



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CARACTERIZACION DE ENTEROBACTERIAS A PARTIR DE UN
SISTEMA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE
UNA GRANJA PORCINA A PEQUEÑA ESCALA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

MARIANA GARCIA DURAN

ASESORES: MCV. GERARDO RAMIREZ HERNANDEZ
MPA. ALEJANDRA MERCADILLO SIERRA



MEXICO, D. F.

2005

m. 341901



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres:

A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni con las riquezas más grandes del mundo; aunque se que su mayor riqueza es mi felicidad. Gracias.

“La cultura se adquiere leyendo libros; pero el conocimiento del mundo, que es mucho más necesario, solo se alcanza leyendo a los hombres y estudiando las diversas ediciones que de ellos existen.”

LORD CHESTERFIELD

AGRADECIMIENTOS

A dios por la vida tan hermosa que me ha dado.

A mis padres, gracias por su inmenso amor y apoyo en mis decisiones.

A mi hermano Enrique por estar siempre al pendiente de mí.

A Juan Carlos por todo su apoyo y dedicación que recibí durante mi carrera.

A mis amigas Ana, Diana, Claudia, Miriam, Gaby, Lilian y mi amigo Chucho que conocí durante la carrera, pero aún más fuera de ella.

Al Laboratorio del Departamento de Producción Animal: Cerdos, particularmente a la Dra. Alejandra Mercadillo Sierra y Esperanza Galván Pérez por todo el apoyo durante el trabajo del laboratorio y fuera del mismo; de igual manera a Raymundo y a Víctor por brindarme su tiempo para la realización de este trabajo y su amistad. También a la Dra. Rosalba Carreón y Carmen Mercado por su entera disposición cuando lo necesitaba.

Al Laboratorio de Microbiología Molecular especialmente a la Dra. Estela y el Dr. Daniel.

A las personas que integran el Departamento de Producción Animal: Cerdos.

A mis asesores el Dr. Gerardo Ramírez Hernández y Alejandra Mercadillo Sierra.

Al Dr. Roberto Martínez Gamba, por sus consejos.

A los integrantes del jurado Alejandro de la Peña Moctezuma, Marco Antonio Herradora Lozano, Arturo German Borbolla Sosa y Reyes López Ordaz.

A todos mis familiares y amigos que no necesito mencionar, porque están en mi mente y mi corazón. Gracias.

Al proyecto PAPPIT 223903: Sistema alternativo para el tratamiento y aprovechamiento de aguas residuales de granjas porcinas, propuesta para disminuir la contaminación ambiental.

CONTENIDO

ÍNDICE	PÁGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO GENERAL	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	34
LITERATURA CITADA	35
ANEXOS	41

LISTA DE CUADROS

PÁGINA

1. Promedio de enterobacterias (UFC/g) en agar MacConkey 23
2. Aislamiento de *Salmonella entérica* a partir de las muestras de cada una de las etapas del tratamiento. 23
3. Promedio de UFC/g de *E.coli*. 25

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

1.-Esquema del sistema de tratamiento.	13
2.Obtención de la muestra a partir de la fosa de sedimentación.	14
3.- Material para la realización de las diluciones décuples.	15
4.- Siembra de la muestra en agar MacConkey posterior a las diluciones.	15
5.- Muestras de aguas residuales inoculadas en caldo selenito (1) y caldo tetrionato(2).	16
6.- Bioquímica de <i>Salmonella enterica</i> serovariedad Choleraesuis donde trehalosa y arabinosa son negativas, ramnosa positiva.	17
7.- Agar MacConkey con colonias sospechosas a <i>Salmonella</i> entérica.	18
8.- Extracción de ADN de las muestras de aguas residuales.	19
9.- Agar MacConkey con colonias de <i>E. coli</i> con 24 h de sembrada.	21
10.- En el carril 1 y 15 se muestra el marcador de peso molecular, 2 y 16 el control (+) y en el carril 14 y 22 el control (-); en el resto de los carriles se encuentran las muestras de aguas residuales.	24

RESUMEN

GARCÍA DURÁN MARIANA. Caracterización de enterobacterias a partir de un sistema de tratamiento de aguas residuales de una granja porcina a pequeña escala. (Bajo la dirección de MCV. Gerardo Ramírez Hernández y MPA. Alejandra Mercadillo Sierra)

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *Salmonella*, así como la cuantificación de enterobacterias en la fracción líquida de los desechos porcinos obtenidos a partir de un tratamiento primario, el cual consiste en la separación de los desechos en una fracción sólida y una fracción líquida. Los puntos de muestreo fueron: cárcamo de colección (CC), líquido separado (LS) y fosa de sedimentación (FS). Las muestras se tomaron durante cinco semanas con dos repeticiones por cada punto de muestreo teniendo un total de 30 muestras. A cada muestra se le realizó la cuantificación de enterobacterias (UFC/g) así como el aislamiento y tipificación de *Salmonella* y aislamiento de *E. coli*. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza con el paquete estadístico SAS. Las etapas del tratamiento no mostraron diferencia estadística ($P > 0.05$) en la cuantificación de enterobacterias: CC (2.6×10^6 UFC/g), LS (2.1×10^7 UFC/g) y FS (9.0×10^6 UFC/g). En la misma manera para *E. coli* (UFC/g) tampoco mostró diferencia en las etapas del tratamiento: CC (6.4×10^5), LS (6.7×10^5) y FS (5.5×10^6). En relación al aislamiento y tipificación de *Salmonella* se encontró *Salmonella entérica* serovariedad Choleraesuis en las tres etapas: CC 20%, LS 40% y FS 30%. Concluyendo que el sistema de tratamiento primario de aguas residuales consistente en un cárcamo de colección, separador y fosa de sedimentación no elimina *Salmonella entérica* y no reduce la cantidad de enterobacterias en ninguna de sus etapas.

INTRODUCCIÓN

La porcicultura es la actividad pecuaria que se encuentra en primer lugar a nivel mundial en producción de carne con 93.3 millones de toneladas al año. México se ubica en el lugar número 18 a nivel mundial y, en segundo en Latinoamérica después de Brasil ⁽¹⁾. En la década de los 90's, la oferta de carne de cerdo en México creció a un promedio de 3.5%, ubicándose al final de la década en 994,186 toneladas, lo que colocó a la carne de cerdo como la tercera más consumida en nuestro país, con una disponibilidad per capita de 15.1 kg ⁽²⁾.

Actualmente la porcicultura es una actividad que tiende a concentrarse en grandes unidades de producción las cuales emplean tecnologías de punta en aspectos como sanidad, reproducción, genética, instalaciones y manejo en general. En México se observan básicamente tres diferentes sistemas de producción, caracterizados por su nivel tecnológico: 1) sistema tecnificado que se estima representa aproximadamente el 55% de la producción nacional; 2) sistema semitecnificado representando el 15% y el 3) sistema de traspatio que representa el 30% de la producción nacional ⁽³⁾. En nuestro país, un mayor nivel de tecnificación en la producción, significa una mayor cantidad de cerdos; contar con instalaciones adecuadas, elaborar su propio alimento, tener una alta genética entre otras. La porcicultura con una alta concentración de animales genera una gran producción de ruido, olores y sobre todo de desechos orgánicos a través de las heces y orina ⁽⁴⁾. Esta situación trae como consecuencia un aumento en la capacidad contaminante de la granja sobre todo en regiones del país que presentan una alta densidad de población porcina ⁽²⁾.

Ambientalmente se han identificado cuatro aspectos relevantes generados por la producción porcina: la gran concentración de animales en explotaciones poco tecnificadas; la falta de una relación con actividades agrícolas, que tiene como resultado la eliminación de los desechos porcinos (orina, excretas y alimento desperdiciado) en terrenos que no son agrícolas o su descarga en ríos o lagunas sin ningún tratamiento previo; alimentos mal balanceados que origina una gran cantidad de heces y contienen además una alta concentración de nitrógeno y fósforo; y el uso indiscriminado de agua que se utiliza para remover los desechos porcinos dentro de las granjas, contaminando así grandes cantidades de este recurso no renovable ⁽⁵⁾. En este sentido el tratamiento más utilizado en México por parte de los porcicultores no tecnificados es el físico que consiste en la dilución de los desechos porcinos en agua, para posteriormente sedimentar los sólidos y a continuación realizar una separación mecánica, con lo que se obtienen tanto una fracción líquida que es vertida a tierras de cultivo o cuerpos de agua, como una fracción sólida con 15-20% de humedad ⁽⁶⁾. En los sistemas de producción tecnificados la fracción líquida recibe un tratamiento biológico que consiste en lagunas de fermentación aerobias o anaerobias. En las lagunas aerobias intervienen bacterias que degradan la celulosa y la lignina contenidas en los desechos de la granja. Estas lagunas son de poca profundidad y las aguas tratadas pueden ser fuente de nutrimentos para el crecimiento de algas y peces ^(7,8). Las lagunas anaeróbicas reciben este nombre ya que este proceso se lleva a cabo en ausencia de oxígeno y con bacterias que forman ácido y metano. Estas lagunas requieren menor superficie pero mayor profundidad y el agua producida puede ser usada para riego de cultivos, crecimiento de peces y algas; y los sedimentos como fertilizantes o como materia prima para la alimentación ⁽⁷⁾.

En granjas con baja o nula tecnificación la eliminación de los desechos porcícolas se lleva a cabo sin ningún tratamiento y se vierten a terrenos cercanos a las granjas, a sistemas de drenaje público ó a cuerpos de agua como ríos y lagos. En algunas granjas de este tipo se han implementado sistemas de tratamiento primario consistentes en: la colección de todas las excretas en un cárcamo, seguido de la separación de los sólidos por un método físico, con un separador mecánico ⁽⁸⁾.

La excreta porcina contiene un alto porcentaje de materia orgánica, de la cual, sólo el 55% es biodegradable; además contiene algunos contaminantes como son minerales como cobre, zinc y arsénico ⁽⁵⁾, además de microorganismos patógenos citándose virus, parásitos y bacterias ⁽⁹⁾.

En el caso de las bacterias se ha establecido que una variedad de ellas pueden sobrevivir y multiplicarse en las heces de cerdo durante su almacenamiento. Entre estas se encuentran *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis*, *Brucella*, *Leptospira* y *Brachyspira hyodysenteriae* ⁽¹⁰⁾.

En cuanto a la fracción sólida se han realizado análisis bacteriológicos y se han buscado tratamientos para reducir la presencia de agentes bacterianos como son el ensilaje que elimina a *Salmonella* y *E. coli* después de 11 días ^(11,12) y la composta que elimina bacterias patógenas como *Salmonella* a una temperatura entre 64-67 °C por 2 a 3 semanas ^(13,14).

En relación al análisis bacteriológico de la fracción líquida se ha documentado la presencia de enterobacterias en lagunas aerobias y anaerobias ^(15,16); algunas investigaciones mencionan que enterobacterias como *Salmonella* puede sobrevivir durante varios meses y dar resultados positivos, aun cuando no existan animales infectados al momento de tomar la muestra ⁽¹⁷⁾. La fracción líquida de los desechos porcinos constituyen un problema serio de contaminación para ríos, lagos y tierras cercanas a las granjas, lo cual ha originado la necesidad de desarrollar un manejo adecuado o un tratamiento completo ^(6,18), que puede consistir en un tratamiento químico utilizando reactivos como cloruro férrico, cal y polímeros orgánicos que aumentan la eficiencia de la sedimentación y la filtración ⁽¹⁹⁾; o tratamientos naturales como el carvacrol y el timol que son antimicrobianos naturales y se encuentran en el orégano y el tomillo demostrando que reducen olores y patógenos inhibiendo la fermentación microbiana reduciendo micrororganismos anaerobios y eliminando coliformes fecales, por mencionar algunas alternativas ⁽²⁰⁾.

Características de *Salmonella enterica*

Es un miembro de la familia Enterobacteriaceae, bacilo Gram-negativo, móvil y anaerobio facultativo. Esta bacteria se puede multiplicar entre los 7 a 45 °C y sobrevive al frío y la desecación, persistiendo por semanas, meses o años en sustratos orgánicos con pH menores a 5. La habilidad para sobrevivir en el ambiente, así como su prolongado estado de portador en innumerables hospedadores asegura su distribución mundial, siendo la enfermedad zoonótica más encontrada ⁽²¹⁾.

Se reconocen actualmente 2213 serovariedades diferentes de las cuales más de 200 han sido aisladas de personas infectadas. Los cerdos pueden ser infectados por algunas serovariedades como son *S. Choleraesuis*, y *S. Typhisuis* que son los más adaptados; y *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* y *S. Derby* son los más frecuentes ⁽²²⁾.

Grandes cantidades de materia orgánica frecuentemente contaminadas con *Salmonella* resultan de una producción intensiva creando un problema de la disposición de las excretas, un ejemplo de ello es que se ha podido recuperar *Salmonella Choleraesuis* de heces secas después de 13 meses de almacenamiento ⁽²³⁾.

Al realizar un estudio para comparar la resistencia de *Salmonella* a los antimicrobianos a partir, por un lado de muestras de aguas residuales y por el otro muestras de órganos, alimento para animales y comida; se encontró en el primer caso que la resistencia a los antimicrobianos fue en el 92% de 24 muestras y en el segundo la resistencia fue del 27% de 934 muestras, demostrando que existe mayor resistencia antimicrobiana en muestras aisladas a partir de fuentes ambientales como son las aguas residuales que a partir de órganos, alimento para animales o comida. Respecto a las muestras tomadas del medio ambiente existió resistencia a 10 antimicrobianos, los tres principales fueron estreptomicina, tetraciclina y ácido nalidíxico ⁽²⁴⁾.

Características de *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram-negativo fermentador de la lactosa, componente de la microbiota normal del intestino. La mayoría de las serovariedades son saprofitas pero otras son patógenas y causan enfermedades en humanos y animales ⁽²⁵⁾. Las manifestaciones clínicas

más importantes son: enterotóxica, enterotoxémica o septicémica. La colibacilosis enterotóxica ocurre en lechones y becerros como un cuadro diarreico. A veces, la presentación depende del estado inmunitario del animal. La forma enterotoxémica se presenta en cerdos de 6 a 14 semanas asociándose al destete y factores nutricionales que permiten la proliferación de *E. coli* beta-hemolítica ⁽²⁶⁾.

La serotipificación es establecida mediante los siguientes antígenos: O (pared celular), K (cápsula o fimbria) y H (flagelar). Aproximadamente, existen 160 antígenos O, 100 antígenos K y 60 antígenos H. Ciertas serovariedades están asociadas a enfermedad, por ejemplo la serovariedad O157:H7 produce una citotoxina que esta asociada a colitis hemorrágica en el humano mientras que la serovariedad O157:NM (no móvil) produce una enterotoxina que causa diarrea en los lechones ⁽²⁵⁾.

Marco Legal para el tratamiento de aguas residuales

Por el riesgo que representan los desechos fecales por el potencial contenido de organismos patógenos para la salud animal y humana, existen en México cuatro leyes relacionadas con la protección ambiental, que son: la Ley General de Equilibrio Ecológico y de Protección al Ambiente, la Ley de Aguas Nacionales, la Ley General de Salud y la Ley Federal de Derechos ⁽⁸⁾. En enero de 1997 se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, con el objetivo de proteger su calidad y posibilitar sus usos. La aplicación de la norma es gradual y las fechas de cumplimiento son los años 2000, 2005 y 2010, según la carga contaminante medida por la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) con un parámetro mínimo de 10 mg/l y máximo de 150 mg/l o sólidos suspendidos totales (SST) con un parámetro mínimo de 10 mg/l y como máximo 125 mg/l, con un potencial de hidrógeno (pH) de 5 a 10 unidades ⁽²⁷⁾.

Para determinar la contaminación por patógenos se toma como indicador a los coliformes fecales. El límite máximo permisible para las descargas de aguas residuales vertidas a aguas y bienes nacionales, así como las descargas vertidas a suelo (uso en riego agrícola) es de 1,000 y 2,000 como número más probable (NMP) de coliformes fecales por cada 100 ml para el promedio mensual y diario, respectivamente ⁽²⁷⁾. Las desventajas de esta norma en cuanto a presencia de microorganismos es establecer un límite máximo permisible para coliformes fecales lo cual no se logra mediante un tratamiento primario, que es el tratamiento que muchos porcicultores realizan descargándola en cuerpos de agua o suelos agrícolas.

JUSTIFICACIÓN

El tratamiento primario consiste en una separación de los desechos porcinos que da como resultado una fracción sólida con cierto porcentaje de humedad y una fracción líquida. Respecto a la fracción sólida, se han realizado estudios bacteriológicos para determinar la presencia de agentes bacterianos; y se ha utilizado el ensilaje y la composta para disminuirlos. En la fracción líquida se ha hecho pocos estudios para determinar la presencia de agentes patógenos. Esto es importante ya que una gran parte de los porcicultores en México utiliza el tratamiento primario, donde la fracción líquida es descargada directamente a los cultivos o enviadas a ríos o lagos desconociendo el tipo y la carga de patógenos que contiene, con el riesgo de transmitirlo a otras poblaciones animales y humanas. De ahí la necesidad de evaluar el contenido de algunos patógenos en los líquidos eliminados mediante un tratamiento primario en un sistema semitecnificado a pequeña escala.

HIPÓTESIS

En una granja porcina semitecnificada a pequeña escala, el sistema de tratamiento de aguas residuales basado en la separación de sólidos y sedimentación no cambia la concentración de enterobacterias contenidas en la fracción líquida resultante.

OBJETIVO

Determinar la presencia de *Salmonella* y realizar la cuantificación de enterobacterias en la fracción líquida de los desechos porcinos de una granja semitecnificada a pequeña escala a partir del material del cárcamo de colección, del líquido separado y de la fosa de sedimentación, de un tratamiento primario.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en una granja porcina semitecnificada a pequeña escala ubicada en el municipio de Otumba al oriente del Estado de México. Es una explotación lechonera que tiene 100 hembras reproductoras y cuenta con un sistema de tratamiento primario que consiste en una recolección de los desechos porcinos de todas las áreas de la granja hacia un cárcamo de colección y posteriormente pasa por un separador mecánico de sólidos. Este separador consiste en una prensa de tornillo que exprime los desechos obteniendo así la fracción sólida y la fracción líquida, esta última a su vez es transportada a la fosa de sedimentación a través de un tubo separador ⁽⁶⁾.

Las medidas del cárcamo de colección (CC) son: 2.34 m de ancho, 3.06 m de largo y 5 m de altura al centro; la fosa de sedimentación (FS) mide 1.66 m de ancho, 1.95 m de largo y 2.43 m de altura.

Muestreo

Con base en estudios previos, se determinó que el paso del material líquido por el sistema de tratamiento primario tiene una duración de 6 días, por lo que cada muestreo se llevó a cabo una vez a la semana ⁽²⁸⁾.

El muestreo se repitió durante cinco semanas para establecer la homogeneidad del proceso. En cada semana se obtuvieron muestras iniciales a partir de los siguientes puntos de muestreo: el cárcamo de colección (CC), del líquido separado (LS) y de la fosa de sedimentación (FS) (**Figura 1**).

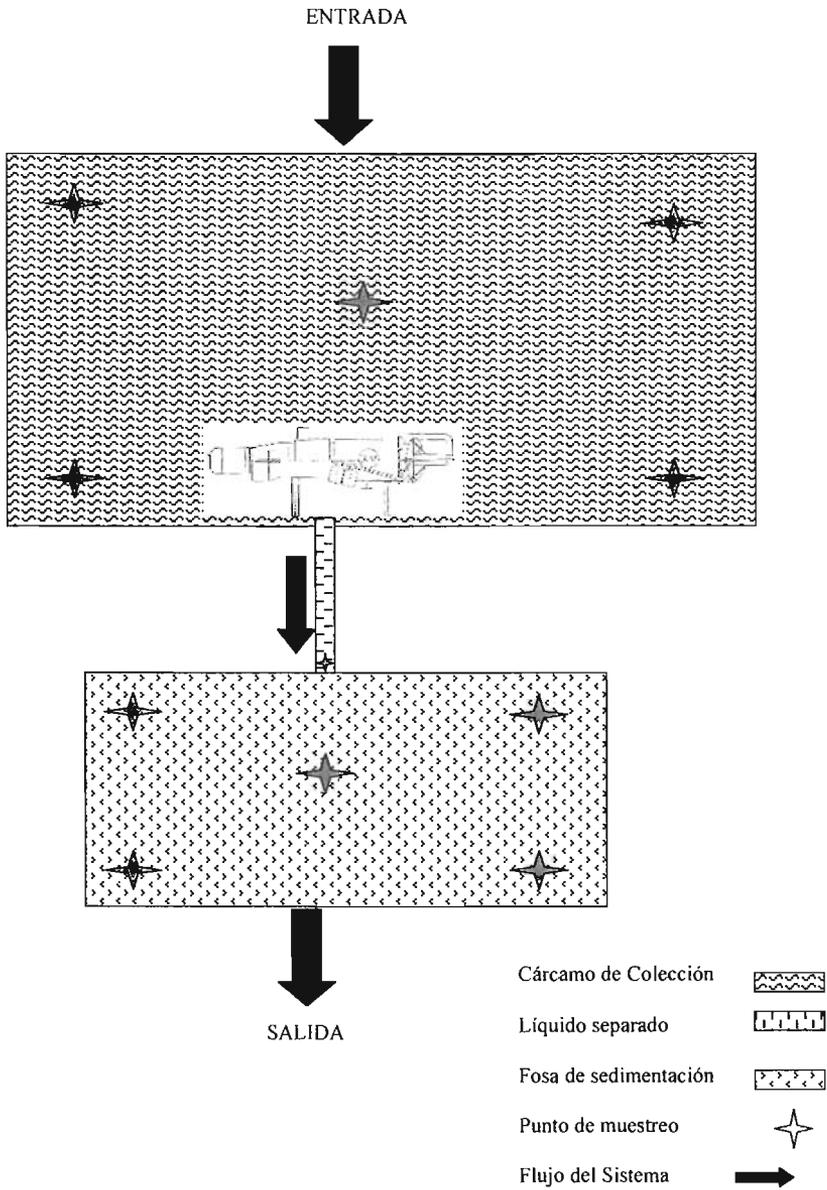


Figura 1. Esquema del sistema de tratamiento

Se colectaron muestras de 200 ml utilizando un dispositivo hidráulico, en cinco áreas diferentes de cada uno de los tres puntos de muestreo. Estas cinco muestras iniciales se mezclaron con el fin de obtener una muestra final de un litro para cada punto de muestreo (**Figura 2**). Las muestras finales se depositaron en recipientes de vidrio previamente esterilizados y se procedió a medir el pH con tiras reactivas y tomar la temperatura del líquido colectado (**Anexo 1**). Los frascos se identificaron y se colocaron en una caja de poliuretano con refrigerantes. Este procedimiento se repitió en cada muestreo y así se obtuvieron dos muestras por semana para cada punto de muestreo (30 muestras en total). Las muestras se conservaron en refrigeración a 4 °C durante el traslado de la granja al laboratorio.



Figura 2. Obtención de la muestra a partir de la fosa de sedimentación

Análisis bacteriológico.

Este se realizó en el laboratorio de diagnóstico del Departamento de Producción Animal: Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Conteo de enterobacterias

El conteo de enterobacterias se realizó por medio de diluciones décuples seriadas a partir de 10^{-1} hasta 10^{-10} , colocando 1 ml de muestra en 9 ml de solución salina fisiológica estéril (SSF) (Figura 3). A partir de cada dilución se tomaron 50 μ l y se sembraron en agar MacConkey ⁽¹⁾ (MC), se procedió a su incubación a 37 °C durante 24 h (Figura 4). Posteriormente se registró el número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) ¹².



Figura 3. Material para la realización de las diluciones décuples seriadas



Figura 4. Siembra de la muestra en agar MacConkey posterior a las diluciones.

⁽¹⁾ Bioxon. Becton Dickinson de México. Catalogo 210900 (REF 4300109)

Aislamiento e identificación de *Salmonella entérica*

El aislamiento e identificación de *Salmonella* se realizó tomando 10 ml de cada muestra del CC, LS y FS que se inocularon en 90 ml de caldo selenito de sodio⁽¹⁾ así como en caldo tetrionato⁽²⁾ para posteriormente incubarse a 37 °C durante 18 a 24 h (Figura 5).



Figura 5. Muestras de aguas residuales inoculadas en caldo selenito (1) y caldo tetrionato (2).

Después de este tiempo se resembraron por la técnica de hisopo en agar *Salmonella-Shigella*⁽³⁾ (SS) y verde brillante⁽⁴⁾ (VB), a las 24 h se hizo una segunda resiembra en SS y VB. Al tercer pase se dio por concluida la presencia o no del agente ⁽²⁹⁾.

Las cajas con presencia de colonias sospechosas a *Salmonella* que en el caso del SS son transparentes con un punto negro al centro y en VB son de color rosa, se tomaron con el asa microbiológica y se realizó un frotis, si las colonias eran bacilos Gram negativos se tomó una colonia para resembrarla en una placa con agar SS y VB para su purificación. A las 24 h posteriores a la resiembra se realizó su identificación a través de pruebas bioquímicas sembrándolas en Agar Hierro Tres Azúcares (TSI), medio de SIM, Agar

⁽¹⁾ Bioxon. Becton Dickinson de México. Catalogo 220300 (REF 4300203)

⁽²⁾ Bioxon. Becton Dickinson de México. Catalogo 211683 (REF 4300120)

⁽³⁾ Bioxon. Becton Dickinson de México. Catalogo 214400 (REF 4300144)

⁽⁴⁾ Bioxon. Becton Dickinson de México. Catalogo 211708 (REF 4300124)

Citrato de Simmons, urea, malonato, ramnosa, arabinosa y trehalosa (**Figura 6**), incubándose durante 24 h a 37 °C ⁽³⁰⁾.

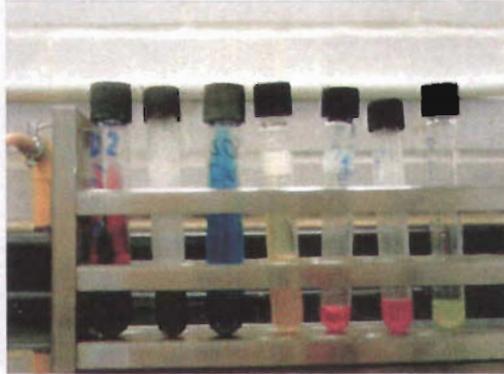


Figura 6. Bioquímica de *Salmonella entérica* serovariedad Choleraesuis donde trehalosa y arabinosa son negativas: ramnosa positiva.

Para corroborar el serogrupo se utilizó antisuero de *Salmonella* grupo C₂, grupo somático O (*Salmonella* O Grupo C₂, factores 6, 8)⁽¹⁾ colocando 50 µl en una placa de vidrio y tomando con una asa bacteriológica colonias a partir de MacConkey previamente sembrado con *Salmonella* (**Figura 7**). Se homogeneizó el antisuero con las colonias, si durante los 3 primeros minutos hubo aglutinación, la reacción se considero positiva.

⁽¹⁾ Difco. Distribuido en México por Becton Dickinson de México. Catálogo 222641



Figura 7. Agar MacConkey con colonias sospechosas a *Salmonella* entérica.

Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *Salmonella*

Para confirmar la ausencia o presencia del agente se realizó la técnica de PCR con los iniciadores invA-MFF1 e invA-MFF2.

De las 30 muestras obtenidas se redujeron a 15, ya que eran dos muestras para cada punto de muestreo.

La técnica se realizó en el Laboratorio de Microbiología Molecular, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Extracción del ADN

Se colocaron 15 μ l de la muestra en un vial, se centrifugó a 12 mil revoluciones por minuto (rpm) durante 15 min. Terminada la centrifugación se **agrega**ron 100 μ l de solución buffer (TE), EDTA, proteínasa K y 100 ml de SDS al 10%.

Los viales se pusieron a baño María a 56 °C durante 30 minutos, posteriormente se adicionó a cada vial 190 µl de fenolcloroformo. Se realizó una segunda centrifugación a 1200 rpm por 20 segundos para obtener el ADN y depositarlo en otros viales (**Figura 8**). A cada muestra se le agregó metanol (por cada volumen que hubiera de ADN se agregaban 100 µl) y acetato de sodio 3 molar pH 6 (por cada 100 µl de metanol se agregaron 10 µl de acetato de sodio).



Se realizó una centrifugación en condiciones de refrigeración a 13,500 rpm a 4 °C por 20 minutos y se separó el sobrenadante colocándolo en otros viales para secar por centrifugación al alto vacío. Después de secar la preparación se agregaron a cada vial 15 µl de TE.

Por otro lado se preparó el gel con 80 µl de Tris-acetato de sodio (TAE) al 10% y 0.8 gr. de agarosa; se calentó, se dejó enfriar y se vació en la cámara de electroforesis.

Se tomaron 5 μ l de buffer de carga (sucrosa, bromofenol y Xylene Cyanol) con la pipeta y se mezclaron con 5 μ l de la muestra para depositarse en cada uno de los pozos de la cámara de electroforesis; realizando el mismo procedimiento para cada una de las muestras. La cámara se programó con 90 voltios, terminando la prueba, el gel se colocó en bromuro de etidio por 7 minutos para posteriormente introducirse en la cámara de lectura y observar la presencia de ADN.

Amplificación del ADN

En otros viales se agregaron 25 μ l de agua y se le adicionaron: 5 μ l de buffer 10X, 4.5 μ l de Cloruro de Magnesio, 2.5 μ l de dNTP, el ADN extraído, 2 μ l de iniciadores, 4 μ l de albumina, 4 μ l de Triton y 1 ml de Taq polimerasa.

Las muestras se centrifugaron y posteriormente se introdujeron al termociclador siguiendo las siguientes condiciones: a) Desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos. b) Repetir 30 veces tanto la desnaturalización como el alineamiento a 94 °C y 55 °C por 30 segundos, respectivamente. c) Extensión a 72 °C durante 30 segundos. d) Por ultimo, la extensión final a 72 °C por 7 minutos.

Se realizó nuevamente la preparación del gel y los procedimientos posteriores a esté anteriormente mencionados. Cabe señalar que en el carril 1 y 15 se colocó el marcador, en el carril 2 y 6 el control **positivo (+)** y en el carril 14 y 22 el control **negativo (-)**.

Aislamiento de *E. coli*

El aislamiento de *E. coli* se realizó a partir de las mismas muestras tomadas del CC, LS y FS sembrando 1 ml en agar MacConkey; e incubándolo a 37 °C durante 24 h. Al término de este tiempo se seleccionaron colonias sospechosas a *E. coli* (de color rosa, grandes y mucoides) para realizarles un frotis. Aquellas que fueron Gram negativas y de morfología coco-bacilar se resembraron en agar MacConkey (**Figura 9**), a las 24 h se realizó la bioquímica corta que consiste en TSI, medio de SIM, agar citrato de Simmons y urea, se incubaron durante 24 h y posteriormente se procedió a realizar la lectura ^(12, 31) y registrarlo en un formato de identificación bacteriana (**Anexo 2**).

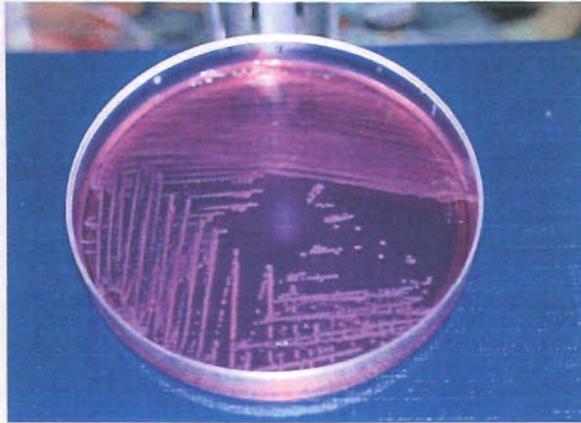


Figura 9. Agar MacConkey con colonias de *E. coli* con 24 h de sembrada.

Análisis estadístico

Los resultados de las unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) para el conteo de enterobacterias y *E. coli* de las muestras tomadas de CC, LS y de FS, se transformaron obteniendo el logaritmo base 10; con los datos así transformados se llevó a cabo el análisis de varianza, por medio del paquete estadístico SAS (Statistic Analysis System, 1998) utilizando el siguiente modelo:

$$\gamma_{ij} = \mu + A_i + e_{ij}$$

donde:

γ_{ij} = variable de respuesta.

μ = media general.

A_i = Efecto del tipo de muestra (1 = cárcamo de colección, 2 = líquido separado, 3 = Fosa de sedimentación), $i = 1, 2, 3$

e_{ij} = error experimental.

Los resultados del aislamiento de *Salmonella* se representaron en porcentaje.

RESULTADOS

Conteo de enterobacterias

No hubo diferencia estadística ($p < 0.05$) en el conteo de enterobacterias en cada una de las etapas del sistema de tratamiento de agua residual (**cuadro 1**).

Cuadro 1. Promedio de enterobacterias (UFC/g) en agar MacConkey.

Tipo de muestra	n	\bar{x} UFC/g	D. S.
Cárcamo de colección	10	2.6×10^6	1.5×10^6
Líquido separado	10	2.1×10^7	6.2×10^7
Fosa de sedimentación	10	9.0×10^6	2.4×10^7

n.- Tamaño de muestra

\bar{X} UFC/g.- Promedio de unidades formadoras de colonias por gramo de heces.

D.S.- Desviación estándar

Aislamiento y Tipificación de *Salmonella* entérica serovariedad Choleraesuis

En forma general se realizó el aislamiento de *Salmonella* en 9 de 30 muestras de las diversas etapas del tratamiento, lo que representa el 30%. Para cada tipo de muestra se obtuvieron los siguientes porcentajes: CC 20, LS 40 y FS con 30 (**cuadro 2**).

Cuadro 2. Aislamiento de *Salmonella* a partir de las muestras de cada una de las etapas del tratamiento.

Tipo de Muestra	N	Aislados	Porcentaje (%)
Cárcamo de colección	10	2	20
Líquido separado	10	4	40
Fosa de sedimentación	10	3	30

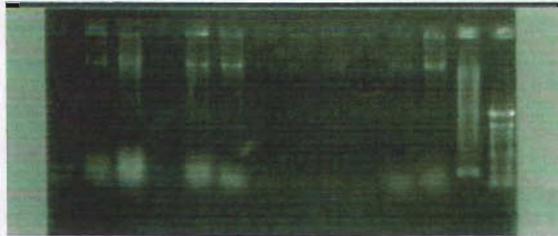
n.- Tamaño de muestra

Al realizar la tipificación mediante pruebas bioquímicas y el antisuero se encontró que el 100% de las muestras aisladas fueron positivas a *Salmonella entérica* serovariedad Choleraesuis (**Anexo 3**).

Detección de *Salmonella* por la Técnica de PCR

Los resultados para la detección de *Salmonella entérica* fueron negativos mediante la técnica de PCR (**Figura 8**).

(14) (13)(12)(11)(10)(9) (8) (7) (6) (5) (4) (3) (2) (1)



(22) (21)(20)(19)(18)(17) (16)(15)

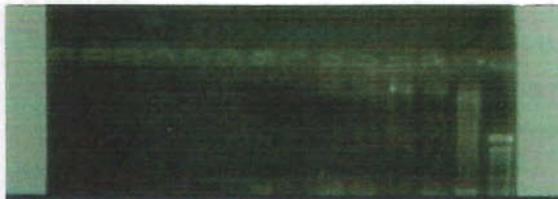


Figura 10. En el carril 1 y 15 se muestra el marcador de peso molecular, 2 y 16 el control (+) y en el carril 14 y 22 el control (-); en el resto de los carriles se encuentran las muestras de aguas residuales.

Conteo de *E. coli*

Cuadro 3. Promedio de UFC/g de *E. coli*

Tipo de muestra	n	\bar{x} UFC/g	D.S.
Cárcamo de colección	10	6.4×10^5	7.4×10^5
Líquido separado	10	6.7×10^5	8.6×10^5
Fosa de sedimentación	10	5.5×10^6	1.8×10^7

n.- Tamaño de muestra

\bar{x} UFC/g.- Promedio de unidades formadoras de colonias por gramo de heces.

D.S.- Desviación estándar

DISCUSIÓN

Enterobacterias

En el presente estudio, el conteo de enterobacterias fue de 2.6×10^6 , 2.1×10^7 y 9.0×10^6 UFC/g, a partir del cárcamo, separador y fosa de sedimentación respectivamente. En estudios anteriores Martínez *et al.* ⁽¹²⁾ reportaron valores de 1.6×10^5 en el efluente o cárcamo y 8×10^4 en la fosa de sedimentación. Ramírez ⁽²⁸⁾ encontró valores muy similares para el cárcamo (1.5×10^5) y, sin embargo para la fosa de sedimentación los valores aumentaron 3.9×10^5 , en relación al trabajo realizado por Martínez *et al.* Ambos autores obtuvieron valores inferiores a los obtenidos en este estudio; esta disparidad se debe a condiciones como el tiempo de los desechos en el corral, el drenaje, la exposición con desinfectantes o por el tiempo de retención del material de desecho en las etapas del tratamiento, al respecto Mateu *et al.* ⁽¹⁶⁾ realizaron el muestreo de la fosa de sedimentación con 10, 14 y 18 días de retención del material y encontraron valores iniciales de 2.11×10^9 UFC/g. Sin embargo, conforme el tiempo de retención se incremento, se reportó un valor de 2.87×10^7 al día 18. Este valor fue superior a lo encontrado en este estudio. Factores como la fermentación aeróbica o anaeróbica modifican la presencia de coliformes, dado por el tiempo de retención y la remoción continua del material, que podrían ser responsables de esta diferencia entre ambos trabajos. Además en el presente estudio el tiempo máximo de retención de la muestras (cárcamo y fosa de sedimentación) fue de 6 días, por lo que se desconoce si un mayor tiempo de muestreo (18 días) podría repercutir en el conteo bacteriano.

Las muestras tomadas en las diferentes etapas del tratamiento no muestran cambios significativos entre estas, a pesar de que cada muestreo se tomó de manera rigurosa e independiente.

La supervivencia de las bacterias también está dada por la temperatura, el contenido de sólidos y el pH. Existen estudios que indican que durante el almacenamiento de los desechos porcinos el pH baja de 7.5 hasta 6.5 durante el primer mes; debido a la producción de ácidos grasos con efecto tóxico. Conforme el tiempo de almacenaje se incrementa, el pH vuelve a subir a niveles de 7.0 ⁽⁹⁾. Contrariamente en este trabajo el almacenamiento de los desechos porcinos duró únicamente 6 días y el pH final fue de 7.5 a 8.5. Posiblemente la cantidad de agua que se le adiciona actuó como un agente diluyente que impidió la acidificación de los desechos almacenados.

Aislamiento de Salmonella entérica

El aislamiento de *Salmonella* para cada una de las etapas fue: cárcamo 20 %, separador 40 % y fosa de sedimentación 30 %. En estudios similares Rajic *et al.* ⁽³²⁾ lograron aislar el agente en el 31.76% de los casos a partir de 85 muestras del material del desagüe (25 g/ml), comparativo con la etapa del cárcamo de este estudio existió una variación del 11.76%.

Iñigo ⁽¹⁵⁾ no detectó ninguna muestra positiva a *Salmonella* a partir del efluente de cinco granjas porcinas con un tratamiento de fermentación aeróbica; quizás porque no se encontraba el agente o el tratamiento eliminó a la bacteria. Por otro lado, Jones ⁽¹⁷⁾ aisló *Salmonella* en 76% de las muestras obtenidas a partir de la fracción líquida almacenada por 30 días, concluyendo que esta bacteria puede sobrevivir en la fracción líquida varios meses.

aun cuando no existan animales infectados al momento de tomar la muestra. Por último Ramírez ⁽²⁸⁾ encontró *Salmonella* Enteritidis en granjas ubicadas en la región central de México en 7 de 20 muestras del efluente (35%) de 6 granjas porcinas y 14 de 17 muestras de la fosa de sedimentación (70%) en 8 granjas, demostrando la presencia de este agente en esa región.

La variación de los porcentajes en este estudio para cada una de las etapas estuvo determinada por la dificultad del aislamiento en algunas muestras; ya que los medios de cultivo se contaminaban con la presencia de otras bacterias, lo que evitaba la obtención de las colonias bacterianas sospechosas a *Salmonella*.

En un estudio realizado por Hozowski y Wasyl ⁽²⁴⁾ donde aislaron 6 muestras positivas a *Salmonella* de 11 (54.5%) a partir del efluente, 27 positivas de 123 muestras (21.9%) del sedimento y 5 positivas de 24 (20.8%) en la composta. Observaron que era mayor la presencia de este agente en el efluente, similar a lo resultados del separador en el presente estudio ⁽¹³⁾.

El riesgo de transmisión de *Salmonella* a través de los desechos líquidos es evidente en el trabajo realizado por Baloda *et al.* ⁽³³⁾ quienes seleccionaron una granja porcina con antecedentes recurrentes de problemas entéricos, asperjaron la fracción líquida en un campo de cultivo. Tomaron 10 muestras después de la aspersión al día 0, 2, 6 y 14; el aislamiento de *Salmonella* se logró en el 90% de las muestras inmediatamente después de la aspersión. 70%, 50%. 50% de los aislamientos fueron positivos a 2, 6 y 14 días, respectivamente. Por

eso la importancia de darle un tratamiento a la fracción líquida ya que esta bacteria puede sobrevivir en el ambiente por algún tiempo.

Tipificación de *Salmonella*

Al realizar la tipificación de *Salmonella* el 100% fue *Salmonella enterica* serovariedad Choleraesuis. Baggesen ⁽³⁴⁾ encontró 30 diferentes serovariedades de *Salmonella* de 832 cerdos (6.2%). La serovariedad predominante fue *S. Typhimurium* en 536 (64.4%) de los aislamientos y solamente se encontró *S. Enteritidis* en 5 cerdos (0.6%). En este caso el tipo de muestra es diferente y la variación de las serovariedades está dado por condiciones geográficas y ambientales.

Otros autores como Rajic *et al.* ⁽³²⁾ también han determinado la presencia de algunas serovariedades de *Salmonella* en las excretas quienes encontraron 15 serovariedades diferentes, las más frecuentes fueron *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Infantis*, y *S. Enteritidis*. Yung *et al.* ⁽³⁵⁾ aislaron *Salmonella* en 50 muestras y 27 serovariedades fueron notificadas, entre las que están: *Salmonella Typhimurium* (30%), *S. Derby* (16.1%), *S. Schwarzengrund* (14.9%), *S. Mbandaka* (6.3%), *S. Enteritidis* (6.3%), *S. Litchfield* (3.3%), *S. Braenderup* (3.0%), *S. Aardwick* (3.0%), *S. Rissen* (2.3%), *S. Agona* (2.0%), *S. London* (2.0%), *S. Newport* (1.3%), *S. Ruiru* (1.0%), *S. Bredeney* (0.8%) y dos aislamientos de *S. Tennessee*, *S. Kinshasa*, *S. Emsbuettel*, *S. Thomasville* y uno de *S. Havana*, *S. Langensalza*, *S. Cubana*, *S. Senftenberg*, *S. Montevideo*, *S. Brandenburg*, *S. Orion*, *S. Anatum*, y *S. Westhamptom*.

Davies *et al.* ⁽³⁶⁾ aislaron *Salmonella* en 95 de 729 (12%) muestras fecales, las serovariedades identificadas fueron *S. Derby*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Mbandaka*, *S. Worthington* y *S. Tennessee*.

Las serovariedades encontradas en las excretas por estos autores tiene su importancia porque *Salmonella* es una zoonosis y más de 200 serovariedades han sido aisladas en humanos ⁽²²⁾.

En relación a la presencia de algunas serovariedades de *Salmonella* en la fracción líquida están los estudios realizados por Chandler y Creven ⁽³⁷⁾ quienes aislaron *Salmonella* Havana del efluente y Henry *et al.* ⁽³¹⁾ aislaron 11 serovariedades de *Salmonella* a partir de una laguna facultativa, así como del efluente de tres granjas.

Salmonella entérica serovariedad Choleraesuis encontrada en este estudio, según Baloda *et al.* ⁽³³⁾ es uno de las serovariedades que no sobrevive fuera del hospedador por mucho tiempo. Sin embargo, Martínez-Gamba *et al.* ⁽¹²⁾ determinaron la presencia de *Salmonella* Choleraesuis en la fracción líquida obtenida a partir del separador de sólidos; de la misma manera que fue obtenido en este estudio en las tres etapas del tratamiento con 6 días de almacenamiento.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *Salmonella*

Strauch y Ballarini⁹ mencionan que una pequeña cantidad de enterobacterias como *Salmonella* pueden ser aisladas fácilmente mediante medios de cultivo, sin embargo en el presente trabajo se realizó la técnica de PCR para mayor confiabilidad de la presencia de *Salmonella* en cada una de las muestras, y el resultado fue negativo.

Para la extracción del ADN las muestras se sometieron a una extracción alcalina. Sin embargo, Moller ⁽³⁸⁾ en la extracción del ADN a partir de excretas para determinar la presencia de *Lawsonia intracelularis*, hirvió las muestras por 15 minutos; estas muestras contenían 0.1 g de heces en 300 ml de buffer lisis (50 Mm Tris-HCl), 1 Mm EDTA 0.5%. Tween-20, y posteriormente se realizó la centrifugación por 30 segundos en 100g de agua Milli-Q diluido 1:100 y almacenado a -20°C para su posterior procesamiento. Por otra parte, García *et al.* ⁽³⁹⁾ realizaron la extracción de ADN para determinar la presencia de *Lawsonia intracelularis* a partir de mucosa intestinal y excretas. Para estos dos tipos de muestras la extracción de ADN tuvo sus variantes, en el primer caso se raspo la mucosa y se le adicionó 950 µl de solución de lisis y 50 µl de suspensión de tierras diatomeas para posteriormente agitarse y centrifugarse. En el segundo caso, las muestras a partir de las excretas se homogeneizaron con agua destilada y posteriormente pasaron por un cedazo para eliminar partículas grandes, colocaron 400 µl del filtrado en cada vial y le añadieron 950 µl de solución de lisis y 50 µl de suspensión de diatomeas. Entendiendo con lo anterior que a pesar de que se busca un mismo agente, por ser distinta la muestra, el proceso para la extracción de ADN tendrá sus variaciones, por lo que un resultado negativo en la técnica de PCR se debe a diversas circunstancias como la inexistencia de la bacteria, prueba no estandarizada o la muestra de ADN deseada se haya contaminado ⁽⁴⁰⁾. En el caso de la detección de bacterias por la técnica de PCR en aguas residuales Waage *et al.* ⁽⁴¹⁾ mencionan que el mayor obstáculo es la presencia de sustancias húmicas las cuales son sustancias inhibitorias para la técnica de PCR.

Conteo de *Escherichia coli*

Los valores obtenidos del conteo de *E. coli* en el presente estudio del cárcamo fueron 6.4×10^5 , separador 6.7×10^5 y fosa de sedimentación 5.5×10^6 UFC/g. El conteo de las tres etapas fue más alto que lo obtenido por Ramirez ⁽²⁸⁾ que fue de 5.3×10^4 UFC/g y Mateu *et al.* ⁽¹⁶⁾ 1×10^4 UFC/g en el efluente. Sin embargo, fue similar a lo obtenido por Iñigo *et al.* ⁽¹⁵⁾ quienes estudiaron la contaminación por coliformes en los desechos fecales procesado en forma aeróbica que fue de 1.1×10^5 .

Factores como la temperatura y el tiempo modifican la cantidad de *E. coli* como lo describen Jiang *et al.* ⁽⁴²⁾ quienes demostraron que este agente disminuye a los 7 días a 15 °C de 0.5 a 2 log₁₀ UFC/g en excretas mezcladas con tierra.

En cuanto a la presencia de *E. coli* enteropatógena en las excretas, investigadores como Van der Wolf y Peperkamp ⁽⁴³⁾ aislaron a la bacteria en un 20.02% en 451 muestras. Además de que en estudios previos han demostrado que bacterias patógenas como *E. coli* O157:H7 ha podido sobrevivir de 42-49 días a 37 °C, de 49-56 días a 22 °C y de 63 a 70 días a 5 °C en excretas de bovino ⁽⁴⁴⁾. Un ejemplo de su superviviencia es el trabajo realizado por Ethan *et al.* ⁽⁴⁵⁾ quienes aplicaron excretas a la tierra y la mezclaron, para posteriormente dispersarlas sobre las lechugas, encontrando por medio de microscopia epifluorescente a la bacteria en el tejido de la planta a pesar de la acción de agentes sanitizantes para su eliminación.

Por otro lado, Chern *et al.* ⁽⁴⁶⁾ determinó la presencia de genes asociados a las toxinas de *E. coli* enterotoxigénica (LTIIa y STII) y *E. coli* enterohemorrágica (*stxI*, *stxII* y

eaeA) durante un año en lagunas de fermentación destinadas al uso agrícola encontrando una alta prevalencia de estas toxinas.

CONCLUSIONES

El sistema de tratamiento primario de aguas residuales consistente en un cárcamo de colección, separador y fosa de sedimentación no elimina *Salmonella entérica*.

Este sistema de tratamiento no reduce la cantidad de enterobacterias en ninguna de sus etapas.

LITERATURA CITADA

1. Pérez ER. Porcicultura intensiva en México. 1999 Oct-Dec [www.fao.org.docrep/x17t/x1700t03.htm](http://www.fao.org/docrep/x17t/x1700t03.htm)
2. SAGAR. 2000. Centro de Estadística Agropecuaria, SAGAR. <http://www.sagar.gob.mx> Sierra y Cuarón 1995.
3. Lastra MIJ, Peralta AMA, Villamar A, Ortega MA, Segura MC, Barrera WMA, et al. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de porcino en México 2000: (27 pantallas) <http://www.sagar.gob.mx>
4. León DJS. Impacto ecológico de la producción animal intensiva. El caso de la porcicultura. En: La producción porcicola en México: Contribución al desarrollo de una visión integral. Editor: Luis Kato Maldonado. Universidad Autónoma Metropolitana, 1995 pp. 277-290.
5. Pérez ER. Porcicultura y medio ambiente. Memorias II Seminario de Manejo y Reciclaje de Residuos Porcinos; 1997 octubre 22-25; Querétaro, México: Consejo Mexicano de Porcicultura, 1997: 10-12.
6. Taiganides PE. Pig waste management and pollution control. Proceedings of the XIV Panamerican Veterinary Sciences Congress; 1994 octubre 8-12, Acapulco (Guerrero): México. PANVET, 1994: 313-322.
7. Liceaga MM. Manejo de excretas en granjas porcinas: Estudio recapitulativo (tesis de licenciatura). México D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 1994.

8. Taiganides PE, Pérez ER, Girón SE. Manual para el manejo y control de aguas residuales y excretas porcinas en México. Consejo mexicano de porcicultura; 1996: 77-78.
9. Strauch D, Ballarini G. Hygienic aspects of the production and agricultural use of animal wastes. J Vet Med B 1994; 41: 176-228.
10. Olson LD Survival of *Serpulina hyodysenteriae* in a effluent lagoon. J Am Vet Med Ass 1995; (207):1470-1472.
11. Day DL. Aprovechamiento de excretas animales, como ingredientes para raciones alimenticias. Porcira 1988; 11 (134):41-55.
12. Martínez-Gamba R., Pradal-Roa P, Castrejon, PF, Herradora M, Galvan E., Mercado C. Persistence of *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, Aujeszky's Disease virus, Blue Eye Disease virus in ensilages based on the solid fraction of the faeces. J Appl Mic 2001; (91): 750- 758.
13. Plym FL, Ekesbo I. Survival of Salmonellas in composted and not composted solid animal manures. J Vet Med B 1993; 40: 654-658.
14. Salmonella elimination during of spent pig litter. Elsevier Science. Bio Tech 1998; 63: 193-196
15. Iñigo DC, Angelo IS, Soto AC, Alcalinos H. Caracterización bacteriológica y parasitológica de desecho fecal porcino en Chile. Avances en Ciencias Veterinarias 1991; 6 (1):23-28.
16. Mateu A, Mata-Alvarez J, Parés, R. Enterobacterial and viral decay experimental models for anaerobic digestion of piggery waste. App Mic Bio 1992; (38): 291-296.

17. Jones WP. The effect of temperature, solids content and pH on the survival of Salmonellas in cattle slurry Br Vet J 1976; (132):284-293.
18. Molina RR. Utilización de la cerdaza en la alimentación animal. Memorias del II seminario de Manejo y Reciclaje de Residuos Porcinos; 1997 octubre 22-25; Querétaro, México: Consejo Mexicano de Porcicultura, 1997: 63-65.
19. Caruso M, Maero E, Arechavaleta RM.: Industrias Cármicas, residuos, su tratamiento y prevención de la contaminación. Seminario de la Carrera de Especialización en Ciencias Químicas y Ambiente; 2002 diciembre; Buenos Aires Argentina: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires, 2002: (45 pantallas) www.ba.ucs.edu.ar/ambiente/publieg/pegre004.doc
20. Varel HG. Carvacrol and Thymol reduce swine waste odor and pathogens: stability oils. Current Microbiology 2002; 44: 38-43.
21. Straw EB, Sylvie D, Mengeling LW, Taylor JD. Disease of swine. 8ª ed. Ames Iowa, USA: Iowa State Press, 1999.
22. Darwich L, Torre E, Martin M, Mateu E. Multiresistant Salmonella strains isolated from pigs in Catalunya, 1998-2000 Proceedings 16 th International Pig Veterinary Society Congress, 2000:222
23. Gray JT, Fedorka-Cray PJ. Survival and infectivity of *Salmonella choleraesuis* in swine feces. Journal of Food Protection 2001;64:945-949.
24. Hoszowski A, Wasyl D. *Salmonella* spp. found in waste, sewage sludge, compost and their antimicrobial resistance. Bull Vet Inst Pulawy 2001; 45: 163-170.

25. Gyles LC, Thoen OC. Patogenesis of bacterial infections in animal. Ames Iowa USA: Iowa State University Press, 1993.
26. Trigo TF. Patología Sistémica Veterinaria.3ª ed. México D.F: McGraw-Hill Interamericana, 1998.
27. NOM-001-ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
www.semarnat.gob.mx
28. Ramírez HG. Evaluación microbiológica de excretas porcinas sólidas y frescas de 10 granjas ubicadas en la región central de México (tesis de maestría). México D. F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 2002.
29. Koneman WE, Allen DS, Dowell RV, Sommers MH. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia: J.B. Lippincott company, 1979.
30. Carter GR. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 3th ed. Springfield, USA: C.C. Thomas, 1979.
31. Henry DP, Frost AJ, O' Boyle DA, Cameron RD. The isolation of salmonellas from piggery waste water after orthodox pondage treatment. Aus Vet J 1995. 72; (12): 478-479.
32. Rajic A, Keenlside J, McFall M, Wu J, Chow E, Deckert A, *et al.* Salmonella occurrence and setotype diversity on 90 finishing farms in Alberta. 17th Congress of the International Pig Veterinary Society, 2002a; vol 1: 315.

33. Baloda BS, Christensen L, Trajcevska S. Persistence of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 clone in a piggery and agricultural soil amended with Salmonella- contaminated slurry. *App and Env Mic* 2001; 67 (6): 2859- 2862.
34. Baggesen DL, Wegener HC, Bager F, Stege H, Christenson J. Herd prevalence of *Salmonella enterica* infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. *Preventive Veterinary Medicine*. 1996; 26: 201-213.
35. Yung BY, Cho KH, Lee HS, Jyeong JS, Klim BH. Serotypes and antimicrobial susceptibility of salmonella from korean pigs. 17 th Congress of the International Pig Veterinary Society, 2002a; vol 1: 315.
36. Davies P, Funk J, Turkson P, O'Carroll J, Nichols M, Gebreyes W. Effects of methods on the isolation of Salmonellas from preweaning piglets with diarrhoea in Vietnam. 17 th Congress of the International Pig Veterinary Society.2002; vol.2: 42.
37. Chandler DS, Creven JA. A note on the persistence of the *Salmonella* Havana and fecal coliforms on a naturally contaminated piggery effluent disposal site. *J App Bac* 1981;51: 45-49.
38. Moller K, Jensen TK, Jorsal SE. Bacteriological examination and PCR analysis of feces from growing pigs originating from herds with and without diarrhea 14 th Congress of the International Pig Veterinary Society, 1996: 325.
39. García L, Socci G, Barrón L, Arriaga C, Morilla A. Diagnóstico de ileitis porcina por medio de la reacción en cadena de la polimerasa *Vet. Mex* 1998; 29 (3): 263-267.
40. Alcamo E. *DNA Technology The awesome Skitt*. 2nd edition. California, USA: Harcourt Academic Press, 2001.

41. Waage AS, Vardund T, Lund V, Kapperund G. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. *J App Mic* 1999; 87: 418-428.
42. Jiang X, Morgan J, Doyle PM. Fate de *Escherichia coli* O147:H7 in manure-amended soil. *App Env Mic* 2002; 68 (5): 2605-2609.
43. Van der Wolf PJ, Peperkamp NHTM. Salmonellae (sero)types and their resistance patterns in pig faecal and post-mortem samples. *Vet Quart* 2001; 23: 175-181.
44. Wang G, Zhao T, Doyle PM. Fate enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *App Env Mic* 1996; 62: 2567-2570.
45. Ethan BS, Sima Y, Karl RM. Transmission of *Escherichia coli* O157: H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *App Env Mic* 2002; 68 (1): 397-400.
46. Chem CE, Tsai Yu-li, Olson HB. Occurrence of genes associated with enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in agricultural waste lagoons. *App Env Mic* 2004; 70 (1): 356-362.

ANEXOS

Anexo I. Medición de pH y temperatura

Muestra	Ph	Temperatura (°C)
1. Cárcamo (1)	7.5	18
2. Cárcamo(2)	7.5	18
3. Líquido separado (1)	7.5	18
4. Líquido separado (2)	7.5	18
5. Fosa de sedimentación (1)	7.5	18
6. Fosa de sedimentación (2)	7.5	18
7. Cárcamo (1)	7.5	17
8. Cárcamo(2)	7.5	17
9. Líquido separado(1)	7.5	17
10. Líquido separado(2)	7.5	17
11. Fosa de sedimentación (1)	7.5	17
12. Fosa de sedimentación (2)	7.5	17
13. Cárcamo (1)	8.0	18
14. Cárcamo(2)	8.0	18
15. Líquido separado(1)	8.5	18
16. Líquido separado(2)	8.5	18
17. Fosa de sedimentación (1)	8.0	18
18. Fosa de sedimentación (2)	8.0	18
19. Cárcamo (1)	7.5	17
20. Cárcamo (2)	7.5	17
21. Líquido separado(1)	7.5	17
22. Líquido separado(2)	7.5	17
23. Fosa de sedimentación (1)	8.0	17
24. Fosa de sedimentación (2)	8.0	17
25. Cárcamo (1)	8.0	18
26. Cárcamo (2)	8.0	18
27. Líquido separado(1)	8.0	18
28. Líquido separado(2)	8.0	18
29. Fosa de sedimentación (1)	8.0	18
30. Fosa de sedimentación (2)	8.0	18

Anexo 2. Formato para la identificación de bacterias.

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL: CERDOS**

Fecha _____ No. de Caso _____ Muestra _____

Colonia					
Tinción Gram					
Medio					
Tamaño					
Descripción					
Hemolisis					
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 3. Etapas del tratamiento donde se encontró *Salmonella entérica* serovariedad Choleraesuis.

Muestra	Resultado
1. Cárcamo (1)	Negativo
2. Cárcamo (2)	Negativo
3. Líquido separado (1)	Negativo
4. Líquido separado (2)	Positivo
5. Fosa de sedimentación (1)	Negativo
6. Fosa de sedimentación (2)	Negativo
7. Cárcamo (1)	Negativo
8. Cárcamo (2)	Negativo
9. Líquido separado (1)	Positivo
10. Líquido separado (2)	Positivo
11. Fosa de sedimentación (1)	Positivo
12. Fosa de sedimentación (2)	Positivo
13. Cárcamo (1)	Negativo
14. Cárcamo (2)	Positivo
15. Líquido separado (1)	Negativo
16. Líquido separado (2)	Negativo
17. Fosa de sedimentación (1)	Negativo
18. Fosa de sedimentación (2)	Negativo
19. Cárcamo (1)	Negativo
20. Cárcamo (2)	Positivo
21. Líquido separado (1)	Negativo
22. Líquido separado (2)	Positivo
23. Fosa de sedimentación (1)	Negativo
24. Fosa de sedimentación (2)	Negativo
25. Cárcamo (1)	Negativo
26. Cárcamo (2)	Negativo
27. Líquido separado (1)	Negativo
28. Líquido separado (2)	Negativo
29. Fosa de sedimentación (1)	Positivo
30. Fosa de sedimentación (2)	Negativo