

Universidad EARTH



**Medición del efecto de la
aplicación de
Microorganismos Eficaces
(EM) en la generación de gas
metano (CH₄) en los sistemas
biodigestores a escala**

Gaston Miyashiro

Julio César Meggs Salguero

Proyecto de Graduación

para obtener el grado de

Licenciatura en Ciencias Agrícolas

y el título de

Ingeniero Agrónomo

2007

Guácimo, Limón, Costa Rica

La Universidad EARTH certifica que el Proyecto de Graduación titulado

Medición del efecto de la aplicación de Microorganismos Eficaces (EM) en la generación de gas metano (CH₄) en los sistemas biodigestores a escala

Presentado por

Gaston Miyashiro

Julio César Meggs Salguero

Reúne las condiciones para obtener el título de Ingeniero agrónomo
con el grado académico de Licenciatura

**Decano de Asuntos
Académicos**

Manuel Cerrato, Ph.D.

Asesor

Keita Kojima, M.Sc.

Asesor

Jane Yeomans, Ph.D.



EARTH

Diciembre, 2007

Dedicatoria

Quiero dedicar este proyecto de graduación a mis queridos padres, Hideo Miyashiro, que en paz descanse y Tetsuko Miyashiro, a mi tío abuelo Shigeo Shimabukuro.

A mis amigos que siempre me han apoyado: David Schannen, Pablo Fleitas Rumak, Gustavo Tawara, Nicolás Álvarez Almada, Sebastián Álvarez Almada, Sabrina Konda, Cecilia Iguchi y Mohammad Alnibari.

A las personas que han apoyado mi estadía en la Universidad EARTH: Takatsuru Nishikawa, Shuichi Okumoto y Keita Kojima.

Gaston Miyashiro

Dedico este proyecto de graduación a mis padres, Julio Armando Meggs Mata y Zoila Argentina Salguero Rosales, a mis hermanos Franklin Alexander Meggs Salguero y Celeste Azucena Meggs Salguero.

A mis amigos de toda la vida con quienes nos hemos apoyado siempre: Delvert René Martínez Maldonado, Henry Alberto Estrada Cabrera, Yansuly Lin-Valy López Lam y Rosario Annabella Solis Tiu.

Julio César Meggs Salguero

Agradecimiento

Mi agradecimiento a cuantas personas han hecho posible la realización del presente proyecto de graduación con cita especial de Jane Yeomans por su paciencia y dedicación a la corrección y revisión del presente proyecto. Al profesor Keita Kojima por el asesoramiento y apoyo financiero y a los compañeros Delvert Martínez, Jardí Martínez, Omar Martínez y Jorge Arteaga por la ayuda incondicional en el montaje del proyecto. Por último y no menos importante a Stephanie Lansing por el préstamo de la maquinaria de medición.

Gaston Miyashiro

Especiales agradecimientos a todas las personas que hicieron posible llegar a la finalización del presente proyecto de graduación, a la profesora Jane Yeomans por su asesoramiento, corrección y revisión del contenido del proyecto, a Keita Kojima por su incondicional apoyo durante todo el transcurso de elaboración del proyecto.

A Jardí Martínez, Omar Martínez, Jorge Arteaga y Delvert Martínez por su valiosa colaboración durante el montaje de la fase de campo del proyecto. Finalmente a Stephanie Lansing por su cooperación.

Julio César Meggs Salguero

Resumen

Este estudio se estableció para investigar el efecto de EM (Microorganismos Eficaces) en la producción del gas de efecto invernadero metano (CH_4), con el objetivo de buscar formas para reducir la emisión de gases de efecto invernadero producidos en la agricultura, utilizando métodos biológicos. Tres tipos de material orgánico, excretas bovinas, excretas porcinas y una mezcla de ambos a una relación 1:1 fueron tratados con diferentes concentraciones de EMA y colocados dentro de bolsas plásticas al vacío para asegurar la producción de biogás. Las bolsas fueron incubadas al aire libre bajo sombra durante 6 semanas. Los contenidos de cada bolsa fueron analizados en concentración de CH_4 y CO_2 en el biogás, el porcentaje de sólidos totales y pH en la fase líquida. Un incremento en concentración de EMA resultó en porcentaje mayor de CH_4 en el biogás ($p < 0,01$). Las excretas porcinas han producido los mayores porcentajes de CH_4 y CO_2 en el biogás ($p < 0,01$) comparado con el resto de materiales orgánicos utilizados. Las excretas bovinas produjeron el menor porcentaje de sólidos totales en la fase líquida ($p < 0,01$) comparado con los demás materiales orgánicos. Sin embargo, la metodología utilizada para realizar esta investigación no ha permitido la producción suficiente de biogás para un análisis más extensivo.

Palabras Clave: Biogás, CH_4 (metano), descomposición, EM (Microorganismos Eficaces), gas de efecto invernadero, materia orgánica.

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of EM (Effective Microorganisms) on the production of the greenhouse effect gas, methane (CH_4) with the objective of ascertaining a way to reduce the emission of greenhouse gases produced in agriculture, using biological methods. Three types of organic material, cattle manure, hog manure, and a 1:1 ratio mixture of both, were treated with different concentrations of EMA and placed in airtight plastic bags to ensure biogas production. The bags were incubated in an open air shed for 6 weeks. The contents of each bag then were analyzed for CH_4 and CO_2 concentration in the biogas and percent total solid content and pH in the liquid phase. An increase in the EMA concentration resulted in higher CH_4 concentration in the biogas ($p < 0.01$). The hog manure produced the highest CH_4 and CO_2 concentrations ($p < 0.01$) as compared to the other organic materials used. The cattle manure produced the least amount of total solids ($p < 0.01$) as compared to the other organic materials used. However, the methodology used to conduct these experiments did not permit the production of enough biogas for a more extensive analysis.

Key words: Biogas, CH_4 (methane), decomposition, EM (Effective Microorganisms), greenhouse effect gas, organic matter.

Lista de Contenido

	Página
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTO	V
RESUMEN	1
ABSTRACT	1
LISTA DE CONTENIDO	3
1 INTRODUCCIÓN	3
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GENERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 GASES DE EFECTO INVERNADERO	3
3.1.1 Metano (CH ₄).....	3
3.1.2 Calentamiento Global	3
3.1.3 Alternativas para Mitigar la Emisión de Gases de Efecto Invernadero Contribuyentes al Calentamiento Global	3
3.2 BIOGÁS	3
3.2.1 Proceso Bioquímico de la Producción de Biogás	3
3.2.2 Biodigestor.....	3
3.3 MICROORGANISMOS EFICACES (EM)	3
3.3.1 Bacterias Fototrópicas (<i>Rhodopseudomonas</i> spp.).....	3
3.3.2 Bacterias Ácido Lácticas (<i>Lactobacillus</i> spp.).....	3
3.3.3 Levaduras (<i>Saccharomyces</i> spp.)	3
3.3.4 EM Activado (EMa).....	3
3.3.5 Proceso Químico de Fermentación del EM	3
3.4 USO DE EM EN EL CONTROL DE LOS GASES DE EFECTO INVERNADERO	3
4 MATERIALES Y MÉTODOS	3
4.1 UBICACIÓN	3
4.2 EXPERIMENTO 1	3
4.3 EXPERIMENTO 2	3
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	3
5.1 EXPERIMENTO 1	3
5.1.1 Análisis de Laboratorio de la Materia Orgánica Utilizada como Sustrato	3
5.1.2 Volumen de Biogás	3
5.1.3 Coloración de la Materia Orgánica	3

5.2	EXPERIMENTO 2.....	3
5.2.1	Producción de CH ₄	3
5.2.2	Producción de CO ₂	3
5.2.3	ST (Sólidos Totales)	3
5.2.4	pH	3
5.3	ANÁLISIS DE LA METODOLOGÍA DEL PROYECTO.....	3
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	3
7	LISTA DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
8	ANEXOS	3

1 Introducción

En la actualidad son muchos los comentarios y opiniones acerca del incremento en el calentamiento global observado en los últimos años, debido al exceso de emisión de gases de efecto invernadero provenientes de la actividad humana. En el protocolo de Kyoto (1997), en el cual los países industrializados se comprometen a disminuir sus emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) con el objetivo de reducir el calentamiento global, se identifican 6 GEI como los más importantes¹. Aunque el principal contribuyente individual es el dióxido de carbono (CO_2), se ha encontrado que el metano (CH_4) puede ser 21 veces más potente que el CO_2 como atrapador de calor². En Costa Rica el 72 % del total de CH_4 generado proviene de fuentes agrícolas y ganaderas³, por lo que se deduce la importancia de los sistemas biológicos agrícolas y pecuarios en la generación de estos gases, especialmente CH_4 .

En la actualidad los sistemas de producción, específicamente los sistemas agropecuarios, están diseñados de tal forma que no encajan con el ritmo y características del medio ambiente en el cual se encuentran establecidos. Por ejemplo, los monocultivos intensivos y la ganadería extensiva se desaprovecha el potencial natural del medio, puesto que en lugar de interactuar con él y beneficiarse de su sostenibilidad natural, se basan en productos químicos e insumos ajenos al sistema biológico, volviéndose un círculo vicioso en el cual cada vez son necesarios más insumos externos para mantener la producción o el rendimiento del sistema. Lo anterior se da debido al poco interés en los sistemas de producción orgánica y la ignorancia de la existencia y la forma de uso de productos alternativos amigables con el ambiente. Estos productos, como el producto de Microorganismos Eficaces (EM por sus siglas en inglés), pueden reducir la contaminación generada por el desequilibrio que provocan los sistemas de producción humanos y que pueden mejorar los resultados obtenidos de

¹ UNFCCC (UNITED NATIONS FRAMEWORK CONVENTION ON CLIMATE CHANGE, DE). Convención marco de las Naciones Unidas sobre el cambio climático: los diez primeros años. (En adelante citado como UNFCCC).

² SOLÓRZANO, G. Aportación de gases de efecto invernadero por el manejo de residuos sólidos en México: el caso del metano. (En adelante citado como Aportación de gases).

³ BRETSCHER, D. Agricultura orgánica y gases con efecto invernadero.

dichos sistemas. Sin embargo, falta mucha investigación acerca del efecto específico de estos productos sobre sistemas biológicos productivos como reductor de factores de contaminación generados, siendo éste el principal problema que limita su uso, desaprovechándose el gran potencial y los beneficios que esta tecnología ofrece.

Cómo resultado obtenemos métodos o sistemas de producción agropecuarios subdesarrollados y altamente contaminantes. Liberan al ambiente materiales que no son contaminantes en forma directa, pero en altas cantidades producen desequilibrios traducidos a problemas medio ambientales de gran envergadura. Claro ejemplo es el caso de los gases CO₂ y CH₄, principales responsables del aumento en el efecto invernadero y por ende del calentamiento global, que tanto preocupa actualmente a las naciones del mundo. Conociendo el hecho de que los sistemas biológicos agropecuarios cuando se encuentran en desequilibrio con el medio ambiente son generadores de altas cantidades de GEI. Éstos vienen a colaborar con el elevado calentamiento global que se está dando en la actualidad.

Con lo anterior podemos concluir que es un serio problema y, además, que somos los seres humanos los causantes del mismo. De tal forma que podemos observar claramente la necesidad de la realización de investigaciones y estudios que nos permitan encontrar tecnologías para contrarrestar o mitigar el exceso en la generación de gases invernadero. El uso de tecnologías alternativas y amigables con el medio ambiente, como el EM, pueden ayudar a reducir el problema de las emisiones de estos gases. Pero, existe el problema de que no se conoce específicamente el efecto sobre estos sistemas biológicos desde el punto de vista de la magnitud de la reducción de dichos gases.

Basándose en los resultados encontrados por el Dr. Higa, que lo llevaron a concluir que el uso de EM puede o efectivamente reduce las emisiones de CH₄⁴, esta investigación tiene como finalidad medir el efecto de diferentes dosis de EM sobre sistemas biodigestores a escala que son eficientes en la generación de gases como el CH₄ y CO₂.

⁴ HIGA, T. A preliminary study of the suppressing effect of EM on methane emissions in paddy fields. (En adelante citado como A preliminary study).

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

Investigar el efecto de los Microorganismos Eficaces activados (EMa) sobre la generación de CH₄ en sistemas de biodigestores a nivel de laboratorio, para reducir la emisión de gases de invernadero.

2.2 Objetivos Específicos

1. Observar la consecuencia de la aplicación de EMa como fuente alternativa de tratamientos en sistemas biológicos.
2. Evaluar el efecto de la aplicación de EMa sobre la producción de CH₄.
3. Medir el efecto de diferentes porcentajes de EMa en diferentes sustratos generadores de CH₄.

3 Revisión Bibliográfica

3.1 Gases de Efecto Invernadero

En el protocolo de Kyoto (1997) se hizo mención de seis gases de efecto invernadero principales: CO_2 , CH_4 , óxido nitroso (N_2O), hidrofluorocarbonos (HFC), perfluorocarbonos (PFC) y hexafluoruro de azufre (SF_6)⁵. Éstos son gases presentes en la atmósfera terrestre y dan lugar al fenómeno denominado efecto invernadero.

Cabe mencionar que su concentración atmosférica es baja, siendo estas medidas en la escala de las partes por millón (ppm). Pero, la variación en estas concentraciones tiene una importancia fundamental en el cambio de la temperatura del aire próximo al suelo, de tal forma que cuando estas son adecuadas, la temperatura terrestre permanece en un rango de valores aptos para la existencia de la vida en el planeta⁶.

3.1.1 Metano (CH_4)

3.1.1.1 Propiedades

El CH_4 en temperatura ambiente se encuentra en estado gaseoso y es incoloro e inodoro. Este alcano tiene un punto de fusión de $-182,6\text{ }^\circ\text{C}$ y un punto de ebullición de $-161,7\text{ }^\circ\text{C}$. Es insoluble en agua pero muy soluble en varios disolventes orgánicos no polares y además puede ser licuado⁷.

La estructura molecular del CH_4 se parece mucho a su estructura de los orbitales atómicos. Esta estructura es tetraédrica con ángulos entre enlaces de $109,5^\circ$ (Figura 1)⁸. Esta es la razón por la cual el CH_4 puede ser 21 veces más potente que el CO_2 como atrapador de calor⁹, ya que esta forma tetraédrica refleja más los rayos del sol.

⁵ UNFCCC .

⁶ ABRAHAM, E. *et al.* Breve enciclopedia del ambiente.

⁷ CARET, R. y WINGROVE, A. Química orgánica. (En adelante citado como Química orgánica).

⁸ Química orgánica.

⁹ Aportación de gases.

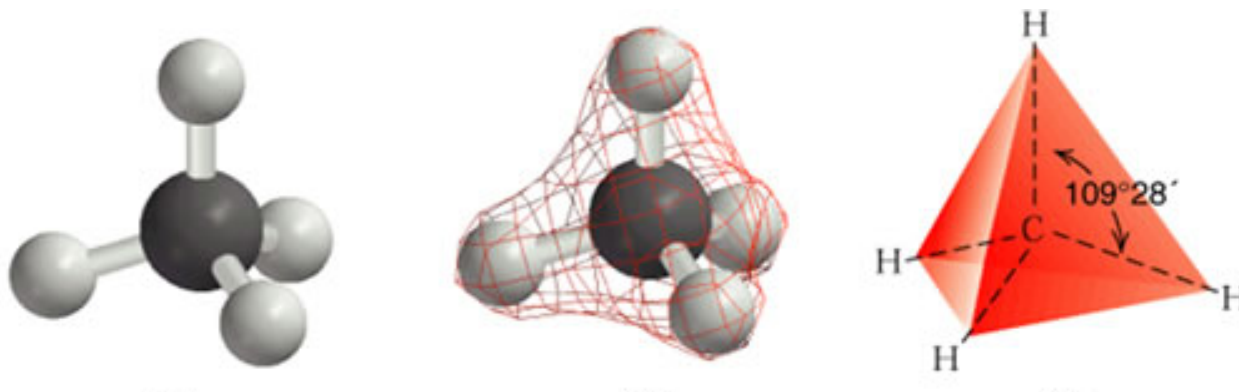


Figura 1. Estructura molecular tridimensional del CH₄¹⁰.

3.1.1.2 Fuente Natural

El CH₄ es el principal hidrocarburo que compone el “gas de los pantanos” (biogás) que se forma por la descomposición anaeróbica de plantas realizado por microorganismos. Este gas es muy inflamable. Se puede separar de otros gases como el etano, propano e isobutano a través de la destilación fraccionada para producir gas para generar energía. También se pueden presentar en minas de carbón y se le conoce como gas grisú o fuego húmedo porque puede explotar fácilmente¹¹.

3.1.2 Calentamiento Global

El planeta se está calentado, pero para hacernos una mejor idea del problema al cual nos estamos enfrentando, hacemos un breve resumen del último reporte de la IPCC para el 2001 (Intergovernmental Panel on Climate Change) extrayendo lo siguiente¹²:

- Los registros de mareas muestran que el promedio global del nivel del mar se elevó entre 0,1 m y 0,2 m en el siglo XX, incrementándose en forma simultánea el contenido calórico de los océanos.
- Las cubiertas de nieve y hielo han disminuido en forma tal, que en el hemisferio norte se ha detectado una disminución de 10 % a 15 % en la temporada primavera-verano desde la década de 1950.

¹⁰ Tomado de TextosCientificos.com. Hibridaciones del carbono.

¹¹ Química orgánica.

¹² IPCC (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, US). Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.

- La concentración atmosférica de CO₂ ha aumentado 31 % desde 1750, al igual que la concentración de CH₄ que registra un incremento de 1,06 ppm (151 %) en este mismo periodo y continúa aumentando. Para ambos la concentración actual es la más alta registrada en los últimos 420 000 años. Asimismo, se estima que poco más del 50 % de las actuales emisiones tienen origen antropogénico.

Según FAO existe un acuerdo general en que alrededor de la cuarta parte del principal gas de invernadero (CO₂) se deriva de fuentes agrícolas (cambios en el uso de la tierra, deforestación y quema de biomasa). El CH₄ representa una parte menor del efecto de calentamiento, pero la mayor parte de él procede también de fuentes agrícolas, como rumiantes domésticos, incendios forestales, cultivo de arroz en tierras húmedas y productos de residuos. El laboreo convencional y la utilización convencional de fertilizantes constituyen juntos la fuente del 70 % de NO_x. En conjunto, las fuentes agrícolas son responsables de un 30 % del calentamiento mundial¹³.

3.1.3 Alternativas para Mitigar la Emisión de Gases de Efecto Invernadero Contribuyentes al Calentamiento Global

Los métodos existentes en la actualidad son métodos preventivos de la emisión de GEI (no producir estos gases) en vez de métodos correctivos. Uno de los métodos recomendados por la Universidad de Ohio State es el de la restauración de suelos degradados, ya que estudios muestran que la degradación de suelos y pérdidas de carbono orgánico en el suelo son altos contribuyentes a la liberación de GEI a la atmósfera. Esta degradación de los suelos se debe al uso indiscriminado de las tierras agrícolas que ha comenzado luego de la revolución verde¹⁴. Otro método es el de utilización de agricultura intensiva. Se realizarían prácticas de manejo más sostenibles del suelo para aumentar la producción en la misma área de suelo y no ir utilizando nuevos suelos para producir más¹⁵.

Otro de los grandes problemas generadores de GEI es la deforestación, ya que además de eliminar material que puede capturar el CO₂ del aire, a su vez se está liberando el

¹³ FAO. Variabilidad y cambio del clima: un desafío para la producción agrícola sostenible.

¹⁴ LAL, R. Controlling greenhouse gases and feeding the globe through soil management. (En adelante citado como Controlling greenhouse).

¹⁵ Controlling greenhouse.

CO₂ que ha sido captado por los árboles durante años. En un estudio realizado en Brazil se evaluaron las emisiones de GEI con diferentes tipos cortes y aclareos de bosques. Los tres casos estudiados fueron el de aclareo para construir potreros que son grandes parches, otro de la deforestación planificada en callejones y finalmente la deforestación al azar (quitando árboles aislados sin dejar parques abiertos). Los resultados de este estudio presentaron que la fragmentación de los bosques por aclareo en callejones y deforestación al azar emite de dos a cinco más GEI que en el caso de aclareo para el armado de potreros¹⁶.

3.2 Biogás

El biogás es un compuesto de gases que principalmente se compone de CH₄ y CO₂ que se produce de la descomposición anaeróbica de materia orgánica realizado por microorganismos (Cuadro 1). El gas fue descubierto y reportado por Shirley en 1667 en los pantanos que causan los llamados “fuegos fatuos”. Luego Volta relacionó el gas con la descomposición de la vegetación en el fondo del agua¹⁷. El gas combustible del biogás es el CH₄ y éste es incoloro e inodoro. Al quemarlo se produce una llama azul y productos no contaminantes en una combustión completa¹⁸.

¹⁶ LAURENCE, W. *et al.* Tropical forest fragmentation and greenhouse gas emissions. *Forest Ecology and Management*.

¹⁷ MANDUJANO, M. *et al.* Biogás: energía y fertilizantes a partir de desechos orgánicos, manual para el promotor de la tecnología. (En adelante citado como Biogás: energía y fertilizantes).

¹⁸ Biogás: energía y fertilizantes.

Cuadro 1. Promedio de gases que componen el biogás¹⁹.

Gas	Porcentaje
Metano (CH ₄)	54 % - 70 %
Dióxido de carbono (CO ₂)	27 % - 45 %
Hidrógeno (H ₂)	1 % - 10 %
Nitrógeno (N ₂)	0,5 % - 3 %
Ácido sulfhídrico (H ₂ S)	0,1 %

3.2.1 Proceso Bioquímico de la Producción de Biogás

La producción de biogás se debe a la descomposición anaeróbica de materia orgánica, los cuales pueden ser desechos animales, desechos vegetales, desechos de procesos industriales, entre otros. Este proceso engloba una serie de reacciones bioquímicas y se pueden identificar dos fases principales (Figura 2): una fase acidogénica en donde la materia orgánica se convierte en su mayoría a acetatos y una segunda fase metanogénica en donde se produce CH₄ y CO₂²⁰.

¹⁹ Tomado de Mandujano, M. Biogás: energía y fertilizantes a partir de desechos orgánicos, manual para el promotor de la tecnología.

²⁰ TATA ENERGY RESEARCH INSTITUTE. Biogas technology: an information package. (En adelante citado como Tata Energy).

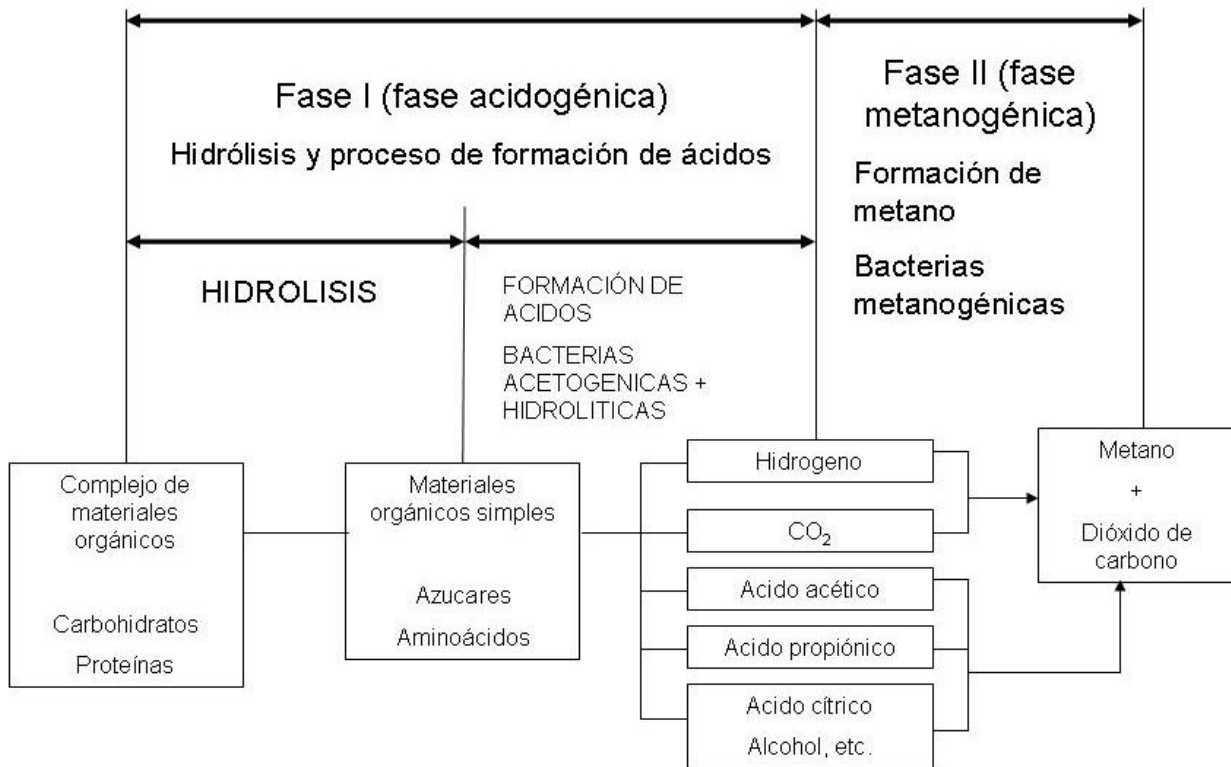


Figura 2. Proceso de la digestión difásica en la producción de CH₄²¹.

3.2.1.1 Fase acidogénica

Esta fase es el punto clave de la producción de biogás, ya que el acetato que es producido en esta fase es el sustrato principal para la producción de CH₄. Los productos finales de la fase ácida son acetatos, ácidos grasos superiores, CO₂ y H₂. La formación de estos productos se realiza por una cadena complicada de reacciones enzimáticas. Los carbohidratos poliméricos que contiene la materia orgánica son hidrolizados por enzimas a azúcares solubles simples, ácidos orgánicos y alcoholes de cadena corta²².

En la fermentación los azúcares son transformados a ácido pirúvico con liberación de hidrógeno (H) y este último servirá para reducir el ácido pirúvico a ácido propiónico. También el ácido pirúvico puede reducirse a etanol y los ácidos láctico, butírico y succínico (Cuadro 2).

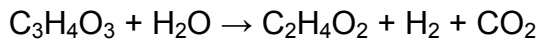
²¹ Tomado de Tata Energy Documentation & Information Centre. Biogas technology: an information package.

²² Tata Energy.

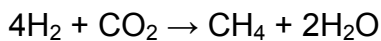
Cuadro 2. Reacciones bioquímicas del ácido pirúvico²³.

Producto	Reacción
Etanol	$C_3H_4O_3 + 2H \rightarrow C_2H_6O + CO_2$
Ácido láctico	$C_3H_4O_3 + 2H \rightarrow C_3H_6O_3$
Ácido butírico	$2C_3H_4O_3 \rightarrow C_4H_8O_2 + 2CO_2$
Ácido succínico	$C_3H_4O_3 + CO_2 + 2H \rightarrow C_4H_6O_4 + H_2O$

La síntesis de ácido acético a partir de ácido pirúvico es:



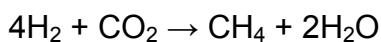
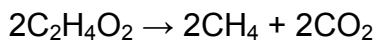
El hidrógeno luego puede ser utilizado por las bacterias metanogénicas para producir CH₄ y H₂O:



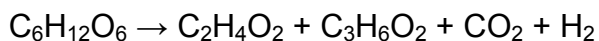
3.2.1.2 Fase metanogénica

En esta fase de los productos intermediarios de la fase ácida se convierten en CH₄. Los principales sustratos para la metanogénesis son el ácido acético y H₂ + CO₂, siendo el primero el más importante²⁴.

El proceso por el cual se produce CH₄ es el siguiente:



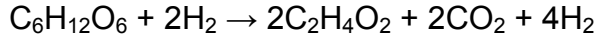
Si las bacterias metanogénicas crecen junto a las bacterias fermentadoras de azúcares la remoción de los H₂; esto induce a formar más de este compuesto en vez de una mezcla de ácido acético y ácido propiónico:



²³ Tomado de Tata Energy Documentation & Information Centre. Biogas technology: an information package.

²⁴ Tata Energy.

Lo que se produce sería ácido acético:



El hidrógeno formado en la etapa inicial del rompimiento de la glucosa a ácido pirúvico libera H_2 y más de este compuesto sería liberado en el proceso de ácido acético. El 4H_2 se combinaría luego con CO_2 para formar CH_4 . En un modo similar la producción de etanol, ácido láctico y otras reacciones que se mostraron anteriormente, serían convertidos a favor del ácido acético y producción de H_2 ²⁵.

3.2.1.3 Microorganismos que intervienen en el proceso de producción de biogás

Para la producción de biogás se requiere de la simbiosis de varias bacterias anaeróbicas. Al menos cuatro diferentes tipos de bacterias han sido reconocidos para la fermentación de la materia orgánica y su metabolismo genera biogás como producto final²⁶.

3.2.1.3.1 Bacterias hidrolíticas

Fermentan moléculas orgánicas complejas como polisacáridos, lípidos y proteínas en varios compuestos más simples (ácido acético, H_2 , CO_2 , compuestos de un solo carbono, ácidos orgánicos más grandes que el ácido acético y compuestos neutrales más grandes que el metanol)²⁷.

3.2.1.3.2 Bacterias acetogénicas

Convierten ácidos orgánicos como los butiratos y propionatos, y compuestos neutrales como el etanol y propanol a H_2 y acetatos²⁸.

3.2.1.3.3 Bacterias homoacetogénicas

Pueden fermentar un alto espectro de compuestos de uno solo o varios carbonos a ácidos acéticos²⁹.

²⁵ Tata Energy.

²⁶ Tata Energy.

²⁷ Tata Energy.

²⁸ Tata Energy.

²⁹ Tata Energy.

3.2.1.3.4 Bacterias metanogénicas

Son las que fermentan el H₂, CO₂, compuestos de un solo carbono y acetatos a CH₄. Las bacterias metanogénicas identificadas son: *Methanococcus*, *Metanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum*, y *Methanobacillus*³⁰.

3.2.2 Biodigestor

El biodigestor es básicamente una planta generadora de biogás en donde ocurre un proceso de descomposición anaeróbica de material orgánico. Este biogás es utilizado para la generación de energía por su alto contenido de CH₄ que es altamente inflamable. El biodigestor consiste en un contenedor hermético que puede tener uno o dos compartimientos separando la fase líquida con el almacenamiento del gas producido. El residuo de este proceso deja un excelente abono orgánico llamado bioabono³¹.

Los materiales que pueden ser utilizados como materia orgánica para la producción de biogás son desechos animales, excreta humana, desechos vegetales (tanto de plantas acuáticas como de plantas terrestres, pero deben ser trituradas antes de que entren en el sistema del biodigestor) y desechos sólidos municipales e industriales. Estos últimos requieren de mayor estudio en la producción de biogás³².

3.3 Microorganismos Eficaces (EM)

Microorganismos Eficaces (Effective Microorganisms, EM por sus siglas en inglés) es un coctel de microorganismos³³. Fue descubierto y desarrollado por el Doctor Teruo Higa, profesor de la Universidad de Ryukyus en la prefectura de Okinawa, Japón, en la década de 1980. El Doctor Higa estuvo investigando la eficacia microorganismos individualmente sin éxito alguno. Pero, al final de una investigación en laboratorio en 1977 mezcló los remanentes y los desechó en el jardín del laboratorio. Luego de varios días observó un crecimiento anormal de las plantas en donde se desechó la mezcla y

³⁰ Tata Energy.

³¹ Biogás: Energía y Fertilizantes.

³² Tata Energy.

³³ HIGA, T. What is EM technology?

concluyó que la mezcla de estos microorganismos producía efectos positivos. De allí nació el desarrollo de la tecnología de EM³⁴.

El EM se produce en tinas de cultivos de unas 80 variedades de microorganismos. Los microorganismos pertenecen a diez géneros de cinco familias distintas e incluye especies aeróbicas y anaeróbicas (de bacterias fototrópicas, bacterias ácido lácticas y levadoras). Dicho producto es el resultado de la coexistencia entre dos grupos de microorganismos con diferentes condiciones de vida, microorganismos aeróbicos que necesitan del aire para sobrevivir y microorganismos anaeróbicos donde el oxígeno no es necesario³⁵. Esta amplia diversidad de microorganismos le confiere al producto propiedades muy características que le han hecho ganar muchos seguidores alrededor del mundo. Entre estas características está aplicado a la agricultura y permite incrementar los rendimientos de los cultivos en dos o tres veces la producción actual. También el EM tiene la habilidad de transformar casi todos los contaminantes, desechos y basura que nos parece tan desagradable y problemática, a un estado no contaminante³⁶.

3.3.1 Bacterias Fototrópicas (*Rhodopseudomonas spp.*)

Las bacterias fototrópicas son un grupo de microorganismos independientes y autosuficientes. Estas bacterias sintetizan sustancias útiles de secreciones de raíces, materia orgánica y/o gases dañinos como el ácido sulfhídrico (H₂S) con el uso de luz solar y calor del suelo como fuentes de energía. Estas sustancias útiles son aminoácidos, ácidos nucleicos, sustancias bioactivas y azúcares, los cuales promueven el crecimiento y desarrollo de la planta³⁷.

Los metabolitos de estos microorganismos son absorbidos directamente por las plantas y actúan como sustrato para el incremento poblacional de microorganismos benéficos. Por ejemplo, en la rizósfera las micorrizas vesicular arbuscular (VA) se incrementan gracias a la disponibilidad de compuestos nitrogenados (aminoácidos) que son

³⁴ HIGA, T. Effective microorganisms and their role in kyusei nature farming and sustainable agriculture.

³⁵ HIGA, T. An earth saving revolution. (En adelante citado como An earth saving).

³⁶ HIGA, T. An earth saving revolution II.

³⁷ FUJISAWA, A. *et al.* Kyusei nature farming and the technology of effective microorganisms: guidelines for practical use. (En adelante citado como Kyusei nature farming).

secretados por las bacterias fototrópicas. Las micorrizas VA en respuesta incrementa la solubilidad de fosfatos en el suelo y, por ello, otorgan fósforo que no era disponible a las plantas. Las micorrizas VA también pueden coexistir con *Azobacter* y *Rhizobium*, incrementando la capacidad de las plantas para fijar nitrógeno de la atmósfera³⁸.

3.3.2 Bacterias Ácido Lácticas (*Lactobacillus* spp.)

Las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico de azúcares y otros carbohidratos, producidos por las bacterias fototrópicas y levaduras. Por eso, algunas comidas y bebidas como el yogur y encurtidos son hechas con bacterias ácido lácticas desde tiempos remotos. Sin embargo, el ácido láctico es un compuesto esterilizante fuerte que suprime microorganismos dañinos y ayuda a la descomposición de materiales como la lignina y la celulosa fermentándolos, removiendo efectos no deseables de la materia orgánica no descompuesta³⁹.

Las bacterias ácido lácticas tienen la habilidad de suprimir enfermedades incluyendo microorganismos como *Fusarium*, que aparecen en programas de cultivos continuos. En circunstancias normales, especies como *Fusarium* debilitan las plantas, exponiéndolos a enfermedades y poblaciones grandes de plagas como los nematodos. El uso de bacterias ácido lácticas reducen las poblaciones de nematodos y controla la propagación y dispersión de *Fusarium*, y gracias a ello induce un mejor ambiente para el crecimiento de los cultivos⁴⁰.

3.3.3 Levaduras (*Saccharomycetes* spp.)

Las levaduras sintetizan sustancias antimicrobiales y otras útiles, requeridas por las plantas para su crecimiento. Esto lo hacen a partir de aminoácidos y azúcares secretados por las bacterias fototrópicas, raíces de plantas y materia orgánica⁴¹.

³⁸ Kyusei nature farming.

³⁹ Kyusei nature farming.

⁴⁰ Kyusei nature farming.

⁴¹ Kyusei nature farming.

Las sustancias bioactivas como las hormonas y las enzimas producidas por las levaduras promueven la división activa celular y radical. Estas secreciones también son sustratos útiles para el EM como las bacterias ácido lácticas y actinomicetes⁴².

3.3.4 EM Activado (EMa)

Los microorganismos del EM se encuentran en un estado latente, por lo que al utilizarlo el efecto de éste es un poco lento. Para evitar esto se puede activar el EM y el subproducto es llamado EMa. El proceso para activar el EM es mezclar el producto con agua de buena calidad y melaza (Cuadro 3). Se debe procesar en un recipiente cerrado para ofrecer un ambiente anaeróbico y la solución estará finalizada cuando alcance un pH de 3,5. El EMa nunca debe ser reactivado por dos razones: primero esto puede causar contaminación en la mezcla y segundo el balance microbiano es alterado y la eficacia del EM se pierde⁴³.

Además, el proceso de activación EM sirve para la multiplicación de microorganismos. Así se pueden reducir costos de aplicación, ya que luego de la activación el EMa se debe diluir en agua a diferentes porcentajes según el uso que se le dé⁴⁴. Se utiliza melaza como fuente de energía para la activación de EM, ya que también contiene proteínas y minerales útiles para los microorganismos, a diferencia del azúcar refinada que solo contiene sacarosa. La temperatura óptima de activación es entre 25 °C y 37 °C, ya que fuera de estos rangos la velocidad de reproducción de estos microorganismos se reduce considerablemente⁴⁵.

Cuadro 3. Materiales y porcentajes necesarios para la activación de EM en un 5 %⁴⁶.

Materiales	Porcentaje
Agua (Buena Calidad)	90
EM	5
Melaza	5

⁴² Kyusei nature farming.

⁴³ Kyusei nature farming.

⁴⁴ MAU, F. EM microorganismos efectivos. (En adelante citado como EM microorganismos efectivos).

⁴⁵ EM microorganismos efectivos.

⁴⁶ Tomado de MAU, F. EM microorganismos efectivos.

3.3.5 Proceso Químico de Fermentación del EM

En el proceso de fermentación las bacterias ácido lácticas generan ácidos orgánicos como resultado de su metabolismo, utilizando como sustrato los derivados de la materia orgánica producida en el la hidrólisis. Luego las bacterias fototrópicas se encargan de producir ácido sulfúrico para ser aprovechadas por las bacterias reductoras de sulfatos produciendo sacáridos. Estos sacáridos vuelven a ser reprocesadas junto con los demás derivados de la materia orgánica para repetir el ciclo⁴⁷.

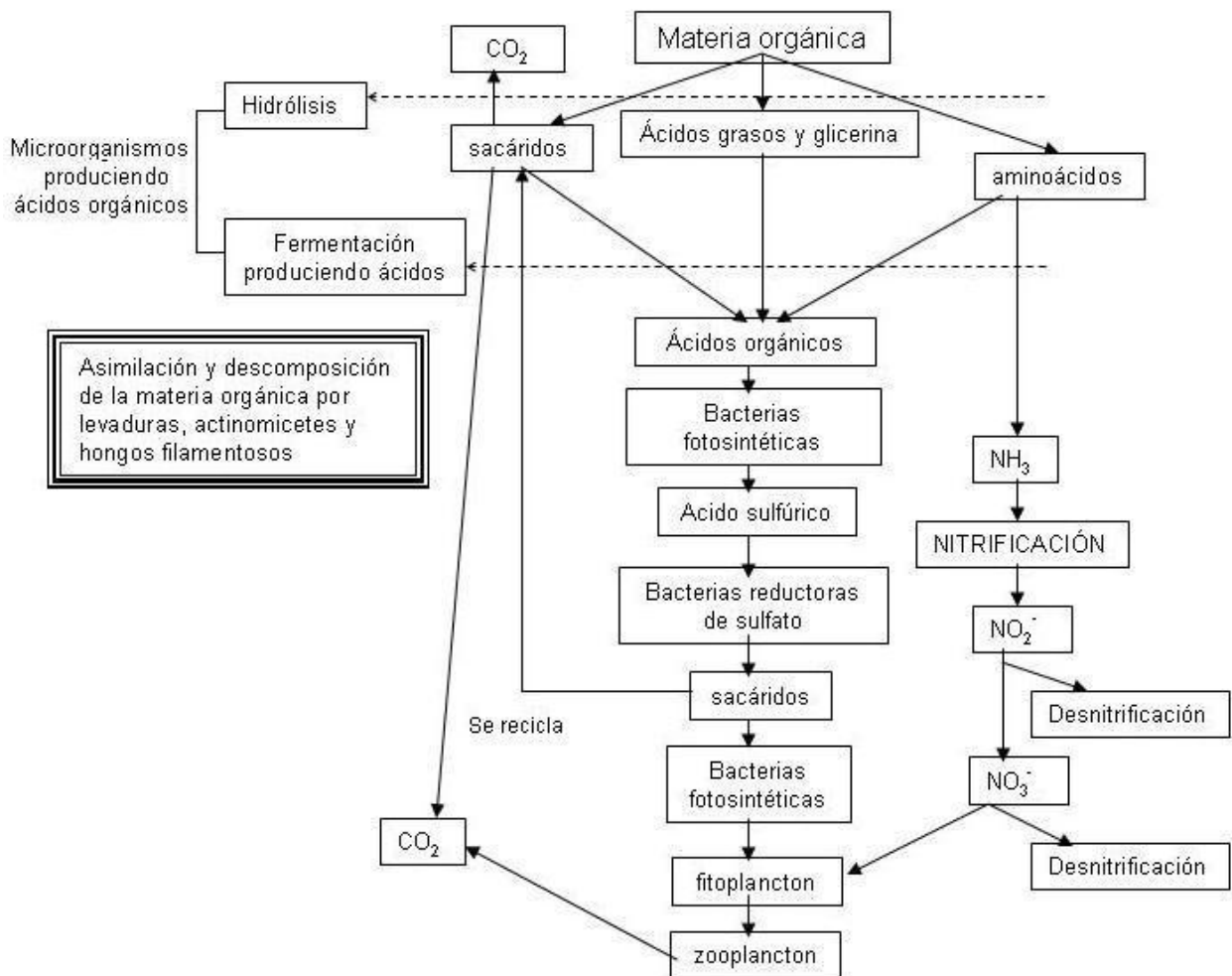


Figura 3. Proceso en el cual se fermenta la materia orgánica con el uso de EM⁴⁸.

Las bacterias fototrópicas son el pivote central de la efectividad del EM que utilizan la luz solar y ácidos orgánicos para multiplicarse⁴⁹. La relación de cooperación y

⁴⁷ CHINEN, N. y HIGA, T. EM treatments of odor, waste water and environmental problems. (En adelante citado como EM treatments).

⁴⁸ Tomado de Chinen, N. y Higa, T. EM treatments of odor, waste water and environmental problems.

co-prosperidad del EM hace que los otros microorganismos provean de ácidos orgánicos a las bacterias fototrópicas. Es así por el cual el EM funciona en ausencia de luz también⁵⁰.

3.4 Uso de EM en el Control de los Gases de Efecto Invernadero

Según Higa, con la tecnología EM se pueden controlar los GEI porque los hidrocarburos, sulfuros y óxidos son tratados por estos microorganismos, convirtiendo estas sustancias en aminoácidos, oxígeno orgánico y azúcares que fertilizan el suelo, proveen nutrientes a las plantas y plancton para animales acuáticos⁵¹. Lo que no hace EM es convertirlos en ningún tipo de gas. En un reciente estudio, Higa determinó que la tecnología EM mostró tener un efecto de supresión en la generación de CH₄ en campos de arroz inundado de hasta un 59 %⁵².

⁴⁹ Kyusei nature farming

⁵⁰ EM treatments.

⁵¹ An earth saving.

⁵² A preliminary study.

4 Materiales y Métodos

4.1 Ubicación

La investigación se ubicó dentro de las instalaciones de la Universidad EARTH, cerca de la compostera, usando una infraestructura adecuada para proteger los biodigestores a escala. Específicamente se instaló a 10° 13' 10,95" latitud Norte y 83° 35' 37,59" longitud Oeste. La altitud a la cual fue ubicado es de 33,9 m.s.n.m.

4.2 Experimento 1

Con el objetivo de medir el efecto de la aplicación de EMa en la generación de CH₄ en un sistema biológico, se realizó un diseño estadístico multifactorial. Esto constó de cinco tratamientos de EMa con tres tipos de material orgánico, en biodigestores a escala con seis repeticiones de cada uno (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diseño experimental utilizado en la investigación (Experimento 1).

Concentración EMa (%)	Material orgánico (estiércol)		
	Bovino	Porcino	Mezcla 1:1 (Bovino:Porcino)
0	T01	T02	T03
0,1	T11	T12	T13
1	T21	T22	T23
5	T31	T32	T33
10	T41	T42	T43

Cada unidad experimental representó un biodigestor a escala, el cual consistió en una bolsa plástica de 21 cm por 30 cm con un volumen de 10 L. Cada bolsa contenía como material sustrato para la generación de gas, una mezcla de 200 mL de excretas (tipo según el tratamiento) y 800 mL de solución de EMa al 5 % con agua corriente de tubo (dosis según el tratamiento), el porcentaje de EMa en función del litro de mezcla. Estas bolsas fueron selladas sin dejar aire dentro de las mismas para que el gas generado fuese completamente por los microorganismos y a partir de la mezcla sustrato de estiércol y EMa. La duración del proceso de generación de gas o tiempo de retención

por tratarse de biodigestores a escala fue de 30 días, siendo el mismo que se utiliza como parámetro de diseño en los biodigestores utilizados en la Finca Pecuaria Integrada (FPI) de la universidad.

Antes de montar el experimento, se realizó un análisis completo de las mezclas diluidas en agua de las excretas utilizadas para las unidades experimentales. Se analizó las mezclas para sólidos totales (método de incineración), pH (el electrodo del pH-metro directamente en la mezcla diluida de estiércol y agua), elementos mayores, menores y cenizas⁵³.

Se evaluó semanalmente de forma visual el volumen de gas generado por unidad experimental y de acuerdo al gas generado (si había suficiente gas dentro de la bolsa para el análisis). También se realizaron muestreos de la pureza de CH₄ presente.

4.3 Experimento 2

Después de 6 semanas del Experimento 1, la cantidad (volumen) de gases generados no fue significativa o suficiente para poder realizar un análisis de pureza de CH₄ presente. Por esta razón, se repitió el experimento con las siguientes modificaciones. En este segundo montaje del experimento, se realizó un diseño estadístico multifactorial que constó de tres tratamientos con tres tipos de material orgánico, en biodigestores a escala con seis repeticiones (Cuadro 5).

Cuadro 5. Diseño experimental utilizado en la investigación (Experimento 2).

Concentración EMa (%)	Material orgánico (estiércol)		
	Bovino	Porcino	Mezcla 1:1 (Bovino:Porcino)
0	T01	T02	T03
1	T11	T12	T13
10	T21	T22	T23

⁵³ CLESCERI, LS; GREENBERG, AE; EATON, AD. (eds.) Standard Methods for Examination of Water and Wastewater.

Para la construcción de los biodigestores a escala se utilizó la misma cantidad de estiércol (200 mL) como material sustrato y efluente de biodigestor como inóculo de microorganismos metanogénicos (800 mL), con la dosis de EMA al 5 % en función del volumen total de mezcla (1 L) dentro de una bolsa plástica de 10 L. Para asegurar una población de microorganismos metanogénicos, el estiércol fue mezclado con agua de efluente proveniente del biodigestor de la FPI. Las bolsas (biodigestores a escala) fueron selladas como se hizo en el Experimento 1. Sin embargo, en el Experimento 2, las bolsas fueron selladas permitiéndoles tener una cámara de aire de 5900 cm³ en su interior. El tiempo de retención bajo análisis fue de 30 días, haciendo uso del parámetro de diseño usado por la FPI de la universidad.

Al finalizar el periodo de retención, se realizó la evaluación de pureza de gas CH₄ así como el porcentaje de CO₂ presente para cada una de las unidades experimentales. Al mismo tiempo se evaluaron los sólidos totales remanentes en las mismas. A partir de los resultados obtenidos se desarrollaron análisis utilizando el paquete de software estadístico Minitab 15 para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

5 Resultados y Discusión

5.1 Experimento 1

5.1.1 Análisis de Laboratorio de la Materia Orgánica Utilizada como Sustrato

Se hizo un análisis químico de laboratorio en los sustratos utilizados (Cuadro 6). El análisis se ha hecho de los diferentes materiales orgánicos utilizados mezclados con agua antes de agregar EMa.

Cuadro 6. Datos del análisis químico de la materia orgánica.

Materia orgánica	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	ST †	Ceniza
	----- mg kg ⁻¹ -----									%
Bovino	10,8	253	2,5	71	*	*	*	*	26035	0,67
Porcino	22,7	612	3,9	52	*	*	*	*	30871	0,49
Mezcla	14,1	361	2,3	64	*	*	*	*	21108	0,40

† Sólidos totales

* No detectable

5.1.2 Volumen de Biogás

En este experimento se evaluó el incremento en los contenidos de biogás a lo largo del tiempo o periodo de retención bajo observación. Se entiende por biogás la producción principalmente de CH₄, CO₂ y vapor, con cantidades menores de otros gases como H₂S. En esta evaluación el valor máximo posible para el contenido de biogás fue 10, que representaba un llenado completo de la bolsa. En muchas de las observaciones fue muy difícil distinguir dichos incrementos para dar una valoración al mismo. Para esto se llevó un seguimiento en el cual se hizo una evaluación visual del gas generado.

Con cualquier materia orgánica, los tratamientos presentaron un incremento muy leve en los contenidos de biogás (Figura 4). En el caso de la materia orgánica de bovino, la producción más alta fue con el tratamiento T41 (10 % EMa). Los otros tratamientos fueron muy similares y produjeron menos biogás que el T41. La producción de gas más bajo fue con T01 (0 % EMa) (Figura 4a).

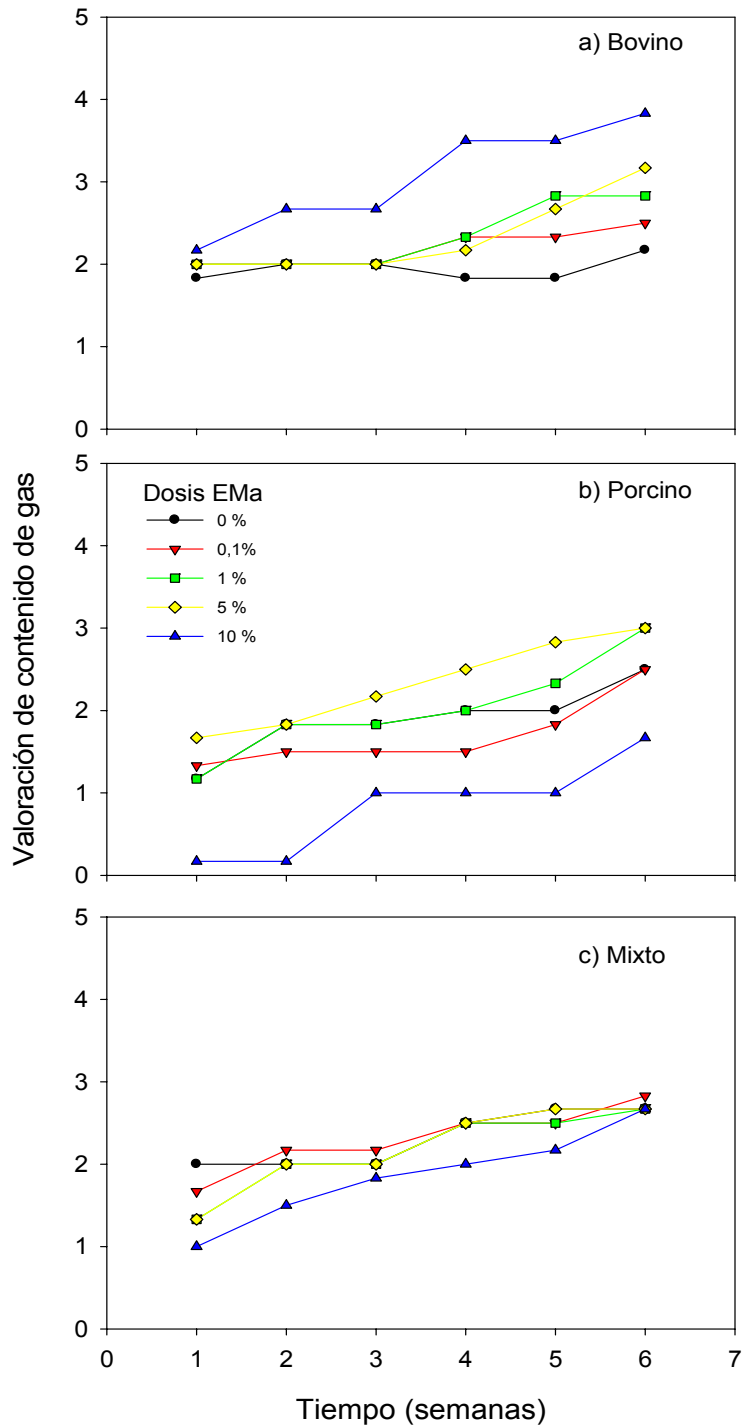


Figura 4. Evaluación visual del incremento en el volumen de gas producido con materia orgánica a) bovino, b) porcino y c) mixto.

Igual como con la materia orgánica de bovino, con la de porcino los primeros cuatro tratamientos produjeron cantidades similares de biogás. Los tratamientos T02 y T12

generaron menos gas que T22 y T32 (Figura 4b). Sin embargo, con ese material, la producción más baja fue con el tratamiento T42 (10 % EMa), contrario de los resultados con la materia orgánica de bovino. Con la materia orgánica mixto (Figura 4c), los resultados fueron similares a los del porcino; la producción más baja fue con el tratamiento T43 (10 % EMa).

Los tratamientos en este Experimento 1 no generaron una cantidad de gas adecuada para hacer un análisis apropiado de contenido de CH₄ (Figura 5). Esto debido a que el aparato para medir dicho parámetro requiere de un volumen determinado de gas en circulación para realizar la medición. Estos valores tan bajos de contenido de biogás en las bolsas tampoco permitieron realizar la determinación de la pureza (%) de CO₂ presente. Esta baja producción de biogás pudo deberse a varios factores; uno de ellos es la no utilización de inocular como efluente de biodigestor en producción. Otro factor pudo ser la utilización de agua proveniente de tubo, la cual puede contener altos porcentajes de cloro, eliminando el contenido de microorganismos presentes en el material empleado (Figura 5).

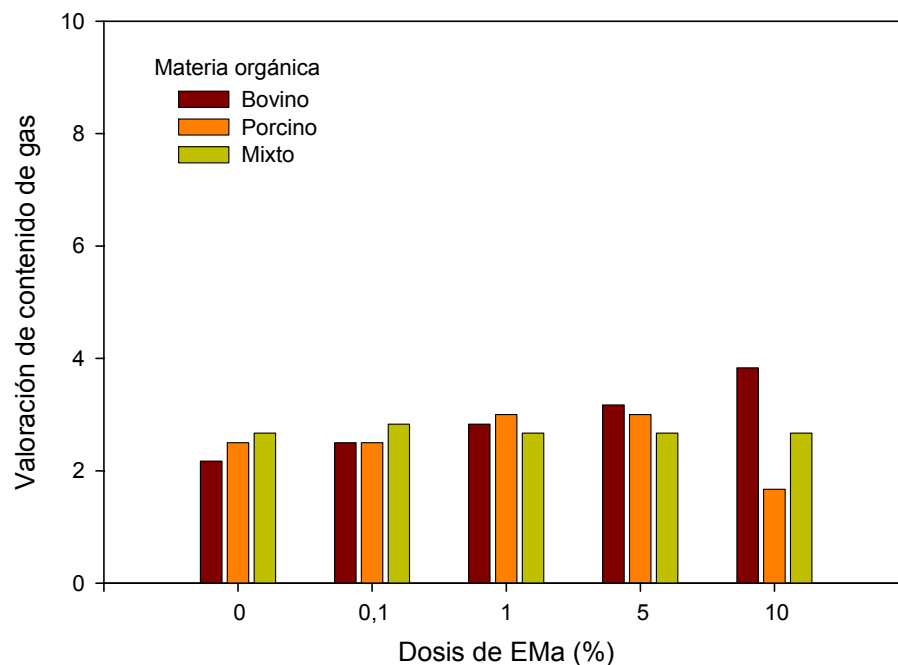


Figura 5. Contenido de gas según valoración en la última semana (semana 6) de análisis de CH₄.

5.1.3 Coloración de la Materia Orgánica

En todas las bolsas se observó la presencia de una especie de algas, generadas a partir del material y adheridas a las paredes de las bolsas. Dichas algas mostraron un patrón de aparición según el material, la cerdaza presentó una coloración rojiza (Figura 6), la bovinaza coloración café (Figura 7) y el material mixto mostró una combinación de color rojizo-café (Figura 8). Estas coloraciones de rojo y rojizo-café se debieron a grandes cantidades de colonias de bacterias fototrópicas provenientes principalmente del EMA aplicado durante la preparación de los tratamientos. Las coloraciones café fueron debidas a las mismas bacterias pero en menor concentración de colonias presentes.



Figura 6. Coloración rojiza en bolsas conteniendo material a base de cerdaza.



Figura 7. Coloración café en bolsas conteniendo material a base de bovinaza.



Figura 8. Coloración rojizo-café en bolsas conteniendo material mixto.

5.2 Experimento 2

Para el Experimento 2, aunque se realizaron modificaciones en la metodología, todavía no fue posible llevar un registro de la producción e incrementos de biogás generado. Esto resultó también debido a la cámara de gas que se introdujo dentro de las bolsas, previo al sellado de las mismas. Sin embargo, al final del periodo de retención de los tratamientos, sí se pudo realizar un registro de concentración de CH_4 , CO_2 , sólidos totales y pH por cada tratamiento.

5.2.1 Producción de CH_4

Los resultados generados por el análisis de porcentaje de CH_4 mostraron una tendencia al aumento en función del incremento en la dosis de EMa aplicado al material sustrato. En el caso de tipo de material utilizado, a mayor contenido de material de origen porcino, el porcentaje de CH_4 se incrementó hasta alcanzar el mayor valor con el tratamiento que únicamente contenía éste (Figuras 9 y 10).

Los análisis de varianza aplicados mostraron que hay diferencias significativas en los resultados presentados por los tratamientos material utilizado y concentración de EMa ($p < 0,01$), pero no existieron diferencias estadísticamente significativas en la interacción entre el material y la concentración. En base a lo anterior se realizaron pruebas de medias para cada caso, determinándose que los mejores tratamientos para la generación de CH_4 fueron el material de origen porcino y la concentración de 10 % de EMa con un valor de p ajustado $< 0,01$ para ambos (Anexos 7, 8 y 9).

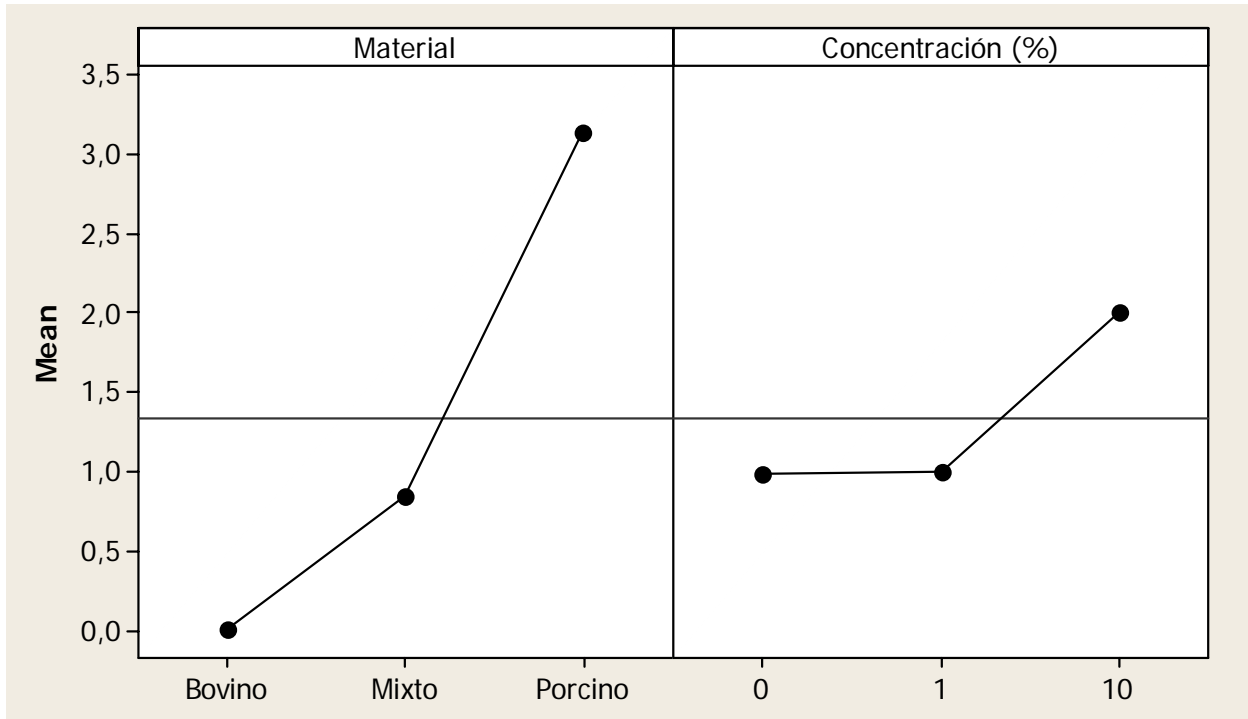


Figura 9. Gráfico de las medias ajustadas del efecto del material y concentración en CH₄.

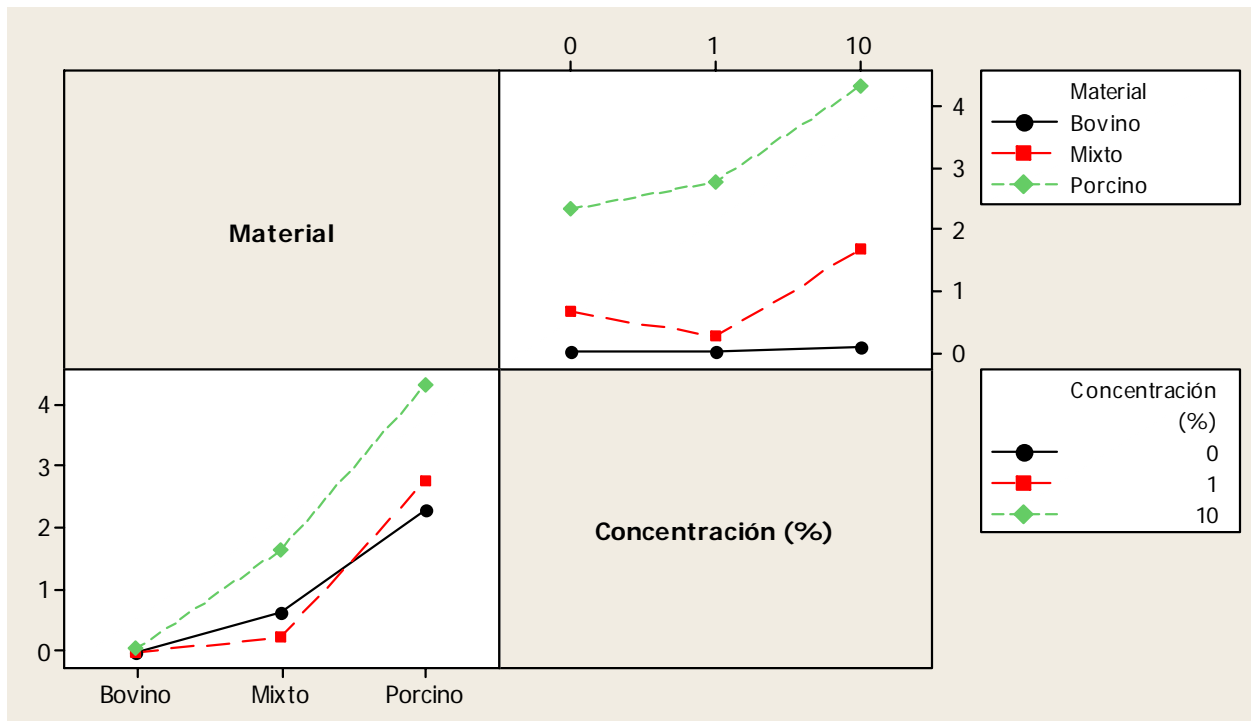


Figura 10. Gráficos de las interacciones entre porcentaje de CH₄ producido con las diferentes concentraciones de EMA y los diferentes materiales utilizados (medias ajustadas).

El comportamiento mostrado por el CH₄ en función del EMa se pudo deber a que los microorganismos de este compuesto al entrar en contacto con la materia orgánica comenzaron un proceso de degradación de ésta, permitiendo la disponibilidad de compuestos orgánicos más simples que pudieran ser utilizados por las bacterias metanogénicas presentes en el medio. Se ha mencionado que la aplicación de EMa puede reducir la generación de CH₄⁵⁴, pero esto se puede dar si dicho producto es aplicado dentro del biodigestor durante la producción activa de biogás, pudiendo deberse a la competencia por los nutrientes por parte de los microorganismos del producto. Para el caso del presente estudio el EMa fue aplicado desde el inicio del montaje del proyecto, de tal forma que la fase de metanogénesis no había aun comenzado.

En el caso de la respuesta del porcentaje de CH₄ en base a material utilizado, el de origen porcino presentó una mejor respuesta, debido a que el tracto digestivo porcino es menos eficiente en la degradación de la materia orgánica por tratarse de un monogástrico. De esta forma la materia orgánica sin degradar o parcialmente degradada queda a disposición de los microorganismos metanogénicos. Esto se pudo corroborar con los datos obtenidos del contenido de nutrientes por material utilizado. En contraste el material de origen bovino obtuvo menos nutrientes disponibles (Cuadro 4) para el proceso de metanogénesis, puesto que dicho material ya ha pasado por un proceso de digestión de cuatro diferentes estómagos. De tal forma, dependiendo del material que alimenta los biodigestores, éstos van a ser más o menos eficientes en la producción de CH₄.

5.2.2 Producción de CO₂

Los resultados generados por el análisis de porcentaje de CO₂ mostraron una tendencia al aumento en función del incremento en la dosis de EMa aplicado al material sustrato sin tomar en cuenta la significancia estadística. Al igual que en el caso de CH₄ en el tipo de material utilizado, a mayor contenido de material de origen porcino, el porcentaje de CO₂ se incrementó hasta alcanzar el mayor valor con el tratamiento que únicamente contenía éste (Figuras 11 y 12).

⁵⁴ A preliminary study.

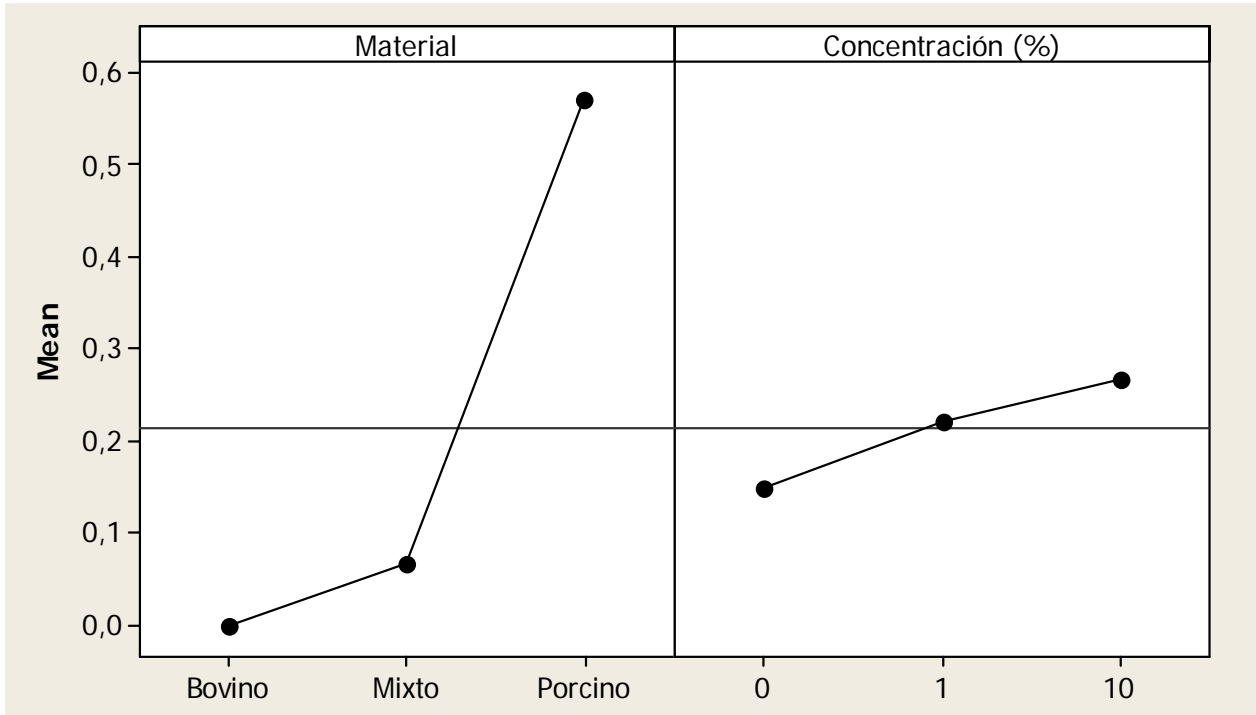


Figura 11. Gráfico de las medias ajustadas del efecto del material y concentración en CO₂.

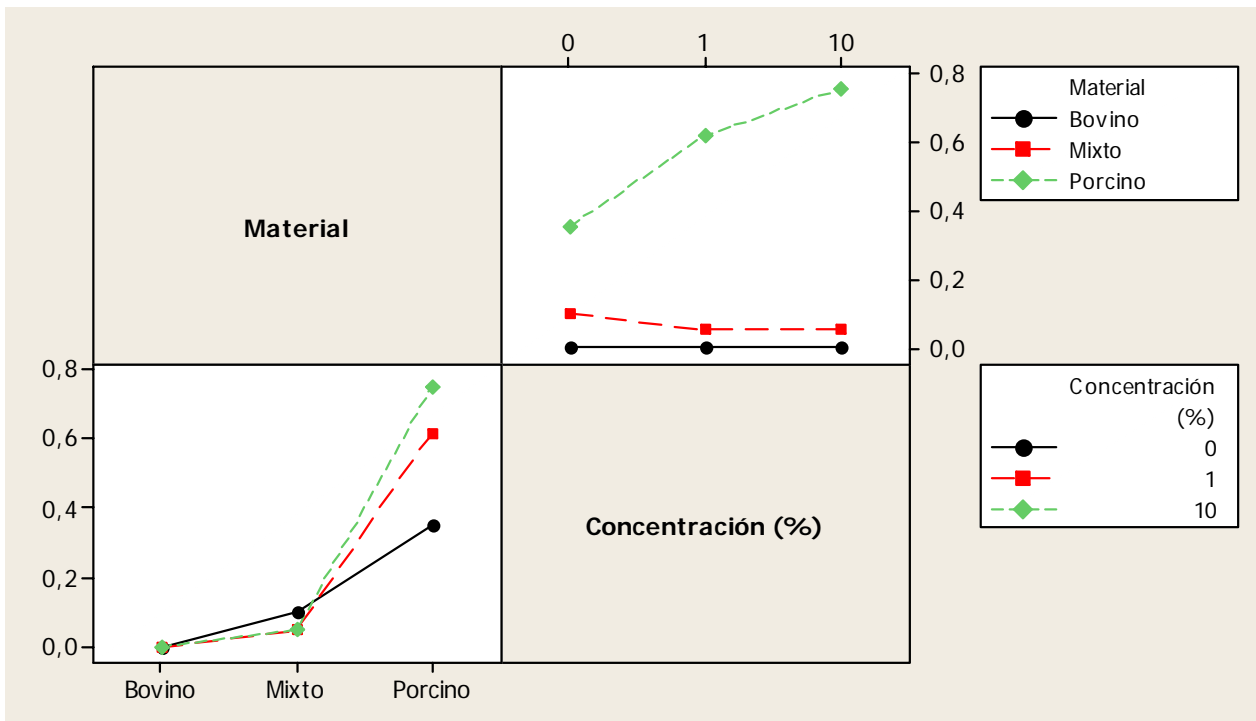


Figura 12. Gráficos de las interacciones entre porcentaje de CO₂ producido con las diferentes concentraciones de EMA y los diferentes materiales utilizados (medias ajustadas).

El análisis de varianza aplicado al resultado de porcentaje de CO₂ generado mostró que existieron diferencias estadísticamente significativas únicamente para el tratamiento de material utilizado ($p < 0,01$). Cuando los promedios de los factores de este tratamiento fueron sometidos a una prueba de medias, ésta indicó que el mejor tratamiento para la generación de CO₂ fue el material de origen porcino, con un valor de p ajustado $< 0,01$ (Anexos 10 y 11).

Al igual que el comportamiento mostrado por los resultados de porcentaje de CH₄, el porcentaje de CO₂ respondió a un mayor contenido de nutrientes por parte del material de origen porcino, para el proceso de degradación de la materia orgánica. Esto se debió a la naturaleza monogástrica del porcino y por ende la menor eficiencia en el aprovechamiento del material orgánico en comparación con el rumen y los estómagos del bovino.

5.2.3 ST (Sólidos Totales)

Los resultados generados por el análisis de porcentaje de ST mostraron una tendencia de disminución en función del incremento en la dosis de EMa aplicado al material sustrato, sin tomar en cuenta la significancia estadística. En el caso de material utilizado, a mayor contenido de material de origen porcino, el porcentaje de ST se incrementó (Figuras 13 y 14).

Al realizar los análisis de varianza al porcentaje de ST se encontró una diferencia estadísticamente significativa para el tratamiento de material utilizado y para la interacción de tratamiento de material y porcentaje de EMa aplicado ($p < 0,01$). En el caso de la prueba de medias se demostró que los tratamientos para el porcentaje de ST mayor fueron los materiales de origen porcino y mixto (Anexos 12, 13 y 14).

Las Figuras 13 y 14 presentan datos de únicamente las diferencias finales entre los tratamientos y no las diferencias entre los porcentajes iniciales y finales del proceso de metanogénesis. A pesar de haber generado menor cantidad de CH₄ y CO₂, el material de origen bovino presentó una menor cantidad de sólidos totales remanentes en comparación con el de origen porcino.

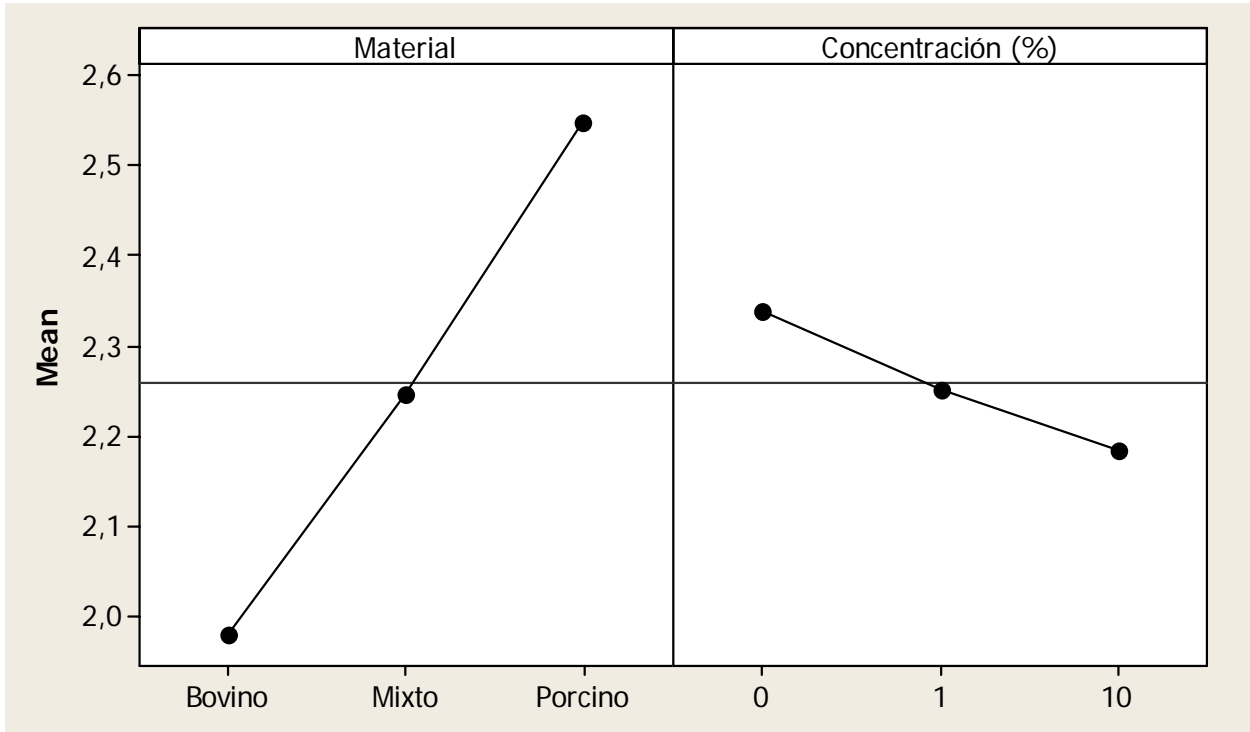


Figura 13. Gráfico de las medias ajustadas del efecto del material y concentración en los sólidos totales remanentes.

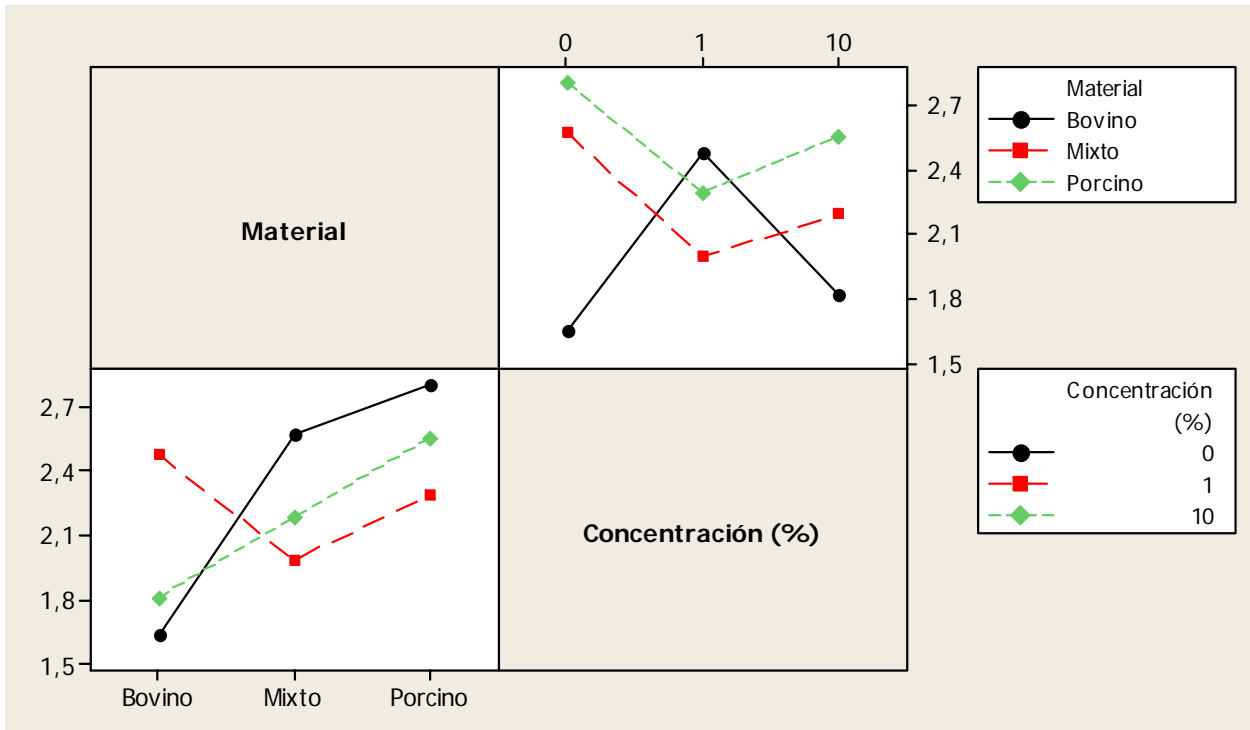


Figura 14. Gráficos de las interacciones entre los sólidos totales remanentes con las diferentes concentraciones de EMA y los diferentes materiales utilizados (medias ajustadas).

5.2.4 pH

Los resultados generados por el análisis de pH mostraron una tendencia de aumento en función del incremento en la dosis de EMa aplicado al material sustrato, sin tomar en cuenta la significancia estadística. En el caso de material utilizado, a mayor contenido de material de origen porcino, el pH se incrementó (Figuras 15 y 16).

Al realizar los análisis de varianza al pH se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el tratamiento de material utilizado y para la interacción entre el tratamiento de material y porcentaje de EMa aplicado ($p < 0,01$). En el caso de la prueba de medias se demostró que al igual que las otras variables, los tratamientos para el valor de pH mayor fueron los materiales de origen porcino y mixto, al mismo tiempo las interacciones entre los materiales de origen porcino con las dosis menores de EMa demostraron tener los valores de pH mayores del experimento (Anexos 15, 16 y 17).

Las Figuras 15 y 16 presentan datos de únicamente las diferencias finales de pH entre los tratamientos y no las diferencias entre los valores de pH iniciales y finales del proceso de metanogénesis. Estos resultados de valores de pH generados por el Experimento 2 no nos proporcionaron bases para un análisis con el fin de los objetivos, puesto que las dosis de EMa utilizadas no mostraron tener diferencias estadísticamente significativas con respecto al cambio del pH.

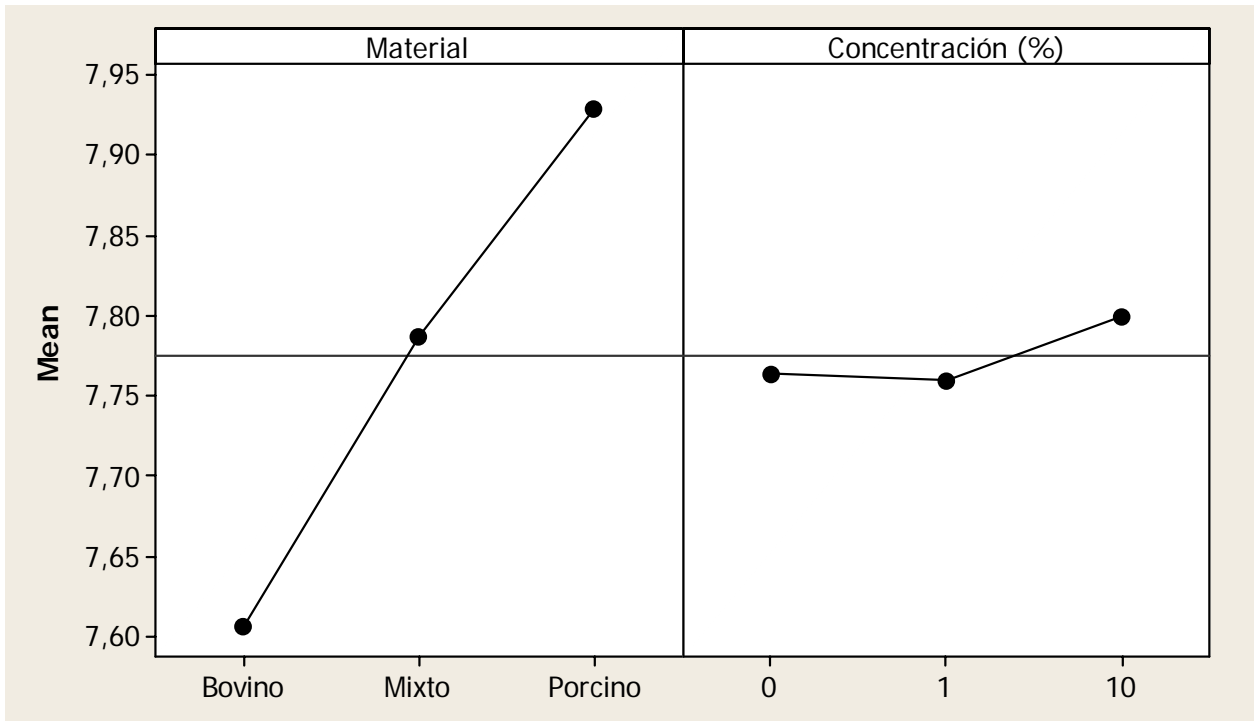


Figura 15. Gráfico de las medias ajustadas del efecto del material y concentración en el pH.

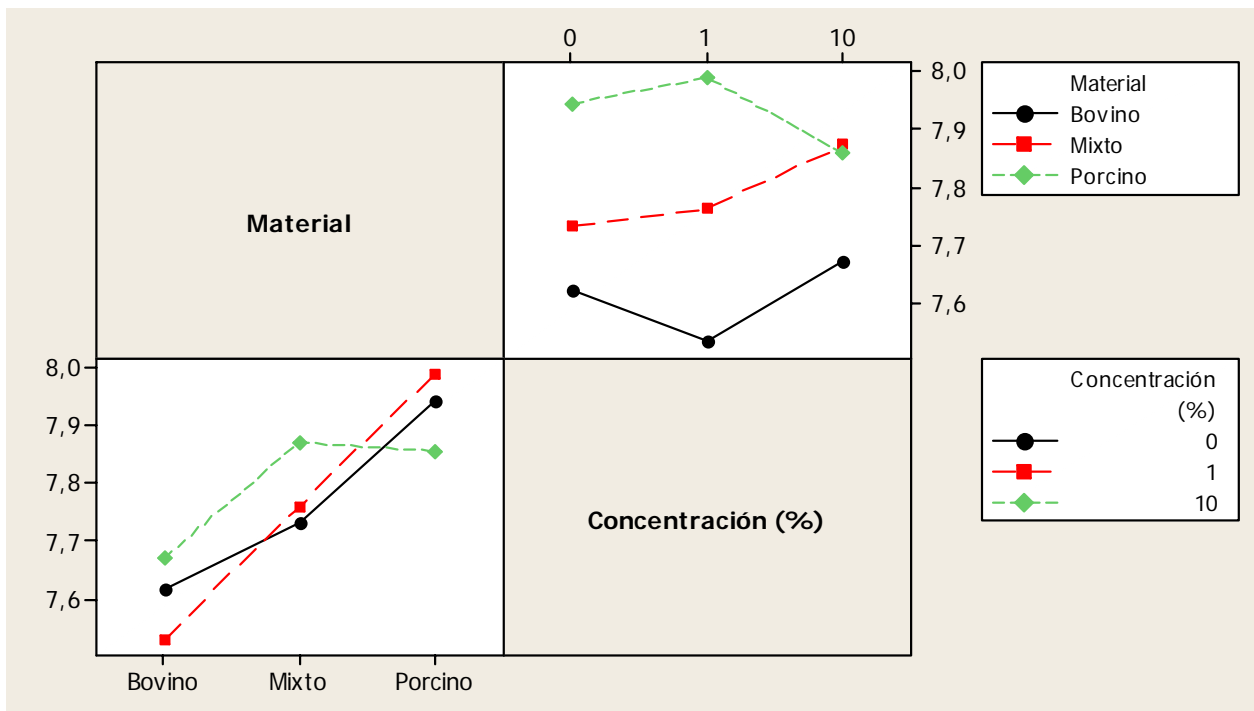


Figura 16. Gráficos de las interacciones entre el pH con las diferentes concentraciones de EMA y los diferentes materiales utilizados (medias ajustadas).

5.3 Análisis de la Metodología del Proyecto

En esta investigación, la aplicación de EMA en el sistema biológico del tipo de los biodigestores analizados demostró tener una tendencia a la disminución en la cantidad de sólidos totales remanentes en el sistema, al aumentar la cantidad de CH₄ generado, al igual que aumentó la emisión de CO₂ y dio mayores valores de pH a mayor dosis de EMA aplicado. Aplicar EMA en el material orgánico, previo al inicio de la fase de producción de CH₄ y bajo las condiciones en que se desarrolló la investigación, contribuyó a este aumento de la producción de biogás (CH₄ y CO₂). Para posteriores investigaciones se debería comparar el efecto del EMA, aplicándolo en el material orgánico previo a ser introducido al biodigestor como un pre-tratamiento contra la aplicación directa de este producto en el biodigestor en producción.

Sin embargo, la metodología utilizada para el montaje de estos experimentos demostró no ser la más eficiente para lograr la producción de CH₄ adecuada para un análisis más extenso. La combinación de efluente de biodigestor como inoculante y el dejar las bolsas sin aire en el interior puede brindar mejores resultados en función de volumen de biogás, debido a que el proceso es anaeróbico.

Al mismo tiempo, los aparatos utilizados para el análisis del biogás, específicamente el utilizado para la medición del porcentaje de CH₄ presente, demostró no tener un nivel de precisión adecuado. La utilización de metodologías como la cromatografía de gases puede brindar datos de mayor calidad para el análisis de pureza de CH₄, debido a su precisión para la medición.

El lugar donde se ubicó el experimento fue idóneo debido a la distancia que guardaba en relación con las residencias estudiantiles, evitándose problemas de daño de las bolsas y al mismo tiempo incomodidades con los malos olores. A la estructura es recomendable únicamente agregar un sarán que rodee el área con un porcentaje de sombra adecuado, para evitar que las bolsas tengan un contacto directo con la luz solar que deteriora el plástico de las bolsas y el sello.

Dado el comportamiento observado en la producción de CH₄ y CO₂, los resultados tendrían mayor significancia si se realizará una nueva investigación en la cual se evalúe el efecto del EMA en biodigestores de tamaño convencional y en distintas etapas de

generación de CH₄. A partir de éstos no habría problemas en analizar el volumen generado de forma cuantitativa, siendo este un parámetro muy importante para el análisis. Otras variables importantes para analizar en investigaciones futuras serían de sólidos totales, sólidos solubles totales y análisis químicos al inicio y al final de la fase de producción de CH₄.

6 Conclusiones y Recomendaciones

- La aplicación de EMa en un sistema biológico del tipo de los biodigestores analizados, demostró tener una tendencia a la disminución en la cantidad de sólidos totales remanentes en el sistema, a aumentar la cantidad de CH₄ generado, al igual que aumentó la emisión de CO₂ y dio mayores valores de pH a mayor dosis de EMa aplicado.
- Aplicar EMa en el material orgánico, previo al inicio de la fase de producción de CH₄ y bajo las condiciones en que se desarrollo la investigación, contribuyó al aumento de la producción de biogás (CH₄ y CO₂).
- El efecto de la aplicación de diferentes dosis de EMa aumentó el porcentaje de CH₄ presente en el biogás, a razón de 1 % más con la dosis de 10 % sobre las medias de CH₄ generado con las dosis de 0 % y 1 % de EMa.
- El material orgánico de origen porcino, bajo las condiciones de desarrollo del proyecto, mostró ser más eficiente en la producción de biogás.
- Dado el comportamiento observado en la producción de CH₄ y CO₂, realizar una nueva investigación en la cual se evalúe el efecto del EMa en biodigestores convencionales en fase de producción.
- Realizar una investigación comparando el efecto del EMa, aplicándolo en el material orgánico previo a ser introducido al biodigestor como un pre-tratamiento contra la aplicación directa de este producto en el biodigestor en producción.
- En investigaciones futuras realizar análisis de sólidos totales, sólidos solubles totales y análisis químicos al inicio y al final de la fase de producción de CH₄.

7 Lista de Referencias Bibliográficas

- ABRAHAM, E. *et al.* *Breve enciclopedia del ambiente*. [en línea]. Argentina (AR) : Universidad Nacional de Cuyo, 1996. [Consultado 16 agosto 2007]. Disponible en Internet <<http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/>>
- Biogas technology: an information package*. 1ª ed. Bombay (IN) : Tata Energy Research Institute, 1985. 189 p.
- BRETSCHER, D. *Agricultura orgánica y gases con efecto invernadero*. San José (CR) : Corporación Educativa para el Desarrollo Costarricense, 2005.
- CARET, R. y WINGROVE, A. *Química orgánica*. 2ª ed. México (MX) : Harper & Row Latinoamericana, 1984. 1569 p. ISBN 968-6034-36-6
- CHINEN, N. y HIGA, T. *EM treatments of odor, waste water and environmental problems*. Okinawa (JP) : University of Ryukyus. College of Agriculture, 1998.
- CLESCERI, LS; GREENBERG, AE; EATON, AD. (eds.) *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 20ª Ed. Washington (US) : American Public Health Association (APHA), 1999. 1325 p.
- FAO. *Variabilidad y cambio del clima: un desafío para la producción agrícola sostenible*. [en línea]. Roma (IT), 2001. [Consultado 14 marzo 2007]. Disponible en Internet <http://www.fao.org/docrep/meeting/003/x9177s.htm#P72_3621>
- FUJISAWA, A. *et al.* *Kyusei nature farming and the technology of effective microorganisms: guidelines for practical use*. Editado por SANGAKKARA, R. 2ª ed. Atami (JP) :INFRC, 1999. 44 p.
- Hibridaciones del carbono*. [en línea]. [Consultado 20 agosto 2007]. Disponible en Internet <<http://www.textoscientificos.com/quimica/orgánica/hibridacion-carbono>>
- HIGA, T. *An earth saving revolution II*. 1ª ed. Traducido por Anja KANAL. Tokyo (JP) : Sunmark Publishing, 1998. 364 p. ISBN 4-7631-9214-0
- *A preliminary study of the suppressing effect of EM on methane emissions in paddy fields*. Okinawa (JP) : Department of Agriculture University of Ryukyus, 1998. 7 p.
 - *An earth saving revolution*. 2ª ed. Traducido por Anja KANAL. Tokyo (JP) : Sunmark Publishing, 1996. 335 p. ISBN 4-7631-9157-8
 - *Effective microorganisms and their role in kyusei nature farming and sustainable agriculture*. In SHARIFUKKIN, H., ANUAR, A. y SHAHBUDDIN, M. (eds.). *Proceedings of the 2nd Conference on Effective Microorganisms (EM)*. Saraburi (TH), November 1993. Atami (JP) : INFRC, 1994. p. 1 – 6.
 - *Preliminary study of the suppressing effect of EM on methane emissions in paddy fields*. Okinawa (JP) : University of Ryukyus. Department of Agriculture, 1996. 7 p.

-. *What is EM technology?* Okinawa (JP) : University of Ryukyus. College of Agriculture, 1995. 6 p.

IPCC (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, US). *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. 1^a ed. Cambridge (US) : Cambridge University Press, 2001. 881 p. ISBN-0521-80767-0

LAL, R. *Controlling greenhouse gases and feeding the globe through soil management*. Columbus, Ohio (US) : The Ohio State University, 2000. 36 p.

LAURENCE, W. *et al.* Tropical forest fragmentation and greenhouse gas emissions. *Forest Ecology and Management*, Marzo 1998, no. 110, p. 173 - 180.

MANDUJANO, M. *et al.* *Biogás: energía y fertilizantes a partir de desechos orgánicos, manual para el promotor de la tecnología*. México (MX) : OLADE, 1981. 41 p. Serie Publicaciones Especiales, no. 6.

MAU, F. *EM microorganismos efectivos*. 1^a ed. München (DE) : Goldman / Arkanna Verlag, 2002. 237 p. ISBN 84-7871-741-2

SOLÓRZANO, G. *Aportación de gases de efecto invernadero por el manejo de residuos sólidos en México: el caso del metano*. [en línea]. México (MX) : Instituto Nacional de Ecología, 2005. [Consultado 15 marzo 2007]. Disponible en Internet
<<http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetitas/381/gsolorzano.html>>

UNFCCC (UNITED NATIONS FRAMEWORK CONVENTION ON CLIMATE CHANGE, DE). *Convención marco de las Naciones Unidas sobre el cambio climático: los diez primeros años*. 1^a ed. Bonn (DE): Secretaría del cambio climático, 2004. 97 p. ISBN 92-9218-010-5

8 Anexos

Anexo 1. Datos de volumen promedio del experimento 1.

Dosis (%)	Semana 1			Semana 2			Semana 3		
	Bovino	Porcino	Mixto	Bovino	Porcino	Mixto	Bovino	Porcino	Mixto
0	1,83	1,17	2,00	2,00	1,83	2,00	2,00	1,83	2,00
0,1	2,00	1,33	1,67	2,00	1,50	2,17	2,00	1,50	2,17
1	2,00	1,17	1,33	2,00	1,83	2,00	2,00	1,83	2,00
5	2,00	1,67	1,33	2,00	1,83	2,00	2,00	2,17	2,00
10	2,17	0,17	1,00	2,67	0,17	1,50	2,67	1,00	1,83

Dosis (%)	Semana 4			Semana 5			Semana 6		
	Bovino	Porcino	Mixto	Bovino	Porcino	Mixto	Bovino	Porcino	Mixto
0	1,83	2,00	2,50	1,83	2,00	2,67	2,17	2,50	2,67
0,1	2,33	1,50	2,50	2,33	1,83	2,50	2,50	2,50	2,83
1	2,33	2,00	2,50	2,83	2,33	2,50	2,83	3,00	2,67
5	2,17	2,50	2,50	2,67	2,83	2,67	3,17	3,00	2,67
10	3,50	1,00	2,00	3,50	1,00	2,17	3,83	1,67	2,67

Anexo 2. Datos de coloración del líquido en las bolsas del Experimento 1.

Repeticiones	Bovino				
	0 %	0,1 %	1 %	5 %	10 %
R1	café++	café+++	café+++	café++	café+
R2	café++	café++	café++	café++	café++
R3	café++	café++	café++	café++	café++
R4	café++	café++	café++	café++	café++
R5	café++	café++	café++	café++	café++
R6	café++	café++	café++	café++	café++

Repeticiones	Porcino				
	0 %	0 %	1 %	5 %	10 %
R1	rojizo++	rojizo++	rojizo+	café	café+
R2	rojizo++	rojizo++	rojizo++	rojizo++	café+
R3	rojizo++	rojizo++	rojizo++	rojizo++	rojizo++
R4	rojizo++	rojizo++	rojizo++	rojizo++	rojizo++
R5	rojizo++	rojizo++	rojizo++	rojizo++	rojizo++
R6	rojizo++	rojizo++	rojizo++	rojizo++	rojizo++

Repeticiones	Mixto				
	0 %	0 %	1 %	5 %	10 %
R1	café+rojo	café+rojo	café+rojo	café	café
R2	café+rojo	café+rojo	café+rojo	café+rojo	café+rojo
R3	café+rojo	café+rojo	café+rojo	café+rojo	café+rojo
R4	café+rojo	café+rojo	café+rojo	café+rojo	café+rojo
R5	café+rojo	café+rojo	café+rojo	café+rojo	café+rojo
R6	café+rojo	café+rojo	café+rojo	café+rojo	café+rojo

Anexo 3. Datos del porcentaje de CH₄ al final del Experimento 2.

Repeticiones	Bovino			Porcino			Mixto		
	0 %	1 %	10 %	0 %	1 %	10 %	0 %	1 %	10 %
R1	0,0	0,0	0,0	5,2	2,1	2,6	0,6	0,3	0,4
R2	0,0	0,0	0,2	3,2	2,5	1,6	0,7	0,1	0,9
R3	0,0	0,0	0,1	1,4	2,4	5,9	0,6	0,4	1,3
R4	0,0	0,0	0,0	1,0	2,7	4,8	0,7	0,2	1,7
R5	0,0	0,0	0,0	1,6	4,2	6,1	0,7	0,2	3,3
R6	0,0	0,0	0,0	1,5	2,7	4,9	0,6	0,2	2,3

Anexo 4. Datos del porcentaje de CO₂ al final del Experimento 2.

Repeticiones	Bovino			Porcino			Mixto		
	0 %	1 %	10 %	0 %	1 %	10 %	0 %	1 %	10 %
R1	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0
R2	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0
R3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	1,4	0,0	0,0	0,0
R4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,5	0,3	0,3	0,0
R5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	1,5	0,0	0,0	0,3
R6	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,8	0,0	0,0	0,0

Anexo 5. Datos del porcentaje de ST al final del Experimento 2.

Repeticiones	Bovino			Porcino			Mixto		
	0 %	1 %	10 %	0 %	1 %	10 %	0 %	1 %	10 %
R1	1,68	2,53	2,08	3,77	*	2,35	2,97	2,32	1,97
R2	*	2,93	2,22	*	2,07	3,22	2,88	1,94	2,29
R3	2,02	2,35	1,86	2,22	2,59	2,59	2,28	2,43	1,96
R4	2,16	2,10	1,58	3,35	2,69	2,60	2,61	2,16	1,94
R5	1,06	*	2,01	2,28	1,97	2,32	2,58	2,24	2,70
R6	1,33	1,91	1,16	2,41	2,11	2,24	2,09	0,84	2,27

* Muestras perdidas

Anexo 6. Datos de pH al final del Experimento 2.

Repeticiones	Bovino			Porcino			Mixto		
	0 %	1 %	10 %	0 %	1 %	10 %	0 %	1 %	10 %
R1	7,63	7,51	7,55	7,95	*	7,83	7,73	7,65	7,89
R2	*	7,47	7,60	*	8,01	7,91	7,72	7,77	7,84
R3	7,52	7,53	7,60	7,96	8,03	7,94	7,64	7,73	7,87
R4	7,62	7,51	7,81	7,90	8,11	7,82	7,85	7,66	7,86
R5	7,69	*	7,64	7,97	7,88	7,81	7,70	7,80	7,86
R6	7,63	7,64	7,83	7,94	7,91	7,83	7,75	7,96	7,91

* Muestras perdidas

Anexo 7. Análisis de Varianza para CH₄ (%), utilizando Test de suma de cuadrados ajustado (Minitab 15).

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Material	2	93,827	93,827	46,914	56,07	0,000
Concentración	2	12,269	12,269	6,135	7,33	0,002
Material*Concentración	4	7,312	7,312	1,828	2,18	0,086
Error	45	37,648	37,648	0,837		
Total	53	151,056				

S = 0,914675 R-Sq = 75,08% R-Sq(adj) = 70,65%

Anexo 8. Test simultáneo de Tukey para la variable de respuesta CH₄. Comparaciones a nivel de material (Minitab 15).

Material = Bovino sustraído de:

Material	Difference of Means	SE of Difference	Adjusted T-Value	P-Value
Mixto	0,8278	0,3049	2,715	0,0249
Porcino	3,1167	0,3049	10,222	0,0000

Material = Mixto sustraído de:

Material	Difference of Means	SE of Difference	Adjusted T-Value	P-Value
Porcino	2,289	0,3049	7,507	0,0000

**Anexo 9. Test simultáneo de Tukey para la variable de respuesta CH₄.
Comparaciones a nivel de concentración (Minitab 15).**

Concentración = 0 % sustraído de:

Concentración	Difference of Means	SE of Difference	Adjusted T-Value	P-Value
1 %	0,01111	0,3049	0,03644	0,9993
10 %	1,01667	0,3049	3,33452	0,0048

Concentración = 1 % sustraído de:

Concentración	Difference of Means	SE of Difference	Adjusted T-Value	P-Value
10	1,006	0,3049	3,298	0,0053

Anexo 10. Análisis de Varianza para CO₂ (%), utilizando Test de suma de cuadrados ajustado (Minitab 15).

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Material	2	3,5248	3,5248	1,7624	14,88	0,000
Concentración	2	0,1248	0,1248	0,0624	0,53	0,594
Material*Concentración	4	0,383	0,383	0,0957	0,81	0,526
Error	45	5,3283	5,3283	0,1184		
Total	53	9,3609				

S = 0,344104 R-Sq = 43,08% R-Sq(adj) = 32,96%

**Anexo 11. Test simultáneo de Tukey para la variable de respuesta CO₂.
Comparaciones a nivel de material (Minitab 15).**

Material = Bovino sustraído de:

Material	Difference of Means	SE of Difference	Adjusted T-Value	P-Value
Mixto	0,06667	0,1147	0,5812	0,8308
Porcino	0,57222	0,1147	4,9888	0,0000

Material = Mixto sustraído de:

Material	Difference of Means	SE of Difference	Adjusted T-Value	P-Value
Porcino	0,5056	0,1147	4,408	0,0002

Anexo 12. Análisis de Varianza para ST (%), utilizando Test de suma de cuadrados ajustado (Minitab 15).

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Material	2	2,6835	2,5701	1,285	6,34	0,004
Concentración	2	0,2555	0,2047	0,1023	0,51	0,607
Material*Concentración	4	3,4048	3,4048	0,8521	4,21	0,006
Error	41	8,3068	8,3068	0,2026		
Total	49	14,6541				

S = 0,450116 R-Sq = 43,31% R-Sq(adj) = 32,25%

**Anexo 13. Test simultáneo de Tukey para la variable de respuesta ST.
Comparaciones a nivel de material (Minitab 15).**

Material = Bovino sustraído de:

Material	Difference of Means	SE of Difference	Adjusted T-Value	P-Value
Mixto	0,2675	0,155	1,726	0,2078
Porcino	0,5686	0,1597	3,559	0,0027

Material = Mixto sustraído de:

Material	Difference of Means	SE of Difference	Adjusted T-Value	P-Value
Porcino	0,3011	0,155	1,943	0,1397

**Anexo 14. Test simultáneo de Tukey para la variable de respuesta ST.
Comparaciones a nivel de material por concentración (Minitab 15).**

Material = Bovino - Concentración = 0 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Bovino	1 %	0,8303	0,2847	2,9165	0,1144
Bovino	10 %	0,1683	0,2726	0,6175	0,9994
Mixto	0 %	0,921	0,2726	3,379	0,0384
Mixto	1 %	0,3401	0,2726	1,2478	0,9403
Mixto	10 %	0,5399	0,2726	1,981	0,5648
Porcino	0 %	1,1582	0,2847	4,0685	0,0059
Porcino	1 %	0,6417	0,2847	2,2543	0,3921
Porcino	10 %	0,9042	0,2726	3,3178	0,0448

Efecto de Microorganismos Eficaces (EM) en la generación de metano

Material = Bovino - Concentración = 1 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Bovino	10 %	-0,6620	0,2726	-2,4290	0,2964
Mixto	0 %	0,0907	0,2726	0,3330	1,0000
Mixto	1 %	-0,4902	0,2726	-1,7980	0,6828
Mixto	10 %	-0,2903	0,2726	-1,0650	0,9761
Porcino	0 %	0,3279	0,2847	1,1520	0,9619
Porcino	1 %	-0,1885	0,2847	-0,6620	0,9990
Porcino	10 %	0,0739	0,2726	0,2710	1,0000

Material = Bovino - Concentración = 10 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Mixto	0 %	0,7527	0,2599	2,8963	0,1195
Mixto	1 %	0,1718	0,2599	0,6611	0,999
Mixto	10 %	0,3717	0,2599	1,4301	0,8795
Porcino	0 %	0,9899	0,2726	3,6319	0,0199
Porcino	1 %	0,4734	0,2726	1,737	0,7208
Porcino	10 %	0,7359	0,2599	2,8319	0,1371

Efecto de Microorganismos Eficaces (EM) en la generación de metano

Material = Mixto - Concentración = 0 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Mixto	1 %	-0,5809	0,2599	-2,235	0,4034
Mixto	10 %	-0,381	0,2599	-1,466	0,8643
Porcino	0 %	0,2372	0,2726	0,87	0,9934
Porcino	1 %	-0,2793	0,2726	-1,024	0,9811
Porcino	10 %	-0,0168	0,2599	-0,064	1,0000

Material = Mixto - Concentración = 1 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Mixto	10 %	0,1999	0,2599	0,769	0,9971
Porcino	0 %	0,8181	0,2726	3,0016	0,0947
Porcino	1 %	0,3016	0,2726	1,067	0,9699
Porcino	10 %	0,5641	0,2599	2,1708	0,4427

Material = Mixto - Concentración = 10 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Porcino	0	0,6183	0,2726	2,2684	0,3839
Porcino	1	0,1018	0,2726	0,3735	1,0000
Porcino	10	0,3643	0,2599	1,4017	0,8907

Efecto de Microorganismos Eficaces (EM) en la generación de metano

Material = Porcino - Concentración = 0 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Porcino	1	-0,5165	0,2847	-1,814	0,6729
Porcino	10	-0,254	0,2726	-0,932	0,9897

Material = Porcino - Concentración = 1 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Porcino	10	0,2625	0,2726	0,963	0,9872

Anexo 15. Análisis de Varianza para pH, utilizando Test de suma de cuadrados ajustado (Minitab 15).

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Material	2	0,79222	0,82965	0,41482	69,13	0,000
Concentración	2	0,01783	0,01624	0,00812	1,35	0,270
Material*Concentración	4	0,15057	0,15057	0,03764	6,27	0
Error	41	0,24603	0,24603	0,00600		
Total	49	1,20664				

S = 0,0774639 R-Sq = 79,61% R-Sq(adj) = 75,63%

**Anexo 16. Test simultáneo de Tukey para la variable de respuesta ST.
Comparaciones a nivel de material (Minitab 15).**

Material = Bovino sustraído de:

Material	Difference of Means	SE of Difference	Adjusted T-Value	P-Value
Mixto	0,1811	0,02667	6,791	0,0000
Porcino	0,3223	0,02749	11,726	0,0000

Material = Mixto sustraído de:

Material	Difference of Means	SE of Difference	Adjusted T-Value	P-Value
Porcino	0,1412	0,02667	5,296	0,0000

**Anexo 17. Test simultáneo de Tukey para la variable de respuesta pH.
Comparaciones a nivel de material por concentración (Minitab 15).**

Material = Bovino - Concentración = 0 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Bovino	1 %	-0,08600	0,04899	-1,755	0,7096
Bovino	10 %	0,05367	0,04691	1,144	0,9634
Mixto	0 %	0,11367	0,04691	2,423	0,2992
Mixto	1 %	0,14367	0,04691	3,063	0,0824
Mixto	10 %	0,25367	0,04691	5,408	0,0001
Porcino	0 %	0,32600	0,04899	6,654	0,0000
Porcino	1 %	0,37000	0,04899	7,552	0,0000
Porcino	10 %	0,23867	0,04691	5,088	0,0003

Efecto de Microorganismos Eficaces (EM) en la generación de metano

Material = Bovino - Concentración = 1 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Bovino	10 %	0,1397	0,04691	2,978	0,1000
Mixto	0 %	0,1997	0,04691	4,257	0,0034
Mixto	1 %	0,2297	0,04691	4,896	0,0005
Mixto	10 %	0,3397	0,04691	7,241	0,0000
Porcino	0 %	0,4120	0,04899	8,409	0,0000
Porcino	1 %	0,4560	0,04899	9,308	0,0000
Porcino	10 %	0,3247	0,04691	6,922	1,0000

Material = Bovino - Concentración = 10 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Mixto	0 %	0,06000	0,04472	1,342	0,9124
Mixto	1 %	0,09000	0,04472	2,012	0,5440
Mixto	10 %	0,20000	0,04472	4,472	0,0018
Porcino	0 %	0,27233	0,04691	5,806	0,0000
Porcino	1 %	0,31633	0,04691	6,744	0,0000
Porcino	10 %	0,18500	0,04472	4,137	0,0049

Efecto de Microorganismos Eficaces (EM) en la generación de metano

Material = Mixto - Concentración = 0 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Mixto	1 %	0,03000	0,04472	0,6708	0,9989
Mixto	10 %	0,14000	0,04472	3,1303	0,0704
Porcino	0 %	0,21233	0,04691	4,5267	0,0015
Porcino	1 %	0,25633	0,04691	5,4647	0,0001
Porcino	10 %	0,12500	0,04472	2,7949	0,1481

Material = Mixto - Concentración = 1 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Mixto	10 %	0,11000	0,04472	2,460	0,2811
Porcino	0 %	0,18233	0,04691	3,887	0,0099
Porcino	1 %	0,22633	0,04691	4,825	0,0006
Porcino	10 %	0,09500	0,04472	2,124	0,4719

Material = Mixto - Concentración = 10 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Porcino	0	0,07233	0,04691	1,5421	0,8290
Porcino	1	0,11633	0,04691	2,4801	0,2712
Porcino	10	-0,01500	0,04472	-0,3354	1,0000

Efecto de Microorganismos Eficaces (EM) en la generación de metano

Material = Porcino - Concentración = 0 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Porcino	1	0,04400	0,04899	0,898	0,9919
Porcino	10	-0,08733	0,04691	-1,862	0,6423

Material = Porcino - Concentración = 1 % sustraído de:

Material	Concentración	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Porcino	10	-0,1313	0,04691	-2,800	0,1466