



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**DETERMINACION DE BACTERIAS PATOGENAS EN
ENSILADOS DE EXCRETAS PORCINAS CON
CAÑA DE AZUCAR**

TESIS PRESENTADA ANTE LA
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
POR

BENITA CONCEPCION HERNANDEZ CRISTOBAL



ASESORES: M.V.Z. M.C. FRANCISCO A. CASTREJON PINEDA
O.F.B. M.C. OLGA VELAZQUEZ MADRAZO
M.V.Z. M.C. HUMBERTO TRONCOSO ALTAMIRANO

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A MI LINDA Y BONDADOSA MAMI : *Natividad Cristóbal Mérimo*

Porque es el mejor ejemplo de rectitud, respeto, responsabilidad y amor. Por la interminable fe, fuerza, libertad, y apoyo brindado para seguir adelante. De todo corazón deseo que la vida siempre la colme de dichas y bendiciones.

A un amante es al que más se ama, a la pareja a quien se ama mejor; y a la madre a quien se ama para siempre.

Petit Senn

Gracias mami

A MI TIA CHULA, VANIDOSA Y PARLANCHINA : **Rosa Ana Cristóbal**

Por ser siempre tan alegre y, por todos los momentos que me ha consentido y consolado. Sinceramente espero que logre todo lo que se ha propuesto.

La virtud, el estudio y la alegría son tres características que no deben vivir separadas.

Voltaire

A MIS PRIMOS : **Ana Isabel y Oscar Guillermo**

Por ser tan lindos, cariñosos y bien educados.

Con cariño para el resorateronte y la ligartija de su queridísimo hulefante.

AL MEJOR : **Arturo Hernández Minero**

Porque ha sido el mejor padre.

Gracias

Prudente padre es el que conoce bien a su hijo.

Shakespeare

A MI TIA : **Margarita Cristóbal Merino y a su familia**

Por su gran cariño.

A LA FAMILIA : **Hernández Minero**

Por su afecto, y por ser más que una familia... han sido mis amigos.

A MIS AMIGOS: *Norah Arps*

Por el cariño que me ha demostrado y por aquel pushe mau....

Adrian Ten Kate

Por su ejemplo de profesionalismo

Jaime Ten Kate y Annenor Ten Kate

Por el afecto que nos tenemos y por dejar en mí los mejores recuerdos de la infancia.

A todos ellos por su cariño y bondad para con mi familia y conmigo.

Los momentos más felices que mi corazón conoce, son aquellos en que derrama su afecto sobre unas cuantas personas estimadas.

Tomás Jefferson

A MIS AMIGOS, COMPAÑEROS Y DEMAS :

Oscar, H. P., Salvador P. A., Ignacio B. B., Manuel S. C., Francisco Michel, Edgar P. F., Guillermo G. B., Armando R. Y., Humberto S. B.

Por su amistad y por lo bien que la hemos pasado juntos.

Y CON AFECTO ESPECIAL A:

José Pompeyo Flores Díaz

Por el cariño que me ha demostrado siempre.

En la escala de lo cósmico sólo lo fantástico tiene posibilidades de ser verdadero.

(Popol vuh)

Eduardo Aguado Mulgado

Por su amistad, regaños, consejos y sabias palabras.

Ante todo es preciso conocer el fin hacia el que debemos dirigir nuestras acciones, es necesario descubrir nuestro destino para tomar la firme determinación de dirigirnos hacia él.

Confusio

A todas las personas que han estado en algún momento de mi vida y que dejan los mejores recuerdos y las más gratas experiencias y; aún cuando aquí su nombre no se encuentre, no son menos importantes para mí.

Gracias por todo

AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORES :

M.V.Z. Francisco Castrejón Pineda

Q.F.B. Olga Velázquez Madrazo

M.V.Z. Humberto Troncoso Altamirano

Por su paciencia, apoyo, amistad y tiempo.

Una sola conversación con un hombre sabio, vale más que diez años de estudio en los libros.

Lonfellow

A MI DISTINGUIDO Y MUY RESPETABLE JURADO :

M.V.Z. Jorge López Morales

M.V.Z. Marco A. Herradora Lozano

M.V.Z. Marcela Figueroa Ochoa

M.V.Z. Luis Corona Gochi

Gracias por la atención y el tiempo que me dieron para la realización de este trabajo y principalmente por permitirme conocerlos mejor, como buenos profesionistas y como mejores personas.

No sois ni sabios, ni justos, si buscáis en la sabiduría y en la justicia, algo que no sean la sabiduría y la justicia.

Maeterlink

A todos los profesores, ayudantes y laboratoristas del **Departamento de Nutrición de la F.M.V.Z.**, por su amistad, compañerismo y ayuda en todo momento. Al **Depto. de Microbiología de la F.M.V.Z.** por su colaboración.

Al **Depto. de Tecnología de Alimentos y al Cepario**, ambos de la **Facultad de Química**, por su ayuda en la elaboración de esta tesis.

**A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y por ende a mi
queridísima UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

Gracias por todo

El conocimiento es la fe de que lo bueno existe, la ignorancia es el temor de
que lo bueno llega; sin embargo ...

La experiencia no se adquiere por la simple acumulación de los
conocimientos, sino por la reflexión que se haga de los sucesos.

Espero haber demostrado en este espacio y en este momento todo el
amor, cariño, respeto y agradecimiento que siento por cada uno de los
aquí mencionados, ya que como bien decía C. C. Colton : ninguna
persona ha experimentado nunca tantas dificultades para expresarse, como el
hombre agradecido.

CONTENIDO

	<u>PAGINA</u>
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1. JUSTIFICACIÓN	10
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVOS	10
II. MATERIAL Y MÉTODOS	11
1. LOCALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN y ORIGEN DE LOS MATERIALES	11
2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTOS	11
3. METODOLOGÍA	11
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	14
III. RESULTADOS	15
IV. DISCUSIÓN	16
1. ALGUNAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES	16
2. CONTENIDO DE MATERIA SECA Y pH	16
3. MICROBIOLOGÍA DE LOS ENSILADOS	18
V. CONCLUSIONES	23
1. RECOMENDACIONES	23
VI. LITERATURA CITADA	24
INDICE CUADROS	30

RESUMEN

HERNÁNDEZ CRISTÓBAL B. CONCEPCIÓN. - Determinación de bacterias patógenas en ensilados de excretas porcinas con caña de azúcar. Bajo la asesoría de M.V.Z. Francisco A. Castrejón Pineda. Q.F.B. Olga Velázquez Madrazo y M.V.Z. Humberto Troncoso Altamirano.

Con el objetivo de evaluar las modificaciones producidas en el ensilaje de excretas porcinas (fracción sólida) mezcladas con caña de azúcar picada, antes y después de la fermentación, en proporciones 60:40 y 70:30 (g/100g base húmeda) respectivamente, se elaboraron pequeños microsilos (2.5 Kg. de capacidad) usando envases de plástico que se almacenaron durante 30, 45 y 60 días. Los parámetros a evaluar fueron: contenido de materia seca, pH, algunas características sensoriales, presencia de salmonella y unidades formadoras de colonias (UFC) de coliformes y clostridios. Se usó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2 (mezclas) por 4 (tiempos de ensilaje) y 3 (repeticiones por cada tratamiento). Los frascos se destaparon en condiciones asépticas e inmediatamente se realizaron las determinaciones, siembras y cultivos, utilizando el contenido de la parte central de los microsilos. Los cambios en las características sensoriales correspondieron a un proceso adecuado de ensilaje, no hubo crecimiento de hongos, disminuyó el olor a excretas y aumentó el olor ácido; no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la cantidad de materia seca de los tratamientos. El pH de las mezclas antes de ensilar fue mayor ($p < 0.05$) en comparación con las mezclas después de ensilar, no existiendo diferencia significativa entre estas últimas. No se detectó crecimiento de Salmonella en las materias primas. Las bacterias coliformes disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) con el ensilaje. Las UFC de clostridios no disminuyeron con el ensilaje, si bien en las muestras antes de ensilar fueron menores comparadas con los otros tiempos de ensilaje; después se incrementaron y posteriormente, al aumentar el tiempo de ensilaje, hubo cierta tendencia hacia la reducción de UFC/g de muestra, aún cuando esta reducción no fue significativa ($p > 0.05$). Se concluye que el ensilaje como método de conservación y tratamiento de excretas porcinas mezcladas con caña de azúcar, elimina el crecimiento de bacterias coliformes, no así el crecimiento de anaeróbios formadores de esporas, siendo *Clostridium perfringens* el de mayor interés.

DETERMINACION DE BACTERIAS PATOGENAS EN ENSILADOS DE EXCRETAS PORCINAS CON CAÑA DE AZUCAR.

I. INTRODUCCION

En México, la creciente necesidad de conseguir alimentos a gran escala y bajo costo, motiva la constante búsqueda de fuentes alternas de alimentación animal, con el fin de mejorar las condiciones de vida, alimentar a la población y generar excedentes exportables (4, 13, 18, 20, 29). Esta búsqueda destinada a satisfacer los requerimientos nutricionales de los animales, que a su vez pretende satisfacer las del hombre, no es la única meta; en los últimos años se ha dado mayor importancia a evitar la depredación y el deterioro del entorno ecológico, promoviendo la protección del mismo (7, 23, 24, 26, 29). La tendencia actual enfatiza el logro de un desarrollo social, industrial y económico sin sacrificar las zonas naturales, evitando así la consecuente pérdida de poblaciones vegetales y animales (6, 37, 39, 40).

Por otro lado, la industria pecuaria en la actualidad enfrenta un sin número de problemas para mantener un nivel de producción acorde con los cambios económicos que sufre el país (8, 21). El continuo aumento del costo de las materias primas para la elaboración de alimentos, la dificultad para su abastecimiento oportuno y la dudosa calidad de las mismas, hace que la utilización de subproductos vegetales y animales sea una alternativa de alimentación excelente para disminuir costos (8, 24, 26). Un claro ejemplo es el uso de excretas, que además de estar disponibles todo el año, son fuente rica de calcio, fósforo y nitrógeno; no así de energía (6, 9, 29, 40).

Debido a la baja densidad energética se sugiere no usar las excretas porcinas como única fuente de alimento, ya que el consumo de alimento y la ganancia de peso de los animales disminuyen a medida que se incrementa la inclusión de excretas en sus raciones; por ello se recomienda mezclarlas con fuentes de carbohidratos de fácil degradación como los cereales y bagazos de

cítricos (24, 32, 47). Para zonas tropicales también se recomiendan subproductos de la caña de azúcar o la misma caña, que por sus características de producción está disponible en gran parte del país (19, 43). Hasta hace algunos años, el fin principal del cultivo de caña (*Saccharum officinarum*), era el de producir azúcar, disacárido formado por glucosa y fructosa, para el consumo humano, pero fué que con la llegada del Dr. Thomas Prestón a México en 1973 que se revolucionó el uso de la caña, ya que se empezaron a utilizar con más frecuencia algunos subproductos de ésta en la alimentación de bovinos para la producción de carne (19).

El estiércol de cerdos y el de rumiantes es un recurso poco explotado, sin embargo, está tomando relevancia debido a la cada vez mayor restricción al uso de excretas de aves, por el riesgo que representa el diseminar enfermedades infectocontagiosas de importancia económica, además de que puede ser un contaminante ambiental potencial por ser vehículo de sustancias nocivas tales como : micotoxinas, secuestradores de aflatoxinas, restos de antibióticos, coccidiosis, arsenicales, hormonas, metales pesados, drogas, minerales, etc. No obstante, los desechos avícolas que incluyen cama, alimento, plumas, heces y orina, siguen siendo los más utilizados a pesar de que se ha comprobado que dentro de los subproductos pecuarios resulta ser uno de los más tóxicos (9, 29, 39, 47).

Las excretas porcinas se han usado principalmente para rumiantes, por la ventaja que tiene la microbiota del rumen de transformar el nitrógeno no proteico (NNP) en proteína microbiana y finalmente en proteína animal (6, 15, 47, 49).

La reutilización de los nutrientes fecales no es una idea extraña, nace de la coprófagia y cecotrófia observada en algunos animales salvajes y domésticos, tampoco el uso de excretas es novedoso, ya que desde 1920 se tiene conocimiento de una práctica semejante a las actuales, donde se alojaron becerros y cerdos en el mismo corral para que estos últimos aprovecharan los nutrientes de las heces de los primeros (19).

Aún cuando la población total de cerdos en México ha disminuído drásticamente desde los años ochenta, es desde hace 3 décadas que la industria porcícola a nivel nacional y mundial se ha perfilado como una de las industrias pecuarias con mayor aplicación tecnológica y eficiencia productiva; no obstante, seguirán existiendo los sectores semi-intensivo y de traspatio, provocando que la producción de materia fecal sea un problema real de contaminación ambiental, ya que estas no son completamente aprovechadas en las unidades de producción (6, 22, 24, 44, 48, 62). Actualmente se estudia una reglamentación más rigurosa con respecto a la descarga de desechos pecuarios, como lo están haciendo otros países; de hecho, ya se reglamentó la descarga de desechos líquidos (6, 8, 17, 22, 24, 57). Así, a partir del 1º de octubre de 1991, las instalaciones porcinas son sujetas del pago de multas cuando sus descargas de aguas residuales presenten concentraciones que estén por arriba de las permisibles y estén descargando en una corriente de agua, depósitos o terrenos considerados bienes nacionales. El monto de la cuota se determina mensualmente y está en función de la zona de disponibilidad correspondiente al lugar donde la instalación porcícola realice la descarga, del volúmen de agua que descargue, de la demanda química de oxígeno (DQO) y de los sólidos suspendidos totales. Además, según los especialistas toda granja o explotación pecuaria en especial la porcícola por el sólo hecho de estar en operación es ya inevitablemente una fuente de contaminación (17, 41).

Entre otras muchas acciones tendientes a lograr la preservación del ambiente, se utilizan las heces de los animales domésticos, no sólo como abono orgánico, sino también para la producción de biogas o sustrato para la acuicultura, sino además, reciclándolas en el alimento de la misma u otra especie (7, 25, 26, 26, 47, 48). Ya que estos desechos orgánicos representan un problema de salud pública, no sólo por la liberación de gases nocivos a la atmósfera (monóxido y dióxido de carbono, amoniaco, metano, sulfuro de nitrógeno, etc.), sino por el contenido de elementos no nutricionales derivados de la ración, mal olor, contaminación de mantos freáticos y favorecimiento de la

proliferación de insectos y, además, porque son medios excelentes para la permanencia y multiplicación de virus, parásitos y bacterias como: *Campylobacter*, *Clostridium spp.*, *E. coli*, *Mycobacterium spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, etc.; así como sus correspondientes toxinas (1, 10, 19, 21, 22, 29, 39, 40, 41, 43, 62). Empero, no siempre estos microorganismos están presentes en el estiércol de animales sanos, siendo más comunes en las heces de los animales infectados; aún cuando esto último es cierto, no necesariamente estos patógenos representan un peligro de enfermedad relativo, ya que la posibilidad de encontrar condiciones favorables para su supervivencia en el medio, se ven limitadas por las fluctuaciones de los factores ambientales (25, 36).

El tratamiento previo de las excretas para su reutilización favorece más aún la eliminación y destrucción de los microorganismos, así como la destrucción de agentes tóxicos y estabiliza mejor el producto para su almacenamiento (6). Se han ideado diferentes tratamientos físicos, químicos y biológicos que pueden ser aplicados a las excretas después de su recolección, principalmente antes de ser utilizadas como ingredientes alimenticios (6, 27, 29, 47). La elección de un manejo ó tratamiento en particular depende de muchos factores, es decir, el proceso debe integrarse al sistema pecuario que los origina, que a su vez debe responder a una nueva proyección de la explotación (47, 57, 58). Asimismo, los fines que se persiguen son reducir costos, aumentar beneficios a través de la recuperación de nutrientes y disminuir el impacto ambiental (3, 6, 24, 26, 47, 48). Los tratamientos biológicos han resultado ser de los más económicos y dentro de estos el ensilaje parece ser uno de los más prometedores, ya que el producto final es muy aceptado por el animal, se disminuyen los olores, se preserva la mayor parte de nutrientes fecales por un período mayor y, se favorece la fermentación anaeróbica de los carbohidratos solubles, disminuyendo rápidamente el pH del medio, lo cual inhibe el crecimiento de microorganismos indeseables; no obstante, existen algunas bacterias del género *Clostridium* que por ser esporuladas son más resistentes a estos cambios y pueden permanecer como un problema serio de contaminación (6, 24, 25, 26, 47, 58, 62).

El grupo de organismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos; en primer lugar para indicar una contaminación en principio potencialmente peligrosa, basándose en el hecho de que el habitat natural de las enterobacterias son las heces humanas y de otros mamíferos, su presencia da como positivo de contaminación fecal (35, 52, 53, 54, 61). El uso de coliformes como indicador sanitario puede ser aplicado a:

- Prácticas sanitarias deficientes tanto en el manejo como en la fabricación de los alimentos.
- La calidad microbiológica de un producto, lo que no necesariamente implica un riesgo sanitario.
- Evaluación de la prácticas sanitarias e higiénicas del equipo.

Las bacterias coliformes son un grupo heterogeneo y existe poca evidencia que indique que estas bacterias pertenezcan a un solo género taxonómico; esta familia de bacterias no es muy exigente y crecen en los medios básicos (36).

Los miembros del género *Salmonella* pertenecen a la familia de las Enterobacteriaceae, han sido estudiados como patógenos de origen alimentario. Es decir, la puerta de entrada de las *Salmonellas*, *Shigelas* y la de otros agentes infecciosos gastrointestinales, es casi exclusivamente la vía oral. La infección se transmite principalmente por las heces, pero también puede darse por la orina. La epidemiología de las salmonelosis es extremadamente compleja; algunas de las fases no se conocen todavía bien(16, 36). Por ejemplo, *Salmonella typhi* y *paratyphi* infectan principalmente al hombre, mientras que otras salmonelas afectan también a un gran número de animales. Algunos serotipos tienen especificidad de hospedador como, *Salmonella pullorum* para pollos, *Salmonella Choleraesuis* para cerdos, en cuyos casos los agentes correspondientes producen enfermedades con manifestaciones clínicas(16, 36). A pesar de la especificidad de la *Salmonella choleraesuis*, en ocasiones origina también graves infecciones en el hombre, con una mortalidad que puede llegar a superar la de otras especies (36).

Como las salmonelas van acompañadas a menudo de otras, para su aislamiento e identificación se emplean medios de cultivo con sustancias inhibitorias de diversa selectividad (36, 51, 54).

Una serie de factores, tales como las prácticas de cría animal, los sistemas de reproducción animal, la producción centralizada de alimentos, contribuyen a crear ciclos de perpetuación entre hombre y animales. Los principales eslabones de las cadenas de circulación son animales - piensos - animales, animales - alimentos hombre y hombre - alimentos - animales. Prácticamente, todos los productos de origen animal pueden ser vehículo de transmisión de salmonelas al hombre (16).

El género *Clostridium* comprende bacilos anaeróbios productores de esporas y exotoxinas, son microorganismos saprófitos y comensales normales en el tracto gastrointestinal, y a veces, en el respiratorio y urogenital del hombre y los animales (36). La patogenicidad de este género depende de varios factores predisponentes así como de la cantidad y actividad de la toxina que produzcan; la capacidad de esporular los convierte en un microorganismo altamente resistente a las condiciones adversas del medio. *Clostridium perfringens* puede crecer a temperaturas entre 12 y 50°C, pero su desarrollo es muy lento por debajo de 15 C (14). Las células vegetativas del *Clostridium perfringens* son sensibles a bajas temperaturas y, el almacenamiento prolongado de los alimentos a temperaturas de refrigeración es probable que resulte en su destrucción lenta si las contienen. Las esporas no se ven afectadas en el mismo grado por la acción de las bajas temperaturas. Se ha observado la germinación de esporas a 5°C, es decir por debajo de la temperatura mínima de crecimiento (50, 59). La velocidad de crecimiento se ve afectada por el pH, de modo que el crecimiento del *Clostridium perfringens* es más lento en un medio a pH de 5.8 que en otro de 7.2. Se menciona que el pH del medio ejerce un efecto considerable sobre el número de esporas aparentemente viables después del tratamiento térmico; es decir, las esporas son más resistentes al calor en un pH óptimo de crecimiento, que en promedio es de 7.0 y, según se va alterando esta neutralidad, aumenta la

sensibilidad térmica (14, 59). La mayoría de investigadores coinciden que a un pH ácido frecuentemente se inactivan con facilidad; lo que probablemente se debe a que el pH ambiental altera el medio iónico dentro de la cubierta de la espora (14). Alderton y Snell 1963, citados por Cheftel (14) sugirieron que las esporas podrían actuar como débiles intercambiadores de iones, de forma que el pH ácido, permitiría la sustitución de H^+ por otros iones ligados a la pared de la espora, disminuyendo así su estabilidad (14, 20, 25, 28, 59). Se sabe que las esporas contienen DNA, RNA, agua, diversas enzimas, iones metálicos y otros compuestos, especialmente ácido dipicolínico (DPA), la síntesis de este ácido y la incorporación masiva de iones de Ca^{2+} se hace cuando la célula vegetativa pasa a la forma esporulada; a su vez, la germinación se desencadena por la mezcla de aminoácidos, con iones Mg^{2+} y Mn^{2+} , con glucosa, y con ácido dipicolínico en presencia de iones de Ca^{2+} , así como por choques o estímulos térmicos que activan las enzimas latentes (14, 20, 25, 28, 50, 59). El tiempo y temperatura óptimos para este tipo de choques depende de la clase de espora; por ejemplo, las esporas de bacterias termófilas precisan de un tratamiento térmico más intenso que las bacterias mesófilas. El ácido sórbico y el pH ácido inhiben la germinación, al igual que ciertos cationes divalentes, el almidón y los ácidos oléico y linoléico (20). Aún cuando las esporas sean colocadas en un medio que favorezca su germinación, estas no germinarán a menos que primero sean activadas por un agente que dañe la capa de la espora. Entre los agentes que pueden destruir la latencia están el calor, abrasión, acidez y compuestos que contienen grupos sulfhidrilo libres (28).

Con base en algunos trabajos experimentales en microbiología de alimentos, se han determinado los intervalos de pH a los cuales pueden resistir algunas especies bacterianas (Cuadro 1). Estos datos se han obtenido bajo condiciones óptimas de cultivo, por lo que los rangos de variación son más amplios de los que se obtienen normalmente en la industria alimentaria, ya que las condiciones inferiores a las óptimas - tales como la presencia de especies competidoras, tensión de oxígeno, temperatura poco favorable, actividad de agua

escasa, daños térmicos sufridos durante el proceso, etc. - reducen el intervalo de pH al que los microorganismos manifiestan un óptimo crecimiento (14, 50, 61).

La tolerancia de los microorganismos a la acidez puede depender del tipo de ácido empleado en la acidificación. Por ejemplo, el *Lactobacillus brevis* se muestra capaz de crecer en medios de cultivo líquidos con pH de 3.0 cuando se utiliza ácido cítrico, clorhídrico, fosfórico o tartárico; sin embargo, cuando se usa ác. láctico sólo tolera pH de 3.7 y un pH de 4.0 cuando se emplea ácido acético (14).

Cabe hacer notar que no sólo las enfermedades bacterianas son de importancia epidemiológica, ya que existen virus y parásitos causantes de enfermedad. Algunos trabajos indican que los ensilados pueden ser un proceso de inhibición eficaz contra muchos nemátodos y virus, ya que la mayoría no resisten pH fuera del rango de 5 a 9 (25). Por ejemplo, existe una Norma Oficial Mexicana (NOM) que indica que antes de comercializar y movilizar las excretas avícolas, primero hay que someterlas a un proceso de fermentación, de por lo menos 48 horas (46). El propósito no es sólo el de lograr un pH bajo, sino además, que la temperatura ascienda en las excretas al menos 60°C; lo cual asegura la destrucción del virus de influenza aviar. Sin embargo, para un reciclaje de excretas porcinas, sería importante determinar si el virus de la enfermedad de Aujeszky también se destruye con un proceso similar, ya que de no ser así, es una enfermedad altamente contagiosa y mortal para los rumiantes y cerdos jóvenes; además que, de acuerdo a algunos autores resiste pH más ácidos que el valor mencionado con anterioridad (11, 34).

Por lo anterior, es importante mayor investigación que asegure la calidad nutricional y microbiológica de los ensilados a base de excretas.

Justificación

La presente investigación tuvo la finalidad de observar los cambios en la flora bacteriana de ensilados con excretas porcinas y caña de azúcar, en el proceso de fermentación, con el objetivo de comprobar su calidad sanitaria y de ser necesario evitar su uso o promover alguna solución para que posteriormente no representen un problema de salud pública al ser utilizadas en el alimento para animales domésticos.

Hipótesis

La concentración de bacterias patógenas en ensilados de excretas porcinas con caña de azúcar picada, disminuye al aumentar el tiempo de exposición de los microorganismos al pH ácido de la fermentación anaeróbica del ensilado.

Objetivos

Determinar en ensilados de excretas de cerdo (fracción sólida) con caña de azúcar picada, en diferente relación excreta - caña, los siguientes cambios:

1. Las principales características sensoriales.
2. Porcentaje de materia seca (%MS).
3. Potencial de hidrogeniones (pH)
4. Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de microorganismos coliformes
5. Número de UFC de *Clostridium perfringens*
6. Presencia de *Salmonella spp.* en 25 gramos

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Localización de la investigación y origen de los materiales.

La investigación se desarrolló en el área de microbiología del laboratorio de Tecnología de Alimentos del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química. La determinación de las características sensoriales, presencia de hongos macroscópicos, características de M.S. y pH, se realizaron en el Laboratorio de Bromatología del Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ambos pertenecientes a la U.N.A.M.

La fracción sólida de las excretas porcinas fue recolectada de la Granja porcina ejidal del pueblo de Xoxocotla, municipio de Puente de Ixtla, estado de Morelos. Se utilizó la fracción sólida obtenida en la recicladora de excretas del sistema Lisco (26, 57); se tomó una muestra al azar de aproximadamente 20 Kg, que se mezcló con caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) picada (aproximadamente a 2 cm de tamaño de partícula), la cual provenía de diferentes predios del pueblo de Tehuixtla, Mor. (19). Estos ingredientes se mezclaron para elaborar los diferentes tratamientos en cuanto a su relación excreta - caña y se sometieron a diferentes tiempos de ensilaje.

Diseño experimental y tratamientos.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, dos mezclas de excreta porcina : caña de azúcar (60:40 y 70:30, g / 100g en base húmeda), por cuatro tiempos de ensilaje (0, 30, 45 y 60 días), se utilizaron tres repeticiones por cada tratamiento. En el Cuadro 2 se indican los diversos tratamientos que se utilizaron en el experimento (30).

Metodología.

Las mezclas se colocaron en frascos (microsilos) de plástico con capacidad aproximada de 2.5 kg; se procedió al llenado completo realizando la compactación de las mezclas en capas de aproximadamente 5 cm de grosor; una vez llenos, se

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Localización de la investigación y origen de los materiales.

La investigación se desarrolló en el área de microbiología del laboratorio de Tecnología de Alimentos del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química. La determinación de las características sensoriales, presencia de hongos macroscópicos, características de M.S. y pH, se realizaron en el Laboratorio de Bromatología del Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ambos pertenecientes a la U.N.A.M.

La fracción sólida de las excretas porcinas fue recolectada de la Granja porcina ejidal del pueblo de Xoxocotla, municipio de Puente de Ixtla, estado de Morelos. Se utilizó la fracción sólida obtenida en la recicladora de excretas del sistema Lisco (26, 57); se tomó una muestra al azar de aproximadamente 20 Kg, que se mezcló con caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) picada (aproximadamente a 2 cm de tamaño de partícula), la cual provenía de diferentes predios del pueblo de Tehuixtla, Mor. (19). Estos ingredientes se mezclaron para elaborar los diferentes tratamientos en cuanto a su relación excreta - caña y se sometieron a diferentes tiempos de ensilaje.

Diseño experimental y tratamientos.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, dos mezclas de excreta porcina : caña de azúcar (60:40 y 70:30, g / 100g en base húmeda), por cuatro tiempos de ensilaje (0, 30, 45 y 60 días), se utilizaron tres repeticiones por cada tratamiento. En el Cuadro 2 se indican los diversos tratamientos que se utilizaron en el experimento (30).

Metodología.

Las mezclas se colocaron en frascos (microsilos) de plástico con capacidad aproximada de 2.5 kg; se procedió al llenado completo realizando la compactación de las mezclas en capas de aproximadamente 5 cm de grosor; una vez llenos, se

cerraron con tapas de rosca adaptadas con una válvula de hule en el centro; se sellaron herméticamente los recipientes con silicón y se realizó vacío utilizando una bomba. (3, 26). En las excretas y la caña de azúcar, así como en cada una de las mezclas antes y después de ensilar, se determinaron el porcentaje de materia seca y el pH. La concentración de materia seca se determinó mediante la diferencia de peso en las muestras antes y después de su deshidratación en estufa a 55 - 60°C hasta peso constante, según la metodología de la A.O.A.C. y los procedimientos analíticos recomendados para ensilados (2, 60). El pH se cuantificó con un potenciómetro marca Conductronic pH 20, siguiendo la metodología descrita por Irma Tejada (60). Además, se determinó la presencia de *Salmonella* y se cuantificaron las colonias (UFC) de coliformes y clostridios, siguiendo la metodología que se describe a continuación: cuando se cumplió el período de ensilaje, los recipientes fueron abiertos en condiciones de asépsia. Al abrir los microsilos se desechó una capa superficial de 4 a 5 cm de espesor con una cuchara estéril de aluminio, para asegurar que fuera removida la mayor parte del material que en las mejores condiciones de ensilaje no alcanza rápidamente la anaerobiosis ni óptimos niveles de acidificación; posteriormente se tomaron 4 muestras, tanto en los materiales antes de ensilar como en los ensilados. La primera muestra (100g) se empleó para determinar las principales características sensoriales (presencia de hongos, olor, color) e inmediatamente después siguiendo las técnicas anteriormente mencionadas se cuantificó el porcentaje de materia seca; la segunda muestra de ensilado (25g) se utilizó para la determinación de pH (2, 38). La muestra tres se utilizó para la cuenta en placa de coliformes, en los medios selectivos y diferenciales de Agar Bilis Rojo Violeta (BRV) y Agar MacConkey (McC), y para *Clostridium perfringens* en Agar Tripton Sulfito Neomicina (TSN) (33). Se realizó el conteo de colonias en cada uno de los medios y se registró como el número de unidades formadoras de colonias (UFC / g) (38). Para lo anterior se homogenizaron 11 g de muestra junto con 99 ml de agua peptonada al 0.1% estéril en una licuadora durante 2 minutos; con una pipeta se tomó 1 ml de esta suspensión y se depositó en un tubo de ensayo que

contenía 9 ml de agua peptonada al 0.1%. A partir de este tubo, se hicieron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-6} ; realizadas las diluciones, se virtió 1 ml de cada dilución a la caja de Petri desechable estéril 15x100, y se añadió el medio de cultivo correspondiente fundido y enfriado a 45°C (55). Las cajas preparadas se dejaron solidificar y se incubaron invertidas en la estufa por 18 - 24 hrs a 36°C. Para el caso de *Clostridium perfringens*, además de lo ya mencionado se usó una jarra para anaerobiosis y sobres del sistema Gaspak (33, 42). La cuarta muestra del ensilado fue para el aislamiento de *Salmonella spp.*; 25 g de muestra se mezclaron con 250 ml de caldo tetrionato; esta suspensión se incubó por 18 hrs a 36°C, con el objeto de favorecer el desarrollo de *Salmonella spp.* y la inhibición de otras enterobacterias y, posteriormente se efectuó la resiembra en medios selectivos y diferenciales con la técnica de aislamiento en cultivo puro, se usaron placas de Agar Bilis Peptona Lauril Sulfato (BPLS) y Agar Salmonella - Shigella (SS) elaborados un día antes. Realizada la siembra, las cajas se incubaron invertidas por 18 - 24 hrs a 36°C (12, 16, 33, 38, 63).

Para todos los medios se realizaron los controles positivos y de esterilidad correspondientes. En las cajas donde existió crecimiento de colonias características, se efectuaron los conteos de las mismas con un contador de colonias tipo Quebec. Además, como pruebas complementarias se realizaron las pruebas bioquímicas de identificación de acuerdo a los Procedimientos de Laboratorio para Bacteriología y Micología Veterinarias (42).

En las cajas de Petri en las cuales no se observó crecimiento a simple vista de las colonias características, se aplicó la técnica que indica la Norma Oficial Mexicana (NOM) publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 25 de agosto de 1995 (53). La NOM indica que en aquellos medios donde no se presenta crecimiento aparente de colonias características, el resultado se considera negativo; sin embargo, no se debe registrar como cero, sino que el resultado se reporta como menos de un coliforme por gramo (1/d), donde d es el factor de dilución (53).

Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio del análisis de varianza para un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial (dos mezclas de excreta - caña por cuatro tiempos de ensilaje). Utilizando como unidad experimental en el análisis de microorganismos, el crecimiento (UFC) de cada caja de Petri transformado a logaritmo base 10 (ya que con esta transformación los resultados presentan una distribución normal indispensable para el análisis estadístico). Cuando existieron diferencias entre tratamientos, se utilizó la prueba de Tukey para comparación de medias, empleando el paquete estadístico S.A.S (Statistical Analysis System) para microcomputadoras (30, 31, 56).

III. RESULTADOS

En el Cuadro 3, se muestran algunas de las características sensoriales que se determinaron en los ensilados de excretas porcinas con caña de azúcar. En ningún ensilado se manifestó crecimiento de hongos y en todos los casos disminuyó el olor a excretas y aumentó el olor a ácido.

En el Cuadro 4, se indican los porcentajes de materia seca (MS) y pH en las excretas porcinas (fracción sólida), caña de azúcar (picada) y en cada una de las mezclas que integraron los tratamientos. El contenido de MS en la caña de azúcar fue 32.16 % y en las excretas porcinas fue 29.92 %. Los ensilados presentaron un contenido de M.S. entre estos valores, por lo que no hubo una variación significativa ($p > .05$), debida a la proporción de estos, el proceso o el tiempo de ensilaje.

El valor de pH en la caña de azúcar correspondió a 3.9, mientras que en las excretas porcinas fue de 5.2 (Cuadro 4). Las mezclas con 60:40 y 70:30 antes de ensilar, presentaron valores de 4.84 y 4.96 respectivamente. Todos los ensilados presentaron valores entre 3.51 y 3.63, que en comparación con las mezclas antes de ensilar, fueron significativamente más ácidos ($p < .05$) sin que se manifestara diferencia significativa entre los 30 a 60 días de ensilaje (Cuadro 4).

En los Cuadros 5 y 6 se describen los cambios microbiológicos ocurridos durante todo el proceso. De acuerdo con los datos sobre microorganismos patógenos, tanto para la caña de azúcar como para las excretas porcinas y las mezclas ensiladas, fueron negativas para *Salmonella spp.* La caña de azúcar fue negativa para coliformes totales y *Clostridium perfringens*. Las excretas porcinas presentaron gran número de coliformes y *Clostridium*, que se manifestaron en las mezclas antes de ensilar correspondientes al día 0. En todas las mezclas ensiladas no se encontraron colonias características de coliformes en ninguno de los medios utilizados para su cultivo ($p < .05$). Los clostridios no disminuyeron significativamente ($p > .05$) por el ensilaje.

IV. DISCUSION

Algunas características sensoriales y otras consideraciones.

De acuerdo con algunas características de los ensilados, se establece que fueron en general de buena calidad, ya que cumplieron con los requisitos necesarios de una buena fermentación, entre ellos los cambios ocurridos en color y olor que, Iñiguez (25) y Campabadal (6), señalan en una fermentación láctica adecuada de las excretas.

Al abrir los ensilados, no se observó macroscópicamente desarrollo aparente de hongos en ninguno de los microsilos, por lo que se reportaron como negativos a la presencia de estos microorganismos, esto es uno de los indicadores utilizados por McCullogh y otros investigadores (32), de que el proceso de ensilaje se realizó satisfactoriamente. Aún así, no debe asegurarse que los ensilados estaban libres de hongos, ya que estos pudieron estar momentáneamente inhibidos y también existen un gran número de hongos microscópicos, los cuales se hicieron presentes al realizar los cultivos bacterianos; esto se explica a que encontraron las condiciones óptimas para su crecimiento y desarrollo; no obstante, conforme se incrementaron las diluciones, los hongos fueron disminuyendo y dieron paso a un mejor crecimiento de las bacterias, permitiendo su aislamiento e identificación. Se comprende que existió una competencia por los nutrientes y esta fue más fuerte cuando hubo más microorganismos por unidad de nutriente; cuando esto sucede, en muchas ocasiones tienen que dejar de crecer unos para permitir el desarrollo y reproducción de otros (36, 50).

Contenido de materia seca y pH.

Como se indica en el Cuadro 4, no existió diferencia significativa ($p > .05$) en el contenido de M.S. de los ensilados y las materias primas; es decir, las cantidades de M.S. para las excretas porcinas y caña de azúcar, fueron 29.92% y 32.16% respectivamente y, la M.S. en los ensilados presentó valores entre 29.54

% y 32.12 %; este contenido de M.S. se encontró dentro de los niveles óptimos que recomiendan McCollough (32) e Iñiguez (25) en ensilados de maíz , de excretas y de otros forrajes, para una adecuada compactación y estabilización de la fermentación láctica. De acuerdo con estos mismos investigadores niveles superiores a 60 % de M.S. dificultan la compactación, haciendo muy difícil que se logren las condiciones adecuadas de anaerobiosis, por lo que hay mayor pérdida de nutrimentos en el ensilado. Asimismo, cantidades de M.S. inferiores al 28%, limitan una adecuada fermentación ya que se produce sobrecalentamiento, pudiendo alcanzar temperaturas superiores a los 50°C, las cuales también representan pérdidas de nutrimentos. Generalmente, los ensilados que tienen menos del 30% de M.S. son especialmente propensos a fermentaciones por Clostridium. Niveles de M.S. de 35 a 40%, proporcionan mayor cantidad de energía para las necesidades de los animales, por kg de ración; por otro lado, proporcionan una presión osmótica suficiente para inhibir la generación de Clostridium, aún cuando en este intervalo no disminuye completamente su desarrollo, si se retarda por algunos días, lo cual da oportunidad a las bacterias lácticas para producir ácido suficiente para estabilizar y preservar el ensilado (25). Por lo anterior, sería importante seguir investigando cómo se comportan estos microorganismos en ensilados de excretas porcinas y caña de azúcar, donde el contenido de M.S. se manipulara por arriba de 35%.

En lo que se refiere a pH, este estuvo influenciado por la cantidad de excretas utilizadas en cada una de las proporciones. La excreta sola presentó un pH superior al de la caña (5.2 contra 3.9) por esta razón la mezcla donde se utilizó mayor cantidad de excreta, presentó un pH ligeramente menos ácido. La diferencia de pH entre los tratamientos antes de ensilar no fue significativa ($p > .05$), posteriormente desde el día 30 hasta el 60, el pH disminuyó significativamente ($p < .05$) sin que se presentaran diferencias debidas a la proporción de excreta - caña o a los días de ensilaje. A pesar de esto, se pudo observar cierta disminución en los valores de pH conforme transcurrió el proceso de almacenaje, como se puede observar en el Cuadro 4.

En la presente investigación, el contenido de materia seca y el pH de los ensilados, fueron adecuados si se comparan con otro tipo de ensilados. En cuanto a la temperatura, el proceso fermentativo al tal vez se realizó en frío y posiblemente se debió debido al tamaño de los silos y a que la biomasa en fermentación no logró modificar la temperatura de la superficie de los microsilos, o también pudo deberse a que la superficie expuesta a la temperatura del medio ambiente favoreció la pérdida de calor. Sin embargo, esta apreciación se realizó sólo al tacto, ya que no se pudo contar con los termómetros apropiados para registrar estos cambios en el interior de los microsilos.

Microbiología de los ensilados de excretas porcinas.

Como ya se mencionó, la tecnificación constante de la producción animal y específicamente la porcícola, deriva grandes volúmenes de excretas, los cuales, cuando se depositan en grandes cantidades sobre las áreas de cultivo o sobre arroyos y ríos, contribuyen al deterioro ambiental (25, 29). No obstante, dadas las características nutritivas de las heces, éstas son susceptibles de ser recicladas en la alimentación animal, principalmente de rumiantes, ya que los microorganismos ruminales pueden utilizar el NNP, degradar la celulosa y otros componentes de las paredes celulares presentes en las excretas, transformarlos en ácidos grasos volátiles y proteína microbiana disponible para el animal. Sin embargo, no debe olvidarse que la principal limitante del reciclaje de excretas, es el potencial de riesgo que representa su alto contenido de materia orgánica, la cual posee a su vez una alta actividad biológica de bacterias, virus y parásitos causantes de enfermedad. Aproximadamente el 50% de esta microflora se considera patógena, por lo que varios investigadores coinciden acerca de la necesidad de procesar el estiércol antes de que sea utilizado en la alimentación animal, no sin antes tomar en cuenta que debe ser orientado a un sistema de mínimo equipo, procesamiento poco sofisticado, económico y que garantice la ausencia de riesgos en la salud humana y animal (41).

Las bacterias coliformes y *Salmonella* disminuyeron significativamente ($p < .05$) como se puede apreciar en los Cuadros 5 y 6. El grado de disminución y

la rapidez con que disminuyeron los clostridios no fue tan evidente. Los organismos coliformes no fueron detectados en las mezclas fermentadas durante 30 días, este resultado se mantuvo en los dos periodos de experimentación siguientes (45 y 65 días de ensilaje) y, la principal explicación de la desaparición de las bacterias coliformes, fue la disminución significativa del pH producida desde el inicio y durante el proceso. Resultados similares a los anteriores fueron encontrados por Iñiguez (25) y otros investigadores (6, 32, 46), en ensilados de excretas completas de cerdo con forrajes como maíz y otras gramíneas y leguminosas.

Como se indica en los Cuadros 5 y 6, el análisis bacteriológico de las heces solas fue negativo para *Salmonella spp.*, esto pudo deberse posiblemente a que las heces procedían de una explotación libre de este microorganismo, o bien que al almacenarse durante un tiempo en las fosas de captación, las condiciones de pH, temperatura, presión osmótica, tensión de O₂, competencia, etc., no fueron las óptimas para el desarrollo de estos microorganismos y por lo tanto desaparecieron, o no permanecieron viables en las excretas y por ende no aparecieron en las mezclas ensiladas. Este microorganismo es mucho más susceptible a condiciones adversas que muchas otras enterobacterias; si las coliformes que siendo menos exigentes y más resistentes a las condiciones no óptimas, desaparecieron con el proceso fermentativo, esto hace pensar que las salmonelas también hubiesen desaparecido (14, 36, 42). De acuerdo con Nicolette (36), *Salmonella spp.* es muy sensible a factores adversos del medio por lo que su permanencia, desarrollo y posterior identificación en las muestras resulta difícil.

Con respecto al género *Clostridium*, la disminución en el número de estos microorganismos no fue significativa ($p > 0.05$) en ninguna de las dos proporciones de excreta - caña. En la excreta sola, se obtuvieron las UFC de *Clostridium* más numerosas. La disminución de la población de *Clostridium* en las mezclas antes de ensilar encuentra su explicación en una simple dilución que se hizo por la inclusión de la caña y entonces el número de UFC por gramo de muestra fue menor. Esta población comparada con las siguientes que correspondieron a los

30, 45 y 60 días de ensilaje, también fue menor. Lo anterior se atribuye a que en los primeros días de ensilaje y de acuerdo con las características propias de este proceso, se dieron las condiciones óptimas que favorecieron la elevación inicial en la cantidad de estas bacterias; posteriormente, en los conteos que se realizaron a los 45 y 60 días, el número de UFC de *Clostridium. perfringens* mostró una ligera disminución (no significativa); sin embargo, esta disminución no alcanzó la población de las mezclas iniciales (Cuadros 5 y 6). Por la facultad de esporular de los clostridios, resultó difícil eliminarlos durante el proceso de ensilaje (25).

Acerca del efecto del pH sobre estos microorganismos, Iñiguez, 1991 (25) y McCullough (31), mencionan que la acidificación es importante para la inhibición de clostridios; no obstante, en esta investigación el análisis de correlación mostró una relación negativa significativa ($p= 0.0455$) con un $r^2 = - 0.41198$, lo que significa un 41.19 % de aumento en la población de clostridios por cada unidad de disminución en pH y esto aún desde un punto de vista práctico resulta muy difícil de explicar. Tampoco es correcto decir que la acidificación eleva el número de clostridios. Por lo anterior se puede concluir, que el crecimiento del *Clostridium*, no solamente es afectado por la concentración de hidrogeniones, sino que un papel importante sobre su multiplicación o inhibición, lo tienen otro tipo de factores como concentración de nutrientes, la proporción de ácidos grasos producidos y la concentración de ácido láctico que estabiliza al final el ensilado. En otro tipo de microorganismos como el *Lactobacillus brevis* se demostró que fue capaz de crecer en medios de cultivo líquidos con pH de 3.0 cuando se utilizó ácido cítrico, clorhídrico, fosfórico o tartárico; sin embargo, cuando se usó ácido láctico sólo toleró pH de 3.7 y un pH de 4.0 cuando se empleó ácido acético (14). Además, no se deben olvidar otros factores tales como la temperatura e inclusive la competencia por nutrientes que se establece entre los microorganismos.

Cabe hacer notar, que sería importante aumentar el tiempo de almacenaje para determinar su resistencia a una exposición ácida más prolongada, así como estudiar la susceptibilidad de los clostridios a diferentes ácidos que pudieran ser

agregados a los ensilados a fin de lograr cantidades mucho más bajas de este patógeno.

Se llegó a la conclusión de que el número de UFC de clostridios no fue influenciado por la cantidad de M.S. presente en cada una de las mezclas, ya que la M.S. permaneció similar en las distintas proporciones a lo largo de todo el experimento (Cuadro 3). En este estudio, los ensilados permanecieron arriba del 30% de M.S. Con relación a esto, diversos investigadores citados por Iniguez (25) describieron que generalmente los ensilados que tienen menos del 30% de M.S. fueron especialmente propensos a fermentaciones por microorganismos anaeróbios formadores de esporas, principalmente clostridios, que dieron como resultado ensilados de mala calidad. Lo que no indican la mayoría de los investigadores, es el número máximo de anaeróbios formadores de esporas y especialmente de clostridium, para decidir si un ensilado es o no de mala calidad.

Debe resaltarse que no solo la determinación bacteriológica de los ensilados a base de excretas es importante, ya que también existen virus y parásitos patógenos que pudieran permanecer en estos alimentos, con posibles efectos sobre la salud animal y finalmente complicaciones en la salud humana.

Dentro de las enfermedades virales de más atención en este momento puede citarse a la seudorrabia o enfermedad de Aujeszky, la cual es causada por un Herpesvirus suis, que afecta principalmente a los cerdos jóvenes, rumiantes y a casi todos los animales de sangre caliente, incluso las aves son susceptibles a la inoculación (5, 11, 34,). En el hombre sólo se presenta como un prurito intenso (11).

Los virus son generalmente estables entre valores de pH de 5.0 y 9.0. Algunos virus (por ejemplo, los enterovirus) son resistentes a las condiciones ácidas y todos los virus se destruyen bajo condiciones alcalinas. En las reacciones de hemoaglutinación, las variaciones de menos de una unidad de pH, pueden influir en el resultado (28, 34). De acuerdo a esto último, se podría pensar que posiblemente el proceso de ensilaje o cualquier otro método de fermentación

también es bueno para el control de virus y, más cuando se logran valores de pH menores de 4 como los obtenidos en esta investigación (25, 46).

Por lo anterior, es de suma importancia generar más información que ayude a determinar el límite máximo de microorganismos patógenos presentes en los ensilados de excretas, de tal manera que se establezcan las especificaciones sanitarias acerca del uso de este tipo de productos y de otro tipo de ingredientes en la industria animal. (45).

V. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos bajo las condiciones de la presente investigación se concluye que el ensilaje es un procesamiento efectivo para disminuir la población de bacterias coliformes en diferentes proporciones de excretas porcinas (fracción sólida) con caña de azúcar picada. La disminución de bacterias coliformes fue tan notoria que se consideró como negativa en todos los ensilados.

Clostridium perfringens, no disminuyó significativamente con el ensilaje. A medida que transcurrió mayor tiempo de almacenamiento, se presentó una pequeña disminución en la población de estos microorganismos.

RECOMENDACIONES

El efecto del ensilaje sobre los microorganismos coliformes fue significativo desde los 30 días de procesamiento, por lo que en otros experimentos se recomienda utilizar períodos menores, para determinar a partir de cuantos días de ensilaje se puede tener la seguridad de la desaparición de las bacterias coliformes.

Debido a la disminución observada en *Clostridium* a medida que transcurrió mayor tiempo de ensilaje, se recomienda evaluar la viabilidad de estos microorganismos durante mayores períodos de almacenamiento, así como determinar el número de las estructuras biológicas (esporas o bacterias viables), a partir de las cuales persiste la viabilidad. Esto último con la finalidad de analizar si previamente al ensilaje, es posible combinar alguna otra forma de tratamiento que finalmente reduzca este tipo de microorganismos.

VI. LITERATURA CITADA

1. Anónimo : En Holanda el problema son las excretas. *Síntesis Porcina*. 5 (7): 26 - 28 (1988).
2. A.O.A.C. : Official Methods of Analysis. 12ª ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. 1975.
3. Archila, C. W. ; Herrera, S. R. y González, M. S. : Evaluación nutritiva de maíz y sorgo forrajero ensilado con excreta y melaza. *Agrociencia serie Ciencia Animal*, 1 (2):135 - 152 (1991).
4. Banderas, T. R. : Evaluación química y biológica de ensilados a base de gallinaza y melaza a diferentes proporciones y niveles de humedad. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. Zoot.* U.N.A.M. México, D.F. 1981.
5. Callis, J. J. ; Dardiri, a. H.; Ferris, D. H.; Gay, G. J.; Wilder, F. W. y Mason, J. : Manual ilustrado para el reconocimiento y diagnóstico de ciertas enfermedades animales. Vol 1. *Comisión México - Americana para la prevención de la Fiebre Aftosa*. México, 1982.
6. Campabadal, C. M. y Navarro G. H. : Utilización de la cerdaza en la alimentación de ganado de carne y como alternativa para evitar la contaminación ambiental. *Asociación Americana de Soya. ASA/México*. A.N. N° 134 (1994).
7. Campabadal, C. M. y Navarro, G. H. : Factores que afectan la utilización de la cerdaza en la alimentación del ganado de carne. *Asociación Americana de Soya. ASA/México*. A.N. N° 145 (1995).
8. Canacintra : La Industria Alimentaria Animal en México. *Sección 49 de Fabricantes de Alimentos Balanceados para Animales, Canacintra*. México, 1994 - 1995.
9. Castellanos, R. A.: La pollinaza tiene gran demanda. *Cebú*, 30:24 (1992).
10. Cole, D.J.A. : Controlando el impacto ambiental de los productos nitrogenados de desecho sobre la salud animal, el desempeño y sobre el medio

- ambiente. Ronda Latinoamericana en Biotecnología. 1 - 8. *Alltech, Inc.* México, (1993).
11. Correa, G.P. : Enfermedades Virales de los Animales Domésticos Monogástricos. 3ª ed. México, 1981.
 12. Cottral, G. E. : Manual of Standardized Methods for Veterinary Microbiology. *Cornell University Press, Washington, D.C. USA*, 1978.
 13. Cruz, Q.F.D. : Utilización de excretas de conejo en la alimentación de conejos en crecimiento. Tesis de Licenciatura. *Fac. de Med. Vet. Y Zoot. U.N.A.M.*, 1982.
 14. Cheftel, J.C. : Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos Vol II. *Acribia*. España, 1987.
 15. Church, D.C. : Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants. 2º. ed. *O and B Books Inc., Corvallis, OR., USA*, 1976.
 16. Elliot, R. P.; Clark, D. S.; Lewis, K. H.; Lundbeck, H.; Olson, J. C. y Simmons, B. : Microorganismos de los alimentos (Técnicas de análisis microbiológicos) Vol 1. *Acribia*. España.
 17. Escobedo, G. C. L. : La contaminación y la definición de tecnologías. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, Gro. México, Oct. 1994.
 18. FAO : Desarrollo rural : soluciones simples para problemas complejos. Desarrollo Rural, Nº 7. 1992.
 19. Flores, M. J. A : Bromatología Animal. 3a. ed. *Limusa*. México, 1989.
 20. Frazier, W.C. y Westhoff, D.C.: Microbiología de Alimentos. *Acribia*. España, 1978.
 21. Gadd, J. : El estiércol promotor de enfermedades. *Porcivama*, 20 (2):43 - 44 (1973).
 22. García, S. J. : Evaluación del efecto de la adición de un ensilado a base de cerdaza y sorgo sobre el comportamiento productivo de cerdos alimentados durante la etapa de desarrollo. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M. México, D.F.* 1993.

23. González, S. J. : Compromiso ecológico de la Confederación Nacional Ganadera. *México Ganadero*, (383): 4 - 9 (1994).
24. Iñiguez, B. y Robles, A. : Uso del estiércol. *Industria Porcina*, **10** : 10 - 11, (1990).
25. Iñiguez, C. G. : Fermentación de estiércol de cerdo para la obtención de un alimento para rumiantes. Tesis de doctorado. *Instituto de Investigaciones Biomédicas*. U.N.A.M. México, D.F. 1991. a
26. Iñiguez, C. G. : Aprovechamiento del estiércol de cerdo mediante fermentación. *Nuestro Acontecer Porcino*, 1 (1):14 - 20 (1993). b
27. Jacques, K. A. y Hoyos, G. : Manejo de desperdicios y control de olores: necesidades de planificación para la producción intensiva. *Biotechnología en la Industria de Alimentación Animal*, 3: 197 - 210, (1992).
28. Jawetz, E.; Melnick, J. L. y Adelberg, E. A. : Microbiología Médica. *El Manual Moderno S.A. de C.V.* México, 1987.
29. Liceaga, M. M. : Manejo de excretas en granjas porcinas : Estudio recapitulativo. Tesis de Licenciatura. *Fac. Med. Vet.* U.N.A.M. México, D.F. 1994.
30. Martínez, G. A. : Diseño y Análisis de Experimentos con Caña de Azúcar. *Colegio de Postgraduados*. Chapingo, México, 1972.
31. Martínez, G. A. : Diseños Experimentales: Métodos y Elementos de Teoría. *Trillas*. México, 1989.
32. McCollough, M.E. : NFIA, Fermentation of Silage a Review. National Feed Ingredients Association. Iowa, USA, 1978.
33. Merck.: Manual de Medios de Cultivo. *Laboratorios Merck*. México, 1994.
34. Mohanty, S. B. y Dutta, S. K. : Virología Veterinaria. 1ra. ed. *Interamericana*. México, 1981.
35. Moreno, G.B. : Análisis Microbiológicos de los Alimentos. 1ra. ed. *Acribia*. España, 1973.
36. Nicolet, J. : Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria. 1ra. ed. *Acribia*. España, 1985.

37. Oñate, L. S. : Medio ambiente y TLC. *Porcicultura Mexicana*, 5: 19 - 25 (1993).
38. Pascual, A. M. : Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. *Díaz de Santos, S.A. España*, 1992.
39. Pauzenga, U. : Producción animal en los años 90 en armonía con la naturaleza. *Porcivama*, 2:23 - 34 (1992).
40. Pineda, E. y Duhart, P.: Solución para mejorar el ambiente y el manejo de excretas en instalaciones. *Porcivama*, (1): 36 - 57 (1991).
41. Pérez, E. R. : Ganadería porcina y medio ambiente. *México Ganadero*, julio : 25 - 27 (1992).
42. Pérez, M. J. Vázquez, M. R. J.; Rodríguez, S. M. C.; Miranda, M. R. E.; Romo, G. A. L. y Nader, G. E. : Procedimientos de Laboratorio para Bacteriología y Micología Veterinarias. 2a ed. *U.N.A.M. México*, 1989.
43. SAGAR. : Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. *Subsecretaría de planeación, México*, 1994.
44. SAGAR. : Anuario estadístico de la producción pecuaria de los Estados Unidos Mexicanos. *Subsecretaría de planeación, México*, 1994.
45. SAGAR : Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-012 ZOO/1993. Especificaciones para la regularización de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por estos. *Diario Oficial de la Federación*, febrero 24 (1994).
46. SAGAR. Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-013-ZOO-1996, Tratamiento, transporte, movilización, almacenamiento y comercialización de la gallinaza y pollinaza. *Diario Oficial de la Federación*, marzo 20 (1996)
47. Salazar, G.G. : Algunas consideraciones sobre el manejo y valor de las excretas en la alimentación animal. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, Gro. México, Oct. 1994.
48. Salazar, G. G. : Reciclaje de excretas, buen negocio. *Síntesis Porcina*, octubre : 19 - 24 (1995).

49. Shimada, A.: Fundamentos de Nutrición Animal Comparativa. 1ra. ed. *Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México*, A.C. México, 1983.
50. Silliker, J. H.; Elliot, R. P.; Baird-Parker, A. C.; Bryan, F. L.; Christian, J. H. B.; Clark, D. S. y Roberts, T. A. : Ecología Microbiana de los Alimentos (Factores que Afectan a la Supervivencia de los Microorganismos en los Alimentos). Vol I. *Acribia*. Zaragoza, España, 1980.
51. SSA : Proyecto de Norma oficial Mexicana NOM-065 SSA1-93. Medios de Cultivo. Generalidades. *Diario Oficial de la Federación*, abril 20 (1994).
52. SSA. Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes por la Técnica del Número más Probable. *Diario Oficial de la Federación*, agosto 15 (1994).
53. SSA : Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. *Diario Oficial de la Federación*, agosto 15 (1994).
54. SSA : Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de salmonella en alimentos. *Diario Oficial de la Federación*, agosto 15 (1994).
55. SSA : Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimento para su análisis microbiológico. *Diario Oficial de la Federación*, agosto 15 (1994).
56. Steel , G. D. y Torrie, H. I. : Bioestadística: Principios y Procedimientos. 1ra. ed. *McGraw Hill*, México, 1989.
57. Sutton, A. : El manejo del desperdicio porcino, problemas y oportunidades. *Desarrollo Porcicola*, 14: 24 - 27 (1993).
58. Taiganides, E. P. : Manejo de desechos en ganadería, métodos prácticos en la perspectiva mundial y latinoamericana. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, Gro. México, Oct. 1994.
59. Tarazona, V. J.M. : Microbiología Moderna de los Alimentos. 2da. ed. *Acribia*. España, 1981.

60. Tejada, I. : Control de Calidad y Análisis de Alimentos para Animales. Sistema de Educación Continua en Producción Animal, A.C. (SEP). México. 1992
61. Thatcher, F.S. : Análisis Microbiológico de los Alimentos. *Acribia*. España, 1973.
62. Vega, V. F. : Daños y soluciones ecológicas en las granjas porcinas. *Porcivama*, 11 (131):62 - 68 (1987).
63. Wistreich, G. A. and Lechtman, M. D. : Laboratory Exercise in Microbiology. 2da ed. USA, 1989.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

INDICE DE CUADROS

Cuadros	Pag
1. Límites de pH favorables para el crecimiento de diversos microorganismos en medios de cultivo de laboratorio	31
2. Descripción de los tratamientos utilizados en la investigación, cantidades en base húmeda	32
3. Características sensoriales de ensilados de excretas de cerdo (fracción sólida) con caña de azúcar picada	33
4. Cambios en el pH y el contenido de materia seca (ms) de ensilados con excretas de cerdo y caña de azúcar	34
5. Viabilidad (ufc/g) de algunas bacterias patógenas en ensilados de excretas porcinas (60 %) con caña de azúcar (40 %)	35
6. Viabilidad (ufc/g) de algunas bacterias patógenas en ensilados de excretas porcinas (70 %) con caña de azúcar (30 %)	36

**Cuadro 1.- LÍMITES DE pH FAVORABLES PARA EL CRECIMIENTO DE
DIVERSOS MICROORGANISMOS EN MEDIOS DE CULTIVO DE
LABORATORIO.**

Bacterias Gram (-)		
<i>E. coli</i>	4.4	9.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (aerógenes)	4.4	9.0
<i>Proteus vulgaris</i>	4.4	9.0
<i>Salmonella paratyphi</i>	4.5	7.8
<i>Salmonella schottmuelleri</i>	4.5	8.0
<i>Salmonella typhi</i>	4.0 - 4.5	8.0 - 9.6
Bacterias Gram (+)		
<i>Clostridium botulinum</i>	4.7	8.5
<i>Clostridium sporógenes</i>	5.0	9.0
<i>Lactobacillus spp.</i>	3.8 - 4.4	7.2
Hongos		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.35	8.6
<i>Saccharomyces fragilis</i>	2.4	9.05
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1.5	
<i>Aspergillus oryzae</i>	1.6	9.3
<i>Penicillium italicum</i>	1.9	9.3
<i>Penicillium variable</i>	1.6	11.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	1.8	11.1

Cuadro 2.- DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN LA INVESTIGACIÓN, CANTIDADES EN BASE HUMEDA.



1*	60	40	0
2*	70	30	0
3	60	40	30
4	70	30	30
5	60	40	45
6	70	30	45
7	60	40	60
8	70	30	60

* CORRESPONDEN A LAS MEZCLAS ANTES DE ENSILAR.

Cuadro 3.- CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE ENSILADOS DE EXCRETAS DE CERDO (FRACCIÓN SÓLIDA) CON CAÑA DE AZÚCAR PICADA.



R1-30-60/40*	+++	-	-	café claro	-
R2-30-60/40	+++	-	-	café claro	-
R3-30-60/40	++	+	-	café claro	-
R1-30-70/30	+++	-	-	café claro	-
R2-30-70/30	+++	-	-	café claro	-
R3-30-70/30	++	+	-	café claro	-
R1-45-60/40	+++	-	+	café	-
R2-45-60/40	++	+	-	café	-
R3-45-60/40	+	-	-	café	-
R1-45-70/30	++	-	+	café	-
R2-45-70/30	++	-	+	café	-
R3-45-70/30	+	-	+++	café	-
R1-60-60/40	+++	-	-	café	-
R2-60-60/40	+++	-	-	café	-
R3-60-60/40	+++	-	-	café	-
R1-60-70/30	+++	-	-	café	-
R2-65-70/30	+++	-	-	café	-
R3-65-70/30	++	+	-	café	-

* Número de repetición, días de ensilaje y relación excreta - caña.

+ Ligero
 ++ Moderado
 +++ Abundante
 - Negativo

**CUADRO 4. CAMBIOS EN EL pH Y EL CONTENIDO DE MATERIA SECA (MS)
DE ENSILADO CON EXCRETAS DE CERDO Y CAÑA DE AZÚCAR.**



Caña de azúcar	32.16	3.90
Excretas porcinas	29.92	5.20
Tratamientos		
60-40 día 0	30.47 a	4.84 a
70-30 día 0	30.66 a	4.96 a
60-40 día 30	30.07 a	3.61 b
70-30 día 30	30.77 a	3.63 b
60-40 día 45	29.54 a	3.56 b
70-30 día 45	30.15 a	3.62 b
60-40 día 60	31.33 a	3.51 b
70-30 día 60	32.12 a	3.60 b

a, b literales distintas por columna indican diferencia significativa ($p < .05$)

Cuadro 5. VIABILIDAD (UFC/g) DE ALGUNAS BACTERIAS PATÓGENAS EN ENSILADOS DE EXCRETAS PORCINAS (60 %) CON CAÑA DE AZÚCAR (40 %).

	BWW		ACC		DPLS		SS		TSN	
	promedio	d.s.	promedio	d.s.			promedio	d.s.		
	Caña de azúcar	7X10 ¹ *	±(3X10 ¹)	1X10 ¹	±(0)	-	-	1X10 ¹	±(0)	
Excretas de cerdo	25X10 ⁷	±(18X10 ⁷)	16X10 ⁸	±(24X10 ⁸)	-	-	12X10 ⁸	±(20X10 ⁸)		
Días de ensilaje										
0	35X10 ⁷ a	±(0)	24X10 ⁷ a	±(19X10 ⁷)			40X10 ³ a	±(53X10 ³)		
30	1X10 ¹ b	±(0)	1X10 ¹ b	±(0)			34X10 ⁴ a	±(58X10 ⁴)		
45	1X10 ¹ b	±(0)	1X10 ¹ b	±(0)			19X10 ⁴ a	±(15X10 ³)		
60	1X10 ¹ b	±(0)	1X10 ¹ b	±(0)			26X10 ⁴ a	±(17X10 ⁴)		

* Cuando en las placas no hubo colonias características, se reportó el resultado como menos de un coliforme 1/d por gramo, en donde d es el factor de dilución (53)

a, b literales distintas por columna indican diferencia significativa (p < 05)
d s corresponde a la desviación estandar

CUADRO 6. VIABILIDAD (UFC/G) DE ALGUNAS BACTERIAS PATÓGENAS EN ENSILADOS DE EXCRETAS PORCINAS (70 %) CON CAÑA DE AZÚCAR (30 %).

	SRV		MCC		BPLS		SS		TSN	
	promedio	d.s	promedio	d.s					promedio	d.s
Caña de azúcar	7X10 ¹ *	±(3X10 ¹) A	1X10 ¹	±(0)	-	-	1X10 ¹	±(0)		
Excretas de cerdo	25X10 ⁷	±(18X10 ⁷)	16X10 ⁶	±(24X10 ⁶)	-	-	12X10 ⁵	±(20X10 ⁵)		
Días de ensilaje										
0	23X10 ⁷ a	±(20X10 ⁷)	23X10 ⁷ a	±(20X10 ⁷)			66X10 ² a	±(59X10 ²)		
30	1X10 ¹ b	±(0)	1X10 ¹ b	±(0)			59X10 ⁴ a	±(51X10 ⁴)		
45	1X10 ¹ b	±(0)	1X10 ¹ b	±(0)			24X10 ⁴ a	±(27X10 ⁴)		
60	1X10 ¹ b	±(0)	1X10 ¹ b	±(0)			11X10 ⁴ a	±(53X10 ³)		

* Cuando en las placas no hubo colonias características, se reportó el resultado como menos de un coliforme por 1/d por gramo, en donde d es el factor de dilución (53)

a, b literales distintas por columna indican diferencia significativa (p<05)
d.s. corresponde a la desviación estandar