



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Instituto de Investigaciones Biomédicas

“Preparación de un inóculo endógeno para la inactivación de organismos patógenos y degradación acelerada de cadáveres de cerdo bajo condiciones de compostaje”

TESIS

Para optar por el grado de:

Doctor en Ciencias

Presenta:

M en C. Alejandro Vargas Sánchez.

TUTOR

Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.

COMITE TUTOR

Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.

Dra. Maria Elena Trujillo Ortega. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.

Dra. Laura Bertha Reyes Sánchez. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.

PROFESOR INVITADO

Dra. Esperanza García López. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM

Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Marzo, 2019



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.

Agradecimientos

Agradezco por la vida que me diste, por los padres que me diste, por la familia que permitiste formara y por las bendiciones materiales otorgadas. Ahora que he terminado este escrito, es momento de comprometerme por escrito y ante todas las personas que amo y respeto a trabajar más para engrandecer tu Reino, de llevar a los demás a tus pies y de brindar palabras de amor para quien las necesite. Te pido que bendigas mi entrada y mi salida a casa, que todos los negocios y empresas que realice sean para darte a conocer porque sé que yo sólo puedo sembrar y cuidar de la tierra, pero Tú eres quien provee el crecimiento y la abundancia viene porque Tú así lo deseas. También te pido que bendigas de sobremanera a las autoridades que me formaron durante estos estudios y que las bendigas en su entorno familiar y con sus alumnos. Te pido te manifiestes en sus vidas y las guardes en este difícil pero hermoso país. Porque tuyo es el Reino, el Poder y la Gloria, bendito seas *Ha Kadosh Baruj Hu*.

Agradezco tu ejemplo de amor y respeto hacia tus padres, porque siempre los apoyaste económicamente. También porque ví tu interés, los actos de honestidad y entrega a tu trabajo, pero sobre todo porque mostraste la existencia de un balance entre tu trabajo y tu vida familiar por lo que Dios cumplió su promesa y te bendijo con una larga y feliz vida. Ahora que tus hijos hemos hecho nuestras vidas es momento de dejar plasmado mi agradecimiento en papel. Gracias papá!

A ti que igual que yo caminamos en un mundo “solitos” pero siempre acompañados, te agradezco porque en el peor momento de mi vida, me diste los consejos más sabios y me hiciste entrar en razón. Jamás dudes que Dios estará contigo, donde quiera que estés, porque todo lo puedes en El Señor. Lic. Liliana Vargas Sánchez.

Bonita, como te agradezco toda la paciencia que me has tenido en este proyecto que sabes fue la puerta de salida del infierno que estaba viviendo. Mi muy mal humor debe cambiar ya que este logro nos traerá la paz tan anhelada por años y por fin podremos tener unas vacaciones sin preocupación alguna. Gracias por los hijos que me has dado, son diferentes pero podemos ver que El Eterno se amanifiesta en ambos de manera diferente pero siempre viva. Porque tu hija es la más dedicada al Señor, mientras que Salomón es de noble corazón.

Dra. Susana Mendoza: Gracias a ti pude terminar los estudios que sabes me costaron, desde un inicio, mucho trabajo. Has estado en todas las etapas de mi formación por lo que me conoces perfectamente y sabes cuando es el momento de felicitar pero también de jalar orejas! Tu paciencia para conmigo ha sido fundamental. Por ti pude conocer “nuevos mundos” y aprendí a volar lejos. Todo lo has logrado y sé que en tu corazón existen más planes; estoy seguro que con la vida, salud y fortaleza que Dios te brinde lo conseguirás sin ninguna duda. Por siempre, Querida Susy. TQM.

Dra. María Elena Trujillo: Gracias por haberme brindado la oportunidad de continuar con mi formación profesional. Los estudios presentes me costaron todo mi esfuerzo y sobre todo frustraciones, pero finalmente le entrego cuentas del permiso otorgado. Usted es la máxima inspiración de mucha gente del gremio veterinario pero para mí es muy importante la parte “oculta” de un líder exitoso, esto es, la vida familiar, por lo que deseo que sus logros profesionales sigan estando de la mano de los personales.

Dra. Laura Bertha Reyes Sánchez: Usted me enseñó la importancia del suelo en la producción de alimentos y la vida del hombre. Sus enseñanzas me han mostrado el camino que debo tomar en relación con la producción del compost. De ahora en adelante, mi misión profesional será mostrar al difícil gremio veterinario la manera de producir proteína animal lo más sostenible posible.

Es injusto no mencionar a todos los compañeros de posgrado, alumnos del CEIEPP y académicos que me apoyaron a conseguir este logro, pero en esta ocasión, decidí incluir solamente a los más cercanos.

ÍNDICE GENERAL	PÁGINA
Capítulo 1.0 ANTECEDENTES	11
1.1 ACTIVIDADES ANTROPOGÉNICAS Y C. CLIMÁTICO	11
1.2 CICLOS NATURALES Y ARTIFICIALES	12
1.3 SOSTENIBILIDAD DE LA INDUSTRIA PORCINA	14
Capítulo 2.0 INTRODUCCIÓN	17
2.1 GENERACION DE DESECHOS POR LA IND. PORCINA	17
2.2 PROCESO DE COMPOSTAJE	19
2.3 CAPACIDAD SANITIZANTE DEL PROCESO	20
2.4 MICROBIOLOGIA DEL PROCESO	21
2.5 PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN	22
Capítulo 3.0 DISEÑO DEL EXPERIMENTO	24
3.1 JUSTIFICACIÓN	24
3.2 OBJETIVOS	25
3.3 HIPÓTESIS	26
Capítulo 4.0 MATERIAL Y METODOLOGÍA	27
4.1 PREPARACIÓN DE INÓCULO ENDÓGENO (<i>Fase I</i>)	27
4.1.1 ELABORACIÓN DE BIOPILA FUENTE	27
4.1.2 ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA	27
4.1.3 PREPARACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS	28
4.1.4 SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	28
4.1.5 ELABORACIÓN DEL INÓCULO ENDÓGENO	29
4.1.7 USO DE MICROCOSMOS	29
4.2 EXPERIMENTO DE COMPOSTAJE (<i>Fase II</i>)	30
4.2.1 COMPOSTAJE EN BIORREACTORES	30
4.2.2 MUESTREOS	30
4.2.3 ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS	31
4.2.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO E I. DE GERMINACIÓN	31
4.3 INACTIVACIÓN DE AGENTE PATÓGENO (<i>Fase III</i>)	32
4.3.1 PREPARACIÓN DE CULTIVO BACTERIANO	32
4.3.2 CONSTRUCCIÓN DE BIOPILAS	32
4.3.3 MANEJO DE LOS TUBOS DE ENSAYE	32
4.3.4 PROCESAMIENTO DE LOS TUBOS RECUPERADOS	33
4.3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
Capítulo 5.0 RESULTADOS Y DISCUSION	36
5.1 DE FASE I	36
5.2 DE FASE II	43
5.3 DE FASE III	56

Capítulo 6.0 CONCLUSIONES	60
Capítulo 7.0 PROSPECTIVA	61
BIBLIOGRAFIA	62
TABLAS Y FIGURAS	79
ANEXO 1	88
ANEXO 2	90

Lista de abreviaturas o siglas

ACMC: agar carboximetilcelulosa.

AEC: agar extracto de compost.

AL: agar leche.

AP: agua peptonada.

ARN: ácido ribonucleico.

ATP: adenosin trifosfato.

ATS: agar triptosoya.

BHI: infusión cerebro corazón. Por sus siglas en Inglés.

BpI: biopila inoculada.

BpR: biopila de referencia.

C: carbono.

CH₄: metano.

CO₂: dióxido de carbono.

EC: extracto de compost.

ECCA: extracto carne de cerdo / aserrín.

GEI: gases de efecto invernadero.

H₂S: ácido sulfhídrico.

IEB: inóculo endógeno bacteriano.

MBM: medio basal mínimo.

N: nitrógeno.

NaCl: Cloruro de sodio

N₂O: óxido nitroso.

NH₃: amoníaco ó amonio desprotonado.

O₂: oxígeno.

P: fósforo.

PRRS: porcine respiratory and reproductive syndrome. Por sus siglas en Inglés.

QS: *quorum sensing*.

S: azúfre.

SM: solución mineral.

ZCM: zona(s) crítica(s) de muestreo.

Lista de símbolos de unidades¹

cm: centímetro(s).

d: día(s).

g: gramo(s).

h: hora(s).

kg: kilogramo(s).

l: litro(s).

mg: miligramo(s).

min: minuto(s).

ml: mililitro(s).

mm: milímetro(s).

N: normal.

^o*C*: grados Celsius.

rpm: revoluciones por minuto.

s: segundo(s).

sem: semana.

UFC: unidades formadoras de colonias.

μ *l*: microlitro(s).

1.- Taylor y Thompson, 2008.

RESUMEN

MC. Alejandro Vargas Sánchez. Preparación de un inóculo endógeno para la activación de organismos patógenos y degradación acelerada de cadáveres de cerdo bajo condiciones de compostaje. Bajo la dirección de: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira. Comité Tutoral. Dr. Susana Elisa Mendoza Elvira; Dra. Maria Elena Trujillo Ortega; Dra. Laura Bertha Reyes Sánchez. Las unidades de producción porcinas generan residuos orgánicos que hasta el momento no son tratados adecuadamente o los métodos existentes dañan el ambiente directa o indirectamente. Se mezclaron residuos sólidos derivados del cárcamo colector de efluentes de una granja porcina y se mezclaron con aserrín para formar una matriz de degradación donde fueron co-compostados cadáveres de cerdo. Este ecosistema artificial sirvió para fomentar el desarrollo y posterior aislamiento de especies microbianas que fueron usadas para elaborar un inóculo endógeno bacteriano y mantenerlo viable en un medio mínimo basal constituido por extractos naturales y una solución mineral. El inóculo fue adicionado a tres matrices de 150 kg cada una, mientras que se construyeron otras de referencia -todas conteniendo cadáveres de cerdo- que recibieron agua peptonada. Después de un período de observación de 98 días, y empleando métodos analíticos, se observó que el inóculo aceleró ($P < 0.05$) la descomposición de los cadáveres debido a la actividad enzimática aumentada de la biomasa microbiana adicionada. También se redujo ($P < 0.05$) el tiempo necesario para reducir la carga microbiana patógena. Complementariamente, el índice de germinación mejoró ($P < 0.05$) en las matrices inoculadas, mientras que el contenido de nitrógeno continuamente aumentó por lo que se considera que el producto puede fijar nitrógeno atmosférico. Por lo que los resultados obtenidos permitirán incrementar, en México, la aceptación del proceso de compostaje que aún no se emplea rutinariamente para disponer de los cadáveres y residuos orgánicos.

Palabras clave: Compostaje de cadáveres, residuos orgánicos, inóculo, necromasa, fitotoxicidad, relación C/N.

SUMMARY

Pig production units generate organic residues which often are not appropriately treated before being discharged to waste waters or are treated by methods that directly or indirectly harm the environment. In this study, solid residues from the effluent sump in a pig farm were mixed with sawdust to form a degradation matrix where pig carcasses were co-composted. This artificial ecosystem was used to promote the growth and eventual isolation of various microbial species, which were then used to elaborate a bacterial endogenous inoculum, maintaining it viable in a minimum basal medium composed from natural extracts and a mineral solution. The inoculum was added to three 150-kg degradation matrices. Reference matrices, prepared from pig carcasses as described above, were added with peptone water only. Then, the decomposition rate of pig carcasses was determined by analytic methods in inoculated and reference matrices. After a 98-day observation period, the inoculum was found to accelerate the decomposition of pig carcasses ($P<0.05$) due to the increased enzymatic activity of the added biomass. The time required to decrease pathogen microbial load was reduced in inoculated matrices ($P<0.05$) and the germination index was also reduced ($P<0.05$), while nitrogen content increased continuously, suggesting that the product can fixate atmospheric nitrogen. These results may promote the acceptance of the composting process, which is not routinely used in Mexico to dispose of carcasses or organic residues.

Key words: Mortality composting, organic residues, inocule, necromass, fitotoxicity, C/N relation.

Capítulo 1.0 ANTECEDENTES

En este capítulo será expuesto el problema nacional -e internacional- relacionado con el uso inadecuado de los recursos naturales como el suelo, bosques y agua. Analizando la problemática se entenderá la manera como el proceso de compostaje puede contribuir con la ralentización del calentamiento global, lo que adicionalmente vuelve más sostenibles las actividades del subsector pecuario.

1.1 ACTIVIDADES ANTROPOGÉNICAS Y CAMBIO CLIMÁTICO

Incremento de la producción de proteína animal: El mejoramiento de la economía y las finanzas en algunos países emergentes como China e India, provocan la sustitución del consumo de calorías de origen vegetal por otras de tipo animal de mayor calidad y precio (FAO, 2017; Meeker y Meisinger, 2015; Pérez, 2006). Además, debido a que la producción de carne de cerdo demanda extensiones de terreno grandes para obtener los granos y semillas que los alimentan, se considera que la porcicultura contribuye de manera importante con la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) que son emitidos a la atmósfera (FAO, 2013) y con el cambio del uso del suelo (Ilea, 2009; MacLeod *et al.*, 2013; Pérez, 2006; Urquiaga *et al.*, 2016) caracterizado por el incremento de los incendios forestales en zonas templadas, y por el surgimiento de actividades agropecuarias en zonas tropicales (Carabias, 2013). Posteriormente, los terrenos donde se establecieron “nuevos” monocultivos, son vendidos a desarrolladoras inmobiliarias que los convierten en fraccionamientos habitacionales, consumiendo entonces, cantidades grandes de recursos como el agua potable, y finalmente se contamina el ambiente por medio de la emisión de GEI (de Klein *et al.*, 2008; Ilea, 2009; MacLeod *et al.*, 2013) de origen doméstico, por el vertimiento de aguas residuales en cuerpos de agua naturales y la acumulación de residuos orgánicos e inorgánicos que en muchos lugares son mal manejados (Sauri y Castillo, 2002).

El cambio climático antropogénico más reciente se caracteriza por el calentamiento global (Carabias, 2013; de Klein *et al.*, 2008) y ha impactado negativamente y en forma acelerada a los ecosistemas que albergan la biodiversidad del planeta (Grajales *et al.*, 2008; Arita, 2013). De continuar con esta situación, pronto se verá afectado negativamente el desarrollo económico de las naciones (FAO, 2017; Grajales *et al.*, 2008) pero principalmente de las más

pobres. Una consecuencia del incremento de la temperatura media del planeta, es el cambio de la distribución, frecuencia e intensidad de las lluvias, que combinado con las políticas de control natal deficientes en algunos países –como México- resultan en un reparto heterogéneo y en la disminución gradual de la disponibilidad del agua (Castellanos *et al.*, 2000; Geissler y Arroyo, 2011; Grajales *et al.*, 2008; OCDE, 2013). El incremento constante de las emisiones de GEI mundiales confirma que una prioridad para la comunidad internacional es enfrentar el cambio climático (Grajales *et al.*, 2008; MacLeod *et al.*, 2013). Solamente por imaginar un escenario radical en el pasado, la tendencia en el incremento de la temperatura atmosférica media actual es similar a la existente durante la época glacial que eliminó a la biodiversidad prevalente.

Deforestación: El descuido, la falta de interés político y las prácticas de manejo inapropiadas, impiden la acumulación natural, continua y eficiente del dióxido de carbono (CO₂) dentro del proceso de fijación del carbono (C), que permitiría la reducción de los niveles atmosféricos de este bioelemento (Grajales *et al.*, 2008; Robert, 2002). Irónicamente, en los bosques se genera como subproducto del proceso de fotosíntesis: oxígeno (O₂) que es aprovechado dentro del proceso de la respiración celular presente en gran cantidad de organismos vivos (Alberts *et al.*, 2015; Audesirk *et al.*, 2011; Maier, 2009; Pichardo *et al.*, 2008) así como en microorganismos que funcionan como degradadores naturales. Lamentablemente, el cuidado y atención de los ecosistemas forestales no es una actividad desarrollada en México (Ponce y Márquez, 2005), lo que se demuestra por la cifra de 13 millones de hectáreas deforestadas anualmente (Carabias, 2013), lo que es grave ya que se calcula que estos ecosistemas fueron formados hace cientos de miles y hasta millones de años (Arita, 2013) pero además representan un almacén de C terrestre muy importante (Ulyshen *et al.*, 2016). Las regiones que registran las pérdidas netas de bosques más grandes del mundo son África subsahariana, América Latina y El Caribe (Grajales *et al.*, 2008). El aumento de la población mundial y el aumento en el consumo de alimentos de origen animal indicado en el punto anterior genera indirectamente un incremento en la deforestación a nivel mundial (Urquiaga *et al.*, 2016).

1.2 CICLOS NATURALES Y ARTIFICIALES

La relación actual del hombre con los recursos naturales no es lógica ni razonable, más bien es arbitraria, por lo que se considera es unidireccional y mayormente extractiva (Jeavons, 1991; Ponce y Márquez, 2005). Así que al cosechar las plantas, hortalizas o deforestar, el

hombre aprovecha los recursos generados, pero no devuelve al sistema ningún beneficio, como los residuos orgánicos, ya que prefiere ofrecerlos como alimento complementario o material de cama para los animales que posee (Robert, 2002) y en algunos países en desarrollo, los residuos son colectados para cocinar e incluso, estos se emplean para calentarse (FAO, 2017) lo que provoca que no se deje preparado y listo el suelo para el siguiente ciclo productivo. Entonces, uno de los aspectos globales principales para tratar durante el siglo XXI, es la degradación de 2 billones de hectáreas que se está incrementando a un ritmo de 5-10 millones de hectáreas anualmente⁻¹ (Lal, 2007). Por el contrario, un manejo cuidadoso y planificado del ciclo agropecuario, asociando los cultivos con la producción animal, podría reintroducir nuevas fuentes de C orgánico al sistema (Harrison, 2008; Robert, 2002). Los sistemas agrícolas responsables, deben entonces mantener o mejor aún aumentar la adición de materia orgánica al suelo para transformarlo en un reservorio natural de C (Martínez *et al.*, 2008; Robert, 2002).

1.2.1 Ciclos biogeoquímicos.

La naturaleza muestra su sabiduría y su grado de evolución por medio de la existencia de los ciclos dentro de sus procesos naturales. Por ejemplo, los productos de la fase luminosa de la fotosíntesis: el adenosin trifosfato (ATP) y la coenzima nicotina-adenina-dinucleótido son utilizados continuamente por lo que una vez que sirven en la producción de azúcares, regresan a la fase que los generó para estar disponibles para el siguiente ciclo anabólico (Alberts *et al.*, 2002; Audesirk *et al.*, 2011; Cain *et al.*, 2011; Hillis *et al.*, 2014; Tortora *et al.*, 2010). De manera similar, al morir una ardilla, se degrada por el efecto de los microorganismos descomponedores (Sadava *et al.*, 2014) que devuelven los bioelementos al sistema. Posteriormente, el C, nitrógeno (N), azufre (S) y fósforo (P), son depositados en la superficie del suelo en donde se infiltrarán para posteriormente ser aprovechados, en un nuevo ciclo, por los organismos productores (fotoautótrofos) que servirán de alimento para los organismos consumidores o herbívoros (quimioheterótrofos) y estos a su vez serán el alimento o sustrato de los organismos consumidores secundarios o depredadores que aprovecharán la energía acumulada, hasta el momento de su muerte, por lo que entonces, el ciclo volverá a comenzar (Caín *et al.*, 2011; Ponce y Márquez, 2005). Por debajo de los primeros 40 centímetros (*cm*) del suelo, los microorganismos más numerosos encontrados, responsables de la degradación de los animales muertos o de los residuos vegetales y la

posterior integración de la materia orgánica al suelo son: las bacterias, los actinomicetos y los hongos (Cepeda, 2009; Pichtel, 2005; Robert, 2002; Tortora *et al.*, 2001).

1.2.2 Ciclo agropecuario

La inversión de recursos financieros en actividades propias de la agricultura como la mano de obra, combustibles, equipo, semillas y agua, genera cosechas que pueden ser autoconsumidas o comercializarse. Similarmente, los negocios pecuarios constan de procesos que requieren inversión y manejo adecuados. La unidad de producción animal posee el potencial para reducir los costos productivos y paralelamente reducir los problemas relacionados con la adquisición de la materia prima si diseña un plan en donde integre sus procesos con los de otra empresa agrícola. Esto es, debe unirse estratégicamente de tal manera que ambas compartan la misma misión, y mantengan alineados sus objetivos, estrategias, actividades y planes. Por el contrario, los negocios agrícola y pecuario que se encuentran separados -por la razón que sea- son entonces vulnerables debido a la necesidad de adquirir los recursos naturales que no poseen, pero que el otro negocio si tiene disponible y deja de aprovechar (Urquiaga *et al.*, 2016). Así que, debido a la desvinculación entre ambos, los escenarios de mayor impacto negativo -para el medio ambiente- son aquellos en donde la industria agrícola no maneja apropiadamente sus residuos pero consume enormes cantidades de recursos -agua y fertilizantes sintéticos- sin considerar las características fisicoquímicas originales del suelo (Castellanos *et al.*, 2000). Por su parte, la industria pecuaria, genera abundantes aguas residuales o efluentes ricos en materia orgánica y los vierte directamente y sin tratamiento alguno (Taigánides *et al.*, 1996) a la red de drenaje municipal que está diseñada para captar solamente las aguas urbanas sobrecargando al sistema y/o vertiendo dichas aguas en cuerpos de agua naturales (Pérez, 2006) incrementando con eso los niveles de contaminantes específicos como la materia orgánica, agentes patógenos y agro-químicos, entre otros (Geissler y Arroyo, 2011).

1.3 SOSTENIBILIDAD DE LA INDUSTRIA PORCINA

1.3.1 Porcicultura e impacto ambiental

Las categorías: *i)* agricultura, *ii)* uso del suelo, cambio de uso del suelo y silvicultura y *iii)* desechos, aportan en conjunto, el 24.5 % del total de los GEI emitidos en México (Arvizu, 2013). Esta cantidad es similar a la reportada por otros autores a nivel mundial (de Klein *et al.*,

2008; MacLeod *et al.*, 2013). De los GEI, el CO₂, el metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O) son los más potentes (Jiang *et al.* 2011; USDA, 2012) contribuyentes al calentamiento global.

Así como la principal fuente de emisiones de CO₂ es el uso de combustibles fósiles, del mismo modo, las prácticas de agricultura contribuyen con un 40% y 90% de las emisiones de CH₄ y N₂O, respectivamente (de Klein *et al.*, 2008; MacLeod *et al.*, 2013). Usando como ejemplo a la industria porcina en Hong Kong, esta presentó un crecimiento importante al final del siglo pasado. De hecho, se considera como una de las mayores contribuyentes a la contaminación local ya que representó el 70% de toda la contaminación agrícola en los nuevos territorios.

Además, la mitad de la materia orgánica generada en las unidades productivas porcinas, fue vertida al mar (Huang *et al.*, 2004). En Irlanda, la excreta de cerdo se maneja diseminándola en las tierras pero la cantidad que se deposita no debe exceder los 170 kg de N orgánico por hectárea por año (Nolan *et al.*, 2011). También, es común la práctica de aplicar dosis de fertilizantes superiores a las recomendadas, lo que conlleva a una contaminación posterior de las aguas subterráneas (Rashid *et al.*, 2010) y posteriormente al surgimiento de enfermedades digestivas -como cáncer de colon- en la gente (OCDE, 2013). Para evaluar cualquier tipo de contaminación - suelo, aire o agua-, es necesario, determinar él o los tipo (s) de contaminante (s) involucrado (s), así como su concentración (USDA, 2012). Para lograrlo, se usan datos individuales en relación a un solo elemento o compuesto químico, pero también existe la posibilidad de determinar parámetros sumarios que se refieren a propiedades de grupos de contaminantes (Geissler y Arroyo, 2011). Por ejemplo, en los Estados Unidos, en relación con la descarga de agua residual de las granjas porcinas, se tiene el valor máximo permitido de 50 mg/litro⁻¹ de demanda biológica de O₂ (Tiquia y Tam, 2000). En México también existen límites para la eliminación de aguas residuales (Taigánides *et al.*, 1996) pero la falta de legislación, la corrupción y la burocracia dificultan la gestión adecuada de los efluentes (Pérez, 2006). Es importante identificar la fuente de un contaminante, el camino de su distribución así como su destino final (Geissler y Arroyo, 2011) ya que este puede afectar gravemente la economía regional. Por ejemplo, en el estado de Guanajuato, el turismo fue afectado nocivamente por los olores desagradables derivados de una granja porcina (Morilla, 2009). Además de la volatilización de los ácidos grasos y aminas (Mackie *et al.*, 1998), provenientes de la excreta animal y de sus sistemas de tratamiento (Sasaki *et al.*, 2005), también la emisión del metil mercaptano (CH₃SH) (Li *et al.*, 2008; Xiujin *et al.*, 2008), compuestos orgánicos volátiles (USDA, 2012), amoníaco (NH₃) y del ácido sulfhídrico (H₂S) desprendido por la descomposición anaeróbica de los despojos de origen animal (Li *et al.*, 2008; Morilla, 2009)

suman su efecto y aroma, lo que afecta definitivamente la opinión del público (USDA, 2012) lo que puede determinar la permanencia o cierre de granjas, por parte de las autoridades estatales cuando algunas zonas frecuentadas por turistas, se ven afectadas.

1.3.2 Industria porcina en México

Una de las principales características del sector ganadero en México es su heterogeneidad productiva; ya que se pueden encontrar todas las escalas de producción y todos los niveles de tecnificación (Vargas, 2009). Un común denominador en esta diversidad productiva es, en términos generales, la falta de “internalización” de los costos ambientales (Pérez, 2006) dentro de los costos de producción, debido entre otras cosas a que el cuidado del medio ambiente se considera más un costo y menos una oportunidad (Carabias, 2013; Morilla, 2009). El problema de contaminación ambiental generado por las granjas productoras de cerdos en México, presenta dos razones básicas: por un lado, las autoridades carecen del marco legal, así como de infraestructura y presupuesto para monitorear los niveles de contaminantes (Geissler y Arroyo, 2011) contratar recursos humanos suficientes e implementar leyes. Por su parte, los productores carecen de instrucción ambiental, su nivel educativo es reducido, no poseen motivación para implementar paquetes tecnológicos o realizar los análisis necesarios (Morilla, 2009; Vargas, 2009) y se encuentran desmotivados ya que saben que después de cualquier esfuerzo, siempre tendrán que realizar el pago de los derechos correspondientes (Pérez, 2006). En el año 1994, se realizó un estudio evaluando 221 granjas porcinas de las que se encontró que sólo una contaba con sistema de tratamiento de efluentes completo constituido por fosa, separador, digestores, separación química y clarificador (Morilla, 2009). Por lo que se vuelve urgente, realizar los esfuerzos necesarios para establecer el marco legal y la normativa ambiental ya que la porcicultura nacional impacta directa o indirectamente al medio ambiente (Pérez, 2006).

Capítulo 2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 GENERACIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS POR LA INDUSTRIA PORCINA

El incremento de la productividad de una granja porcina aumenta directamente la generación de efluentes dependiendo el sistema de manejo de las excretas y de la infraestructura construida para la alimentación animal. Una granja de ciclo completo de 100 vientres genera anualmente 1.15 millones de litros (*l*) de efluentes (McKeon, 2008). Mientras que una unidad de producción porcina del mismo tamaño y que cuenta con buenas prácticas de manejo y presenta una incidencia de enfermedades reducida genera anualmente 6,800 kilogramos (*kg*) por concepto de mortalidad y materia orgánica (Vargas, 2009). En México, no se practica la cultura del buen vecino (Morilla, 2009), ni se tiene desarrollada la conciencia de sostenibilidad integral (Carabias, 2012), por lo que es común observar que la excreta y la mortalidad y materia orgánica de las granjas porcinas, son colocados en la zona limítrofe de la propiedad. Peor aún es la contaminación ambiental cuando estos residuos contienen agentes infecciosos (Meeker y Meisinger, 2015). Una granja de pie de cría de 500 vientres que es afectada en forma aguda¹ (Zimmerman *et al.*, 2006) por el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) produce sólo en el área de lactancia: 3,058 *kg* de materia orgánica, debido a un incremento del 63.33 % en comparación con la generada en el mismo tiempo por una granja libre de esta enfermedad². Adicionalmente, en el área de gestación, se generan: 650 *kg* de materia orgánica³ y debido a la muerte súbita del 10 % de las hembras reproductoras (Yesque, 2012), se producen 7,750 *kg* de cadáveres o necromasa⁴. Todo este material, característicamente no es manejada adecuadamente, ya que el enterramiento o contención en cisternas, no generan las condiciones abióticas o fisicoquímicas requeridas para inactivar a los agentes patógenos (ACP, 2002; Eamens, 2011; SAGARPA, 2011; Vargas, 2009). En 2012, Han *et al.* detectaron ácido ribonucleico (ARN) del virus del PRRS en órganos de lechones vivos y mortinatos, lo que evidencia el riesgo sanitario elevado en el que se encuentra la granja fuente y las unidades

- 1.- Durante cuatro semanas
- 2.- Tasa de parición: 85%; prolificidad: 13 LNT; mortalidad pre-destete: 8 %; peso promedio por placenta: 5 kg.
- 3.- Aborto del 30% de las cerdas en gestación tardía durante las primeras cuatro semanas.
- 4.- Hembras reproductoras entre 140 a 170 kg de peso vivo.

cercanas a esta cuando la necromasa y materia orgánica no son manejadas y la zona en donde se acumulan se convierte en un lugar idóneo para que se establezcan interacciones tróficas entre organismos debido a la abundancia de materia orgánica (Ponce y Márquez, 2005) que funciona como los sustratos que favorecen el desarrollo de las poblaciones de organismos carroñeros (Pérez y Villegas, 2009; Sadava *et al.*, 2014). Desde el año 2003, Otake *et al.*, ya habían considerado la intervención de los artrópodos en la diseminación aérea del virus del PRRS pero concluyeron que faltaba investigación adicional para aclarar dicha hipótesis. Posteriormente, se reportó que la interacción entre el cerdo, el virus y el medio ambiente era compleja (Zimmerman *et al.*, 2006) y era de esperarse, ya que además del papel posible de los insectos hematófagos, también se deben estudiar otras especies de dípteros que pueden portar temporalmente, al virus que se origina en la zona donde se disponen la necromasa y materia orgánica.

Cuando un animal muere, rápidamente ocurren modificaciones bioquímicas en los tejidos específicamente, la carne se acidifica (Eskin y Fereidon, 2013; Mota *et al.*, 2005). Sin embargo, la temperatura de las masas musculares no se modifica de manera importante debido a que la descomposición ocurre en ausencia de O₂ por lo que no ocurren reacciones de calor (Bonhotal *et al.*, 2014). Por otro lado, los estudios de aislamiento viral, indican la viabilidad del virus del PRRS en un 47 % de muestras de suero cuando estas son almacenadas a 24 grados Celsius (°C) durante las primeras 24 horas (h) (Zimmerman *et al.*, 2006). También, debido a que una vía de transmisión reconocida del virus es la transplacentaria, se deben diseñar protocolos de investigación que consideren el manejo de dichos residuos dentro de los programas de bioseguridad para lograr el control efectivo de la enfermedad ya que al menos la erradicación en los Estados Unidos se ha dificultado y la forma de transmisión no ha podido determinarse con precisión (Pijoan, 2006). Actualmente, se reconoce que el manejo de las excretas, disposición de las mortalidades, manejo de los alimentos, manejo efectivo de los transportes y entrenamiento del personal pueden impedir el ingreso de coronavirus entéricos porcinos (Geiger *et al.*, 2016) por lo que deben elaborarse protocolos que estudien la relación entre una mala gestión de los residuos orgánicos y el mantenimiento o transmisión de las enfermedades de los cerdos.

2.2 PROCESO DE COMPOSTAJE.

La recomendación general es enterrar, incinerar (Meeker y Meisinger, 2015; Pérez y Villegas, 2009) ó depositar los animales muertos dentro de contenedores (Pinelli *et al.*, 2004; SAGARPA, 2011; USDA, 2010; Wilkinson, 2007). Sin embargo, las desventajas del enterramiento son: la incapacidad para inactivar a los agentes patógenos presentes en la materia prima (Eamens *et al.*, 2011; Peláez y Sáenz, 2015; Pérez y Villegas, 2009), el riesgo elevado de contaminación del agua subterránea (Peláez y Sáenz, 2015; Pérez, 2006; OCDE, 2013), la depleción de los nutrientes de los suelos (Peláez y Sáenz, 2015; Pichtel, 2005) y el costo de la mano de obra (Mukhtar *et al.*, 2004). Por otro lado, la incineración emite gran cantidad de CO₂ debido a la combustión de los despojos (Pérez y Villegas, 2009; Pinelli *et al.*, 2004; SAGARPA, 2011) y al uso de combustibles requeridos para iniciar la reacción (Jiang *et al.* 2011; Wilkinson, 2007). Además de este GEI, se emiten al ambiente óxidos de sulfuro y de N que provocan problemas de salud en humanos (Peláez y Sáenz, 2015; Rashid *et al.*, 2010). También, se debe considerar el costo del mantenimiento del equipo (Morrow, 2001). Los contenedores de concreto tienen una vida útil limitada, sobre todo si estos no son vaciados, por lo que una vez que estos se llenan, deben construirse otros nuevos (Vargas, 2009).

El manejo de la necromasa debe descontaminarla exitosamente (Stanford *et al.*, 2009) mientras esta es contenida adecuadamente (Meeker y Meisinger, 2015; Deen, 2008). La palabra *composta* deriva del latín *componere* (Ruiz, 2009) y es de uso común en México, incluso por las diversas autoridades federales (SAGARPA, 2011). Sin embargo, para La Real Academia Española este término no existe, por lo que en el presente trabajo se empleará el término “compost” y se omitirá la palabra “*composta*”.

El compostaje de tipo aeróbico favorece la degradación por parte de microorganismos que emplean al O₂ (Zhu, 2007) como último aceptor de electrones (Alberts *et al.*, 2015). Los productos del proceso de compostaje son; calor (Liang *et al.* 2003; Pichtel, 2005), biomasa microbiana (Maier, 2009), H₂O y CO₂ (Varnero *et al.*, 2007). En relación con la materia recalcitrante, esto es, aquella que resiste el ataque químico y enzimático (Pichtel, 2005; Epstein, 2011), esta puede ser utilizada perfectamente como una enmienda para el suelo y

fertilizante para cultivos vegetales (Jeavons, 1991; Roman *et al.*, 2013), en actividades de jardinería, (Pleasant y Martin, 2008), como sustrato para lombrices (Rodríguez y Córdoba, 2006; Ruiz, 2009), como residuo de los sanitarios ecológicos (McKinley *et al.*, 2012), para la remediación de suelos contaminados (Arellano y Guzmán, 2011; Volke y Velasco, 2002), para el tratamiento de efluentes de rastro (Mittal, 2006), como biofiltro (Bruns *et al.*, 2001; Epstein, 2011; Pichtel, 2005; Sauri y Castillo, 2002; Turovskiy y Mathai, 2006) y como un probiótico potencial para usarse en aves y cerdos (Miyamoto *et al.*, 2013).

Las agencias gubernamentales de bioseguridad en países como Australia, Nueva Zelanda, Colombia, Estados Unidos y Canadá han reconocido los beneficios potenciales del proceso de compostaje para incluir a la necromasa generada por motivos naturales (Akdeniz *et al.*, 2010; Morrow y Middleton, 2001; Morse, 2006; Pérez y Villegas, 2009; Sanders *et al.*, 2010; Stanford *et al.*, 2000; Stanford *et al.*, 2009; USDA, 2010), así como la provocada por brotes infecciosos (Wilkinson, 2007). También, el proceso de compostaje puede usarse para reciclar los subproductos altamente contaminantes generados por la industria peletera (Barrena *et al.*, 2007). Además, mantiene la estabilidad sanitaria (Deen, 2008; Eamens *et al.*, 2011) de una granja por medio del procesamiento de los residuos orgánicos y necromasa dentro de las instalaciones que los generaron (Pérez y Villegas, 2009; Vargas, 2012) con lo que se elimina el riesgo de epizootias (Geiger *et al.*, 2016; Miller, 2007; Waddilove, 2008) y zoonosis cuando estos residuos deben moverse a otro sitio donde serán dispuestos (Moeller, 2006) o son transportados a las unidades de rendimiento (Morrow, 2001). La materia prima que ha sido compostada ha sido: cama de corrales, paja completa y molida, aserrín, viruta y las excretas de los animales (Fukumoto *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006; Komar *et al.*, 2012; Nemiroff y Patterson, 2007; Pérez y Villegas, 2009; Tiquia *et al.*, 2002). Sin embargo, cualquier residuo o materia orgánica puede emplearse como sustrato debido a que se encuentra conformada por bioelementos fundamentales para el desarrollo de las poblaciones microbianas con capacidad degradativa (Epstein, 2011; Roman *et al.*, 2013).

2.3 CAPACIDAD SANITIZANTE DEL PROCESO

Dentro de una biopila de materiales compostados, los factores que intervienen para inactivar patógenos son: producción de gases tóxicos, producción de ácidos orgánicos, antagonismo microbiano y generación de antibióticos, entre otros (Eamens *et al.*, 2011; Epstein, 2011; Mukhtar *et al.*, 2004; Román *et al.*, 2009; Ruíz, 2009; Sánchez, 2009). De todos los anteriores

el que mayor impacto presenta sobre los agentes patógenos es la temperatura (Akdeniz *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2010; Greiner y Connor, 2016; Tiquia y Tam, 2002). Esta reacción de autocalentamiento de la biopila se debe al efecto simultáneo del rompimiento de los enlaces químicos de las biomoléculas complejas y la adquisición del ATP encontrado en la matriz de degradación (Pichtel, 2005; Horiuchi *et al.*, 2003). Entonces, la capacidad de las biopilas para calentarse (Barrena *et al.*, 2007), elimina a las bacterias (García-Sierra *et al.*, 2001), virus (Greiner y Connor, 2016), y parásitos (Esquivel, 2012; McKinley, 2012) si la temperatura se mantiene en 55 °C por al menos 72 h continuas (Epstein, 2011; Gao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008; Nolan *et al.*, 2011; USDA, 2010; Wilkinson, 2007; Zhang y He, 2006), pero evitando superar los 65 °C ya que entonces, se ralentiza el proceso degradativo (Li *et al.*, 2008; Xiujin *et al.*, 2008; Zhang y He, 2006), debido a la muerte de las especies termosensibles y a la formación de esporas (Marchant *et al.*, 2008) que dejan de degradar los residuos y posteriormente durante la manipulación de las biopilas, forman parte de los bioaerosoles (LeGoff *et al.*, 2010) que se trasladan hacia otras zonas geográficas, reduciendo así la eficiencia del proceso de descomposición.

Para eliminar o reducir la presencia de patógenos en los materiales compostados hasta un nivel sanitario adecuado para los humanos, los animales y las plantas, es importante que los subprocesos del compostaje sean conducidos por personal con experiencia (Christensen *et al.* 2002; Wilkinson, 2007). De tal manera que este proceso puede emplearse adecuadamente para eliminar los agentes patógenos encontrados en los residuos peligrosos, biológico, infecciosos indicados en la Norma Oficial Mexicana 087-ECOL-SSA1-2002 (DOF, 2003).

2.4 MICROBIOLOGIA DEL PROCESO

Los factores fisicoquímicos principales que afectan el desarrollo de la comunidad microbiana dentro de las biopilas son: los niveles de humedad (Liang, 2003; Jiang *et al.*, 2011) y de O₂ disuelto (Zhu, 2007), pH (Peláez y Sáenz, 2015); el tamaño de la partícula (Huerta-Pujol *et al.*, 2010), la relación C/N (Huang, 2004; Zhu, 2007) así como el tamaño del sistema (Epstein, 2011; Fukumoto *et al.*, 2003; Maresová y Kollárová, 2010). En diseños controlados, se ha monitoreado la cantidad de O₂ consumido en relación con el sustrato que se le ofrece (Pichtel, 2005). Así, se tiene que la descomposición de los carbohidratos comienza en etapas tempranas del proceso y es completado en las primeras 80 h, mientras que la descomposición de los lípidos comienza posteriormente (Kitano *et al.*, 1998). Algunas biomoléculas complejas

como la proteína, hemicelulosa, celulosa y quitina son naturalmente, ligeramente susceptibles a la degradación sucedida dentro de una biopila (Epstein, 2011). Sin embargo, si se controlan las condiciones fisicoquímicas (nutrientes, humedad, tamaño de la partícula y nivel de O₂), se favorece el crecimiento de un consorcio microbiano (Pichtel, 2005), capaz de generar enzimas específicas de sustrato (Tiquia *et al.*, 2001) que acelerarán la descomposición y como resultado, producirán moléculas sencillas (aminoácidos, ácidos grasos, glucógeno, ácidos nucleicos y fosfolípidos), además de CO₂ y H₂O (Alberts *et al.*, 2002; USDA, 2010).

Posteriormente, dichos monómeros o moléculas simples son internalizadas a la célula microbiana para ser utilizadas como fuente de energía o como bloques constructores, dentro de los procesos biosintéticos, favoreciéndose el crecimiento de la biomasa microbiana (Maier, 2009; Tortora *et al.*, 2010). Una vez que los elementos nutritivos de rápida asimilación se agotan, o se presenta algún factor limitante como una reducción en el contenido de O₂, la actividad microbiana y la generación de calor se detienen (Horiuchi *et al.*, 2003) lo que favorece el desarrollo de un segundo grupo de microorganismos adaptado a las nuevas condiciones fisicoquímicas existentes dentro del sistema hasta que su metabolismo incrementa la temperatura de la matriz lo que permite el restablecimiento del primer consorcio microbiano. Estas sucesiones ocurren en forma cíclica a lo largo del tiempo y hasta que la mayoría de los sustratos se agotan y sólo prevalecen los compuestos recalcitrantes (Tuomela *et al.*, 2000) ó de difícil degradación ante el ataque químico o enzimático (Tiquia *et al.*, 2001), pero que serán degradados por otro grupo de microorganismos -hongos y levaduras- durante la etapa fría ó de curado del compost (Rickeboer *et al.*, 2003).

2.5 PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Una de las aplicaciones del proceso de compostaje a nivel mundial es la degradación de los residuos generados por la industria petroquímica (Gandolfi *et al.*, 2010; Otte *et al.*, 1994; Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2016; Zucchi *et al.*, 2003) pero también se ha incrementado el interés por la descomposición de los residuos de origen agropecuario (García-Gómez *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Huerta-Pujol *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2008; Sánchez, 2009; VanderGheynst y Lei, 2000; Zhu *et al.*, 2007). Los estudios existentes en relación con los microorganismos involucrados en el proceso se pueden clasificar: *i*) en aquellos que caracterizan genéticamente las especies aisladas de estos ambientes (Bruns *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2005; Vecchioli *et al.*, 1990); *ii*) en aquellos que contabilizan las poblaciones involucradas empleando técnicas de cultivo clásicas (Balkwill y Ghiorse, 1985;

Ryckeboer *et al.*, 2003) o empleando equipo como el citómetro de flujo (Ishii *et al.*, 2010), y *iii*) los que describen la sucesión de las poblaciones dentro de las biopilas (Amir *et al.*, 2008; Peters *et al.*, 2000; Velikonja *et al.*, 2003).

Los microorganismos que han sido aislados de la fase termogénica del PC fueron: *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermoactinomyces candidus* y *Bacillus smithii*, que participan como organismos asimiladores de NH₃ (Sasaki *et al.*, 2005). Posteriormente, en 2008, Méndez aisló e identificó a *Pseudomonas* y *Lactobacillus* como los géneros bacterianos más efectivos para degradar In-vitro, tejidos de cerdo. Finalmente, fueron identificados: *Sphingobacterium composti*, *Microbacterium barkeri* y *Thermobifida fusca* como organismos degradadores de lignina (Taylor *et al.*, 2012). Actualmente, una línea de investigación importante es la aceleración del proceso de compostaje (Pichtel, 2005), que optimiza los recursos (financieros, tiempo y espacio) necesarios para degradar a los residuos orgánicos. En 2008, Kato y Miura, lograron reducir el tiempo del compostaje incluyendo compost maduro usado como inóculo.

Sin embargo, los conteos de los microorganismos inoculados permanecieron constantes hasta el final del experimento. También, los géneros microbianos involucrados fueron desconocidos. En contraste, Velikonja *et al.*, en 2003 estudiaron la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la pared microbiana durante los 198 días (*d*) que duró el experimento. Los análisis de las características fisicoquímicas evidenciaron que la inoculación con compost fue efectiva. En relación con los factores abióticos que afectan el proceso de compostaje, la relación C/N de la materia prima puede afectar el tiempo que dura el proceso (Chang y Hsu, 2008; Xu *et al.*, 2010). Para el caso del uso de bioinóculos, estos deben elaborarse dentro de biorreactores (Erickson, 2009; Martínez, 2015; Otte *et al.*, 1994; Vogel y Walter, 2002), donde se establecieron las condiciones abióticas requeridas para el desarrollo del consorcio microbiano específico (Zhang *et al.*, 2004) con capacidades para degradar al sustrato blanco (Ichida *et al.*, 2001; Zucchi *et al.*, 2003). La generación de bioinoculantes debe realizarse con el aislamiento y cultivo de microorganismos autóctonos (Martínez, 2015).

Capítulo 3.0 DISEÑO DEL EXPERIMENTO

3.1 JUSTIFICACIÓN

Aunque el proceso de compostaje se ha empleado en los países desarrollados durante los últimos 17 años, la presente investigación muestra la manera como este proceso puede acelerarse empleando un inóculo endógeno, lo que convierte al compostaje en una biotecnología innovadora para degradar los residuos orgánicos de origen pecuario que hasta el momento no son manejados, o se disponen de forma inadecuada generando problemas de contaminación ambiental.

El proceso de compostaje fue implementado desde el año 2009 en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Sin embargo, los subprocesos que lo conforman no se encuentran descritos ni han sido estandarizados, por lo que se carece de respaldo científico para replicarlo. De manera que los resultados de la tesis presente enriquecerán en gran manera al proceso que se lleva a cabo en el CEIEPP que cabe hacer la mención, es el único de los Centros de Enseñanza, Investigación y Extensión, FMVZ, UNAM que trata los residuos orgánicos en forma sostenible.

Las unidades de producción porcina en México, que establezcan el proceso de compostaje acelerado fortalecerán sus medidas de bioseguridad y además podrán contener sus residuos adecuadamente lo que permitirá reducir el movimiento de enfermedades y posteriormente certificar ambos procesos.

La aplicación de compost al suelo mejora sus características fisicoquímicas ya que el suelo nacional se encuentra erosionado debido -entre otras razones- a la falta de materia orgánica, de tal manera que el compost generado por las unidades de producción porcinas podrá ser aplicado en diversos proyectos agrícolas.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO GENERAL

Elaboración de un inóculo endógeno bacteriano constituido por géneros aislados de una biopila hecha con materia prima específica y que será adicionado en matrices elaboradas con los mismos residuos orgánicos con la finalidad de evaluar el efecto sobre la descomposición de la materia orgánica, la sanitización del producto generado así como la reducción de la fitotoxicidad.

3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.2.1 Construcción de un hábitat (biopila), con biosólidos mezclados con aserrín, donde serán colocados cadáveres de cerdo, lo que generará una reacción térmica intensa que favorecerá el establecimiento de condiciones fisicoquímicas específicas que fomentarán el desarrollo de diversidad microbiana con capacidad degradadora.
- 3.2.2.2 Elaboración de un medio basal que permita el aislamiento e identificación de bacterias encontradas dentro de una biopila y que forme parte de un inóculo endógeno que será elaborado en condiciones controladas.
- 3.2.2.3 Evaluar el efecto del uso del inóculo endógeno bacteriano sobre los cambios en las concentraciones de carbono y de N derivado de la materia prima compostada con el paso del tiempo.
- 3.2.2.4 Evaluar el efecto del inóculo endógeno bacteriano sobre el índice de germinación en semillas de rábano (*Raphanus sativus*).

3.2.2.5 Analizar la capacidad del inóculo endógeno bacteriano para inactivar a la bacteria *Escherichia coli* que se encuentre en la materia prima compostada así como la introducida, en biopilas, formando parte de suspensiones microbianas.

3.3 HIPÓTESIS

“El inóculo endógeno bacteriano creado en condiciones controladas, presenta capacidad para acelerar la inactivación de algún agente patógeno encontrado en la materia prima que será compostada; así como de mejorar la descomposición de la materia orgánica seleccionada y de reducir el tiempo para que el compost generado pierda fitotoxicidad”.

Capítulo 4.0 MATERIAL Y METODOLOGÍA

4.1. PREPARACION DEL INOCULO ENDÓGENO (Fase I).

4.1.1 ELABORACIÓN DE BIOPILA FUENTE

Fueron empleados los sólidos recuperados (o biosólidos) provenientes del cárcamo colector de efluentes de una granja de 135 vientres de ciclo completo localizada en el Municipio de Jilotepec, Estado de México, México. Estos fueron la fuente de N, mientras que como agente estructurante y en menor medida, fuente de C se empleó aserrín que fue adquirido de una maderería local. Este último pasó por una criba metálica de 0.5 cm (*cm*). Los biosólidos, se desecaron a la sombra por 48 *h* y posteriormente fueron refinados con la ayuda de una criba metálica de 5 *mm*. Posteriormente, se encostalaron y se almacenaron a la sombra. Antes de combinar los ingredientes, se tomaron muestras representativas y se realizaron análisis bromatológicos para conocer el contenido de humedad, N total y C orgánico total. Con los resultados, se construyó una pila de 150 *kg* que presentó una relación C/N de 25/1 y tuvo forma de cono invertido y base circular. La humedad fue mantenida entre 55-60 % adicionando agua de la llave. Dentro de la pila fue introducida la cabeza de un cerdo de 100 *kg* que fue cortada por su eje de simetría longitudinal, así como las vísceras (tráquea, bronquios, bronquiolos, pulmones y corazón). Una vez formada la pila, cada 3 *h* se midió la temperatura interior (*TFA; Germany*) así como la ambiental. Cuando se alcanzaron 55 °C en las tres zonas críticas de muestreo (*ZCM*) descritas en el punto 4.2.2., se tomaron tres submuestras que se mantuvieron a 5 °C hasta su procesamiento. Esta metodología sirvió para elaborar el inóculo endógeno.

4.1.2 ANALISIS DE LA MATERIA PRIMA

Humedad. Se tomó una muestra de 5 gramos (*g*) de aserrín, sólidos recuperados o compost en diferentes etapas de madurez que se colocó en una estufa puesta a 70 °C por 12 *h* hasta lograr el peso constante. Entonces, se realizaron los cálculos indicados por Íñiguez, 2010:

porcentaje de humedad de la muestra = (peso inicial – peso final) / peso inicial * 100

N Total (NT). Para las muestras de materia prima empleada durante la *Fase I*, se tomó una muestra de 0.5 g y se realizó el método Kjeldahl descrito por Fernández *et al.*, 2006 con las siguientes variaciones: empleo de rojo de metilo como indicador de pH disuelto en ácido bórico al 4% y el uso de ácido clorhídrico al 0.01 N para la titulación del N amoniacal.

Sólidos Volátiles. Para analizar la materia prima de la *Fase I*, se empleó una muestra de 5 g y se colocó en un crisol que se introdujo por 12 h a una estufa puesta a 70 °C. Posteriormente, se colocó dentro de una mufla (*Muffle Furnace; Blue M; USA*) puesta a 520 °C durante 4 h (Huerta-Pujol *et al.*, 2010). Las cenizas sirvieron para calcular el contenido de sólidos volátiles, de acuerdo al siguiente cálculo:

$$\text{sólidos volátiles (\%)} = 100 - \text{cenizas (\%)}$$

pH y conductividad eléctrica. Se pesó 1 g de muestra y se colocó en un vaso de precipitados de 25 mililitros (*ml*), se agregaron 10 *ml* de agua destilada (pH: 5.28 +/- 0.049). Se agitó y dejó reposar por 10 minutos (*min*). El potenciómetro (*CONDUCTRONIC pH10; USA*) se ajustó con las soluciones amortiguadoras de referencia (pH=4.0 y pH=7.0). El pH fue medido y se registró la lectura. Para la medición de la conductividad eléctrica se empleó el mismo extracto pero usando un conductímetro digital (*ORION STAR; A212; USA*).

4.1.3 PREPARACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS

Se pesaron 10 g de muestra de cada ZCM en un matraz Erlenmeyer conteniendo 95 *ml* de agua peptonada (AP) al 0.1 % (ver anexo 1.1). Posteriormente, la suspensión se agitó a 150 revoluciones por minuto (*rpm*) por 10 *min*. Después, se transfirió 1 *ml* hacia tubos de ensaye (10 x 150 *mm*) conteniendo 9 *ml* de AP al 0.1%. Se continuó este procedimiento hasta llegar a la dilución 10⁻⁸. Todos los tubos de ensaye fueron agitados (*VortexGenie2; Scientific Industries; USA*) por 10 s. De cada dilución, fueron adicionadas alícuotas de 100 microlitros (μ l) en cajas de Petri (cP) conteniendo el medio de cultivo requerido y fueron diseminadas en la superficie con un bastón de Drigalski.

4.1.4 SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Para evaluar el efecto en el número de unidades formadoras de colonias (*UFC*) debido a la adición del extracto de compost (EC) en los medios de cultivo seleccionados, y además analizar el crecimiento microbiano en cada ZCM, fueron preparadas cP ($n=5$) con cada uno de los siguientes medios de cultivo y en las siguientes proporciones: agar extracto de compost (AEC) 100% (ver anexo 1.2); agar leche (AL) 100 % (ver anexo 2.1); AL 50 % / agar extracto de compost (AEC) 50 %; agar carboximetilcelulosa (ACMC)100 % (ver anexo 2.2); ACMC 50 % / AEC 50% y agar triptosoya (ATS) 100% (ver anexo 2.3) que se empleó como medio de referencia (Álvarez y Mendoza, 2005; Germida y de Freitas, 2008). La incubación se realizó a 37 °C por 24 h en ambiente aeróbico (*Dry Type Microbiological Incubator; Blue M; USA*). Solamente fueron enumeradas las cajas de Petri con un número de colonias entre 30 y 300. Para revelar la presencia de las colonias en ACMC fue empleado el Rojo Congo al 1% (ver anexo 1.3).

4.1.5 ELABORACIÓN DEL INÓCULO ENDÓGENO

Para preparar el medio basal mínimo (MBM), fueron colocadas las siguientes soluciones en un matraz Erlenmeyer de 500 ml: solución mineral (SM) 100 ml (ver anexo 1.4); EC: 100 ml; extracto carne de cerdo / aserrín (ECCA): 50 ml. (ver anexo 1.5) Después, el pH fue ajustado a 8.0 y el MBM fue esterilizado en autoclave por 15 min. Finalmente, fueron adicionados 50 mg/l de nistatina γ -irradiada (*Sigma-Aldrich; USA*). A este medio se adicionaron 10 g de compost (base húmeda), obtenido de la ZCM central. Entonces, el matraz fue colocado dentro de una incubadora (*Controlled Environment Incubator Shaker; USA*) puesta a 175 rpm y 55 °C por 5 d. Después de homogenizar la solución, se tomó 1 ml y se transfirió en 250 ml de MBM recién preparado y estéril. Este procedimiento se realizó en 5 ocasiones. El producto obtenido fue considerado como el inóculo endógeno bacteriano (IEB). Para el aislamiento de los microorganismos que crecieron, se empleó agar MBM y agar Fluorocult ® E.coli O157:H7 (*MERCK; Germany*). La caracterización bioquímica se realizó empleando los siguientes métodos microbiológicos: reacción de Gram, morfología microscópica, viabilidad después de exposición a 80 °C por 10 min, tinción de esporas, oxidasa, catalasa, prueba O/F y motilidad (Álvarez y Mendoza, 2005). La designación del género microbiano se realizó de acuerdo con Barrow y Feltham, 2003. Para probar que el sustrato ofrecido (ECCA) fue empleado por los microorganismos encontrados en el IEB, fueron puestos a incubar (55 °C y 175 rpm) matraces de referencia, conteniendo MBM estéril, sin inóculo.

4.1.6 USO DE MICROCOSMOS

Se preparó una matriz de 300 g con biosólidos y aserrín en la misma proporción y humedad que en el punto 4.1.1 y el total se repartió en 3 bolsas Ziploc ® esterilizadas con luz ultravioleta. Después, fueron añadidos 10 ml de IEB en cada bolsa. Finalmente se empleó una liga de goma para contener suficiente aire dentro del microcosmos creado. A los microcosmos de referencia ($n=3$) se les añadieron únicamente 10 ml de AP al 0.1 % (pH = 8.0). Los seis microcosmos fueron agitados manualmente para homogenizar la matriz con la solución añadida y se colocaron dentro de una incubadora puesta a 55 °C. Cada 3 d los microcosmos fueron abiertos, en ambiente estéril, para renovar el aire. Al inicio y final del experimento, fueron tomadas muestras para conocer el contenido de sólidos volátiles y las *UFC* que crecieron (en la superficie) en agar MBM. Sólo fueron contadas, las cajas de Petri conteniendo un número de colonias entre 30 y 300.

4.2. EXPERIMENTO DE COMPOSTAJE (Fase II).

4.2.1 COMPOSTAJE EN BIORREACTORES

Se construyó una biopila de 300 kg con la misma relación C/N y humedad que la empleada para construir la biopila indicada en la *Fase I* del presente experimento. Después de mezclada, esta se dividió en dos partes iguales de 150 kg y una recibió 5 l de IEB, mientras la otra recibió 5 l de AP al 0.1 %, como tratamiento control. Estas matrices fueron introducidas en biorreactores (contenedores cilíndricos de plástico) de 200 l, junto con la mitad de un cerdo muerto de 15 kg, sin la cabeza. Las vísceras (aparato respiratorio, corazón, y aparato digestivo) de cada carcasa fueron extraídas, pesadas y divididas en dos partes iguales. Cada 3 d, se midió la temperatura del interior de los biorreactores así como la temperatura ambiental. Después, para asegurar un ambiente aeróbico en el interior, las matrices fueron extraídas y homogenizadas manualmente por 5 min. Finalmente, las matrices -junto con los residuos de cerdo- se devolvieron a los contenedores. De este procedimiento se realizaron dos repeticiones adicionales. La humedad de las matrices fue ajustada en 60 %.

4.2.2 MUESTREOS

Todas las matrices, se muestrearon a los 0, 14, 28, 42, 56, 70, 84 y 98 d de introducidas en los biorreactores. Las ZCM se ubicaron a 25, 50 y 75 cm de la base circular superior de cada contenedor. Para muestrear el eje longitudinal, se retiró aproximadamente 1 kg de matriz y se tomó asépticamente una sub-muestra de 40 g, de cada zona arriba indicada, que se colocó dentro de una bolsa Ziploc® estéril y esta a su vez, dentro de un termo con hielo. Las tres sub-muestras se mezclaron para formar una muestra compuesta de 120 g. Estas muestras sirvieron para realizar los análisis microbiológicos correspondientes.

Posteriormente, se volvió a formar a dar forma de cono a la materia orgánica y empleando la técnica de cuarteo descrita por Rickeboer *et al.*, 2003 se obtuvo una muestra de 500 g que se transportó dentro de una bolsa estéril Ziploc® y esta última dentro de un termo con hielo. Cada vez que se extrajeron las matrices, los residuos de cerdo fueron colectados con pinzas estériles y se pesaron (OHAUS; SC4010; USA). Finalmente, se colocó una base de matriz de

15 cm y sobre ella se colocaron residuos de cerdo y así sucesivamente hasta terminar de llenar cada biorreactor

4.2.3 ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS.

Las muestras de las matrices de compost se analizaron de la siguiente manera: **COT**: Una muestra de 50 g se desecó a 63 °C por 2 h y de esta, se usaron sólo 20-30 mg que se introdujeron en un analizador de carbono orgánico (TOC5050A; Shimadzu; Japan). **NT**: Se emplearon 100 mg de muestra empleando el método Dumas y usando un analizador de elementos (FLASH 2000; Elemental Analyzer; Thermo Scientific; Italy).

4.2.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Para enumerar los microorganismos heterótrofos totales así como de la bacteria *Escherichia coli* presentes en ambas matrices, se empleó el agar MBM y agar Fluorocult® *E.coli* O157:H7 (Merck; Germany), respectivamente. Se tomó una muestra de 10 g de compost (base húmeda) y se realizaron diluciones seriadas (desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁹) empleando AP al 0.1 %. Cada vez que fueron mezcladas, se empleó aparato Vortex por 10 s. Las condiciones de incubación fueron 55 °C y 37 °C, respectivamente por 24 h, en ambiente aeróbico para cada tipo de microorganismo.

4.2.5 ÍNDICE DE GERMINACIÓN

Para determinar el porcentaje de germinación relativa, el crecimiento de radícula relativo y con ambos obtener el índice de germinación, se realizó una suspensión 1:5 hecha con matriz de compost (base seca) y agua desionizada que se agitó durante 20 min a 100 rpm. Después, se colocaron filtros Whatman No. 40 dentro de cajas de Petri (n=3) y se acomodaron 10 semillas de rábano (*Raphanus sativus*). Posteriormente, fueron remojadas con la suspensión. Las cajas se colocaron a la sombra, a temperatura ambiente, por 3 d. Después, se abrieron y contaron las semillas germinadas y se midió el largo de la radícula. Con estos resultados, se realizaron los cálculos indicados en la Norma Ambiental del Distrito Federal 020-AMBT-2011 (GODF, 2012). Como solución de referencia, se empleó agua desionizada. Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento.

4.3. INACTIVACIÓN DE AGENTE PATÓGENO (Fase III).

4.3.1. PREPARACIÓN DE CULTIVO BACTERIANO

Fue empleada una cepa de referencia de la bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*) O157:H7 (ATCC; 25922) que se cultivó en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) (BD; BIOXON; USA) a 37 °C por 18 h. Posteriormente, se tomaron algunas colonias y se inocularon en 150 ml de caldo BHI (pH= 7.2 ± 0.2). La suspensión bacteriana fue colocada en una estufa bacteriológica (*Controlled Environment Incubator Shaker; USA*) puesta a 37 °C, y 175 rpm por 18 h. Después, fueron preparados 28 tubos de ensaye conteniendo 5 ml de la suspensión bacteriana. Para conocer la concentración, se tomó al azar un tubo de ensaye y se agitó por 10 s en aparato Vortex y se realizaron diluciones seriadas empleando AP al 0.1 % (pH=7.2 ± 0.2). De cada dilución, se tomaron alícuotas de 100 µl que se diseminaron en la superficie de 3 cP conteniendo 20 ml de agar BHI. Las cajas fueron puestas en incubación (37 °C) por 18 h. Solamente fueron contadas aquellas donde crecieron de 30 a 300 colonias.

4.3.2. CONSTRUCCIÓN DE BIOPILAS

Fue preparada una biopila mezclando manualmente 140 kg de aserrín con 220 kg de heces frescas provenientes de cerdos en finalización (70 y 100 kg de peso vivo). A esa mezcla, se adicionaron 50 l de agua de la llave calentada a 50 °C. Una vez homogenizada, por medio del método de cuarteo, esta se dividió en dos partes iguales y cada una fue asignada a alguno de dos tratamientos: Bp de referencia (BpR) y Bp inoculada (BpI). La primera recibió 5 l de AP al 0.1 % calentada a 50 °C, mientras que la segunda recibió 5 l de IEB a 50 °C. Ambas biopilas tuvieron forma de cono invertido con base circular y fueron colocadas dentro de corrales techados con piso de concreto (inclinación del 1 %). Las biopilas, permanecieron estáticas por 24 h antes de la introducción de los tubos de ensaye conteniendo suspensión bacteriana. Para monitorear la temperatura del interior, se empleó un termómetro digital infrarrojo (*HERR-100, Steren, China*) que midió, por 5 d, la temperatura del interior de las biopilas.

4.3.3. MANEJO DE LOS TUBOS DE ENSAYE

Una vez preparados, se seleccionaron al azar cuatro tubos de ensaye con suspensión bacteriana y se colocaron dentro de una estufa bacteriológica (37 °C por 48 h, posición vertical y sin agitar). Para el caso de los tubos colocados dentro de las biopilas, se acomodaron 4 tubos en posición vertical en cada cuadrante encontrado en cada ZCM por lo que fueron colocados en total, 12 tubos de ensaye dentro de cada biopila.

4.3.4. PROCESAMIENTO DE LOS TUBOS RECUPERADOS.

A las 12 h de la exposición a la temperatura dentro de las biopilas, fue extraído un tubo de ensaye correspondiente a cada ZCM pero del mismo cuadrante, por lo que fueron extraídos tres tubos en total. Para facilitar la recuperación, cada tubo estaba unido a un cordón de algodón con un rótulo en el extremo exterior. Los tubos extraídos se colocaron dentro de una caja de poliestireno expandido conteniendo hielo para ser transportados. Simultáneamente, fue extraído un tubo de ensaye de la estufa bacteriológica (puesta a 37 °C) y se colocó dentro de una caja de poliestireno con hielo en espera de su procesamiento. Los 4 tubos de ensaye fueron manejados de la siguiente manera: agitación en aparato Vortex, toma de muestra (1 ml), realización de diluciones seriadas (hasta dilución 10⁻⁹), sembrado de alícuota (100 µl) en agar BHI e incubación a 37 °C por 18 h, sin agitación. Se realizaron tres repeticiones de cada dilución. Sólo fueron contadas las cajas que tuvieron entre 30-300 colonias. Este procedimiento fue realizado a los tubos extraídos a las 24, 36 y 48 h.

4.3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Fase I: En relación con las características fisicoquímicas de la materia prima, fueron reportadas la media y desviación estándar (entre paréntesis). A las biopilas se realizaron mediciones simples (°C y H) de cada ZCM durante las primeras horas del mezclado. Para demostrar la necesidad del uso del extracto de compost, fue empleado un diseño en bloques completos al azar (Gutiérrez y de la Vara, 2012) donde los factores controlados fueron: el nivel de O₂, temperatura y tiempo de cultivo, presencia de amortiguadores en el medio e inhibición del crecimiento de hongos. El factor de tratamiento estuvo conformado por los diferentes medios de cultivo empleados y el factor de bloque fue la zona crítica de muestreo,

la variable de respuesta medida fueron las UFC/g^1 (materia seca) por tratamiento por lo que se usó el análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. *Fase II:* Para obtener la tasa de decaimiento de la necromasa compostada, se realizaron los cálculos matemáticos indicados por Zimmer, 2009. Para comparar las medias de los parámetros fisicoquímicos así como del índice de germinación de las matrices de compost durante los muestreos realizados, fue empleada la prueba t de Student, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. *Fase III:* En relación con la temperatura de las biopilas, fueron reportadas las medias de las mediciones ($n=3$) tomadas de las ZCM. En relación con los heterótrofos totales y de la bacteria *Escherichia coli*, fueron transformadas las UFC a unidades Log10.

Capítulo 5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO ENDÓGENO (FASE I).

5.1.1 ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA

Los resultados obtenidos (Tabla 1) muestran que los niveles de humedad, sólidos volátiles, NT *Kjeldahl*, así como la relación C / N de la materia prima empleada en la presente investigación, son similares a los obtenidos en otras investigaciones (Gao *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2011; Larney y Angers, 2012; Liang *et al.*, 2003; Zhu, 2007), por lo que el aserrín y los biosólidos deben considerarse, por los productores mexicanos de cerdo, como fuentes potenciales de los elementos C y N para emplearlas dentro del proceso de compostaje (Barker, 2010). Los biosólidos que no son manejados, impactan el ambiente (Vargas *et al.*, 2013) por medio de la emisión de GEI (MacLeod *et al.*, 2013), contaminación de los cuerpos de agua (Gao *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2003; Taigánides *et al.*, 1996) y del suelo (Pérez, 2006). Los ciclos biogeoquímicos estos dos elementos se encuentran entre los más importantes en los ambientes naturales (Campos *et al.*, 2014; Fernández *et al.*, 2006). También, estos elementos son los más importantes para el desarrollo de los microorganismos ambientales (Amir *et al.*, 2008; Epstein, 2011; Wang y D'Odorico, 2008). Así que la combinación empleada para elaborar la biopila inicial o fuente fomentó una reacción térmica intensa que coincide con los reportado anteriormente (Harrison, 2008; Huerta-Pujol *et al.*, 2010; Turovskiy y Mathai, 2006). Consecuentemente, el ambiente térmico creado facilitó el establecimiento de una comunidad de microorganismos degradadores que inicialmente fueron mesofílicos aeróbicos, pero posteriormente fueron reemplazados por otros termotolerantes y termofílicos (Amir *et al.*, 2008; Velikonja *et al.*, 2003; Wang y D'Odorico, 2008; Xu *et al.*, 2010) dentro de los cuales algunas especies pudieron ser aisladas.

Como resultado de la acción enzimática específica hacia las moléculas que conformaron los sólidos recuperados por parte de los microorganismos degradadores que presentan metabolismo aeróbico (Tiquia *et al.*, 2001; Turovskiy y Mathai, 2006), se generó CO₂, que es un GEI que tiene el menor potencial para calentar el planeta al compararlo con el CH₄ y N₂O que se forman durante el proceso de fermentación ocurrido en ambientes anaeróbicos específicos (Beck-Friis *et al.*, 2003; Mackie *et al.*, 1998), como los sistemas de manejo de las heces líquidas, fosas profundas, pero principalmente, cuando la excreta es almacenada (o sólo apilada) por largo tiempo sin manejo alguno (MacLeod *et al.*, 2013) o cuando se carece de experiencia en el proceso de compostaje. Entonces, cada vez que un residuo orgánico es empleado dentro del proceso de compostaje, las emisiones de GEI se reducen porque el C y

el N son empleados: 1) para generar una reacción térmica elevada (Epstein, 2011; Liang *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2007); 2) para el crecimiento de la biomasa microbiana específica (Sandrin *et al.*, 2009; Wang y D'Odorico, 2008); y 3) para producir un material residual, recalcitrante llamado compost que presenta uso agronómico importante (Harrison, 2008; Stanford *et al.*; 2007; Tiquia *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2007;).

Los residuos de cerdo que fueron colocados en la biopila: *i)* cabezas y *ii)* órganos respiratorios, perdieron masa (base húmeda) en el orden de 53.5 y 91.38%, respectivamente, a los 14 *d* de ser sometidas al proceso de compostaje. Este resultado es similar al encontrado por Xu *et al.*, 2010 quienes midieron el porcentaje de materia orgánica perdida de tejido cerebral fresco de bovino introducido dentro de una matriz colocada dentro de biorreactores ventilados pasivamente. Aunque es razonable considerar a la composición de los tejidos compostados como el factor principal de la diferencia entre la pérdida de masa de las cabezas y las vísceras, el objetivo de haberlas colocado fue únicamente para establecer los factores abióticos necesarios -elementos nutritivos- para permitir a la comunidad microbiana conocer los sustratos blanco que posteriormente serían ofrecidos durante el experimento de compostaje usando biorreactores.

Debido a que el proceso de compostaje requiere de una gran cantidad de materia orgánica rica en C, los productores de compost emplean el ingrediente más barato y disponible localmente. Así entonces, al comparar la madera troceada, la viruta y el aserrín, en términos de degradabilidad y disponibilidad del C, el aserrín es la mejor opción, mientras que la madera troceada es la peor de todas (Bonhotal *et al.*, 2014). Por otro lado, los cadáveres de cerdo o necromasa no son considerados un ingrediente común ya que el público o los consumidores de compost no están familiarizados con su manejo (USDA, 2010). De tal manera que la presente investigación servirá para dar a conocer los beneficios del empleo de esta materia orgánica que se genera abundantemente en las unidades de producción animal en México y el resto del mundo.

5.1.2 TEMPERATURA DE LA BIOPILA FUENTE

La temperatura alcanzada fue producto de la combinación de los factores abióticos y bióticos dentro de la biopila construida. Así, la necromasa incluida ofreció moléculas complejas derivadas de la carne que fueron empleadas como sustrato blanco para la obtención de energía y de componentes necesarios para el crecimiento microbiano (Pepper *et al.*, 2009) lo que aumentó la posibilidad de aislar microorganismos en condiciones de laboratorio.

La reacción térmica es iniciada por medio de la actividad enzimática específica y el crecimiento de los organismos mesófilos presentes, en forma natural, en la materia prima empleada. Posteriormente, durante la fase de calor máximo, el crecimiento y actividad de los organismos que no toleran el calor son inhibidos (Amir *et al.*, 2008) por lo que las especies que pueden ser aisladas no corresponden a este tipo de organismos. La temperatura que presenta potencial para inactivar agentes patógenos (55 °C) fue alcanzada en las tres zonas críticas de la biopila fuente a las 18 h de haberla formado (Tabla 2).

La selección de esa temperatura fue debido a que los microorganismos aislados deben resistir la temperatura de inactivación mientras continúan degradando sustratos específicos. En 2008, Li *et al.*, compostaron excreta de bovino combinada con paja de arroz. El tiempo que tardaron dos matrices elaboradas en alcanzar la temperatura de inactivación de agentes patógenos fue de 13.5 h empleando dos niveles diferentes de aire inyectado, de tal forma que el tiempo que tardó la matriz elaborada, en el presente experimento, en alcanzar la temperatura de 55 °C se considera como muy aceptable.

5.1.3 SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Cariello *et al.*, 2007 recomiendan el aislamiento de microorganismos y el empleo de cultivos microbianos puros como inoculantes. En contradicción, Velikonja *et al.*, 2003 consideran que es improbable que un solo organismo pueda gobernar, por completo al proceso de compostaje. Además, las comunidades microbianas, o consorcios, existentes en los diferentes ambientes no son iguales ni se comportan de manera similar a como lo hace una línea celular aislada en laboratorio ni tampoco son una mezcla de organismos originalmente no relacionados, por lo que el criterio para obtener un consorcio microbiano -o cultivo de enriquecimiento- en condiciones controladas debe ser diferente (Caldwell *et al.*, 2002).

El empleo de medios de cultivo conteniendo componentes específicos como la carboximetilcelulosa o leche favoreció el aislamiento de bacterias con capacidad para degradar celulosa y proteína, respectivamente durante la fase temprana del proceso de compostaje. En el año 2003, Zucchi *et al.*, emplearon extracto de suelo estéril y un agente surfactante para incrementar el número de bacterias “*viables pero no cultivables*” encontradas en muestras de suelo contaminado con hidrocarburos. En la presente investigación, los conteos de bacterias celulolíticas y proteolíticas aislados empleando extracto de compost añadido a los medios de cultivo fueron superiores significativamente ($P < 0.05$) a los encontrados empleando medios clásicos (Tablas 3 y 4). Adicionalmente, existió diferencia estadística ($P < 0.05$) al comparar las UFC entre las diferentes zonas críticas de muestreo.

Este hecho se explica debido al establecimiento de zonas o gradientes con diferente temperatura (Turovskiy y Mathai, 2006; Wu *et al.*, 2009), concentración de O₂ (Zhu *et al.*, 2007) y nivel de humedad (Tiquia *et al.*; 2001) a lo largo del eje de simetría longitudinal de una biopila, siendo el centro, la zona más activa (Gao *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2007) debido a que presenta las condiciones abióticas ideales (humedad, temperatura y ventilación) para presentar la mayor actividad microbiana (Xu *et al.*, 2010). Balkwill y Ghiorse en 1985, emplearon medios de cultivo diluidos, e incrementaron los conteos de células encontradas en diferentes profundidades en sedimentos por debajo de la superficie. Dicho resultado es contradictorio con los resultados de la presente investigación. Sin embargo, es necesario estudiar profundamente las características fisicoquímicas específicas existentes en la matriz donde cada microorganismo florece, para mejorar su cultivo en laboratorio, ya que algunos géneros microbianos requieren concentraciones de sustrato elevadas mientras otros, requieren que el medio de cultivo -y la concentración de nutrientes- se encuentre diluido para favorecer el aislamiento microbiano procedente de muestras ambientales (Maier, 2009; Vecchioli *et al.*, 1994; Yan-Lue *et al.*, 2014). Este hecho es fundamental ya que algunas veces, un inóculo endógeno creado bajo condiciones de laboratorio pierde su función cuando este es liberado en un ambiente natural con la finalidad de degradar un sustrato blanco (Otte *et al.*; 1994; Tanner, 2002; Vogel y Walter, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Zucchi *et al.*; 2003). La razón se debe a la diferencia en las condiciones fisicoquímicas existentes en el ambiente natural y las condiciones de laboratorio establecidas (Maier, 2009) además de factores bióticos como la depredación, parasitismo y competencia que existe con la comunidad microbiana autóctona del ambiente natural (Sadava *et al.*, 2014; Vogel y Walter, 2002). Por otro lado, el desarrollo de cultivos ambientales mixtos se basa en la selección natural forzada hacia los factores abióticos establecidos dentro del biorreactor donde son cultivados, y que deben ser similares a las condiciones del ambiente destino (Erickson, 2009).

El uso de un consorcio microbiano para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Arellano y Guzmán, 2011; Gandolfi *et al.*, 2010; Ichida *et al.*, 2001; Zucchi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004) ha resultado ser una estrategia biotecnológica efectiva (Caldwell *et al.*, 2002) que presenta elevado potencial de desarrollo a nivel industrial (Sauri y Castillo, 2002). Por lo que debido a que las unidades de producción animal generan gran cantidad de materia orgánica y esta no es manejada (Vargas, 2009), o recibe tratamiento mínimo (Vargas *et al.*, 2013), es que el uso de un inóculo endógeno puede acelerar la adopción del compostaje dentro de las medidas de bioseguridad de una unidad de producción. Entonces, aunque las técnicas moleculares modernas han revelado una gran diversidad microbiana en ambientes naturales y artificiales (Guo *et al.*, 2007; Ishii *et al.*, 2010; Ryckeboer *et al.*, 2003;

Wu *et al.*, 2009), las técnicas microbiológicas clásicas, esto es, la selección de los componentes del medio de cultivo, así como el establecimiento de los factores de control específicos que permiten el aislamiento de microorganismos difíciles o “fastidiosos” (Ryckeboer *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2005; Vogel y Walter, 2002) son fundamentales para diseñar un inóculo endógeno eficiente.

5.1.4 OBTENCIÓN DEL CULTIVO DE ENRIQUECIMIENTO.

En el ambiente, una comunidad microbiana se desarrolla dentro de una matriz específica, a veces conocida como *hábitat* (Marchant *et al.*, 2008), por lo que se considera se conserva en equilibrio con el medio (Maier, 2009). Sin embargo, si las características fisicoquímicas naturales cambian, algunos géneros microbianos morirán, otros se volverán quiescentes o entrarán en fase de latencia (Campos *et al.*, 2014; Le Goff *et al.*, 2010) mientras que otros detendrán su crecimiento hasta adaptarse y posteriormente continuar con su actividad de degradación específica (Marchant *et al.*, 2008). También puede suceder que un disturbio, natural o antropogénico, incremente el suministro de sustratos, por lo que la actividad metabólica de la biomasa microbiana puede aumentar (Campos *et al.*, 2014), indicando que en condiciones de laboratorio, las especies procedentes de muestras ambientales, también pueden ser seleccionadas si las condiciones fisicoquímicas son establecidas dentro del biorreactor que las contendrá (Vogel y Walter, 2002).

La sucesión secundaria ocurre cuando algunos tipos de disturbios destruyen la mayor parte de la comunidad microbiana inicial. Sin embargo, muy pocas especies –característicamente dos o tres- sobreviven si existen cantidades mínimas de nutrientes como el N y el C (Dalling, 2008). Por lo que, debido a que dentro de la biopila construida, existieron condiciones de riqueza de sustratos y temperatura elevada, los microorganismos que crecieron y se aislaron se consideran copiotrófos (Maier, 2009), termófilos (Turovskiy y Mathai, 2006), respectivamente.

En base a los resultados obtenidos por las pruebas bioquímicas, los géneros bacterianos aislados del MBM fueron *Bacillus* sp., y *Pseudomonas* sp., ambos considerados como microorganismos aislados comúnmente de biopilas de compost (Epstein, 2011; Yan-Lue *et al.*, 2014). En el año 2003, Ramírez y Cocha aislaron los mismos géneros bacterianos y el cultivo que crearon fue considerado como poseedor de una gran actividad enzimática. Sin embargo, dicha cualidad no fue validada en condiciones de compostaje en el campo. En oposición, Cariello *et al.*, 2007 evaluaron el uso de un inóculo endógeno diseñado otra vez,

empleando al *Bacillus* y *Pseudomonas*, para degradar residuos municipales sólidos, pero los métodos analíticos empleados para monitorear la reducción de la fitotoxicidad fueron limitados.

5.1.5 USO DE MICROCOSMOS

Después de 5 repeticiones consecutivas, el pH del MBM que recibió el inóculo endógeno bacteriano aumentó significativamente ($P < 0.01$) debido a la presencia de NH_3 procedente del sustrato blanco en este caso el extracto de carne de cerdo / aserrín (Figura 1).

Este resultado también lo obtuvieron Gao *et al.*, 2010 al compostar excreta de pollo con aserrín y observaron que días después, el pH se elevó hasta obtener valores de 8. Posteriormente, durante el empleo de microcosmos, la cantidad de sólidos volátiles encontrados en la muestra basal de matriz, fue de: 78.9 % +/- 0.48, y 14 d posteriormente, el contenido existente en las muestras inoculadas y controles fue de: 66.05 % +/- 1.5 vs. 76.03 % +/- 0.96, respectivamente existiendo diferencia estadística ($P < 0.05$) debido al uso del IEB (Figura 2).

Empleando microcosmos, se imitan las condiciones abióticas ocurridas en ambientes naturales (Vecchioli *et al.*, 1994; Vogel y Walter, 2002; Zucchi *et al.*, 2003). Además, el empleo de este modelo permite controlar, la o las dosis del sustrato adicionado, como ocurre durante la remediación de suelos donde existen cantidades elevadas de un contaminante (Otte *et al.*, 1994) y donde frecuentemente, es más de un elemento el que genera el problema (Gandolfi *et al.*, 2010).

Complementariamente, fueron tomadas muestras de ambas matrices, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron cajas de Petri para conocer el número de organismos heterótrofos totales (observaciones triples y [desviación estándar]) que crecieron en agar medio mínimo esencial. Los valores obtenidos en muestras inoculadas y en los controles fueron: $2.19 [0.46] \times 10^7$ y $1.58 [0.23] \times 10^6$ UFC/g¹ de compost (materia seca), respectivamente después de 14 d de incubación a 55 °C, lo que indicó la existencia de diferencia estadística ($P < 0.05$) a favor del uso de inóculo endógeno. En el año 2003, Zucchi *et al.*, incrementaron el número de bacterias degradadoras de hidrocarburos obtenidas de muestras de suelo en comparación con otros que sólo recibieron agua estéril. Es posible, que la falta de ofrecimiento de determinados elementos nutritivos o minerales a la biomasa microbiana encontrada en los microcosmos pudiera ser la responsable de dicha diferencia, ya que previamente en 1994, Vecchioli *et al.*, estudiaron el efecto de la adición de medio mineral basal enriquecido con un inóculo bacteriano, y lo compararon con el uso del mismo medio estéril en relación con el

cultivo de bacterias degradadoras de hidrocarburos derivadas de muestras de suelo contaminado. Los primeros dos grupos tratados incrementaron la degradación de compuestos hidrocarbonados en comparación con el grupo de referencia que consistió en muestras de suelo sin ninguna adición. En el caso de la presente investigación, la adición de AP estéril a los microcosmos de referencia puede considerarse como un estímulo para los microorganismos presentes en la materia prima empleada (Vogel y Walter, 2002). En suelos contaminados, la tasa de degradación microbiana de los compuestos orgánicos es debida principalmente a: *i*) la disponibilidad de los residuos químicos para la comunidad microbiana (Vogel y Walter, 2002); *ii*) la cantidad de biomasa microbiana presente; y *iii*) el nivel de actividad de los microorganismos (Vecchioli *et al.*, 1994).

Si la degradación depende a su vez, de la actividad de la biomasa microbiana adaptada (Zucchi *et al.*; 2003; Maier, 2009), entonces, las dos últimas razones pueden ser explicadas, parcialmente, por medio del fenómeno de quorum sensing (QS) que ocurre en bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Bacillus* (Yan-Lue, 2014), una vez que se alcanza una densidad bacteriana elevada (Marquina y Santos de la Sen, 2010). Desde 1994, Otte *et al.*, demostraron que cuando es añadido suelo estéril a un biorreactor, se ofrece mayor superficie a los microorganismos para fijarse, lo que conlleva a un incremento del nivel de actividad microbiana. Entonces, esta observación temprana, pudo indicar evidencia indirecta de la formación de biopelícula como resultado del proceso de QS (Marquina y Santos de la Sen, 2010; Yan-Lue, 2014). Así que, la fijación de los microorganismos que conformaron el inóculo endógeno elaborado a las partículas de la matriz encontrada en los microcosmos empleados puede ser explicada por medio del aumento en la superficie para realizar la adhesión y a la ausencia de interacciones negativas tales como competencia o parasitismo (Sadava *et al.*, 2011), que normalmente ocurren dentro de biopilas de materia orgánica.

5.2 COMPOSTAJE DE RESIDUOS ORGANICOS (FASE II)

5.2.1 CONTENIDO DE HUMEDAD

El nivel de humedad en ambas matrices, a lo largo del tiempo, se mantuvo (Figura 3). El nivel recomendado para promover la degradación microbiana en condiciones de compostaje aeróbico, se encuentra entre 50 y 60 % (Epstein, 2011; Liang *et al.*, 2003; Nolan *et al.*, 2011; Román *et al.*, 2013; Tiquia, 2005). Es necesario evitar el exceso de humedad en una matriz de degradación ya que las carcasas animales contienen gran cantidad de humedad que es liberada durante la degradación (Bonhotal *et al.*, 2014), por lo que fácilmente se puede saturar el espacio existente entre las partículas de materia prima -y la delgada película de agua que las rodea- lo que puede conducir a que se genere un ambiente anaeróbico indeseable (Nolan *et al.*, 2011). Los niveles adecuados de humedad en ambos tratamientos, aseguraron el establecimiento de las condiciones abióticas necesarias para el desarrollo de microorganismos degradadores (Epstein, 2011) en cantidades normales o aumentadas para el caso de las matrices inoculadas. Una ventaja del mantenimiento de la humedad es la formación limitada de bioaerosoles que ocurre, en forma natural, cuando el aire incide las biopilas (Rosas *et al.*, 2004) o durante algunas actividades principales del compostaje como durante la molienda y el volteo de los montones (Le Goff *et al.*, 2009). Los bioaerosoles pueden contener microorganismos vivos adsorbidos, así como componentes microbianos cuando la humedad es menor al 30% (Huerta-Pujol *et al.*, 2010; Le Goff *et al.*, 2009). Cuando la humedad de una matriz es superior al 60% pero, además, la relación C / N es reducida (menor a 20) al iniciar el proceso de compostaje, es altamente probable que se desprendan olores desagradables y no se alcance la estabilidad al menos durante los primeros 56 d del proceso degradativo (Nolan *et al.*, 2011). Komar *et al.*, 2012 mantuvieron la humedad (50 %) de biopilas elaboradas con excreta de caballo y paja de avena por lo que obtuvieron una pérdida de peso promedio de 39.25 % en 100 d. Similarmente, en el presente experimento, la pérdida de peso en las matrices inoculadas y de referencia fue de 38.3 ± 1.35 % y 32.2 ± 2.44 %, respectivamente a los 98 d, por lo que existió diferencia estadística ($P < 0.05$) por el uso del IEB. La razón de dicho resultado se debe a la emisión al ambiente de mayor cantidad de vapor de agua y CO₂ producto del metabolismo microbiano de la biomasa microbiana aumentada. Tiquia *et al.*, 2002 observaron que algunas biopilas suelen perder más del 50 % de su peso inicial si la humedad no es ajustada continuamente. Esta pérdida no debe considerarse como debida a un incremento en la eficiencia del proceso sino más bien es derivado de una falta de experiencia en el manejo de las biopilas.

5.2.2 TEMPERATURA DE LAS BIOPILAS

El período de tiempo requerido para alcanzar la temperatura que presenta capacidad para inactivar agentes patógenos ($55\text{ }^{\circ}\text{C}$), se alcanzó en 2 *d*. Posteriormente, la temperatura disminuyó a niveles considerados como mesófilos a los 18 *d* del proceso de compostaje (Figura 4). Debido a la intensidad de la temperatura de la matriz, muchos microorganismos como los hongos, levaduras y bacterias de rango de temperatura mesófila mueren (Rickeboer *et al.*, 2003), mientras que se forman esporas de algunos microorganismos termotolerantes y algunos termofílicos (Marchant *et al.*, 2008; Le Goff *et al.*, 2010; Peláez y Sáenz, 2015). Después de cada homogenización, la temperatura de ambas matrices volvió a incrementarse hasta alcanzar los niveles máximos en las tres ZCM dentro de los biorreactores. Sin embargo, las temperaturas fueron disminuyendo gradualmente hasta alcanzar el nivel de temperatura considerado como mesófilo ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) a partir de los 45 *d* del compostaje. En este momento, la etapa de maduración del compost da inicio (Barker, 2010; Barrena *et al.*, 2005; Bernal *et al.*, 2009; Epstein, 2011) por lo que la temperatura de las matrices no se vuelve a elevar debido a dos factores principales: *i*) la actividad microbiana reducida (Alberts *et al.*, 2015; Horiuchi *et al.*, 2003) debido a la cantidad reducida de sustratos disponibles (Gao *et al.*, 2010); y *ii*) a la disipación del calor (Epstein, 2011) debido a la diferencia de temperatura entre los contenedores y el ambiente. Las temperaturas reducidas al término del experimento indican que la materia orgánica se estabiliza (Gao *et al.*, 2010) y eso a su vez denotaría una calidad adecuada del producto final (Amir *et al.*, 2008; Nolan *et al.*, 2011). En el año 2002 Tiquia *et al.*, compostaron los residuos de paja empleados como cama, en donde vivieron cerdos durante 5 meses, y estos alcanzaron temperaturas de hasta $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante la primera *sem* del experimento. Sin embargo, debido a que la mitad de las pilas experimentales no fueron volteadas, estas presentaron temperaturas elevadas constantes (arriba de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante los 42 *d* que duró el experimento en comparación con las pilas que fueron volteadas semanalmente, las cuales fueron disminuyendo gradualmente su temperatura e igualaron la temperatura ambiental a los 42 *d*. En la presente investigación, la temperatura alcanzada indicó que los factores abióticos principales, como la humedad y la relación C/N fueron controlados adecuadamente. Además, el volteo continuo de las matrices aseguró un nivel de ventilación adecuado, ya que al emplear biorreactores sin perforaciones se podría incentivar el cambio de ruta metabólica por parte de los microorganismos, esto es, ellos dejarían de realizar la respiración celular y en su lugar, se activaría la vía original, la fermentación (Alberts *et al.*, 2015). Así que se considera que el incremento de la temperatura obtenido por arriba de los $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ dentro de los contenedores empleados, por al menos 72 *h*, fue un resultado

importante que de acuerdo con Li *et al.*, 2008 fue debido al adecuado consumo O₂ ya que este presenta una correlación elevada con la temperatura alcanzada en matrices de materia orgánica compostada. Alcanzar esta temperatura dentro de contenedores no perforados, debe considerarse como relevante por lo que el proceso de compostaje podrá realizarse, en investigación futura, dentro de biorreactores de mayor volumen construidos para alojar materia orgánica, que estaría confinada y lejos del alcance de animales carroñeros.

5.2.3 DESCOMPOSICIÓN DE LOS CADÁVERES DE CERDO

El proceso de compostaje realizado en algunas instituciones educativas (Bonhotal *et al.*, 2014; Íñiguez, 2010; Morrow, 2001; Morse, 2006; Mukhtar *et al.*, 2004; Wilkinson, 2007); en trabajos de investigación (Benson *et al.*, 2008; Eamens *et al.*, 2011; García-Sierra *et al.*, 2001; Sanders *et al.*, 2010; Sheperd *et al.*, 2010; Standford *et al.*, 2000; Standford *et al.*, 2007; Standford *et al.*, 2007); así como el realizado por algunas asociaciones independientes (ACP, 2002; Moeller, 2006) se basan en la elaboración de biopilas empleando ingredientes conteniendo C y N o en el acomodo de la materia prima dentro de cubículos donde los animales muertos -sin seccionar- son intercalados o co-compostados con materiales compuestos principalmente por C. Aquí, la materia orgánica permanece, sin ser movida, por un mínimo de 30 *d*. Posteriormente, la materia orgánica se extrae, se mezcla y se regresa a los cubículos, para dar inicio a un segundo ciclo de degradación por 30 *d* adicionales. En contraste, en la presente investigación los cadáveres compostados fueron manejados y monitoreados cada 14 *d*, lo que ofreció la oportunidad de incrementar el conocimiento de los cambios degradativos que sufrieron los tejidos animales compostados.

Así, durante el primer monitoreo, a las 2 *sem* del proceso, en ninguna de las matrices elaboradas fueron encontrados detritos del aparato respiratorio, corazón, y aparato digestivo de los cerdos. Sin embargo, la piel, el tejido muscular y los huesos se encontraron en diferentes grados de descomposición aunque fueron perdiendo forma y masa gradualmente. En 2010 Xu *et al.*, evaluaron la pérdida de masa de 150 *g* de tejido cerebral de bovino colocado dentro de biorreactores de 20 *l* y esta fue entre 36-48 % de la masa inicial en sólo 15 *d* del compostaje. Similarmente, en la presente investigación, la pérdida de peso de los cadáveres colocados en las matrices inoculadas y de referencia, a los 14 *d*, fue de 49.33 contra 46.30% por lo que existió diferencia estadística ($P < 0.05$) por el uso del inóculo endógeno bacteriano elaborado. Una razón de tal mejora en la descomposición de los tejidos animales se puede explicar debió al fraccionamiento. En 2011, Eamens *et al.*, compostaron carcasas de bovino -entre 250 y 300 *kg*- sin seccionar con residuos de jardinería y excreta

fresca de bovino. Al analizar, visualmente, la descomposición de las carcasas a los 28 *d*, observaron que esta fue menor a la provocada por la fauna local -dípteros- en carcasas de referencia que permanecieron al aire libre. Lo que esto indica es que el fraccionamiento de los cadáveres hace disponibles zonas de tejido nuevas y frescas para ser procesadas enzimáticamente por los microorganismos degradadores (Tiquia *et al.*, 2001). De hecho, Bonhotal *et al.*, 2014 recomiendan el uso de equipo especializado para fraccionar los cadáveres de animales y acelerar su degradación. En el año 2012, Esquivel compostó 3 *kg* de carne -proveniente de la disección de un cerdo- y la repartió equitativamente en 6 biopilas de 50 *kg* c/u. Después de 2 *sem*, al voltear las biopilas, no encontró residuos de carne.

El indicador que mejor describe la pérdida de masa de los detritos vegetales o animales es la tasa de decaimiento (Zimmer, 2008). Comparando el efecto de la adición del inóculo o del AP en las matrices elaboradas, se obtuvieron las siguientes tasas de decaimiento a los 28 *d*: $2.04 \pm 0.209 \%^{-d}$ vs. $1.69 \pm 0.056 \%^{-d}$, respectivamente mientras que a los 98 *d* fueron de: $0.84 \pm 0.05 \%^{-d}$ vs. $0.77 \pm 0.03\%^{-d}$, respectivamente. Debido a que la tasa de degradación de los residuos de cerdo con el uso del inóculo superó el nivel considerado por Zimmer, 2008 como elevado ($>2 \%^{-d}$), se consideró ventajoso emplearlo durante la fase temprana del proceso. La razón de este resultado se debió que al inicio el experimento, el tejido muscular y las vísceras fueron los sustratos principales empleados por el IEB. Posteriormente, al realizar la evaluación a 98 *d*, los anteriores tejidos ya habían sido degradados y únicamente permaneció (en ambas matrices) tejido óseo reblandecido lo que es un hallazgo normal cuando se compostan cadáveres de animales (Bonhotal *et al.*, 2014). El decaimiento acelerado de los las vísceras y músculo se debe a la relación C/N reducida (Barker, 2010; Bonhotal *et al.*, 2014; Morse, 2006; Zimmer, 2008;), lo que favorece su digestión enzimática y aprovechamiento de la energía contenida (Sadava *et al.*, 2011; Wang y D'Odorico, 2008), siempre y cuando existan factores fisicoquímicos adecuados (Li *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2003; Huerta-Pujol *et al.*, 2010; Epstein, 2011) que permitan que se lleve a cabo la descomposición (Akdeniz *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2007). En contradicción, Xu *et al.*, 2010 consideran que la degradación de tejidos animales aumenta conforme avanza el proceso. Sin embargo, en la presente investigación, se demostró que la tendencia en la descomposición, en ambos tratamientos, no se acelera más bien se mantiene conforme avanza el proceso degradativo ocurrido. Otros autores que hacen recomendaciones contrastantes son Li *et al.*, 2008 ya que indican que el compostaje de heces de bovino mezcladas con la paja de arroz se incentiva empleando una humedad del 65 %, esto es, un nivel por arriba de las recomendaciones que la mayoría de los autores recomiendan. Así que, el uso del proceso de compostaje empleando inóculos específicos de sustrato y dentro de biorreactores es adecuado para degradar cerdos de hasta

15 kg lo que es una ventaja importante sobre la descomposición natural ya que en algunas granjas se pueden compostar animales pequeños o las placentas y mortinatos sin exponerlos al ambiente. Otro aspecto que debe estudiarse es el relacionado con la actividad microbiana ocurrida dentro de la matriz de degradación ya que se ha observado un incremento de la temperatura, en las zonas sobre y debajo de la necromasa (Peláez y Sáenz, 2015). Este resultado depende de la relación C/N existente dentro de las masas musculares y la matriz donde esta es degradada.

Debido al contenido de agua elevado dentro de las fibras musculares (Eskin y Fereidon, 2013; Mota *et al.*, 2005), de cualquier especie animal, en condiciones de muerte natural, se favorece el proceso de fermentación que promueve la generación de subproductos volátiles como el H₂S, N₂O, CH₃SH, CO₂ y CH₄ (Li *et al.*, 2008; Sadava *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2007), así como aminas (cadaverina y putrescina). Con excepción del CO₂, todos los anteriormente mencionados presentan olores desagradables para el hombre (Mackie, 1998), pero son atractivos para los organismos detritívoros -dípteros y coleópteros- que en condiciones naturales, son los consumidores principales de los cadáveres (Eamens *et al.*, 2011; Sadava *et al.*, 2011). En contraste, la fuente de C es un material fibroso que presenta una relación C/N elevada, es un material voluminoso que se encuentra constituido de diferentes moléculas como la celulosa, hemicelulosa y lignina, que son -particularmente las dos últimas- resistentes al ataque enzimático y químico (Bonhotal *et al.*, 2014) por lo que la temperatura dentro de una biopila hecha principalmente con cadáveres es heterogénea y difícil de controlar sobre todo si la biopila o la masa completa se voltea cada 4 *sem* (Morse, 2006). Después que el proceso de compostaje ha concluido, es frecuente encontrar los huesos grandes de los animales adultos (Bonhotal *et al.*, 2014). Del mismo modo, en la presente investigación, aunque los animales que se compostaron eran jóvenes, el tejido óseo que resistió hasta el final del experimento se encontró poroso y blando.

5.2.4 CONTEO DE MICROORGANISMOS HETERÓTROFOS TOTALES.

Las matrices inoculadas presentaron hasta los 42 *d* del proceso de compostaje, conteos de organismos heterótrofos totales superiores ($P < 0.05$) a los mostrados por las matrices control (Tabla 5). Posteriormente, las matrices que recibieron inóculo redujeron los conteos hasta que fueron similares ($P > 0.05$) a las matrices control.

Los microorganismos heterótrofos presentes en forma natural en el suelo -bacterias, hongos y actinomicetos- degradan las moléculas que se encuentran disponibles (Robert, 2002; Sadava *et al.*, 2014) y/o aquellas que son añadidas (Campos *et al.*, 2014). Del mismo modo, cuando

materia orgánica es acomodada dentro de biopilas, esta es degradada por la biomasa microbiana existente que crece hasta que la energía y las biomoléculas son consumidas (Epstein, 2011), lo que a su vez se relaciona con la reducción de la temperatura del interior de las biopilas (Zhu *et al.*, 2007).

El inóculo endógeno elaborado en el presente estudio estuvo conformado por al menos dos géneros bacterianos que sobrevivieron a las características fisicoquímicas establecidas en el laboratorio, lo que permitió su aislamiento posterior. En 2005, Tiquia estudió el efecto de la adición de cuatro inóculos comerciales en biopilas hechas con la cama profunda donde vivieron 35 cerdos por 12 *sem* y donde la humedad se mantuvo constante en 60 % y los montones se voltearon cada 4 *sem*. Después de 91 *d* de observación, no se encontraron diferencias significativas por el uso de algún inóculo bacteriano. Este resultado se atribuyó al control de la humedad y aireación. En contraste, en la presente investigación, el inóculo endógeno bacteriano sí tuvo efecto debido a que los géneros bacterianos fueron aislados de una biopila fuente construida con materia orgánica similar a donde se encontraba el sustrato blanco, en este caso, los cadáveres de cerdo. Esto se debió a que las bacterias del IEB ya estaban acondicionadas a las condiciones abióticas prevalentes dentro de la matriz donde fueron depositadas por lo que ya contaban con la ruta metabólica, y las enzimas específicas para descomponer al sustrato blanco. Adicionalmente, durante el experimento de Tiquia, 2005, las *UFC* de organismos heterótrofos totales, encontrados en las biopilas, fueron similares a los obtenidos en las matrices control del presente experimento, pero inferiores a lo obtenido en las matrices inoculadas, por lo que se deduce que aunque el nivel de oxígeno y la humedad pudieron ser factores clave que estimularon la sobrevivencia, función degradativa y crecimiento de los organismos heterótrofos dentro de las matrices estudiadas, la aplicación de un mayor número de organismos degradadores fue la ventaja definitiva. Así, conforme se fueron degradando los cadáveres de cerdo compostados, se liberaron proteínas de la carne y células muertas a la matriz que pudieron servir como sustratos que favorecieron el crecimiento y desarrollo del consorcio microbiano adicionado (Íñiguez, 2010; Xu *et al.*, 2010).

5.2.5 CONTEOS DE AGENTE PATÓGENO.

En las matrices inoculadas, a partir de los 28 *d*, los conteos de la bacteria *Escherichia coli* fueron diferentes estadísticamente ($P < 0.05$) en comparación con los de las matrices de referencia (Tabla 5). Posteriormente, a partir de los 42 *d*, las *UFC* en las matrices inoculadas, dejaron de existir, mientras que los conteos bacterianos en las matrices de referencia fueron disminuyendo gradualmente y a partir de los 70 *d*, los niveles se encontraron dentro del límite

permitido por la Norma Ambiental del Distrito Federal-020-AMBT-2011 (GODF, 2012) que considera al compost como un biosólido tipo A, esto es, que puede ser comercializado y manipulado sin riesgo sanitario para los humanos y los animales (Gerba y Pepper, 2009; Román *et al.*, 2013). Este nivel también cumple con las regulaciones de la Comunidad Europea que establece que un producto derivado de excretas animales comercializable debe estar libre de la bacteria *Salmonella* y tener conteos de *Escherichia coli* o *Enterococcus* iguales o por debajo de los 3.0 log₁₀ UFC/gr¹ (Nolan *et al.*, 2011). En forma natural, los residuos tales como las excretas y los biosólidos pueden contener gran cantidad de microorganismos patógenos para los humanos y los animales (Elving *et al.*, 2010). Debido a que los “coliformes fecales” se encuentran compuestos por varios géneros bacterianos y estos pueden crecer aún después que una biopila hubiera pasado por el período de sanitización, no es recomendable emplearlos como organismos indicadores (Christensen *et al.*, 2002). Por esa razón, en presente estudio se seleccionó a la bacteria *Escherichia coli* como organismo indicador de la capacidad sanitizante del proceso de compostaje. En el año 2011, Eamens *et al.*, emplearon agar MacConkey como medio de cultivo en lugar de realizar la técnica del número más probable (NMP) para determinar la concentración de *Escherichia coli* en muestras de 200 g de heces bovinas compostadas con residuos de jardinería y a partir de los 28 d del compostaje, no obtuvieron crecimiento bacteriano alguno. Del mismo modo, en el presente estudio tampoco se empleó la técnica del NMP pero para demostrar la reducción en los conteos bacterianos se empleó el agar específico Fluorocult® E.coli O157:H7. Entonces, la sanitización acelerada de la materia prima empleada, se debió a la participación de al menos tres factores: 1) la reacción térmica intensa (Epstein, 2011) dentro de las matrices elaboradas; 2) la existencia del gas CO₂, derivado del proceso de respiración celular que es nocivo para la sobrevivencia microbiana (Alberts *et al.*, 2015), y 3) la presencia transitoria de amoniaco necesario para generar amonio de origen bacteriano (Ruiz, 2009).

Se ha observado que las biopilas elaboradas con materia orgánica estéril tienden a recontaminarse con microorganismos patógenos debido a la falta de antagonismo microbiano (Christensen *et al.*, 2002) por lo que debería considerarse como una medida rutinaria, la adición de inóculos endógenos o comerciales como parte de los procedimientos para disponer sanitariamente los cadáveres de animales, sus despojos y materiales considerados como peligrosos (SAGARPA, 2011) de tal manera que la competencia microbiana genere un factor adicional que evite la sobrevivencia de los agentes patógenos en la materia prima que será compostada.

5.2.6 CONTENIDO DE CARBONO Y NITRÓGENO.

Al comenzar el experimento, el contenido de COT en ambas matrices fue el mismo, pero a los 42 *d* del proceso, el nivel aumentó ($P < 0.05$) en las matrices que recibieron el IEB (Tabla 6). Al concluir los 98 *d* de observación, el nivel volvió a ser similar al de las matrices de referencia. Durante el proceso de compostaje, las moléculas que contienen C, como los carbohidratos y grasas, que conformaron los cadáveres de cerdo, pueden ingresar en algún subproceso como la glicólisis, servir para formar la molécula de acetil coenzima A, o ser aprovechado en el ciclo de Krebs (Alberts *et al.*, 2015) de las bacterias amilolíticas o celulolíticas (Ryckeboer *et al.*, 2003) generando moléculas estables y oxidadas de C (Audesirk *et al.*, 2011), siempre y cuando la dosis de grasa o aceite adicionado no sature el sistema, deteniéndose entonces el proceso de descomposición (Chang y Hsu, 2008). Por esa razón se compostaron animales pequeños que presentan en forma natural, una cantidad reducida de grasa corporal. La proteína y polipéptidos de los tejidos animales se consideran moderadamente susceptibles al proceso de compostaje (Epstein, 2011). De tal manera que el uso del IEB, facilitó la digestión enzimática y aceleró la disponibilidad de moléculas orgánicas, conteniendo C, a la matriz donde fueron degradados. Además, los volteos continuos de las matrices homogenizaron la materia orgánica haciendo disponibles continuamente a los nutrientes. Entre los subproductos de la madera, la viruta presenta menor degradabilidad en comparación con el aserrín, debido a la menor superficie de contacto en la primera (Nolan *et al.*, 2011). Aunque la hemicelulosa y lignina contenidas en el aserrín son resistentes al proceso de compostaje durante las fases termófila y mesófila (Epstein, 2011), las fracciones no estructurales de esas materias primas pueden mineralizarse y conducir a pérdidas de C (Nolan *et al.*, 2011). Las moléculas que son empleadas y oxidadas durante el compostaje, conforman el C disponible o lábil (Larney y Angers, 2012; Tuomela *et al.*, 2000). Por esa razón, cuando se estudia el nivel de materia orgánica o de COT durante el proceso de compostaje es común encontrar una pérdida del nivel inicial existente en una biopila recién formada (Christensen *et al.*, 2002; Tiquia *et al.*, 2002). Entonces, se considera razonable que los niveles aumentados de C provinieran de la degradación aumentada de los cadáveres de cerdo y posteriormente, el nivel aumentado de C fuera empleado para el metabolismo microbiano (Pepper *et al.*, 2009; Tiquia *et al.*, 2002; Tiquia, 2005) del consorcio encontrado en el IEB, por lo que al final del experimento, los niveles de COT entre tratamientos fueran similares.

Para el caso de los niveles de NT encontrados en las matrices que formaron parte de la presente investigación, se observó que desde los 14 *d* y hasta los 98 *d* (final del experimento), los niveles siempre fueron diferentes ($P < 0.05$) entre tratamientos (Tabla 6).

Por lo general, durante el compostaje industrial, se ha observado una pérdida de N, como NH_3 que se volatiliza de las biopilas formadas (Epstein, 2011; Sánchez, 2009; Tiquia *et al.*, 2002; Tiquia, 2005). También, el N es perdido cuando las condiciones anaeróbicas inducen a los microorganismos a emplear vías metabólicas anaeróbicas que producen N_2 y el N_2O (Raviv, 2015) siendo el último, el GEI con mayor capacidad para calentar el planeta (Rashid *et al.*, 2010). Sin embargo, tal pérdida de N puede revertirse si se cuenta con experiencia en el manejo de los subprocesos que conforman al compostaje (Ruíz, 2009) de tal manera que el NH_3 sea utilizado por los microorganismos para formar ion amonio (NH_4^+) que se asimila en las células vegetales, principalmente por medio de la vía glutamina sintetasa/glutamato sintasa y con la producción de protones (van den Berg y Ashmore, 2008). Por último, en condiciones aeróbicas, el ion NH_3 acumulado en los suelos, se mineraliza para formar nitritos y posteriormente nitratos (Barker, 2010). Para que el nivel de N total pueda mantenerse durante el proceso de compostaje e idealmente aumente, se debe contar con un nivel inicial adecuado de N. La relación C/N de una carcasa animal, como la empleada en la presente investigación, fué de 5/1 lo que asegura la disponibilidad de N y con esto las reacciones enzimáticas siempre ocurrirán (Bonhotal *et al.*, 2014). También, se ha observado que el nivel aumentado de N en una matriz de degradación fomenta el consumo de los ácidos grasos generados dentro de una biopila (Chang y Hsu, 2008). Entonces, el N es requerido para sintetizar proteína celular, necesaria para la mitosis lo que fomenta el crecimiento de biomasa. (Nolan *et al.*, 2011). Cuando se han realizado biopilas y se ha comparado la temperatura generada por matrices conteniendo niveles altos de C, N o grasa, la mayor temperatura se obtuvo en aquellas matrices que presentaron la mayor cantidad de N (Chang y Hsu, 2008).

Conforme las células microbianas mueren, se libera a la matriz liquido intracelular (Bonhotal *et al.*, 2014) además de las estructuras celulares conformados principalmente por proteínas (Alberts *et al.*, 2015; Audesirk *et al.*, 2011). En 2009, Standford *et al.*, hicieron biopilas comparando diferentes niveles de inclusión de excreta líquida bovina y esta se mezcló con paja de avena y cadáveres de becerro. La temperatura fue mayor cuando la inclusión de excreta y la humedad fueron las más adecuadas. De tal manera que cuando la relación C/N inicial es superior a 50, es difícil que la degradación ocurra debido a que el N se convierte en el reactivo que limita las reacciones enzimáticas. Otro factor que evita la pérdida de N es el manejo de las condiciones abióticas dentro de una biopila. En la presente investigación, la humedad de las matrices fue controlada a lo largo del experimento y los volteos frecuentes aseguraron la existencia de niveles adecuados de O_2 , así que se considera que no existió interferencia importante en los procesos de amonificación y de nitrificación, ambos considerados pasos necesarios en la mineralización del N (Cain *et al.*, 2011; Epstein 2011;

Komar *et al.*, 2012). Sin embargo, en las matrices control se observó a los 42 *d* del experimento, una reducción del contenido de N en las matrices control. Esto puede explicarse debido al establecimiento de zonas de anaerobiosis dentro de los contenedores de plástico que provocaron tal resultado:

La experimentación empleando diferentes materias primas y biopilas ha permitido generar compostes conteniendo niveles de N total superiores a los niveles iniciales (Xu *et al.*, 2010). En la presente investigación se logró aumentar el nivel inicial del N por lo que es posible que los microorganismos encontrados en el IEB presentaron capacidad para fijar N atmosférico (Raviv, 2015). Por lo que es necesario realizar investigación adicional para detectar con precisión, el tipo de molécula nitrogenada encontrado en cada momento de muestreo de una biopila inoculada con el mismo IEB ya que la estabilidad relativa de las formas nitrogenadas encontradas en un compost puede ser un indicador de la conveniencia de las materias primas usadas como fuente de C y N y puede determinar la calidad del compost adicionado al suelo para la producción agronómica de las cosechas (Komar *et al.*, 2012).

5.2.7 RELACIÓN CARBONO / NITRÓGENO.

La relación C/N, en ambos tratamientos, fue reduciéndose a lo largo del proceso de compostaje (Tabla 6). A los 42 *d*, la relación C/N de ambas matrices aumento pero posteriormente volvió a tomar su tendencia a la reducción hasta que los niveles entre tratamientos fueron similares.

Este balance de nutrientes se fue modificando, debido a dos aspectos fundamentales: *i*) la relación C/N inicial fue establecida en un nivel cercano a 30, lo que es considerado como adecuado para el proceso degradativo (Epstein, 2011; Nolan *et al.*, 2011; Rodríguez y Córdoba, 2006; Román *et al.*, 2013; Ruiz, 2009). De hecho, Chang y Hsu en 2008 encontraron una correlación positiva elevada ($r^2= 0.88$) entre la relación C/N inicial y la duración del proceso de compostaje. Komar *et al.*, 2012 lograron reducir entre 29 y 39 puntos la relación C/N inicial de biopilas elaboradas con paja de avena y excremento de caballo que fueron compostadas por 100 *d*. Sin embargo, debido a que la cama con excreta se extrajo directamente de las caballerizas, no fue posible balancearla de mejor manera, esto es, iniciar con una menor relación C/N. También, se ha observado que cuando se termina el proceso de compostaje con una relación C/N de 20, o menos, eso indica que el producto es maduro, siempre y cuando, la relación C/N inicial hubiera comenzado por arriba de 30 (Nolan *et al.*, 2011); *ii*) debido a la permanencia de moléculas carbonadas en la matriz de compost. La materia orgánica compostada es oxidada por medio del proceso de respiración celular

ocurrida en los microorganismos descomponedores (heterótrofos). Por lo que, una gran proporción del C encontrado en la materia prima se emite al ambiente (Alberts *et al.*, 2015). Sin embargo, las moléculas a base de C que permanecen en la matriz de compost en algún momento fueron empleadas como fuente de energía o para incrementar la biomasa microbiana (Nolan *et al.*, 2011). Así que el proceso de compostaje es mejor que la incineración ya que el primero mantiene el C dentro del compost formado y posteriormente este se deposita y almacena en el suelo, mientras que la incineración volatiliza el total de la materia orgánica.

5.2.8 Nivel de pH

El pH de ambas matrices se incrementó a los 14 *d*, pero sin existir diferencias significativas ($P > 0.05$). Posteriormente, comienza una disminución gradual hasta que se alcanza el nivel considerado como neutral al término del experimento (Figura 5).

El nivel inicial de pH, de la matriz formada, es moderadamente ácido (5.8) lo que se puede deber al uso del aserrín ya que se ha observado que el pH de los materiales a base de madera, tienden a reducir el nivel de pH (Huang *et al.*, 2006; Komar *et al.*, 2012) de las matrices construidas. El aumento de pH en los primeros 14 *d* del proceso de compostaje coincidió con la mayor intensidad de calor dentro de las matrices. A su vez, esa temperatura fue producto de la actividad microbiana de la biomasa indígena (matrices control) o de la biomasa indígena más la adicionada (matrices inoculadas). Entonces, la descomposición de los tejidos animales -polipéptidos y aminoácidos- provocó una mayor entrega de grupos amino (NH_2) que resultó en mayor producción de NH_3 . En 2010, Gao *et al.*, hicieron biopilas de residuos orgánicos y observaron que el pH se elevó en los primeros 3 *d* del mezclado de la materia prima pero, posteriormente, el nivel de pH se redujo gradualmente y se estabilizó, en un rango de pH neutro, debido a la volatilización parcial del NH_3 , a la pérdida de iones H^+ debido a la nitrificación (Nolan *et al.*, 2011), a la producción de ácidos orgánicos e inorgánicos y a la liberación de CO_2 formado durante el proceso de compostaje.

Así que los cambios de pH que pudieron haber ocurrido en los *d* posteriores al inicio del presente estudio en las matrices usadas, no fueron registrados. Ahora bien, el grado de actividad microbiana que permite la descomposición de moléculas orgánicas sólo puede lograrse cuando existe un nivel de O_2 adecuado (Christensen *et al.*, 2002). Así que la frecuencia de los volteos realizados a las matrices del presente experimento favoreció la actividad microbiana. Sin embargo, es importante mencionar que el compostaje de residuos orgánicos, junto con cadáveres dentro de contenedores cerrados es un procedimiento que se

encuentra poco desarrollado por lo que pueden ocurrir cambios repentinos e inesperados dentro de los contenedores y esto puede generar zonas de anaerobiosis temporal. Por lo que es necesario generar investigación adicional relacionada con el uso de contenedores hechos con diferentes materiales y de dimensiones diferentes. También, se ha observado que el pH afecta nocivamente la sobrevivencia de algunos patógenos si los niveles se mantienen alcalinos o ácidos por tiempo prolongado (Christensen *et al.*, 2002). De tal manera que la bacteria *Escherichia coli*, estudiada en el presente trabajo, tuvo que enfrentar, además de la temperatura extrema durante la fase temprana del compostaje, al NH_3 formado por la descomposición de biosólidos y los cadáveres de cerdo.

El pH final del compost puede influir sobre las características fisicoquímicas del suelo lo que conlleva a un decremento en la producción de las cosechas y sistemas de pastoreo (Komar *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que el producto obtenido del compostaje de materia orgánica inoculada no afectó nocivamente a las semillas de rábano empleadas.

5.2.9 ÍNDICE DE GERMINACIÓN.

En la presente investigación, desde los 14 *d* del inicio del compostaje, en las matrices que recibieron IEB, existió un índice de germinación cercano al 80% (Tabla 7). Posteriormente, ambas matrices superaron ese nivel, pero, desde los 42 *d* hasta el fin del experimento, en las matrices control, el índice de germinación se mantuvo constante. Sin embargo, en las matrices inoculadas, existió un mejoramiento constante del índice con el paso del tiempo.

La Asociación de Compostaje del Reino Unido considera maduro al compost que no presenta efectos negativos sobre la germinación de las semillas o el crecimiento de las plantas (Nolan *et al.*, 2011). Complementariamente, la estabilidad del compost se relaciona con el nivel de actividad microbiana (Larney y Angers, 2012; Nolan *et al.*, 2011). La estabilidad y madurez del compost dependen de las condiciones fisicoquímicas iniciales presentes en las matrices de degradación así como del control del proceso de compostaje (Nolan *et al.*, 2011).

En condiciones naturales, las moléculas complejas derivadas de la materia prima presentes en compostes inmaduros e inestables, favorecen el desarrollo y actividad de determinados microorganismos los que a su vez generan compuestos fitotóxicos (Nolan *et al.*, 2011). Las moléculas nitrogenadas reactivas más importantes en los ecosistemas terrestres son el NH_3 , NH_4^+ , y el NO_3^- , siendo más tóxicos los primeros (van den Berg y Ashmore, 2008). Es razonable considerar que la reducción del índice de germinación ocurrido a los 42 *d*, en ambas matrices se debió a la existencia de cantidades elevadas de NH_3 provenientes de los

cadáveres en descomposición. En las matrices inoculadas, el NH_3 excedente fue empleado rápidamente por la biomasa microbiana aumentada, pero en las matrices control, la biomasa indígena presentó inconvenientes para manejarlo adecuadamente. Algunos autores (Nolan *et al.*, 2011; Tiquia, 2005; Zucconi *et al.*, 1981) sugieren emplear el índice de germinación (combinación del factor de germinación de semillas relativa y factor de elongación de raíces) de 80% como indicador de la desaparición de la fitotoxicidad en compostes. En el año 2011, (Nolan *et al.*, compostaron, dentro de tambores giratorios, 40 kg de residuos orgánicos y donde los tratamientos fueron: excreta de cerdo (ExC) sola; ExC + aserrín; ExC + residuos de jardinería; ExC + paja molida. El índice de germinación, a los 56 d, fue superior al 80% en las matrices que emplearon aserrín y residuos de jardinería. También, Tiquia, (2005), empleó semillas de espinaca China (*Amaranthus spinosus*), y realizó pruebas de fitotoxicidad al final del proceso de compostaje para asegurar que los efectos dañinos y de toxicidad del producto fueron eliminados. El índice de germinación por arriba del 80% se alcanzó en todas las pilas evaluadas.

Finalmente, durante la etapa de maduración del compost, se forman moléculas más grandes y más estables químicamente pero biológicamente menos reactivas, como los nitratos (Amir *et al.*, 2008) lo que provee de beneficios valiosos para el crecimiento de las plantas por medio del incremento de la fertilidad de los suelos (Christensen *et al.*, 2002; Sadava *et al.*, 2014; Sazaki *et al.*, 2005; Robert, 2002).

5.3 INACTIVACIÓN DE AGENTE PATÓGENO (FASE III).

5.3.1 TEMPERATURA DE LAS BIOPILAS

Las condiciones fisicoquímicas o factores abióticos principales que deben controlarse al compostar residuos orgánicos son: niveles de nutrientes elevados (Pichtel, 2005), relación C/N inicial cercano a 30 (Erickson *et al.*, 2009), humedad entre 50-60 % (Liang *et al.*, 2003), tamaño de la partícula (Huerta *et al.*, 2010), pH (Peláez y Sáenz, 2015), así como capacidad de la matriz conformada para retener el calor (Epstein, 2011; Maresová y Kollárová, 2010). Todos en conjunto, son necesarios para la creación de un ambiente que favorezca el desarrollo y crecimiento de biomasa microbiana con capacidad degradativa (Liang *et al.*, 2003; Maier, 2009; Pichtel, 2005). Por otro lado, las biopilas elaboradas y manejadas adecuadamente, pueden alcanzar rápidamente temperaturas letales para los microorganismos patógenos como la bacteria *Escherichia coli* que crece en temperaturas mesófilas (Turner, 2002). En el presente estudio, la temperatura alcanzada en ambas matrices, desde el mezclado de la materia prima y la introducción de los tubos de ensayo conteniendo suspensión bacteriana, fué superior a la recomendada por las autoridades Americanas (USDA, 2010) por lo que se considera que las biopilas estuvieron bien manejadas. Así, la temperatura de la Bpl llegó a su pico a los 4 d, y posteriormente comenzó a descender (Figura 6). Este comportamiento, se puede atribuir a lo siguiente: aunque el nivel de O₂ inicial fue el mismo en ambas matrices, debido a que la matriz inoculada contenía biomasa microbiana aumentada, el O₂ se agotó rápidamente, lo que ralentizó la generación de reacciones térmicas y su posterior acumulación en la matriz (Sheperd *et al.*, 2010). Por arriba de los 60 °C, los microorganismos mesófilicos mueren, mientras que los termófilicos, comienzan a esporular para sobrevivir esas condiciones desfavorables y en espera de otras condiciones ambientales más adecuadas para re-establecer el proceso de mitosis celular (Le Goff *et al.*, 2010; Maier, 2009; Marchant *et al.*, 2008). Para el caso de la BpR, también superó la temperatura indicada (USDA, 2010) para inactivar agentes patógenos. Debido a que esta biopila recibió AP, tardó más tiempo en alcanzar la temperatura máxima. Debido a que la duración del experimento fue de sólo 5 d, no se evaluó, por más tiempo, la tendencia de la temperatura en ambas matrices.

5.3.2 CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Las suspensiones bacterianas preparadas (0 d) presentaron una concentración de 5.3×10^6 UFC / ml⁻¹. En la naturaleza, el N, se encuentra en cantidades limitadas por lo que el

desarrollo de las poblaciones microbianas indígenas o autóctonas, se ve limitado y sólo ocurre cuando existen adiciones esporádicas del N (Maier, 2009). Por el contrario, en condiciones de compostaje, la proporción de C y N se establece desde el mezclado de la materia prima para que la relación sea igual o inferior a 30, lo que favorece el crecimiento de biomasa microbiana e incentiva la degradación de las biomoléculas que conforman la materia orgánica (Epstein, 2011). En la presente investigación, los componentes del medio BHI contienen N, por lo que al existir, dentro de la estufa bacteriológica las condiciones ambientales adecuadas, las biomoléculas fueron empleadas para el establecimiento de la maquinaria enzimática requerida para la síntesis proteica y posterior formación de estructuras celulares (Audesirk *et al.*, 2011) y por lo tanto conducir al incremento de la biomasa (Alberts *et al.*, 2015) de la bacteria *Escherichia coli* (Figura 7).

5.3.3 INACTIVACIÓN MICROBIANA POR MEDIO DEL COMPOSTAJE

Debido a que las biopilas construídas generaron temperaturas superiores a las recomendadas para la inactivación de agentes patógenos, las colonias bacterianas dejaron de observarse a partir de las 24 y 36 h de exposición a las condiciones de compostaje para el caso de las Bpl y BpR, respectivamente (Figuras 8 y 9).

En México, el proceso de compostaje aún no se emplea para disponer de las mortalidades y la materia orgánica derivada de las granjas porcinas (Vargas *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 2016). Así que tampoco existe evidencia científica, que muestre la capacidad de alguna manipulación, estrategia o biotecnología para acelerar dicho proceso. El primer objetivo del proceso de compostaje es la inactivación de los agentes patógenos presentes en la materia prima (Bernal *et al.*, 2009; Epstein, 2011; Nolan *et al.*, 2011; Raviv, 2015; USDA, 2010; Wilkinson, 2007) ya que el movimiento de microorganismos infecciosos al ambiente representa una contaminación importante (Vargas *et al.*, 2016).

Algunos microorganismos patógenos como la bacteria *Escherichia coli*, sobreviven y se reproducen en ambientes con temperatura templada o mesofíla y que presentan humedad relativa elevada. Los animales de sangre caliente como los mamíferos ofrecen ambas condiciones (Alberts *et al.*, 2015; Eskin y Fereidon, 2013) por lo que representan un hábitat ideal para su establecimiento. Sin embargo, cuando los agentes patógenos son eliminados por los mecanismos naturales de excreción de los animales, estos pueden sobrevivir temporalmente, en ambientes específicos como el suelo y los ecosistemas lacustres (Marchant *et al.*, 2008), pero cuando ingresan a la atmósfera, como bioaerosoles, las bacterias se estresan y detienen su metabolismo (Rosas *et al.*, 2004) hasta que encuentran

las condiciones fisicoquímicas adecuadas para el reestablecimiento de su maquinaria metabólica por lo que entonces, vuelven a reproducirse. Se ha reportado la sobrevivencia de la *Escherichia coli* en excreta fresca hasta por 56 d (Turner, 2002), lo que indica que la capacidad para sobrevivir fuera de los organismos depende de factores abióticos como la humedad, temperatura, pH y grado de radiación solar presentes en el sustrato donde la bacteria se encuentre.

La ventaja técnica de tener una reacción térmica intensa temprana en una matriz de degradación es la inactivación de los agentes patógenos presentes en la materia prima en menor tiempo (Esquivel, 2012). Esto es muy importante: *i*) para las granjas que no tienen homogenizados los subprocesos que constituyen al proceso de compostaje (Vargas *et al.*, 2016); *ii*) o en aquellas unidades productivas que generan y manejan volúmenes grandes de residuos orgánicos (Eamens *et al.*, 2011; Epstein, 2011; Pichtel, 2005; Sheperd *et al.*, 2010) ya que es más fácil perder el control del proceso; *iii*) o cuando las biopilas presentan un nivel de humedad subóptima (Liang *et al.*, 2003; Sheperd *et al.*, 2010); *iv*) en aquellas unidades productivas que padecen enfermedades digestivas y que deben controlarse rápidamente (Esquivel, 2012; Geiger *et al.*, 2016; Wilkinson, 2007); *v*) durante la época de otoño en el hemisferio norte ya que se forman más bioaerosoles conteniendo agentes patógenos que ingresan a la atmósfera (Marchant *et al.*, 2008; Rosas *et al.*, 2004); y *vi*) cuando las biopilas son visitadas rutinariamente por fauna nociva con función de vector de enfermedades para el hombre o los animales (Esquivel, 2012; Pichtel, 2005; Sadava *et al.*, 2014; Vargas *et al.*, 2016).

Ahora bien, aunque la inactivación de agentes patógenos debe ocurrir durante la etapa temprana del compostaje, es importante conocer la capacidad de la *Escherichia coli* para resistir las condiciones existentes dentro de una matriz de materiales compostados ya que algunas enfermedades zoonóticas son transmitidas por medio del consumo de alimentos contaminados. Dentro de los factores observados, se encuentran los cambios en las prácticas agrícolas y en los sistemas de producción animal como es el riego de los cultivos con aguas residuales sin tratar o la aplicación de compost inmaduro que no ha recibido tratamiento efectivo (Donoso *et al.*, 2016). En 2002, Turner observó que cuando la bacteria *Escherichia coli* es inoculada en sustratos tales como paja de avena, excreta de cerdo fresca y cama profunda y son incubados a 55 °C, la bacteria se mantiene viva sólo por 2 h. Pero, cuando la temperatura de incubación es de 50 °C, la sobrevivencia se incrementa hasta las 72 h.

Coincidiendo con estos hechos, la BpI y la BpR sólo permitieron la formación de UFC hasta antes de las 36 h, por lo que se debe considerar al proceso de compostaje como capaz de inactivar microorganismos patógenos en un corto período de tiempo, siempre y cuando se

tenga experiencia en el control de los factores abióticos principales. Así que se debe considerar que aquel compost que ha pasado por un proceso de sanitización adecuado, sólo puede contener microorganismos patógenos cuando estos se han adicionado recientemente (Sheperd *et al.*, 2010) como cuando la fauna nociva visita las biopilas que no presentan acceso restringido. Entonces, los resultados obtenidos en el presente experimento servirán como referencia para el diseño en un futuro cercano, de experimentos empleando biorreactores o biopilas a pequeña escala (hasta 200 kg) y donde se busque conocer el tiempo requerido para la inactivación de diversos agentes patógenos que afectan a las diferentes especies animales (*p. ej.*, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de parvovirus canino, virus de la influenza aviar, etc.).

Capítulo 6.0 CONCLUSIONES.

- La mezcla de sólidos recuperados y aserrín generó una reacción térmica favorable para el desarrollo de una comunidad microbiana termofílica.
- La adición de extracto de compost a medios de cultivo clásicos mejora los conteos de unidades formadoras de colonias de bacterias celulolíticas y proteolíticas.
- Realizando experimentos con microcosmos, se pudo observar que la adición del inóculo endógeno bacteriano, mejora la degradación de materia orgánica específica.
- Los cadáveres de cerdo colocados dentro de biorreactores se degradan más rápido al iniciar el proceso de compostaje con el uso de un inóculo endógeno bacteriano. Sin embargo, al final del período de observación de 98 días, la descomposición de los cadáveres se ralentiza.
- La adición del inóculo endógeno bacteriano incrementa el número de microorganismos heterótrofos que a su vez aceleran la descomposición de la materia orgánica compostada.
- La inoculación de matrices conteniendo a la bacteria *Escherichia coli* reduce los conteos microbianos, desde los 42 días del proceso de compostaje.
- El contenido de nitrógeno total de las matrices inoculadas aumenta a lo largo del proceso de compostaje, mientras que el nivel de carbono orgánico total se reduce gradualmente, por lo que la relación carbono nitrógeno termina siendo reducida.
- El pH observado a lo largo del período de observación, dentro de las matrices estudiadas, no es afectado por el uso del inóculo bacteriano.
- La aplicación del inóculo endógeno bacteriano en las matrices estudiadas genera un índice de germinación superior al 80 % desde los 56 días del compostaje.
- La adición del inóculo endógeno bacteriano a una biopila de excretas porcinas y aserrín, genera una reacción térmica de mayor intensidad, por lo que la bacteria *Escherichia coli* suspendida en medio BHI, es inactivada en menos de 24 h.

Capítulo 7.0 PROSPECTIVA.

El uso de inóculos endógenos que aceleren el proceso de compostaje de los cadáveres de cerdo aventaja al enterramiento y la incineración sobre todo cuando se presentan brotes infecciosos y la mortalidad aumenta considerablemente.

El proceso de compostaje acelerado, además de degradar sosteniblemente a los residuos orgánicos de origen pecuario, genera un producto, que sirve de enmienda y fertilizante para aplicarse al suelo nacional con lo que se contribuye con la lucha contra la desertificación y erosión que el hombre genera debido a sus prácticas agrícolas inadecuadas e intensivas. Sin embargo, es necesario analizar el compost generado para conocer las concentraciones de elementos no contemplados en la presente investigación y que pueden afectar nocivamente el desarrollo de los organismos productores.

El uso de biorreactores permite desarrollar al proceso de compostaje en un espacio limitado aumentando el control de los principales factores abióticos que favorecen el establecimiento y desarrollo del consorcio microbiano que conduce el proceso de descomposición. Así que, es posible diseñar biorreactores con inyección de aire calentado, para estimular la actividad microbiana y con esto se generen ahorros por concepto de mano de obra necesaria para realizar los volteos rutinarios. También, la sanitización de la materia prima puede ser llevada a cabo sin entrar en contacto con los agentes patógenos. Por lo que el compostaje de excretas de animales domésticos o de residuos de hospitales veterinarios, en un futuro próximo en México, podría llevarse a cabo empleando reactores.

Finalmente, el experimento de inactivación de patógenos llevado a cabo en la *Fase III* del presente trabajo puede emplearse -modificando el diseño original- para demostrar que durante la contención adecuada de la materia prima contaminada, esta es sanitizada. Actualmente, en México, existen enfermedades (p ej., diarrea epidémica porcina, síndrome respiratorio y reproductivo porcino) que se pueden transmitir por medio del contacto con ciertos residuos orgánicos (placentas, excreta, animales muertos) que no son manejados. Por lo que es necesario continuar con la investigación adicional buscándo la asociación con escuelas, facultades, iniciativa privada, y los empresarios para evidenciar las capacidades del proceso de compostaje acelerado y con eso incrementar la adopción en las granjas porcinas nacionales lo que mejorará las medidas de bioseguridad.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- **Akdeniz, N., Koziel, J. A., Ahn, H-K., Glanville, T. D. and Crawford, B. P. 2010.** Field scale evaluation of volatile organic compound production inside biosecure swine mortality composts. *Waste Manage.* 30; 1981-1988.
- 2.- **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. 2015.** Cell chemistry and bioenergetics. In: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. Sixth Edition. 43-108.
- 3.- **Álvarez, M. C. y Mendoza, E. S. 2005.** Selección de medios de cultivo y fundamento de las pruebas bioquímicas. En: *Manual Básico de Bacteriología*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Segunda edición. 79-126.
- 4.- **Amir, S., Merlina, G., Pinelli, E., Winterton, P., Revel, J.C. and Hafidi, M. 2008.** Microbial community dynamics during composting of sewage sludge and straw studied through phospholipid and neutral lipid analysis. *J. Hazard Mater.* 159; 593-601.
- 5.- **Arellano, J. y Guzmán, J. E. 2011.** Remediación. En: *Ingeniería Ambiental*. Alfaomega Grupo Editor, 77-84.
- 6.- **Arita, H. 2013.** México, con la mayor variedad de especies en América. *Gaceta UNAM*. No: 4,501; 9.
- 7.- **Arvizu, J. L. 2013.** Desechos. En: *Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero 1990-2010*. SEMARNAT. INECC. 137-156.
- 8.- **Asociación Colombiana de Porcicultores. 2002.** Cartilla Técnica: Manejo de la mortalidad por medio del compost. Fondo Nacional de la Porcicultura y Corporaciones Autónomas Regionales de Risaralda, Caldas y Quindío.
- 9.- **Audesirk, T., Audesirk, G. and Byers, B. E. 2011.** Harvesting Energy: Glycolysis and Cellular Respiration. In: *Biology. Life on Earth*. Ninth Edition. Benjamin Cummings. 127-141.
- 10.- **Balkwill, D. L. and Ghiorse, W. C. 1985.** Characterization of subsurface bacteria associated with two shallow aquifers in Oklahoma. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (3), 580-588.
- 11.- **Barker, A. V. 2010.** Composting. In: *Science and technology of organic farming*. CRC Press. Taylor and Francis group. 93-103.

- 12.- Barrena, R., Pagans, E., Vázquez, F., Artola, A. and Sánchez, A. 2007.** Full-scale co-composting of hair wastes from the leather manufacturing industry and sewage sludge. *Compost Sci. Util.* 15; 1; 16-21.
- 13.- Barrena, R., Vázquez, F., Gordillo, MA., Gea, T. and Sánchez, A. 2005.** Respirometric assays at fixed and process temperatures to monitor composting process. *Bioresour. Technol.* 96; 1153-1159.
- 14.- Barrow, G. I and Feltham R.K.A. 2003.** Bacterial characters and characterization. In: Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria. Third Edition. Cambridge University Press. 21-42.
- 15.- Beck-Friis, B., Smars, S., Jonsson, H., Eklind, Y. and Kirchmann. 2003.** Composting of Source-Separated House hold Organics at Different Oxygen Levels: Gaining and Understanding of the Emission Dynamics.11, 1, 41-50.
- 16.- Benson, E., Malone, G., Alphin, R., Johnson, K. and Staicu, E. 2008.** Application of in-house mortality composting on viral inactivity of Newcastle disease virus. *Poultry Sci.* 87; 627-635.
- 17.- Bernal, M.P, Alburquerque, J. A. and Moral, R. 2009.** Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresour. Technol.* 100; 5444-5453.
- 18.- Bonhotal, J., Schwarz, M. and Rynk, R. 2014.** Feedstock characteristics and requirements. In: *Composting Animal Mortalities.* Cornell Waste Management Institute. 7-10
- 19.- Bruns, M. A., Hanson, J. R., Mefford, J. and Scow, K. M. 2001.** Isolate PM1 populations are dominant and novel methyl *tert*-butyl ether-degrading bacteria in compost biofilter enrichments. *Environ. Microbiol.* 3 (3) 220-225.
- 20.- Bueno, P., Tapias, R., López, F. and Díaz, M. J. 2008.** Optimizing composting parameters for nitrogen conservation in composting. *Bioresour. Technol.* 99, 5069–5077.
- 21.- Cain, M. L., Bowman, W. D. and Hacker, S. D. 2011.** Nutrient Supply and Cycling. In: *Ecology.* Second Edition. Sinauer Associates, Inc. 452-473.
- 22.- California Compost Quality Council. 2001.** CCQC-Compost Maturity Index. URL: <http://www.crra.com/ccqc/ccqchome.htm>
- 23.- Caldwell, D. E., Wolfaardt, G. M., Korber, D. R., Karthikeyan, S., Lawrence, J. R. and Brannan, D. K. 2002.** Cultivation of microbial consortia and communities. In: *manual of environmental microbiology.* ASM Press. American Society of Microbiology. 92-100.

- 24.- Campos, A. C., Etchevers, J. B., Oleschko, K. L. and Hidalgo, C. M. 2014.** Soil microbial biomass and nitrogen mineralization rates along an altitudinal gradient on the Cofre de Perote volcano (México): the importance of landscape position and land use. *Land. Degrad. Dev.* 25, 581-593.
- 25.- Carabias. J. 2013.** Estancado, el desarrollo sustentable en todo el mundo. *Gaceta UNAM.* No 4,509; 7.
- 26.- Cariello, M. E., Castañeda, L., Riobo, I. and González, J. 2007.** Endogenous microorganisms inoculant to speed up the composting process of urban sewage sludge. *J. Soil. Sci. Plant. Nutr.* 7 (3) 26-37.
- 27.- Castellanos, J. Z., Uvalle-Bueno, J. X. y Aguilar-Santelises, A. 2000.** La calidad del agua para uso agrícola. En: *Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas.* INTAGRI. 146-154.
- 28.- Cepeda J. M. 2009.** Componentes orgánicos del suelo. En: *Química de suelos.* Editorial Trillas. Segunda Edición. 43-64.
- 29.- Chang, J. I. and Hsu, T.E. 2008.** Effects of compositions on food waste composting. *Bioresour. Technol.* 99, 8068-8074.
- 30.- Christensen, K., Carlsbaek, M. and Kron, E. 2002.** Strategies for evaluating the sanitary quality of composting. *J. Appl. Microbiol.* 92, 1143-1158.
- 31.- Ciprian C. A.; Cruz, S. T.; Mendoza, E. S.E. 2005.** Epidemiología, prevención y control de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos. En: *Enfermedades de importancia económica en producción animal.* Rodríguez, V. R. I. Editorial Mc Graw Hill. Yucatán, México. 449-477.
- 32.- Dalling, J. W. 2008.** Pioneer Species. In: *Encyclopedia of Ecology.* Jorgensen, S. E., Faith, B. D. Elsevier. 2779-2782.
- 33.- Deen, J. 2008.** Prevention and control of emerging and re-emerging zoonotic swine diseases. Paper presented at the 6th Asian Pig Veterinary Society Congress. Ho Chi Minh City, Vietnam. K22-K24.
- 34.- de Klein, Pinares-Patino, C. and Waghorn, G. C. 2008.** Greenhouse Gas Emissions. In: *Environmental Impacts of Pasture-based Farming.* CABI; 1-25.
- 35.- Diario Oficial de la Federación. 2003.** NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección Ambiental; Salud Ambiental; Residuos Peligrosos-Biológico- Infecciosos. Clasificación y Especificaciones de Manejo.

- 36.- Donoso, S., Gadicke, P. y Landaeta, C. 2016.** Las zoonosis transmitidas por alimentos pueden afectar su epidemiología, producto del cambio climático y los procesos de globalización. Chil. J. Agric. Anim. Sci. 32 (2) 149-156.
- 37.- Eamens, G. J., Dorahy, C. J., Muirhead, L., Enman, B., Pengelly, P., Barchia, I. M., Gonsalves J.R. and Cooper, K. 2011.** Bacterial survival studies to assess the efficacy of static pile composting and above ground burial for disposal of bovine carcasses. J. Appl. Microbiol. 110, 1402-1413.
- 38.- Elving, J., Ottoson, J. R., Vinnera, B. and Albiñ, A. 2010.** Growth potential of faecal bacteria in simulated psychrophilic/mesophilic zones during composting of organic waste. J. Appl. Microbiol. 108, 1974–1981.
- 39.- Eklind, Y. and Kirchmann, H. 2000.** Composting and storage of organic household waste with different litter amendments. II: nitrogen turnover and losses. Bioresour. Technol. 74, 125-133.
- 40.- Epstein, E. 2011.** Basic concepts of composting. In: Industrial composting. CRC Press. Taylor and Francis Group. 15-24.
- 41.- Erickson, L. E. 2009.** Bioreactors. In: Encyclopedia of Microbiology. Third Edition. Academic Press. Elsevier Inc. 206-211.
- 42.- Eskin, N.A and Fereidon, S. 2013.** Meat and Fish. In: Biochemistry of Foods. Third Edition. Elsevier, Inc. 127-186.
- 43.- Esquivel, H. 2012.** Evaluación sanitaria del composteo sobre la inactivación de cisticercos de *Taenia solium* en canales de cerdo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
- 44.- FAO. 2013.** Carbon footprint. In: Food Wastage Footprint. Impacts on Natural Resources. 16-25
- 45.- FAO. 2017.** Global economic growth, investment, trade and food prices. In: The future of food and agriculture. Trends and challenges. Rome. 17-31.
- 46.- Fernández, L. C., Rojas, N. G., Roldán, T. G., Ramírez, M. E., Zegarra, H.G., Uribe, R., Reyes Ávila, R. J., Flores, D. y Arce, J. M. 2006.** Análisis físicos y químicos en suelo. En: Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. SEMARNAT. Primera Edición. 19-87.

- 47.- Fukumoto, Y., Osada, T., Hanajima, D. and Haga. K. 2003.** Patterns and quantities of NH₃, N₂O y CH₄ emissions during swine manure composting without forced aeration –effect of compost pile scale. *Bioresour. Technol.* 89, 109-114.
- 48.- Gaceta Oficial del Distrito Federal. 2012.** NADF-020-AMBT-2011. Requerimientos mínimos para la producción de composta a partir de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos, agrícolas, pecuarios y forestales así como las especificaciones mínimas de calidad de la composta producida y/o distribuida en el Distrito Federal. El 30 de Noviembre de 2012.
- 49.- Gandolfi, I., Sicolo, M., Franzetti, A., Fontanarosa, E., Santagostino, A. and Bestetti, G. 2010.** Influence of compost amendment on microbial community and ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils. *Bioresour. Technol.* 101, 568-575.
- 50.- Gao, M., Liang, F., Yu, A., Li, B. and Yang, L. 2010.** Evaluation of stability and maturity during forced-aeration composting of chicken manure and sawdust at different C/N ratios. *Chemosphere.* 78, 614-619.
- 51.- García-Sierra, J., Rozeboom, D. W., Straw, B. E., Thacker, B. J., Granger, L. M., Fedorka-Cray, P. J. and Gray, J. T. 2001.** Studies on survival of pseudorabies virus, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, and *Salmonella* serovar Choleraesuis in composted swine carcasses. *J. Swine Health Prod.* 9 (5) 225-231.
- 52.- García-Gómez, A., Roig, A. and Bernal, M.P. 2003.** Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Bioresour. Technol.* 86, 59-64.
- 53.- Geiger, J., Cano, J. P., Lyons, J. W., Thompson, R., Riek, T. and Snider, T. 2016.** Applied strategies to prevent spread of swine enteric coronaviruses in a North American multiplication system. 24th International Pig Veterinary Society Congress and 8th European Symposium of Porcine Health Management. O-VVD3-011, 114.
- 54.- Geissler, G. y Arroyo M. 2011.** La contaminación del agua y los procesos de tratamiento de aguas contaminadas. En: *El agua como un recurso natural renovable*. Editorial Trillas. Impreso en México. 127-154.
- 55.- Gerba, P and Pepper, I. L. 2009.** Wastewater Treatment and Biosolids Reuse. In: *Environmental Microbiology*. Academic Press. 503-530.
- 56.- Germida, J. J., and de Freitas, J. R. 2008.** Cultural methods for soil and root-associated microorganisms. In: *Soil sampling and methods of analysis*. Carter, M. R., and Gregorich, E. G. Canadian Society of Soil Science. Taylor and Francis Group, LLC. 215-245.

- 57.- Grajales, A., Jaramillo, A. y Cruz, G. 2008.** Los nuevos conceptos sobre “agua virtual” y “huella hídrica” aplicados al desarrollo sostenible: Implicaciones de la agricultura en el consumo hídrico. *Agronomía*. 16 (1) 7-26.
- 58.- Greiner, L. and Connor, J. 2016.** Evaluation of Compost Bays to Test Positive for PEDv/PDCov on Clinically Active Farms. 24th International Pig Veterinary Society Congress and 8th European Symposium of Porcine Health Management. PO-PW1-070, 516.
- 59.- Gunadi, B. and Edwards, C. 2003.** The effects of multiple applications of different organic wastes on the growth, fecundity and survival of *Eisenia fetida* (Savigny) (Lumbricidae). *Pedobiología*. 47, 321-329.
- 60.- Guo, Y., Zhu, N., Zhu, S., and Deng, C. 2007.** Molecular phylogenetic diversity of bacteria and its spatial distribution in composts. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1344-1354.
- 61.- Gutiérrez, H y de la Vara, R. 2012.** Diseños en bloques. En: Análisis y diseño de experimentos. Tercera Edición. McGraw-Hill/Interamericana Editores. 85-114.
- 62.- Han, K., Seo, H., Oh, Y., Park, C. and Chae, C. 2012.** The effects of North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-based modified live vaccine in pre-immunized sows artificially inseminated with European PRRSV spiked semen. *Proceedings of the 22nd International Pig Veterinary Society Congress*. Jeju, Korea, 287.
- 63.- Harrison, R. B. 2008.** Composting and formation of humic substances. In: *Encyclopedia of Ecology*. Jorgensen, S. E., Faith, B. D. Elsevier. 713-719.
- 64.- Hillis, D. M., Sadava, D., Hill, R. W. and Price, M. 2014.** Pathways that harvest and store chemical energy. In: *Principles of life*. Second Edition. Sinauer Associates, MacMillan. 105-127.
- 65.- Horiuchi, J., Ebie, K., Tada, K., Kobayashi, M. and Kanno, T. 2003.** Simplified method for estimation of microbial activity in compost by ATP analysis. *Bioresour. Technol.* 86, 95-98.
- 66.- Huang, G. F., Wong, J.W., Wu, Q. T. and Nagar, B. 2004.** Effect of C/N on composting of pig manure with sawdust. *Waste Manage.* 24, 805-813.
- 67.- Huerta-Pujol, O., Soliva, M., Martínez-Farré, F. X., Valero, J. and López, M. 2010.** Bulk density determination as a simple and complementary tool in composting process control. *Bioresour. Technol.* 101, 995-1001.
- 68.- Ichida, J. M., Krizova, L., LeFevre, C. A., Keener, H. M., Elwell, D. L. and Burt. E. H. 2001.** Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J. Microbiol. Methods.* 47, 199-208.

- 69.- Ilea, C. R. 2009.** Intensive Livestock Farming: Global Trends, Increased Environmental Concerns, and Ethical Solutions. *J. Agric. Environ. Ethics.* 22, 153–167.
- 70.- Iñiguez, G. 2010.** Compostaje de residuos de rastros (intestino grueso de cerdos). En: *Experiencias en el compostaje y residuos industriales y pecuarios.* Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Primera edición. 117-131.
- 71.- Iñiguez, G., Rodríguez, R. y Virgen, G. 2010.** Compostaje de material de descarte y aguas residuales de la industria de curtiduría. En: *Experiencias en el compostaje de residuos industriales y pecuarios.* Iñiguez, G. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Primera edición. 53-72.
- 72.- Iñiguez, G. 2011.** Determinaciones. En: *El ABC del compostaje.* Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Primera Edición. 71-86.
- 73.- Ishii, K., Fukui, M. and Takii, S. 2000.** Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *J. Appl. Microbiol.* 89, 768-777.
- 74.- Jeavons, J. 1991.** La Composta. En: *Cultivo biointensivo de alimentos.* Ecology Action of the Mid-Penninsula, 38-52.
- 75.- Jiang, T., Schuchardt, F., Li, G., Guo, R. and Zhao, Y. 2011.** Effect of C/N ratio, aeration rate and moisture content on ammonia and greenhouse gas emission during the composting. *J. Environ. Sci.* 23, 1754-1760.
- 76.- Kato, K. and Miura, N. 2008.** Effect of matured compost as a bulking and inoculating agent on the microbial community and maturity of cattle manure compost. *Bioresour. Technol.* 99, 3372-3380.
- 77.- Kitano, M., Yoshida, T., Maeda, K., Matsukawa, R., Hasebe, Y., Uchiyama, S. and Karube, I. 1998.** Degradation of *Chlorella* cells during composting. *J. Biotechnol.* 66, 187-193.
- 78.- Komar, S., Miskewitz, R., Westendorf, M. and Williams, C. A. 2012.** Effects of bedding type on compost quality of equine stall waste: Implications for small horse farms. *J. Animal Sci.* 90, 1069-1075.
- 79.- Lal, R. 2007.** Managing soils for food security and climate change. *Journal of Crop Improvement.* 19; No 37-38, 49-71.
- 80.- Larney, F. J. and Angers, D. A. 2012.** The role of organic amendments in soil reclamation: A review. *Canadian Journal of Soil Science.* 92, 19-38.

- 81.- Le Goff, O., Bru-Adan, V., Bacheley, H., Godon, J-J. and Wéry, N. 2010.** The microbial signature of aerosols produced during the thermophilic phase of composting. *J. Appl. Microbiol.* 108, 325-340.
- 82.- Liang, C., Das, K. C. and McClendon, R. 2003.** The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. *Bioresour. Technol.* 86, 131-137.
- 83.- Li, X., Zhang, R., and Pang, Y. 2008.** Characteristics of dairy manure composting with rice straw. *Bioresour. Technol.* 99, 359-367.
- 84.- Mackie, R.I., Stroot, P. G. and Varel, V. H. 1998.** Biochemical identification and biological origin of key odor components in livestock waste. *J. Animal Sci.* 76, 1331-1342.
- 85.- MacLeod, M., Gerber, P., Mottet, A., Tempio, G., Falcucci, A., Opio, C., Vellinga, T., Henderson, B. and Steinfeld, H. 2013.** Greenhouse gas emissions from pig and chicken supply chains. A global life cycle assessment. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- 86.- Maier, R.M. 2009.** Bacterial Growth. In: *Environmental Microbiology*. Maier, R. M., Pepper, I. L. and Gerba, C. P. Elsevier. Academic Press. 37-54.
- 87.- Marchant, R., Franzetti, A., Pavlostathis, S., Okutman, D., Erdbrugger, I., Unyayar, A., Mazmanci, M. and Banat, I. 2008.** Thermophilic bacteria in cool temperate soils: are they metabolically active or continually added by global atmospheric transport? *Appl. Microb. Cell Physiol.* 78, 841-852.
- 88.- Maresová, K. and Kollárová, M. 2010.** Influence of compost covers on the efficiency of biowaste composting process. *Waste Manage.* 30, 2469-2474.
- 89.- Marquina, D y Santos de la Sen, A. 2010.** Sistemas de Quorum sensing en bacterias. *Reduca (Biología). Serie Microbiología.* 3 (5): 39-55.
- 90.- Martínez, E., Fuentes, J. P. y Acevedo, E. 2008.** Carbono orgánico y propiedades del suelo. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal.* 8 (1) 68-96.
- 91.- Martínez, M. M., Pedroza, A. M. y Gutiérrez, V. 2010.** Preparación de medios de cultivo. *Métodos Microbiológicos, Físicos y químicos con aplicación ambiental. Manual de microbiología ambiental.* Editorial USM, Santiago, Chile.
- 92.- McKeon, M. 2008.** Cut your slurry costs. *Pig International.* 38, 8.
- 93.- McKinley, J., Parzen, R. and Mercado, A. 2012.** Ammonia inactivation of *Ascaris ova* in ecological compost by using urine and ash. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (15) 5133-5137.

- 94.- Meeker, D. L., and Meisinger, J. L. 2015.** Rendered ingredients significantly influence sustainability, quality, and safety of pet food. *J. Animal Sci.* 93, 835-847.
- 95.- Méndez, E. J. 2008.** Elaboración de inoculante como acelerador de la digestión de biomasa animal. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana.
- 96.- Mendoza, S. y Ciprian, A. 2001.** Tercer Ciclo Nacional “Enfermedades respiratorias del cerdo”. Editorial UNAM. México DF. 75-84.
- 97.- Miller, D. 2007.** Horizontal Composter Handles Mortalities. *National Hog Farmer.* Jun 15.
- 98.- Mittal, G. S. 2006.** Treatment of wastewater from abattoirs before land application: A review. *Bioresour. Technol.* 97, 1119-1135.
- 99.- Miyamoto; H., Seta, M., Horiuchi, S., Iwasawa, Y., Naito, T., Nishida, A., Miyamoto, H., Matsushita, T., Itoh, K., and Kodama, H. 2013.** Potential probiotic thermophiles isolated from mice after compost ingestion. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1147-1157.
- 100.- Moeller, S. 2006.** Environment assurance program: Composting swine mortality module. Des Moines, IA. National Pork Board.
- 101.- Morilla, A. 2009.** Contaminación Ambiental. En: Manual de bioseguridad para empresas porcinas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Primera Edición. 231-268.
- 102.- Morrow, M. and Middleton, T. 2001.** Carcass disposal: A growing concern. *Pig Progress* 17 (1) 7-9.
- 103.- Morrow, W.E. 2001.** Alternative methods for the disposal of swine carcasses. www.ncsu.edu/project/swine_extension/publication/factsheets/815s.htm
- 104.- Morse, D. E. 2006.** How to compost Step by step. In: Composting Animal Mortalities. Agricultural Resources Management and Development Division. Minnesota Department of Agriculture. 19-23.
- 105.- Mota, D., Herrera, E., Ramírez, R., Álvarez, E., Alonso, M.L. y Becerril, M. 2005.** Reacciones enzimáticas en la canal porcina. *Los porcicultores y su entorno.* 7; 46; 90-96.
- 106.- Mukhtar, S., Kalbasi, A. and Ahmed, A. 2004.** Composting. In: Carcass disposal: A comprehensive review. National Agricultural Biosecurity Center Consortium. Kansas State University. 1-85
- 107.- Nemiroff, L. and Patterson, J. 2007.** Design, testing and implementation of a large-scale urban dog waste composting program. *Compost Sci. Util.* 15 (4) 237-242.

- 108.- Nolan, T., Troy, S. M., Healy, M.G., Kwapinski, W., Leahyc, J.J., and Lawlor, P. G. 2011.** Characterization of compost produced from separated pig manure and a variety of bulking agents at low initial C/N ratios. *Bioresour. Technol.* 102, 7131-7138.
- 109.- Olea, R. 2010.** Oportunidades para el sector agropecuario ante el cambio climático: uso de biodigestores. Quinto día agrosilvopastoril. Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agrosilvopastoril. Chapa de Mota, México. 9-15.
- 110.- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2013.** Costs and distributional impacts of inaction. In: *Water security for better lives. OECD Studies on Water*, OECD Publishing. 145- 170.
- 111.- Otte, M.P., Gagnon, J., Comeau, Y., Matte, N., Greer, C.W. and Samson, R. 1994.** Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of pentachlorophenol/creosote contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 926-932.
- 112.- Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G. A. and Piotrowska-Seget. 2016.** Monitoring the changes in a bacterial community in petroleum-polluted soil bioaugmented with hydrocarbon-degrading strains. *Appl. Soil Ecol.* 105, 76-85.
- 113.- Peláez, C. A y Sáenz O. A. 2015.** Compostaje de mortalidad como alternativa para el manejo del cadáver y el residuo del equino en el Centro de Veterinaria y Zootecnia CES. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- 114.- Pepper, I. L., Gerba, C. P. And Maier, R. M. 2009.** Environmental Sample Collection and Processing. In: *Environmental Microbiology*. Maier, R. M., Pepper, I. L. and Gerba, C. P. Elsevier. Academic Press. 137-155.
- 115.- Pérez, M. V. y Villegas, R. A. 2009.** Manual técnico: procedimientos para el manejo de residuos orgánicos avícolas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquía.
- 116.- Pérez, R. 2006.** Granjas porcinas y medio ambiente. Contaminación del agua en La Piedad, Michoacán. Primera Edición. UNAM-IIE-FMVZ-I NE.
- 117.- Peters, S., Koshinsky, S., Schwieger, F. and Tebbe, C. 2000.** Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (3), 930-936.

- 118.- Pichardo, V., Chávez, H. y Gallegos, A. 2008.** Estimación de carbono en plantaciones forestales de *Pinus douglasina*, a partir de biomasa aérea. Avances en la Investigación Científica en el CUCBA; ISBN 978-607-00-2083-4.
- 119.- Pichtel, J. 2005.** Composting MSW. In: Waste Management Practices: Municipal, Hazardous, and Industrial. CRC Press. Taylor and Francis Group. 213-245.
- 120.- Pijoan, C. 2006.** Regional eradication: An option for today or for the future? Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians. 393-394.
- 121.- Pinelli, A., Acedo, E., Hernández, J., Belmar, R y Beltrán, A. 2004.** Buenas Prácticas de Manejo durante la producción porcina. En: Manual de Buenas Prácticas de Producción en Granjas Porcícolas. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Confederación de Porcicultores Mexicanos, A. C. Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 26-37
- 122.- Pleasant, B and Martin, D. L. 2008.** Gardening in garbage. In: The complete compost gardening guide. Storey Publishing. 8-29
- 123.- Ponce, M. y Márquez, M. L. 2005.** Ecosistemas. En: Ecología: organismos, ambientes y su preservación. Primera edición. Editorial Esfinge. 24-69.
- 124.- Ramírez, P y Coha, J. M. 2003.** Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. Revista Peruana de Biología. 10 (1) 67-77.
- 125.- Rashid., M. T., Voroney, R. P. and Khalid, M. 2010.** Application of food industry to agricultural soils mitigates green-house gas emissions. Bioresour. Technol. 101, 485-490.
- 126.- Raviv, M. 2015.** Can the use of composts and other organic amendments in horticulture help to mitigate climate change? In: Proceedings of the Second International Symposium on Organic Matter management and Compost Use in Horticulture. Edited by: Ortega, R., Martínez, MM. and Ospina, P. International Society for Horticultural Science. 19-28.
- 127.- R Core Team 2017.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- 128.- Reyes, A. 2012.** Elaboración de una composta: Cálculo del costo de producción por concepto del consumo de agua. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.

- 129.- Robert, M. 2002.** Tendencia general de la captura de carbono en el suelo. En: Captura de carbono en los suelos para un mejor manejo de la tierra. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 1-7.
- 130.- Rodríguez, M. y Córdoba, A. 2006.** Manual de Compostaje Municipal. Tratamiento de residuos sólidos urbanos. SEMARNAT, INE y GTZ. Primera edición.
- 131.- Román, P., Martínez, M. M., Pantoja, A. 2013.** Fundamentos teóricos del compostaje. En: Manual de Compostaje del Agricultor. Experiencias en América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 21-44.
- 132.- Rosas, I., Salinas, E., Martínez, L., Eslava, C. y Cravioto, A. 2004.** Bacterias en la atmósfera. En: Microbiología Ambiental. Instituto Nacional de Ecología. (INE-SEMARNAT). Universidad Nacional Autónoma de México. 15-45.
- 133.- Ruiz, J.F. 2009.** Proceso biológico aeróbico de compostaje. En: Ingeniería del compostaje. Universidad Autónoma Chapingo. Primera edición. 99-115.
- 134.- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K. and Swings, J. 2003.** Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. J. Appl. Microbiol. 94, 127-137.
- 135.- Sadava, D., Hillis, D. M., Heller, H. C. and Berenbaum, M. R. 2014.** Community Ecology. In: The Science of Biology. Tenth Edition. Sinauer. MacMillan. 1188-1206.
- 136.- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2011.** Métodos aceptados para la disposición sanitaria de cadáveres de animales, sus despojos y materiales de riesgo. En: Manual de procedimientos para la prevención, control y erradicación de la Influenza aviar de alta patogenicidad. SAGARPA/SENASICA. 60-68.
- 137.- Sánchez, T.M. 2009.** Caracterización microbiológica del proceso de compostaje a partir de residuos azucareros. Agronomía Tropical. 59 (3) 309-316.
- 138.- Sanders, J. O., Rozeboom, D. W., Loudon, T. L., Northcott, W. J. and Person, H. L. 2010.** Quantifying nutrients in effluent from uncovered, intact mature bovine carcass compost piles subjected to storm events. Compost Sci. Util. 18 (4) 216-231.
- 139.- Sandrin, T. R., Herman, D. C. and Maier, R. M. 2009.** Physiological Methods. In: Environmental Microbiology. Maier, R. M., Pepper, I. L. and Gerba, C. P. Elsevier. Academic Press. 191-223.

- 140.- Sasaki, H., Yano, H., Sasaki, T. and Nakai, Y. 2005.** A survey of ammonia-assimilating micro-organisms in cattle manure composting. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1356-1363.
- 141.- Sauri, M. R. y Castillo, E. R. 2002.** Utilización de la composta en procesos para la remoción de contaminantes. *Ingeniería.* 6, 55-60.
- 142.- Sheperd, MW., Liang, P., Jiang, X., Doyle, MP. and Erickson, MC. 2010.** Microbiological analysis of composts produced on South Carolina poultry farms. *J. Appl. Microbiol.* 108, 2067-2076.
- 143.- Signorini, P.M., Civit, S., Bonilla, M., Cervantes, M.E., Calderón, M., Pérez, A., Espejel, M.P. y Almaza, C. 2006.** Evaluación de riesgos de los rastros y mataderos municipales. *COFEPRIS* 5-26.
- 144.- Standford, K., Larney, F., Olson, A., Yanke, L. and McKenzie, R. 2000.** Composting as a means of disposal of sheep mortalities. *Compost Sci. Util.* 8 (2) 135-146.
- 145.- Standford, K., McAllister, T.A., Reuter, T., Xu, X., Moyer J.R. and Larney, F. J. 2009.** Biocontained Mortality Compost Using Liquid Manure. *Compost Sci. Util.* 17 (3) 158-165.
- 146.- Stanford, K., Nelson, V., Sexton, B., McAllister, T. A., Hao, X. and Larney, F. J. 2007.** Open-air windrows for winter disposal of frozen cattle mortalities: effects of ambient temperature and mortality layering. *Compost Sci. Util.* 15 (4) 257-266.
- 147.- Stormo, K. E. and Crawford, R. L. 1992.** Preparation of encapsulated microbial cells for environmental applications. *App. Environ. Microbiol.* 58 (2) 727-730.
- 148.- Taigánides, E. P., Pérez, R. y Girón, E. 1996.** Las leyes ambientales y la porcicultura en México. En: Manual para el manejo y control de aguas residuales y excretas porcinas en México. Instituto de Investigaciones Económicas. UNAM. México. 1-22.
- 149.- Tanner, R. S. 2002.** Cultivation of bacteria and fungi. In: Manual of Environmental Microbiology. Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, G. R., McInerney, M. J. and Stetzenbach, L. D. ASM Press. American Society of Microbiology. 62-70.
- 150.- Taylor, B. N. and Thompson, A. 2008.** The International System of Units (SI). U. S. Department of Commerce. National Institute of Standards and Technology Special Publication 330. Washington, D. C.
- 151.- Taylor, C.R., Hardiman, E.M., Ahmad, M., Sainsbury, P.D., Norris, P.R. and Bugg, T.D.H. 2012.** Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin from screening of environmental samples. *J. Appl. Microbiol.* 113, 521-530.

- 152.- Tiquia, S.M. 2005.** Microbiological parameters as indicators of compost maturity. *J. Appl. Microbiol.* 99, 816-828.
- 153.- Tiquia, S. and Tam, N. 2002.** Characterization and composting of poultry litter in forced-aeration piles. *Process Biochem.* 37, 869-880.
- 154.- Tiquia, S. M. and Tam, N. 2000.** Co-composting of spent pig litter and sludge with forced-aeration. *Bioresour. Technol.* 72, 1-7.
- 155.- Tiquia, S. M., Richard, T. L., Honeyman, M. S. 2002.** Carbon, nutrient, and mass loss during composting. *Nutr. Cyc. Agroecosyst.* 62, (1) 15-24.
- 156.- Tiquia, S., Wan, J. and Tam, N. 2001.** Extracellular enzyme profiles during co-composting of poultry manure and yard trimmings. *Process Biochem.* 36, 813-820.
- 157.- Tortora, G., Funke, B. and Case, C. 2010.** Environmental and Applied Microbiology. In: *Microbiology. An introduction.* Benjamin Cummings. Tenth edition. 766-792.
- 158.- Trautmann, N. M. and Krasny, and M. E. 1997.** The science of composting. In: *Composting in the classroom.* National Science Fundation; Cornell Waste Management Institute; Cornell Center for the Environment. 1-26.
- 159.- Travers D. 2007.** Microbiología aplicada a las ciencias ambientales: reactores biológicos para el tratamiento de efluentes industriales. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias. Facultad de Química. Universidad de la República. Uruguay.
- 160.- Trujillo, M.A. 2012.** Biomédicas produce fertilizantes biológicos. *Gaceta UNAM.* No. 4,448; 10.
- 161.- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itävaara, M. 2000.** Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresour. Technol.* 6, 169-183.
- 162.- Turner, C. 2002.** The thermal inactivation of *E.coli* in straw and pig manure. *Bioresour. Technol.* 84, 57-61.
- 163.- Turovskiy, I. S. and Mathai P. K. 2006.** Composting. In: *Wastewater sludge processing.* Wiley-Interscience. A John Wiley and Sons, Inc., Publication. 210-250
- 164.- Ulyshen, M. D., Müller, J. and Seibold, S. 2016.** Bark coverage and insects influence wood decomposition: Directs and indirect effects. *Appl. Soil Ecol.* 105, 25-30.
- 165.- Urquiaga, S.; Reis-Martins, M.; Guareschi, R.; Alves, B.J.A.; Jantalia, C.; Boddey R.M. 2016.** Suelo, Agricultura y Alimentación. Aprovechando las oportunidades. XLI Congreso

Nacional de la Ciencia del suelo. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C., León, México. 11-15.

166.- United State Department of Agriculture. 2012. National Engineering Handbook, Part 651, Agricultural Wastes and Water, Air, and Animal Resources. Washington, D.C.

167.- United State Department of Agriculture. 2010. National Engineering Handbook, Part 637, Composting. Washington, D.C.

168.- van den Berg and Ashmore, M. 2008. Nitrogen. In: Encyclopedia of Ecology. Edited by Jorgensen, S. E. and Fath, B. D. Elsevier B. V. 2518-2526.

169.- Vander Gheynst, J. S. and Lei, F. 2000. The effect of microbial inoculation and pH on microbial community structure changes during composting. Process Biochem. 35, 923-929.

170.- van Wyk, P. H. and Mohulatsi, M. 2003. Biodegradation of waste paper by cellulase from *Trichoderma viride*. Bioresour. Technol. 86, 21-23.

171.- Vargas, A. 2009. Aprovechamiento de los desechos en las granjas porcinas y su impacto medioambiental. Convención Nacional de la Federación de Colegios y Asociaciones de Médicos Veterinarios Zootecnistas A.C. Pachuca de Soto, Hidalgo.

172.- Vargas, A., Mendoza, S.E. Trujillo, M.E., y Reyes, L. B. 2013. Compostaje de cadáveres de cerdo y obtención del costo de producción. Primer foro regional sobre bioingeniería del compostaje. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México.

173.- Vargas-Sánchez, A., Mendoza-Elvira, S. M., Reyes Sánchez, L. B., Trujillo-Ortega, M. E. y García-López, E. 2014. Evolución y pérdida de masa en materia orgánica compostada. XX Congreso Latinoamericano y XVI Congreso Peruano de la Ciencia del Suelo. Cusco, Perú.

174.- Vargas, A., Trujillo, M.E., Mendoza, E.S. y Ayala, R.A. 2012. Compostaje de cadáveres (*In-site*) en una granja de ciclo completo. Memorias del XLVII Congreso Nacional AMVEC, A. C., Guadalajara, Jalisco. 189.

175.- Vargas, A., Trujillo, ME., Martínez, VM. y Mendoza, ES. 2016. Establecimiento del proceso de compostaje en una granja porcina. XIV Congreso Anual "Día AMVEC". Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos del Estado de México. Metepec, Estado de México. 15-21.

176.- Varnero, M. T., Rojas, C. y Orellana, R. 2007. Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal. 7 (1) 28-37.

- 177.- Vecchioli, G. I., Del Panno, M. T. and Paineira, M. T. 1990.** Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. *Environmental Pollution*. 67, 249-258.
- 178.- Velikonja, S., Mihelic, R., Lobnik, F. and Lestan, D. 2003.** Microbial community structure during composting with and without mass inocula. *Compost Sci. Util.* 11 (1), 6-15.
- 179.- Vogel, T. M. and Walter, M. V. 2002.** Bioaugmentation. In: *Manual of Environmental Microbiology*. Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, G. R., McInerney, M. J. and Stetzenbach, L. D. ASM Press. American Society of Microbiology, 952-959.
- 180.- Volke, T. y Velasco, J. A. 2002.** Tecnologías de remediación. En: *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. INE-SEMARNAT. 27-58.
- 181.- Waddilove, A. 2008.** Biosecurity know how: Ten ways pathogens can spread. *The pigsite.com*
- 182.- Wang, L and D´Odorico, P. 2008.** Decomposition and mineralization. In: *Encyclopedia of Ecology*. Jorgensen, S. E., Faith, B. D. Elsevier. 838-844.
- 183.- Wilkinson, K. 2007.** The biosecurity of on-farm mortality composting. *J. Appl. Microbiol.* 102, 609-618.
- 184.- Wu, L., Li, F., Deng, C., Xu, D., Jiang, S. and Xiong, Y. 2009.** A method for obtaining DNA from compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 389-395.
- 185.- Xiujin, L., Zhang, R. and Pang, Y. 2008.** Characteristics of dairy manure composting with rice straw. *Bioresour. Technol.* 99, 359-367.
- 186.- Xu, S., Hao, X., Stanford, K., McAllister, T., Larney, F. J., and Jingguo, W. 2007.** Greenhouse gas emissions during co-composting of cattle mortalities with manure. *Nutr. Cyc. Agroecosys.* 78, 177-187.
- 187.- Xu, S., McAllister, T. A., Leonard, J. J., Clark, O. G., and Belosevic, M. 2010.** Assessment of microbial communities in decomposition of specified risk material using a passively aerated laboratory-scale composter. *Compost Sci. Util.* 18 (4) 255-265.
- 188.- Yan-Lue, Li., Robson, E, Wai-Fong, Y. and Kok-Gan C. 2014.** Quorum Sensing Activity of *Aeromonas Caviae* Strain YL12, A Bacterium Isolated from Compost. *Sensors.* 14, 7026-7040.
- 189.- Yeske, P. 2012.** Disease control and elimination approaches. *Proceedings of the 22nd International Pig Veterinary Society Congress*. Jeju, Korea, 63.

- 190.- Zhang, H., Kallimanis, A., Koukkou, A. I. and Drainas, C. 2004.** Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 124-131.
- 191.- Zhang, Y and He, Y. 2006.** Co-composting solid swine manure with pine sawdust as organic substrate. *Bioresour. Technol.* 97, 2024-2031.
- 192.- Zhu, N. 2007.** Effect of low initial C/N ratio on aerobic composting of swine manure with rice straw. *Bioresour. Technol.* 98, 9-13.
- 193.- Zimmer, M. 2008.** Detritus. In: *Encyclopedia of Ecology.* Jorgensen, S. E., Faith, B. D. Elsevier. 903-911.
- 194.- Zimmerman, J., Benfield, D. A., Murtaugh, M. P., Osorio, F., Stevenson, G. W., and Torremorell, M. 2006.** Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). In: *Diseases of Swine.* 9th Edition. Blackwell Publishing. 387-418.
- 195.- Zucchi, M., Angiolini, L., Borin, S., Brusetti, L., Dietrich, N., Gigliotti, C., Barbieri, P., Sorlini, C. and Daffonchio, D. 2003.** Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil. *J. Appl. Microbiol.* 94, 248–257.
- 196.- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M. 1981.** Evaluating toxicity in immature composts. *Biocycle.* 22, 54-57.

10.0 TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.- Características fisicoquímicas de la materia prima

Característica	Aserrín	Biosólidos
pH	6.04 (0.095)	5.44 (0.016)
Humedad (%)	9.18 (1.133)	26.31 (3.187)
Materia seca (%)	90.82 (1.133)	73.69 (3.134)
Sólidos volátiles (%)	99.08 (0.113)	67.60 (0.136)
Cenizas (%)	0.91 (0.113)	32.40 (0.136)
Carbono Orgánico Total (%)	55.05 (0.345)	37.53 (2.250)
Nitrógeno Total (%)	0.09 (0.000)	2.57 (0.967)
Relación C/N	611.66	14.60

La desviación estándar ($n=3$) se muestra dentro del paréntesis. Los valores son la media de los triplicados (basados en materia seca). La relación C / N se obtiene por la división de las partes de C entre las de N.

Tabla 2.- Temperaturas dentro de biopila fuente y ambiente.

Tiempo (h)	Temperatura °C			
	Z1	Z2	Z3	Ambiente
0	25	25	25	22
3	31	29	28	23
6	37	35	38	23
9	45	48	44	20
12	48	50	49	19
15	52	54	53	17
18	55	58	56	15
21	60	64	55	17
24	61	65	56	18

Z1: 25 cm; Z2: 50 cm; y Z3: 75 cm del vértice del cono formado. La biopila presentó una relación C/N inicial de 30/1 y humedad relativa de 55%.

Tabla 3.- Efecto del tratamiento y zona de muestreo sobre las UFC (bacterias celulolíticas) / gramo de compost⁻¹.

Zona de Muestreo	ATS	AEC	ACMC	ACMC / AEC
Z1	2.3 x 10 ⁸ aY	4.5 x 10 ⁸ aY	1.6 x 10 ⁸ aZ	2.8 x 10 ⁸ aY
Z2	2.2 x 10 ⁷ aX	8.4 x 10 ⁸ cZ	9.5 x 10 ⁷ aY	3.2 x 10 ⁸ bY
Z3	1.8 x 10 ⁷ bX	2.9 x 10 ⁶ aX	2.5 x 10 ⁶ aX	5.1 x 10 ⁷ cX

Zona de muestreo: Z1: 20 cm; Z2: 40 cm; Z3: 60 cm. ATS: Agar Triptosoya 100 %; AEC: agar extracto de compost 100 %; ACMC: agar carboximetilcelulosa 100 %; ACMC / EC: agar carboximetilcelulosa 50% / agar extracto de compost 50 %. Fueron empleadas cinco repeticiones. *a,b,c* : Dentro de cada fila, los valores seguidos de diferentes letras, difieren estadísticamente ($P<0.05$) entre medios de cultivo. *X, Y, Z*: Dentro de una columna, los valores seguidos por letras diferentes difieren estadísticamente ($P<0.05$) entre zonas de muestreo.

Tabla 4.- Efecto del tratamiento y zona de muestreo sobre las UFC (bacterias proteolíticas) / gramo de compost⁻¹.

Zona de Muestreo	ATS	AEC	AL	AL / AEC
Z1	2.3 x 10 ⁸ abY	4.5 x 10 ⁸ bY	1.4 x 10 ⁷ aY	1.2 x 10 ⁹ cZ
Z2	2.2 x 10 ⁷ abX	8.4 x 10 ⁸ cY	2.2 x 10 ⁶ aX	8.1 x 10 ⁷ bY
Z3	1.8 x 10 ⁷ bX	2.9 x 10 ⁶ aX	1.0 x 10 ⁶ aX	1.5 x 10 ⁷ bX

Zona de muestreo: Z1: 20 cm; Z2: 40 cm; Z3: 60 cm. ATS: Agar Triptosoya 100 %; AEC: agar extracto de compost 100 %; AL: agar leche 100 %; AL / AEC: agar leche 50% / agar extracto de compost 50 %. Fueron empleadas cinco repeticiones. *a,b,c* : Dentro de cada fila, los valores seguidos de diferentes letras, difieren estadísticamente ($P<0.05$) entre medios de cultivo. *X, Y, Z*: Dentro de una columna, los valores seguidos por letras diferentes difieren estadísticamente ($P<0.05$) entre zonas de muestreo.

Tabla 5. Conteos microbianos durante el proceso de compostaje.

Tipo de microorganismo	Tipo de matriz	Días en proceso							
		0	14	28	42	56	70	84	98
Heterótrofos totales	Sin inocular	3.50	5.49 ^a	6.75 ^a	6.70 ^a	6.89	6.77	6.82	4.73
	Inoculada	3.50	8.68 ^b	9.86 ^b	8.63 ^b	7.09	7.22	6.89	4.86
<i>Escherichia coli</i>	Sin inocular	8.52	4.12	4.12 ^B	2.9 ^B	2.43 ^B	2.17 ^B	1.92 ^B	1.66 ^B
	Inoculada	8.52	4.27	2.41 ^A	ND ^A	ND ^A	ND ^A	ND ^A	ND ^A

^{a,b} Medias por columna (Heterótrofos totales) con diferente literal, indican diferencia ($P < 0.05$). ^{A,B} Medias por columna (*Escherichia coli*) con diferente literal, indican diferencia ($P < 0.01$). ND: no fueron detectados. Los conteos microbianos ($UFC / gr \text{ compost}^{-1}$) en base a materia seca, fueron ajustados a unidades LOG10. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Tabla 6. Contenido de carbono, nitrógeno y relación C/N.

Tipo de análisis	Tipo de matriz	Días en proceso				
		0	14	42	70	98
COT (%)	Sin inocular	42.90	41.86	42.72 ^a	40.05	40.81
	Inoculada	42.90	43.57	49.93 ^b	42.23	40.75
NT (%)	Sin inocular	1.38	1.45 ^a	1.51 ^a	1.56 ^a	1.68 ^a
	Inoculada	1.38	1.54 ^b	1.68 ^b	1.69 ^b	1.76 ^b
Relación C/N	Sin inocular	31.2	28.8	28.3	25.7	24.2
	Inoculada	31.2	28.2	29.8	25.0	23.2

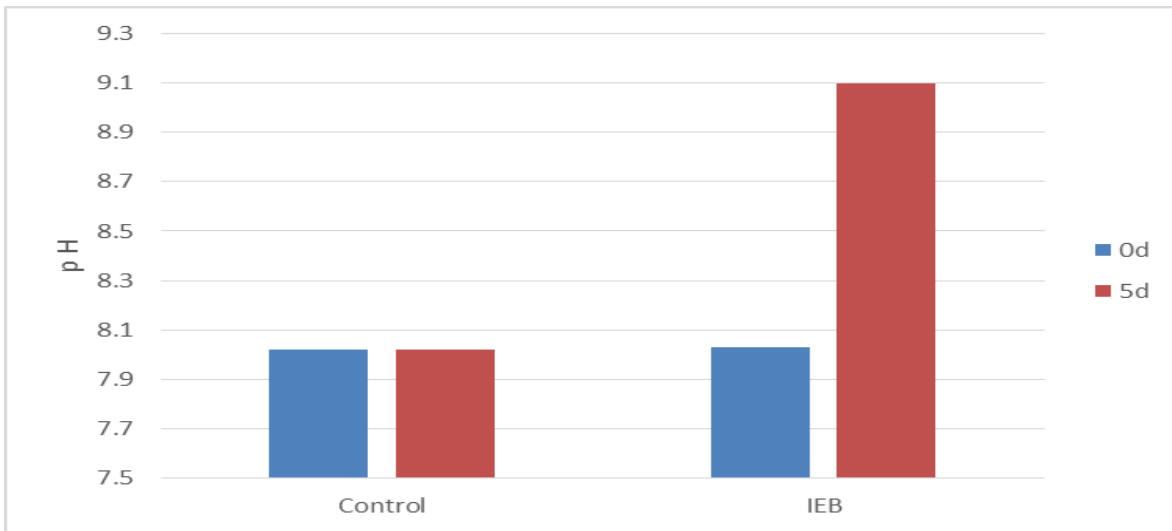
^{a, b} Medias por columna con diferente literal, indican diferencia ($P < 0.05$). COT: Carbono Orgánico Total. NT: Nitrógeno Total. Relación C/N: relación carbono/nitrógeno

Tabla 7. Índice de germinación (%) obtenido entre tratamientos.

Tipo de Matriz	Días en proceso							
	0	14	28	42	56	70	84	98
Sin inocular	40.06	79.67	87.5	70.05	68.93 ^A	79.37 ^A	66.35 ^A	87.34 ^A
Inoculada	40.06	66.43	83.59	77.32	103.06 ^B	101.39 ^B	103.83 ^B	164.97 ^B

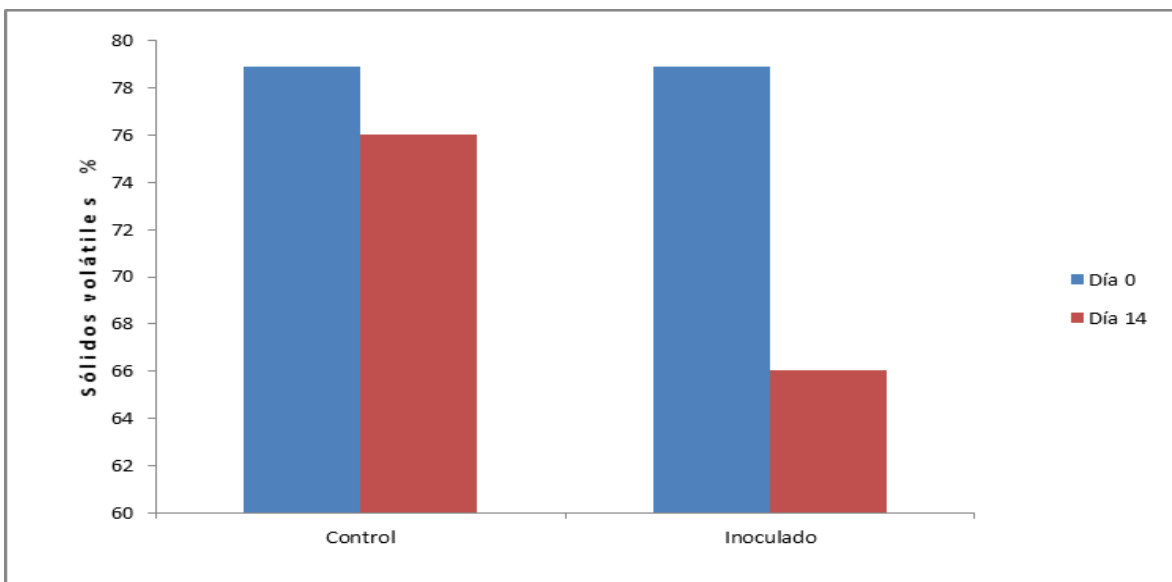
^{A,B} Medias por columna con diferente literal, indican diferencia ($P < 0.01$).

Figura 1.- Cambio de pH observado usando medio esencial mínimo.



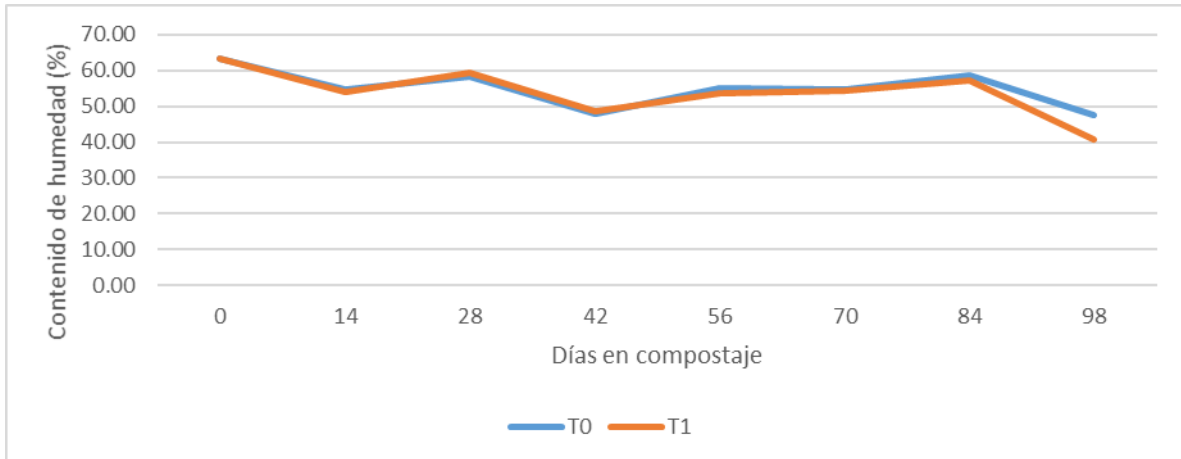
Fue adicionado inóculo endógeno bacteriano (IEB) al medio empleado. El tratamiento control usó agua peptonada al 0.1 %. El procedimiento fue llevado a cabo por quintuplicado.

Figura 2.- Degradación de materia orgánica empleando microcosmos.



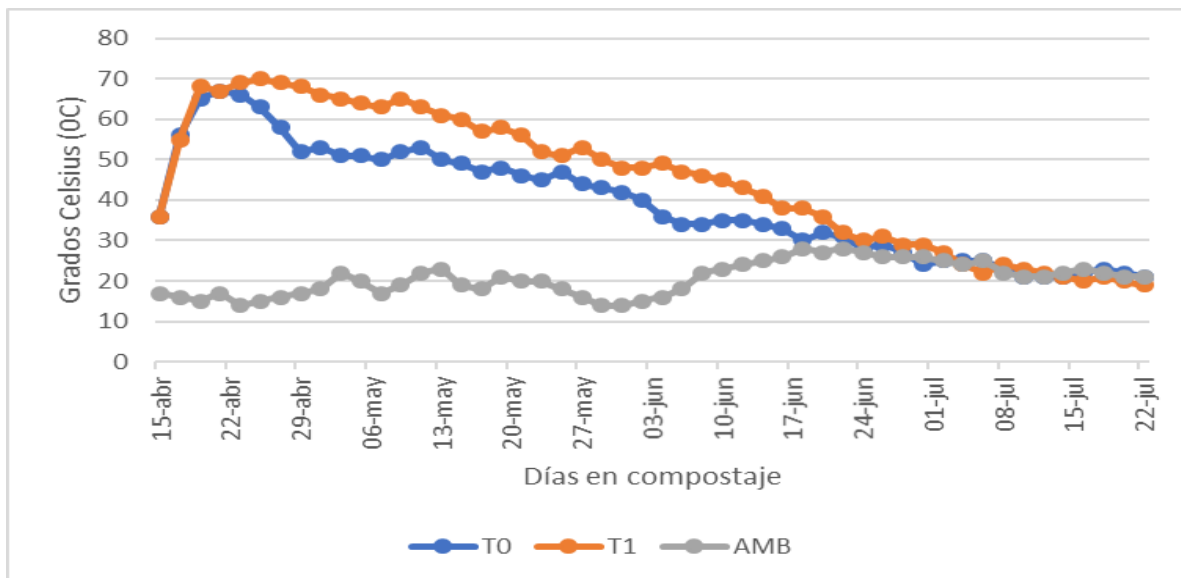
Los valores de los sólidos volátiles (incineración a 520 °C por 4 h) son la media de tres observaciones (en base a materia seca).

Figura 3.- Contenido de humedad (%) entre tratamientos.



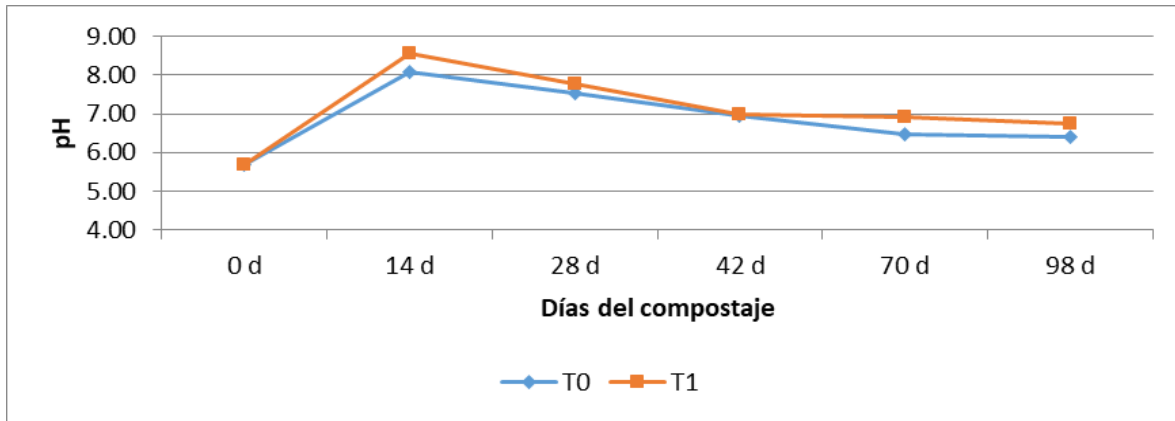
T0: Matriz control conteniendo aserrín, sólidos recuperados y cadáver de un cerdo de 15 kg. Se le adicionó 5 litros de agua peptonada al 0.1 %. T1: Matriz elaborada con la misma materia orgánica que T0 pero adicionada con 5 litros de inóculo endógeno bacteriano.

Figura 4.- Temperatura dentro de las matrices elaboradas.



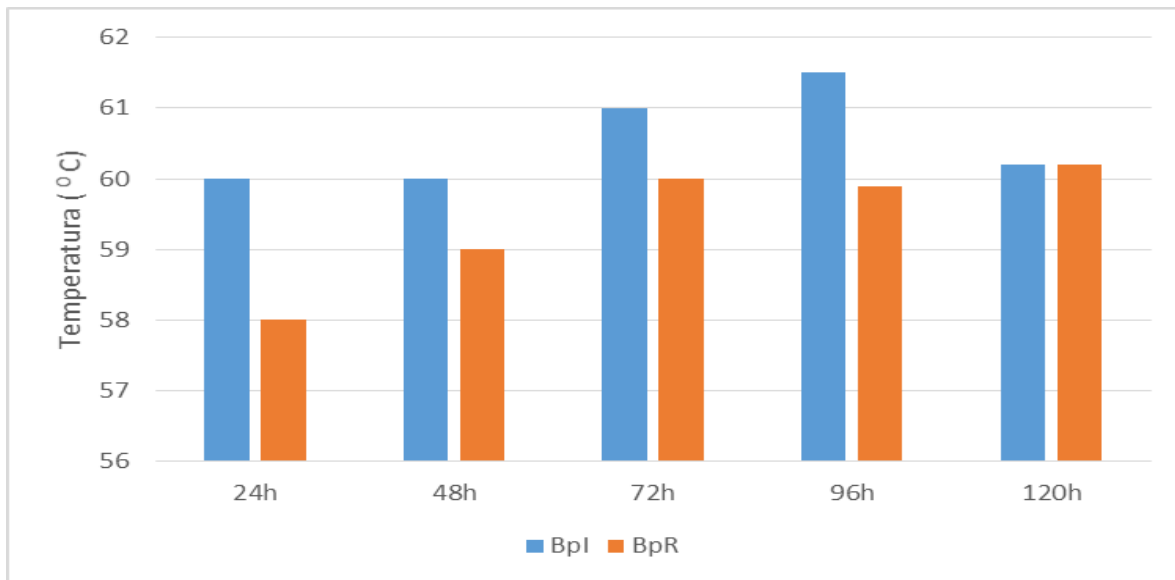
T0: Matriz control. T1: Matriz inoculada. Los valores de temperatura mostrados corresponden al promedio de tres mediciones realizadas en zonas críticas de muestreo dentro de las matrices. AMB: Temperatura ambiental que fue medida cada tercer día a las 10:00 h.

Figura 5.- Tendencia en el pH a lo largo del proceso.



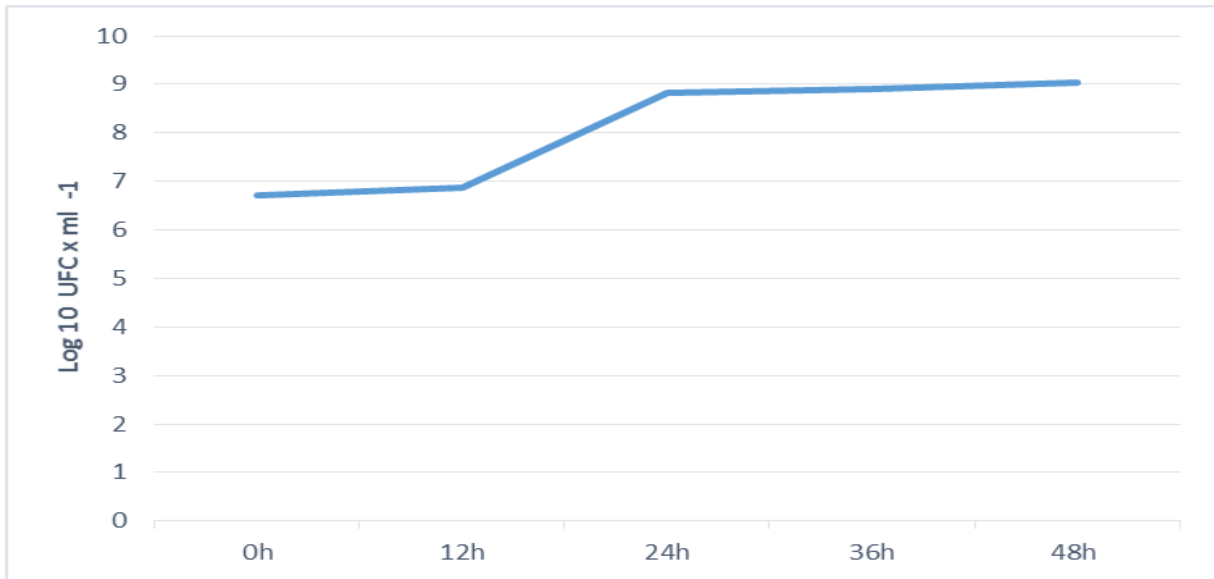
T0: Matriz control. T1: Matriz con adición de inóculo endógeno. Fueron empleadas tres repeticiones.

Figura 6.- Temperatura dentro de las biopilas elaboradas.



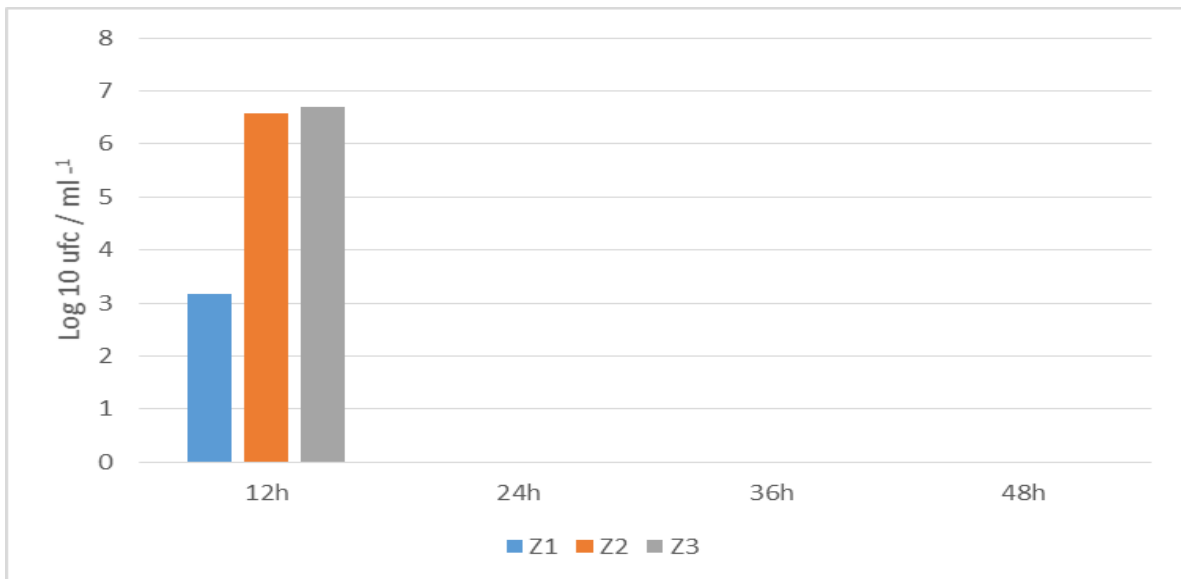
BpI: Biopila inoculada. BpR: biopila de referencia. La temperatura indicada corresponde a la media de la temperatura de las tres zonas críticas de muestreo. Cada biopila fue elaborada con 70 kilogramos de aserrín + 110 kilogramos de heces frescas. A esta mezcla se le adicionaron 50 litros de agua de la llave calentada a 50 °C.

Figura 7.- Curva de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*.



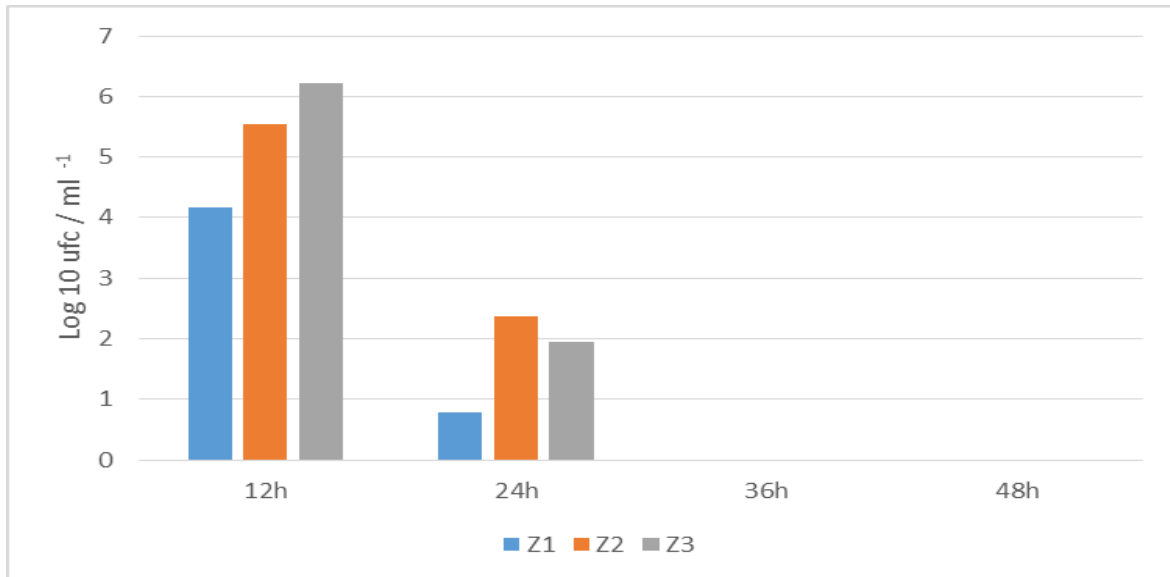
Las condiciones del cultivo fueron: 37 °C, y 175 rpm por 18 h. El medio de cultivo utilizado fue infusión cerebro-corazón. Se emplearon tres repeticiones.

Figura 8. Conteos bacterianos (*Escherichia coli*) encontrados dentro de biopila inoculada.



Las zonas se ubicaron a Z1:25, Z2:50 y Z3:75 centímetros de la base de la biopila. Se realizaron tres repeticiones de cada muestra obtenida.

Figura 9. Conteos bacterianos (*Escjerichia coli*) encontrados dentro de biopila de referencia.



Las zonas se ubicaron a Z1:25, Z2:50 y Z3:75 centímetros de la base de la biopila. Se realizaron tres repeticiones de cada muestra obtenida.

Anexo 1.0 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS.

1.1 AGUA PEPTONADA al 0.1 % (m/v)

Disolver peptona, 1.0 g; cloruro de sodio (NaCl), 8.5 g en 1 l de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0 +/- 0.2. Esterilizar a 121 °C por 15 min. Se almacena en un lugar oscuro entre 0 y 5 °C, hasta por 30 d (Germida y de Freitas, 2008).

1.2 EXTRACTO DE COMPOST (EC):

Adición de 1 g de compost (proveniente de la zona crítica de muestreo central) en 10 ml de una solución de NaCl al 0.85% (ver anexo 11.1.2). Homogenización por 10 min a 150 rpm a temperatura ambiente. Al terminar, se empleó una gasa de algodón doblada cuatro veces para colectar la fase líquida. Centrifugar a 1,000 x g por 10 min (RC5 Superspeed Refrigerated Centrifuge; Sorvall; USA). Se midió el pH, se registró y se empleó como pH de referencia para ajustar las otras soluciones elaboradas. Esterilización a 121 °C por 30 min (Sasaki *et al.*, 2005). Para preparar agar extracto de compost, fueron añadidos 15 g / l de agar.

1.3 PREPARACIÓN DE ROJO CONGO AL 1% (m/v):

Pesar 1 g de colorante rojo congo y disolver en 100 ml de agua destilada. Depositar en un frasco de vidrio previamente rotulado y almacenar a 4 °C (Martínez *et al.*, 2010).

1.4 PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MINERAL (SM):

Pesar 0.1 g de K₂HPO₄; 0.1 g de KH₂PO₄; 0.5 g de CaCl₂ y se disuelven en 1,000 ml de agua destilada. Se ajusta el pH (8.0) y se coloca en un frasco de vidrio previamente rotulado. Se esteriliza (121 °C x 15 min) y al enfriar, se guarda en refrigeración.

1.5 PREPARACIÓN DE EXTRACTO CARNE DE CERDO ASERRÍN (ECCA):

Se pesaron 100 g de carne de cerdo magra y se muelen dos veces. Se pesan 10 g de aserrín, se miden 200 ml de (SM) y todos los reactivos se colocan dentro de un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Se esterilizó la mezcla a 121 °C. Para clarificar ECCA, se empleó una gasa de algodón doblada por cuadruplicado. Se ajustó el pH a 8.0 y se volvió a esterilizar en un frasco ámbar. Se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

1.6 PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN SALINA (SS) 0.85% (m/v):

Pesar 0.85 g de NaCl y disolverlos en 100 ml de agua destilada. Depositar en un frasco de vidrio previamente rotulado y guardar refrigerado a 4 °C (Martínez *et al.*, 2010).

1.7 PREPARACIÓN DE CLORURO DE SODIO 2M:

Pesar 116.8 g de NaCl y disolverlos en 1,000 ml de agua destilada. Depositar en un frasco de vidrio previamente rotulado y almacenarlo a 4 °C (Martínez *et al.*, 2010).

Anexo 2.0 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

2.1 AGAR LECHE (AL):

Se pesan por separado: K_2HPO_4 0.1 g, KH_2PO_4 0.1 g, $CaCl_2$ 0.5 g, peptona universal 2.5 g, extracto de levadura 2.5 g, y se depositan en un recipiente de vidrio resistente al proceso de esterilización. Se adicionaron 700 ml de agua destilada y se homogenizó. Se midió el pH y se igualó con el del EC. Adición de 15 g de agar y se calentó lentamente en mechero hasta ebullición suave. Por separado, se pesaron 30 g de leche en polvo (*BD-DIFCO; USA*) y se disolvieron en 300 ml de agua destilada (*Rickeboer et al., 2003*). Se esterilizaron ambas soluciones a 121 °C por 15 min y se mezclaron al encontrarse ambas a 55 °C. Posteriormente, a 48 °C, se adicionaron 50 mg / L de nistatina γ -irradiada (*Sigma-Aldrich; USA*).

2.2 AGAR CARBOXIMETILCELULOSA (ACMC):

Se pesaron por separado: K_2HPO_4 0.1 g, KH_2PO_4 0.1 g, $CaCl_2$ 0.5 g, peptona universal 2.5 g, extracto de levadura 2.5 g, carboximetilcelulosa en polvo (*Sigma-Aldrich; USA*) 10 g y se depositaron en un recipiente de vidrio resistente al proceso de esterilización. Se adicionaron 1,000 ml de agua destilada, se homogenizó todo, se midió el pH y se ajustó con el del EC. Finalmente, se adicionaron 15 g de agar y se calentó la mezcla lentamente hasta ebullición suave. Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min (*Martínez et al., 2010*). Cuando la solución se encontró a 48 °C, se adicionaron 50 mg/l de nistatina γ -irradiada (*Sigma-Aldrich; USA*). Para revelar las colonias formadas, se preparó una solución de rojo Congo al 1% y se adicionó en la superficie del cultivo, posteriormente se lavó el excedente con agua destilada.

2.3 AGAR TRIPTOSOYA (ATS):

Se pesaron por separado: 15 g de peptona de caseína, 5 g de peptona de soya, 5 g de NaCl y 15 g de agar. Posteriormente, se diluyeron en 1,000 ml de agua destilada. Se homogenizó la mezcla, se midió el pH con potenciómetro y se ajustó a 8.0 +/- 0.2. Se calentó en mechero hasta ebullición suave. (*Martínez et al., 2010*). Se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 min. Cuando se encuentra a 48 °C, se adicionaron 50 mg / L de nistatina γ -irradiada (*Sigma-Aldrich; USA*).

