

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

## Identificación de Microorganismos Patógenos e Indicadores de Contaminación en un Biodigestor Alimentado con Heces de Rumiantes



# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**

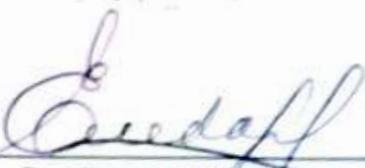


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de Demetrio Morales Flores hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado Identificación de Microorganismos Patógenos e Indicadores de Contaminación en un Biodigestor Alimentado con Heces de Rumiantes y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico

Atentamente:



---

Dra. Evelia Acevedo Félix  
Presidente del Jurado



---

M.C. Lucia Guadalupe Castillón Campaña  
Secretario



---

M.E. Francisca Ofelia Muñoz Osuna  
Vocal



---

Q.B. Esther Margarita Gutiérrez Verduzco  
Suplente

## AGRACEDIMIENTOS Y DEDICATORIAS

### ***A Dios y mi virgencita:***

Mis honores y agradecimientos ante todo a **Dios** y a la **Virgencita de Guadalupe**, por permitir que siempre siga adelante y porque siempre sentí sus presencias en este camino, donde mi Fe pudo más que cualquier obstáculo.

### ***A mis padres:***

Mis dos grandes viejos, **Ignacio Morales** y **Gertrudis Flores**, quienes con grandes sacrificios y esperanza me dieron este gran regalo, no encuentro palabras más bonitas de expresar que decirles LOS AMO y MUCHAS GRACIAS, este trabajo es especialmente dedicado a ustedes dos.

### ***A mis hermanos:***

De todos soy el que escribe una memoria, pero muchas gracias por estimularme en esos momentos y hacer todo lo posible para que yo llegara a hacerlo, con todo ese amor y cariño se las dedico a ustedes, a todos.

### ***A mis sobrinos:***

Gracias por el apoyo que todos me han brindado y por que han sido siempre familia y amigos pero más a las grandes luchadoras que nunca me dejaron de lado, siempre que las necesite estuvieron ahí, tanto para consejos, diversión y sus maneras de apoyarme en el estudio, muchas Gracias I.Q Flor de María Martínez, E.D.S. Imelda Lilian Martínez e I.I.S. Luisana Contreras.

### ***A mis amigos:***

Cuantos momentos de frío y calor hemos pasado, cuanta hambre de querer salir adelante, que a veces nos queremos comer el mundo de un solo bocado y nos damos cuenta que solo somos unos aventureros en el camino, pero aun así sin sus locuras y apoyo no podría yo haber tenido los ánimos de concluir, Gracias a Manuel Morales, Margarita Morales, Verónica Morales, Damián Bañuelos, también a la Peluza, los Culiayangos, los del Equipo LACMA, los del Equipo de Fisiología Vegetal, a todos. Me siento lleno de dicha porque nunca me han negado un consejo, un regaño o simplemente la amistad que siempre me brindan, se me acaban las

palabras y muy dentro de mi pronuncio sus nombres, las imágenes de esos recuerdos que nos han hecho reír, enojar y sobre todo fortalecer la amistad.

***A la Universidad de Sonora:***

Ahora si puedo decir con esas ganas que yo estudie en la UNISON, que ahí dentro me encontré con grandes maestros, profe Lucía Castellón, Griselda Macrina, el gran profe Moisés, la profe Ana Irene Ledesma, la profe Margarita Gutiérrez, Aida Chaparro, Lupita Cañez, el profe Antonio Rascón, Enrique Bolado, Ramón Robles, y demás que hicieron hincapié siempre en mi formación, gracias nuevamente y orgullosamente digo soy Búho de la Universidad de Sonora.

***A CIAD:***

Este trabajo se llevó a cabo con el financiamiento del proyecto CONACYT 18 8865 del Laboratorio de Innovación para la Producción Inocua y Sustentable de Alimentos en Comunidades Rurales.

En esta gran institución encontré grandes amigos y grandes instructores que me brindaron su apoyo técnico, como la Dra. Evelia Acedo, que de ahora en adelante tiene un lugar muy especial en mi trayectoria, por ser de las primeras personas que confió en mí, también me encuentro infinitamente agradecido también con la Q.B. Rosalva Pérez Morales por su apoyo técnico y capacitación, que sin lugar a duda es de las personas que más paciencia me tuvo en toda esta estancia, mis respetos y gracias, no podría faltar reconocer las grandes ideas y el gran apoyo técnico de Alejandra Zamora, podría decir la mano derecha de Dios, porque en ella encuentro una confianza que me han hecho aterrizar; sin dejar de lado sus conocimientos y la manera de apoyarme a la Q.B. María Isabel Quintana, que nunca me negó su respaldo en técnicas y materiales.

También agradezco al nuevo compañerismo de la Q.B.C. Yuri Edith Aguirre, Q.B.C Juan Reyes, el M.C Emmanuel Aispuro Hernández, la M.C. Gabriela Andrade, M.C Valentín León, M.C. Vanesa García, Dr. Miguel Ángel Martínez, Q.B. Francisco Soto y la M.C. Araceli Vera.

*Demestrio Morales Flores*

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
OBJETIVOS.....	x
Objetivo General.....	x
Objetivos Particulares.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Actividad Ganadera.....	3
Contaminación por la Actividad Ganadera.....	3
Contaminación por Estiércol.....	4
Contaminación por Fertilización Química.....	5
Daños a la Salud por Agroquímicos.....	7
Agricultura y Cambio Climático.....	8
Agricultura Orgánica.....	9
Historia de la Biodigestión en la Agricultura.....	10
Biodigestores.....	11
Clasificación de los Biodigestores.....	12
Propiedades físicas, químicas y biológicas del biodigestor.....	12
pH.....	13
Respiración.....	13
Oxigenación.....	14
Anaerobiosis.....	14
Sistema anaerobio/aerobio.....	15
Aerobiosis.....	16
Tiempo de retención.....	17
Temperatura.....	18
Productos del Biodigestor.....	19
Biogás.....	19
Biol.....	20

Características de los Componentes Químicos del Biofertilizante en las Plantas.....	21
Nitrógeno.....	22
Bacterias fijadoras de nitrógeno.....	22
Calcio.....	23
Magnesio.....	23
Microbiota Presente en Rumiantes.....	23
Microorganismos Presentes en el Biol.....	24
Bacterias Patógenas.....	25
<i>Salmonella spp</i> .....	26
<i>Listeria spp</i> .....	26
<i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	27
Normatividad de Producción del Biol.....	27
Impacto de Biofertilizantes de Proceso Inadecuado.....	29
Beneficios del Uso del Biodigestor.....	30
Beneficios Económicos del Biodigestor.....	31
Beneficios a la Salud.....	31
Beneficios al Medio Ambiente.....	32
Biorremediación del suelo.....	32
Importancia de Biotecnología Biodigestora en Sonora.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Alimentación del Biodigestor.....	35
Análisis Microbiológicos.....	36
Determinación de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	36
Determinación de <i>Salmonella spp</i> .....	37
Determinación de <i>Listeria spp</i> .....	37
Determinación de Coliformes Totales, Coliformes Fecales y <i>Escherichia coli</i> Presuntiva Mediante la Técnica del Número Más Probable.....	38
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
Determinación de Microorganismos Patógenos.....	40
Coliformes Fecales y Totales.....	42
Coliformes Fecales y Totales por Etapa del Proceso.....	43

Efecto de Época de Muestreo.....	45
Comparación con Normas Mexicanas.....	46
Referencia con Normatividad.....	46
CONCLUSIONES.....	49
RECOMENDACIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Vías de entrada de los contaminantes químicos al humano.....	8
2. Tiempo de retención hidráulico de estiércol de ganado en distintas regiones.....	18
3. Composición química de algunos abonos orgánicos.....	21
4. Límites máximos permisibles de contaminantes mostrados por la NOM-003-ECOL-1997.....	28
5. Aprovechamiento y límites máximos permisibles de contaminantes biológicos en biosólidos de la NOM-004-SEMARNAT-2002.....	29
6. Muestreo del biodigestor. Muestra de entrada a la bolsa y salidas del Biol de las bolsas 1 y 2.....	36
7. Promedios generales de las cuentas de coliformes totales y fecales (Log10 NMP/100 mL) en el biodigestor, durante los dos períodos de muestreo.....	42
8. NMP de Coliformes totales y fecales en muestras dentro del rango permitido por la NOM-003-ECOL-1997 para el periodo primavera-verano 2012.....	47
9. Límites máximos permisibles de contaminantes mostrados por la NOM-003-ECOL-1997.....	47

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Donadores de electrones en distintas respiraciones.....	14
2. Etapas de la biodegradación anaerobia.....	15
3. Temperatura de vida de microorganismos llevada a cabo en la biodigestión.....	19
4. Cuentas de coliformes fecales ( $\pm$ error estándar) por etapa del proceso de digestión en la composta.....	44
5. Cuentas de coliformes totales ( $\pm$ error estándar) por etapa del proceso de digestión en la composta.....	44
6. Cuentas de coliformes fecales y totales ( $\pm$ error estándar) por etapa del proceso de digestión en la composta para cada época de muestreo.....	45

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Aislar e identificar microorganismos patógenos e indicadores de contaminación presentes en un Biodigestor de régimen semicontinuo con compartimiento anaerobio y aerobio, para la obtención de un fertilizante orgánico.

### **Objetivos Particulares**

- Cuantificar coliformes totales y fecales en Biol obtenido durante la fermentación en la bolsa aerobia y anaerobia del Biodigestor alimentado con heces de rumiantes.
- Aislar e identificar bacterias patógenas como: *Salmonella spp*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria spp*.

## RESUMEN

La importancia del tratamiento de los desechos antropogénicos, es el aprovechamiento de energías renovables útiles en la disminución de factores que deterioran el ecosistema, reduciendo así los efectos del cambio climático. Existen varios métodos para la disminución y/o eliminación de los contaminantes presentes en los desechos, como son el composteo y el uso de biofermentadores o biodigestores. Los biodigestores se pueden diseñar para que se lleve a cabo una fermentación anaerobia y una posterior estabilización aerobia. Durante la fase anaeróbica, es posible eliminar diferentes microorganismos, las bacterias indicadoras de contaminación (coliformes fecales) y bacterias patógenas. Mientras que durante la fermentación aerobia, se produce la estabilización química, se disminuye la actividad biológica y se oxida la materia orgánica presente, para obtener un producto que puede ser utilizado como biofertilizante orgánico. El objetivo del presente trabajo fue el de aislar e identificar microorganismos patógenos e indicadores de contaminación presentes en el biofertilizante, obtenido en un biodigestor de régimen semicontinuo con compartimiento anaerobio y aerobio, alimentado con heces de bovino. Los muestreos se dividieron en dos periodos: primavera-verano y otoño-invierno, con 24 muestras analizadas en cada período, se cuantificaron las bacterias indicadores de contaminación (coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*), por los métodos de cuenta en placa, así como la presencia de las bacterias patógenas: *Salmonella* spp, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria* spp. Se encontró que en la época de primavera-verano, no se aislaron microorganismos patógenos y se obtuvo la mayor disminución de organismos coliformes, fue de 3.1 ciclos logarítmicos, ya que el promedio de la entrada al sistema fue de 7.85 Log<sub>10</sub> disminuyendo hasta un promedio de 4.7 Log<sub>10</sub> a la salida de la bolsa aerobia, mientras que durante el otoño-invierno la disminución fue apenas de 1 ciclo Log, ya que el promedio de entrada fue de 8.01 Log<sub>10</sub> y 7 Log<sub>10</sub>, al final de la bolsa aerobia. En este mismo período se detectó la presencia de *Escherichia coli* O157:H7, una de cada bolsa y 4 muestras con *Salmonella* spp, en el receptáculo de salida del biol, pero se comprobó que era contaminación externa. Es necesario realizar cambios en el tiempo de retención de la bolsa anaerobia y proteger el sistema de las bajas temperaturas del período otoño-invierno para que el sistema mantenga las propiedades fisicoquímicas, para realizar la eliminación de la contaminación bacteriana durante todo el año.



## INTRODUCCIÓN

Los retos actuales sobre la inseguridad alimentaria, el cambio climático y la pérdida de biodiversidad, son los principales motores para el desarrollo sostenible de la humanidad.

En el caso particular de los problemas del cambio climático, se sabe que los sistemas de producción ganadera, son uno de los factores que ocasionan problemas al medio ambiente (FAO, 2006). Sin embargo, también es sabido que para hacer frente a esos retos, se deberá mejorar la economía y es necesario apostar a diferentes actividades económicas, como la agrícola.

Esta visión nos lleva a la búsqueda de sistemas más parecidos al orgánico, cuyo interés aumenta debido al cambio en el uso de compuestos químicos por nuevas biotecnologías, basadas en la utilización de materias primas de los mismos desechos antropogénicos, generados por la comunidad, plantas y animales; donde se obtienen productos efectivos de mínima inversión como las energías renovables y abonos orgánicos (SAGARPA, 2010).

La importancia del tratamiento de los desechos antropogénicos, es el aprovechamiento de energías renovables útiles en la disminución de factores que deterioran el ecosistema, reduciendo así los efectos del cambio climático; definido por la Organización de las Naciones Unidas como “diferentes cambios de clima atribuidos directa o indirectamente a la actividad humana, que altera la composición de la atmósfera mundial y que se suma a la variabilidad natural del clima observado durante períodos de tiempo comparables” (ONU, 1992).

Son muchas las actividades humanas que contribuyen al cambio climático, entre las principales se encuentran el uso intensivo de combustibles fósiles (carbón, petróleo, gasolina, diesel, gas natural y los combustibles derivados del petróleo), quema y pérdida de bosques, éstas son consideradas las principales fuentes del problema (GPPVEM, 2010).

A nivel mundial México ocupa el lugar número 12 en las emisiones de CO<sub>2</sub> por quema de combustibles fósiles, con un total de 416.26 millones de toneladas de CO<sub>2</sub> o el 1.5% de las emisiones globales (SAGARPA y FIRCO, 2009).

No se cuenta con estimaciones de las emisiones de metano de origen ruminal proveniente de la producción ganadera en México, pero se sabe que la producción de metano en el rumen representa una pérdida de entre 7 y 15% de la energía bruta consumida por los rumiantes, por lo que todas las acciones están encaminadas a reducir dichas pérdidas, con el fin de tener una producción ganadera más eficiente y que sea amigable con el medio ambiente (Kuvera y col., 2012).

El incremento de la producción agrícola y ganadera ha llevado a realizar acciones que además de la disminución del cambio climático, se obtenga la disminución en costos biorremediando suelos agrícolas utilizando el composteo, donde los residuos orgánicos se reducen fácilmente con la presencia de los microorganismos apropiados, aireación adecuada, temperatura óptima, nutrientes, pH y humedad (Puerta, 2003).

Sin embargo, la naturaleza de la materia prima, hace que en el compostaje también puedan estar presentes microorganismos patógenos y su posible eliminación es mediante la estabilización química, donde se disminuye la actividad biológica y se oxida la materia orgánica presente obteniendo un eficiente biofertilizante. El proceso de reducción se lleva a cabo mediante una cinética bacteriana que consta de dos etapas: mesofílica y termofílica.

En el periodo mesofílico, la masa vegetal está a temperatura ambiente y los microorganismos mesófilos se multiplican rápidamente, la actividad metabólica de estos microorganismos eleva la temperatura incrementándola hasta el periodo termofílico, donde invaden los microorganismos termófilos que producen ácidos orgánicos y transforman nitrógeno en amoníaco. Se asume que durante la etapa termófila los patógenos se reducen, obteniéndose al final un Biol (fertilizante orgánico) libre de patógenos (Morales y Peláez, 2010). Al descender la temperatura aparecen nuevamente mesófilos como bacterias esporógenas y actinomicetos que descomponen la celulosa (Lozano y col., 2008).

El Biol es uno de los productos finales de la biodigestión de la materia orgánica y puede ser utilizado como fertilizante, insecticida, fungicida, fitoregulador e inoculante (Rodas, 2007). Investigaciones acerca de las nuevas tecnologías orgánicas han expuesto tentativamente la composición del Biol promedio siendo 8.5% de materia orgánica, 2.6% de nitrógeno, 1.5% de fósforo, 1.0 de potasio y un pH de 7.5 (Soria y col., 2001).

## **ANTECEDENTES**

### **Actividad Ganadera**

De acuerdo a la definición del INEGI (2012), la ganadería es una actividad del sector primario que se refiere al cuidado y alimentación de cerdos, vacas, pollos, borregos, abejas, etcétera para aprovechar su carne, leche, huevos, lana, miel y otros derivados.

El Estado de Sonora ocupa el octavo lugar de producción de ganado bovino, lo que corresponde a un 4.23% de la producción a nivel nacional, de acuerdo a los datos del Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (SAGARPA, 2013), aun cuando se ha presentado una disminución de la actividad económica, sigue representando un importante aporte a la economía sonorense.

### **Contaminación por la Actividad Ganadera**

De acuerdo a un informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2006), el 18 % de los gases de efecto invernadero, son producidos por la ganadería y es mayor que el del sector del transporte. Además en el estudio, se concluye que la ganadería es una de las principales causas de la degradación del suelo y de recursos hídricos en el mundo.

La producción que se realizó en el período de 1999-2001 fue de 229 millones de toneladas y se prevé un aumento hasta 465 millones de toneladas de carne y de 580 a 1043 millones de toneladas en 2050. En ese mismo informe, se hace hincapié en el riesgo ambiental que este aumento representa y se recomienda que cada una de las unidades de producción pecuaria deba disminuir al menos a la mitad su producción, para tratar de paliar el daño ambiental e impedir que la situación empeore. Sin embargo, también se recomienda que se deban buscar acciones que no pongan en mayor riesgo la seguridad alimentaria en todo el planeta.

Se considera que el sector ganadero es responsable del 9 % del CO<sub>2</sub> procedente de las actividades humanas, como ya se mencionó anteriormente, produce un porcentaje más elevado de los gases de efecto invernadero, es decir, genera el 65 % del óxido nitroso de origen humano, que tiene 296 veces el Potencial de Calentamiento Global (GWP, por sus siglas en inglés) que del CO<sub>2</sub> y la mayor parte de esta contaminación procede del estiércol.

Por otra parte, el 37 % del metano es producido por el sistema digestivo de los rumiantes y el 64 % del amoníaco, responsable en parte de la lluvia ácida.

Además el informe de la FAO explica que la ganadería utiliza el 30 % de la superficie terrestre del planeta, que en su mayoría se trata de pastizales, y un 33 % de la superficie cultivable para la producción de forraje, superficie que sigue creciendo año con año, por la tala de bosques para producir pastos. De hecho, se considera que el 70% de los bosques que han desaparecido en el Amazonas, están siendo utilizados para la producción de pastizales (FAO, 2006; Pérez-Espejo, 2008).

### **Contaminación por Estiércol**

La producción de estiércol diaria por especie animal es de 0.102 kg/pollo, 0.270 Kg/pavo, 4.7 kg/cerdo, 22 kg/bovino de engorda, 38 kg/vaca seca y 68 kg/vacas lactantes. Estos valores cambian de acuerdo al sistema de producción, es decir, los sistemas intensivos, producirán una mayor cantidad de desechos animales (ASABE, 2005). Por otra parte, las excretas de bovinos pueden proporcionar un beneficio ecológico al depositar nutrientes como nitrógeno y fósforo en el suelo. Sin embargo, poco se utiliza el estiércol como fertilizante orgánico, si se compara con la fertilización química (Reynolds y col., 2002).

El estiércol proporciona varias ventajas al utilizarse como fertilizante, aumenta la capacidad de retención de agua, el intercambio catiónico, la filtración de agua al subsuelo y reduce la erosión. Además, la fracción líquida del estiércol ayuda a disminuir las pérdidas de nitrógeno, carbono y azufre en el suelo (Capulín y col., 2001), lo que ayuda a la reducción del uso de fertilizantes químicos, disminuyendo los problemas de impacto ambiental (Pinos y col., 2012). Sin embargo, para evitar que estos nutrientes necesarios para los suelos se conviertan en un potencial riesgo para el ambiente, si se utilizan junto a otros fertilizantes químicos, es necesario que se conozcan sus concentraciones y de ser posible, que las heces tengan un tratamiento para eliminar otros contaminantes presentes, ya que estos desechos contienen gran cantidad de microorganismos que pueden ser patógenos, tanto para el resto de los animales, como al humano y las plantas. Además la disposición inadecuada de las heces, hace que los microorganismos ambientales que pueden digerir la materia orgánica presente inicien la descomposición y se emitan gases como el metano, que se acumula en el medio ambiente, con el consabido efecto nocivo.

La aplicación de estiércol fresco en los cultivos trae como consecuencia el riesgo potencial de inoculación de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en

los productos, ocasionando pérdidas millonarias al momento de exportación, por riesgos en la salud, etc., lo que hace que los agricultores opten por productos agroquímicos como fertilizantes, herbicidas, pesticidas y plaguicidas; siendo aún mayores contaminantes en la salud y el ambiente. Es por esto que se recomienda que el estiércol sea tratado antes de utilizarse como un fertilizante, en sistemas donde sea posible el control de las emanaciones de gases y CO<sub>2</sub>. La digestión anaeróbica del estiércol produce gases que en su mayoría son metano (60 %), bióxido de carbono (39 %), y trazas de óxido nitroso (0.2 %) (Bekkering y col., 2010). El metano es un gas no tóxico utilizado como biocombustible y es producido mediante el uso de biofermentadores, tratamiento que se ha utilizado en algunas áreas del mundo desde la década de 1970. Con el uso de este proceso se reducen las emisiones de metano y óxido nitroso de las excretas en un 66 % (Chadwick y col., 2011) y 98 % los olores (Massé y col., 2011).

### **Contaminación por Fertilización Química**

Los agroquímicos son todas las sustancias químicas que se utilizan en la agricultura para enriquecer los cultivos como fertilizantes, para eliminar insectos, hongos y plagas (Moreno y López, 2005), pero su uso indiscriminado incrementa la contaminación ambiental y daños a la salud, al consumir trazas de agroquímicos en los alimentos.

Se denomina contaminación ambiental a la presencia en el ambiente de cualquier agente (físico, químico o biológico) o bien de una combinación de varios agentes en lugares, formas y concentraciones tales que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o para el bienestar de la población, que pueden ser perjudiciales para la vida vegetal y animal o impidan el uso normal de las propiedades y lugares de recreación y goce de los mismos (Fernández y Peña, 2012).

Hoy en día existen infinidad de procesos de alto grado contaminante sin aún conocer los efectos como los muchos tipos de sustancias químicas que fueron descubiertas a finales de los años 40's incrementando dramáticamente la producción agrícola y la obtención de una abundante variedad de granos, frutas y verduras, a bajo costo, pero cobrando un alto precio al surgir los efectos a finales de los 60's cuando aumentaron los problemas de salud. La contaminación ambiental e impacto a la vida silvestre, hasta la resistencia de algunas plagas volviéndose inmunes a muchos pesticidas fue dramática (DPR, 2006).

El uso intensivo e inadecuado de dichos insumos genera un alto impacto ambiental (Torres y col., 2006) demostrados por estudios sobre agricultura y medio ambiente en nuestro país, donde presentan un aumento en la problemática del uso de agroquímicos para poder satisfacer

la demanda del mercado agrícola. Con la finalidad de obtener rendimientos económicos en la agricultura, como los cultivos de hortalizas en el Valle de Culiacán, Sinaloa, “El Bajío”, Guanajuato, México, al intentar cubrir la demanda alimentaria y exportación, estos territorios agrícolas han generado un alto impacto ambiental debido al uso inadecuado y excesivo de insumos tales como altas cantidades de agroquímicos y aguas residuales sin tratamiento, reflejándose en la acumulación de sales, detergentes, metales pesados en el suelo y emisión de gases contaminantes a la atmósfera y por otro lado en la incidencia de enfermedades humanas por efecto de dichos contaminantes (Santos y col., 2012).

Los agroquímicos utilizados bajo normatividad en la producción agrícola pueden disminuir los efectos de contaminación y daño a la salud. El uso de los agroquímicos contribuye a la crisis de la agricultura que dificulta la preservación de los ecosistemas, los recursos naturales, y afecta la salud de las comunidades rurales y de los consumidores urbanos. La búsqueda de la productividad a corto plazo por encima de la sustentabilidad ecológica, practicada en las últimas décadas, ha dejado un saldo a nivel mundial de contaminación y envenenamiento donde el pretendido remedio universal ha resultado ser peor que la enfermedad (UNODC, 2010).

Con la finalidad del aumento productivo se ha incrementado el consumo de estos productos químicos, tal es el caso del Valle de Mexicali, México, que ha implementado una agricultura semejante al Valle Imperial Californiano, donde la utilidad rebasa las normas del uso y manejo de agroquímicos, a diferencia de este se registra durante varios años la aplicación de algunos plaguicidas que han sido prohibidos o severamente restringidos en Estados Unidos y otros países, observándose en especial el cultivo para mercado interno (Davicino, 2012).

El uso indiscriminado de agroquímicos en la agricultura del Valle de Mexicali, ocasionó resistencia por parte de las plagas, esta resistencia fue ocasionada por la introducción de nuevos agroquímicos como los organoclorados, pero poco a poco las plagas fueron adquiriendo más resistencia y empezaron a proliferar sin control. Debido a la situación de resistencia, se dieron a la tarea de la aplicación de cocteles de diferentes compuestos dentro de los más comunes el DDT más Toxafeno y azufre, aplicándolas de manera aérea para que tuviera mayor efectividad, resultado contrario fue la destrucción de la fauna benéfica como los predadores que contribuía al combate de las plagas, por lo que estas proliferaron y otras nuevas aparecieron (Moreno y López, 2005).

Con esta problemática del uso indiscriminado de agroquímicos en nuestro país, los estudios han aumentado indicando que las hortalizas representan 19.75% del consumo de ingredientes activos de fungicidas en México (Lopes y col., 2012). Los productos tóxicos derivados de estas actividades terminan por contaminar alimentos por una combinación con los medios

tradicionales: agua, suelo y aire. A través del agua se pueden incorporar sustancias o materias nocivas, microorganismos y productos químicos. El suelo puede incorporar residuos y desechos tóxicos derivados de la industria provocando un desequilibrio físico, químico y biológico que afecta en proporciones variables al ambiente, plantas, animales y a seres humanos (Santana, 2012).

El incremento acelerado del uso de plaguicidas en las regiones agrícolas, las políticas de subsidio a favor del uso de estos insumos peligrosos y la falta de voluntad política de los gobiernos por vigilar y hacer cumplir las normas que regulan el uso de plaguicidas, está generando altas tasas de intoxicación en el mundo (tres millones por año) y la muerte, confirmando 25 personas por hora (Davicino, 2012).

### **Daños a la Salud por Agroquímicos**

A partir de los años cuarenta, se generalizó el uso de plaguicidas en la agricultura, de tal manera que para el año 1995, su utilización a nivel mundial llegó a cinco millones de toneladas. Fue a partir de entonces que en los países desarrollados se empezó a reducir su uso, pero aún siguen utilizándose en algunos países en desarrollo. Se ha establecido que sólo el 0.1% de la cantidad de plaguicidas aplicado llega a la plaga, mientras que el restante circula por el medio ambiente, contaminando posiblemente el suelo, agua y la biota (Torres y Capote, 2004).

La Secretaria de Fomento Sustentable Agropecuario mediante la Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable, publicó en junio de 2010, el estudio sobre uso y manejo de agroquímicos, donde expone el daño que pueden ocasionar al humano. Estos productos son muy peligrosos aún en pequeñas cantidades, muchos trabajadores agrícolas mueren y muchos son envenenados o lesionados cada año, a causa de la penetración de estas sustancias en el cuerpo, los casos más comunes es por respiración, absorción por la piel, y la ingesta de productos contaminados o partículas en el ambiente (OEIDRUS, 2010), descritas en la Tabla 1.

Las formas de contacto y exposición a los agroquímicos, cuando son manipulados sin los cuidados necesarios, representan una fuerte amenaza a la salud de los trabajadores y del medio ambiente. Actualmente el envenenamiento por pesticidas es una enfermedad que no suele ser diagnosticada o pasada por alto, a pesar de las recomendaciones de las instituciones de salud ocupacional y ambiental especialmente a las enfermedades relacionadas con pesticidas (EPA, 1999). Como alternativa a estos problemas se ha recomendado la utilización de va-

rias tecnologías de mitigación de daños al ecosistema, como es la agricultura orgánica, uso de biodigestores para la obtención de biofertilizantes, entre otros (SAGARPA, 2010).

Tabla 1. Vías de entrada de los contaminantes químicos al humano.

Medio de entrada al organismo	Descripción de forma de contacto
Inhalación	En forma de aerosoles.
Piel	Así como los plaguicidas entran y penetran la piel de los insectos, también son fáciles de penetrar la piel de los humanos, aumentado si hace calor o por presencia de una herida.
Oral	Es común durante el trabajo con estos agroquímicos la acumulación en ropas y manos, pudiendo llegar partículas de agroquímicos hasta la boca del individuo, provocando una intoxicación mediante su ingesta.

(OEIDRUS, 2010).

### Agricultura y Cambio Climático

El cambio climático global es el cambio de clima provocado de forma directa o indirecta por la actividad humana, capaz de alterar la composición de la atmósfera de forma adicional a la variación del clima que se presenta de forma natural a través de períodos de tiempo comparables (CMNUCC, 1992).

Existe gran acumulación de gases en la atmosfera como el CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, entre otros, permitiendo que la energía calorífica continúe llegando a la tierra. La acumulación de estos gases atrapa el calor de la energía calorífica reflejada y no permite que viajen de vuelta al espacio exterior, ocasionando que el calor generado permanezca atrapado y aumente la temperatura en la corteza terrestre; por esta razón se denominan gases de efecto invernadero (González y col., 2012). Los gases de invernadero son los responsables del incremento de temperatura y de continuar la presente tendencia, en el año 2030 se duplicaría la presencia de gases de efecto invernadero en la tropósfera terrestre, repercutiendo en el aumento de temperaturas entre 1.5 y 4.5 °C y en la elevación del nivel del mar de 20 a 140 cm (González y col., 2009).

Son muchas las actividades que incrementan los desórdenes en el ecosistema. Actualmente todas estas actividades se realizan al mismo tiempo e incrementan los eventos del efecto

del cambio climático, entre los principales se cuenta con la disposición inadecuada de residuos orgánicos, altas concentraciones de desechos de animales en la actividad ganadera y porcina; uso indiscriminado de agroquímicos para la estimulación y protección a plantas en la agricultura y ganadería; uso intensivo de combustibles fósiles y el deterioro de los bosques.

### **Agricultura Orgánica**

De acuerdo a la FAO (2003), La agricultura orgánica es un sistema de producción que trata de utilizar al máximo los recursos de la finca, dándole énfasis a la fertilidad del suelo y la actividad biológica y, al mismo tiempo, a minimizar el uso de los recursos no renovables y no utilizar fertilizantes y plaguicidas sintéticos para proteger el ambiente y la salud humana.

Para no incrementar daños al ecosistema al momento de dar un tratamiento a los residuos orgánicos contaminantes, además se ha incrementado fuertemente la demanda de energía verde, tanto que requiere que las opciones de gestión y descontaminación de residuos deben incluir recuperación de energía. En este contexto, el tratamiento biológico de residuos por digestión parece ser una tecnología prometedora (Teglia y col., 2010).

La agricultura orgánica es un sistema de producción que tiene como objetivo ambiental, social y económico, buscar la producción de alimentos a través de medios naturales, sin el uso de pesticidas, lo que resulta en la producción de alimentos más saludables. El interés por la agricultura orgánica se ha visto reforzado por las preocupaciones del público acerca de la contaminación, la inocuidad de los alimentos y la salud humana y animal, así como por el valor dado a la naturaleza y al campo (FAO, 2002).

La utilización de nuevas tecnologías para incrementar la producción alimentaria, donde no utilice materiales inorgánicos y contaminantes bioacumulables, puede traer como resultado una agricultura orgánica, al evitar la utilización de fertilizantes, plaguicidas, pesticidas y otros productos químicos contaminantes en la actividad abastecedora de alimentos. En este propósito de la agricultura moderna podemos aumentar la producción alimenticia disminuyendo partículas trazas de químicos en los alimentos, esto se puede lograr utilizando productos de origen orgánico para la bioestimulación de suelos, por sus múltiples ventajas ecológicas, acelerando el crecimiento y desarrollo de los vegetales; mejorando la producción de las cosechas y aumentando la resistencia a diferentes plagas (Gilbert, 2011).

Con el uso de bioestimulantes se erradica la utilización de los pesticidas, plaguicidas, y fertilizantes químicos. La bioestimulación con nutrientes minerales, involucra la absorción por las raíces desde el suelo y la incorporación en compuestos orgánicos que son esenciales para

el crecimiento y desarrollo de las plantas. Esta incorporación de nutrientes a sustancias orgánicas tales como pigmentos, enzimas, cofactores, lípidos, ácidos nucleicos o aminoácidos se denomina asimilación de nutrientes y se pueden obtener de inoculantes biológicos producto de la biodigestión de desechos orgánicos, alternativa viable y ecológica; con la finalidad de erradicar el uso de fertilizantes químicos nitrogenados disminuyendo el impacto ambiental causado por los agroquímicos (Gastón y col., 2012).

### **Historia de la Biodigestión en la Agricultura**

La biodigestión utiliza aquellos desechos que se pueden descomponer por medio de la acción de microorganismos, a través de un sistema natural aeróbico y/o anaeróbico, Por ejemplo las lombrices, los hongos y las bacterias (Vázquez y Morales, 2011). Esta actividad en la agricultura se practica desde hace 3,000 años y es una de las tecnologías que manejó la agricultura prehispánica, siendo una alternativa viable y ecológica (Rodas y Ramón, 2007).

El desarrollo de esta técnica tiene su origen en la India con las experiencias hechas por el inglés Albert Howard en 1905; su éxito consistió en combinar sus conocimientos científicos con los tradicionales de los campesinos. El método fue llamado Indore, se basaba en fermentar una mezcla de desechos vegetales con excrementos animales y humedecerlos cada cierto tiempo para posteriormente aplicarlos a la tierra como biofertilizante (Raspeño y Cuniolo, 1996).

La problemática de esta actividad surge en la tercera y cuarta década del siglo XX cuando una buena cantidad de plantas de compostaje fueron desarrolladas en Europa y América del Norte en donde el desconocimiento de los procesos bioquímicos involucrados acarrearón serios problemas y muchas debieron ser cerradas (Puerta, 2003).

Es necesario comprender los procesos bioquímicos llevados a cabo en el compostaje no tratado o tratado de manera inadecuada, mismo que al ser utilizado como biofertilizante o nutriente del suelo en la agricultura orgánica, puede dar lugar a la contaminación de los productos y/o de las fuentes de aguas, por lo que su aplicación descontrolada constituye un peligro para la salud pública y una amenaza para el medio ambiente, por la exposición a microorganismos patógenos (Gómez y col., 2004).

La situación ha llevado a la búsqueda de alternativas para conseguir una buena digestión de los desechos y eliminar el uso de residuos orgánicos en la tierra agrícola, que pueda traer impactos ambientales tales como la contaminación de las aguas subterráneas o de emisiones de gases nocivos (Teglia y col., 2010). Para un proceso exitoso, es necesario tomar en

cuenta además, el comportamiento y costumbres del agricultor, así como su nivel educativo y conocimientos de calidad e inocuidad alimentaria (Fernández y Peña, 2012).

La experiencia y el conocimiento de las leyes de compostaje, impactó a finales de los años 60's ocurriendo el fuerte desarrollo de la agricultura orgánica moderna, cuando agricultores y consumidores empezaron a preocuparse por las consecuencias que podía tener la actividad agrícola para las personas y recursos naturales, debido a la gran cantidad de sustancias químicas utilizadas, tanto en agricultura como en producción animal convencional (Céspedes, 2005). Así mismo, la biodigestión fue utilizada como una alternativa al uso de compuestos organohalogenados, generalmente cloros substituidos que poseen características de persistencia, una vez liberados al ambiente, ya que su descomposición ocurre en tiempos relativamente largos (Macías y col., 2008).

Una herramienta útil para la descontaminación y la eliminación de residuos son el uso de equipos herméticos llamados biodigestores. Estos equipos funcionan mediante condiciones físicas, químicas y biológicas produciendo reacciones que suministran productos orgánicos útiles a partir de otros residuos orgánicos.

### **Biodigestores**

Los biodigestores, son sistemas utilizados como una alternativa al tratamiento de residuos líquidos y/o sólidos, que puedan dañar la naturaleza tales como residuos de plantas; residuos animales, como el estiércol; desechos públicos, tales como aguas negras y aguas residuales. Con esta operación la salud se beneficia por la disminución de residuos acarreadores de problemas como las infecciones causadas por microorganismos presentes en el aire o vectores; además de la contaminación biológica (Teglia y col., 2010).

El biodigestor fue diseñado en la década de 1770 por el científico italiano Alessandro Volta, tecnología que ha sido muy utilizada en varios países, como es el caso de Alemania, donde se montó la primera planta en 1906 y para 1997 tenía más de 400 plantas y para el 2010 se esperaba una cantidad de 5.300 a 6.300. Por su función en la producción de biogás se continuaron registrando en España, Dinamarca, Suiza, Suecia y China, estas entidades lo utilizaron con la finalidad de convertir toneladas de desechos en toneladas de biogás (Vázquez, 2011).

Los biodigestores ayudan a la disminución de gases de efecto invernadero que son originados por la descomposición de materia orgánica y es llevada a cabo por microorganismos presentes en la gallinaza, estiércol vacuno, estiércol porcino, restos de cosechas de plátano y

residuos urbanos, entre otros. Con este proceso se pueden obtener dos productos principales, como el biogás y el biofertilizante (Gómez y col., 2004).

### **Clasificación de Biodigestores**

Los biodigestores reportados en la actividad descontaminante de residuos orgánicos operan en régimen estacionario o de Batch, de régimen semicontinuo, horizontales de desplazamiento y de régimen continuo.

Los de régimen estacionario consisten en tanques herméticos con una salida de gas, se cargan solo una vez y se descargan cuando han dejado de producir gas; los de régimen semicontinuo se construyen bajo tierra, se carga por gravedad una vez al día y en la parte superior flota una campana donde se almacena el gas. Los biodigestores horizontales de desplazamiento también se construyen enterrados semejantes a un canal y se operan a régimen semicontinuo, la carga entra por un extremo del biodigestor y el efluente sale por el extremo opuesto; los de régimen continuos se utilizan principalmente para tratamientos de aguas negras, son plantas muy grandes que emplean equipos para proporcionar calefacción, estos generalmente son de tipo industrial (Mandujano y col., 1981).

Los biodigestores descritos son utilizados principalmente para la obtención de biogás en condiciones anaerobias (Soria y col., 2001). Hasta el momento no hay registros de biodigestores que empleen y demuestren la utilidad del tratamiento anaerobio seguido de un tratamiento aerobio para la obtención del biogás y un biofertilizante sanitizado, por la combinación de tratamientos; la mayoría de los biodigestores son anaerobios y son contruidos enterrados para que puedan mantener las propiedades físicas, químicas y biológicas, así como los cambios bruscos de temperatura que dañan el metabolismo bacteriano (Domínguez y col., 2012) y desestabilización del proceso de digestión (FAO, 2011).

**Propiedades físicas, químicas y biológicas del biodigestor.** El compostaje de los residuos orgánicos se produce fácilmente con la presencia de los microorganismos apropiados, disponibilidad de oxígeno, temperatura óptima, nutrientes necesarios, pH y humedad (Puerta, 2003). Al ser llevado a cabo por un proceso biológico dentro del equipo biodigestor, finalmente la tecnología no afecta el contenido de nutrientes, lo que convierte el efluente en un excelente fertilizante para suelos agrícolas (Vízquez, 2011).

**pH.** El pH es un parámetro indicativo de la disponibilidad de nutrientes para la población bacteriana que realizará la función de degradación del material contenido en el biodigestor (Estrada y col., 2008). El rango óptimo de pH para lograr una mayor eficiencia en la biodigestión está entre 6.6 a 7.6; ya que es en este rango donde crece la mayoría de las bacterias que deberán de mantenerse en equilibrio dentro del biodigestor (Soria y col., 2001).

Los procesos de biodigestión pueden verse afectados por los cambios de pH, incluso inhibirse el proceso de fermentación cuando hay una disminución a 5 o un aumento a más de 8; y al no llevarse la fermentación el proceso se detiene (Domínguez y col., 2012).

Las disminuciones de pH demandan un equilibrio ácido-base importante para la presencia de los microorganismos (Estrada y col., 2008). Para evitar que se estropee el proceso de biodigestión se recurre a una neutralización del medio para poder reanudar el pH (Soria y col., 2001), este es el tratamiento más empleado para mantener las condiciones requeridas del proceso dando como resultado una disminución de microorganismos por estabilización alcalina, en la cual una base, normalmente cal, se mezcla con el biosólido para elevar el pH y poder así disminuir la mayor parte de los microorganismos, entre estos los microorganismos patógenos (Torres y col., 2009).

Una de las teorías más apegadas a la alcalinidad del proceso está dada por la destrucción de la materia orgánica, principalmente las proteínas, las cuales liberan amoníaco, este reacciona con el dióxido de carbono durante una reacción bioquímica para producir bicarbonato de amonio, el cual contribuye a la alcalinidad del sistema. Esta reacción se limita a las proteínas por presentar altos contenidos de nitrógeno orgánico, aun existiendo residuos orgánicos ricos en carbohidratos como la melasa, el almidón, la papa, que no contribuyen a la alcalinidad porque no contienen nitrógeno orgánico (FAO y col., 2011), esta actividad de la alcalinidad del medio es totalmente biológica y aceptable en los procesos de biodigestión de la materia sin la necesidad de introducir aditivos que lo realicen, solo es llevado a cabo por eventos naturales.

**Respiración.** Es un proceso de óxido-reducción (redox), de obtención de energía donde los donadores de electrones pueden ser compuestos orgánicos e inorgánicos, pero los aceptores son siempre inorgánicos ( $O_2$  o compuestos distintos a éste).

Todos los microorganismos que llevan a cabo el flujo de electrones y de compuestos carbonados en la respiración son quimiótrofos ya que obtienen la energía de reacciones redox, como se muestra en la Figura 1. De acuerdo a la naturaleza de los receptores de electrones se distinguen por la respiración aerobia o anaerobia. En cualquier caso los donadores de electrones pueden ser orgánicos (en su mayoría más eficiente) o inorgánicos.

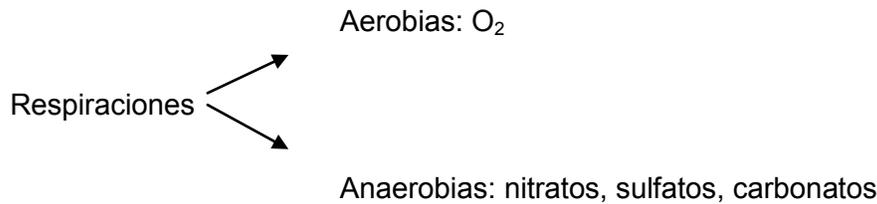


Figura 1. Donadores de electrones en distintas respiraciones.  
(Frioni, 1999).

**Oxigenación.** La oxigenación en la producción del biofertilizante está relacionada directamente con las condiciones del biodigestor, donde en condiciones anaerobias se lleva a cabo la fermentación de la materia orgánica, también conocida como respiración anaerobia, mientras que en aerobiosis se realiza el compostaje.

En la anaerobiosis los residuos son removidos de forma incompleta, quedando amonio, ácido sulfhídrico y ácidos grasos; haciendo necesario un tratamiento aerobio posterior. En conjunto estas dos respiraciones hacen una secuencia favorable e indispensable para el tratamiento de los desechos orgánicos.

**Anaerobiosis.** La digestión anaerobia es un proceso complejo desde el punto de vista microbiológico; al estar enmarcando en el ciclo anaerobio del carbono. Es posible en ausencia de oxígeno transformar las sustancias orgánicas en biomasa y compuestos inorgánicos en su mayoría volátiles:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HN}_3$  (ácido hidrazoico o ácido nitrhídrico),  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{N}_2$  y  $\text{CH}_4$ . Naturalmente ocurre en el tracto digestivo de animales y/o en pantanos; pero también puede realizarse en depósitos cerrados herméticamente, llamados biodigestores (Soria y col., 2001), utilizando el incremento de bacterias presentes en el estiércol fresco que continúan digiriendo y producen metano, dióxido de carbono y otros gases en ausencia de oxígeno (Martí, 2008); además, ofrece varios beneficios técnicos ya que este proceso completamente cerrado reduce la contaminación odorante (Teglia y col., 2010).

La biodegradación anaerobia es una fermentación que consiste en una serie de procesos de degradación microbiana de la materia orgánica, en ausencia de agentes oxidantes ( $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). Como producto de esta biodegradación se produce el biogás y queda como remanente una forma de materia orgánica estabilizada llamada biofertilizante (Frioni, 1999). En la Figura 2

se muestra el proceso llevado a cabo en cuatro etapas, hidrólisis de biopolímeros, fermentación o acidogénesis, acetogénesis y la metanogénesis.

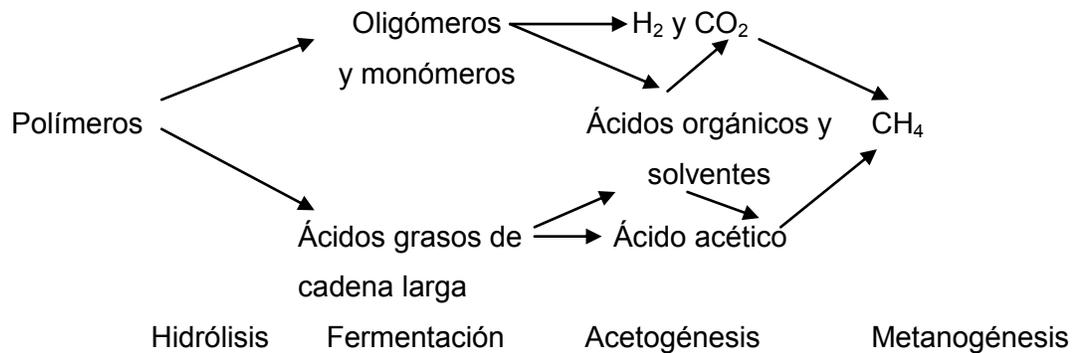


Figura 2. Etapas de la biodegradación anaerobia.

(Frioni, 1999).

**Sistema anaerobio/aerobio.** En climas calientes se está realizando un sistema híbrido para el tratamiento de los desechos, combinando el tratamiento anaerobio con un post tratamiento o estabilización de los desechos en aerobiosis. Este sistema puede ser construido y operado con menores costos que cuando se utiliza aerobiosis o anaerobiosis únicamente. Este tratamiento es más sostenible que cuando se emplea uno solo en particular, ya que hay menos producción de lodos y bajo requerimiento de energía. Además que se produce la biodegradación completa de algunos compuestos xenobióticos que no son degradados en un proceso sencillo, independientemente del sistema utilizado (Vandeviere, 1999).

Se realizó una comparación de tratamientos aerobio y anaerobio, por separado, de excretas de ganado vacuno. Se observó que en ambos tratamientos hay una disminución del contenido de materia orgánica del estiércol, así como de los ácidos grasos volátiles, que son nocivos para los animales. En ninguno de los dos casos se perdió el valor fertilizante ya que el estiércol conserva los minerales, sin embargo el principal problema es que en el tratamiento anaerobio aproximadamente la mitad del nitrógeno orgánico se transforma en amoniacal, mientras que con el tratamiento aerobio, no se produce el cambio, quedando casi la totalidad como nitrógeno orgánico (Marañón y col., 1998).

Una de las características más importantes en los sistemas, es que la microbiota anaerobia puede permanecer algún tiempo inactiva y rápidamente puede volverse a activar, mientras que la microbiota aerobia necesita una mayor cantidad de energía debido a los sistemas de aireación para la reactivación. Por otra parte, el proceso anaerobio genera mayor cantidad de

lodos (40 a 60% de la materia orgánica), siendo necesaria su posterior estabilización, mientras que el aerobio solo produce el 10% de los lodos ya estabilizado (Marañón y col., 1998).

**Aerobiosis.** Se ha utilizado el tratamiento de la materia orgánica en la presencia de oxígeno, también conocida como degradación aerobia y termófila de materiales orgánicos de diferente origen. En un principio el proceso de digestión aeróbica tuvo escasa aceptación, debido a que se desconocían sus principios fundamentales (FAO, 2011). Sin embargo, ahora se sabe que es realizada por comunidades bacterianas quimioheterotróficas existentes en los propios residuos, dando como resultado un producto estable que puede ser utilizado como fertilizante. No hay formaciones de gases, inactiva microorganismos patógenos y contribuye al reciclaje de nutrientes de los residuos (Frioni, 1999).

El proceso de la digestión aeróbica involucra la oxidación directa de la materia orgánica biodegradable y la autooxidación de la materia celular (FAO, 2011) y puede llevarse a cabo entre 5 a 7 días en equipos herméticos; mientras que al aire libre de 3 a 8 semanas o más y se puede obtener una composta adecuada (Mustín, 1987). Esto se da a medida que progresa la oxidación de la materia orgánica disponible, mientras que la tasa de crecimiento bacteriano empieza a disminuir (FAO, 2011).

El compostaje que se practica en la actualidad es un proceso aerobio que combina fases mesófilas (15 a 45 °C) y termófilas (45 a 70 °C) para conseguir la reducción de los residuos orgánicos y su biotransformación en un producto estable y valorizable (Gómez y col., 2004). Los microorganismos presentes en las etapas del compostaje utilizan los elementos nutricionales en el material orgánico para realizar sus procesos metabólicos como en la etapa mesófila, donde predominan bacterias productoras de ácidos que atacan la materia orgánica fácilmente degradable, generando calor que favorece la presencia de microorganismos termófilos (Estrada y col., 2008).

En la etapa termófila, a partir del décimo día se inicia una elevación de la temperatura y la población predominante son los actinomicetos y bacterias termófilas; que se ven influenciadas por la elevación de la temperatura y la disponibilidad de oxígeno. Se asume que durante la etapa termófila los patógenos se reducen, obteniéndose al final un producto libre de patógenos como *Salmonella spp*, *Streptococcus spp*, *Aspergillus spp*. y Coliformes (Frioni, 1999); además de los pocos olores que ayudan a la disminución en la presencia de roedores y de insectos (Morales y Peláez, 2010; FAO, 2011).

El biofertilizante producido en esta etapa mejora las características físicas, químicas y biológicas del suelo (Céspedes, 2005) lo que podría dar una agricultura libre de maleza por la

desintegración de las semillas de plantas no deseadas (Puerta, 2003). Cuando la temperatura del centro del estanque vuelve a valores cercanos a temperatura ambiente y no es posible distinguir las materias primas originales, se puede asumir que el compost está terminado (Céspedes, 2005).

**Tiempo de retención.** El tiempo de retención es el tiempo necesario para que dentro de un biodigestor se den las reacciones bioquímicas para obtener los productos adecuados. El tiempo de retención se designa al tiempo que tarda en digerirse completamente todo el volumen orgánico cargado en el biodigestor. Las bacterias requieren de cierto tiempo para degradar la materia orgánica, y la velocidad de degradación está ligada a dos factores muy importantes como el tipo de sustrato y la temperatura. A mayor temperatura disminuye el tiempo de retención en relación con el sustrato, principalmente cuando los materiales son ricos en celulosa (Domínguez y col., 2012).

Si no se toma en cuenta el tiempo de retención y se aumenta fuertemente la mezcla de carga diaria de materia orgánica, se estará saturando el sistema, ya que si se ha diseñado el biodigestor para una carga específica de estiércol, y está entrando una mayor cantidad de lo previsto, no permitirá que las bacterias lleven a cabo la fermentación de la materia y por tanto, una menor descomposición de las heces, menor producción de calor y compuestos antimicrobianos, aumentando la posibilidad de que permanezcan los microorganismos patógenos y bacterias coliformes dañinas para la salud humana (Martí, 2008). Es por esto que se ha relacionado la capacidad del biodigestor, con el tiempo de retención, el cual puede variar entre 15 a 30 días para la digestión mesofílica y entre 5 a 15 días para la digestión termofílica.

De acuerdo a un estudio realizado por Estrada y colaboradores (2008), donde describieron la utilización de un biodigestor plástico de flujo continuo donde la cuenta de coliformes en el material de entrada al biodigestor era de  $7 \times 10^9$  UFC/mL, fue necesario un tiempo de retención de 46 días para reducir a cero coliformes. Además de la relación tiempos de retención-volumen del digestor, es necesario tomar en cuenta las condiciones climatológicas ambientales del lugar donde se situará el biodigestor. La Tabla 2 muestra las recomendaciones del Manual de Reciclaje Orgánico y Biogás para tiempos de retención en diferentes regiones donde varían la temperatura media de acuerdo a las estaciones del año propuestas por Verner (1991). El trabajo de Soria y col., (2001), hace referencia a la digestión de la excreta líquida y el tiempo de retención dentro del biodigestor, quienes concluyeron que el tiempo de retención puede disminuirse a 30 días si existen temperaturas muy altas y alargarse hasta 90 días si las temperaturas permanecen muy bajas, para la eliminación al 100% de las bacterias coliformes.

Tabla 2. Tiempo de retención hidráulico de estiércol de ganado en distintas regiones.

Tiempo de retención hidráulico	Características
30-40 días	Clima tropical con regiones planas. Ejemplo: Indonesia, Venezuela, América Central.
40-60 días	Regiones cálidas con inviernos fríos cortos.
60-90 días	Clima temperado con inviernos fríos.

(FAO, 2011).

**Temperatura.** La temperatura es un evento que cambia naturalmente en el interior del biodigestor y hace que las reacciones aumenten y se lleven a cabo correctamente. El calor es la primera indicación de que el proceso de descomposición inició, la ausencia de calor en los primeros días indica un problema con la baja actividad microbiana, disminución de la presencia de oxígeno por exceso de agua o materia orgánica (Frioni, 1999). Los niveles de reacción química y biológica normalmente aumentan con el incremento de la temperatura. Las bacterias mesófilas completan su ciclo biológico en periodos de 15 a 40°C con una temperatura óptima de 35°C. Las bacterias termofílicas cumplen su función en un ámbito de 35 a 60°C con una temperatura óptima de 55°C (Soria y col., 2001).

Yanko (1988), demostró que temperaturas por encima de 53°C durante el compostaje elimina totalmente las bacterias patógenas y que la presencia de organismos patógenos se presenta en el compost de mala calidad como consecuencia de una excesiva aireación lo que conduce a reducir la temperatura.

Las altas temperaturas causan una declinación del metabolismo, debido a la degradación de las enzimas y esto es crítico para la vida de las células (Domínguez y col., 2012). Los biodigestores anaerobios pueden alcanzar temperaturas de alrededor de los 60°C; las altas temperaturas también son deseables para la destrucción de semillas de maleza y la pasteurización del material.

Las reacciones bioquímicas aumentan su velocidad por cada aumento de 10°C de temperatura, hasta un valor que se desnaturalizan macromoléculas importantes como ácidos nucleídos, proteínas, entre otras, por lo que no es recomendable que se exceda demasiado por que limitan a la microbiota mesófila, ya que se coagulan las proteínas y producen pérdidas de nitrógeno como amonio (Frioni, 1999). En la Figura 3 se representa la dinámica de los cambios poblacionales de las bacterias de acuerdo a los cambios de temperatura dentro del compostaje donde los microorganismos pueden sobrevivir y se dan las etapas psicrótroficas por debajo de 25°C, etapa mesofílica entre 25 y 45°C y la etapa termofílica entre 45 y 65°C.

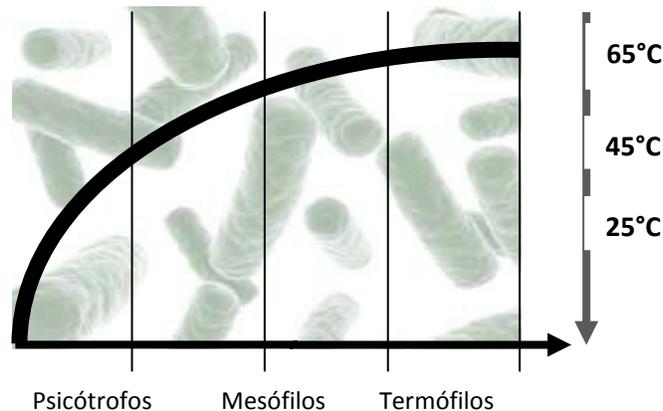


Figura 3. Temperatura de vida de microorganismos llevada a cabo en la biodigestión.  
Adaptación de (FAO y col., 2011).

### Productos del Biodigestor

#### Biogás

Durante la digestión anaeróbica de la biomasa, se realiza una serie de reacciones bioquímicas que generan el biogás, el cual, está constituido principalmente por metano ( $\text{CH}_4$ ) en un 50 a 80%; anhídrido carbónico ( $\text{CO}_2$ ) de un 20 a 50% y aproximadamente 1% de otras sustancias tales como nitrógeno, hidrógeno, amoníaco y sulfuro de oxígeno. Las propiedades físicas se caracterizan por una temperatura de ignición de 650 a 750°C y su flama alcanza una temperatura a 870°C, haciendo este producto de interés para influir en muchos factores ecológicos y económicos (FAO, 2011).

Basado en estas propiedades, se ha recomendado el uso del biogás como fuente importante de calor, para motores de ignición de gas, motores de electricidad, turbinas de gas y combustible para automóviles; además se utiliza para el cocimiento de alimentos en distintos países como Bangladesh, China, India, Nepal, Ruanda, Sri Lanka y Vietnam (De la Merced, 2012). Siendo China el país donde se ha logrado el mayor avance conocido, con la instalación de 7 millones de biodigestores, esta acción fue desarrollada principalmente para la disposición final de residuos orgánicos (IMCO, 2011).

## **Biol**

El Biol es un abono orgánico líquido, resultado de la descomposición de los residuos animales y vegetales: guano, rastrojos, etc., en ausencia de oxígeno. Contiene nutrientes que son asimilados fácilmente por las plantas haciéndolas más vigorosas y resistentes. La técnica empleada para lograr éste propósito son los biodigestores (FAO y col., 2003, INIA, 2008). “Los biodigestores se desarrollaron principalmente con la finalidad de producir energía y abono para las plantas utilizando el estiércol de los animales. Sin embargo, en los últimos años, esta técnica está priorizando la producción de bioabono, especialmente del abono foliar denominado biol” (Moreno, 2007).

El Biol es el líquido que se descarga de un digestor y es lo que se utiliza como abono foliar. Es una fuente orgánica de fitoreguladores que permite promover actividades fisiológicas y estimular el desarrollo de las plantas.

Los abonos orgánicos son todos aquellos residuos de origen animal y vegetal de los que las plantas pueden obtener grandes cantidades de nutrimentos; el suelo con la descomposición de estos abonos, se va enriqueciendo con carbono orgánico y mejora sus características físicas, químicas y biológicas (SAGARPA, 2010).

Para su utilización es necesario dar un tratamiento a la materia orgánica con la finalidad de mejorar la concentración de sus minerales y eliminar o inactivar microorganismos patógenos como bacterias, protozoos, larvas, huevos, pupas de insectos y agentes infecciosos, reduciendo la contaminación ambiental y convirtiendo las excretas en residuos útiles sin riesgo de transmisión de enfermedades (Estrada y col., 2008). Siendo un producto proveniente de las heces del ganado se caracterizan como fuente importante portadora de patógenos como *Campylobacter* sp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella* sp. y *Cryptosporidium* sp (Fernández y Peña, 2012).

Un proceso adecuado de biodigestión garantiza un producto respaldado por una fase líquida valorizada después de un tratamiento biológico, para poderse utilizar como fertilizante líquido o someterse a una extracción con el fin de separar y utilizar específicamente los nutrientes contenidos; y la fracción sólida se puede utilizar como abono en los suelos de cultivo (Teglia y col., 2010), dado que la aplicación constante de ellos, mejora las características físicas, químicas y biológicas del suelo (SAGARPA, 2010).

La composición química de algunos abonos orgánicos, es presentada en la Tabla 3, donde Santos (1987), demostró la eficacia en nutrientes y condiciones para la estabilización del suelo agrícola.

Tabla 3. Composición química de algunos abonos orgánicos.

Característica	Vacuno	Gallinaza	Vermicomposta	Composta	Pulpa de café	Paja de Arroz
Humedad %	36.0	30.0				
Ph	8.0	7.6	7.6	7.7	5.8	7.20
Mat. Orgánica	70.0	70.0			89.60	7.70
N total %	1.5	3.7	1.1	2.1	1.68	0.50
P %	0.6	1.8	0.3	1.1	0.35	0.05
K %	2.5	1.9	1.1	1.6	0.36	1.38
Ca%	3.2	5.6	1.6	6.5	0.50	0.22
Mg %	0.8	0.7	0.5	0.6	0.64	0.11
Zn ppm	130	575	100	235		
Mn ppm	264	500	403	265		
Fe ppm	6354	1125	10625	3000		
Relación C/N	16	15	19	15	30.90	9.49
Mineralización % al año	35	90				

(SAGARPA, 2010).

### Características de los Componentes Químicos del Biofertilizante en las Plantas

Los biofertilizantes son obtenidos mediante la fermentación de materia orgánica, se aplican a los cultivos para su crecimiento y salud. Los microorganismos presentes en el fertilizante, interactúan biológicamente con el suelo, las raíces y las semillas de las plantas, promoviendo el crecimiento de la microbiota que mejora la fertilidad del suelo.

Debido a que los fertilizantes químicos causan un deterioro de la vitalidad del suelo a través del tiempo, los biofertilizantes son alternativas atractivas, beneficiando las cosechas y la tierra por igual. Se utilizan además con el propósito de disminuir costos de producción y reducir el impacto negativo sobre el ambiente (Salazar y Juárez, 2012).

Entre los 16 nutrimentos esenciales que las plantas requieren para su normal crecimiento y desarrollo se encuentran el nitrógeno, calcio y magnesio. Estos tres, de acuerdo con su demanda por los cultivos son considerados macronutrientes o elementos mayores siendo más alto el requerimiento de potasio (Sadieghan, 2012).

Por otra parte, dentro de las características de los componentes químicos del biofertilizante destacan los más importantes como el nitrógeno, calcio, magnesio y potasio.

**Nitrógeno.** El Nitrógeno que respiran los organismos no es utilizable directamente y sólo algunas plantas en simbiosis con bacterias fijadoras de Nitrógeno pueden originar compuestos susceptibles de incorporarse al suelo o a los seres vivos, es decir, que pueden originar compuestos aprovechables además de la estimulación del crecimiento de la planta. Es aquí donde se evidencia el papel vital que tienen dichas plantas para la vida y los seres vivos (Calvo, 2011).

**Bacterias fijadoras de nitrógeno.** La atmósfera contiene 78% de nitrógeno como gas inerte, el cual, no está disponible para las plantas (NADP, 2000). Las bacterias fijadoras de nitrógeno han sido un grupo muy estudiado debido a la capacidad que tienen para convertir nitrógeno de la atmósfera a amoníaco, el cual es un nutriente más asimilable para la planta, y este a su vez incorporado al tejido vegetal para la producción de aminoácidos (Gastón y col., 2012).

Aunque hay muchas bacterias en el suelo que pudieran reciclar nitrógeno a partir de material orgánico, solo se puede dar por aquellas que contengan la enzima nitrogenasa, contrario a las bacterias que son deficientes en esta enzima, no tienen posibilidad de reciclar el nitrógeno (Carcaño y col., 2006).

Las *bacterias simbióticas* se encuentran en dos grupos de organismos, donde las condiciones aerobias nutren el crecimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno del primer grupo, al cual pertenecen bacterias móviles del suelo, y que son atraídas hacia la raíz por compuestos que ésta libera, grupo conocido por ser quimioorganótrofos aerobios, denominados *Rizobios*. A este grupo pertenece *Rhizobium* que tienen la función de nodular en raíces de leguminosas de climas templados y subtropicales; *Azorhizobium* forma nódulos en tallos y raíces y *Bradyrhizobium* nodula raíces de soja.

El segundo grupo está formado por Actinomicetos (bacterias Gram positivas) que nodulan raíces de muchos árboles y arbustos. Son aquellas bacterias filamentosas que viven en simbiosis con plantas actinorricas (angiospermas capaces de formar nódulos) y son pertenecientes al género *Frankia*, estas no forman micelio aéreo y sus esporas son inmóviles (Calvo, 2011).

**Calcio.** El calcio es un nutriente de naturaleza estructural, este elemento es tomado del suelo en forma iónica  $Ca^{2+}$ , para posteriormente formar parte del componente de las paredes y membranas celulares, razón por la cual es indispensable su presencia para la formación de nuevas células. Se cree que este elemento contrarresta los efectos tóxicos del ácido oxálico al formar oxalato de Ca en las vacuolas; regular la hidratación; activador de enzimas (Amilasa, ATPasa); regulación de la elongación y crecimiento (Sadieghan, 2012).

**Magnesio.** La absorción de magnesio en las plantas es de forma  $Mg^{2+}$ , su presencia en las plantas se relaciona con la aparición en el centro de la molécula de la clorofila, pigmento esencial para que las plantas verdes puedan llevar a cabo la fotosíntesis; (Mengel y Kirkby, 2000). Además de la regulación del pH celular y el balance de catión–anión, síntesis de proteínas, activación de enzimas y transferencia de energía (Marschner, 1986). Mientras que la absorción de potasio es mediante las raíces en forma iónica  $K^+$  y sus principales funciones en las plantas es el crecimiento meristemático, estado hídrico, fotosíntesis y transporte a larga distancia; debido a la gran movilidad que lo caracteriza; actúa básicamente neutralizando ácidos orgánicos que resultan del metabolismo, y así asegurar la constancia de la concentración de  $H^+$  en los jugos celulares y la traslocación de azúcares y la formación de almidón.

Además de la descripción de estos nutrientes es indispensable mencionar que los microorganismos son quienes realizan la función para que se puedan encontrar en el biofertilizante. Los microorganismos juegan un papel muy importante en la extracción de nutrientes al poder realizar la degradación de la materia orgánica en distintas condiciones como anaerobiosis, aerobiosis, variaciones de temperatura y pH, humedad y tiempos de retención.

### **Microbiota Presente en Rumiantes**

Los microorganismos del tracto gastrointestinal (TGI) de bovinos, juegan un papel vital en el animal, de la misma forma que para el resto de los organismos. En el rumen los microorganismos producen ácidos grasos volátiles y masa microbiana a partir del alimento, proveyendo así de nutrientes al animal. El rumen es un ecosistema muy diverso que incluye bacteria, hongos, protozoos y arqueobacterias (Hespell y col., 1997).

Existe una gran variedad de microorganismos en la microbiota intestinal de los rumiantes encontrándose los filos de *Firmicutes* en un 55,2 %, 25,4 % de *Bacteroidetes*, 2,9 % de *Tenericutes*, y *Proteobacteria* en un 2,5%, así como otros filos minoritarios: *Actinobacteria* (0.73%), *Spirochaetes* (0.54%), *Verrucomicrobia*, (0.19%), *Cyanobacteria* (0.15%), *Fibrobacteres* (0.02%), y *Lentisphaerae* (0.02%). Los filos mayoritarios también están presentes en el tracto gastrointestinal de diferentes mamíferos, lo que sugiere que tanto firmicutes como bacteroidetes desempeñan un papel crítico en la ecología microbiana del intestino de los mamíferos, tanto en procesos benéficos como no benéficos o patogénicos (Shanks y col., 2011).

En la nutrición animal, los procesos microbianos del rumen y del TGI de animales destinados para el consumo aún se pueden considerar una “caja negra” (Dowd y col., 2008), ya que

hasta hace poco tiempo no se conocía el tipo de microorganismos que se pueden esparcir al ambiente en las heces.

La transmisión de microorganismos patógenos presentes en el estiércol de ganado bovino que pasta en campo abierto, es un factor muy importante de la diseminación y presencia de bacterias y parásitos patógenos para el humano, como *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157:H7, *Cryptosporidium* y *Giardia lamblia*, los cuales son microorganismos de la microbiota normal de los vacunos. Además la presencia de heces en el subsuelo contaminan por lixiviados a aguas, territorios de cultivo y finalmente al hombre (Moriarty y col., 2008; Puri y Dudley, 2010). Además de la contaminación de carne de vacuno, leche y agua potable (Shanks y col., 2011).

### **Microorganismos Presentes en el Biol**

Los microorganismos utilizados en la producción de los biofertilizantes son clasificados dentro de dos grupos: El primer grupo incluye microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta, fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando hierro y fósforo inorgánico y mejorando la tolerancia al estrés por sequía, salinidad, metales tóxicos y exceso de pesticidas, por parte de la planta.

El segundo grupo incluye microorganismos los cuales son capaces de disminuir o prevenir los efectos de deterioro de microorganismos patógenos. Puede haber microorganismos que puedan estar en los dos grupos, que además de promover el crecimiento de la planta, inhiba los efectos de microorganismos patógenos (Armenta y col., 2010), por esta razón es importante conocer el proceso de descomposición de la materia orgánica, para evitar fallas en el proceso orgánico y generar contaminación de microorganismos no deseados que puedan dañar la agricultura y la salud.

Las fallas en el proceso para la obtención de un Biol tienen como efecto de que se arrojan grandes cantidades de microorganismos de interés en salud y en la industria alimentaria. En la mayoría de los casos la aplicación del Biol se realiza sin el previo tratamiento y depuración, sin embargo, con el objetivo de evitar que las altas concentraciones de huevos, larvas de parásitos o gérmenes de origen fecal que producen enfermedades infecciosas capaces de causar la muerte en animales y el hombre, es necesario realizar un proceso de sanitización, para disminuir la carga de microorganismos y evitar los daños que estos pueden ocasionar a la salud y el medio ambiente, ya que para la obtención del biofertilizante se utiliza como materia prima excretas de rumiantes en el mayor de los casos (Estrada y col., 2008).

No se puede confiar ciegamente en que el propio proceso de fermentación elimina la totalidad de los patógenos, puesto que varias investigaciones indican que algunos patógenos tienen un umbral térmico más alto que otros, como por ejemplo el virus de la Hepatitis A y otros virus. Además el tiempo y la temperatura necesaria para eliminar o reducir los peligros microbianos en el compost o biol u otras materias orgánicas, puede variar según el clima de la región y las prácticas concretas de gestión ambiental aplicadas en cada caso (FAO, 2000; Gómez y col., 2004).

Para la estimación de que el producto a utilizar como Biol está libre de patógenos se ha utilizado como referencia, que las muestras contengan menos de 1000 coliformes fecales por gramo de peso seco del compost, como indicativo de que todos los microorganismos patógenos han sido destruidos (Yanko, 1988).

### **Bacterias Patógenas**

Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades en los Estados Unidos aseguran que los brotes de origen alimentario, especialmente aquellos que están asociados al consumo de frutas y vegetales frescos, han aumentado su frecuencia en la última década.

Se ha observado una alta incidencia transmitida por el consumo de vegetales frescos y crudos, pudiendo causar enfermedad e inclusive la muerte, varios de los brotes han sido causados por bacterias como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. principalmente y que son los causantes de gastroenteritis (Fernández y Peña, 2012).

El tratamiento realizado en el compost para su aplicación como biofertilizante está dirigido a destruir las bacterias patógenas y mantener las condiciones desfavorables para su crecimiento (Gómez y col., 2004).

No obstante, entre los microorganismos más importantes encontrados en hortalizas destacan bacterias como *Escherichia coli* O157:H7 que puede provocar una diarrea sanguinolenta que se complica en pocos días en lo que se conoce como síndrome urémico hemolítico y muerte. Además de otros patógenos que afectan específicamente el hígado (virus de la hepatitis A), el sistema nervioso (botulismo por *Clostridium botulinum* y meningoencefalitis por *Listeria monocytogenes*) o infecciones sistémicas (*Salmonella typhi*), es por eso que debe destacarse las características sobresalientes de estos microorganismos ya que deben considerarse en la planeación de programas y actividades encaminadas a proteger la inocuidad de las hortalizas expuestas a la fertilización por biofertilizantes orgánicos (Fernández y Peña, 2012).

***Salmonella spp.*** Es un género bacteriano que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Es un bacilo, Gram negativo, patógeno intracelular, facultativo. De acuerdo al esquema clásico de caracterización serológico de Kauffman-White, basado en antígenos somáticos, flagelares y ocasionalmente capsular (Vi), las salmonellas se clasifican en más de 2,500 serotipos, los cuales pueden ser móviles o inmóviles (Figueroa y Verdugo, 2005).

La salmonelosis es una de las principales causas de gastroenteritis en humanos y animales. Los reservorios de *Salmonella* de potencial transmisibilidad para el humano los constituyen principalmente personas y animales domésticos infectados, aguas y alimentos contaminados como carnes, huevos y productos lácteos no pasteurizados. Las infecciones por *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* y serovar *Enteritidis* son una causa importante de morbilidad y mortalidad especialmente en niños y personas inmunocomprometidas. Las especies y serovarietades del género no resisten las temperaturas de 55 °C por 1 hora (Gómez y col., 2004).

***Listeria spp.*** Es un bacilo corto, Gram positivo, móvil debido a que posee flagelos. Se sugiere que entre el 1 y 10% de los seres humanos pueden ser portadores intestinales de *L. monocytogenes*. Esta bacteria se ha encontrado en un gran número de especies diferentes de mamíferos, tanto domésticos como salvajes y en varias especies de aves.

Puede ser aislada del suelo, del forraje ensilado y de otras fuentes ambientales. *L. monocytogenes* es altamente resistente a los efectos de la congelación, el secado y el calentamiento. Esta última característica es especialmente notoria ya que se trata de una bacteria que no forma esporas. Adicionalmente, la mayoría de las especies de *L. monocytogenes* son patógenas en cierto grado (Gebretsadik y col., 2011).

La listeriosis es una enfermedad de humanos y animales, la cual es una de las enfermedades zoonóticas emergentes más importantes a nivel mundial. La listeriosis es una infección grave causada por consumir alimentos contaminados con la bacteria *Listeria monocytogenes*, la cual recientemente ha sido reconocida como un serio problema de salud pública en los Estados Unidos. La enfermedad afecta principalmente a personas de edad avanzada, mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos que tienen el sistema inmunitario debilitado. Sin embargo, también puede afectar a las personas que no presentan estos factores de riesgo. La *Listeria monocytogenes* se encuentra en el suelo y en el agua. Las verduras se pueden contaminar con la tierra o el estiércol utilizado como fertilizante. Los animales pueden tener la bacteria sin que parezcan enfermos y pueden contaminar sus derivados como carnes o productos lácteos (CDC, 2012).

***Escherichia coli* O157:H7.** La *E. coli* es una bacteria común que vive como comensal en el intestino de animales y personas. Dentro de las cepas existentes de *E. coli* se encuentra el serotipo O157:H7, siendo reconocida como tóxica por la capacidad de enfermar al hombre si se encuentra en el agua o los alimentos y es causante de 73,000 casos de infección y 61 muertes en Estados Unidos (CDC, 2010).

Este microorganismo tiene forma de bacilo, Gram negativo, de la familia *Enterobacteriaceae* y su patogenicidad es debida por la producción de exotoxinas, diferenciándola de la flora normal (CFSPH y IICAB, 2010). La contaminación fecal del agua y de otros alimentos, así como la contaminación cruzada durante la preparación de estos (con carne de vacuno y otros productos cárnicos, superficies y utensilios de cocina contaminados), también es causa de infecciones (OMS, 2011).

Las *E. coli* están serotipadas según los antígenos O (lipopolisacáridos somáticos), H (flagelares) y K (capsulares). Los serotipos que se conocen por contener características enteroinvasivas incluyen al organismo móvil *E. coli* O157:H7, y los miembros de otros serogrupos, en particular O26, O103, O111 y O145 pero también O91, O104, O113, O117, O118, O121, O128, entre otros (CFSPH y IICAB, 2010).

La prevalencia del microorganismo en animales sanos oscila entre el 7% y el 30%, encontrando informes de su aislamiento en bóvidos, óvidos, cabras, perros y gatos (OMS, 2011). Al parecer estas cepas no son patogénicas para los animales, aunque algunos investigadores las encuentran con más frecuencia en aquellos que tienen diarrea.

Una teoría válida expuesta por el personal de Clínica Mayo en julio de 2011 se basa en la presencia de este microorganismo en los vegetales causado por la presencia de ganado vacuno contaminando los campos donde se cultiva el producto fresco siendo las verduras como espinaca y la lechuga particularmente vulnerables a este tipo de contaminación; también figura el consumo de coles de bruselas, salami, leche y jugos no pasteurizados (CDC, 2010). Aumentando la probabilidad de infección causada desde 10 a 100 unidades formadoras de colonias, basados en factores no modificables como la edad, salud y disponibilidad del microorganismo hacia el huésped (CFSPH y IICAB, 2010).

### **Normatividad de Producción del Biol**

La producción primaria higiénica de frutas y hortalizas frescas descritas en ALINORM 03/13 por la Comisión del Codex Alimentarius en el 2003 regulariza el empleo de estiércol, biosólidos y otros fertilizantes naturales de manera que se limite la posibilidad de contaminación microbiana,

química y física, que ocasione que un alimento sea inocuo, reduciendo al mínimo la contaminación microbiana. Solo se podrán utilizar estiércol, biosólidos y otros fertilizantes naturales no tratados o parcialmente tratados si se adoptan medidas adecuadas para reducir los contaminantes microbianos, aumentando al máximo el tiempo transcurrido entre la aplicación y la recolección de las frutas y hortalizas frescas y hace hincapié que el productor que adquiera la utilidad de estos enmendadores, deberá contener documentación del proveedor en la que se identifiquen la procedencia, el tratamiento aplicado, los análisis realizados y los resultados de los mismos.

En México, las normas que avalan la reutilización de residuos son la Norma Oficial Mexicana NOM-003-ECOL-1997 y la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002.

La Norma Oficial Mexicana NOM-003-ECOL-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público, en esta Norma se destacan los valores máximos permitidos de contaminantes (Tabla 4).

Tabla 4. Límites máximos permisibles de contaminantes mostrados por la NOM-003-ECOL-1997.

Tipo de reúso	Coliformes fecales NMP/100	Huevos de helmintos (h/L)
Servicios al público con contacto directo.	240	1
Servicios al público con contacto directo u ocasional.	1 000	5

NOM-003-ECOL-1997.

La Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002, protección ambiental, informa que después de un proceso de estabilización, los lodos y biosólidos pueden ser susceptibles de aprovechamiento siempre y cuando cumplan con los límites máximos permisibles de contaminantes. En la Tabla 5 describe el aprovechamiento de biosólidos y los límites máximos permisibles de contaminantes biológicos.

Tabla 5. Aprovechamiento y límites máximos permisibles de contaminantes biológicos en biosólidos de la NOM-004-SEMARNAT-2002.

Clase	Indicador bacteriológico de contaminación	Patógenos	Parásitos
	Coliformes fecales NMP/g en base seca	<i>Salmonella spp.</i> NMP/g en base seca	Huevos de helmintos/g en base seca
A	Menor de 1000	Menor de 3	Menor de 1
B	Menor de 1000	Menor de 3	Menor de 10
C	Menor de 2000 000	Menor de 300	Menor de 35

TIPO	CLASE	APROVECHAMIENTO
EXCELENTE	A	Usos urbanos con contacto directo durante su aplicación. Los establecidos para la clase B y C.
EXCELENTE O BUENO	B	Usos urbanos sin contacto público directo durante su aplicación. Los establecidos para clase C.
EXCELENTE O BUENO	C	Usos forestales. Mejoramientos de suelos agrícolas. Usos agrícolas.

NOM-004-SEMARNAT-2002.

### Impactos de Biofertilizantes de Proceso Inadecuado

Entre los abonos orgánicos se incluyen los estiércoles, compostas, vermicompostas, abonos verdes, residuos de las cosechas, residuos orgánicos industriales, aguas negras y sedimentos industriales (SAGARPA, 2010); algunas de estas fuentes de biorremediación incrementan la posibilidad de daño al no conocer un tratamiento adecuado para la obtención de un producto final. El empleo de fertilizantes orgánicos conlleva el riesgo de que se cuente con la presencia de microorganismos patógenos a las hortalizas.

Los microorganismos patógenos provienen del abono animal utilizando diversos desechos orgánicos, biosólidos provenientes de desechos humanos y otros menos peligrosos como melazas y vegetales secos (Fernández y Peña, 2012).

La necesidad de preservar los alimentos de cosechas y el ambiente libre de contaminación exige la depuración de las aguas residuales antes de ser vertidas a los cauces receptores, generando en este proceso elevadas cantidades de residuos orgánicos llamados lodos de de-

puradores, biosólidos o fangos (Utria y col., 2008). Similarmente esta acción se debe realizar con la materia fecal de rumiantes, en especial el ganado bovino y las ovejas, siendo los reservorios más importantes de la *E. coli enterohemorrágica* (ECEH) O157:H7, entre otros patógenos para el humano (CFSPH y IICAB, 2010).

Al realizar el compostaje se minimizan los riesgos por la actividad biológica de microorganismos, que al aumentar la temperatura, destruye patógenos, descompone y transforma compuestos orgánicos en sustancias húmicas estables (Lozano y col., 2008). Las buenas prácticas agrícolas y de higiene son necesarias para proteger los cultivos de la contaminación con los patógenos presentes en estos biofertilizantes (Gómez y col., 2004).

La forma más común de transmisión de enfermedades y otros problemas que afectan la salud humana (González y col., 2009), es por el contacto indirecto, ingiriendo alimentos cultivados utilizando el compost mal elaborado (Gómez y col., 2004). Los microorganismos patógenos e indicadores de contaminación también están presentes en los casos donde se reutilizan las aguas residuales para la producción agrícola, lo cual es una práctica común en varios países. Sin embargo, existe una creciente preocupación por el medio ambiente y los impactos en la salud por éstas técnicas.

En el caso de las aguas residuales domésticas, debe haber un control de contaminación microbiológica y muchos países en desarrollo ya han adoptado varias leyes y convenios al respecto, con el fin de respetar los límites máximos permisibles de indicadores patógenos en el efluente de las plantas de tratamiento (Halalshen y col., 2008).

El agua de riego contaminada con heces es una fuente importante de *E. coli* O157:H7 en los vegetales. Este organismo puede adherirse a las plantas, y sobrevive en la superficie de frutas, vegetales y hierbas culinarias frescas. De acuerdo con las condiciones ambientales, pequeñas cantidades de bacterias que permanecen en los vegetales lavados pueden multiplicarse de manera significativa durante varios días (CFSPH y IICAB, 2010; Torres y col., 2009; Fernández y Peña, 2012).

### **Beneficios del Uso del Biodigestor**

Desde los años 70's se comenzaron a evidenciar los impactos adversos sobre la salud y el ambiente que producen los residuos sólidos municipales, al no realizarse un control adecuado (Torres y col., 2009). La gran ventaja de la actividad biodigestora puede sustituir a uno de los principales métodos para eliminar los residuos animales como la incineración.

Al llevarse a cabo prácticas adecuadas de disposición final de residuos se podrán obtener mejores rendimientos en la agricultura, economía, uso de recursos naturales y disminución de fertilizantes químicos. El uso de los abonos químicos en la fertilización de cultivos, actualmente está propiciando que el suelo sufra de un agotamiento acelerado de materia orgánica y un desbalance nutrimental y que al transcurrir el tiempo puede provocar pérdida de fertilidad y capacidad productiva (Céspedes, 2005; SAGARPA, 2010).

En los últimos años se le ha dado importancia al uso de los biofertilizantes, los cuales son insumos formulados con uno o varios microorganismos, los cuales proveen o mejoran la disponibilidad de nutrientes cuando se aplican a los cultivos. En este sentido se ha trabajado en diferentes sistemas de biodigestión. La información comercial del Sistema Biobolsa muestra los beneficios de la utilidad del biodigestor en el ámbito económico, salud y medio ambiente.

### **Beneficios Económicos del Biodigestor**

Con la producción de Biogás y Biofertilizante se podrán disminuir los gastos de insumos agrícolas. Por 1.5 cubetas de excremento de ganado bovino diario, se produce 1 m<sup>3</sup> de biogás al día, equivalentes a 0.5 kg de Gas LP o a 0.75 L de gasolina o a más de 2 kg de leña. Esa misma cantidad de mezcla diaria es la que se puede obtener de biofertilizante para la agricultura. Una de las posibilidades de desarrollo agrícola, es el uso de biofertilizantes, que por su gran bondad bioestimulante, ayuda a mejorar el crecimiento y desarrollo de las plantas, producido en forma natural y económica (Colque y col., 2005).

### **Beneficios a la Salud**

Con el uso de Biogás en la cocina, se disminuye la exposición al humo generado por la leña, reduciendo a su vez los riesgos de enfermedades respiratorias. Además se da un adecuado manejo de los desechos orgánicos, se disminuyen los olores y las moscas en la vivienda o granja, al mismo tiempo, se reducen considerablemente los riesgos de infección. Además, por el uso de esta tecnología al momento de obtener un biofertilizante orgánico, se disminuye el uso de fertilizantes químicos en los cultivos vegetales, por lo tanto, se reduce el transporte de tóxicos al hombre que los consume, aunado a que la mayoría de los fertilizantes químicos contienen compuestos bioacumulables, son capaces de ocasionar diversos daños al hombre por estar en continuo contacto, los más comunes por bioacumulación es cáncer y la muerte por alta intoxicación generada (Céspedes, 2005).

## **Beneficios al Medio Ambiente**

Hoy en día, al no conocer el beneficio de la utilización de los desechos orgánicos producidos por los rumiantes, se ha incrementado la acumulación de gases efecto invernadero, siendo causados por la disposición de esta materia orgánica contaminante, causada por el efecto de descomposición de la materia donde el gas metano no es atrapado para un uso y en su caso queda mezclado con otros gases en la atmósfera, incrementando así el calentamiento global.

La revista electrónica Primicias Rurales (2011) describe que el uso del biodigestor promueve el cuidado de las cuencas y de los bosques, derivado del adecuado tratamiento de los desechos y de la disminución de la tala para conseguir leña combustible; ayuda a combatir el cambio climático, al disminuir la emisión de gases de efecto invernadero ( $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ ) y promueve la agricultura orgánica al ofrecer una solución natural para la nutrición del suelo y las plantas.

**Biorremediación del suelo.** El conocimiento del manejo de biodigestores para el tratamiento de estos residuos donde se implementan condiciones anaerobias o aerobias lleva a la adopción de buenas prácticas para la obtención de un biofertilizante para su aplicación como bioabono al suelo, donde se permitirá maximizar los beneficios ambientales en su uso. Tales prácticas producen menores emisiones de gases hacia la atmósfera, al igual una menor contaminación difusa de nutrientes por escorrentía y lixiviación, generando una biorremediación del suelo agrícola. La biorremediación por el acondicionamiento del suelo, se define como material añadido al suelo, cuyo principal objetivo es mantener o mejorar las propiedades físicas y químicas y/o actividad biológica (Teglia y col., 2010).

El uso del bioabono en programas de recuperación de suelos degradados permite mejorar el intercambio catiónico del suelo; con ello se amplía la disponibilidad de nutrientes del suelo. Por otra parte, contribuye a aumentar la humedad del suelo y a la creación de un microclima adecuado para las plantas; siendo el bioabono una fuente orgánica de fitoreguladores en pequeñas cantidades capaz de promover actividades fisiológicas y estimular el desarrollo de las plantas, favoreciendo el enraizamiento (aumenta y fortalece la base radicular), ejerce una acción sobre el follaje (amplía la fase foliar), mejora la floración y activa el vigor y poder germinativo de las semillas, traducándose esto en un incremento significativo de la producción de biomasa vegetal (FAO y col., 2011).

## **Importancia de la Tecnología Biodigestora en Sonora**

De todo el conocimiento englobado donde se destacan la utilidad de la tecnología biodigestora, la importancia de sanitización del producto y el incremento de actividad del cambio climático, la Estrategia Nacional del Cambio Climático presentada por la Delegación Federal de la SEMARNAT en Sonora en el mes de Mayo de 2013, muestra datos donde se enumeran los beneficios y la importancia de esta tecnología en el estado.

En la entidad se distinguen tres regiones climáticas: Seco desértico en toda la costa; Seco Estepario en el Norte, Centro y sur y Templado con lluvias en verano en el Norte, y sobre la línea serrana colindante con el estado de Chihuahua.

El clima general de la Región está influido por su ubicación latitudinal, correspondiente a un cinturón de zonas áridas distribuido alrededor del mundo, prevaleciendo un sistema de alta presión originado por la confluencia de masas de aire frío y tropical, lo que provoca cielos despejados, amplia exposición solar e incremento de temperaturas. Predominan los climas de tipo seco y semiseco, en la mayor parte del territorio sonorense, y los climas subhúmedos y templados a lo largo del límite oriental, en la sierra alta de Chihuahua (CONAGUA, 2012).

Debido a sus características físicas, Sonora es un estado que fija metas en actividades productivas, económicas, sociales o culturales, pero una muy importante es la disponibilidad del agua, tanto de consumo humano, como para uso pecuario, agrícola e industrial; la afectación de este recurso y las actividades dependientes de ésta, se ven incrementadas por el efecto del cambio climático que se presenta a nivel mundial.

En el 2005, las actividades en Sonora representaron aproximadamente 19.9 millones de toneladas métricas (MTm) de emisiones de monóxido de carbono, una cantidad equivalente a alrededor del 2.9% de las emisiones de gases efecto invernadero en México con base en las emisiones nacionales del 2005.

Dentro de las actividades más importantes que incrementan la concentración de gases efecto invernadero son el uso de energía y el sector agrícola importante por el ciclo del nitrógeno donde sus gases de efecto invernadero potenciales pueden quedar retenidos o ser liberados hacia la atmósfera a un ritmo por encima del normal, como sucede en el caso de la descomposición aeróbica y anaeróbica del estiércol, llevándose a cabo la liberación de metano debido a la descomposición de la materia y la fermentación entérica.

Si se implementan estrategias biodigestoras donde se utilicen los desechos bovinos como el estiércol, se puede erradicar el aumento del calentamiento global porque se estarían atrapando los gases efecto invernadero como el gas metano, producido por la degradación de

la materia orgánica (estiércol). Entre otros beneficios destaca la agricultura, donde al utilizar el bioabono generado por el equipo biodigestor se puede biorremediar el suelo y erradicar el uso de agroquímicos (Macías y col., 2008).

En el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) se trabaja en establecer canales de apoyo a los pequeños productores sonorenses de leche y queso, a través de la innovación de tecnologías adaptables a las condiciones agroecológicas y culturales de las comunidades rurales para la producción de alimentos inocuos y sustentables, que es uno de los objetivos del proyecto "Laboratorio de Innovación para la Producción Inocua y Sustentable de Alimentos en Comunidades Rurales", cuya responsable es la Dra. María del Carmen Hernández Moreno. Entre las actividades a realizar en el mismo, es el uso de la tecnología de biodigestores familiares de bajo costo, para la obtención del biofertilizante (Biol). En un trabajo realizado recientemente, titulado "Caracterización fisicoquímica del fertilizante líquido (Biol) producto de un biodigestor de estiércol de bovino" (Baldenebro, 2013), se obtuvieron valores promedios de macro-nutrientes del Biol de: 1,340 mg/L para nitrógeno total, 489 mg/L para nitrógeno amoniacal, 349 mg/L para fósforo, 3,026 mg/L de potasio. Así mismo, se encontró una importante disminución en los parámetros fisicoquímicos del producto del biodigestor y el pH de salida fue de: 7.34. De acuerdo a la literatura los resultados obtenidos, es recomendado el uso para la fertilización de cultivos, lo que permite la sustitución total o parcial de los fertilizantes sintéticos. Como complemento al trabajo realizado anteriormente, para la presente tesis se planteó el objetivo de aislar e identificar microorganismos patógenos e indicadores de contaminación presentes en un Biodigestor de régimen semicontinuo con compartimiento anaerobio y aerobio, para la obtención de un fertilizante orgánico.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se construyó un biodigestor tubular que consta de 2 bolsas de polietileno de alta densidad (1.5 mm), con una capacidad de 4000 L., la primera, donde se lleva a cabo la digestión anaerobia y la segunda con un volumen de 3500 L., a la cual se le dispuso un aditamento de entrada de oxígeno. El sistema completo se instaló en el patio del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. El biodigestor cuenta con una pila de alimentación de la mezcla de agua y estiércol, en una proporción 3:1 para obtener un volumen de 120 L de agua y 40 L de estiércol. Con esta mezcla el biodigestor se alimentó cada 48 horas.

### **Alimentación del Biodigestor**

Para la recolección de las heces de vacas, se utilizaron cubetas y palas tratadas con hipoclorito de sodio al 10%, para evitar hasta donde fue posible, introducir microorganismos que no fuesen los propios de la muestra. La recolección se realizó cada 48 horas en un rancho ganadero, de aproximadamente 80 cabezas, se recolectó estiércol fresco con una pala en dos cubetas de 19 L, una vez recolectada la muestra se transportó rápidamente y se realizó la mezcla homogénea en un tambo de 200 L; después de homogenizar, utilizando un vaso de precipitado estéril se tomó una muestra representativa de aproximadamente 500 mL en bolsa comercial Whirl-pack Nasco con malla separadora y se resguardó en hielera térmica de unice!; el resto de la mezcla se traspasó mediante un tubo conector hacia la bolsa 1 del biodigestor.

Se dejaron escapar aproximadamente 70 L de la bolsa 1 a la bolsa 2 y se tomó la muestra correspondiente, en las mismas condiciones anteriores. Al final de la bolsa 2, se tomó una muestra del biol estabilizado aeróbicamente, para lo cual se dejó fluir una parte del biol que estaba en el tubo de salida, en las mismas condiciones anteriores y las tres muestras se transportaron en hielo, al Laboratorio de Microbiología Molecular.

La calendarización de los muestreos en las dos bolsas, se encuentran en la Tabla 6 y se programaron de tal manera que cada una de las muestras tenga un tiempo de retención de 30 días en cada bolsa.

Estos tratamientos se realizaron de manera completa en primavera-verano 2012 y otoño-invierno 2012-2013, para abarcar las diferentes temperaturas del año. Todas las muestras recolectadas debieron ser procesadas el mismo día para la determinación de microorganismos patógenos y bacterias Coliformes.

Tabla 6. Muestreo del biodigestor. Muestra de entrada a la bolsa y salidas del Biol de las bolsas 1 y 2.

Muestreo	Primavera-Verano	Otoño-Invierno	Muestra de entrada	Bolsa 1 anaerobia	Bolsa 2 aerobia
1	20 mar 2012	10 dic 2012	1		
2	26 mar 2012	17 dic 2012			
3	09 abr 2012	24 dic 2012	2		
4	16 abr 2012	31 dic 2012		3	4
5	23 abr 2012	07 ene 2013	5	6	7
6	30 abr 2012	14 ene 2013		8	9
7	07 may 2012	21 ene 2013	10	11	12
8	14 may 2012	28 ene 2013		13	14
9	21 may 2012	04 feb 2013		15	16
10	28 may 2012	11 feb 2013		17	18
11	04 jun 2012	18 feb 2013		19	20
12	11 jun 2012	25 feb 2013			21
13	18 jun 2012	04 mar 2013			22
14	20 jun 2012	11 mar 2013			23
15	25 jun 2012	18 mar 2013			24

### Análisis Microbiológicos

#### Determinación de *Escherichia coli* O157:H7

Se tomaron 25 mL de biol y se colocaron en 225 mL de caldo EC modificado añadiendo 225 µL del antibiótico Novobiocina 2%; se homogenizó y se incubó a 37 °C por 24 y 48 horas. Después de las 24 horas de incubación, la muestra se sembró por estría cruzada en Agar MacConkey Sorbitol y se incubó por 24 horas a 37°C y el proceso se repitió a las 48 horas.

Las colonias características sorbitol negativo, se identificaron mediante las siguientes pruebas bioquímicas: Utilización de Citrato, fermentación de carbohidratos en agar Tres Azúcares y Hierro (TSI), movilidad, producción de indol y utilización de la ornitina (Medio MIO), producción de sustancias ácidas ó básicas en el medio Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MR-VP), producción de la enzima β-D-glucuronidasa, que actúa sobre el sustrato 4-metilumbeliferil-β-glucorónido (MUG), transformándolo en 4-metilumbeliferona, la cuál es un compuesto fluorescente, que se observa en luz ultra violeta (UV).

Las cepas presuntivas de *E. coli* O157:H7 que presentaban las características metabólicas de los controles utilizados, se incubaron en Agar EMB, para comprobar el brillo metálico característico con que crece *Escherichia coli* (BD, 2013).

### **Determinación de *Salmonella spp.***

Preenriquecimiento. De manera ascética, se tomaron 25 mL de Biol y se transfirieron a un recipiente de vidrio conteniendo 225 mL de caldo lactosado y se incubó por 24 horas. Después de la incubación se agitó y se tomaron 2 mL, añadiendo 1 mL en un tubo contenido de 10 mL de Caldo Tetrionato, adicionado con 100 µL de verde brillante al 0,1 % más 200 µL de solución yodo-yoduro; y el mililitro restante (1mL) se añadió a 10 mL de caldo Selenito Cistina. Se mezclaron por medio de vortex y se incubaron por 24 horas a 37°C, como se muestra en la NOM-114-SSA1-1994 para la determinación de *Salmonella spp.*; para el aislamiento e identificación, se homogenizaron los tubos contenido de caldo tetrionato; y selenito cistina y se inocularon en los medios selectivos; Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), Agar Verde Brillante (VD), Agar Entérico Hektoen (EH) y Agar Sulfito de Bismuto (SB).

Prosiguiendo con la incubación por 24 horas a 37°C. Cumplidas las 24 horas de incubación, se observaron las colonias típicas de *Salmonella spp.*, descritas por la norma y se continuo a la identificación bioquímica, utilizando los medios: Agar hierro lisina (LIA), triple azúcar hierro (TSI) y la prueba de la ureasa. Al obtener los resultados presuntivos del tubo de TSI se tomó muestra y se sembró en Agar Soya Tripticasa (TSA) incubándola a 37°C por 24 horas; el crecimiento en este medio se utilizó para la confirmación serológica, utilizando el antisuero polivalente A de *Salmonella O*, marca BD Difco.

### **Determinación de *Listeria spp.***

La determinación de *Listeria spp.* se realizó utilizando la NOM-143-SSA1-1995 donde se requiere un enriquecimiento. Se tomaron 25 mL de Biol y se inocularon en 225 mL de medio de enriquecimiento EB para *Listeria*; y se incubó por 48 horas a 30°C. Para su aislamiento se sembró por duplicado en los medios LPM y OXA y se incubaron a diferentes temperaturas: LPM por 48 horas a 30°C y medio OXA (*Listeria Selective Agar Oxford Formulation*) por 48 horas a 37°C.

Se observaron las colonias de cada placa; las placas de LPM (*Lithium Chloride Phenylethanol Moxalactam*, por sus siglas en inglés) se observaron a simple vista con luz blanca en un ángulo de 45°; y en el medio OXA solo las características coloniales en un ángulo de 45°.

Una vez identificadas al menos cinco colonias sospechosas de cada medio se pasaron a medio ASTEL (*Agar soya tripticaseína con 0,6% de extracto de levadura*) partiendo la placa, tratando de obtener colonias aisladas y puras y se incubaron a 37°C por 24 horas. Las pruebas para la identificación utilizadas se realizaron en el siguiente orden: Prueba de la Catalasa, Tin-

ción de Gram, Prueba de movilidad en fresco, Prueba de hemólisis dibujando una cuadrícula en el fondo de la placa de Agar sangre al 5% y se colocó por picadura y se incubó por 48 horas a 37°C; observando los resultados de esta prueba, las colonias sospechosas pasaron a la prueba de CAMP, sembrando una estría de *Staphylococcus aureus* y otra paralelamente de *Rhodococcus equi*, separadas lo suficiente, donde se estriaron líneas de colonias sospechosas, de extremo a extremo dejando 0,5 centímetros despegada de cada estría de *S. aureus* y *R. equi* y se incubó por 24 y 48 horas a 37°C.

### **Determinación de Coliformes Totales, Coliformes Fecales y *Escherichia coli* Presuntiva Mediante la Técnica del Número Más Probable.**

Se tomaron 10 mL de Biol perfectamente homogenizado y se colocaron en 90 mL de buffer de fosfato, se homogenizó y se realizaron otras 9 diluciones seriadas, que se sembraron en series de tres tubos conteniendo 10 mL de caldo Lauril Sulfato y una campana Durham. Se incubaron por 48 horas a 37°C.

Los tubos que presentaron burbujeo y gas en la campana Durham, se sembraron en Caldo de Bilis Lactosa Verde Brillante (CBLVB) y Caldo EC, ambos con campana Durham. Estos medios selectivos se incubaron en condiciones diferentes: CBLVB por 48 horas a 37°C para la confirmación de Coliformes Totales y Caldo EC (medio para determinación de bacterias coliformes) por 48 horas en baño maría a 44.5°C, para observar la presencia de organismos Coliformes fecales (termotolerantes).

Para la identificación de *E. coli*, los tubos que mostraron gas y burbujas en caldo EC, se sembraron en Agar Eosina Azul de Metileno (EMB, por sus siglas en inglés), para después incubar por 24 horas a 37°C. Las colonias que presentaron brillo metálico se confirmaron con las pruebas bioquímicas del IMViC: Producción de indol, movilidad y descarboxilación de la ornitina (medio MIO), producción de compuestos ácidos o alcalinos con el medio MV-VP (rojo de metilo-Voges Proskauer) y la utilización de citrato como fuente de carbono.

### **Diseño Experimental y Análisis Estadístico**

Los valores de unidades formadoras de colonias (UFC) de coliformes fecales y totales fueron transformados a logaritmo base 10 para su normalización. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza por modelos lineales generalizados para un diseño completamente al azar, donde el efecto principal fue la etapa del proceso o la época del año. Las comparaciones

de medias se realizaron por la prueba de Tukey-Kramer. Las significancias se estimaron a un nivel de probabilidad de 0.05 en el error. Todos los datos fueron procesados en el paquete estadístico NCSS versión 2007.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El biodigestor utilizado en esta investigación se instaló y se llenó con materia fecal bovina, que se obtuvo del rastro municipal y de las queserías que se encuentran en las inmediaciones del CIAD. La primera bolsa se llenó a un volumen total líquido de 4 m<sup>3</sup> y 1.3 m<sup>3</sup> para volumen gaseoso, estimando una capacidad total de 5.3 m<sup>3</sup>. Para la adecuada funcionalidad del biodigestor se probó que no hubiese fugas, para evitar las pérdidas de líquido y evitar la contaminación. De acuerdo a las recomendaciones de la FAO (2011) se estimó un tiempo de retención hidráulica de 30 días para cada una de las bolsas del biodigestor.

Durante los primeros 30 días se permitió la estabilización de la microbiota y se inició el drenado a la segunda bolsa, observándose también que transcurridos los siguientes 30 días, también se encontraba la primera bolsa llena de gas, el cual se quemaba constantemente para evitar que se reventara la bolsa. A partir de ese momento, se tomó como el inicio de la fase experimental del presente trabajo y se agregó nuevamente la muestra de heces a la primera bolsa y por desplazamiento de volumen el excedente de la primera bolsa pasa a la segunda, la cual tiene un ambiente aerobio proporcionado por un respirador en la parte central de la bolsa.

Cuando se inició esta investigación, el biodigestor ya contaba con una microbiota estabilizada durante varios meses con producción de metano, el cual era quemado para evitar las emanaciones a la atmósfera. Se analizaron un total de 48 muestras, divididas en dos periodos: primavera-verano y otoño-invierno del 2012-2013.

El calendario de muestreo fue diseñado para abarcar cuatro seguimientos consecutivos, que se le llamó en cascada, es decir, tomando en cuenta el tiempo de retención, se consideró que la muestra que entró a la bolsa 1, a los 30 días era el material que pasaba a la bolsa 2 y ésta a su vez, salía los siguientes 30 días de la bolsa 2, considerando el líquido como biofertilizante estabilizado y completamente digerido.

### Determinación de Microorganismos Patógenos

Durante el período otoño-invierno, no se encontró presencia de microorganismos patógenos en ninguna de las 24 muestras analizadas para *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* ni de *Escherichia coli* O157:H7, mismas que forman parte de la microbiota que se puede encontrar en las heces del ganado vacuno. Las características que tenía el biodigestor durante este periodo fue la conservación de un pH de 8.5 y variabilidad en la temperatura registrada, comprendiendo

temperaturas desde los 15° C hasta los 37° C, registrando las temperaturas más bajas en el mes de Enero y aumentando gradualmente en los meses del resto del estudio.

Por otra parte, durante el período de primavera-verano, se aislaron microorganismos patógenos en 2 de las muestras tomadas en este período. De las muestra tomadas en abril (muestra 9) y la obtenida en mayo (muestra 13), se aisló *E. coli* O157:H7. La primera se tomó de la bolsa aerobia y la 13 en la muestra anaerobia, sin embargo en los posteriores muestreos ya no se aisló la bacteria.

La presencia del patógeno empezó al aumentar la temperatura ambiental, pero para los meses de franco verano ya no se aisló nuevamente. Durante el mes de junio se presentó un incidente en las instalaciones del biodigestor, es decir un ave murió en el receptáculo del biol una vez que sale del sistema de bolsas en el mes de junio, ya que éste se encuentra al aire libre. Se aisló *Salmonella spp.* en las últimas cuatro muestras de salida del sistema, pero no de las muestras del interior, es por esto que se consideró que la contaminación fue externa.

Se considera que la contaminación del agua, ambiente e incluso los alimentos de origen animal, están relacionados por la habilidad de algunas bacterias para sobrevivir en el estiércol una vez que ha sido excretado. Las bacterias ubicuotas detectadas en las heces de las vacas están formadas por diferentes tipos: *Clostridium*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Ruminococcus*, *Alistipes*, *Lachnospiraceae*, *Prevotella*, *Lachnospira*, *Enterococcus*, *Oscillospira*, *Cytophage*, *Anaerotruncus* y *Acidaminococcus spp.*

Algunas especies patogénicas que producen enfermedades alimentarias como *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*, así como los parásitos *Cryptosporidium* y *Giardia lamblia* (Moriarty y col., 2008; Dowd y col., 2009). Se ha investigado el impacto de la temperatura (4°C, 27°C y 41°C) y el contenido de humedad (30%, 55% y 83%) del estiércol y como afectan en la sobrevivencia de varias bacterias indicadoras como coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Strptococcus* fecales.

Las poblaciones bacterianas aumentaron alrededor de 2.5 log<sup>10</sup>, durante los primeros tres días después de la excreción. Finalmente, se concluye que la temperatura presentó un efecto importante en la sobrevivencia de los tres grupos de bacterias fecales y la humedad sólo fue significativa en la sobrevivencia de los estreptococos.

A partir de los 35 días de almacenamiento de las heces a 41 °C no se encontró la presencia de *E. coli* ni de coliformes fecales, mientras que a menor temperatura, se mantenían las cuentas importantes de ambos (Wang y col., 2004; Pure y Dudle, 2010). En este trabajo se logró eliminar *E. coli* O157:H7 en un período inferior a los 60 días en el biodigestor.

En el caso de *Listeria monocytogenes*, se ha encontrado en varios de los puntos de la cadena de producción de carne de bovino. El patógeno fue detectado en muestras fecales de vaca y su cría, hierba cortada, suelo, acequias, estanques y los bebederos, siendo en las muestras fecales y del suelo donde se obtuvo la menor incidencia (Mohammed y col., 2010).

Las heces utilizadas para alimentar el biodigestor, eran lo más fresco posible, pudiendo ser ésta una de las causas por las que no se aisló el patógeno en ninguna de las muestras directas analizadas.

Las condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos patógenos de interés son temperaturas en el rango de 30 a 41°C o menos para su desarrollo. Sin embargo, *E. coli* O157:H7 que puede iniciar su proliferación a 12°C, con valores de pH en un rango de 4.5 a 12; y disponibilidad de nutrientes presentes en la materia orgánica.

Mientras que a *Salmonella spp.*, no le es tan favorable las bajas temperaturas, ésta se caracteriza por su proliferación en un rango de 35 a 37°C, pero por debajo de los 20°C disminuye su desarrollo. Respecto a *Listeria* también puede tener una sobrevivencia e incluso multiplicación en temperaturas muy bajas como de refrigerador (aproximadamente 4 °C), hasta temperaturas óptimas de 30 a 37°C y un pH óptimo de 7.0 (Fernández, 2000).

### Coliformes Fecales y Totales

El comportamiento de las bacterias coliformes fue muy variable durante los 60 días de retención de las heces en las bolsas del biodigestor, esto posiblemente fue el efecto de que se estuvo alimentando el sistema con estiércol fresco. Se observó que durante el período de primavera-verano hubo mayor disminución de las bacterias coliformes en general mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7. Promedios generales de las cuentas de coliformes totales y fecales (Log<sub>10</sub> NMP/100 mL) en el biodigestor, durante los dos períodos de muestreo.

Muestras	Carga inicial	Bolsa anaerobia	Bolsa aerobia
Primavera-Verano	7.85		
Promedio general		5.8	4.7
Muestras consecutivas		4.9	4.4
Otoño-Invierno	8.01		
Promedio General		7.4	7.0
Muestras consecutivas		7.5	7.4

Se observó que las muestras de entrada a la bolsa, son muy parecidas y tomando en cuenta los promedios generales. En la bolsa anaerobia hubo una reducción de 2.05 ciclos lo-

garítmicos y 3.15 en el sistema completo. En cambio la reducción de coliformes fue muy bajo en el período de otoño-invierno, 0.61 en la bolsa anaerobia y llegando a 1, después de la estabilización de la bolsa aerobia.

Cuando se hace el seguimiento de las 4 muestras consecutivas, lo que se llamó “en cascada”, los promedios de eliminación son mayores, de 2.95 en la bolsa anaerobia y de 3.45 después de la segunda bolsa. En el caso de la disminución en el período otoño-invierno fue menor.

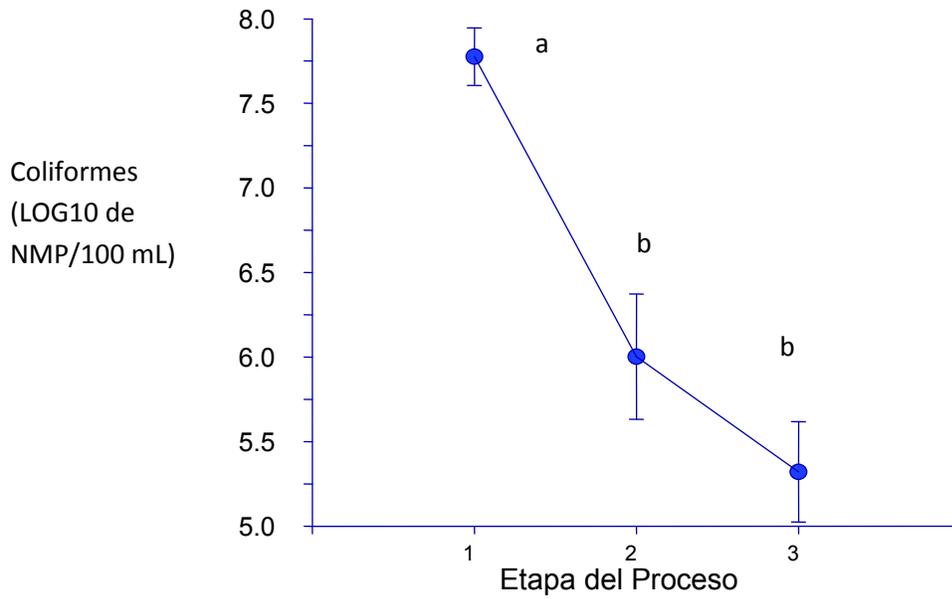
El efecto de la temperatura se ha estudiado ya en otros trabajos y los resultados han sido similares, mayor reducción de coliformes y de patógenos a temperaturas mayores (Puri y Dudle, 2010), con temperaturas controladas en el laboratorio. Sin embargo en este estudio no se controló las temperaturas, ya que este tipo de tratamiento que se le dio a las heces de bovino, se pretende implementar en el campo, donde sería remotamente posible que se pueda controlar el biodigestor de esta manera.

Este prototipo se realiza de esta manera, con el fin de conocer cuál sería la fecha más conveniente para que el biodigestor inicie la producción del biogás, mismo que puede ser utilizado posteriormente para mantener las temperaturas ideales en el mismo sistema. Es decir, se pretende que sea autosustentable respecto a la energía necesaria para la producción de calor.

### **Coliformes Fecales y Totales por Etapa del Proceso**

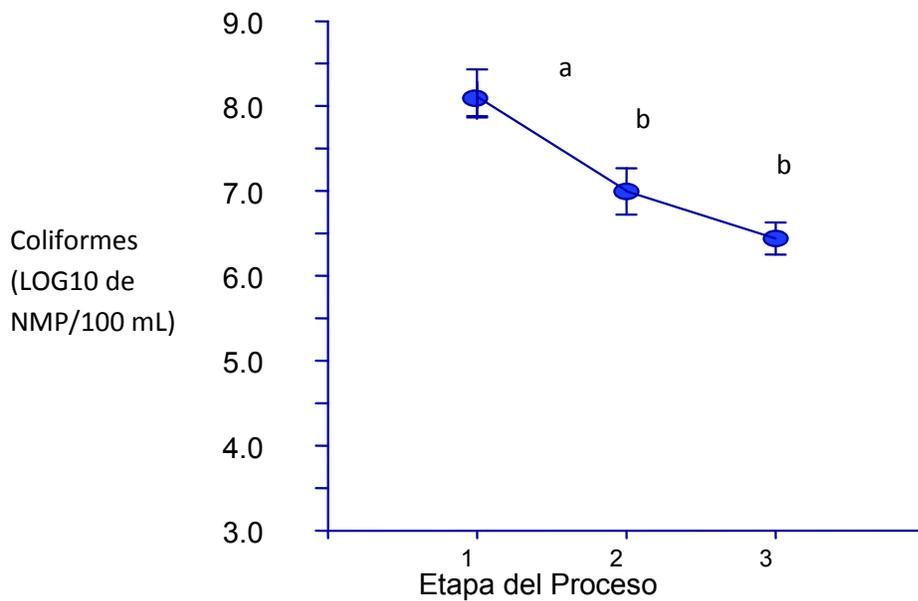
Las Figuras 4 y 5 muestran las cuentas promedio de coliformes fecales y totales ( $\text{Log}_{10}$  del NMP/100 mL) en los periodos primavera-verano y otoño-invierno. Para ambos conteos, de coliformes totales y coliformes fecales, se observó una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) debido a la etapa del proceso.

En la etapa 1 (referencia de entrada) las cuentas fueron alrededor de 7.8 logaritmos y tuvieron una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) de aproximadamente 2.8 ciclos logarítmicos en la etapa 2. En la etapa 3, las cuentas fueron de 5.5 logaritmos y no representaron un cambio significativo con respecto a la etapa 2 ( $P > 0.05$ ).



Medias<sup>ab</sup> con diferente literal, indican diferencia (P<0.05).

Figura 4. Cuentas de coliformes fecales y totales ( $\pm$  error estándar) por etapa del proceso de digestión en la composta periodo primavera-verano.

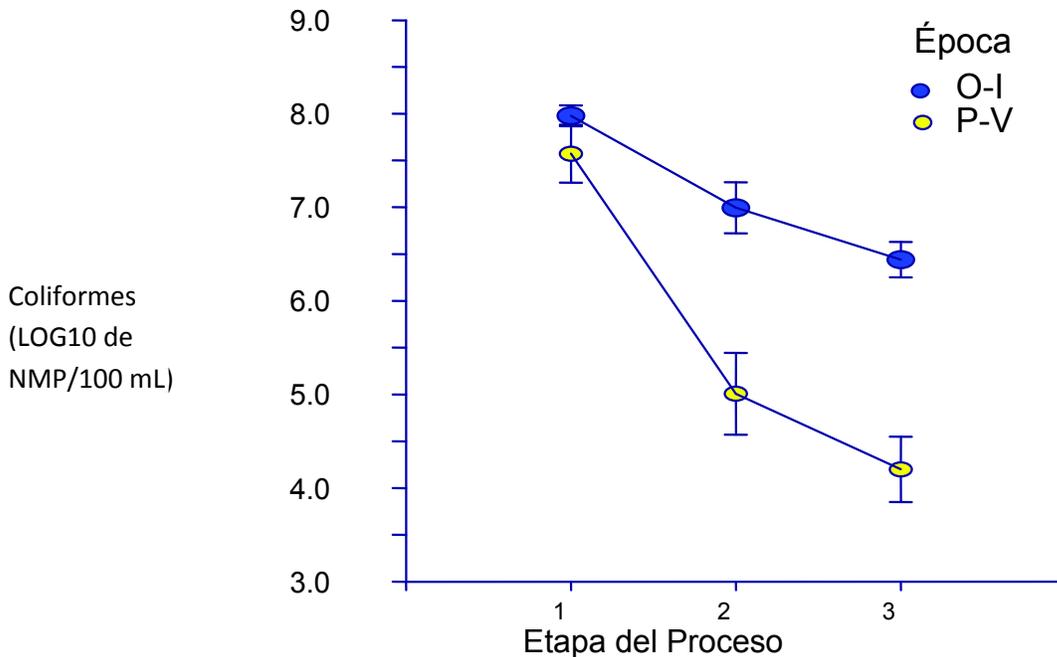


Medias<sup>ab</sup> con diferente literal, indican diferencia (P<0.05).

Figura 5. Cuentas de coliformes fecales y totales ( $\pm$  error estándar) por etapa del proceso de digestión en la composta periodo otoño-invierno.

## Efecto de Época de Muestreo

Respecto al efecto de época de muestreo, se observaron diferencias entre las ( $P < 0.05$ ) tres etapas del proceso de digestión, tanto las cuentas de coliformes fecales como totales fueron menores en los muestreos hechos en primavera-verano, respecto a otoño invierno (Figura 6).



Medias<sup>ab</sup> con diferente literal, indican diferencia ( $P < 0.05$ ). O-I, otoño-invierno; P-V, primavera-verano.

Figura 6. Cuentas de coliformes fecales y totales ( $\pm$  error estándar) por etapa del proceso de digestión en la composta para cada época de muestreo.

Como se puede observar la disminución más importante de ambos grupos de bacterias coliformes fue por el periodo primavera-verano 2012, ya que en este la temperatura fue un punto muy importante, que unido al tiempo de retención utilizado, lograron obtener 4 muestras dentro de las especificaciones de las normas. Aun cuando en el periodo otoño-invierno 2012-2013, la eliminación de coliformes fue menor, se pudo observar que cuando el biodigestor está en funcionamiento, es decir los lodos formados están activos, se pueden originar los procesos bioquímicos en temporadas invernales, aun cuando es más lento. Como ya se mencionó anteriormente, en el caso de que se utilice el biogás como combustible para mantener el calor en el

sistema, bien podría mantenerse la actividad en todas las estaciones del año con la misma actividad y se obtendría una digestión total y rápida de las heces de bovino.

### **Comparación con Normas Mexicanas**

En México, el artículo 120 de la Ley General de Equilibrio Ecológico y de Protección al Ambiente (DOF, 2013) se refiere a la regulación de las descargas derivadas de actividades agropecuarias como estiércol, aguas residuales, industriales, etc., a los cuerpos de agua sin tratamiento. Así mismo, la Comisión Nacional del Agua establece los parámetros para las descargas residuales en aguas y bienes nacionales con base en las normas NOM-001-1996; la NOM-002-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal y la Norma Oficial Mexicana NOM-003-ECOL-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público. Sin embargo, no se cuenta con vigilancia por parte de las autoridades ambientales, lo que ha provocado un abuso en las descargas de desechos a cuerpos de agua por parte de todas las industrias, no sólo de las agropecuarias (Pérez, 2001).

Se sabe que para mitigar los gases con efecto de invernadero (GEI) por el estiércol no es sencilla, ya que con algunas de las soluciones, se presentan otros problemas que tienen consecuencias no deseables. Además, en los países Americanos se carece de estímulos para los ganaderos por el manejo y desecho de excretas como la tienen los productores porcinos, quienes gozan con el incentivo de los abonos de carbono acordados en el protocolo de Kioto (SEMARNAT y col., 2010). Dicho protocolo fue firmado por la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el cambio climático.

El protocolo es un acuerdo internacional que tiene por objetivo reducir las emisiones de seis gases de efecto invernadero que causan el calentamiento global: dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), gas metano ( $\text{CH}_4$ ) y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), además de tres gases industriales fluorados: Hidrofluorocarbonos (HFC), Perfluorocarbonos (PFC) y Hexafluoruro de azufre ( $\text{SF}_6$ ), en un porcentaje aproximado de al menos un 5 % (SEMARNAT, 2012).

### **Referencia con Normatividad**

Para comparar los resultados obtenidos en este trabajo, se utilizó la NOM-003-ECOL-1997, ya que esta norma es más exigente y el residuo líquido que se producirá del biodigestor no será

utilizado para desecharse como agua residual, el objetivo es contar con un biofertilizante orgánico. Esta comparación, también sirve para demostrar la seguridad y la eficacia del uso del equipo biodigestor, para la eliminación de microorganismos indicadores de contaminación. Solo las muestras 16, 18, 21, 23 del periodo primavera-verano 2012 (Tabla 8), están dentro de los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas y que se reúsen en servicios al público establecidos en la mencionada Norma Oficial Mexicana (Tabla 9). Además de que el objetivo de este biofertilizante es poder utilizarlo como abono y riego de praderas donde pastará el ganado bovino lechero.

Tabla 8. NMP de Coliformes totales y fecales en muestras dentro del rango permitido por la NOM-003-ECOL-1997, para el periodo primavera-verano 2012.

Muestra	NMP en 1mL de muestra	NMP en 100 mL de muestra
16	4	400
18	3	300
21	3	300
23	4	400

Tabla 9. Límites máximos permisibles de contaminantes mostrados por la NOM-003-ECOL-1997.

Tipo de reúso	Coliformes fecales NMP/100 mL	Huevos de helmintos (h/L)
Servicios al público con contacto directo	240	1
Servicios al público con contacto directo u ocasional	1 000	5

NOM-003-ECOL-1997.

A nivel internacional los criterios de calidad sugeridos para el uso inocuo de las aguas residuales en agricultura, las normativas conocidas como las directrices de Engelberg que establecen que las aguas residuales tratadas deberán contener menos de 1000 UFC/mL de coliformes fecales y menos de 1 huevo viable de nemátodos intestinales por litro para su uso en agricultura (Strauss 1985; Cairncross y Mara 1990; OMS, 1989). Al igual que las disposiciones de la NOM-003-ECOL-1997 (Tabla 9). En este trabajo se envieron a analizar las muestras de biol al

Labroatorio de Parasitología en CIAD y en ninguna de ellas se encontró la presencia de huevos de helmintos.

## CONCLUSIONES

Se observó variabilidad en la cantidad de bacterias coliformes totales y fecales en las dos etapas o estaciones del año en las que se dividió el presente trabajo, siendo mayor la eliminación durante la época de primavera-verano.

La baja eliminación de otoño-invierno puede ser mejorada posiblemente con ajustes en los tiempos de retención hidráulica de las heces en las bolsas, principalmente en la bolsa anaerobia que es donde se lleva a cabo la mayor eliminación de las bacterias por acción de los procesos bioquímicos y físicos que se llevan a cabo en el interior.

En este sentido, también puede ser importante que todo el sistema sea cubierto durante el mencionado período, para evitar que las bajas temperaturas disminuya la capacidad de eliminación de las bacterias contaminantes.

El sistema completo mostró la capacidad para eliminar la presencia de microorganismos patógenos, ya que a pesar de la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras intermedias, tanto en la bolsa anaerobia como en la aerobia, al finalizar el período de los 30 días de retención de la muestra, no se volvió a aislar el patógeno.

La presencia de *Salmonella* spp., en 4 de las muestras del periodo primavera-verano fue considerado como contaminación externa, ya que se comprobó que se debió a la presencia de una ave muerta en la pila de salida del biol.

## **RECOMENDACIONES**

Una de las recomendaciones más importantes para los próximos estudios utilizando el sistema de biodigestores empleado en el presente trabajo, es el de evitar la entrada de fauna no deseada a las inmediaciones del biodigestor, para evitar las dudas del origen de los microorganismos patógenos en el biol.

Para mejorar el proceso digestivo en el periodo otoño-invierno se deberá utilizar el biogás generado durante la fermentación anaerobia, para la generación de calor.

## BIBLIOGRAFÍA

ALINORM 03/13. Codex Alimentarius. [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. [OMS] Organización Mundial de la Salud. 2003. Programa Conjunto FAO/OMS Sobre Normas Alimentarias Comisión del Codex Alimentarius. Roma. Informe 35:66-85.

Armenta AD, García C, Camacho JR, Apodaca MA, Montoya LG, Nava E. 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Redalyc* 6(1):51-56.

[ASABE] Sociedad Americana de Ingenieros Agrícolas y biólogos 2005. Manure production and characteristics. ASAE Standard D384.2. American Society of Agricultural and Biological Engineers. St. Joseph, MI. 19p.

[BD] Becton Dickinson. 2013. EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified. Ficha técnica PA-254014.06.

Baldenebro, Ontiveros, E. 2013. Caracterización fisicoquímica del fertilizante líquido (biol) producto de un biodigestor de estiércol de bovino. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico. Instituto Tecnológico de Los Mochis, Sinaloa.

Bekkering J, Broekhuis TA, Gemert WJT. 2010. Operational modeling of a sustainable gas supply chain. *Eng. Life Sci.* 10(6):585–594.

Cairncross S, Mara D. 1990. Directrices para el uso sin riesgos de aguas residuales y excretas en agricultura y acuicultura. Organización Mundial de la Salud. Ginebra 210 p.

Calvo S. 2011. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Universidad de Salamanca. 1(3):173- 186.

Capulin GJ, Núñez ER, Etchevers BJ, Baca CG. 2001. Evaluación del extracto líquido de estiércol bovino como insumo de nutrición vegetal en hidroponía. *Revista Agrociencia* 35(3):287-299.

Carcaño MG, Ferrera R, Perez J, Molina JD, Bashan Y. 2006. Actividad Nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de Maíz y Teocinte. Terra Latinoamericana. 24(4):493-502.

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2010. <http://www.cdc.gov/>

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2012. *Listeria* (Listeriosis). <http://www.cdc.gov/spanish/listeria/causes.html>

Céspedes LM. 2005. Agricultura orgánica, principios y prácticas de producción. Chillan, Chile. Boletín 131:7-117.

[CFSPH] Center for Food Security & Public Health. [IICAB] Institute for International Cooperation in Animal Biologics. 2010. *Escherichia coli* Enterohemorrágica. ECOL\_H2009.es. 10:2-12.

Chadwick D, Sommer S, Thorman R, Fanguero D, Cardenas L, Amon B, Misselbrook T. 2011. Manure management: implications for greenhouse gas emissions. Anim. Feed Sci. Technol. 166-167:514-531.

[http://www.animalfeedscience.com/article/S0377-8401\(11\)00155-6/abstract](http://www.animalfeedscience.com/article/S0377-8401(11)00155-6/abstract)

Clínica Mayo. 2011. *Escherichia coli* O157:H7.

<http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/e-coli/basics/definition/con-20032105>

[CMNUCC] Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. 2009. gases de efecto invernadero en Nueva York 1992.

<http://es.wikipedia.org/wiki/Convenci%C3%B3nMarcodelasNacionesUnidassobreeelCambioClim%C3%A1tico>

Colque T, Rodriguez D, Mujica A, Canahua A, Apasa V, Jacobsen SE. 2005. Producción de bioabono líquido natural y ecológico. Puno, Perú. 1(1):1-3.

[CONAGUA] Comisión Nacional del Agua. 2012. Programa Hídrico Regional Visión 2030. Región hidrológico-administrativa II Noroeste. México. 1(2):14-38.

Davicino RA. 2012. inocuidad y calidad como estrategia exportadora diferencial en productos frescos de América latina y el Caribe. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba. Argentina. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato. México. 1(1):285-310.

De la Merced D. 2012. Tesis de maestría “Evaluación de los parámetros de un biodigestor anaerobio tipo continuo”. Xalapa, Veracruz. 9-62.

[DOF] Diario Oficial de la Federación. 2013. Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos.

Domínguez G, Salazar G, Galindo AJ, Xenhuatzi J, Castañeda M, Sánchez FJ, Hernández P. 2012. Implementación de Biodigestores para pequeños y medianos productores porcícolas. Tepatitlan de Morelos, Jal., Méx. Folleto para productores 1(1):7-23.

Dowd SE, Callaway TR, Wolcott RD, Sun Y, McKeehan T, Hagevoort RG, Edrington TS. 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) BMC Microbiology. Springer Link. 1(8):8-125.

[CDPR] California Department of Pesticida Regulation. 2006. Pestida. Lo que debería saber sobre los pesticidas. Sacramento, CA. Boletín informativo de denuncia.

[EPA] Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos. 1999. Sección 1 de información general.

<http://www.epa.gov/oppfead1/safety/spanish/healthcare/handbook/Spch1.pdf>

Estrada J, Londoño G, Jaramillo A. 2008. Efecto del biodigestor plástico de flujo continuo en el tratamiento de aguas residuales de establos bovinos. Vet. Zootec. 2(2):9-20.

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2000. Inocuidad y calidad de los alimentos en relación con la agricultura orgánica. 22ª conferencia regional de la FAO para Europa. Cáp. IV-C. “Contaminación con fertilizantes naturales” No. 36.

<http://www.fao.org/docrep/meeting/x4983s.htm#c1>

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, [MINENERGIA] Ministerio de Energía, [PNUD] Programa de las Naciones para el Desarrollo, [GEF] Global Environment Facility. 2011. Manual de Biogas. Santiago de Chile. 1(1):45-114.

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2002. Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Depósitos de documentos de la FAO. No. Y3557. 106 p.

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2006. Las repercusiones del ganado en el medio ambiente.

<http://www.fao.org/ag/esp/revista/0612sp1.htm>

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2006. La ganadería amenaza al medio ambiente. FAO sala de prensa.

<http://www.fao.org/newsroom/ES/news/2006/1000448/index.html>

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2003. ¿Qué es la agricultura orgánica?.

<http://www.fao.org/docrep/007/ad818s/ad818s03.htm>

Feng P, Weagant SD, Jinneman K. 2011. Bacteriological Analytical Manual. Diarrheogenic *Escherichia coli*. Edition. Food and Drug Administration. Online Cap. 4

<http://www.911emg.com/Ref%20Library%20ERG/FDA%20Bacteriological%20Analysis.pdf>

Fernández E, Peña JJ. 2012. Riesgos microbianos en la producción de alimentos frescos en áreas urbanas y periurbanas de América Latina. Primera edición 2011-2012. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Cinvestav. 361 p.

Fernández EE. 2000. Microbiología e Inocuidad de los alimentos. 1st ed. Universidad Autónoma de Querétaro, México p.217-303.

Figuroa OM, Verdugo R. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Revista Latinoamericana de Microbiología. 47(1-2):25 – 42.

Frioni L. 1999. Procesos microbianos. Argentina Montevideo Uruguay 1st ed. Editorial de la fundación Universidad Nacional de Rio Cuarto. p.332.

Gastón M, Ferrando L, Fernández A. 2012. Aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en plantas de arroz cultivadas en diferentes suelos. 7mo congreso del medio ambiente AUGM. La Plata, Argentina.

Gebretsadik, S, T Kassa, H Alemayehu, K Huruy, N Kebed. 2011. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in foods of animal origin in Addis Ababa, Ethiopia. *Journal of Infection and Public Health*. 4(1):22-9.

Gilbert PM. 2011. BIOL. Información en ABC Color  
<http://www.abc.com.py/articulos/biol-212266.html>

Gómez YT, González MI, Chiroles S. 2004. Microorganismos presentes en el compost. Importancia de su control sanitario. *Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*. 4(7):2-7.

González AM, Paranhos R, Lutterbach MS. 2009. Relationships between fecal indicators and pathogenic microorganisms in a tropical lagoon in Rio de Janeiro, Brazil. *Springer Science*. 164(1-4):207-19.

González R, Marín LE, Dévora GE, Fonseca M. 2012. Cambio climático global, balance hídrico y conflictos sociales por derechos de agua entre usuarios de las cuencas del río yaqui y del río sonora, en el noroeste de México. Folleto "Recursos naturales y contaminación ambiental". 1(1):63-80.

[GPPVEM] Grupo Parlamentario del Partido Verde Ecologista de México. 2010. Que reforma el artículo 33 de la ley orgánica de la administración pública federal. *Gaceta Parlamentaria*, Número 3131-VI.

Halalsheh M, Ghunmi LA, Al-Alami N, Fayyad M. 2008. Fate of pathogens in tomato plants and soil irrigated with secondary treated wastewater. *Water and environmental research and Study Centre, University of Jordan, Amman-Jordan*. 7:81-89.

Hespell RB, Akin DE, Dehoriy BA. 1997. Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen. In Gastrointestinal microbiology. Chapman and Hall, New York. 2:59-141.

[INIA] Instituto Nacional de Investigación Agraria. 2008. Tecnologías innovativas apropiadas a la conservación in situ de la agrobiodiversidad. <http://www.scribd.com/doc/29576597/Biol>

[IMCO] Instituto Mexicano de la Competitividad A.C. 2011. Programa Especial de Cambio Climático para el periodo 2012-2020 con acciones adicionales y análisis de potencial. 1(1):32-35.

[INECC] Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. 2010. Cambio Climático en México. <http://cambioclimatico.inecc.gob.mx/preguntasfrecuentes/protocolodekiotoymdosdebonos.html>  
Accesado Enero 2014.

[INECC] Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. 2010. Cambio Climático en México. 2010. [http://cambio\\_climatico.ine.gob.mx/comprendercc/queeselcc/queeselcc.html](http://cambio_climatico.ine.gob.mx/comprendercc/queeselcc/queeselcc.html)

[INEGI] Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2012. Ganadería. <http://cuentame.inegi.org.mx/economia/primarias/gana/default.aspx?tema=E>

Ku-Vera JC, Ayala AJ, Pérez CA, Herrera J, Castelán OA. 2012. Emisiones de metano por rumiantes Implicaciones para el calentamiento global. Revista Ciencia y Desarrollo 38(259):6-11. <http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/revista/259/articulos/emisiones-de-metano.html>

Lopes JD, Souza ZB, Lovo IC. 2012. La agricultura urbana y seguridad alimentaria. 1st ed. Ed. Centro Internacional de Investigaciones IDRC. Irapuato. México. 185-210 p.

Lozano LA, Zabala F, Rojas IA. 2008. Proceso de la descomposición de los residuos vegetales de la Universidad Industrial Santander mediante compostaje. UIS Ingenierías. 7(2):227 - 236.

Macías JV, Sánchez JL, Ramírez N, Hernández J, Martínez MA. 2008. Diagnóstico de contaminantes orgánicos persistentes (COP) en el Valle del Yaqui. 1 (6):8-12.

Mandujano A, Félix A, Martínez AM. 1981. Biogás energía y fertilizantes a partir de desechos orgánicos. Organización latinoamericana de energía. Cuernavaca, Morelos, México. (6):28-41.

Marañón ME, Sastre AH, Castrillón PE, González, PJ, Pertierra MJ, Berrueta JJ. 1998. Generación de residuos de ganadería vacuna (purines) en Asturias. Problemática y Tratamiento. Ed. Universidad de Oviedo, España. p. 95-95.

Marschner, H. 1986. Mineral Nutrition of Higher Plants. Ed. Academic Press. Cambridge. 674 p.

Martí J. 2008. Guía de diseño y manual de instalación de Biodigestores familiares. GTZ PROAGRO, Bolivia. 4(1) p.81.

Massé DI, Talbot G, Gilbert Y. 2011. On farm biogas production: A method to reduce GHG emissions and develop more sustainable livestock operations. Anim. Feed Sci. Technol. 166(1):436-445.

Mengel K, Kirkby E. 2000. Principios de nutrición vegetal. Instituto Internacional del Potasio. 4ta. Edición y primera en español. Suiza. 607 p.

Mohammed HO, Atwill E, Dunbar L, Ward T, McDonough P, Gonzalez R, Stipetic K. 2010. The risk of *Listeria monocytogenes* infection in beef cattle operations. Journal of Applied Microbiology. 108(1):349–356.

Morales GE, Peláez CA. 2010. Evaluación cinética de los Dípteros como indicadores de la evolución del proceso de Compostaje. Revista Ingenierías Universidad de Medellín. 9(17):13-28.

Moreno JA, López MG. 2007. Desarrollo agrícola y uso de agroquímicos en el Valle de Mexicali. Estudios fronterizos. 6(12):119-153.

Moriarty EM, Sinton LW, Mackenzie ML, Karki N, Wood DR. 2008. A survey of enteric bacteria and protozoans in fresh bovine faeces on New Zealand dairy farms. Journal of Applied Microbiology. 105(1):2015–2025.

Moriarty EM, Sinton LW, Mackenzie ML, Karki N, Woord DR. 2008. A survey of enteric bacteria and protozoans in fresh bovine faeces on New Zealand dairy farms. Christchurch Science Centre, Institute of Environmental Science and Research (ESR), Christchurch, New Zealand. Journal of Applied Microbiology. 105(6):2015-2025.

Mustín M. 1987. Le compost. Gestión de la materia orgánica. Ed. Francois Dubusc. Paris. 954 p.

[NADP] National Atmospheric Deposition Program. 2000. El Nitrógeno en la lluvia nacional. Folleto NADP 2000-01d.  
<http://nadp.sws.uiuc.edu/>

NORMA MEXICANA NMX-AA-42-1987, calidad del agua. Determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-001-ECOL-1996, establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-002-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas en los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-ECOL-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-004-SEMARNAT-2002, protección ambiental. Lodos y biosólidos especificaciones límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-112-SSA1-1994, bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-114-SSA1-1994, bienes y servicios. método para la determinación de *Salmonella ssp.* en alimentos.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-143-SSA1-1995, bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-145-SSA1-1995, productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

[OEIDRUS] Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable. 2010. Estudio sobre uso y manejo de agroquímicos. Baja California.

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 1989. Guidelines on studies in environmental health. Criterios de Salud Ambiental. Ginebra. Informe Técnico 27 p.

<http://www.bvsde.paho.org/eswww/fulltext/aguresi/direc/direct.html>

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2011. Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC). Nota descriptiva 125. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>

[ONU] Organización de las Naciones Unidas. 1992. Convención marco de las naciones unidas sobre el cambio climático, artículo 1. Definiciones.

<http://unfccc.int/home/items/6078.php?q=1992&cx=009772925632828311246%3Aqjvsnghto1u&ie=UTF-8&sa=>

Pérez R. 2001. Porcinocultura y contaminación del agua en la Piedad, Michoacán, México. Rev. Int. Contaminación Ambiental 17(1):5-13.

Pérez-Espejo R. 2008. El lado oscuro de la ganadería, Problemas del desarrollo, IIEc, UNAM. 39(154):217-227.

Pinos RJ, García JC, Peña A, Rendón JA, Gonzales C. Tristán F. 2012. Impactos y regulaciones ambientales del estiércol generado por los sistemas ganaderos de algunos países de América. Scielo. Agrociencia. 46(4):359-370.

Primicias Rurales. 2011. Biodigestores grandes beneficios económico para el Agro.

<http://www.ruralprimicias.com.ar/noticia--biodigestores-grandes-beneficios--economico-para-el-agro-10223.php>

Puerta S. 2003. Los residuos sólidos municipales como acondicionadores de suelos. Revista Lasallista de Investigación. 1(1):56-65.

Puri A, Dudley EG. 2010. Influence of indigenous eukaryotic microbial communities on the reduction of *Escherichia coli* o157:h7 in compost slurry. Department of Food Science, The Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. FEMS Microbiol Lett. 313 (2010):148–154.

Raspeño N, Cuniolo M. 1996. El compost y las lombrices. Revista Procampo 27.

Reynolds RW, Rayner NA, Smith TM, Stokes DC, Wang W. 2002. "An improved in situ and satellite SST analysis for climate". J. Climate. 15:1609-1625.

Rodas F, Ramón V. 2007. El control orgánico de plagas y enfermedades de los cultivos y la fertilización natural del suelo. Guía práctica para los campesinos en el bosque seco. Darwinwt. 35 p.

Sadieghan S. 2012. Tesis doctoral "Efecto de los cambios en las relaciones de calcio, magnesio y potasio intercambiables en suelos de la zona cafetera colombiana sobre la nutrición de café (*Coffea arabica* L.) en la etapa de almácigo". Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 148 p.

[SAGARPA] y [FIRCO] Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Fideicomiso de Riesgo Compartido. 2009. Diagnostico general de la situación actual de los sistemas de la Biodigestión en México. Documentación 2009.

[SAGARPA] Secretaria de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2013. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Boletín enero-marzo 2013.

[SAGARPA] Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2010. Abonos Orgánicos. 6to informe.

[SAGARPA] Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y alimentación. 2007. Aprovechamiento de Biogás para la generación de energía eléctrica en el sector agropecuario. Documento de trabajo mayo de 2007.

Salazar F, Juárez P. 2012. Requerimiento macronutricional en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.). Universidad Autónoma de Nayarit. Revista Biociencias. 2 (2): 27-34.

Santana LF. 2012. Tesis doctoral "Principales factores contaminantes que afectan al medio ambiente en la ciudad de Poza Rica de Hidalgo, Veracruz". Universidad Veracruzana Facultad de Ciencias Químicas Zona Poza Rica, Tuxpan. 69 p.

Santos S, Vera JA, Peña JJ. 2012. La Agricultura Urbana y Periurbana en México: Consideraciones Ambientales. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato. México. Edición 2011-2012. 1(1):185-210.

[SEMARNAT] Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2012. Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático y su Protocolo de Kioto. Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático. <http://www.semarnat.gob.mx/temas/internacional/Paginas/CMNUCC.aspx>.

[SEMARNAT] Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. [INECC] Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. [PNUD] Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. 2010. Cambio Climático en México. El protocolo de Kioto y el mercado de Bonos de Carbono. México. <http://cambioclimatico.inecc.gob.mx/preguntasfrecuentes/protocolodekiotoymdosdebonos.html>

Shanks OC, Kelty K, Archibeque S, Jenkins M, Newton RJ, McLellan SL, Huse SM, Sogin ML. 2011. Community Structures of Fecal Bacteria in Cattle from Different Animal Feeding Operations. Appl. Environ. Microbiol. 77(9):2992.

Soria M, Ferrera-Cerrato R, Etchevers J, Alcantar G, Trinidad J, Borges L, Pereyda G. 2001. Producción de Biofertilizantes mediante biodigestión de excreta líquida de cerdo. Chapingo, México: TERRA Latinoamericana. 19(4):353-362.

Strauss M. 1985. Survival of excreted pathogens in excreta and faecal sludges. IRCWD News, 23:4-9

Teglia C, Tremier A, Martel JL. 2010. Characterization of solid digestates: Part 1, review of existing indicators to assess solid digestates agricultural use. Springer Science. Business Media B.V. 2(1):43-58

Torres D, Capote T. 2004. Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. Ecosistemas. Red de revistas científicas. 13(3):2-6.

Torres P, Madera C, Silva J. 2009. Mejoramiento de la calidad microbiológica de biosólidos generados en plantas de tratamientos de aguas residuales domesticas. Revista EIA. 11(1):21-37.

Torres P, Rodríguez LM, García BI. 2006. Mexico City: The Integration of Urban Agriculture to Contain Urban Sprawl. CITY CASE STUDY MEXICO. Germany. 363-390p.

[UNODC] Oficina de las Naciones Unidas contra las Drogas y el Delito. 2010. Problemática ambiental y la utilización de agroquímicos en la producción de coca. Informe analítico.

[http://www.unodc.org/documents/peruandecuador//Informes/InformesAnaliticos/Informe\\_Analitico\\_Agroquimicos.pdf](http://www.unodc.org/documents/peruandecuador//Informes/InformesAnaliticos/Informe_Analitico_Agroquimicos.pdf)

Utria E, Reynaldo IM, Cabrera JA, Morales D, Goffe Sandra. 2008. Los biosólidos de aguas residuales urbanas aplicados con diferentes frecuencias en las propiedades químicas y microbiológicas del suelo, el rendimiento y la calidad del fruto del tomate (*Solanum lycopersicum* Mill). Cultivos Tropicales. 29(4):5-11.

Vandeviere P. 1999. New and broader applications of anaerobic digestion, critical reviews in environmental. Science and Technology. 29(2):151-173.

Vázquez CV, Morales L. 2011. Tesis de grado licenciatura "Sistema de tratamiento de desechos biodegradables para la generación de biogás en la finca "San José del Cantón Shushufindi". Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ingeniería en Sistemas Electrónica e Industrial.

Vázquez JA. 2011. Dimensionamiento de un biodigestor para el sector agropecuario. Lecherías o porquerías. 8923-7412.

Yanko WA. (1988) Occurrence of pathogens in distribution and marketing municipal sludges report. National Information Service. Springfield, VA. EPA/600/1-87/014.