

01680

2
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE
LA SALUD ANIMAL

"EVALUACION MICROBIOLOGICA DE ENSILADOS A BASE DE EXCRETAS PORCINAS"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL
P R E S E N T A :
MVZ. ROBERTO G. MARTINEZ GAMBA

COMITE TUTORIAL: DR. PEDRO J. B. DE LA S. PRADAL-ROA
DR. HUMBERTO RAMIREZ MENDOZA,
MVZ. MA. PABLO CORREA GIRON,
DR. MARIO A. COBOS PERALTA,
DR. ROBERTO CERVANTES OLIVARES.



MEXICO, D. F.

274246

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos:

Deseo expresar mi agradecimiento a los miembros del comité tutorial:

Dr. Pedro J. B. de la S. Fdo. Pradal-Roa.

Dr. Humberto Ramírez Mendoza.

MVZ MA. Pablo Correa Girón.

Dr. Roberto Cervantes Olivares.

Dr. Mario A. Cobos Peralta.

A los Maestros Francisco Castrejón Pineda y Marco Antonio Herradora Lozano, responsable y corresponsable respectivamente, del proyecto PAPIIT No. INI210997 **“Aprovechamiento integral de las excretas del cerdo para la alimentación animal”**, quienes son los verdaderos impulsores de esta investigación.

A las MVZ Rosario Esperanza Galván Pérez y María del Carmen Mercado Díaz; colaboradoras del proyecto, por el apoyo dado a la realización del trabajo.

A la Srta. Silvia Hernández por el apoyo en el trabajo secretarial.

Resumen

El presente estudio se llevo a cabo para determinar el tiempo de sobrevivencia de *Escherichia coli* (EC), *Salmonella choleraesuis* (SC), virus de la Enfermedad de Aujeszky (EA) y el virus de la Enfermedad del Ojo Azul (EOA), en ensilados a base de fracción sólida de excretas porcinas. En una primera etapa se llevó a cabo una evaluación serológica y microbiológica de la granja origen de las excretas; se analizaron 100 muestras de heces de diferentes áreas de la granja, tanto directamente de los animales como de las áreas de manejo de excretas y un muestreo serológico en 30 animales, para determinar anticuerpos contra EA y EOA. Se encontró una carga de enterobacterias de 3.1×10^6 UFC/gr. Se identificó EC en 11 áreas de la granja y SC en muestras del área de engorda y de los líquidos provenientes del separador de sólidos. No se encontraron anticuerpos, ni se aislaron EA y EOA. En una segunda etapa se inocularon con los cuatro microorganismos, microsilos a base de fracción sólida de excretas porcinas, sorgo y melaza. Se ensilaron por 0, 7, 14, 28 y 56 días, al final de los cuales se evaluó la condición de cada microsilos y se intentó el reisolamiento de los agentes inoculados. En el 97 % de los microsilos se llevó a cabo el proceso de ensilaje en forma correcta. El promedio de pH encontrado en los silos fue de 4.01. Los cuatro agentes inoculados se aislaron únicamente al día 0 de ensilaje. En el caso de los agentes virales estos se identificaron por efecto citopático y fluorescencia, no así por hemoaglutinación y hemoaglutinación pasiva. Se repitió el experimento con 1, 3 y 5 días de ensilaje, encontrando un pH de 4.0 al tercer día de ensilaje y aislando EC, SC y OA al día 1. Se concluyó que los ensilados a base de fracción sólida de excretas porcinas se pueden usar sin riesgo de transmitir los agentes inoculados en el presente trabajo.

Palabras clave: Excretas porcinas, ensilado, *E. coli*, *S. choleraesuis*, Aujeszky, Ojo Azul.

Summary

This study was carried out in order to evaluate the survival time of two bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella choleraesuis* and two viruses, Aujeszky's disease virus and Blue Eye Disease virus in silage made of solid pig feces. In the first phase an evaluation of different farm areas, including live animals feces and manure management were processed for bacteriological and virological test. It was found that in 11 areas of the farm *E.coli* was isolated and *S. choleraesuis* was found in only the animals in the fattening area as well as in the tank used as separator of liquid and solid manure. A concentration of 3.1×10^6 CFU/gr of enterobacteria was found as an average in all areas of the farm. Thirty serum samples taken from animals did not reveal antibodies against the viral diseases and it was not possible to isolate them from the samples taken from the different areas. The second phase of the work was carried out in the laboratory, making the microsilage with a mixture of pig's feces, sorghum and molasses in small jars and the four agents were inoculated in these systems, samples from them were taken at days 0, 7, 14, 28, and 56. The average pH found in the microsilage jars was 4.01 and only from the samples of day 0 was possible to isolate the agents. The third stage was carried out in a similar way as the second, but samples were taken out on days 1, 3 and 5, it was found that the pH dropped at day 3 and it was possible to isolate *E. coli*, *S. choleraesuis* and Blue Eye Disease virus in day 1. This result showed that the pathogens that were studied in this work can not survive more than one day in the silage system and it is clear that the use of pig's feces is not a problem regarding the pathogens studied.

Key words: Swine feces, silage, *E.coli*, *S.choleraesuis*, Aujeszky's Disease, Blue Eye Disease.

Contenido

Índice	Página
Agradecimientos.	i
Resumen.	ii
Summary.	iii
Contenido.	iv
Lista de cuadros.	v
Lista de figuras.	vi
Introducción	1
Hipótesis	21
Objetivos	21
Material y Métodos.	
Etapa 1.	22
Etapa 2.	26
Etapa 3.	35
Resultados.	
Etapa 1.	37
Etapa 2.	40
Etapa 3.	53
Discusión.	57
Conclusiones.	69
Literatura citada.	70
Anexos.	83

Lista de Cuadros.

Página

1.- Composición química de las excretas porcinas en dos granjas en México.	8
2.- Distribución de microsilos por agente inoculado y tiempo de fermentación.	28
3.- Condiciones para el cultivo bacteriano.	31
4.- Título de enterobacterias en las muestras de cada área de la granja.	38
5.- Agentes bacterianos identificados en las muestras de las diferentes áreas de la granja.	39
6.- Promedios del pH por días de ensilaje.	44
7.- Promedio de enterobacterias (UFC/gr) por días de ensilaje.	46
8.- Número de muestras que presentaron efecto citopático por tiempo de ensilaje.	47
9.- Número de muestras que presentaron fluorescencia positiva por tiempo de ensilaje.	47
10.- Medición del pH por inóculo y días de ensilaje en la tercera etapa del trabajo.	53
11.- Cantidad de UFC/gr por inóculo y por días de ensilaje	54

Lista de Figuras.

Página

1.- Frasco de plástico con válvula adaptada en la tapa.	42
2.- Frasco con crecimiento de hongos en la superficie a los 28 días de ensilaje.	43
3.- Herpesvirus observado en una muestra del inóculo. 25,000 X.	49
4.- Rubulavirus observado en una muestra del inóculo. 25,000 X.	50
5.- Herpesvirus observado en una muestra tomada 60 minutos después de ser inoculado. 25,000 X.	51
6.- Rubulavirus porcino observado en una muestra tomada 60 minutos después de ser inoculado. 25,000 X.	52
7.- Fragmentos de Rubulavirus en una muestra de tres días de ensilaje. 25,000 X.	56

INTRODUCCIÓN

La porcicultura es una actividad relevante a nivel mundial, en el año de 1997 la producción de carne de cerdo ocupó el primer lugar a nivel mundial, con 88 millones de toneladas. El inventario mundial de porcinos para el año de 1998 fue de 923.9 millones de cabezas. Durante los dos últimos años ha existido un incremento de 2.2 %, contribuyendo a este incremento países como China y Brasil, pero disminuyendo en países europeos como Alemania, Bélgica y España (Lastra y Galarza, 1998; Trueba, 1998).

En México existen 10.5 millones de cerdos, lo que lo sitúa en el décimo quinto lugar a nivel mundial en población porcina (Lastra y Galarza, 1998). La producción en 1998 fue de 960.8 mil toneladas de carne, lo que representó un incremento de 2.3 % con respecto al año anterior (U.S. Grain Council, 1998). México participa en el mercado mundial con un 1.3% de la producción total de carne de cerdo; en lo que concierne al consumo *per cápita* este es de 12.5 Kg., lo que lo coloca en el décimo tercer lugar mundial (Trueba, 1998). Los datos anteriores destacan la importancia de esta actividad en el país.

Si bien los cerdos están ampliamente distribuidos en el territorio nacional, los estados de Jalisco, Sonora, Guanajuato, Yucatán, Puebla y Michoacán aportan el 71.2% de la producción (Trueba, 1998). Existen regiones donde la concentración de animales es muy grande, tales como: la cuenca del Río Balsas en la que se aglutinan 4.3 millones de cabezas; en Sonora, específicamente en los distritos de riego de los ríos Yaqui y Mayo, así como en la zona de Hermosillo donde existen 1.2 millones de cabezas, mientras que en Yucatán se mantienen un millón de cabezas; es notorio que en todas estas regiones los recursos hidráulicos son pobres, por la sobreexplotación de los mantos acuíferos, las características topográficas y la contaminación debida a las actividades industriales, agrícolas y urbanas (Pérez, 1997).

En relación a este último aspecto, la porcicultura se ha convertido en una actividad contaminante, particularmente en lo que se refiere a la contaminación del agua, ya sea de aguas superficiales por la descarga directa de materia orgánica en pozos, ríos, lagos y lagunas, o bien de aguas subterráneas por la filtración de diversos contaminantes que acompañan a las excretas empleadas como fertilizantes (Sutton, 1993, Moser, 1997, Pérez, 1997).

Existen cuatro factores identificados como la causa principal del impacto negativo de la actividad porcícola sobre el medio ambiente.

1.- La alta concentración de animales en un espacio reducido (Domínguez, 1993; Pérez, 1997).

2.- El desarrollo de una porcicultura sin vínculos con la actividad agrícola, en donde las heces producidas por los cerdos no son integradas a las tierras de cultivo, sino que se depositan en tierras no agrícolas o bien se descargan en ríos o lagunas sin ningún tratamiento (Miner, 1977; Pérez, 1997).

3.- Los sistemas de alimentación con contenidos tan altos de los diferentes elementos, que el cerdo no es capaz de asimilar por completo y que originan mayores volúmenes de excretas (Jacques y Hoyos, 1993; Henry, 1995; Pérez, 1997).

4.- El nivel de contaminación del agua descargada por las granjas, después de emplearla en la limpieza de las instalaciones y en los sistemas de remoción de las excretas (Pérez, 1997).

Las excretas de cerdo se componen de 65 % de orina y 35 % de heces. En particular las heces presentan un alto contenido de materia orgánica biodegradable en un 55 % y numerosos elementos contaminantes entre los que destacan microorganismos patógenos y minerales como el cobre, zinc y arsénico. La cantidad de las excretas que producen los cerdos depende de una multitud de factores, entre ellos, la edad de los cerdos, la madurez fisiológica de los mismos, la cantidad y calidad del alimento consumido, el clima y el consumo de agua. Se ha determinado que un cerdo de 100 kilogramos excreta aproximadamente 6.17 kg tanto de heces como de orina por día, estos desechos originan aguas residuales que representan de un 4 a un 5% del peso vivo de los animales (Domínguez, 1993; Sutton, 1993; Taiganides, 1994). Cuando ésto se extrapola con base en el inventario de cerdos a nivel nacional, representa un alarmante factor de contaminación si no es sometido a algún sistema de tratamiento (Domínguez, 1993).

Antiguamente las excretas porcinas no representaban un problema, ya que se retiraban de la granja junto con la paja que se usaba como cama para los cerdos, lo que formaba una composta libre de patógenos que se empleaba como fertilizante sin ocasionar problemas de contaminación bacteriana o viral; sin embargo, la expansión de la actividad porcícola, el incremento en el tamaño de los hatos, el aumento en el costo de la mano de obra y la concentración de las granjas en forma regional, rebasan la capacidad de la composta como un método de tratamiento de las excretas requiriéndose otros métodos para el manejo de las excretas (Andreadakis, 1992).

Dentro de los métodos empleados para el procesamiento de los desechos de las granjas porcinas están: el dejarlas secar y utilizarlas como fertilizantes, para la regeneración de suelos erosionados, para la producción de composta, para la producción de biogas a través de un proceso de fermentación y la dilución en agua para su almacenamiento en tanques o lagunas, y su posterior desecho o tratamiento (Sweeten, 1992; Liceaga, 1994; Taiganides, 1994; Moser, 1997). En las grandes granjas industriales el último método es el más empleado hoy en día.

Sin embargo, estos usos no disminuyen la descarga de contaminantes al medio ambiente y en el caso de otros, específicamente la producción de biogas, donde un cerdo de 50 kg aporta la cantidad de excretas diarias requeridas para producir 0.1 metros cúbicos de metano por día (CNE, 1985), presenta la desventaja de una inversión inicial elevada para su operación y gastos de mantenimiento, lo cual ha limitado su adopción como parte del sistema de producción de las granjas porcinas (Cabrera, 1998).

Con relación a la dilución de las excretas, es importante hacer notar que en México, aunque existen disposiciones regidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-001 ECOL 1994 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las descargas de aguas residuales vertidas a aguas y bienes nacionales, la cual fija ciertos estándares de calidad, medidos en parámetros de contaminación como son principalmente: la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) con 10 a 150 mg/L, la concentración de sólidos totales con un máximo de 1000 mg/L, sólidos suspendidos de entre 10 a 125 mg/L, los sólidos sedimentados que deben de estar entre 0.5 y 1.5 mL/L, la cantidad de nitrógeno entre 6.0 y 30 mg/L, de amoníaco entre 2.0 y 10 mg/L y de fósforo total entre 1 y 6 mg/L, mismas que deben ser cumplidos por los productores para eliminar sus desechos líquidos; sin embargo, el 38% de las granjas descargan a cuerpos receptores propiedad de la nación, sin ningún tratamiento lo que provoca un alto grado o potencial de contaminación de mantos freáticos, ríos, lagos, etc. (Pérez, 1997).

Otras granjas depositan las excretas sobre el suelo sin tratamiento alguno, lo que origina que elementos fertilizantes presentes en cantidades importantes en las excretas, como el nitrógeno, el fósforo y el potasio se mineralicen, se disuelvan y luego puedan ser utilizados por las plantas; pero hay elementos como el amonio y los fosfatos, que no alcanzan a ser absorbidos por las plantas y se filtran a través de los horizontes del suelo con las lluvias y pueden contaminar mantos freáticos (Vega y Romero, 1987). Para lograr los estándares que marca la NOM-001 ECOL, es necesario que los productores realicen el tratamiento de los desechos (Taiganides, *et al.*, 1996).

El tratamiento de las aguas residuales puede realizarse por métodos físicos, químicos y biológicos; sin embargo el costo de los dos primeros hace que resulten inaplicables en la producción animal (Sheler y Soede, 1980); por esta razón se han desarrollado los métodos biológicos que se dividen a su vez en tres tipos: primarios, secundarios y terciarios, dentro de los segundos encontramos sistemas empleados en el tratamiento de los efluentes de operaciones pecuarias como son: el de lodos activados, lagunas de estabilización, lagunas de oxidación, digestores anaeróbicos y lagunas aeróbicas (Cañizares y Casas, 1991). En México las lagunas de estabilización o anaeróbicas y las lagunas aeróbicas son los métodos más utilizados en las operaciones porcinas que cuentan con tratamiento de desechos.

Los líquidos descargados a partir de una granja porcina consisten en un 88 % de agua libre y en un 12 % de sólidos suspendidos, los cuales contienen la mayor cantidad de los nutrimentos y contaminantes. La mejor forma para su tratamiento es permitir una sedimentación inicial de dichos sólidos, para posteriormente realizar una separación mecánica. Con este proceso se obtienen efluentes líquidos con muy pocas partículas sólidas que son descompuestas por microorganismos, y que pueden ser enviados a lagunas anaeróbicas para su almacenamiento y posterior uso como fertilizante; este tipo de lagunas son económicas y simples de construir, pero su efectividad es variable y en muchos casos el resultado del tratamiento no es adecuado (Andreadakis, 1992); como una segunda opción los líquidos se depositan en lagunas aeróbicas que permiten el reciclaje de agua; ambos tratamientos reducen la cantidad de agentes patógenos (Montalvo, 1984) y la emisión de olores en un 75%; sin embargo, el tratamiento aeróbico resulta diez veces más costoso (Toledo, 1998).

Las lagunas anaeróbicas tienen como ventajas: la eliminación de materia orgánica por sedimentación y degradación microbiana, siempre y cuando se mantenga un pH de alrededor de 7, que es adecuado para la degradación de la materia orgánica; sus desventajas son: que el efluente resultante requiere un tratamiento posterior, que la degradación de la materia orgánica es parcial, que no operan correctamente a bajas temperaturas, que sufren de gasificación y que se producen olores desagradables.

Las lagunas aeróbicas tienen como ventajas que son útiles en cualquier condición climática, tienen un bajo costo inicial por ocupar menos terreno al ser más profundas y su facilidad de operación y mantenimiento; como desventajas que sólo son útiles para altos volúmenes de carga orgánica, que existe una disminución de nutrientes al estabilizarlos y que requieren de una elevada demanda de oxígeno (Donald, 1988; Burns, *et al.* 1990; Cabrera, 1998). Por otra parte los sólidos previamente separados son ricos en nutrientes que pueden utilizarse como fertilizantes, composta y como ingredientes para la alimentación de rumiantes y cerdos (Taiganides, 1994; Drucker y Gómez, 1998).

La marcada contaminación de suelo, agua y aire en regiones aledañas a granjas porcinas y el incremento en la producción de excretas, han motivado a los investigadores en nutrición animal, a estudiar diversas formas de reciclar las excretas animales como parte de las raciones para especies domésticas (Toledo, 1998).

La reutilización de los nutrientes fecales se basa en la observación de la coprofagia en algunos animales salvajes y domésticos. El uso de excretas en unidades de producción pecuaria tampoco es novedoso, ya que desde 1920 se tiene conocimiento de la práctica de alojar a becerros y cerdos en el mismo corral para que estos últimos aprovecharan los nutrientes de las heces de los primeros (Flores, 1989).

En comparación con las excretas de otros animales como bovinos lecheros, de carne y aves, las excretas porcinas tienen un valor intermedio en cuanto a su contenido de proteína; sin embargo, la digestibilidad aparente del nitrógeno puede ser superior a la de las otras especies. La composición nutricional de las excretas de cerdo se ha evaluado en diferentes condiciones observando mucha diferencia en la composición química proximal, mineral y fracciones de fibra, que dan como resultado una enorme variación sobre la digestibilidad (Toledo, 1998).

Iñiguez (1991) menciona que la materia seca de excretas de rumiantes y cerdos tienen un 29 y un 49 % de digestibilidad. La mayor cantidad de información publicada acerca del valor nutricional de las excretas porcinas es sobre su composición proximal, sin embargo es poca la investigación existente sobre su digestibilidad (Castrejón, 1993).

A continuación se presentan algunas características del valor nutricional de las heces porcinas:

Cuadro 1.- Composición química de las excretas porcinas de dos granjas en México.

Principio nutritivo	Granja 1	Granja 2
Materia seca %	34.55	35.99
Proteína bruta %	17.44	14.55
Extracto etéreo %	6.23	5.54
Ceniza %	16.27	5.76
Fibra bruta %	24.12	23.77
E.L.N. %	35.18	50.14
Calcio %	1.95	0.49
Fósforo %	1.23	0.44
Celulosa %	19.66	28.13
Lignina %	8.22	12.18
Digestibilidad <i>in situ</i> %	73.65	80.61

(Toledo, 1998)

El reciclaje de las excretas de cerdo para la alimentación tanto de rumiantes como de cerdos, ayuda a reducir la contaminación que causan los sólidos en el ambiente y a aprovechar su alto contenido de minerales, y especialmente del nitrógeno, lo que disminuye los costos de alimentación (Iñigo, *et al.* 1991; Campadabal y Navarro, 1995; Liceaga, 1994; Molina, 1997). Y aunque la calidad de la cerdaza depende del tipo de dieta que reciben los cerdos, la edad de los mismos y la eficiencia con que se recolectan los sólidos, valores de proteína cruda de 8 a 19 % en base seca, permiten a los rumiantes utilizarla en forma eficiente (Molina, 1997); si bien este sistema de aprovechamiento es sólo una solución parcial, ya que la cerdaza producida en una granja rebasa con mucho el número de bovinos que puede mantener un productor; por ejemplo, un productor de cerdos con 650 unidades animales necesitaría tener 56 bovinos para reciclar todas las excretas (Iñiguez, 1991; García, 1993; Drucker y Gómez, 1998).

Algunos autores mencionan que el incremento en el uso de excretas diluidas sin tratar en la alimentación animal, aumenta los riesgos sanitarios al reciclar microorganismos patógenos y otros contaminantes (Strauch y Ballarini, 1994; Hernández, 1997; Molina, 1997). Un ejemplo de lo anterior lo reportan Huysman *et al.* (1993) quienes detectaron la existencia de contaminación fecal con base en la presencia de *E. coli* y de estreptococos fecales en zonas consideradas no contaminadas, como selvas tropicales húmedas, pero relativamente cercanas a poblaciones animales y humanas.

Strauch y Ballarini (1994) mencionan que el uso de excretas en la alimentación animal puede ser un riesgo, ya que diversos microorganismos patógenos pueden sobrevivir por largos periodos y hasta multiplicarse en las excretas durante su almacenamiento; entre estos están los causantes de: Salmonelosis, Brucelosis, Leptospirosis, Tuberculosis, Yersiniosis, Campilobacteriosis, Erisipela, Listeriosis y Disentería Porcina. Bajo condiciones prácticas el tipo y la cantidad de bacterias presentes en el estiércol dependerá de la localización geográfica de la operación y la composición física y química del estiércol. A su vez la sobrevivencia microbiana en los lodos o sedimentos de excretas será mayor cuando la temperatura se mantenga por abajo de 10 grados centígrados o bien contengan más de 5% de sólidos (Strauch y Ballarini, 1994). Otro factor que favorece la sobrevivencia bacteriana es el no realizar una desinfección adecuada y periodica de los drenajes, del material de cama y del piso de los transportes de desechos (Rajkowski *et al.*, 1998).

Pequeñas concentraciones de enterobacterias pueden ser aisladas con cierta facilidad mediante métodos de cultivo; otras bacterias como las que causan el Anthrax, la Brucelosis, la Mycobacteriosis y la Leptospirosis sólo pueden ser aisladas en el estiércol si su número es alto y se cuenta con la técnica adecuada. Por consiguiente, el número de ocasiones en el cual un patógeno ha sido aislado de las heces no proporciona un verdadero reflejo de su ocurrencia y es justificable asumir que cualquier organismo eliminado en las heces de los animales puede ser encontrado en el estiércol (Strauch y Ballarini, 1994).

En los sedimentos de excretas el pH disminuye durante la primera semana de almacenamiento a 6.5 para después aumentar a 7.0, lo que permite la sobrevivencia de *Salmonella spp.* por más de 150 días, si bien el 90% de ellas muere durante la primer semana cuando el pH baja. Reducciones semejantes se han reportado para *Escherichia coli*, *Erisipelothrix rhusiopathiae*, *Yersinia enterocolitica* y *Staphylococcus aureus*. Periodos mas largos de sobrevivencia han sido indicados para organismos esporulados como *Clostridium perfringens*, cuyo número permanece inalterado por siete meses. Otras bacterias como *Bacillus anthracis*, *Brucella spp.*, *Leptospira spp.* y *Serpulina hyodysenteriae*, sobreviven en las heces porcinas por periodos de tiempo variable dependiendo del manejo que se lleve a cabo con ellas (Strauch y Ballarini, 1994; Olson, 1995)

Lo anterior concuerda con lo citado por Mateu *et al.* (1992) quienes encontraron una disminución de enterobacterias equivalente a cuatro logaritmos en heces de cerdo almacenadas en lagunas de estabilización por 18 días. Así mismo Iñigo *et al.* (1991) encontraron bajas cantidades de coliformes en heces de cerdos de cinco granjas con sistemas de fermentación aeróbica, pero no encontraron *Salmonella spp.* ni *Clostridium perfringens*; mientras Plym y Ekesbo (1993) encontraron que *S. senftenberg* y *S. typhimurium* sobreviven menos de siete días y *S. derby* 14 días en heces de cerdas reproductoras.

En el caso de los virus, los cuales se consideran completamente dependientes de las células del hospedador para su existencia, se puede argumentar que sólo son capaces de sobrevivir en la naturaleza pasando directamente de un hospedador a otro. La información sobre la ocurrencia y supervivencia de los virus en el excremento animal no está ampliamente difundida como en el caso de las bacterias. Sin embargo, se conocen un número considerable de agentes virales que son eliminados en las heces del ganado, y sólo recientemente con la mejora en las técnicas de diagnóstico ha sido posible su identificación en la materia fecal.

Dentro de los virus que se han encontrado en las heces, están los enterovirus; investigaciones cuantitativas en muestras de excretas líquidas con aislamiento viral directo, han producido títulos de 10^6 dosis infectantes en cultivo celular (TCID₅₀). La sobrevivencia de Parvovirus Porcino en excretas líquidas y abono está bien documentada. Por el contrario el virus de la Gastroenteritis Transmisible, al igual que otros coronavirus, son bastante sensibles al medio, al igual que el virus de la Influenza Porcina, cuya supervivencia es baja y su excreción en las heces es poco común (Strauch y Ballarini, 1994).

A pesar de esto se reporta la sobrevivencia de algunos virus en heces de cerdos; por ejemplo, el virus de la Enfermedad de Aujeszky, entre tres a 15 semanas; el de la Fiebre Porcina Africana, por 60 días; y el de la Fiebre Aftosa, entre 21 a 103 días (Strauch y Ballarini, 1994), el Parvovirus Porcino hasta por 14 semanas (Mengeling y Paul, 1986; Mengeling, 1992); contrario a lo anterior algunos autores (Ming y Cliver, 1992; Ming y Cliver, 1995) han demostrado una inactivación del Poliovirus tipo 1 y del virus de Hepatitis A en sedimentos de mezclas de excretas humanas y porcinas a las cuatro semanas y cinco semanas respectivamente, y que dicha inactivación esta relacionada con una elevación de la temperatura por arriba de los 25 grados centígrados, a la presencia de oxígeno y a la elevación del pH de los sedimentos de las fosas que contienen a las heces por arriba de 9.0; aunque la mayoría de los virus entéricos sobreviven en pH que van de 3 a 5 (Ming y Cliver, 1995).

Por otra parte se conoce que bacterias como *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* destruyen a algunos enterovirus, especialmente el virus CA-9 humano, en los sedimentos de estiércol y el sistema de tratamiento de lodos activados (procesos de sedimentación y aereación) reducen la cantidad de virus de manera importante (Cliver y Hermann, 1972; Ward, 1982).

Otros virus, como por ejemplo el de la Influenza Aviar se destruye con facilidad una vez amontonada la gallinaza o la cama en capas de 60 centímetros de grosor y de uno a dos metros de ancho, cubierta con plástico negro, y se mantiene a la intemperie por dos días para que así se eleve la temperatura a 56 grados y se inicie la fermentación (Comisión México-Americana para la prevención de la Fiebre Aftosa, 1994).

Con base en el riesgo potencial de transmisión de agentes patógenos al usar las excretas porcinas en la alimentación, tanto de los cerdos como de rumiantes, se establece la necesidad de dar un tratamiento a las heces de cerdo antes de usarlas como una fuente de materia prima en la alimentación animal, con el fin de eliminar dichos microorganismos patógenos.

Dentro de los distintos tipos de tratamiento que se recomiendan para el reciclaje de excretas están los métodos físicos, químicos y biológicos. Entre estos últimos el ensilaje es una de los más recomendados, ya que disminuye el olor de las excretas, preserva la mayor parte de los nutrimentos y favorece la fermentación anaeróbica de los carbohidratos solubles originando una disminución del pH, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias, virus y otros patógenos (Díaz, *et al.*, 1988; Iñiguez, 1991; Salazar *et al.* 1994; Campadabal y Navarro, 1995); además se favorece su ingestión al modificarse sus características organolépticas, principalmente un olor ácido dulce y un nivel de humedad adecuado. La cantidad de humedad recomendada para un ensilaje de excretas es de 70%, como ocurre con otro tipo de ensilados, por ejemplo el de maíz. Un buen ensilado requiere compactar bien la mezcla de ingredientes para garantizar la anaerobiosis requerida para la conservación de los nutrientes (Flores, 1989; Hernández, 1997).

Un proceso de fermentación ideal, se presenta cuando existen condiciones de anaerobiosis y consiste de varias fases de diferente duración e intensidad:

1.- Las células vegetales y microorganismos facultativos respiran utilizando el oxígeno residual e intersticial de las células vegetales y se da una proteólisis con los sistemas enzimáticos todavía activos. Inicia un cambio en la flora bacteriana hacia microorganismos anaeróbicos.

2.- La presencia de nutrientes de fácil fermentación a partir de los fluidos celulares, comenzando la actividad microbiológica de tipo homo y heteroláctica.

3.- Se incrementa la producción de ácido láctico y hay una fuerte actividad microbiológica, hay un cambio de reacciones y la eliminación de organismos ácido-sensitivos.

La calidad del ensilado está asociada a ciertos parámetros como son: un pH menor a 4.2, un porcentaje de ácido láctico de 2.5, de ácido acético de 0.8 y de ácido butírico menor a 0.1 y a una humedad menor al 70 % (McCullogh, 1978). La producción de ácido láctico y la disminución del pH están asociados al desarrollo inmediato de bacterias lácticas dentro del silo, una vez que las condiciones de anaerobiosis están dadas.

Las bacterias lácticas son organismos anaerobios, Gram positivos, no móviles, no esporulados y fermentadores de azúcares. Dentro de las bacterias lácticas se pueden citar dos grupos: las homofermentativas y las heterofermentativas, dentro de las primeras pueden citarse entre otras: *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilacti*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium* y *Streptococcus lactis*; y dentro de las heterofermentativas están entre otras: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus viridescens*, así como miembros de los subgéneros *Streptobacterium* y *Betabacterium* (Beck, 1978).

Estas bacterias lácticas producen básicamente dos tipos de reacciones: las de desaminación; por ejemplo, convirtiendo la arginina en citrulina y amoniaco, la glutamina en glutamato y amoniaco y la asparagina en aspartato y amoniaco; y las reacciones de descarboxilación, convirtiendo la tirosina en tiamina y bióxido de carbono, la histidina en histamina y bióxido de carbono, la lisina en cadaverina y bióxido de carbono, y la ornitina en putrescina y bióxido de carbono (Edwards y McDonald, 1978).

Otros agentes encontrados en los ensilados son: las enterobacterias, específicamente del grupo Coli-Aerógenos como *Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.* y *Bacillus spp.*, sobre todo en la etapa aerobica; los clostridios principalmente *Cl. tyrobutyricum* y *Cl. butyricum*, especialmente cuando la humedad del silo es alta, lo que da como resultado una fermentación butírica estimulada por estos microorganismos, donde el pH del ensilado no es tan ácido; y por último las levaduras, principalmente de los géneros *Tortulopsis spp.*, *Hansenula spp.*, *Pichia spp.* y *Candida spp.* (Beck, 1978).

Las condiciones de anaerobiosis, el nivel del pH, la presencia de ácidos grasos volátiles, la temperatura alcanzada en los silos y cambios en la presión osmótica hacen difícil la sobrevivencia de muchos microorganismos dentro del material ensilado (Russell y Diez-González, 1998).

En un estudio realizado en México por Iñiguez *et al.* (1990) utilizando ensilados de excretas de cerdo, paja y melaza, encontraron la destrucción de coliformes, principalmente *E. coli* y una reducción en la cantidad de *Clostridium spp.* a los siete días de fermentación.

Resultados semejantes reporta Hernández (1997), quien utilizando ensilados de excretas de cerdo y caña de azúcar observó una disminución significativa en la cantidad de coliformes presentes a los 30 días de fermentación, si bien la disminución en la cantidad de *Clostridium spp.* no fue tan marcada.

En cuanto a la permanencia de agentes virales en los ensilados de excretas de cerdos, no se cuenta con información al respecto; sin embargo, el ensilaje puede constituirse en un proceso de inhibición eficaz contra varios virus, debido a que la mayoría de ellos no sobreviven fuera de un rango de pH de 5 a 9, aunque algunos virus como los enterovirus y el virus de la Enfermedad de Aujeszky resisten más allá de ese rango de pH, por lo que podrían sobrevivir en un ensilado y ésta podría ser una forma de difusión de la enfermedad tanto para rumiantes como para cerdos (Kluge *et al.*, 1992).

Dentro de las bacterias que se pueden transmitir por vía fecal y que mayor importancia tienen en la presentación de problemas infecciosos en las granjas porcinas, están *Salmonella choleraesuis* y *Escherichia coli*; a continuación se describen brevemente algunas de sus características más sobresalientes y las formas de presentación más frecuentes en las granjas porcinas:

La importancia de la salmonelosis queda establecida en un estudio conducido en 1995 por el Sistema Nacional de Monitoreo en Salud Animal del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, en el cual se encontró evidencia de la diseminación por las heces de *Salmonella spp.* en el 38% de 160 granjas participantes en el muestreo, incrementándose la proporción de hatos con diseminación del agente a medida que aumentaba el número de animales en ellos; un 15% de las granjas tuvieron evidencia de diseminación activa en más de dos tercios de los cerdos de engorda (Center for Food Safety and Applied Nutrition, 1998).

Esta enfermedad se encuentra en granjas porcinas de todo el mundo y su importancia se acentúa además, por su capacidad de ocasionar zoonosis, de infectar alimentos de origen animal y de producir enfermedad en otras especies (Wilcock y Schwartz, 1992). *Salmonella spp.* tiene la capacidad de cruzar la barrera mucosa del intestino e invadir y multiplicarse en células del epitelio intestinal del hospedador, causando una infección crónica, un estado de portador y en algunos casos una enfermedad de tipo sistémico (Falkow, 1996).

Uno de los agentes infecciosos más importante en la industria porcina es *Salmonella choleraesuis*, el cual es un bacilo anaerobio facultativo, Gram negativo, que presenta flagelos peritricos y que sobrevive a temperaturas que van de los siete a los 40 grados centígrados y puede permanecer viable por semanas, meses y hasta años, en substratos orgánicos, tanto en condiciones de desecación como de congelación. Específicamente *S. choleraesuis*, al contaminar el alimento o el agua puede ocasionar severos brotes con cuadros tanto entéricos como septicémicos, en animales que están desde la etapa de destete hasta los cuatro meses de vida, con una morbilidad y mortalidad alta.

En la presentación entérica se observa diarrea acuosa de color amarillo, sin la presencia de sangre o moco, en las primeras etapas. La duración de la enfermedad en un cerdos oscila entre 3 y 7 días. Los cerdos afectados tienen fiebre, deshidratación y disminución en el consumo de alimento. Las lesiones que se observan son tiflitis y colitis necróticas tanto focal como difusa, con extensión hacia el intestino delgado ocasionalmente. En la forma septicémica se observa muerte súbita en los casos agudos, además de fiebre, inapetencia, dificultad de movimientos, y en ocasiones cuadros de tos. Las lesiones en esta forma de presentación son: cianosis en varias partes del cuerpo, congestión e infartos en la mucosa fúndica, esplenomegalia, hepatomegalia con focos de necrosis e inflamación de los linfonódulos mesentéricos (Wilcock y Schwartz, 1992). El diagnóstico se confirma por medio de exámenes microbiológicos e histopatológicos, especialmente del hígado, íleon, bazo, linfonódulos mesentéricos y médula ósea; en el caso

de los estudios microbiológicos, debe asegurarse de que se realicen en animales no tratados para evitar resultados falsos negativos (McDonough y Simpson, 1996).

Escherichia coli es un bacilo, Gram negativo, no esporulado, anaerobio facultativo, que presenta flagelos peritricos de longitud variable; *E. coli* se distribuye por contaminación fecal. Periodos largos de sobrevivencia en el medio ambiente son promovidos por factores como temperaturas bajas y presencia de humedad y se ha comprobado que mantiene su viabilidad en excrementos de cerdos por períodos de entre 5 y 11 semanas (Bertschinger, *et al.*, 1992; Falkow, 1996). Esta bacteria está ampliamente distribuida en las granjas porcinas donde las hembras adultas tienen una sólida inmunidad que transmiten a los lechones por medio del calostro. Sin embargo, la circulación o entrada de nuevas cepas de *E. coli* enterotoxigénicas puede originar la presentación de brotes de diarrea neonatal, en camadas de hembras no expuestas anteriormente; en el caso de cepas con la toxina SLT(Shiga Like Toxin) se presentan brotes de la Enfermedad del Edema en cerdos después del destete; también se reportan cuadros de mastitis en hembras recién paridas (Bertschinger *et al.*, 1992; Taylor 1995).

La forma de presentación mas extendida de la enfermedad, es la diarrea neonatal, causada por cepas que producen una o más enterotoxinas y que se han denominado enterotoxigénicas; estas cepas se adhieren al intestino por medio de adhesinas fimbriales (por ejemplo, F4, F5, F6, F41.), colonizan el intestino delgado y producen una o más enterotoxinas, como: STa, STb, o LT las cuales originan una mayor excreción de Cl, Na, HCO₃ y agua hacia el lumen intestinal (Bertschinger *et al.*, 1992; O'Brian y Holmes, 1996).

En los casos de diarrea neonatal, desde dos o tres horas después del nacimiento, se observa la presentación del cuadro con diarrea profusa de color variable, acompañada ocasionalmente de vómito, con marcada deshidratación, depresión y pérdida de condición corporal. Las principales lesiones observadas son: dilatación gástrica, presencia de leche o alimento sin digerir en estómago, infartos venosos en la curvatura mayor del estómago y

dilatación y congestión en intestino delgado. El diagnóstico se confirma en el laboratorio con el aislamiento y tipificación del agente o de alguno de sus mecanismos de patogenicidad (Bertschinger *et al.*, 1992).

Dentro de los virus que sobreviven en las heces resalta el de la Enfermedad de Aujeszky, el cual origina fuertes pérdidas por mortalidad de lechones recién nacidos, complicaciones respiratorias en cerdos de engorda y falla en la reproducción de los animales del pie de cría (Kluge *et al.*, 1992). En nuestro país la Enfermedad de Aujeszky está sujeta a la Campaña Nacional de Erradicación, debido a su importancia económica.

El virus de la Enfermedad de Aujeszky es un Herpes virus, de la subfamilia Alphavirus, con un genoma DNA lineal, envuelto por una nucleocápside de 95 a 105 nanómetros (nm) de espesor y un tamaño total de 150 a 180 nm. La envoltura tienen al menos nueve proteínas estructurales con pesos moleculares que van de 50 a 130 kilodaltons, de las cuales ocho son consideradas glicoproteínas. Produce efecto citopático y no aglutina eritrocitos de ninguna especie (Roizman y Spear, 1973; Kluge *et al.*, 1992; Mengeling *et al.*, 1997).

La enfermedad se presenta con un cuadro nervioso en cerdos de diferentes edades, con 100% de mortalidad en lechones de menos de dos semanas de vida; frecuentemente se asocia a problemas respiratorios en cerdos de mayor edad. En el caso de las cerdas reproductoras, origina repeticiones por mortalidad embrionaria, abortos, el nacimiento de momias y de camadas con pocos lechones. Las principales lesiones son: tonsilitis necrótica, focos de necrosis en hígado y microscópicamente meningoencefalitis no supurativa, ganglioneuritis, necrosis neuronal y cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos. El diagnóstico se confirma por inmunofluorescencia directa a partir de encéfalo y por aislamiento viral a partir de encéfalo, bazo, pulmón y por histopatología (Kluge *et al.*, 1992; Taylor, 1995).

Otro virus que se disemina por las heces es el Rubulavirus porcino causante de la Enfermedad del Ojo Azul, que se ha presentado en diferentes estados de la zona central de México, originando mortalidad en lechones, falla reproductivas en las hembras, orquítis y epididimitis en los verracos (Correa *et al.*, 1986; Stephano, 1992, Correa *et al.*, 1998).

Este agente es un virus RNA de 135 por 250 nm., pleomórfico, envuelto, con un virión que esta constituido por seis proteínas; el virus aglutina eritrocitos de diferentes especies y produce efecto citopático en diferentes líneas celulares (Stephano y Gay 1986; Stephano *et al.*, 1986; Sundvist *et al.*, 1990).

Los signos clínicos de la enfermedad son variables y dependen de la edad de los animales afectados. La enfermedad en los lechones afecta a animales de 2 a 15 días de vida alcanzando 100% de mortalidad en algunos casos, y cursa con signos nerviosos, tales como: ataxia, debilidad, rigidez, tremor muscular, opacidad corneal, posturas anormales y muerte en 48 horas; en cerdos de mayor edad los signos son menos severos y los porcentajes de mortalidad disminuyen. En las hembras reproductoras ocasiona un incremento en el porcentaje de repeticiones, un aumento en la cantidad de lechones nacidos muertos y de fetos momificados. En los sementales produce daño a nivel testicular (Allen *et al.*, 1996; Ramírez, 1998; Stephano, 1985; Stephano, 1992). Las lesiones macroscópicas se resumen en congestión cerebral, aumento del fluido cerebro espinal, opacidad corneal, orquítis y epididimitis con o sin granulomas. El diagnóstico se realiza por medio del aislamiento viral, inmunofluorescencia y pruebas serológicas, principalmente por inhibición de la hemoaglutinación (Stephano, 1992; Ramírez, 1998).

El uso de ensilaje de heces de cerdo para la alimentación animal permite disminuir los costos por concepto de alimentación y los efectos adversos sobre el medio ambiente ocasionados por el desecho de dichas excretas; sin embargo, esta forma de empleo de las heces puede implicar un riesgo de transmisión de agentes infecciosos patógenos para las granjas porcinas y para otras operaciones pecuarias.

La escasa investigación realizada sobre el tiempo de sobrevivencia de agentes infecciosos bacterianos y virales en los ensilados de la fracción sólida de heces de cerdo, justifica la realización de estudios sobre dichos aspectos, en particular si se considera el riesgo potencial de transmisión de enfermedades al emplear los ensilados en la alimentación animal.

HIPÓTESIS.

Las poblaciones de bacterias y virus potencialmente patógenos en los ensilados a base de excretas de cerdo, sorgo y melaza, disminuyen paulatinamente al aumentar el tiempo de ensilaje.

OBJETIVOS.

1.- Realizar una caracterización microbiológica de las excretas, de la granja porcina de donde se obtuvo la materia prima para la preparación de los ensilados, antes y después de la separación de sólidos.

2.- Determinar la sobrevivencia y el título de *Escherichia coli* y *Salmonella choleraesuis* a diferentes tiempos de ensilaje.

3.- Determinar la sobrevivencia y el título del virus de la Enfermedad de Aujeszky y del virus de la Enfermedad del Ojo Azul, a diferentes tiempos de ensilaje.

MATERIAL Y MÉTODOS

ETAPA 1- Evaluación sanitaria y microbiológica de las excretas de la granja de donde provienen las heces, para la preparación de los ensilajes.

Esta etapa se realizó en el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) y en el laboratorio de diagnóstico del Departamento de Producción Animal: Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. El CEIEPP tiene 200 hembras reproductoras y los cerdos derivados de su producción al momento del análisis, con un sistema de producción cerrado y una unidad de producción de semen aislada dentro el mismo predio. En esta granja existe una fosa de sedimentación para la retención de las excretas, mismas que después son bombeadas a un separador de sólidos. Los líquidos derivados del proceso se canalizan hacia fosas de almacenamiento y los sólidos se emplean en la alimentación tanto de cerdos como de pequeños rumiantes, en otras unidades de producción de la Facultad.

Muestreo serológico. Con el fin de contar con antecedentes del estado sanitario de la granja, se determinó la presencia de anticuerpos contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky y el virus de la Enfermedad del Ojo Azul; para lo cual se llevó a cabo un muestreo, con base en la metodología citada por DiGiacomo y Koepsell (1986) y Carpenter y Gardner (1996), a partir de un total de 30 cerdos de diferentes edades.

Con base en el método propuesto por Morilla (1997) los 30 animales se dividieron en:

- Diez hembras reproductoras.
- Cinco hembras de reemplazo.
- Cinco cerdos de destete.

- Cinco cerdos de entre tres y cuatro meses.
- Cinco cerdos de entre cinco y seis meses.

Muestreo de excretas - Se colectaron un total de 100 muestras divididas de la siguiente forma:

- Cinco muestras tomadas directamente de los líquidos provenientes del separador de sólidos.
- Cinco muestras tomadas de los sólidos obtenidos a partir del separador de sólidos.
- Cinco muestras obtenida a partir de la fosa de sedimentación a un metro de profundidad.
- Cinco muestras obtenidas a partir de la fosa de sedimentación en la superficie.
- Cinco muestras obtenidas de la fosa de almacenamiento de líquidos separados.
- Cinco muestras de hembras lactantes de cada sala de maternidad (tres salas, con un total de 15 muestras).
- Cinco muestras de cada sala de destete (cinco salas, con un total de 25 muestras).
- Cinco muestras de cada caseta de engorda (cuatro casetas, con un total de 20 muestras).
- Cinco muestras de cada caseta de gestación (dos casetas, con un total de 10 muestras).
- Cinco muestras de las cerdas de reemplazo.

En el caso de los líquidos provenientes directamente del separador de sólidos se tomaron cinco muestras de 10 ml a intervalos de cinco minutos entre cada una; de la fosa de sedimentación se obtuvo la cantidad de 10 ml en cinco puntos diferentes, a dos niveles: en la superficie y a un metro de profundidad; cabe señalar que en el momento de la colección, la fosa de sedimentación, que es de forma cónica, tenía material hasta 2.0 metros de altura, a partir del fondo. Con el material de las cinco colecciones (50 ml) se realizó una

mezcla de la cual solo se usaron 15 ml, mismos que representaron una muestra. Para la recolección de las muestras se emplearon frascos de vidrio con capacidad de 100 ml, que habían sido esterilizados previamente.

En el caso de los sólidos se colectaron 10 gramos en cinco puntos del depósito, realizando una mezcla en forma semejante a como fue hecho con los líquidos. Los sólidos al salir del separador son captados en un carretilla y no tienen contacto con el suelo. Para la recolección de los sólidos se usaron bolsas de plástico con capacidad de 0.5 kg.

En cada una de las casetas ocupadas de las diferentes áreas de la granja, se recolectó una muestra fecal directa, de 10 gramos a partir del recto de cinco animales, ubicados cada uno en corrales diferentes; para la toma de la muestra de los animales se estimuló el reflejo de defecación a nivel anal y al producirse la defecación las heces se recibieron en una bolsa de plástico. Con una cuchara de plástico desechable para las heces de cada animal, se tomaron a partir de la bolsa de plástico 10 gramos, los cuales se depositaron en un frasco de vidrio igual a los usados para la recolección del material líquido de las fosas, empleando un frasco para las heces de los cinco animales de cada caseta (Ej. maternidad 2, destete 1, etc.); posteriormente dentro del frasco se hizo el mezclado de las heces, empleando otra cuchara de plástico desechable, utilizando de la mezcla de cada frasco solo 15 gramos, lo que representó una muestra por cada caseta.

A partir de cada muestra se intentó el aislamiento, la identificación y la cuantificación de *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*, así como de los virus de la Enfermedad de Aujeszky y de la Enfermedad del Ojo Azul, con el fin de conocer su presencia y título en las heces que se emplearon en la preparación de los silos, en la segunda etapa del experimento. Además, a partir de las muestras de las diferentes áreas de la granja, se realizó la identificación de otras bacterias Gram negativas.

Como base para conocer la carga de enterobacterias en el material a ensilar en la segunda etapa del experimento se obtuvo la cuenta de enterobacterias tanto de todas las muestras como por área de la granja, esto último con el fin de saber si en alguna de las áreas de la granja se eliminaba alguno de los agentes que posteriormente se inocularían.

Todas las muestras fueron transportadas en cajas de unicel con refrigerantes y el tiempo entre la toma de la muestra y su procesamiento fue menor de dos horas y media.

Al final de esta etapa se realizó la descripción de los hallazgos serológicos, aislamiento bacteriano y aislamiento viral.

Análisis estadístico. Se realizó una comparación entre las medias de las unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/gr) de las muestras tomadas de las áreas de manejo de excretas y de las muestras tomadas directamente de los animales en cada área de la granja. Para lo cual se transformaron los datos, obteniendo el logaritmo base 10 y se llevó a cabo un análisis de varianza en un diseño completamente al azar y comparando las medias por una prueba de Tukey, por medio del paquete estadístico SAS (Statistic Analysis System, 1988).

ETAPA 2- Preparación e inoculación de los microsilos.

La segunda etapa del experimento se realizó en los Departamentos de Bioquímica y Nutrición y en el de Producción Animal: Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A partir de los sólidos obtenidos de la separación, se prepararon microsilos con sorgo y melaza, en frascos de plástico con una capacidad de 0.5 kg (de grano molido), de 13 centímetros de altura y siete de diámetro, con tapa rosca a la medida (Envases de Plástico, México D.F. cat. b15)

El material a ensilar contenía un 10 % de sorgo molido, 82 % de excretas sólidas y 8 % de melaza, esta mezcla se hizo en forma manual preparando un total de 70 kg. de mezcla, con 57.4 kg de heces, 5.6 kg de melaza y 7.0 kg de sorgo molido (Hernández, 1997).

Una vez terminada la mezcla se procedió al llenado y compactado de los frascos, para lo cual se fueron colocando capas de 3 cm de espesor, compactando la mezcla con una botella de fondo plano, siguiendo esta secuencia hasta que el frasco estaba lleno y compactado hasta el borde.

Al final se pesaron los frascos encontrando que la variación entre el más pesado y el más ligero fue de 12 gramos (0.596 gr contra 0.584 gr). El pH de la mezcla fue de 6.0.

Una vez terminado el llenado de los frascos y realizado el compactado se distribuyeron al azar y se inocularon con 2 ml. de un cultivo conteniendo 1×10^7 UFC/ml de *Salmonella choleraesuis* y de *Escherichia coli* utilizando una jeringa de cinco mililitros (Becton Dickinson de México) y una aguja de calibre 20 y de dos pulgadas de largo, depositando el inóculo a la mitad del frasco, antes de cerrar y sellar el frasco se volvió a compactar la mezcla en la superficie del frasco; es importante señalar que cada agente se inoculó en frascos diferentes.

El cultivo de *Salmonella choleraesuis*, fue obtenido a partir de una donación del Centro de Investigación de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, y el de *Escherichia coli* serotipo F4, o149, k91, h10, por una donación de la Universidad Autónoma de Yucatán, de una cepa proveniente del centro de referencia de la Universidad del Estado de Pennsylvania, USA.

Siguiendo el mismo procedimiento se inocularon con 5 ml conteniendo $1 \times 10^{7.57}$ UFP por ml. del virus de la Enfermedad de Aujeszky y 5 ml. con $1 \times 10^{6.94}$ dosis infectantes por cultivos celulares ($DICC_{50\%}/50$ ml), del virus de la Enfermedad del Ojo Azul, de igual forma cada virus a se inoculó en frascos diferentes.

Todos los agentes virales antes mencionados provienen del cepario del Departamento de Producción Animal: Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la UNAM. Para llevar a cabo el proceso de inoculación, todos los agentes fueron protegidos con albúmina bovina al 0.2 % (Sigma Chemical, St. Louis, USA. cat.a-3350), como preservador orgánico.

Una vez inoculados los frascos de plástico, se cerraron con tapas de rosca, a las cuales se les adaptó en la parte central un tapón de hule a manera de válvula (Figura 1), se sellaron en todo el borde y alrededor del tapón con silicona (Sista, Henkel Mexicana. Cat 1629) y se realizó el vacío, extrayendo el aire a través de la válvula de hule, por medio de

una aguja desechable de calibre 22, de una pulgada de largo, la cual fue adaptada a una manguera de hule que se conectó a una bomba de vacío (Curtis Mathison Scientific, Michigan, USA), alcanzando un vacío de 400 mm de mercurio por 30 segundos.

Se inocularon 15 microsilos con cada agente infeccioso y se incubaron a temperatura de laboratorio (15 a 20 grados centígrados), durante cinco tiempos de ensilaje (0, 7, 14, 28 y 56 días), con tres repeticiones cada uno, tal y como se representa en el cuadro 3. Los silos se denominaron de acuerdo al agente infeccioso inoculado de la siguiente forma: microsilos inoculados con *E. coli* (EC), microsilos inoculados con *S. choleraesuis* (SC), microsilos inoculados con el virus de la Enfermedad de Aujeszky (EA) y microsilos inoculados con el virus de la Enfermedad del Ojo Azul (OA). Además, para cada tiempo de ensilaje se contó con seis silos no inoculados, que fungieron como controles negativos, tres para los inoculos bacterianos (CB) y tres para los inoculos virales (CV).

Cuadro 2.- Distribución de microsilos por agente inoculado y tiempo de fermentación.

Agente inoculado/	Días de ensilaje				
	0	7	14	28	56
EC	3	3	3	3	3
SC	3	3	3	3	3
CB	3	3	3	3	3
EA	3	3	3	3	3
OA	3	3	3	3	3
CV	3	3	3	3	3

EC = Microsilos inoculado con *Escherichia coli*.

SC = Microsilos inoculado con *Salmonella choleraesuis*.

CB = Microsilos sin inocular que fungieron como control para EC y SC.

EA = Microsilos inoculados con EA.

OA = Microsilos inoculados con EOA.

CV = Microsilos sin inocular que fungieron como controles para EA y OA.

En condiciones normales de operación, el lapso máximo que se permite para la fermentación es de dos meses aproximadamente, de ahí que se escogió como tiempo máximo de fermentación 56 días.

A partir de la misma mezcla se llenaron otros 18 frascos, los cuales fueron inoculados con los mismos agentes y a las mismas dosis, pero sin ser sometidos al proceso de ensilaje (NS), fungiendo como controles positivos; a partir de estos se realizó el aislamiento y titulación de los diferentes agentes etiológicos inoculados, una vez transcurridos 28 días.

Al final del tiempo de fermentación se abrió cada microsilo, se determinó el color y olor del material ensilado y la presencia de hongos en la superficie del silo; posteriormente, se desecharon los primeros cinco centímetros de espesor del material ensilado, con una espátula estéril, tomando una muestra de 20 gramos para el aislamiento y cuantificación bacteriológica y virológica y se midió el pH con un potenciómetro (Hanna Instruments, USA Cat. 8520).

De cada microsilo sólo se intentó identificar y cuantificar el agente etiológico inoculado inicialmente.

Identificación bacteriológica.

Para ambas etapas el aislamiento bacteriológico se llevó a cabo de la siguiente forma, para cada agente:

Salmonella choleraesuis: Se tomaron 15 gr de muestra de cada microsilo para mezclarse con 45 ml de caldo tetrionato (Caldo Base Tetrionato, Merck, Darmstad, Germany. Cat. 041v891085); esta suspensión se incubó por 72 horas a 36 grados centígrados en una incubadora bacteriológica (Incubadora Blue, Revco Cientific, Ashville

USA. Cat. 4M18); cada 24 horas se realizó una resiembra en agar Salmonella-Shigella (SS) (DIFCO, Detroit, USA Cat. 0074-17) y en agar Verde Brillante (VB) (Merck, Darmstad, Alemania. Cat. 7232), volviéndose a incubar por el mismo tiempo y a la misma temperatura. A las colonias sugestivas de ser no fermentadoras de la lactosa se les realizó una bioquímica, sembrándolas en Agar Hierro Tres Azúcares (TSI) (Merck, Cat. 3109), Medio de SIM (Merck, Cat. 5470), Agar Citrato de Simmons (Merck, Cat. 3653654), en Urea (Becton-Dickinson de México. Cat. 214-1) y en los azúcares Malonato, Arabinosa y Trealosa; incubándolas por 24 horas (Carter, 1979) y registrando los datos en un formato de identificación bacteriana (Anexo 1). A partir de las colonias que correspondieron a *Salmonella choleraesuis*, se realizó una prueba serológica (Bacto Salmonella O Antiserum Group C1, Factors 6,7. Difco Laboratories. Cat. 2949-47-5), para confirmar su identificación

Escherichia coli.- Se sembró un gramo de muestra en agar MacConkey (Bioxon, México, Cat. 109) y se incubó a 36 grados centígrados por 24 horas. La identidad de la bacteria fue confirmada por la morfología de las colonias, realizando una tinción de Gram y utilizando pruebas bioquímicas, por medio de un kit para la identificación *in vitro* de enterobacterias y otras bacterias Gram negativas (API 20E, Biomeriux, France. Cat. 20100) (Anexo 2).

Para la identificación del serotipo se realizó una prueba de aglutinación en placa, empleando antisueros donados por Bayer de México S.A.

Las condiciones de cultivo se pueden resumir en el Cuadro 3.

Cuadro 3.- Condiciones para el cultivo bacteriano.

Organismo	Medio de cultivo	Tipo de Atmósfera	Temperatur a (°C)	Tiempo de incubación (hrs.)
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Caldo tetrionato	aeróbica	36	24
<i>Escherichia coli</i>	Agar MacConkey	aeróbica	36	24

Adaptado de Pradal, (1994).

Para realizar el conteo de enterobacterias existentes en la muestra, se hicieron diluciones décuples seriadas, colocando un gramo de muestra en nueve mililitros de solución salina fisiológica estéril (Cloruro de Sodio 10 %, J.T. Baker de México Cat. M-36301) a la que se le ajustó el pH a 7.0, homogeneizándolas en una agitador (Vortex Genie 2 Scientific Industries, USA. Cat. 6560) y transfiriendo un mililitro a otro tubo para hacer la dilución siguiente, y así sucesivamente. A partir de cada dilución se tomaron 50 microlitros y se sembraron en el medio de agar MacConkey incubándose a 37 grados centígrados por 24 horas y registrando posteriormente el número de unidades formadoras de colonias por gr (UFC/gr), según el método de conteo en plato descrito por Milles (Henry *et al.*, 1983).

Con el fin de confirmar la sobrevivencia de otras bacterias en los microsilos, a partir de la mismas diluciones se sembraron 50 microlitros en cajas de gelosa sangre (Base de Agar Sangre, Bioxon, México. Cat. 201), se incubaron a 37 grados centígrados por 24 horas y se registró el número de UFC/gr, por el mismo método.

Identificación viral.

Se tomaron dos gramos de muestra a la cual se le adicionaron 3 ml de medio para cultivo celular (MEM) (Sigma Aldrich, Cat. M0643); posteriormente se procedió a inocular el sobrenadante en placas de 24 pozos (In Vitro, México. Cat. 143982), conteniendo monoestratos celulares específicos para cada agente viral: para el virus de la Enfermedad del Ojo Azul se usaron monocapas de células de riñón de mono verde africano (VERO), y para el virus de la Enfermedad de Aujeszky se emplearon células de riñón de bovino (MDBK). En cada placa de 24 pozos se colocó un control positivo, uno negativo y un control de células.

Una vez inoculadas las monocapas se incubaron durante 90 minutos a 37 grados centígrados (Incubadora Nabco Controlled Enviroment, Portland, USA. Cat. 4100), posteriormente se congelaron a menos 70 grados centígrados por 24 horas; se descongelaron y se centrifugaron a 2000 r.p.m. (Centrifuga, Dreher, Alemania s/catálogo), por 10 minutos, para obtener el sobrenadante.

Los sobrenadantes obtenidos se filtraron a través de una membrana con poro de 0.22 micras de diámetro (Millipore Cat. GSWPO2500), para posteriormente inocularse de nuevo en placas de 24 pozos, con los monoestratos previamente mencionados, los cuales tenían MEM con 2 % de suero fetal bovino.

A continuación se incubaron por 90 minutos, se decantó el medio y se les colocó en medio de mantenimiento (99% MEM y 1% de suero fetal bovino). Los monoestratos fueron revisados cada 24 horas durante tres días (Maes *et al.*, 1979); una vez transcurridas 72 horas de la inoculación, se retiraron los sobrenadantes y se fijaron las células con alcohol anhidro (J.T. Baker, México. Cat. 9000-02), con el fin de evaluar el efecto citopático en las células MBDK.

A partir de los sobrenadantes obtenidos de las placas que contenían las células VERO previamente inoculadas se realizó la prueba de hemaglutinación para determinar la presencia de agentes hemoaglutinantes; a partir de cada sobrenadante se tomaron 50 microlitros y se realizaron 12 diluciones dobles con solución salina buferada fosfatada (SSB) en placas de 96 pozos con fondo en "u" (In Vitro, México. Cat. 167008); posteriormente se agregaron glóbulos rojos de bovino diluidos al 0.5 % en SSB; en cada placa se utilizó una suspensión de virus control positivo y un control de eritrocitos, y de cada muestra se realizaron dos diluciones (Snyder *et al.*, 1982; Ramírez *et al.*, 1996).

A partir de las placas con células MBDK, previamente inoculadas, se tomó el sobrenadante para identificar al virus de la Enfermedad de Aujeszky, por medio de la técnica de hemoaglutinación pasiva, incluyendo controles con sueros conocidos positivos y negativos, además de glóbulos rojos de ovino normales, tanizados y sensibilizados al 2%. Para realizar la prueba, previamente se lavaron tres veces los glóbulos rojos de ovino con SSB, a un pH 7.2, centrifugando a 1000 revoluciones por minuto, por 10 minutos. Se agregaron volúmenes iguales de glóbulos rojos en SSB pH 7.2 y de una solución de ácido tánico 1:80,000, y se lavaron tres veces en la forma antes citada. Se resuspendieron con SSB (pH 6.4). Se preparó el antígeno a una concentración de 1:400 usando como diluyente SSB (pH 6.4). Se colocaron volúmenes iguales de glóbulos rojos tanizados y de un antisuero específico preparado en cerdos; se incubaron 15 minutos a 37 grados centígrados y se lavaron tres veces con SSB (pH 7.2) a 1000 revoluciones por minuto por 10 minutos y se resuspendieron los glóbulos rojos sensibilizados, a una concentración de 2 % en la solución de suero normal de conejo al 1% (Dhinakar, *et al.*, 1995; Nachimuthu *et al.*, 1995; Shaw *et al.*, 1995).

Posteriormente se emplearon 0.02 ml de cada sobrenadante y se agregaron a 0.01 ml de glóbulos rojos de ovino normales, al 50%. Se incubaron 30 minutos a 37 grados centígrados y a continuación se centrifugaron a 1000 revoluciones por minuto. A continuación, empleando placas de 96 pozos con fondo en "u" se transfirieron 0.05 ml de suero normal de conejo al 1% en toda la placa, que fue usada en forma vertical. Paso

seguido, se colocaron 0.05 ml de los sobrenadantes en los pozos de la línea 1. Se hicieron 12 diluciones dobles pipeteando siete veces en cada pozo y al final se desecharon 0.05 ml. Se adicionaron 0.05 ml de glóbulos rojos de ovino sensibilizados al 2% conjugados al antisuero en toda la placa y esta fue leída después de dos horas de incubación (Dhinakar, et al., 1995; Nachimuthu *et al.*, 1995; Shaw et al., 1995). Se consideraron como positivos a aquellos sobrenadantes donde se encontró aglutinación en una dilución de 1:8.

A partir de los monoestratos de células VERO previamente inoculados con el material de los microsilos, se realizó una prueba de inmunofluorescencia indirecta, tanto para la identificación del virus de la Enfermedad de Aujeszky, como para el virus de la Enfermedad del Ojo Azul. En cada pozo se aplicaron 0.05 ml de albúmina sérica bovina, se lavó tres veces con SSB y se aplicó el primer anticuerpo, que en este caso fueron anticuerpos de cerdos contra cada uno de los virus, respectivamente; se incubó por 45 minutos y se volvió a lavar con SSB; posteriormente se agregó el conjugado (AntiPig-FITC Conjugated, Sigma Diagnostics, St. Louis, USA. Cat. F4762) se incubó por otros 45 minutos y se lavó con agua destilada; a continuación se le agregaron 0.02 ml de azul de Evans (Sigma Diagnostic, St. Louis USA. Cat. e0133) y se observó en un microscopio de fluorescencia invertido (Olimpus IX70, Tokio s/cat.) (Buerleson *et al.*, 1992).

Como una técnica de apoyo para la identificación viral, se tomó una muestra de un gramo de cada frasco, previamente inoculado con el mismo virus a los días 0, 7 y 14 posinoculación, para intentar la identificación de los virus inoculados por medio de la microscopía electrónica de transmisión, misma que se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Además, se tomó una muestra de cada inóculo viral como patrón de referencia para la observación en el microscopio electrónico.

Análisis estadístico.

Para el análisis de la sobrevivencia de las enterobacterias y virus inoculados a los microsilos a los diferentes tiempos de ensilaje, se utilizó estadística descriptiva, ya que el no encontrarse datos de crecimiento de enterobacterias en ningún tiempo de ensilaje, impide la realización de cualquier análisis.

Para el análisis estadístico de las variaciones en el pH se empleó un diseño completamente aleatorizado.

Las diferencias entre medias de pH para cada tiempo de ensilaje e inóculo se analizaron mediante un análisis de varianza y una prueba de Tukey (Gill, 1978), empleando el paquete estadístico S.A.S. (Statistical Analysis System, 1988).

ETAPA 3.- Evaluación de microsilos a intervalos menores de una semana.

Con el fin de determinar el momento preciso de destrucción de los microorganismos evaluados en el presente estudio, se procedió a realizar un ensayo complementario, siguiendo los mismos procedimientos establecidos en la segunda etapa.

Para lo cual se preparó una segunda mezcla de nueve kg con sorgo, heces sólidas y melaza, en las mismas proporciones y se compactó en 15 frascos de la misma forma en que se realizó en la segunda etapa de la investigación.

En este caso se inocularon tres microsilos con cada uno de los agentes etiológicos, con dosis infectantes iguales a las usadas en la etapa anterior, y se intentó el aislamiento bacteriano o viral a los días uno, tres y cinco, después de la inoculación.

Debido a que sólo se contó con una muestra por día de ensilaje y de agente etiológico, sólo se hace la descripción de los hallazgos.

Al tercer día de ensilaje, se tomó una muestra de un gramo de los silos que fueron inoculados con los virus de la Enfermedad de Aujeszky y de la Enfermedad del Ojo Azul, respectivamente, para realizar el estudio de microscopía electrónica de transmisión.

RESULTADOS.

Etapa 1. Evaluación sanitaria y microbiológica de las excretas y de los cerdos de la granja de donde provenían las heces para la preparación de los ensilajes.

Muestras serológicas.

Todos los animales fueron negativos a la presencia de anticuerpos tanto contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky como contra el virus de la Enfermedad del Ojo Azul.

Aislamientos bacteriológicos.

El promedio general del conteo de enterobacterias de todas las muestras tomadas fue de 3.1×10^6 UFC/gr (Cuadro 4).

En la cuenta realizada por área de la granja se encontró la mayor carga en las muestras tomadas de los animales de la engorda 2 y de la gestación 2 con 2×10^8 UFC/gr, y las menores cargas se encontraron en el material de la fosa de sedimentación a nivel de la superficie con 8×10^4 y a un metro de profundidad con 1.6×10^5 seguidas de las muestras de la fosa de almacenamiento de líquidos, de los líquidos obtenidos directamente del separador de sólidos, de la muestra de la maternidad 4 y del destete 5 con 2×10^5 UFC/gr.

Como se observa en el Cuadro 4, se encontró diferencia ($p < 0.05$) entre la carga de enterobacterias del área de manejo de excretas con las muestras del área de gestación ; no se encontraron diferencia entre el área de manejo de excretas con maternidad, destete y engorda, ni entre estas últimas con el área de gestación ($p > 0.05$).

En caso del aislamiento de *Salmonella spp.*, se identificó *Salmonella choleraesuis* a partir de las muestras de los líquidos obtenidos del separador de sólidos y de la engorda número tres.

Cuadro 4.- Título de enterobacterias en las muestras de cada área de la granja.

Área	Muestra	UFC/gr por muestra	Promedio por área	E.E.
Manejo de excretas	Fosa de almacenamiento	2×10^5	9.28×10^5 _a	7.68×10^5
	Líquidos del separador	2×10^5		
	Fosa de sedimentación (1)	1.6×10^5		
	Fosa de sedimentación (2)	8×10^4		
	Sólidos	4×10^6		
Maternidad	Maternidad 2	8×10^7	2.87×10^7 _{ab}	2.56×10^7
	Maternidad 3	6×10^6		
	Maternidad 4	2×10^5		
Destete	Destete 1	4×10^6	6.84×10^6 _{ab}	3.42×10^6
	Destete 2	2×10^7		
	Destete 3	6×10^6		
	Destete 5	2×10^5		
	Destete 6	4×10^6		
Engorda	Engorda 1	2×10^6	5.6×10^7 _{ab}	4.81×10^7
	Engorda 2	2×10^8		
	Engorda 3	2×10^6		
	Engorda 4	2×10^7		
Gestación	Gestación 1	4×10^7	8.66×10^7 _b	5.69×10^7
	Gestación 2	2×10^8		
	Reemplazos	2×10^7		

1 = a un metro de profundidad.

2= a nivel de la superficie.

E.E. = Error estandar.

Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Los agentes bacterianos encontrados en el muestreo a partir de la siembra en agar MacConkey fueron: *Escherichia coli* en once áreas; *Klebsiella aerogenes* en tres áreas; *Klebsiella spp.* en tres áreas; *Pseudomona maltophilia* en dos áreas; *Pseudomona spp.* en cuatro áreas; *Citrobacter koseri* en dos áreas; *Bacillus spp.* en una área; *Salmonella choleraesuis* en dos áreas; y *Proteus mirabilis* en tres áreas. La distribución de aislamientos por áreas de la granja se presenta en el Cuadro 5.

Cuadro 5.- Agentes bacterianos identificados en las muestras de las diferentes áreas de la granja.

Área de la granja	Agentes aislados
Fosa de almacenamiento	<i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Citrobacter koseri</i> .
Líquidos del separador	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomona maltophilia</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i>
Fosa de sedimentación (1)	<i>Klebsiella spp.</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Pseudomona spp.</i> .
Fosa de sedimentación (2)	<i>Citrobacter koseri</i> , <i>E. coli</i> .
Sólidos	<i>E. coli</i> .
Maternidad 2	<i>Proteus mirabilis</i> .
Maternidad 3	<i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Pseudomona spp.</i> .
Maternidad 4	<i>Proteus mirabilis</i> .
Destete 1	<i>E. coli</i> .
Destete 2	<i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> .
Destete 3	<i>Klebsiella spp.</i> , <i>Pseudomona maltophilia</i> .
Destete 5	<i>E. coli</i> .
Destete 6	<i>E. coli</i> .
Engorda 1	<i>E. coli</i> .
Engorda 2	<i>Pseudomona spp.</i> .
Engorda 3	<i>Pseudomona spp.</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> .
Engorda 4	<i>E. coli</i> .
Gestación 1	<i>E. coli</i> , <i>Bacillus spp.</i> .
Gestación 2	<i>Klebsiella spp.</i> .
Reemplazos	<i>E. coli</i> .

Al llevar a cabo la serotipificación de las colonias de *E. coli*, correspondieron al serotipo F41.

Aislamientos virales.

Todas las muestras fueron negativas tanto para el virus de la Enfermedad de Aujeszky como para el virus de la Enfermedad del Ojo Azul.

Etapa 2.- Inoculación de los microsilos.

Características y pH del ensilaje.

Se determinaron condiciones adecuadas de ensilaje, tanto por olor, color y pH, en 88 de los 90 frascos (97.7 %). El promedio general del pH de los frascos ensilados fue de 4.01. En el 85% de los frascos se observó la salida de líquido por el borde del tapón y por la orilla de la tapa de rosca, durante las primeras 72 horas (Figura 1).

A los días siete y catorce, después de la inoculación, todos los microsilos presentaron un proceso de ensilaje adecuado, con el olor y el color característicos de los ensilados. En el día 28 se observó en el microsilo EA2, el crecimiento de hongos, a nivel de la superficie cercana al borde del frasco, sobre un área de un centímetro cuadrado (Figura 2) (Anexo 3).

En los frascos no ensilados (NS) se observó, el día 28 posinoculación, el crecimiento de hongos en toda la superficie y hasta los dos centímetros de profundidad; el promedio de pH en estos frascos fue de 5.02.

A los 56 días posinoculación se observó el crecimiento de hongos en la superficie cercana al borde del frasco en los microsilos SC1, CB1, EA1 y CV1; en los microsilos EA3 y CV2 no existieron condiciones adecuadas de ensilaje y el material encontrado era de color oscuro, con un pH de 5.0 y 4.5, respectivamente (Anexo 3).

Los promedios de pH por días de ensilaje e inóculo se presentan en el Cuadro 6, donde se observa el pH más alto ($p < 0.05$) en los frascos con material no ensilado (NS) que en los microsilos EC, SC, CB, EA y CV en todos los días de ensilaje. No existió diferencia en el pH entre los diferentes lapsos de ensilaje. En el caso de los microsilos OA además de encontrar diferencia entre los frascos NS con los microsilos de los diferentes días de ensilaje, se encontró diferencia entre los microsilos con 7 y 28 días de ensilaje con los de 14 y 56 días ($p < 0.05$).

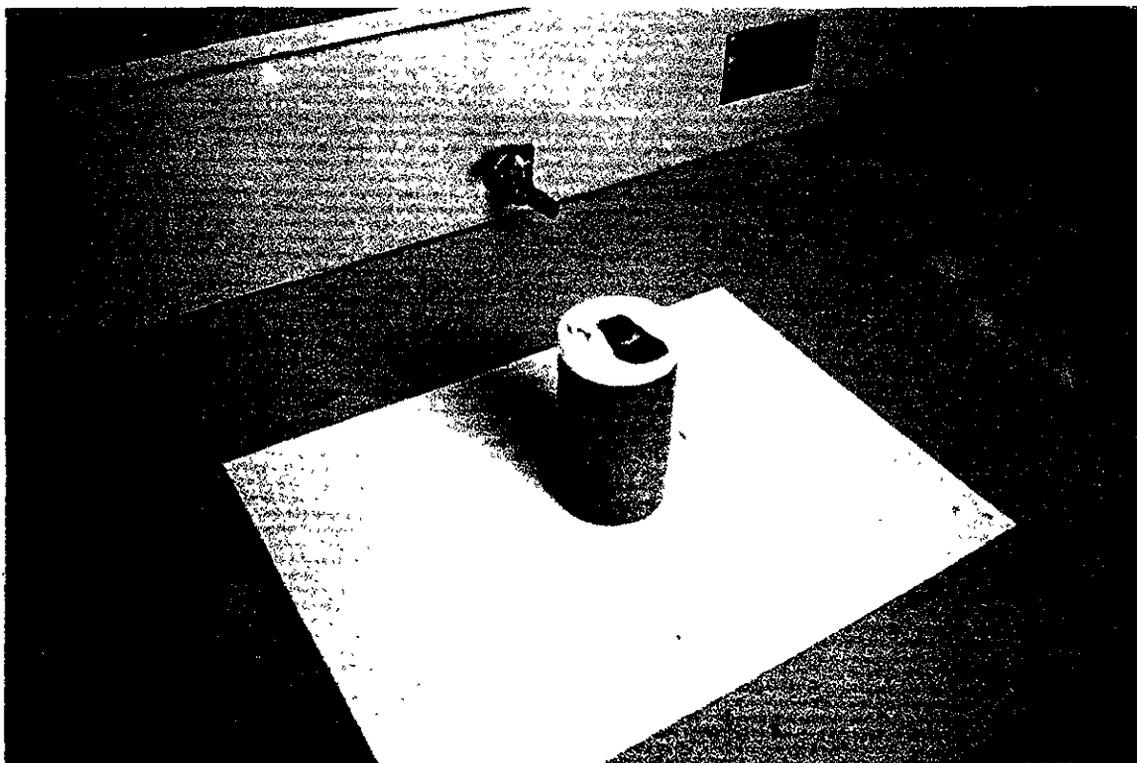


Figura 1.- Frasco de plástico con válvula adaptada en la tapa, donde se observa la salida de líquido por la base del tapón a las 48 horas de ensilaje.



Figura 2.- Frasco con crecimiento de hongos en la superficie a los 28 días de ensilaje.

Cuadro 6.- Promedios del pH por días de ensilaje.

Microsililo	Días de ensilaje										
	7		14		28		28(NS)		56		E.E.
	x	D.S.	x	D.S.	x	D.S.	x	D.S.	x	D.S.	
EC	4.0a	0	4.03a	0.08	3.93a	0.06	5.0b	0.05	4.05a	0.03	0.109
SC	4.0a	0	4.1a	0.05	4.03a	0.03	5.06b	0.06	4.1a	0.05	0.109
CB	3.9a	0.05	4.1a	0.05	3.93a	0.06	5.0b	0	4.2a	0.15	0.111
EA	3.93a	0.13	4.16a	0.03	3.93a	0.06	5.06b	0.06	4.53a	0.25	0.126
OA	3.7a	0.10	4.16b	0.06	3.83a	0.08	5.03c	0.03	4.1b	0.05	0.123
CV	3.9a	0.05	4.1a	0.05	3.93a	0.06	5.0b	0	4.2a	0.15	0.111

EC = Microsilos inoculado con *Escherichia coli*.

SC = Microsilos inoculado con *Salmonella choleraesuis*.

CB = Microsilos sin inocular que fungieron como control para EC y SC.

EA = Microsilos inoculados con virus de la Enfermedad de Aujeszky.

OA = Microsilos inoculados con virus de la Enfermedad del Ojo Azul.

CV = Microsilos sin inocular que fungieron como controles para EA y OA.

X= media.

D. S. =desviación estandar.

E.E.= Error estandar.

NS= Material no ensilado.

Literales diferentes en el mismo renglón indican diferencia ($p < 0.05$)

No existieron diferencias por inóculo ($p > 0.05$).

Identificación bacteriológica.

Los títulos de enterobacterias determinados a partir de muestras de los microsilos a los 60 minutos después de la inoculación, se presentan en el Cuadro 7, donde se puede observar que al día 0, en los silos inoculados con *E. coli* (EC) existió una tendencia a una mayor carga bacteriana, cuando se compara con los microsilos (CB) y los (SC).

La mayor parte de estas colonias eran lactosa positivas, aunque en los controles 2 y 3 se observaron colonias lactosa negativas en las diluciones 3 y 2 respectivamente, mismas que se identificaron como *Pseudomonas spp.*

Al hacer la identificación de las colonias antes citadas se identificó *E. coli* hemolítica en los tres microsilos EC tanto por la prueba de API 20E, como por la realización de las pruebas bioquímicas para enterobacterias; además fue serotipificada por el método de aglutinación, correspondiendo a la cepa inoculada. De estos silos no se aisló *Salmonella choleraesuis*.

En el caso de los microsilos SC se aisló *Salmonella choleraesuis* de los tres silos, la cual, al realizar la prueba serológica correspondió al agente inoculado.

En el caso de los microsilos SC1 y SC2, además se aisló *E. coli* no hemolítica (Anexo 5).

De todos los silos CB se aisló *E. coli* no hemolítica, misma que al realizar la prueba serológica correspondió a un serotipo F41, este serotipo es igual al encontrado en los muestreos realizados en la granja fuente del material, lo cual fue reportado en los resultados de la Etapa 1 de este trabajo. De ninguno de los microsilos CB se aisló *Salmonella choleraesuis*.

A partir del día siete y hasta el día 56, no se encontró crecimiento bacteriano en ninguno de los microsilos evaluados, tanto a partir de las diluciones sembradas en MacConkey, incluso hasta las 96 horas de incubación, así como en los tres pases realizados en SS y VB a partir del caldo tetracionato (Cuadro 7).

Cuadro 7.- Promedio de enterobacterias (UFC/gr) por días de ensilaje.

Microsilo	Días de ensilaje					
	0	7	14	28	28 (NS)	56
EC	2.08x10 ⁸	-	-	-	-	-
SC	2.06x10 ⁷	-	-	-	-	-
CB	7.6x10 ⁵	-	-	-	-	-

EC = Microsilos inoculado con *Escherichia coli*.

SC = Microsilos inoculado con *Salmonella choleraesuis*.

CB = Microsilos sin inocular que fungieron como control para EC y SC.

NS= Material sin ensilar.

0 = 60 minutos después de la inoculación

La cantidad de UFC/gr por microsilo al día 0 se presenta en el Anexo 6.

Identificación viral.

El efecto citopático que se observó en los pozos con células MBDK se presentó en las monocapas inoculadas con el material colectado a los 60 minutos después de la inoculación, tanto en las muestras provenientes de los tres microsilos EA como en las de los tres microsilos OA; no se observó efecto citopático en las monocapas inoculadas con muestras con mayor tiempo de ensilaje (Cuadro 8).

Cuadro 8.- Número de muestras en las que se presentó efecto citopático por tiempo de ensilaje.

Microsilos	Días de ensilaje					
	0	7	14	28	28NS	56
EA	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
OA	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
CV	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

EA = Microsilos inoculados con EA.

OA = Microsilos inoculados con EOA.

CV = Microsilos sin inocular que fungieron como controles para EA y OA.

NS= Material sin ensilar.

0 = 60 minutos después de la inoculación

En lo que se refiere a la inmunofluorescencia, ésta sólo se observó a los 60 minutos después de la inoculación en las tres muestras de los microsilos EA y en dos de los tres microsilos OA. Con respecto a las muestras de los tres microsilos OA a los siete días de ensilaje, se observó en dos de los tres microsilos una fluorescencia muy leve, en comparación con los controles positivos, las cuales se consideraron como inespecíficas por lo que las muestras se reportan como negativas; en las demás muestras no se observó fluorescencia, tal y como se observa en el Cuadro 9.

Cuadro 9.- Número de muestras que presentaron fluorescencia positiva por tiempo de ensilaje.

Microsilos	Días de ensilaje					
	0	7	14	28	28NS	56
EA	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
OA	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
CV	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

EA = Microsilos inoculados con EA.

OA = Microsilos inoculados con EOA.

CV = Microsilos sin inocular que fungieron como controles para EA y OA.

NS= Material sin ensilar.

0 = 60 minutos después de la inoculación

En el caso de la prueba de hemoaglutinación ninguna de las muestras presentó título hemoaglutinante.

En el caso de la prueba de aglutinación pasiva, tampoco se observaron títulos positivos en ninguna de las muestras. Once de las muestras presentaron títulos de 1:2 los cuales se consideraron como inespecíficos, ya que se consideró un título mínimo de 1:8 para dar una muestra como positiva; de estas 11 muestras, siete correspondieron a material de microsilos controles no inoculados.

Los resultados de todas las pruebas de identificación viral en cada microsilo, por días de ensilaje, se puede observar en el Anexo 7.

En cuanto a los estudios de microscopía electrónica, con base en la morfología, solo se pudo observar tanto al virus de la Enfermedad de Aujeszky como al de la Enfermedad del Ojo Azul en las muestras del inóculo y en las muestras tomadas a los 60 minutos posinoculación; no así en las muestras de 7 y 14 días de ensilaje (Figuras 3 a 6).

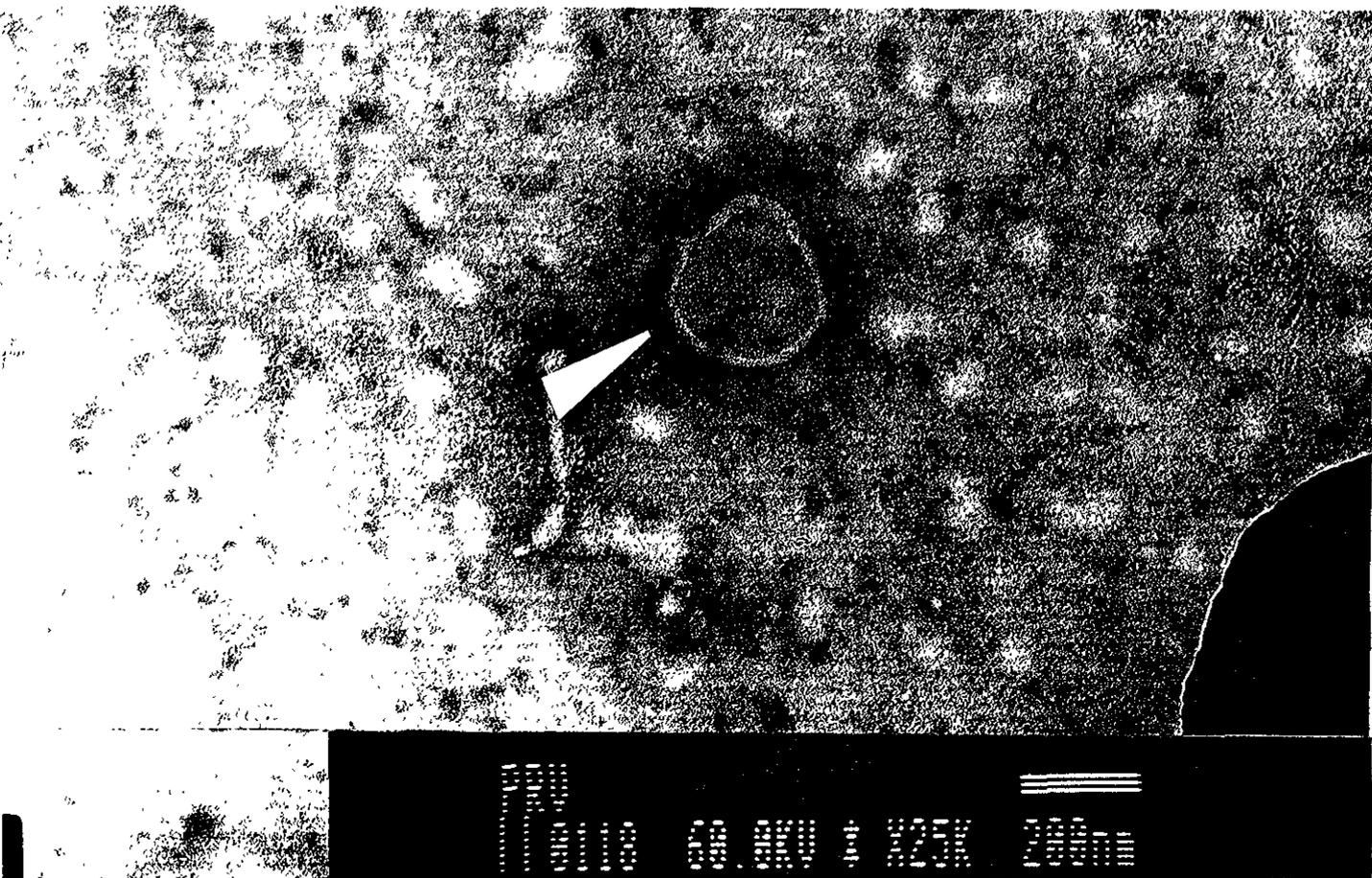


Figura 3.- Herpesvirus observado por microscopía electrónica en una muestra del inóculo original (25,000 X).

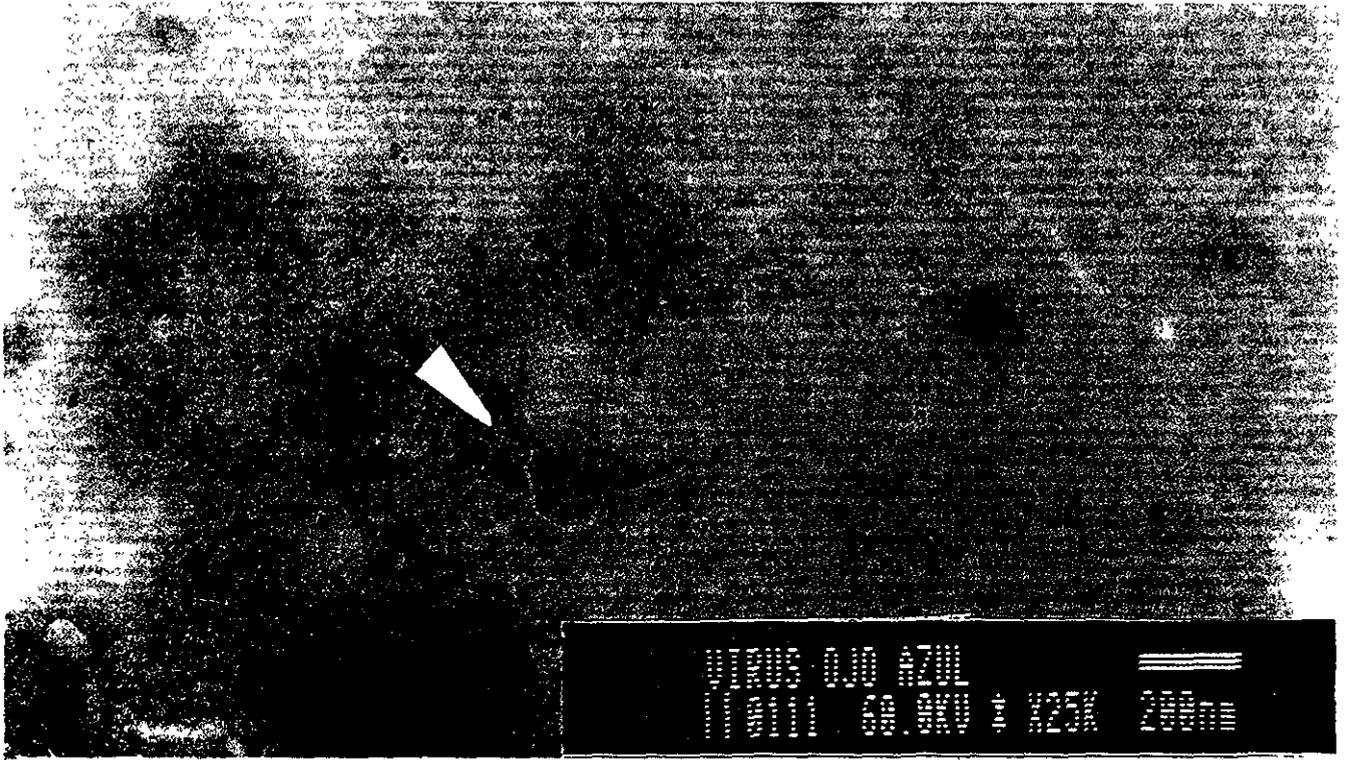


Figura 4.- Rubulavirus porcino observado por microscopía electrónica en una muestra del inóculo (25,000 X).

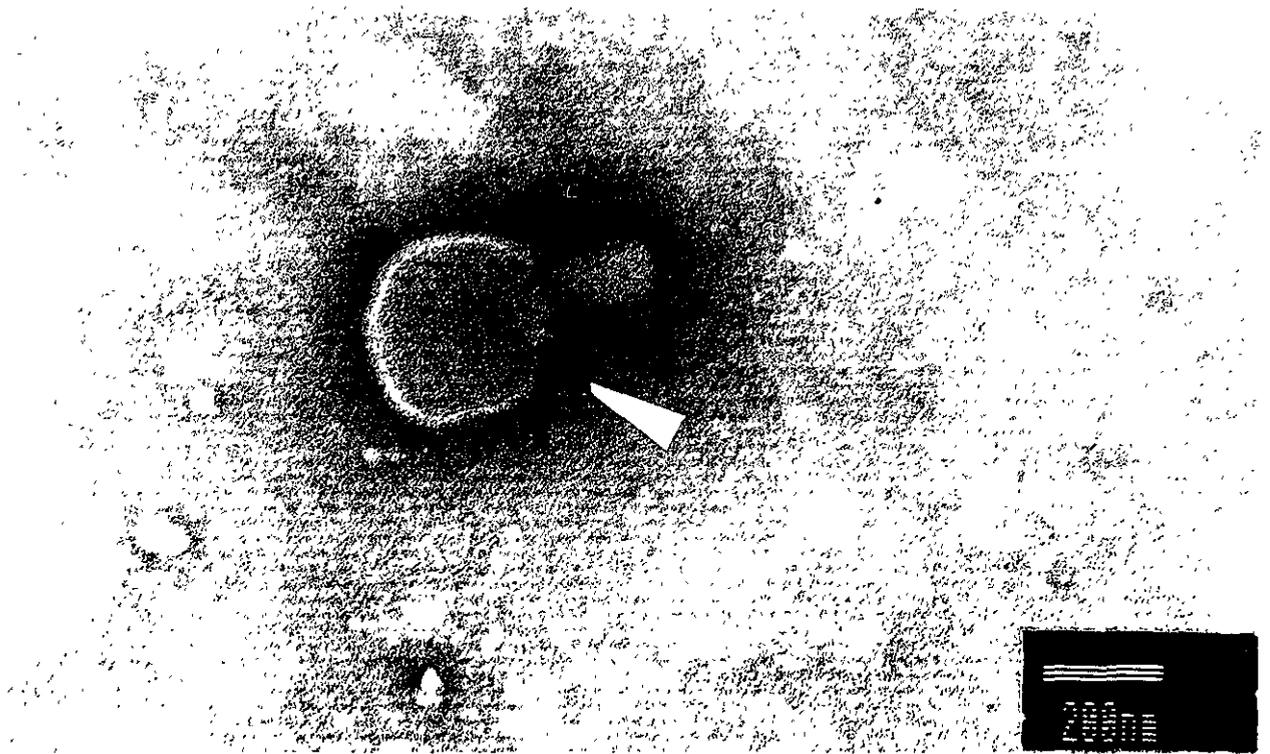


Figura 5.- Herpesvirus observado en una muestra tomada a los 60 minutos después de ser inoculado (25,000 X).

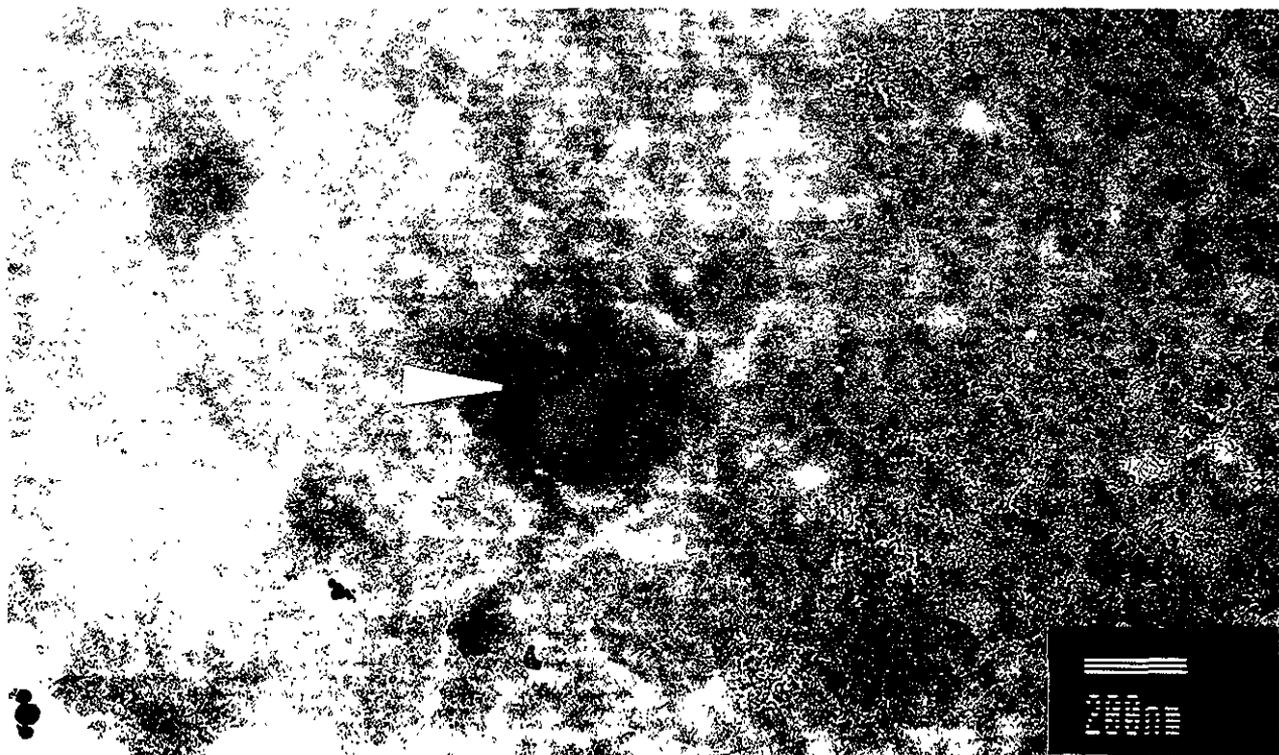


Figura 6.- Rubulavirus porcino observado en una muestra tomada 60 minutos después de ser inoculado (25,000 X).

Etapa 3.- Evaluación de los microsilos a intervalos menores de una semana.

Características y pH del ensilaje.

A las 24 horas de preparados e inoculados los silos, en todos se observó formación de gas y un fuerte olor a excretas de cerdo, sin que el material presentase característica de ensilado. Al tercer día la producción de gas había terminado y el material no presentaba olor a excretas. Al día cinco las condiciones del material fueron muy semejantes a las del día siete de la segunda etapa, existiendo un olor característico del material ensilado. En ningún caso se detectó crecimiento de hongos en la superficie.

El pH de los cuatro microsilos osciló entre 5.5 y 6.0 al día 0, alcanzando un pH de 4.0 al día 3, tal y como se muestra en el cuadro 10.

Cuadro 10.- Medición del pH por inóculo y días de ensilaje, en la tercera etapa.

Microsilo	Días de ensilaje.		
	1	3	5
EC	6.0	4.0	4.0
SC	5.5	4.1	4.0
EA	6.0	4.0	4.0
OA	5.8	4.0	4.0
C	5.8	4.0	4.0

EC = Microsilos inoculado con *Escherichia coli*.

SC = Microsilos inoculado con *Salmonella choleraesuis*.

EA = Microsilos inoculados con EA.

OA = Microsilos inoculados con EOA.

C = Microsilos control.

Aislamiento bacteriano.

A las 24 horas posinoculación se encontró crecimiento de colonias lactosas positivas en los microsilos EC, SC y CB (Cuadro 11); en el microsililo EC se encontró una colonia lactosa negativa en la sexta dilución y en el C en la quinta dilución.

En el microsililo EC se identificaron los dos mismos tipos de *E. coli* encontrados en la segunda etapa del trabajo y al realizar la serotipificación correspondieron al serotipo inoculado y al encontrado en la primera etapa del trabajo.

Del silo SC se aisló *S. choleraesuis*, y a partir del silo C se identificó *E. coli* no hemolítica, serotipo F41.

Al tercer y quinto día después de la inoculación no fue posible aislar *E. coli* ni *S. choleraesuis*.

A partir de las diluciones sembradas en gelosa sangre se encontró carga bacteriana en los tres tiempos de ensilaje (Cuadro 11).

Cuadro 11.- Cantidad de UFC/gr por inóculo y días de ensilaje.

Microsililo	Días de ensilaje		
	1	3	5
EC	4×10^8	-	-
SC	2×10^7	-	-
C	2×10^5	-	-

EC = Microsililos inoculado con *Escherichia coli*.

SC = Microsililos inoculado con *Salmonella choleraesuis*.

C = Microsililos sin inocular que fungieron como control para EC y SC.

Discusión.

El promedio de enterobacterias encontrado en todas las muestras de las diferentes áreas de la granja evaluada en el presente estudio cae dentro del rango reportado por Pradal (1994), quien encontró que al muestrear animales de entre 10 y 12 kg un rango de 10^2 a 10^7 UFC/gr; cabe señalar que el promedio encontrado en el presente estudio incluyó las muestras tomadas de las fosas de sedimentación, almacenamiento, sólidos y líquidos, las cuales presentaron una menor carga de enterobacterias. Si en el presente trabajo únicamente se toman en cuenta las muestras obtenidas directamente de los animales se obtiene un rango de 10^5 a 10^8 UFC/gr, lo que es mayor a lo indicado anteriormente; lo anterior es comprensible pues el muestreo incluyó animales de mayor edad, que tienen una mayor carga bacteriana, pero coincide con Langlois (1978) quien reporta un rango de $10^{5.2}$ a $10^{7.6}$ UfC/gr en animales adultos. Sin embargo, los resultados de lo encontrado en las fosas de almacenamiento y sedimentación difiere con lo reportado por Henry *et al.* (1995) quienes reportan cargas de enterobacterias en fosas anaeróbicas de tres granjas engordadoras, de 4×10^7 a 6×10^7 UFC/gr.

Las cantidades de enterobacterias encontradas en este estudio no disminuyen en las muestras obtenidas en destetes y maternidades con respecto a las de animales de las áreas de engorda y gestación, lo cual difiere con el trabajo realizado por Iñigo *et al.* (1991); especialmente llama la atención en ambos estudios la baja carga bacteriana encontrada en las hembras lactantes y los lechones destetados, lo que puede ser explicado por las normas de manejo sanitario a las que están sometidos dichos animales, especialmente el uso de pisos enrejillados que disminuyen el contacto con las heces; a diferencia de las hembras gestantes y los cerdos de engorda, los cuales están expuestos a ambientes más contaminados por un mayor lapso.

En cuanto a la menor carga bacteriana encontrada en los sistemas de procesamiento y almacenamiento de las heces, con respecto a las muestras tomadas de los animales, los resultados de esta investigación coinciden con algunos autores (Chandler y Craven, 1981; Iñigo *et al.*, 1991; Mateu *et al.*, 1992), quienes encontraron una menor carga de enterobacterias en los depósitos de excretas que en las muestras obtenidas directamente de animales. Para explicar lo anterior existen una serie de factores involucrados, entre ellos están: el uso constante de desinfectantes y la permanencia de residuos de estos en los drenajes de la granja, el proceso de desecación que se da en las excretas en los corrales antes de ser removidas, la dilución que ocurre en los drenajes durante el proceso de arrastre de los sólidos y sobre todo los fenómenos de fermentación y digestión aeróbica y anaeróbica que ocurren en las fosas de sedimentación y almacenamiento, previos al procesamiento, en los cuales existen cambios del pH, temperatura y producción de ácidos grasos volátiles que disminuyen el potencial de sobrevivencia de las bacterias, lo cual se ve incrementado por los tiempos de retención que en algunos casos son prolongados.

En relación a este último aspecto Mateu *et al.* (1992) reportan una disminución de dos logaritmos en la cantidad de enterobacterias encontradas en las muestras de heces líquidas, en lagunas de estabilización, después de diez días de retención; lo cual concuerda con los datos encontrados en este estudio en el que el tiempo de retención va de 7 a 10 días.

Strauch y Ballarini (1991) mencionan que la reducción en la cantidad de bacterias está íntimamente relacionada con la temperatura del material almacenado y con un incremento en la cantidad de sólidos por arriba de un 5%; durante el almacenamiento de las excretas líquidas, el pH cae de un valor de 7.5 a 6.5 y esto origina una disminución de un 90% en la cantidad de enterobacterias. En el presente estudio no se realizó la medición del pH de las fosas de almacenamiento, por lo que es difícil argumentar que en los momentos de muestreo las condiciones eran ácidas, pero el aislamiento de enterobacterias en ellas hace pensar en un pH más alcalino.

Los géneros de bacterias encontrados en las diferentes muestras de excretas, tanto de los animales como las áreas de almacenamiento y procesamiento coincide con la flora que es frecuentemente aislada de las excretas porcinas y que no ocasiona cuadros clínicos de importancia, con excepción de *E. coli* (Iñigo *et al.* 1991; Pradal, 1994; Hernández, 1997).

El haber aislado *S. choleraesuis* de animales en engorda confirma lo reportado por diversos autores (Chandler y Creven, 1981; Strauch y Ballarini, 1991; Plym y Ekesbo, 1993; Wilcox y Schwartz, 1992; Taylor, 1995), en relación a la eliminación de este agente en las heces y establece su presencia en la población muestreada. El no haber aislado *Salmonella choleraesuis* en otras áreas o edades pudo deberse al tamaño de la muestra o bien a una baja incidencia; sin descartar que al ser un problema serio de salud en una piara, cuando aparecen animales afectados son tratados con fuertes dosis de antibióticos, lo que disminuye la cantidad del agente en la población y en el medio.

El aislamiento de *Salmonella choleraesuis* a partir de los líquidos provenientes del separador, confirma su presencia en la granja; y concuerda con Jones (1975) quien reporta el aislamiento de *S. dublin* en heces líquidas almacenadas en fosas de retención; también coincide con Chandler y Caven (1981) quienes aislaron *S. havana* a partir de efluentes porcinos, en una granja sin antecedentes de enfermedad por diez años; y lo mismo sucede con el reporte de Plym y Ekesbo (1993), quienes encontraron que *S. senftenberg* y *S. typhimurium* sobrevivieron en una composta de heces de cerdo por siete días y *S. dublin* por 14 días. Sin embargo, estos últimos autores, reportan que la sobrevivencia de enterobacterias y especialmente de *Salmonella spp.* es mucho más frecuente en las heces sólidas que en las líquidas.

La información anterior confirma lo encontrado por Henry *et al.* (1995) quienes aislaron once serovariedades de *Salmonella spp.* de fosas de almacenamiento de excretas anaeróbicas, facultativas y aeróbicas, así como de efluentes líquidos en tres granjas diferentes, en Australia. Dichos autores argumentan que algunas de las procesos usados en dichas granjas no producen las condiciones de pH suficientes para la eliminación de *Salmonella spp.*.

En el caso de los agentes virales evaluados, el no haber aislado los virus de la Enfermedad de Aujeszky y de la Enfermedad del Ojo Azul, tanto a partir de los animales como de los depósitos de excretas y líquidos, el no haber detectado anticuerpos contra estas enfermedades, la falta de antecedentes de las mismas en la granja desde su inicio en 1992 y el hecho de que la población ha permanecido cerrada a la incorporación de material genético externo, indican que dichos agentes no existen en esa población; más que la existencia de algún tipo de efecto del medio ambiente sobre las heces que cause su inactivación.

No obstante que está esta bien documentado que condiciones adversas, de factores como: temperatura, luz ultravioleta, acidez, calor, otros microorganismos y residuos de desinfectantes originan la inactivación de diversos virus (Cliver y Herrmann, 1972; Ward, 1982, Monteith *et al.*, 1986; Ward *et al.*, 1986; Mateu *et al.*, 1992; Ming y Cliver, 1992; Ming y Cliver, 1995).

Sin embargo, a diferencia de los autores anteriormente citados, Ezzell (1999) menciona que una variedad de virus que infectan el tracto gastrointestinal del humano, como poliovirus y rotavirus, han sido identificados en muestras de aguas oceánicas, tomadas a 1000 metros de profundidad.

En la segunda y tercera fase del experimento, se observó que las condiciones de los microsilos fueron las de una adecuada fermentación, desapareciendo el olor a excretas porcinas y mejorando la textura; coincidiendo con las reportadas por Hernández (1997) y Cabrera (1998), quienes encontraron en los microsilos de excretas porcinas elaborados en envases de plástico de 2.5 kg, un color café, olor ácido, pero no reportan el crecimiento de hongos en la superficie, hasta los 60 días de ensilaje.

La presencia de hongos desde el día 28 de ensilaje en dos frascos y en 6 frascos al día 56, sugieren que a pesar de mantenerlos cerrados y haberlos sellados con silicona, una vez inoculados, hubo entrada de aire contaminado en algunos puntos del borde del frasco. Lo anterior puede explicarse por la fuerte producción de gas que se presentó durante las primeras 72 horas, y ya que los frascos fueron compactados hasta el tope de su capacidad, no quedando espacio para el gas, este último buscó una salida removiendo el silicon en algunos puntos del borde de varios frascos, lo cual facilitó la entrada de aire y el crecimiento de hongos. Esta situación sucede frecuentemente en ensilados de mayor tamaño y no interfiere con el proceso de fermentación, en las partes centrales del silo (García, 1979).

Las características del ensilado y la disminución del pH a 4.0, a las 72 horas de ensilaje en la Etapa 3, indican que los procesos de fermentación y acidificación se desarrollaron correctamente y coinciden con los reportes de Hernández (1997), Cabrera (1998) y Toledo (1998) quienes encontraron los mismos datos de pH que en el presente estudio, y que corresponden al pH que se reporta como satisfactorio para alcanzar una buena calidad en el ensilado (Beck, 1978). Además, las condiciones de olor y color reportadas en este estudio son iguales a aquellas citadas por Iñiguez (1991) y Campadabal y Navarro (1994), cuando se alcanza una adecuada fermentación láctica en los ensilados de excretas porcinas.

El haber encontrado dos silos descompuestos, a los 56 días de ensilaje, pudo deberse: a) que esos frascos no quedaron bien sellados, después de los primeros días posinoculación y permitieron la entrada de aire durante todo el período de ensilaje o bien; b) a que no fueron compactados correctamente desde el momento de introducir la mezcla en ellos; c) a ambas cosas (García, 1979).

Las cantidades de enterobacterias encontradas a los 60 minutos después de la inoculación fueron concordantes con el inóculo empleado, no existiendo prácticamente diferencia entre lo inoculado y lo cuantificado una hora posinoculación. Los microsilos controles presentaron una disminución de 4×10^6 a 7.6×10^5 a los 60 minutos posinoculación, que fue la misma carga de enterobacterias encontrada en los sólidos en la etapa 1 del experimento, y coincide con lo reportado por Hernández (1997) quien encontró 1.6×10^6 a los 60 minutos de ensilaje.

Las cantidades de enterobacterias encontradas al día 0 son ligeramente menores a las halladas por Hernández (1997), que fueron de 2.4×10^7 al muestrear el mismo día. En la tercera etapa del presente estudio, se encontraron al día 1 de ensilaje, cargas de enterobacterias desde 4×10^8 /gr en los microsilos EC, hasta 7×10^5 en los CB; las cuales son muy semejantes a las del día 0.

El aislamiento al día 1 de *E. coli* y *S. choleraesuis* en los microsilos inoculados confirman la eficacia de la inoculación y de las técnicas de aislamiento y cuantificación utilizadas.

El no encontrar crecimiento de enterobacterias desde el día 7 en la segunda Etapa del trabajo y desde el día 3 en la tercera Etapa, coincide con lo reportado por Iñiguez *et al.* (1990), quienes encontraron que después del día siete de ensilaje todos los coliformes fueron totalmente destruidos; estos datos se confirman con lo reportado por Hernández (1997) quien no encontró enterobacterias a los 30 días de ensilaje. Así mismo coincide con

McCaskey *et al.* (1996), quienes reportan la eliminación en cinco días de *E. coli* y *S. typhimurium* inoculados en ensilajes a base de contenido ruminal, maíz, heno de alfalfa, cáscara de semilla de algodón y pollinaza.

La destrucción de las enterobacterias en el presente estudio parece estar muy relacionada con el momento en que se alcanza la fermentación anaeróbica y el menor nivel de pH en los microsilos, lo cual ocurre a las 72 horas (Etapa 3), lo que coincide con diversos autores quienes señalan que la disminución del pH, la ausencia de oxígeno, la presencia de ácidos grasos volátiles y la temperatura del proceso de ensilaje son factores que destruyen a las bacterias (McCullough, 1978; Henry *et al.*, 1983; Iñiguez, 1991; Henry *et al.*, 1995; Hernández, 1997; Gutiérrez, 1997; Russel y Diez-González, 1998).

Si se considera que dentro de las características químicas y microbiológicas de los ensilados normales se incluyen altos niveles de ácido láctico, en comparación con los de ácido acético y ácido butírico, un pH bajo y un contenido bajo amoniacal se explica fácilmente el hecho de no encontrar enterobacterias cuando se establecen las condiciones de ensilaje (McCullough, 1978).

Lo anterior se confirma con los resultados de diversos trabajos, entre ellos los de Hernández (1997) quien reporta que *E. coli* no sobrevive a un pH de 4.4, *S. paratyphi* a 4.5, *S. schottmuelleri* a 4.5 y *S. typhi* a 4.0; Henry *et al.* (1995), indican que *S. typhimurium* no sobrevive a un pH de 4.0 por más de 24 horas, mientras que a un pH de 5.0 sólo se recuperan en tres de cada cuatro muestras a las 48 horas, y ante la presencia de ácidos grasos volátiles incrementa la rapidez de la destrucción; y de Strauch y Ballarini (1991), los cuales mencionan que las poblaciones de *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* y *Serpulina hyodysenteriae* se destruyen en un 90% en una semana en pH menores de 6.5.

Los ensilados formulados con excretas animales reducen la posibilidad de riesgos de salud cuando son suministrados como alimento al ganado. McCaskey y Walters (1977) encontraron que la adición de excretas de ave al maíz forrajero, antes de ensilar, no aumentó la cantidad de coliformes; así mismo, demostraron que *Salmonella spp.* no sobrevive en este tipo de ensilajes después de tres o cuatro días, momento en el que la producción de ácido láctico ha reducido el pH a 4.5 o menos; sin embargo, la disminución del pH no es el único factor que induce la destrucción de dicho agente, ya que a medida que se aumenta la temperatura de ensilaje, se incrementa la velocidad con que el agente se destruye.

El proceso por el cual en un hábitat anaeróbico, con un pH bajo y una alta concentración de ácidos grasos volátiles, hay destrucción de microorganismos, se explica por el hecho de que los ácidos grasos volátiles no disociados, producto de la fermentación, pueden cruzar la membrana celular y disociarse en el ambiente interior que es más alcalino (Beck, 1978; Gutiérrez, 1997; Russel y Diez-González, 1998); una vez adentro de la célula, origina la acumulación de aniones, dependiendo del gradiente del pH a través de la membrana; *E. coli* es capaz de disminuir su pH intracelular hasta 6.1 antes de que se detenga su crecimiento, pero esta pequeña disminución en su gradiente de pH no alcanza a contrarrestar el efecto de la acumulación de aniones (Russel y Diez-González, 1998).

El no encontrar desarrollo de enterobacterias en los frascos abiertos a los 28 días, puede deberse a que si bien había penetración de oxígeno y las condiciones de pH no eran tan ácidas, como se cito anteriormente. *E. coli* no resiste un pH cercano a 5.0, que fue el encontrado en el material de esos frascos y *Salmonella spp.* solo resiste ese nivel de pH por 48 horas (Henry, *et al.*, 1995).

Si bien, en el presente estudio no se determinó el tipo de ácido encontrado en los ensilados, Cabrera (1998) en un estudio con ensilados semejantes encontró que el tipo de ácido predominante fue el láctico, el cual es el que logra la mayor acidificación y permite la destrucción de otros microorganismos (Beck, 1978).

Otro factor que se debe considerar en el presente estudio con respecto a la destrucción de enterobacterias en los ensilados, es el uso de la melaza en la mezcla, la cual se señala como un producto efectivo para suprimir el crecimiento de bacterias y hongos. La adición de melaza a niveles de 15 a 45 %, en las mezclas con excretas frescas de cerdo, se asoció con una disminución del número de UFC/gr de *S. typhimurium*; esta acción antimicrobiana fue más acentuada con el nivel de 45% de melaza, a partir de las 12 horas de inoculada. Se sugiere que la melaza afecta en forma negativa la viabilidad de *S. typhimurium* debido al estrés osmótico ocasionado por la alta concentración de solutos a través de la sacarosa; el mismo efecto fue observado con NaCl y KCl en *S. typhimurium* y *E. coli*, las cuales acumulan ácido glutámico intracelular (Beck, 1978). En el presente estudio solo se empleo un 8% de melaza por lo que no se puede argumentar efecto de la melaza en la destrucción de *Salmonella choleraesuis*.

En cuanto a la sobrevivencia de los virus inoculados en los ensilados, sólo se pudo encontrar evidencia de la presencia del virus de la Enfermedad de Aujeszky a los 60 minutos después de la inoculación y del virus de la Enfermedad del Ojo Azul a los 60 minutos y a las 24 horas, aunque en este último caso sólo se haya evaluado un microsilo. Lo anterior sugiere que el virus de la Enfermedad del Ojo Azul presenta una mayor resistencia a las condiciones de la mezcla durante las primeras 24 horas después de la inoculación, pero es importante recordar que en ese momento, los agentes virales son destruidos por las condiciones del medio ambiente existente en la muestra, más que por el efecto del proceso completo del ensilaje, y tal vez la condición más importante sea el rápido incremento de temperatura que se presenta durante las etapas iniciales de la fermentación.

Si bien todavía no están bien establecidos los efectos de los ensilados sobre la sobrevivencia viral, se puede argumentar que pocos virus resisten condiciones tan ácidas como las encontradas en los microsilos del presente estudio (Fener *et al.*, 1987). De igual forma Jawetz *et al.* (1990) reportan que la mayoría de los virus sólo son estables a un pH que va de 5 a 9 y que todos los virus se destruyen en condiciones más alcalinas. Por ejemplo se conoce que el virus de la Enfermedad de Aujeszky se inactiva a un pH de 4.3 y a una temperatura de 39 grados centígrados entre uno y siete días (Kluge *et al.*, 1992). En el caso del virus de la Enfermedad del Ojo Azul, se reporta que se inactiva a 56 grados centígrados después de 30 minutos, pero a una temperatura de 37 grados centígrados conserva sus propiedades hemoaglutinantes e infectivas en cultivo celular por 110 días (Cruz *et al.*, 1988). Sin embargo, no existen reportes respecto a la susceptibilidad del virus al pH ácido.

En el presente trabajo el pH más ácido se estableció desde las 72 horas, y aunque no se midió la temperatura dentro de los microsilos en los frascos de plástico, se reporta que alcanzan al menos de 38 grados centígrados*. Fener *et al.* (1987), mencionan que la vida media de los virus puede medirse en segundos a 60 grados centígrados, en minutos a 37 grados, en horas a 20 grados, en días a cuatro grados y en años a menos 70 grados.

Tanto la temperatura como el pH son factores importantes de inactivación viral, Ward *et al.* (1986) reportan un 99% de eliminación de echovirus y rotavirus en líquidos fermentados a un pH de 6.5 en 24 horas. Ming y Cliver (1995) reportan la inactivación del virus de la Hepatitis A en un 97 % cuando la temperatura era de 20 grados centígrados, en

* Castrejón, P.F. Comunicación personal.

sedimentos líquidos de cerdo a un pH de 6.9. Estos mismos autores indican que la inactivación viral por las temperaturas altas y por los cambios en el pH, se deben a su efecto sobre la desnaturalización de proteínas virales y mencionan que los virus entéricos son más estables a un pH neutro, que a uno ácido (3-5), y que son más susceptibles a un pH alcalino (9-12) que a uno ácido. En el presente trabajo lo anterior justifica la presencia de restos de cápsides, en los estudios de microscopía electrónica, a los días 7 y 14.

Los resultados hallados en este estudio difieren de los reportados por Monteith *et al.* (1986), quienes inocularon dos silos con enterovirus bovino y parvovirus bovino, y lograron aislar parvovirus a los 30 días de ensilaje en uno de los dos silos inoculados, pero no lograron aislar al enterovirus; en el caso del aislamiento positivo el pH fue de 6.1, mientras que en los otros ensilados fue de 5.9 y 4.4. Estos autores concluyen que la fermentación anaeróbica es un método eficaz para la inactivación viral en las excretas y que las excretas así tratadas pueden ser usadas en forma segura para alimentar al ganado.

Cabe señalar que los virus utilizados en el anterior trabajo son mucho más resistentes a condiciones medio ambientales que los utilizados en esta investigación; por ejemplo, los enterovirus son relativamente estables al calor y a rangos de pH que van de 2 a 9, pero tal y como se comprobó en el estudio citado en el párrafo anterior, son inactivados por el proceso de fermentación anaeróbica (Derbyshire *et al.*, 1992).

Otro aspecto de importancia a considerar, con relación a la inactivación viral en los ensilados, son los reportes de la existencia de bacterias que causan la destrucción de los virus, en las diferentes formas de manejo de excretas porcinas; dentro de las bacterias que se han involucrado en este proceso destacan los *Bacillus spp.* los cuales pueden resistir condiciones de acidez. Este tipo de agentes tienen efectos proteolíticos por medio de enzimas y se ha sugerido que las proteínas virales pueden servir como sustrato en el desarrollo bacteriano (Cliver y Herrmann, 1972; Ward *et al.*, 1986).

Con relación a los resultados encontrados en las diferentes pruebas realizadas para la identificación viral, el haber hallado efecto citopático y fluorescencia en algunas muestras, y que éstas fueron negativas a las pruebas de hemoaglutinación y hemoaglutinación pasiva, puede explicarse debido a una baja cantidad de virus existente en estas muestras. Lo anterior justifica el que el efecto citopático observado haya sido moderado y sólo detectable en algunas áreas de los pozos afectados, mientras que en los pozos con controles positivos era extenso; en el caso de la fluorescencia, esta se observó sólo focalmente en algunas células, mientras que en los pozos con controles positivos la fluorescencia se presentaba en toda la superficie del cultivo. En el caso de las dos muestras de microsilos OA, que presentaron fluorescencia al día siete de ensilaje, ésta se consideró negativa o inespecífica, debido a que las otras pruebas, incluso la microscopía electrónica fueron negativas y a la imposibilidad de identificar al virus tanto a los tres, como a los cinco días después de la inoculación.

Lo anterior puede apoyarse en el trabajo de Bolin *et al.* (1985), quienes encontraron un mayor número de muestras positivas por aislamiento viral, cuando se comparó con la prueba de inmunofluorescencia, para la detección del virus de la Enfermedad de Aujeszky a partir de diversos órganos; sin embargo difiere de lo reportado por Wohlgemuth *et al.* (1978) quienes encontraron la misma sensibilidad en la prueba de fluorescencia y en la de aislamiento viral.

En el caso del virus de la Enfermedad del Ojo Azul, McNeilly *et al.* (1997) hallaron que la prueba de aislamiento viral fue mas sensible que la de inmunofluorescencia para el aislamiento del virus.

Conclusiones.

1.- La cantidad de enterobacterias existente en las áreas de manejo de excretas (fosas de sedimentación, almacenamiento, en los líquidos derivados del separador de sólidos y en los sólidos), fue menor a las eliminadas en las heces por los animales de las diferentes áreas de la granja.

2.- Dentro de las condiciones de este trabajo, los agentes inoculados en los microsilos (*E. coli* y *S. choleraesuis*) no sobreviven las condiciones de ensilaje por siete días. Debido al tamaño de la muestra es difícil asegurar que dichos agentes sólo sobreviven en los ensilajes por 24 horas, por lo que se recomienda realizar trabajos semejantes con un mayor número de repeticiones; sin embargo es probable que su periodo de sobrevivencia no vaya mas allá de las 72 horas.

3.- Los agentes virales inoculados no sobreviven en las mezclas ensiladas por más de siete días. Debido al tamaño de la muestra empleado en la tercera etapa de este estudio es difícil asegurar que los virus inoculados son eliminados a las 72 horas después de la inoculación, por lo que se recomienda hacer trabajos semejantes con una mayor cantidad de repeticiones; sin embargo, se puede sugerir que los virus de la Enfermedad de Aujeszky y de la Enfermedad del Ojo Azul sobreviven un máximo de 24 horas dentro de los ensilados.

La inactivación de estos virus parece estar mas relacionada con la escasa capacidad de sobrevivencia del virus fuera del huésped, que a las condiciones de un proceso completo de ensilaje.

4.- Con base en los resultados de este trabajo, los ensilados hechos a base de la fracción sólida de excretas porcinas se pueden usar sin riesgo de transmitir los agentes inoculados en el presente estudio.

Literatura citada.

Allen, G.M., McNeilly, F., Walker, Y., Linne, T., Moreno-López, J., Hernández, P., Kennedy, S., Carroll, B.P., Herron, B., Foster, J.C., Adair, B. (1996) A sequential study of experimental porcine paramyxovirus infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 405-413.

Andreadakis, A.D. (1992) Anaerobic digestion of piggery waste. *Wat. Sci. Tech.* 25 (1): 9-16.

Bertschinger, H.U., Fairbrother, J.M., Nielsen, N.O. and Pohlenz, J.F. (1992) *Escherichia coli* infections. In Diseases of Swine 7th Edition. Edited by Leman, A.D. *et al.*, Iowa State University Press 3 (39): 487-521.

Beck, Th. (1978) The microbiology of silage fermentation. In Fermentation of Silage. Edit by McCullough, M.E. *National Feed Ingredients Association*. Des Moines, Iowa, USA. 4 (1): 61-114.

Bolin, C.A., Bolin, S.R. and Kluge, J.P. (1985) Pathologic effects of intrauterine deposition of pseudorabies virus on the reproductive tract of swine in early pregnancy. *Am. J. Vet. Res.* 46 (5): 1039-1042.

Burleson, F.G., Chambers, M.T. and Wiedbrauk, L.D. (1992) Immunofluorescence Assays. Virology: A Laboratory Manual. *Academic Press*, San Diego, USA. pp. 95-109.

Burns, J.C., King, L.D. and Westerman, P.W. (1990) Long-term lagoon effluent applications on costal bermudagrass: yield, quality and element removal. *J. Environ. Qual.* 19: 749-756.

Cabrera, M.P. (1998) Acidos grasos de cadena corta, macro y microminerales en ensilados de excretas porcinas con caña de azucar picada. Tesis de Licenciatura. *FMVZ-UNAM*. pag. 52.

Campadabal, C.M., y Navarro, G.H. (1995) Factores que afectan la utilización de la cerdaza en la alimentación del ganado de carne. *Asociación Americana de la Soya*. ASA/México. A.N. número 145.

Cañizares, V.R.O. y Casas, J. (1991) El papel de las microalgas en el tratamiento terciario de aguas residuales. Cuadernos sobre Biotecnología y Bioingeniería. *CINVESTAV-IPN*, México, D.F.

Carpenter, T.E., and Gardner, I.A. (1996) Simulation modeling to determine herd-level predictive values and sensitivity based on individual-animal test sensitivity and specificity and sample size. *Preventive Veterinary Medicine* 27: 57-66.

Carter, G.R. (1979) Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Micology. 3th Edition. *C.C. Thomas*, Springfield, USA. pag. 560.

Castrejón, P.F. (1993) Algunos estudios sobre el reciclaje de excretas en alimentación de bovinos. Memorias del Curso Internacional Avanzado de Nutrición de Rumiantes. *Colegio de Posgraduados. Montecillo*, Edo. de México. pp. 79 - 86.

Center for Food Safety and Applied Nutrition (1998) *Salmonella spp.* Foodborne pathogenic microorganism and natural toxins handbook. *U.S Food and Drug Administration september*: 1-5.

Chandler, D.S and Creven, J.A. (1981) A note on the persistence of *Salmonella havana* and fecal coliforms on a naturally contaminated piggery effluent disposal site. *Journal of Applied Bacteriology* 51: 45-49.

Cliver, D. and Hermann, J.E. (1972) Proteolytic and microbial inactivation of enteroviruses. *Water Research* 6: 795-805.

Comisión México-Americana para la prevención de la Fiebre Aftosa y otras enfermedades Exóticas de los Animales (1994) Manual de Procedimientos para la Prevención y Erradicación de la Influenza Aviar. Sección de Limpieza y Desinfección, CPA. pp. 45.

CNE, Comisión Nacional de Energía. (1985) Biogas, construcción, producción y utilización. *Comisión Nacional de Energía*, La Habana, Cuba. pp. 1-24.

Correa, G.P., Martínez, L.A., Ericson, A. y Moreno, L.J. (1986) Characterization of a paramixovirus isolated from the brain of piglet in Mexico. Proc. 9th IPVS Congress. Barcelona, Spain, *IPVS* July 15-18. 205.

Correa, G.P.; Pérez, J., Martínez, A., Caba, M.A. y Córdova, D. (1998) Encuesta nacional para detectar cerdos seropositivos al rubulavirus porcino mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Memorias del XXXIII Congreso Nacional AMVEC, 12 al 16 de agosto Guanajuato 1998. *AMVEC*. 198-199.

Cruz, G.H., Martínez, L.A., Correa, G.P. y Colinas, T.A. (1988) Viabilidad del paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán (PP-LPM) a diferentes temperaturas. Memorias del XXIII Congreso Nacional AMVEC, 20 a 24 de julio León 1988. *AMVEC*. 84-86.

Derbyshire, J.B. (1992) Enterovirus. In Diseases of Swine 7th Edition. Edited by Leman, A.D. *et al.*, Iowa State University Press. 2 (18): 263-267.

Díaz, J., Díaz, C.P. y Elias, A. (1988) Nota sobre el uso de ensilajes de excretas de preceba porcina y miel fina enriquecidos o sin enriquecer con otros alimentos para cerdas gestantes. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 22: 169-172.

Dhinakar, G., Thangavelup, A. and Venugopalan, A.T. (1995) Passive haemagglutination test in the diagnosis of infectius bursal diseases. *Indian Journal of Animal Sciences* 65 (2): 169-170.

DiGiacomo, R.F., Koepsell, T.D. (1986) Sampling for detection of infection or disease in animal populations. *J.A.V.M.A.* 189 (1): 22-23.

Domínguez, L.E. (1993) Un problema controlable a mediano plazo. *Nuestro Acontecer Porcino* 1: 4-12.

Donald, D.L.D. (1988) Aprovechamiento de excretas animales como ingredientes de raciones alimenticias. *Porcira* 11 (134): 41-51.

Drucker, A. y Gómez, V. (1998) Impacto ecológico de los desechos de granjas porcinas: El caso Yucatán. Memorias III Jornadas en Producción Porcina *FMVZ-UNAM* Abril 2-4. México D.F. 123-147.

Edwards, R.A. and McDonald, P. (1978) Chemistry of silage fermentation. In Fermentation of Silage. Edit by McCullough, M.E. *National Feed Ingredients Association*. Des Moines, Iowa, USA. 3 (1): 29-60.

Falkow, S. (1996) The Evolution of pathogenicity in *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Celular and Molecular Biology. Edited by Neidhardt, F.C. Second Edition. *ASM Press*. Washington, D.C., USA. 149: 2723-2756.

Fener, F., Bachmann, P.A., Gibbs, E.J., Murphy, F.A., Studdert, M.J. and White, D.O. (1987) Veterinary Virology. *Academic Press*, Orlando, USA. pp 4-23.

Flores, M.J.A. (1989) Bromatología Animal. Tercera edición. *Limusa*. México D.F. pag. 1096.

García, J.G. (1979) Ensilado de forrajes. 6a edición. *Publicaciones de Extensión Agraria*. Madrid, España. pp. 1-47.

García, S.J. (1993) Evaluación del efecto de la adición de un ensilado elaborado a base de cerdaza y sorgo sobre el comportamiento productivo de cerdos alimentados durante la etapa de desarrollo. Tesis de Licenciatura. *FMVZ-UNAM*. México D.F. pp. 25-30.

Gill, J. L. (1978) Design and analysis of experiments in the animal and medical sciences. *Iowa State University Press*, Ames, Iowa, USA.

Gutiérrez, V.E. (1997) El papel de la melaza y de los ácidos grasos volátiles sobre la *Salmonella* en raciones con estiércol fresco de cerdo. Memorias II Seminario de Manejo y Reciclaje de Residuales Porcinos. *CMP* octubre 22-25, Querétaro, México. 66-68.

Henry, D.P., Frost, A.J., Samuel, J.L., O' Boyle, D.A. and Thomson, R.H. (1983) Factors affecting the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* in anaerobically fermented pig waste. *Journal of Applied Bacteriology* 55: 89-95.

Henry, D.P., Frost, A.J., O'Boyle, D. and Cameron, R.D. (1995) The isolation of salmonellas from piggery waste water after orthodox pondage treatment. *Australian Veterinary Journal* 72 (12) 478-479.

Hernández, C.B. (1997) Determinación de bacterias patógenas en ensilados de excretas porcinas con caña de azúcar. Tesis de Licenciatura. *FMVZ-UNAM*. México D.F. pp. 15-36.

Huysman, F., Van Renterghem, B. and Verstraete, W. (1993) Antibiotic resistant sulphite-reducing clostridia in soil and groundwater as indicator of manuring practices. *Water, Air and Soil Pollution* 69: 243-255.

Iñigo, D.C., Angelo, I.S., Soto, A.C. y Alcaínos, H. (1991) Caracterización bacteriológica y parasitológica del desecho fecal porcino en Chile. *Avances en Ciencias Veterinarias* 6: (1) 23-28.

Iñiguez, C.G. (1991) Fermentación de estiércol de cerdo para la obtención de un alimento para rumiantes. Tesis de Doctorado. *Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM*. México D.F. pag. 85.

Iñiguez, C.G., Cuarón, I.J., Pérez, G.P., De la Torre, M.M. y Magaña, P.I. (1990) Fermentation characteristics, digestibility and performance of ensiled swine waste, wheat straw and cane molasses feed to sheep. *Biol. Wastes* 34: (4) 281-299.

Jacques, K.A. y Hoyos, G. (1993) Manejo de desperdicios y control de olores: necesidades de planificación para la producción intensiva. *Nuestro Acontecer Porcino* 1 : (1) 51-57.

Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A., Brooks, G.F., Butel, J.S. and Ornston, L.W. (1990) Microbiología Médica. *El Manual Moderno*, México D.F. pp. 125-159.

Jones, P.W. (1975) The effect of storage in slurry on the virulence of *Salmonella dublin*. *Journal of Hyg. Camb.* 74: 65-70.

Kluge, J.P., Beran, G.W., Hill, H.T. and Platt, K.B. (1992) Pseudorabies. In Diseases of Swine. 7th ed. Edited by Leman, A.D. *et al.*, *Iowa State University Press*, 2 (24) 312-323.

Langlois, B.E., Cromwell, G.L. and Hayes, V.W. (1978) Influence of type of antibiotic and length of antibiotic feeding period on performance and persistence of antibiotic resistance enteric bacteria in growing-finishing swine. *J. Anim. Sci.* 46 (5): 1383 - 1396.

Lastra, M.I. y Galarza, M.J. (1998) Situación actual y perspectiva de la producción porcina en México 1990-1998. Edit. por *Lastra y Galarza*. México D.F. pp. 1-12..

Liceaga, M.M. (1994) Manejo de excretas en granjas porcinas. Estudio recapitulativo. Tesis de Licenciatura. *FMVZ-UNAM*. México D.F. pp. 71-93.

Maes, K., Kanitz, C.L. and Gustafson, D.P. (1979) Pseudorabies virus infections in wild and laboratory rats. *Am. J. Vet. Res.* 40: 393-396.

Mateu, A., Mata-Álvarez, J. and Parés, R. (1992) Enterobacterial and viral decay experimental models for anaerobic digestion of piggery waste. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 291-296.

McCaskey, T.A., Das, A.M., Sandhu, K.S., George, M.C. and Stepheson, A.H. (1996) Microbial safety of ensiled rumen contents as animal feed with reference to survivability of experimental inoculated pathogens. *Indian Veterinary Journal* 7 (5): 491-495.

McCullough, M.E. (1978) Silage-general considerations. In Fermentation of Silage. Edit by McCullough, M-E. *National Feed Ingredients Association*. Des Moines, USA. 1(4): 1-26.

McDonough, P.L. and Simpson, K.W. (1996) Diagnosis emerging bacterial infection: Salmonellosis, Campylobacteriosis, Clostridial toxicosis and Helicobacteriosis. *Seminars in Veterinary and Surgery* 11 (3): 187-197.

McNeilly, F., Walker, Y., Allan, G.M., Foster, J.C., Linne, T., Merza, M. Hernández, P., Kennedy, S. and Adair, B. (1997) A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacan Paramyxovirus infection in pigs. *J. Vet. Diag. Invest.* 9 (1): 3-9.

Mengeling, L. and Paul, P.S. (1986) Interepizootic survival of porcine parvoviruses. *JAVMA* 188 (11): 1293-1295.

Mengeling, W.L. (1992) Porcine Parvovirus. In Diseases of Swine. 7th ed . Edited by Leman, A.D. *et al.*, *Iowa State University Press*. 2 (23) 299-311.

Mengeling, W.L., Brockmeier, S.L., Lager, K.M. and Vorwald, A.C. (1997) The role of biotechnologically engineered vaccines and diagnostics in pseudorabies eradication strategies. *Veterinary Microbiology* 55: 49-60.

Miner, R.J. (1997) Hacia una producción porcina independiente de la tierra para la disposición de excretas. Memorias II Seminario de Manejo y Reciclaje de Residuales Porcinos. *CMP* octubre 22-25, Querétaro, México 75-78.

Ming, Y.D. and Cliver, D. (1992) Inactivation of poliovirus type 1 in mixed human and swine wastes and by bacteria from swine manure. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (6): 2016-2021.

Ming, Y.D. and Cliver, D. (1995) Persistence of inoculated Hepatitis A virus in mixed human and animal wastes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: (1) 87-91.

Molina, J.R. (1997) Utilización de la cerdaza en la alimentación animal. Memorias II Seminario de Manejo y Reciclaje de Residuales Porcinos. *CMP* octubre 22-25, Querétaro, México. 63-65.

Montalvo, J.S. (1984) Tratamiento bioquímico de los residuales porcinos. *Rev. Ingeniería Civil* 35 (5): 79-88.

Monteith, D., Shannon, E.E. and Derbyshire, J.B. (1986) The inactivation of a bovine and bovine parvovirus in cattle manure by anaerobic digestion, heat treatment, gamma irradiation, ensilage and composting. *J. Hyg. Camb.* 97: 175-184.

Morilla, A.G. (1997) Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos. *INIFAP-SAGAR y PAIEPAME*. México, D.F. pp. 7-30.

Moser, M.A. (1997) Tratamiento de residuales porcinos para uso en riego agrícola. Memorias II Seminario de Manejo y Reciclaje de Residuales Porcinos. *CMP* octubre 22-25, Querétaro, México. 13-17.

Nachimuthu, K., Dhinakar, G., Thangavelu, A. and Venkatesan, R.A. (1995) Reverse passive haemagglutination test in the diagnosis of infectious bursal disease. *Trop. Anim. Health. Prod.* 27: 43-46.

Olson, L.D. (1995) Survival of *Serpulina hyodysenteriae* in an effluent lagoon. *J.A.V.M.A.* 207 (11): 1470-1472.

O'Brian, A.D. and **Holmes, R.K.** (1996) Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Edited by Neidhardt, F.C. Second Edition. *ASM Press*. Washington, D.C., USA.153: 2788-2797.

Pérez, E.R. (1997) Porcicultura y medio ambiente. Memorias II Seminario de Manejo y Reciclaje de Residuales Porcinos. *CMP* octubre 22.-25, Querétaro, México 10-12.

Plym, L. and **Ekesbo, Y.** (1993) Survival of *Salmonella* in composted and not composted solid animal manure. *J. Vet. Med.* 40: 654-658.

Pradal-Roa, P. (1994) Bacteria in post-antimicrobial enteritis in weaned pigs. Ph. D. Thesis, *Glasgow University*, Scotland.U.K. pag.332.

Ramírez, M.H. (1998) Fisiopatología del paramixovirus del Ojo Azul del cerdo a nivel testicular. Tesis Doctoral. *FMVZ-UNAM*. México D.F. . pp. 5-18.

Ramírez, M.H., Carreón, N.R., Mercado, G.C. y Rodríguez, T.J. (1996) Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación del paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. *Vet. Mex.* 27: 257-259.

Rajkowski, K.T., Eblen, S. and Laubauch, C. (1998) Efficacy of washing and sanitizing trailers used for swine transport in reduction of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *J. Food. Prot.* 61 (1): 31-35.

Roizman, B. and Spear, P.G. (1973) Herpesvirus. In Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages. Edited by Dalton, J.A. and Haguenuau, F. *Academic Press Inc.* New York and London. 2: 83-90.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Russell, J.B. and Diez-González, F. (1998) The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv. Microb. Physiol.* 39: 205-234.

Salazar, C.G. (1994) Algunas consideraciones sobre el manejo y valor de las excretas en la alimentación animal. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. 8-12 octubre. *PANVET* Acapulco, México.

SAS. (1988) SAS User's guide release. 6.03. SAS Institute Inc., Cary NC. pp. 549-640.

Shaw, A.M., Govindarajan, R., Dhinakar, G., Albert, A. and Venugopalan, T. (1995) Reverse passive haemagglutination test for the detection of canine coronavirus antigens. *Indian Journal of Animal Sciences* 65 (5): 525-526.

Sheler, G. and Soeder, C.J. (1980) Algae biomass production and use. *Elsevier North-Holland Biomedical Press*, Amsterdam. pag. 450.

Snyder, M.L., Eernise, K.A., McKnight, R.A. and Stewart, W.C. (1982) Microtitration hemoagglutination inhibition test for Porcine Parvovirus. In *Serologic Microtitration Techniques* Edited by *USDA*, Ames, Iowa, USA.

Stephano, H.A. (1985) El síndrome del Ojo Azul en cerdos. Avances en las Enfermedades del Cerdo. *AMVEC*. 299-311.

Stephano, A.H. (1992) Blue Eye Disease. In *Diseases of Swine*. 7th ed. Edited by *Leman, A.D. et al.*, *Iowa State University Press*. 2 (13) 237-241.

Stephano, H.A. y Gay, G.M. (1986) Encefalitis, falla reproductiva y opacidad corneal. *Sintesis Porcina* 5 (12): 25-39.

Stephano, H.A., Gay, M., and Kreese, J. (1986) Properties of a paramyxovirus associated to a new syndrome characterized by encephalitis, reproductive failure and corneal opacity. Proc. 9th IPVS Congress, Barcelona, Spain. July 15-18. *IPVS*: 455.

Strauch, D. and Ballarini, G. (1994) Hygienic aspects of the production and agricultural use of animal wastes. *J. Vet. Med.* 41: 176-228.

Sundquist, A., Berg, M., Morelo, L.J. and Linne, T. (1990) The structural proteins of a porcine paramyxovirus. *J. Gen. Virol.* 71: 609-613.

Sutton, A. (1993) El manejo del desperdicio porcino. *Desarrollo Porcícola septiembre*: 24-27.

Sweeten, J.M. (1992) Gas metano del estiércol porcino. *Porcira* 2: (2) 26-34.

Taiganides, P.E. (1994) Pig waste management and pollution control. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. 8-12 de octubre. *PANVET* Acapulco, México. 313-322.

Taiganides, P.E., Espejo, R.P. y Girón, S.E. (1996) Manual para el manejo y control de aguas residuales y excretas porcinas en México. *Consejo Mexicano de Porcicultura*. México D.F. pp. 3-15.

Taylor, D.J. (1995) Pig Diseases 6th edition. *The Burlington Press*, Cambridge pag 200.

Toledo, B.A. (1998) Carcterización nutricional de ensilados de excretas porcinas con bagazo de caña y melaza. Tesis de Licenciatura. *FMVZ-UNAM*. México D.F. pp. 26-37.

Trueba, R.S. (1998) Situación actual y proyecciones de la porcicultura. *Desarrollo Porcícola* 48: 5-12.

U.S.A. Grain Council (1998) Boletín Informativo. *Consejo Norteamericano de Granos forrajeros*. Noviembre. pag. 4.

Vega, V.F. y Romero, S.H.L. (1987) Daños y soluciones ecológicas en las granjas porcinas. *Porcivama* 11 (1): 62-68.

Ward, R.L. (1982) Evidence that microorganism cause inactivation of viruses in activated sludge. *Applied and Enviromental Microbiology* 43 (5): 1221-1224.

Ward, R.L., Knowlton, D.R., Winston, P.E (1986) Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. *Applied and Enviromental Microbiology* 52 (3): 450-459.

Wilcock, B.P. and Schwartz, K.J. (1992) Salmonellosis. In Diseases of Swine. 7th ed . Ed. Leman, A.D. *et al.*, Iowa State University Press. 3 (46) 570-583.

Wohlgemuth, K., Leslie, P.F., Reed, D.E., Smidt, D.K. (1978) Pseudorabies virus associated with abortion in swine. *J.A.V.M.A.* 172 (4): 478-479.

Anexo 1.- Formato para la identificación de bacterias.

FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION
ANIMAL: CERDOS

Fecha _____

No. de Caso _____
Muestra _____

Colonia					
Tinción Gram					
Medio					
Tamaño					
Descripción					
Hemólisis					
Subcultivo					
KOH 3 %					
* Catalasa					
Coagulasa					
TSI					
Citrato					
Urea					
Nitratos					
* RM/VP					
Malonato					
Fenilalanina					
* Amilasa					
* NaCL 6.5 %					
Adonitol					
Arabinosa					
Dulcitol					
Fructuosa					
Glucosa					
Inositol					
* Lactosa					
Maltosa					
* Manitol					
* Rafinosa					
Ramnosa					
* Salicin					
* Sorbitol					
* Sacarosa					
* Trealosa					
Xylosa					
Leche tornasolada					

Anexo 2.- API 20E para la identificación de enterobacterias.

ESPAÑOL



Ref. 20 100

SISTEMA DE IDENTIFICACION PARA
ENTEROBACTERIACEAE Y OTROS
BACILOS GRAM-NEGATIVOS.

Ficha técnica
Version C

API 20 E es un sistema para la identificación de las Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram-negativos y no exigentes, mediante 23 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados, y una base de datos. La lista completa de las bacterias que pueden identificarse utilizando este sistema aparece en la tabla de identificación (p. 22 de la ficha técnica).

Principio

La galèria API 20 E consta de 20 microtubos que contienen los substratos deshidratados. Los tests se inoculan con una suspensión bacteriana que rehidrata los medios. Durante la incubación el metabolismo de la bacteria produce cambios de color espontaneos o bien al añadir reactivos.

La lectura de las reacciones se hace de acuerdo con la **tabla de lectura** y la identificación mediante la **tabla de identificación**, **API 20 E Index** o el programa informático para identificación.

- La caja API 20 E permite realizar 25 identificaciones. Se compone de:
 - 25 galerías API 20 E
 - 25 cámaras de incubación
 - 25 hojas de resultados
 - 1 sistema de cierre
 - 1 ficha técnica.
- Para emplear API 20 E es preciso disponer de:
 - Medio de suspensión, 5 ml (ref. 20 110)
 - Caja de reactivos (ref. 20 120) o reactivos individuales (ref. 70 400 a 70 460 y ref. 70 540)
 - Reactivo Zn (ref. 70 380)
 - Aceite de parafina (ref. 70 100)
 - Pipetas o PSipetas (ref. 70 250)
 - API 20 E Index (ref. 20 190) o Programa informático para identificación
 - Gradilla (ref. 70 200)

En algunas ocasiones también se precisa:

 - Medio API OF. Test para determinar el metabolismo fermentativo y oxidativo de la glucosa
 - Medio API M. Test para determinar la movilidad de las bacterias aero-anaerobias.

Material de laboratorio:

 - Estufa (35-37°C), nevera, mechero Bunsen, rotulador.

Conservación

Las galerías API 20 E se presentan en un sobre de aluminio. Después de la apertura del mismo, conservar las galerías restantes cerrando dicho sobre con la ayuda del sistema de cierre (incluido en el envase) : colocar el extremo del sobre entre las dos piezas del sistema de cierre y apretar suavemente y a fondo sobre toda la abertura. Las galerías pueden conservarse así durante 10 meses a 2-8°C (hasta la fecha de caducidad indicada en el envase).

Todos los reactivos se conservan igualmente a 2-8°C y 1 mes después de su apertura.

El reactivo OX es muy sensible a la luz : conservar envuelto en papel aluminio.

Composición de los medios y reactivos

- Medio de suspensión (ref. 20 110): agua desmineralizada.
- Reactivo TDA (ref. 70 400) para la detección de la triptófano desaminasa:

Percloruro férrico	3,4 g
Agua desmineralizada	100 ml
- Reactivo para la detección del indol:

JAMES (ref. 70 540)	
Compuesto J 2183	0,5 g
HCl N	100 ml
ó	
IND	
Paradimetilaminobenzaldehido	5 g
Alcohol isoamilico	75 ml
HCl 37%	25 ml
- Reactivos de Voges Proskauer para la detección de acetoina:

VP 1 (ref. 70 420)	
Hidroxido potasico	40 g
Agua desmineralizada	100 ml
VP 2 (ref. 70 430)	
α naitol	6 g
Etanol	100 ml
- Reactivo de Griess para los nitritos:

NIT 1 (ref. 70 440)	
Acido sulfanilico	0,8 g
Acido acético 5N	100 ml
NIT 2 (ref. 70 450)	
N-N-dimetil-α -naitilamina	0,6 g
Acido acético 5N	100 ml
- OX (ref. 70 460) para detectar oxidasa

Tetrametil-p-fenilendiamina	1 g
Alcohol isoamilico	100 ml

Anexo 3.- Características del ensilado por inóculo y tiempo de ensilaje.

Microsilo	Días de ensilaje			
	7	14	28	56
EC1	N	N	N	N
EC2	N	N	N	N
EC3	N	N	N	N
SC1	N	N	N	H
SC2	N	N	N	N
SC3	N	N	N	N
CB1	N	N	N	H
CB2	N	N	N	N
CB3	N	N	N	N
EA1	N	N	N	H
EA2	N	N	H	N
EA3	N	N	N	S
OA1	N	N	N	N
OA2	N	N	N	N
OA3	N	N	N	N
CV1	N	N	N	H
CV2	N	N	N	S
CV3	N	N	N	N

N = Normal.

H = Crecimiento de hongos en la superficie cercana al borde del frasco.

S = Sin características de ensilaje en todo el frasco

Anexo 4.- PH en cada microsilo por días de ensilaje.

Microsilo	Días de ensilaje				
	7	14	28	28 (NS)	56
EC1	4.0	4.2	3.8	5.0	4.0
EC2	4.0	3.9	4.0	5.1	4.1
EC3	4.0	4.0	4.0	4.9	4.0
SC1	4.0	4.0	4.0	5.0	4.1
SC2	4.0	4.1	4.1	5.0	4.0
SC3	4.0	4.2	4.0	5.2	4.2
CB1	3.9	4.0	4.0	5.0	4.0
CB2	4.0	4.1	3.8	5.0	4.5
CB3	3.8	4.2	4.0	5.0	4.1
EA1	4.2	4.2	3.8	5.0	4.5
EA2	3.8	4.2	4.0	5.2	4.1
EA3	3.8	4.1	4.0	5.0	5.0
OA1	3.8	4.1	3.8	5.0	4.2
OA2	3.5	4.1	3.7	5.0	4.0
OA3	3.5	4.3	4.0	5.1	4.1
CV1	3.9	4.0	4.0	5.0	4.0
CV2	4.0	4.1	3.8	5.0	4.5
CV3	3.8	4.2	4.0	5.0	4.1

Anexo 5.- Agentes aislados por microsilo al día o posinoculación.

Microsilo	<i>E. coli</i> hemolítica	<i>E. coli</i> no hemolítica	<i>S. choleraesuis</i>
EC1	+	+	-
EC2	+	+	-
EC3	+	+	-
SC1	-	+	+
SC2	-	+	+
SC3	-	+	+
CB1	-	+	-
CB2	-	+	-
CB3	-	+	-

+ = aislamiento positivo.

- = no se logró el aislamiento

Anexo 7.-Resultado de las diferentes pruebas de determinación de presencia e identificación viral por microsilo y días de ensilaje.

Microsilo	Prueba	Días de ensilaje					
		0	7	14	28	28NS	56
EA1	ECP	+	-	-	-	-	-
	IF	+	-	-	-	-	-
	HP	-	-	-	-	-	-
EA2	ECP	+	-	-	-	-	-
	IF	+	-	-	-	-	-
	HP	-	-	-	-	-	-
EA3	ECP	+	-	-	-	-	-
	IF	+	-	-	-	-	-
	HP	-	-	-	-	-	-
OA1	ECP	+	-	-	-	-	-
	IF	+	+	-	-	-	-
	Hg	-	-	-	-	-	-
OA2	ECP	+	-	-	-	-	-
	IF	+	+	-	-	-	-
	Hg	-	-	-	-	-	-
OA3	ECP	+	-	-	-	-	-
	IF	-	+	-	-	-	-
	Hg	-	-	-	-	-	-
CV1	ECP	-	-	-	-	-	-
	IF	-	-	-	-	-	-
	HP	-	-	-	-	-	-
CV2	Hg	-	-	-	-	-	-
	ECP	-	-	-	-	-	-
	IF	-	-	-	-	-	-
CV3	HP	-	-	-	-	-	-
	Hg	-	-	-	-	-	-
	ECP	-	-	-	-	-	-
	IF	-	-	-	-	-	-
	HP	-	-	-	-	-	-
	Hg	-	-	-	-	-	-

ECP = Efecto citopático

IF = Inmunofluorescencia

HP = Hemoaglutinación pasiva

Hg = Hemoaglutinación