	1018463690
Email	ojmontealegre.microbiologia@unilibrepereira.edu.co
Teléfonos de Contacto	3175756658-3124709821
Nivel de formación de los estudiantes ponentes (Semestre)	VIII semestre de Microbiología
MODALIDAD (seleccionar una- Marque con una x)	PONENCIA <ul style="list-style-type: none"> • Investigación Terminada X
Área de la investigación (seleccionar una- Marque con una x)	• Ciencias Naturales
	• Ingenierías y Tecnologías
	• Ciencias Médicas y de la Salud. X
	• Ciencias Agrícolas
	• Ciencias Sociales
	• Artes, arquitectura y diseño

Evaluación y Formulación De Microorganismos Eficaces para el Tratamiento De Aguas Residuales Generadas por la Industria Porcícola en Risaralda

Julian Izquierdo, Elijor Muñoz, Oscar Montealegre.

Resumen

Los microorganismos eficaces (ME) corresponden a la mezcla de bacterias foto-tróficas, bacterias productoras de ácido láctico, levaduras y hongos de fermentación que descomponen la materia orgánica encontrada en las aguas residuales, ayudando a disminuir la contaminación en el medio ambiente, su uso se ha implementado en el tratamiento de aguas residuales de origen residencial e industrial. Los resultados obtenidos fueron los esperados, durante las once (11) semanas de evaluación, la carga microbiana fue tan abundante, que el reporte fue incontable en cada una de las muestras, igual con el método de NMP, que fue totalmente turbio, a partir de tercer mes se presentaron en la mezcla número 2, unos cambios organolépticos visibles, que fueron indicador de la reducción de turbidez y poca sedimentación, comparado con las mezclas número uno y tres, otra diferencia significativa fue que no se presentó una gruesa sedimentación y la ausencia de burbujas blancas lo que indica acción de los microorganismos eficientes. En el presente estudio, se evaluó la capacidad de los microorganismos eficaces para el tratamiento de las aguas residuales producidas en la industria porcícola bajo condiciones de laboratorio, que permitan implementar acciones y minimizar la concentración y porcentaje de residuos líquidos y sólidos evaluando su efecto sobre las variables de demanda química y biológica de oxígeno, valores de sólidos disueltos.

Palabras clave: Agua residual, Bioindicadores, Contaminación, Microorganismos eficaces.

Introducción

Durante los últimos 15 años, el sector porcícola en Colombia ha experimentado un importante crecimiento y ha mejorado significativamente su productividad, lo cual ha permitido un avance en su competitividad al interior de la cadena, e incrementar su participación en el mercado interno con algunas opciones en el mercado exterior. La producción porcícola en el departamento de Risaralda ocupa el 4 puesto en el país y el departamento ocupa el tercer puesto en consumo de carne de cerdo después de Antioquia y Valle del Cauca con 9,4 kg de carne de cerdo al año por persona. Los residuos generados pueden ser de tipo orgánico (estiércol sólido o fresco y animales muertos) o inorgánicos. Pero sin lugar a dudas uno de los residuos que genera mayor controversia es la excreta porcina debido al volumen generado, sus características físico-químicas que dificultan su manejo; el bajo caudal y la escasa capacidad de autodepuración por descargas puntuales asociadas a las actividades de las Buenas prácticas agropecuarias, BPA.

El vertido de los residuos generados en una granja porcina puede afectar a las masas de agua tanto superficiales como subterráneas, con incidencias distintas según el componente de las excretas que se considere. Los microorganismos eficaces (ME) corresponden a la mezcla de bacterias foto-tróficas, bacterias productoras de ácido láctico, levaduras y hongos de fermentación que descomponen la materia orgánica encontrada en las aguas residuales, ayudando a disminuir la contaminación en el medio ambiente.

La tecnología de ME implica el crecimiento, aplicación, gestión y el restablecimiento de altas poblaciones de microorganismos beneficiosos en un entorno o sistema (Higa, 1995; Higa & Chinen, 1998; Higa & Wood). Un problema importante que enfrentan las poblaciones en todo el mundo es el tratamiento, eliminación y / o reciclaje de desechos sólidos (Higa, 1995; Higa & Chinen, 1998; Higa & Wood). En países como Australia y muchas naciones de Europa y Asia, incluso Japón, las empresas de gestión de residuos industriales utilizan con bastante éxito los ME.

Planteamiento del problema

La carne de cerdo –a pesar de las prohibiciones religiosas– es la carne de mayor producción y consumo en el mundo, esta presenta, con la carne de aves, las tasas de crecimiento más elevadas a escala mundial. Varios son los factores que se han conjugado para generar este fenómeno: por el lado de la demanda, han influido 1) Los cambios en los hábitos alimenticios derivados de los procesos de urbanización y del efecto de la publicidad en el consumo, 2) el crecimiento de la población y 3) el crecimiento del ingreso per cápita. Por el lado de la oferta, la implantación de un modelo tecnológico altamente eficiente al cual se pueden cuestionar su impacto ambiental, el trato poco humanitario a los animales y la inocuidad de los productos obtenidos.

El desarrollo de la industria porcícola en Colombia ha sido desde hace tres décadas una de las actividades agrícolas que ocupa un espacio de gran importancia en la producción y comercialización de ganado porcino, y en la generación de fuentes de trabajo para aquellos granjeros y agricultores que ven en ésta actividad una fuente de sustento económico.

Según las estadísticas suministradas por la asociación colombiana de poricultores para el año 2013, el Departamento de Risaralda contaba con un inventario porcino de 135.634 cabezas (3,2% del inventario porcino nacional), ocupando el 4^{to} puesto en el país y con una tasa de crecimiento del 24%. Pereira es la ciudad que concentra el 41,5% de este inventario, seguido por Santa Rosa de Cabal con una participación del 23,7%.

Actualmente en Colombia, el tratamiento y aprovechamiento de los subproductos que resultan de la porcicultura, son manejados de forma convencional con alternativas de reducción y mitigación de posibles impactos ambientales que pueden llegar a generar dichos productos. El manejo inadecuado de las aguas residuales ha generado un problema a nivel mundial, la presencia de gran cantidad de materia orgánica y otros compuestos que

emanan olores muy fuertes al ambiente, además de la aparición de vectores infecciosos como las moscas y el crecimiento de las poblaciones de microorganismos patógenos. El reúso de estas aguas sin el tratamiento adecuado, produce contaminación de los productos agrícolas causando enfermedades debido a la presencia de microorganismos patógenos.

La normatividad nacional relacionada con el manejo del agua, establece una serie de estrategias plasmadas en los siguientes documentos:

- _ Conpes 3458 de 2007, relacionado con política nacional de sanidad e inocuidad para la cadena porcícola, cuyo objetivo es mejorar el estatus sanitario y de inocuidad de la industria porcícola nacional (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2007).
- _ Resolución 2640 de 2007, Por la cual se reglamentan las condiciones sanitarias y de inocuidad en la producción primaria de ganado porcino destinado al sacrificio para consumo humano. (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO, 2007).

Esto ha permitido lograr avances en el desarrollo de los procesos de descontaminación del recurso hídrico. En este contexto, se han desarrollado e implementado diferentes instrumentos y estrategias, entre las cuales se destacan la política ambiental, en cuyo marco se han desarrollado diagnósticos, guías y modelos de priorización para la gestión de las aguas residuales; contribuyendo al fortalecimiento de la gestión para la descontaminación de las mismas.

La legislación colombiana, establece criterios de calidad del agua para vertimientos industriales, obligando a que se establezcan estrategias para favorecer la reducción de la carga contaminante (DBO, DQO, ST) y así poder destinar dichas aguas para las actividades agrícolas y pecuarias, sin que constituyan un riesgo significativo para el medio ambiente y la salud.

Se plantea la pregunta: será posible disminuir las variables de DBO, DQO y ST en aguas residuales de la industria porcícola en una granja certificada por el ICA en BPA?

Justificación

La planeación ambiental es un conjunto de lineamientos básicos que deben considerarse en la formulación de un proyecto productivo, con el objeto de que éste responda adecuadamente a los propósitos de conservación del entorno natural, la eficiente utilización de los recursos, el aumento en la productividad y el cumplimiento de la normatividad ambiental. Así, por tanto, con la planeación ambiental se pretende incorporar los aspectos ambientales al proceso de planificación productiva. La porcicultura, como cualquier otra actividad, no es ajena a estos lineamientos y está sometida cada día a una mayor presión debido a unas exigencias económicas, a un desarrollo tecnológico y a un manejo ambiental adecuado para ser una industria más competitiva. Por lo tanto, todo profesional del sector agropecuario debe tomar decisiones que obedecen o están directamente condicionadas por:

- _ Necesidades de producción: para lo cual se requiere conocer infraestructura necesaria, mano de obra, cronograma de actividades, y niveles de producción.
 - _ El consumo.
 - _ Normatividad vigente Decisiones legislativas, reglamentarias y presupuestales.
 - _ Decisiones de ordenación del territorio, urbanística e industrial.
- La adecuada planificación de una explotación debe tener por objeto aprovechar debidamente todos los recursos para sacar el máximo rendimiento. En forma integrada con su entorno y el equilibrio del buen uso de los factores internos la empresa debe buscar como mínimo cuatro tipos de directrices:
- _ Optimo Físico–Biológico. Integrando los recursos físicos (clima, suelo, topografía), y condiciones de la región, de acuerdo con la comparación de un uso actual vs. un uso potencial, establecer el óptimo de relaciones insumo producto y el óptimo físico – biológico.
 - _ Optimo social. Se pretende en este aspecto obtener apropiados resultados dentro del proyecto en las áreas de ocupación de mano de obra, niveles superiores de ingresos familiares que superen el “mínimo”, niveles óptimos de salud, nutrición, educación, vivienda, servicios, organización rural y comunal.

En términos generales la porcicultura no produce residuos, sino subproductos (estiércol), los cuales de no ser reutilizados y redistribuidos adecuadamente para el uso en agricultura pueden convertirse en excedentes y posteriormente en residuos; lo cual implica a su vez que no suponen un ingreso como abono orgánico sino un costo que debe soportar el ganadero para eliminarlos. Teniendo en cuenta que el estiércol es el principal subproducto que se genera en una explotación porcina y el que más controversia causa, se deben buscar soluciones globales y de carácter integrador, con implicación de todas las partes afectadas a fin de poder ofrecer soluciones a las condiciones de producción (MINISTERIO DE AMBIENTE, 2002).

- _ Minimizar la carga del estiércol (acciones en la alimentación).
- _ Minimizar el volumen (acciones en la granja).
- _ Mejorar las prácticas de manejo del estiércol.
- _ Integración entre agricultura y porcicultura.
- _ Cooperación entre entidades ambientales, de investigación, universidades y productores.

Para una adecuada gestión ambiental en una explotación porcina se debe tener en cuenta, en primer lugar: Identificar las principales entradas y salidas que se producen. Comprender cómo una granja intensiva que está incidiendo en el entorno requiere una primera aproximación global, ya que en ella tiene lugar infinidad de procesos biológicos complejos.

Localizar residuos, procesos generadores y fugas energéticas. Cuando se realiza un manejo inadecuado, las aguas residuales de la explotación como el estiércol, se convierten en las principales fuentes de contaminación, aunque un manejo o tratamiento adecuados pueden convertirlos en un recurso interesante desde el punto de vista agrícola o forestal. Introducir índices con valor medioambiental, como el consumo de agua, volumen de residuos generados o el consumo energético entre otros, a través del seguimiento periódico, relacionándolos respecto a la producción de carne a lo largo del tiempo. (MINISTERIO DE AMBIENTE, 2002).

Objetivos

Objetivo General:

Identificar mezclas de M.E. eficaces para tratar (Disminuir) las condiciones físico-químicas (DQO, DBO y ST) y microbiológicas de las aguas residuales de un predio productor porcícola certificado por el ICA en el departamento de Risaralda.

Objetivos Específicos:

- _ Caracterizar físico-química y microbiológicamente las aguas residuales de un predio porcícola certificado por el ICA.
- _ Formular diferentes tipos mezclas de microorganismos eficaces (ME) durante el tratamiento de las aguas residuales de esta industria en un predio porcícola certificado por el ICA.
- _ Evaluar la eficiencia de las mezclas de micro-organismos estudiadas sobre las características físico-químicas y microbiológicas de las aguas residuales del predio certificado y en estudio.
- _ Identificar las mezclas de micro-organismos más eficientes para recuperar las características físico-químicas y microbiológicas de las aguas residuales del predio certificado en estudio.

Marcos de referencia:

a. Agua residual

Las aguas residuales son materiales derivados de los residuos domésticos o de procesos industriales, los cuales por razones de salud pública y por consideraciones de recreación económica y estética, no pueden desecharse vertiéndolas sin tratamiento a los cuerpos de aguas naturales. El tratamiento de las aguas residuales da como resultado la eliminación de microorganismos patógenos, evitando así que estos microorganismos lleguen a los ríos. Específicamente el tratamiento biológico de las aguas residuales es considerado un tratamiento secundario ya que este está ligado íntimamente a dos procesos microbiológicos, los cuales pueden ser aerobios y anaerobios. El aumento en la demanda de agua tiene como

consecuencia un aumento en el volumen de los residuos líquidos, cuya descarga, sin una adecuada recolección, evacuación y tratamiento, deteriora la calidad de las aguas y contribuye con los problemas de disponibilidad del recurso hídrico. En la actualidad son muchas las corrientes hídricas que se ven afectadas por la creciente contaminación generada por los vertimientos de aguas residuales, generando condiciones anóxicas (casos ríos Bogotá, Medellín, Cali, Sogamoso, etc.).

Parámetros de calidad de las aguas

Parámetros biológicos

La calidad biológica del agua es definida con el uso de microorganismos indicadores ya que estos presentan un comportamiento similar a los patógenos en cuanto a su concentración, sensibilidad a factores ambientales y barreras artificiales, además, resultan más fáciles, rápidos y económicos de cuantificar (Cheng et al., 2015; Guo et al., 2015; Metcalf. & Eddy., 2003; Zhao et al., 2015).

En Colombia el decreto 1575 de 2007 por el cual se establece el sistema para la protección y control de la calidad del agua para el consumo humano, en el cual se exige que el agua debe cumplir con los siguientes valores admisibles desde el punto de vista microbiológico, dependiendo de dos diferentes técnicas aprobadas tanto por el instituto Nacional de Salud como por el Ministerio de Salud y Protección Social, para cuantificar coliformes totales y *E.coli*. De igual manera en este documento se reportan los valores correspondientes a los demás parámetros fisicoquímicos, que permiten seleccionar un determinado tipo de tratamiento para mejorar la calidad del agua.

Parámetros físico-químicos

Existen varios parámetros fisicoquímicos de importancia que caracterizan las aguas residuales y cuyos valores se encuentran estrechamente relacionados con el grado de contaminación de la misma. Por esta razón cuantificar las concentraciones de estas sustancias es de gran interés en el tratamiento. En Colombia la resolución 0631 de 2015, por la cual se establecen los parámetros y valores límites máximos en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público y se dictan otras disposiciones permisibles. En su capítulo VI se definen los parámetros físicos y valores límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales de aguas residuales no domestica ARnD a cuerpos de aguas superficiales, para las actividades de la agroindustria y la ganadería (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, 2015) (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros físicos de DBO, DQO y ST y valores límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales de aguas residuales no domestica ARnD a cuerpos de aguas superficiales, para las actividades beneficio porcino.

Parámetro	Unidades	Ganadería de porcinos - Cría	Ganadería de porcinos – Beneficio
DQO	mg/L O ₂	900	800
DBO	mg/L O ₂	450	450
Solidos suspendidos T	mg/L	400	200
Solidos sedimentables	mg/L	5	5

Extracto de (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, 2015)

Microorganismos eficaces

Los Microorganismos Eficaces (*Effective Microorganims* EM) son una mezcla de grupos de organismos que tiene una acción revitalizante en los seres humanos, animales y el medio ambiente natural (Higa, 1995; Higa & Chinen, 1998; Higa & Wood),. Las principales especies que intervienen en los ME incluyen (Daly & Stewart, 1999; Diver, 2001; Dvorak, Bidmanova, Damborsky, & Prokop, 2014; Freitag, 2000; Hader, 1999; Javaid, Bajwa, & Anjum, 2008):

1. Bacterias lácticas: *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *Streptococcus lactis*.
2. Bacterias fotosintéticas: *Rhodopseudomonas palustrus*, *Rhodobacter sphaeroides*
3. Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*
4. Actinomicetos: *Streptomyces albus*, *S. griseus*
5. Hongos de Fermentación: *Aspergillus oryzae*, *Mucor hiemalis*

Los ME se puede utilizar para hacer aerosoles orgánicos para la mejora de la fotosíntesis y el control de insectos, plagas y enfermedades (El uso exitoso de los ME depende de técnicas de formulación adecuados), proteger semillas y mejorar el agua y los alimentos. El método de formulación aumenta su persistencia y fiabilidad en las condiciones ambientales prevalecientes y siempre se puede mejorar su formulación con el fin de manejar las condiciones ambientales desfavorables, al ser mezclados con ingredientes adecuados que pueden actuar como nutrientes, adhesivos o agentes humectantes (Javaid et al., 2008).

Metodología

Recolección de muestra

La toma de la muestra se realizó en una granja porcícola, Las unidades experimentales de agua residual fueron recolectadas en cuatro frascos, con capacidad para 3 litros, fueron transportadas en nevera de icopor con pila refrigerante al laboratorio de análisis microbiológico y fisicoquímico de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Libre seccional Pereira, sede Belmonte. Adicional se llevó la muestra para análisis de

DBO; DQO; ST, para el laboratorio de aguas y aguas de la Universidad tecnológica de Pereira.

Tipo de estudio

La investigación se enfocó a un estudio descriptivo analítico, por medio del cual se caracterizó el agua residual sometida a diferentes tratamientos con microorganismos eficaces.

Verificación de algunas de las técnicas analíticas fisicoquímicas.

- i. **Variables a medir:** Se obtuvieron datos de Demanda Biológica de Oxígeno (DBO), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Sólidos totales (ST) y microorganismos presentes. Para la obtención de estos datos se tomará una muestra mixta con un frasco con volumen de 1 L como representativa de las unidades experimentales y serán llevados al laboratorio de análisis microbiológico y físico-químico de la Universidad Libre seccional Pereira, sede Belmonte, para obtener los datos de la DBO, DQO, ST y análisis microbiológico se utilizará la norma AAOAC para aguas antes y después de haber realizado la intervención.
- ii. **Demanda Biológica de Oxígeno (DBO):** Es una medida de la cantidad de oxígeno consumido en la degradación de la materia orgánica mediante procesos biológicos aerobios (principalmente por bacterias y protozoarios), se utiliza para determinar la contaminación de las aguas. Si el valor es alto, significa que los niveles disueltos serán bajos, porque las bacterias han consumido en gran cantidad de oxígeno (APHA, 1992; Sanchez, 2003).
- iii. **Valor de la DBO:** este indicador se obtiene en el laboratorio, tomando una muestra de agua, alimentada con bacterias y nutrientes y se hace una incubación a 20 °C durante 5 días en la oscuridad. (APHA, 1992; Sanchez, 2003).
- iv. **Demanda Química de Oxígeno (DQO):** Se relaciona con la cantidad de oxígeno requerida para descomponer químicamente la materia orgánica e inorgánica y es utilizable para medir los contaminantes orgánicos que están en las aguas residuales (APHA, 1992; Castillo, Altuna, Michelena, Sanchez-Bravo, & Acosta, 2005).
- v. **Valor de la DQO:** Para medirla es necesario el uso de poderosos agentes químicos como el dicromato o permanganato de potasio en un medio ácido para que ocurra una oxidación química de las sustancias oxidables que contiene la muestra (APHA, 1992; Castillo et al., 2005).
- vi. **Sólidos Totales (ST):** Son todos los sólidos totales y se clasifica en sólidos suspendidos y sólidos disueltos o filtrables. Los sólidos en suspensión pueden ser

sedimentables y no sedimentables, siendo a la vez orgánica e inorgánica, provienen de actividades domésticas, pecuarias, agrícolas e industriales, son interferencia con la penetración de la luz solar y el movimiento de cuerpos en el agua.

- vii. **Valor de los ST:** Es la materia que se consigue como residuo luego de someter el agua a una temperatura entre 103°C a 105°C hasta que se evapore. Los sólidos suspendidos son los que quedan retenidas por un filtro de membrana con un tamaño de poro de 1.2 micras y el resto que pasa son los sólidos disueltos o filtrables. Los sólidos suspendidos sedimentables son los que quedan en el fondo de un recipiente de forma cónica en un tiempo de 60 minutos y los no sedimentables pueden ser retenidos por una barrera física, por ejemplo un filtro, el tamaño de los sólidos no sedimentables son mayores a 0,001 mm (APHA, 1992).

Parámetro para la toma de las muestras

ANALITO	RECIPIENTE PARA LA PRESERVACIÓN	TIEMPO MÁXIMO DE ALMACENAMIENTO
DBO5	Frasco plástico y/o vidrio	6 horas en refrigeración (4°C)
DQO	Frasco plástico y/o vidrio	7 horas en refrigeración (4°C)
ST	Frasco plástico y/o vidrio	Refrigerar por 7 días

Caracterización microbiológica de las aguas residuales

Se realizaron análisis microbiológicos de Coliformes totales y *E coli*, después de cada tratamiento por el método de filtración por membrana, se expresan en unidades de NMP/100 cm³. Estos análisis serán llevados a cabo según el decreto 475 de 1998 (Presidencia de la Republicade Colombia, 1998)

Evaluación de la dosis de microorganismos eficaces

Para establecer las mezclas de microorganismos eficientes fue necesario realizar la escala de macfarland la cual se comparó con una escala estandarizada utilizando espectrofotometría. Así también la escala de macfarlán nos permite determinar la concentración de cada mezcla de microorganismos teniendo en cuenta que cada una de estas está compuesta por tres microorganismos diferentes y en distintas concentraciones (tres veces más concentrada, dos veces más concentrada y la menos concentrada).

Concentraciones de las mezclas:

- 1) Se utilizaron cepas ATCC (kiwi stick) de las cuales se realizaron repiques en agar nutritivo el cual nos da la oportunidad de no gastar el total de los pases que tienen las cepas ATCC

- 2) Por medio de asas redondas extraeremos colonias de los repiques y los inocularemos en agua peptona
- 3) Se verifico por medio de espectrofotometría la concentración de cada mezcla en base a la escala de macfarlánd la cual se comparó anteriormente con una escala estandarizada.
- 4) Por último, al tener las concentraciones deseadas se vierten en cada muestra teniendo en cuenta que cada una de estas se encuentran en igualdad de condiciones y se agregan las mezclas al mismo tiempo.

Formulación de mezclas:

- Mezcla 1

- (3) Bacterias acido lácticas l.casei: 1×10^8 cfu mL⁻¹
- (2) Levaduras candida utilis: 2×10^6 cfu mL⁻¹
- (1) Actinomyces Streptomyces albus: 1×10^3 cfu mL⁻¹

- Mezcla 2

- (1) Bacterias acido lácticas l.casei : 1×10^3 cfu mL⁻¹
- (3) Levaduras candida utilis : 2×10^8 cfu mL⁻¹
- (2) Actinomyces Streptomyces albus : 1×10^6 cfu mL⁻¹

- Mezcla 3

- (2) Bacterias acido lácticas l.casei : 1×10^6 cfu mL⁻¹
- (1) Levaduras candida utilis : 2×10^3 cfu mL⁻¹
- (3) Actinomyces Streptomyces albus : 1×10^8 cfu mL⁻¹

El tratamiento tuvo una duración de tres meses, después de los cuáles se analizarán nuevamente los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de las muestras.

Unidades experimentales

Cada una de las unidades experimentales será generada por triplicado.

- _ Muestra blanco sin tratamiento: 1 litro de aguas residuales
- _ Mezcla 1 ME: 1 litro de aguas residuales + ME 1
- _ Mezcla 2 ME: 1 litro de aguas residuales + ME 2
- _ Mezcla 3 ME: 1 litro de aguas residuales + ME 3

Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizará sobre valores de medias, varianza y desviación estándar. Los análisis serán pruebas de varianza (ANOVA) y las medias de cada una de las variables

entre los tratamientos serán comparadas mediante una prueba de rangos múltiples (Steel & Torrie, 1980) a un nivel de significancia del 5% utilizando el programa estadístico, SPSS.

Productos, Resultados e Impactos esperados:

- a) Productos de generación de nuevo conocimiento:
 - _ 1 artículo sometido a publicación en revista indexada.
- b) Productos de formación de recursos humanos:
 - _ 1 trabajo de grado de 2 estudiantes del programa de microbiología de la Universidad libre Seccional Pereira.
- c) Productos de apropiación social del conocimiento:
 - _ 1 Presentación de los resultados a los productores de la granja en la que se llevó a cabo el trabajo.
 - _ 1 Presentación en evento científico a nivel nacional
- d) Impactos Potenciales:
 - I. Impactos en el conocimiento del campo de estudio.**
 - 1. A mediano plazo, establecimiento de una línea de investigación en el tema de microorganismos eficaces y su uso en la industria agropecuaria.
 - II. Impactos en la calidad de vida de la población.**
 - 1. A largo plazo. Disminución de contaminación y olores con el uso de los microorganismos identificados.

Resultados obtenidos

Para determinar DBO, DQO; ST, se enviaron las muestras al laboratorio de aguas y aguas de la UTP, donde reportan lo siguiente:

Valores obtenidos.

ST: 7.150 Mg/L

DBO: 7.985 Mg O₂ / L

DQO: 12.057 Mg O₂ / L.

Los resultados fueron los esperados, durante las once (11) semanas de evaluación, la carga microbiana fue tan abundante, que el reporte fue incontable en cada una de las muestras, igual con el método de NMP, que fue totalmente turbio, a partir de tercer mes se presentó en la mezcla número 2, unos cambios organolépticos visibles, que fueron indicador de la reducción de turbidez y poca sedimentación, comparado con las mezclas número uno y tres, otra diferencia significativa fue que no se presentó una gruesa sedimentación y la ausencia de burbujas blancas lo que indica acción de los microorganismos eficientes.



Imagen 1. Mezclas con ME, de izquierda a derecha se clasifican como mezclas 1, 2, 3, con su respectivo método de filtración por membrana. Imagen tomada en el laboratorio de microbiología de la Universidad Libre seccional Pereira.



Imagen 2, mezclas número 2, tras la evaluación del tercer mes, donde se evidencian los cambios organolépticos visibles.

A partir de las comparaciones la mezcla 2 (Bacteria ácido láctica *L. casei* : 1×10^3 cfu mL⁻¹, levadura *Candida utilis* : 2×10^8 cfu mL⁻¹, actinomyces *Streptomyces albus* : 1×10^6 cfu mL⁻¹) fue la mejor concentración para el tratamiento de aguas residuales porcícolas.



Imagen 3, método de filtración por membrana de la mezcla número dos, después de las once semanas de evaluación en comparación con filtración incontrolada.

Es evidente la acción de los M.E, después de las once semanas de acción de las mezclas, la población de microorganismos determinables por método de filtración por membrana, ya se evidencian unidades formadoras de colonia, UFC, que son indicador de que las mezclas fueron eficientes para la disminución de la carga microbiana de desechos orgánicos en industria porcícola.

Discusión.

Las propiedades de los desechos porcícolas pueden clasificarse como físicas, químicas y biológicas; las características físicas y químicas son afectadas por la fisiología (tamaño, edad, raza) de los animales y los alimentos (contenido de proteína y fibra) y el ambiente (temperatura y humedad). Las características biológicas (tipo y cantidad de microorganismos presentes) pueden modificarse por la adición de antibióticos, al limitar éstos el crecimiento microbiológico. Las características microbiológicas de los desechos porcícolas pueden afectarse por la utilización de antibióticos, ya sea que se encuentre presente en los alimentos o que sean aplicados directamente al cerdo. Este hecho modifica en especie y cantidad a los microorganismos, situación que puede reflejarse en la efectividad de los sistemas de tratamiento biológicos (Villagómez, Borges, & Pereda, 2002).

El esparcimiento del estiércol de puerco sobre las tierras agrícolas es una práctica muy común para deshacerse del mismo. La aplicación de los residuos porcícolas puede afectar la microbiota del suelo en largo término (De Moura, Sampaio, Remor, Da Silva, & Pereira, 2016). Sin embargo, cuando la tasa de deposición no se controla esta técnica se convierte en una fuente de contaminación.

En general, los principales componentes contaminantes del estiércol de puerco son la materia orgánica (MO), el nitrógeno (NTK), el fósforo (P-Tot) y la materia en suspensión (SST). Pero también es una fuente de contaminación por organismos patógenos. Un (1) gramo de estiércol de puerco fresco puede contener hasta 10^8 gérmenes aerobios y 10^7 gérmenes anaerobios, de los cuales 6×10^5 son enterobacterias (Lasbleiz, 1989).

La tecnología de los microorganismos eficientes (ME), desarrollados por el Dr. Teruo Higas de la universidad de Ryukus de Okinawa, Japón, cuyo efecto potencializado consiste en la mezcla de varios microorganismos naturales de tipo beneficioso, existiendo cuatro tipos principales: bacterias fototróficas, levaduras, bacterias productoras de ácido láctico y hongos de fermentación (Namsivayam, Narendrakumar, & Kumar, 2011).

Es de relevancia resaltar que en el momento de toma de muestra para la realización de esta investigación (lixiviado de desechos porcícolas) también se encontraba presente material biológico como sangre, placenta y otros fluidos, esto debido a que a temprana hora de la

mañana uno de los porcinos había presentado un parto. Esto por consiguiente aumento considerablemente la carga microbiana, por lo cual los microorganismos eficaces (M.E) tuvieron que realizar un mayor trabajo de degradación y eliminación de estos desechos; teniendo en cuenta esto, es de gran importancia resaltar el conjunto de microorganismo de la mezcla 2 la cual como anteriormente se describe fue la que tuvo mayor éxito , además de poder bajar de una manera considerable la carga microbiana presente en el lixiviado del estiércol porcino también reacciono de manera adecuada ante estos otros elementos biológicos que pudieron en gran manera entorpecer el funcionamiento de este conjunto de microorganismo.

Conclusiones.

La utilización de la tecnología de los microorganismos eficientes EM, para el tratamiento de residuos sólidos en la industria colombiana puede ser una manera muy viable de disminuir la acumulación de estos residuos en casa, calle, industria y otros. Los microorganismos eficientes se convierten en el método más apropiado para tratar aguas residuales porcícolas, pues la literatura afirma que el metabolismo de las EM reduce los ingredientes indicadores de contaminación.

Entonces para el tratamiento de aguas residuales porcícola se tiene en cuenta que, de acuerdo al método, es preferible emplear, dos o tres especies de microorganismos seleccionados como microorganismos eficientes.

La gran diversidad de microorganismos que pueden ser eficientes para la biorremediación ha causado un impacto positivo en la investigación pues las publicaciones e investigaciones van aumentando a medida que pasan los años, un ejemplo de estos son las publicaciones acerca de microorganismos eficientes en el tratamiento de manejo de residuos líquidos porcícolas.

Bibliografía

- Ahmed, DA., Hussain, T., Rizvi, F., Gilani, G., & Javid, T (2006). Influence of EM on health and immune system of broilers under experimental condition. *EM Technology Network Database*.
- Akbar, T. . (1996). *Recycling of municipal liquid waste using EM Technology for domestic use*. (Msc), University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.
- APHA. (1992). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. . Washington, USA.
- Asociacion colombiana de porcicultores (2015). [Estadísticas de producción y consumo decerdo a nivel nacional].

- Banu, J. R., Esakkiraj, S., Nagendran, R., & Logakanthi, S. (2005). Biomanagement of petrochemical sludge using an exotic earthworm *Eudrilus eugineae*. *J Environ Biol*, 26(1), 43-47.
- Bernal, DP., & Cardona, DA. (2003). *Selección de tecnología para el tratamiento de aguas residuales domésticas por métodos naturales: una metodología con énfasis en aspectos tecnológicos*. (Pregrado Ingeniería sanitaria y ambiental), Universidad del Valle, Cali. Colombia.
- Boraste, A., Vamsi, KK., Jhadav, A., Khairnar, Y., Gupta, N., Trivedi, S., . . . Joshi, B. (2009). Bio-fertilizers: A novel tool for agriculture. *Int. J. Microbiol. Res*, 1(2), 23-31.
- Bouwman, AFDS., Lee, WAH., Asman, FJ., Dentener, KW., Hoek., Van Der, & Olivier, JGJ. (1997). A global high-resolution emission inventory for ammonia. *II*, 561-587.
- Castilho, A., Cecchi, F., & Alvarez, J. (1997). Combined anaerobic-aerobic system to treat domestic sewage in coastal areas. *A Water Res*, 31(6), 3057-3063.
- Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sanchez-Bravo, J., & Acosta, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indol acético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de biología*, 27, 137-142.
- Castro, A. (2003). *Selección de alternativas sostenibles para el tratamiento de aguas residuales municipales en Colombia: un método con énfasis en aspectos tecnológicos*. (MSc en Ingeniería Sanitaria y Ambiental), Universidad del Valle, Cali. Colombia.
- Cavalcanti, P. (2003). *Integrated application of the UASB reactor and ponds for domestic sewage treatment in tropical regions*. (PhD), Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Crawford, JH. (1983). *Review of composting*.
- Crites, R., & Tchobanoglus, G. (1998). *Small and decentralized wastewater management systems*. USA: McGraw-Hill.
- Chagas, PRR., Tokeshi, H., & Alves, MC. (1999). *Effect of calcium on yield of papaya fruits on conventional and organic (Bokashi EM) systems*. Paper presented at the Proceedings of the 6th International Conference on Kyusei Nature Farming, South Africa.
- Cheng, Z., Chen, M., Xie, L., Peng, L., Yang, M., & Li, M. (2015). Bioaugmentation of a sequencing batch biofilm reactor with *Comamonas testosteroni* and *Bacillus cereus* and their impact on reactor bacterial communities. *Biotechnol Lett*, 37(2), 367-373. doi: 10.1007/s10529-014-1684-1
- Chernicharo, C., & Nascimento, M. (2001). Feasibility of a pilot-scale UASB/trickling filter system for domestic sewage treatment. *Journal Water Science Technology*, 44(7), 221-228.
- Daly, MJ., & Stewart, DPC. (1999). Influence of Effective Microorganisms (EM) on vegetable production and carbon mineralization, A preliminary investigation. *J. Sustain. Agric*, 14, 15-25.
- Diver, S. (2001). Nature Farming and Effective Microorganisms. Retrieved from *Rhizosphere II*.

- Dvorak, P., Bidmanova, S., Damborsky, J., & Prokop, Z. (2014). Immobilized synthetic pathway for biodegradation of toxic recalcitrant pollutant 1,2,3-trichloropropane. *Environ Sci Technol*, 48(12), 6859-6866. doi: 10.1021/es500396r
- Fontúrbel, F., & Ibáñez, C. . (2004). *Fuentes de energía biológica: empleo del metabolismo microbiano para la descontaminación de aguas*. Universidad Loyola.
- Formagini, E. L., Marques, F. R., Serejo, M. L., Paulo, P. L., & Boncz, M. A. (2014). The use of microalgae and their culture medium for biogas production in an integrated cycle. *Water Sci Technol*, 69(5), 941-946. doi: 10.2166/wst.2013.803
- Freitag, DG. (2000). The use of Effective Microorganisms (EM) in Organic Waste Management.
- Fujita, M. (2000). *Nature farming practices for apple production in Japan, In Nature farming and microbial applications*. (Vol. 3).
- Gannoun, H., Bouallagui, H., Okbi, A., Sayadi, S., & Hamdi, M. (2009). Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of biologically pretreated abattoir wastewaters in an upflow anaerobic filter. *J Hazard Mater*, 170(1), 263-271. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.04.111
- Giusti, L. (2009). A review of waste management practices and their impact on human health. *Waste Manag*, 29(8), 2227-2239. doi: 10.1016/j.wasman.2009.03.028
- Gljzen, H. J. (2002). Anaerobic digestion for sustainable development: a natural approach. *Water Sci Technol*, 45(10), 321-328.
- Golovleva, L. A., Aliyeva, R. M., Naumova, R. P., & Gvozdyak, P. I. (1992). Microbial bioconversion of pollutants. *Rev Environ Contam Toxicol*, 124, 41-78.
- Goncalves, R., Araujo, V., & Chernicharo, C. . (1998). Association of a UASB reactor and a submerged aerated biofilter for domestic sewage treatment. *Journal Water Science Technology*, 38(6), 189-195.
- Guo, J., Peng, Y., Ni, B. J., Han, X., Fan, L., & Yuan, Z. (2015). Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. *Microb Cell Fact*, 14, 33. doi: 10.1186/s12934-015-0218-4
- Hader, U. (1999). *Influence of EM on the quality of grass/hay for milk production*. Paper presented at the Proceedings of the 6th International Conference on Kyusei Nature Farming, South Africa.
- Higa, T. (1995). *What is EM Technology*. Okinawa, Japan: University of Ryukyus, College of Agriculture.
- Higa, T., & Chinen, N. (1998). EM treatment of odor, wastewater, and environmental problems. Okinawa, Japan: : University of Ryukyus, College of Agriculture. .
- Higa, T., & Wood, M.). Effective microorganisms for sustainable community development: A national case study of cooperative and co-prosperity in North Korea for the preservation of environmental, agricultural, economic, and cultural integrity.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. (2007). RESOLUCIÓN 2640.

- Javaid, A., & Bajwa, R. (2011). Field evaluation of effective microorganisms (EM) application for growth, nodulation, and nutrition of mung bean. *Turk J Agric For*, 35, 443-452.
- Javaid, A., Bajwa, R., & Anjum, T. (2008). Effect of heat sterilization and EM (effective microorganisms) application of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in organic matter amended soils. *Cereal Res Comm* 36, 489-499.
- Kaaseva, ME. (2004). Performance of a sub-surface flow constructed wetland in polishing pre-treated wastewater – a tropical case study. *Water Res*, 38(6), 681-687.
- Kaushik, P., & Malik, A. (2009). Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. *Environ Int*, 35(1), 127-141. doi: 10.1016/j.envint.2008.05.010
- Khatoon, N., Naz, I., Ali, M. I., Ali, N., Jamal, A., Hameed, A., & Ahmed, S. (2014). Bacterial succession and degradative changes by biofilm on plastic medium for wastewater treatment. *J Basic Microbiol*, 54(7), 739-749. doi: 10.1002/jobm.201300162
- Kiely, G. (2003). *Ingeniería ambiental: fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión*. Madrid, ES: Veza, J. ed.
- Lettinga, G., Man, A., Grin, P., & Hulshof, P. (1987). Anaerobic wastewater treatment as an appropriate technology for developing countries. *Tribune Cebedeau*, 40(11), 21-32.
- Li, C., Ren, H., Yin, E., Tang, S., Li, Y., & Cao, J. (2015). Pilot-scale study on nitrogen and aromatic compounds removal in printing and dyeing wastewater by reinforced hydrolysis-denitrification coupling process and its microbial community analysis. *Environ Sci Pollut Res Int*, 22(12), 9483-9493. doi: 10.1007/s11356-015-4124-4
- Li, WF. (1994). *Effect of EM on crop and animal husbandry in China*. Paper presented at the Proceedings of 3rd Conference on EM Technology.
- Lotti, T., Kleerebezem, R., Abelleira-Pereira, J. M., Abbas, B., & van Loosdrecht, M. C. (2015). Faster through training: The anammox case. *Water Res*, 81, 261-268. doi: 10.1016/j.watres.2015.06.001
- Massoudinejad, M. R., Manshouri, M., Khatibi, M., Adibzadeh, A., & Amini, H. (2008). Hydrogen sulfide removal by *Thiobacillus thioparus* bacteria on seashell bed biofilters. *Pak J Biol Sci*, 11(6), 920-924.
- Mbubligue, SE. (2004). Comparative effectiveness of engineered wetland system in the treatment of anaerobically pre-treated domestic wastewater. *Ecol. Eng.*, 24(15), 269-284.
- Melse, R. W., & Timmerman, M. (2009). Sustainable intensive livestock production demands manure and exhaust air treatment technologies. *Bioresour Technol*, 100(22), 5506-5511. doi: 10.1016/j.biortech.2009.03.003
- Metcalf., & Eddy. (2003). *Wastewater Engineering. Treatment and Reuse*. (Fourth edición ed.). New York (USA). McGraw-Hill. .
- Michailides, M. K., Tekerlekopoulou, A. G., Akrotos, C. S., Coles, S., Pavlou, S., & Vayenas, D. V. (2015). Molasses as an efficient low-cost carbon source for biological Cr(VI) removal. *J Hazard Mater*, 281, 95-105. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.08.004
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Ministerio de Comercio, Industria y Turismo, Ministerio de Hacienda y Crédito

Público, Ministerio de Protección Social, DNP: Dirección de Desarrollo Rural Sostenible. (2007). *POLÍTICA NACIONAL DE SANIDAD E INOCUIDAD PARA LA CADENA PORCICOLA*. Bogota, Colombia.

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL, ASOCIACION COLOMBIANA DE PORCICULTORES, FONDO NACIONAL DE LA PORCICULTURA, SOCIEDAD DE AGRICULTORES DE COLOMBIA. (2002). Guía Ambiental para el subsector Porcícola. *Dirección General Ambiental Sectorial*, 29-41.

Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. (2015). *Resolucion 0631*. Bogota, Colombia.

MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL. (2007). DECRETO 1500.

Mohan, S. Venkata, Rao, N. Chandrasekhara, Prasad, K. Krishna, & Sarma, P. N. (2005). Bioaugmentation of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) with immobilized sulphate reducing bacteria (SRB) for the treatment of sulphate bearing chemical wastewater. *Process Biochemistry*, 40(8), 2849-2857. doi: 10.1016/j.procbio.2004.12.027

Morato, J., Codony, F., Sanchez, O., Perez, L. M., Garcia, J., & Mas, J. (2014). Key design factors affecting microbial community composition and pathogenic organism removal in horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Sci Total Environ*, 481, 81-89. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.01.068

Noyola, A. (1996). Anaerobic technology as tool for the sustainable environment: the context of Mexico. In I. d. I. Unam. (Ed.), *Biodegradación de compuestos orgánicos industriales*. Mexico.

Noyola, A. (2003). Seminario Internacional sobre Métodos Naturales para el Tratamiento de Aguas Residuales *Agua. Tendencias en el tratamiento de aguas residuales domésticas en Latinoamérica*. caeratgene, Colombia.

Olaniran, A. O., Pillay, D., & Pillay, B. (2006). Biostimulation and bioaugmentation enhances aerobic biodegradation of dichloroethenes. *Chemosphere*, 63(4), 600-608. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.08.027

Omri, I., Aouidi, F., Bouallagui, H., Godon, J. J., & Hamdi, M. (2013). Performance study of biofilter developed to treat H₂S from wastewater odour. *Saudi J Biol Sci*, 20(2), 169-176. doi: 10.1016/j.sjbs.2013.01.005

Orantes, J. C., & Gonzalez-Martinez, S. (2003). A new low-cost biofilm carrier for the treatment of municipal wastewater in a moving bed reactor. *Water Sci Technol*, 48(11-12), 243-250.

Pierra, M., Carmona-Martinez, A. A., Trably, E., Godon, J. J., & Bernet, N. (2015). Specific and efficient electrochemical selection of *Geothallobacter subterraneus* and *Desulfuromonas acetoxidans* in high current-producing biofilms. *Bioelectrochemistry*. doi: 10.1016/j.bioelechem.2015.02.003

PRESIDENCIA DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA. (2010). *Decreto 3930*.

Presidencia de la Republicade Colombia. (1998). *Decreto 475*.

Qasim, G. (1997). *Recycling of Sewage Water and Industrial Effluent Using EM Technology*. (MSc), University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.

- Ritter, WF. (1989). Odour control of livestock wastes: State-of-the-art in North America. *J. Agric. Eng. Res*, 42, 51-62.
- Sanchez, J. (2003). *Evaluacion y monitoreo microbiologico y fisicoquimico de una planta de tratamiento de agua residual por rizofiltracion, en una empresa productora dediscos compactos* (Microbiologia Industrial), Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, Colombia.
- Sangakkara, R. (2002). The Technology of effective microorganisms – Case Studies of application: Royal Agricultural College, Cirencester, UK Research Activities.
- Shangguan, H., Liu, J., Zhu, Y., Tong, Z., & Wu, Y. (2015). Start-up of a spiral periphyton bioreactor (SPR) for removal of COD and the characteristics of the associated microbial community. *Bioresour Technol*, 193, 456-462. doi: 10.1016/j.biortech.2015.06.151
- Sharifuddin, HAH. (1993). *Nature farming research in Malaysia: effect of organic amendment and EM on crop production*. Paper presented at the Proceedings 3rd Intl. Conference on Kyusei Nature Farming, Santa Barbara, California U.S.A.
- Shintani, M. (2000). *Organic fertilizer – Managing banana residues with Effective Microorganisms*. Paper presented at the Proceedings of the 13th International Scientific Conference of IFOAM. Alfoeldi T, FiBL, Basel, Switzerland.
- Smet, E., & Van Langenhove, H. (1998). Abatement of volatile organic sulfur compounds in odorous emissions from the bio-industry. *Biodegradation*, 9(3-4), 273-284.
- Sousa, J., & Foresti, E. (1996). Domestic sewage treatment in an up-flow anaerobic blanket – sequencing batch reactor system. *Journal Water Science Technology*, 33(11), 73-84.
- Spoelstra, SF. (1977). Simple phenols and indoles in anaerobically stored piggery wastes. *J. Sci. Fd. Agric*, 28, 415-423.
- Steel, RGD., & Torrie, JH. (1980). *Principles and procedures of statistics*. New York, USA.
- Sterling, CR. (1987). *The detection of Giardia and Cryptosporidium from water sources using monoclonal antibodies*. University of Arizona, Tucson.
- Tawfik, A., Klapwijk, B., Gohary, F., & Lettinga, G. (2002). Treatment of anaerobically pre-treated domestic sewage by a rotating biological contactor. *Water Res*, 36(8), 147-155.
- Tawfik, A., Klapwijk, B., Van Buuren, J., Gohary, F., & Lettinga, G. (2004). Physico-chemical factors affecting the E. coli removal in a rotating biological contactor (RBC) treating UASB effluent. *Water Res*, 38(7), 1081-1088.
- Tawfik, A., Zeeman, G., Klapwijk, B., Sanders, W., Gohary, F., & Lettinga, G. (2003). Treatment of domestic sewage in a combined UASB/RBC system. Process optimization for irrigation purposes. *Journal Water Science Technology*, 48(7), 131-138.
- Torres, P., & Foresti, E. (2001). Domestic sewage treatment in a pilot system composed of UASB and SBR reactors. *Journal Water Science Technology*, 44(6), 247-253.
- Unda, OF. (1999). *Ingenieria sanitaria aplicada al saneamiento y salud pública*. Mexico: Editorial Limusa S.A. .
- Van Craeynest, K., Dewulf, J., Vandeburie, S., & Van Langenhove, H. (2003). Removal of trichloroethylene from waste gases via the peroxone process. *Water Sci Technol*, 48(3), 65-72.

Vieira, S. (1988). Anaerobic Treatment of Domestic Sewage in Brazil - Research Results and Full-scale Experience. *Anaerobic Digestion, 5th International Symposium on Anaerobic Digestion* (pp. 185-195). Boloña (Italia6).