

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

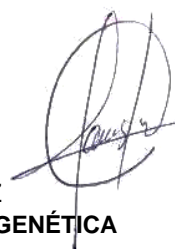
T E S I S

“Evaluación bacteriológica en composta
como producto de baños secos en
comunidades rurales de Montecristo de
Guerrero y Pijijiapan, Chiapas”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA
MOISÉS HORACIO COLUNGA PEÑA

Director
DR. JAVIER GUTIÉRREZ JIMÉNEZ
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÉTICA





UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
SECRETARÍA GENERAL
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas;
Fecha: 15 de noviembre de 2023

C. Moisés Horacio Colunga Peña

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:
Evaluación bacteriológica en composta como producto de baños secos en comunidades rurales
de Montecristo de Guerrero y Pijijapan, Chiapas

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores

Dra. María Adelina Schlie Guzmán

Dr. José Antonio De Fuentes Vicente

Dr. Javier Gutiérrez Jiménez

Firmas:

Ccp. Expediente



Pág. 1 de 1
Revisión 4

AGRADECIMIENTOS

A todos los colaboradores de este proyecto:

A la Asociación Civil “Tierra Verde, Naturaleza y Cultura”, quienes hacen una loable labor al buscar formas de apoyar al prójimo, aplicando estrategias sustentables y en pro del ambiente. Gracias por financiar y acompañarme en las etapas de este estudio, en específico a Cynthia, Luis y Jaime. De verdad, ¡¡muchas gracias!!

A los usuarios de los baños en las diferentes localidades, por su cooperación, amabilidad y hospitalidad.

Al laboratorio de Biología molecular y Genética, de igual manera, por brindarme su espacio y recursos, por instruirme con técnicas y métodos. Por ayudarme a despejar dudas y a crear otras, a la Mtra. Tanía que se encontraba haciendo su tesis de Doctorado y de quien también recibí apoyo. Gracias a mi director de tesis, el Dr. Javier Gutiérrez Jiménez, a quién siempre le he tenido admiración y respeto por su entrega a la ciencia y que honestamente y sin “barbereal” considero un padre en mi formación académica. ¡Ojalá volver a trabajar con usted Doc!

A mis maestros, los que de verdad enseñan con pasión y transmiten el gusto por aprender y conocer esta bonita ciencia.

A mis amigos, con los que fueron menos pesados los proyectos y con quienes gocé las reuniones en casas y salidas a campo, Andrea, Diego Sofía, Noé, Isaura, Francisco, el mejor *team* para trabajar y no trabajar.

A mi hermosa familia... mi madre, María de Lourdes Peña Chirino; mi padre, Moisés Horacio Colunga Castillo y, mi hermano Carlos Alberto Colunga Peña por su apoyo, consejos, amor y muchas cosas más. Los amo, son parte de mí.

ÍNDICE

| | PÁGINA |
|--|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 7 |
| II. MARCO TEÓRICO..... | 10 |
| 2.1. Antigüedad de los sistemas de saneamiento. | |
| 2.2. Características y estructura de un baño seco. | |
| 2.3. Proceso de compostaje. | |
| 2.3.1. Factores que intervienen en el proceso de compostaje. | |
| 2.3.1.1. Factores abióticos. | |
| 2.3.1.2. Factores bióticos. | |
| 2.4. Coliformes. | |
| 2.4.1. Coliformes totales. | |
| 2.4.2. Coliformes fecales. | |
| 2.4.2.1. <i>Escherichia coli</i> . | |
| 2.4.2.2. <i>Salmonella</i> spp. | |
| 2.5. Mecanismos de patogenicidad. | |
| 2.5.1. Factores de virulencia. | |
| III. ANTECEDENTES..... | 18 |
| IV. OBJETIVOS..... | 21 |
| 4.1. Objetivo general | |
| 4.2. Objetivos específicos | |
| V. ZONA DE ESTUDIO..... | 22 |
| VI. MÉTODOS..... | 23 |
| VII. RESULTADOS..... | 31 |
| 7.1. Análisis de las encuestas realizadas. | |
| 7.2. Comparación de las variables independientes por composta y de las medias estadísticas de cada posible factor involucrado en la presencia/ausencia de bacterias. | |
| 7.3. Cuantificación de coliformes fecales y clasificación de la composta de acuerdo a la Agencia de protección ambiental de Estados Unidos (US EPA). | |
| 7.4. Búsqueda y aislamiento de bacilos Gramnegativos. | |
| 7.5. Relación entre la cantidad de coliformes y otras variables. | |
| VIII. DISCUSIÓN..... | 43 |

| | |
|--|-----------|
| IX. CONCLUSIÓN..... | 48 |
| X. RECOMENDACIONES..... | 49 |
| XI. LITERATURA CITADA..... | 50 |
| XII. ANEXOS..... | 57 |
| 12.1. Medios de cultivo y soluciones. | |
| 12.2. Figuras citadas en el texto. | |
| 12.3. Formato de la encuesta aplicada a los usuarios de los BSC. | |
| 12.4. Tabla del NMP (Número más probable). | |
| 12.5. Memoria fotográfica. | |
| 12.6. Evidencia de difusión de resultados en foro académico. | |

RESUMEN

El baño seco compostero (BSC) es una ecotecnia que fomenta el cuidado del agua y la provisión de sistemas eficientes de transformación de desechos humanos en potenciales abonos para los cultivos. Esta tecnología se usa desde 2016 en localidades marginadas de la Reserva de la Biosfera El Triunfo, como ciertas partes de los municipios de Montecristo de Guerrero y de Pijijiapan, Chiapas. En este estudio se realizaron análisis bacteriológicos de ocho biosólidos para su uso como abono (cinco de Montecristo de Guerrero y tres de Pijijiapan). El muestreo se hizo en la fase de maduración del biosólido y el promedio de temperatura fue de 22.4 °C, en tanto que el de pH fue de 7.8. Respecto a la cantidad de coliformes, esta fue mayor en las compostas de Montecristo de Guerrero (\bar{x} = 64 625) en comparación con Pijijiapan (\bar{x} = 12 450). Se recuperaron 6 cepas de *E. coli* silvestres, de las cuales 3 presentaron el gen de virulencia *app*, distintivo del patotipo EAEC. No se aislaron cepas de *Salmonella* spp., aunque se identificaron *Klebsiella* sp. y *Pseudomonas aeruginosa*.

Los abonos se clasificaron de acuerdo a su utilidad según la US EPA. El 25% de las compostas resultó ser apta para ser aprovechada en plantas alimenticias, mientras que el resto puede utilizarse para plantas ornamentales, con excepción de aquellas cuyos valores de pH son demasiado elevados. El análisis estadístico mostró que la densidad bacteriana está relacionada directamente con el tiempo de habilitación del baño ($P=0.003$). Se recomienda el tratamiento de los abonos previo a su utilización y se insta que la implementación de esta ecotecnia (con muchos beneficios) tenga una continuidad para que los abonos producidos puedan ser de calidad y se eviten enfermedades y contaminación a los cuerpos de agua.

I. INTRODUCCIÓN

Los baños secos son una alternativa para lugares donde no se puede proporcionar una red de alcantarillado centralizada o donde hay una falta de infraestructura urbana estándar, incluidas carreteras, electricidad y suministro de agua (Nasri *et al.*, 2019). No solamente son una solución a la falta de servicios de drenaje, sino que son una de las ecotecnias que reducen el uso del agua, ya que, por definición, no la requieren. Actualmente los problemas ambientales por contaminación, desperdicio y abuso (mal manejo) del agua por parte de la actividad agropecuaria e industria, nos obligan a un consumo responsable. Se sabe que los inodoros son uno de los principales lugares en donde se desperdician cantidades considerables de agua limpia en los hogares (Willis *et al.*, 2013; Mourad *et al.*, 2011; Opitz *et al.*, 1999;), se estima que es un 35-45% del agua de uso doméstico (Costner *et al.*, 1990) por lo que incluso países de primer mundo han optado por su implementación (Berger, 2003; Nasri *et al.*, 2019).

Montecristo de Guerrero y Pijijiapan son dos de los municipios altamente marginados de Chiapas (INEGI, 2015), ambas localidades ubicadas en Reserva de la Biosfera El Triunfo (CONANP-FMCN, 2003. Ver Anexo 12.2, Figura 9), una zona montañosa. Esto implica que gran parte de la población, no tenga acceso a servicios básicos como el sistema de drenaje. La REBITRI (Reserva de la Biosfera El Triunfo) se localiza en el parteaguas de la Sierra Madre de Chiapas y donde se encuentran las fronteras de dos de las regiones hidrográficas, en la vertiente de la Depresión Central (Grijalva-Usumacinta) y en la vertiente del Pacífico (Costa), por lo que las aguas pluviales arrastran y filtran por el suelo diferentes tipos de materia orgánica, incluyendo la materia fecal (López Báez *et al.*, 2014). De manera que todo converge en los arroyos y ríos, de los cuales se abastecen de agua las familias que viven a altitudes menores. Aunado a esto, los hábitos están limitados a los recursos que poseen, por lo que no es extraño que el agua y los alimentos que consumen sean sin un tratamiento o lavado previo. Todas estas condiciones podrían ser causa de enfermedades provocadas por microorganismos como las bacterias. Una propuesta para evitar el filtrado de la materia fecal con potenciales patógenos es la utilización de los

baños secos, en los que, durante el proceso de compostaje, podría reducir o eliminar la presencia de bacterias nocivas para la salud humana. No obstante, la acumulación de la materia fecal sin un control en el proceso de compostaje puede resultar perjudicial, suponiendo que no se modifica el ambiente que necesitan las bacterias para sobrevivir, es decir, si factores como la temperatura y el pH no son los óptimos para su eliminación.

El producto final es abono que se forma de manera natural por el proceso de compostaje, durante este proceso el microambiente es cambiante, ya que los diferentes factores presentes (cantidad de oxígeno, pH, temperatura, humedad, aireación) varían con el tiempo (Anand y Apul, 2014). Estas alteraciones en el ambiente son importantes para transformar el producto inicial, que es potencialmente nocivo, en materia inerte para la salud y útil para enriquecer el suelo (Dumontet *et al.*, 2001; Wichuk y McCartney, 2007).

El uso de estos baños puede ser controversial, ya que aunque es una alternativa a los problemas antes mencionados, se mantiene la posibilidad de convertirse en depósitos potencialmente dañinos al permitir la proliferación de distintos microorganismos que no llegan a ser eliminados, aunque se puede encontrar literatura con resultados exitosos en el empleo de estos baños (Ersson y King, 2019; Hill y Baldwin, 2012), también se ha reportado la prevalencia de agentes infecciosos en este tipo de biosólido (Redlinger *et al.*, 2001).

Desde 2016, la asociación civil Tierra Verde Naturaleza y Cultura, ha trabajado en las comunidades que se encuentran dentro de la zona de amortiguamiento de la Reserva de la Biosfera El Triunfo. Muchas familias de estas comunidades no cuentan con un sistema de drenaje eficiente y el recurso del agua es limitado, por lo que en este periodo la construcción de los baños secos composteros ha sido la ecotecnia implementada. Las personas han aceptado y utilizado dicha tecnología de manera satisfactoria. Sin embargo, algunos usuarios cuestionan el uso de la composta que se genera en estos baños, principalmente por saber que uno de los componentes es la excreta humana, que potencialmente contiene bacterias que pudieran causar enfermedades. Por ello, es oportuno evaluar la presencia de patógenos en la composta que a la vez garantice que su uso no es nocivo para la salud.

Además, es importante asegurar que su uso como abono cumpla con las normativas establecidas por organismos de protección ambiental, o de lo

contrario, preparar el producto obtenido con un proceso adicional antes de ser utilizado en la agricultura.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antigüedad de los sistemas de saneamiento.

A través de milenios, las diferentes civilizaciones han buscado la forma de eliminar los desechos humanos mediante diferentes tecnologías. Actualmente se cuenta con suficiente literatura que se enfoca en el desarrollo de sistemas de suministro de agua y de infraestructura hidráulica de las civilizaciones antiguas, sin embargo, referente a los sistemas de saneamiento, particularmente hablando de los inodoros, la información es escasa. Cabe mencionar que muchos de los hallazgos y escritos arqueológicos centran sus ideas en las ciudades o élites, por lo que la información de las antiguas zonas rurales es aún menor (Antoniou *et al.*, 2016).

En la literatura mesopotámica se encuentran referencias de la existencia de alcantarillas en sus ciudades (Pritchard, 1969), además se han reconocido tuberías de arcilla (Alizadeh, 2008). Así, en esta época se tenía un manejo de desechos mediante los “pozos negros”, no dejándolos en la parte superficial del suelo y transportándolos lejos por los canales o tuberías.

2.2. Características y estructura de un baño seco.

Los baños secos composteros (BSC) son construcciones diseñadas para la transformación de las excretas humanas en abono. Esto ocurre mediante un proceso aerobio en el que además intervienen otros factores. Para ello, es necesario que la construcción sea un sistema regulado. Para hacer esta ecotecnia completamente funcional, se deben considerar el espacio y los materiales. Un BSC puede construirse dentro o fuera de una casa. Sin embargo, es de suma importancia que sea un lugar que pueda estar ventilado y no haya riesgo de inundaciones (Castillo-Castillo, 2002).

Los principales componentes del BSC (Figura 1) son: a) Inodoro (taza, retrete, water), que es similar a los que se usan comúnmente, con la diferencia de contar con un separador de heces y orina; b) Cámaras de secado (o composteras) con compuertas de vaciado, donde se depositan las heces y se

inicia el proceso de compostaje; c) Tubo de ventilación, que se conecta con las cámaras para evitar los malos olores; d) Urinario (mingitorio), para facilitar que los hombres orinen y evitar que la orina entre a las cámaras; e) Recolector de orina, puede ser un recipiente cerrado con manguera que se conecte al separador de orina del inodoro y al urinario; f) Mezcla secante o agregado, con lo que se cubrirán las heces (Castillo-Castillo, 2002; Salud Sin Límites Perú, 2015).

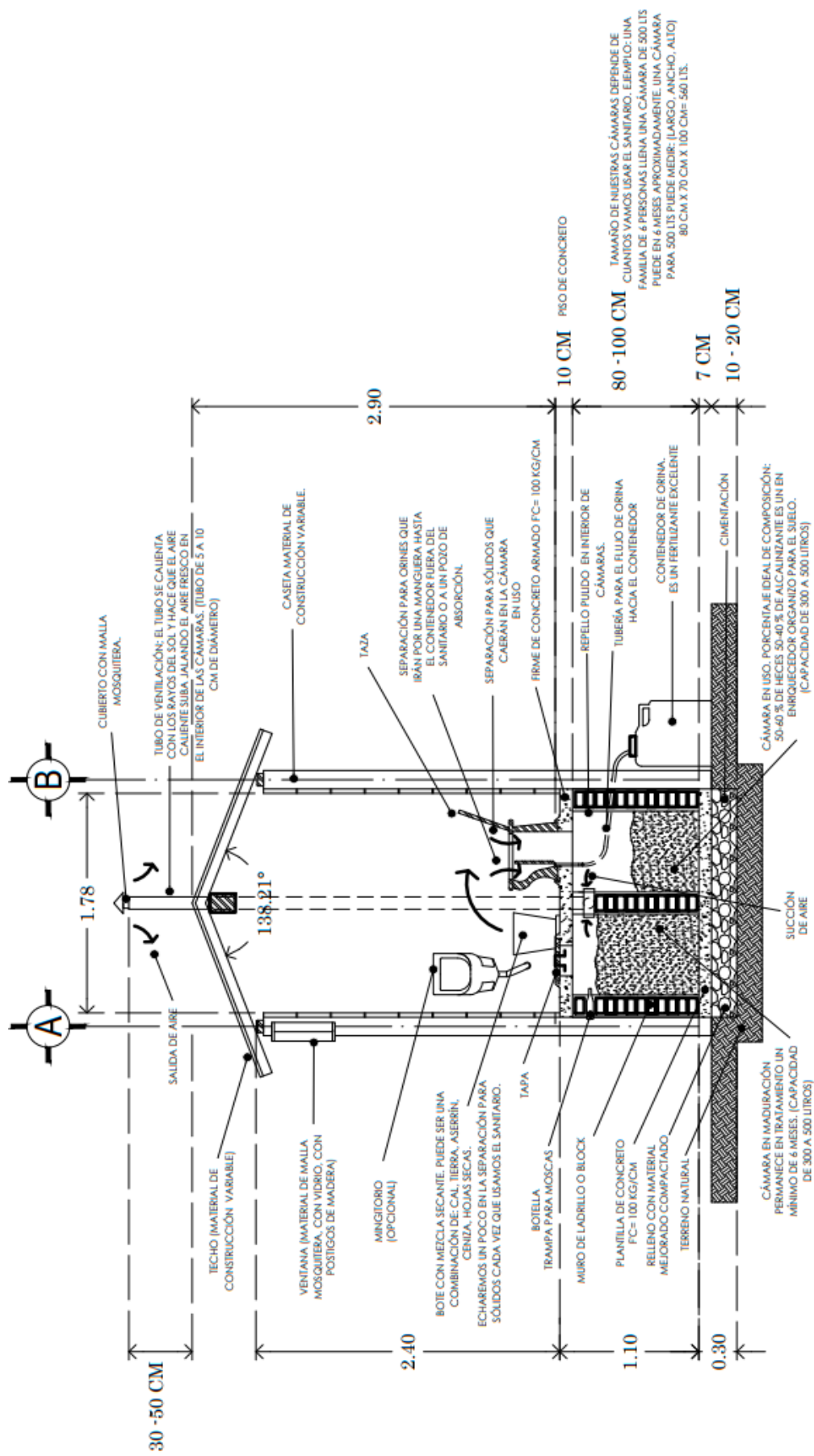


Figura 1. Esquemas de la estructura externa e interna del BSC. Puede observarse que la taza o inodoro cuenta con un separador de heces y orina. (Imagen modificada de Castillo-Castillo, 2002).

2.3. Proceso de compostaje.

La práctica del compostaje es muy antigua y sus principios básicos han sido utilizados con diferente intensidad a través del tiempo y dependiendo de las situaciones sociales y económicas. Esta ha sido retomada últimamente debido a la alta generación de residuos orgánicos, buscando que se acelere su descomposición y se obtenga un producto útil y fértil (Torrentó *et al.*, 2008). Toda materia orgánica (incluyendo los desechos humanos) puede transformarse en este proceso.

De manera general, existen cuatro fases del proceso de compostaje (Figura 2): 1) Fase mesófila, 2) Fase termófila, 3) Fase mesófila II o de enfriamiento y 4) Fase de maduración (Bohórquez-Santana, 2019; Román *et al.*, 2013). Se describen a continuación:

- 1) Fase mesófila: La temperatura de la composta es la temperatura ambiental. Por la actividad de los microorganismos, la temperatura asciende en pocos días.

- 2) Fase termófila: La temperatura es superior a los 60 °C. Los hongos termófilos detienen su actividad y las reacciones de oxidación las llevan a cabo las bacterias formadoras de esporas y actinomicetos. Al llegar a temperaturas de entre 70 y 80 °C, solo se encuentran bacterias termófilas. Gran parte de la materia orgánica es degradada.

- 3) Fase mesófila II o de enfriamiento: La temperatura desciende a valores cercanos a los ambientales. La tasa de descomposición disminuye. Hay una colonización de microorganismos mesófilos.

- 4) Fase de maduración: Esta fase puede durar meses a una temperatura en la que se producen reacciones secundarias para la formación de ácidos húmicos y fúlvicos.

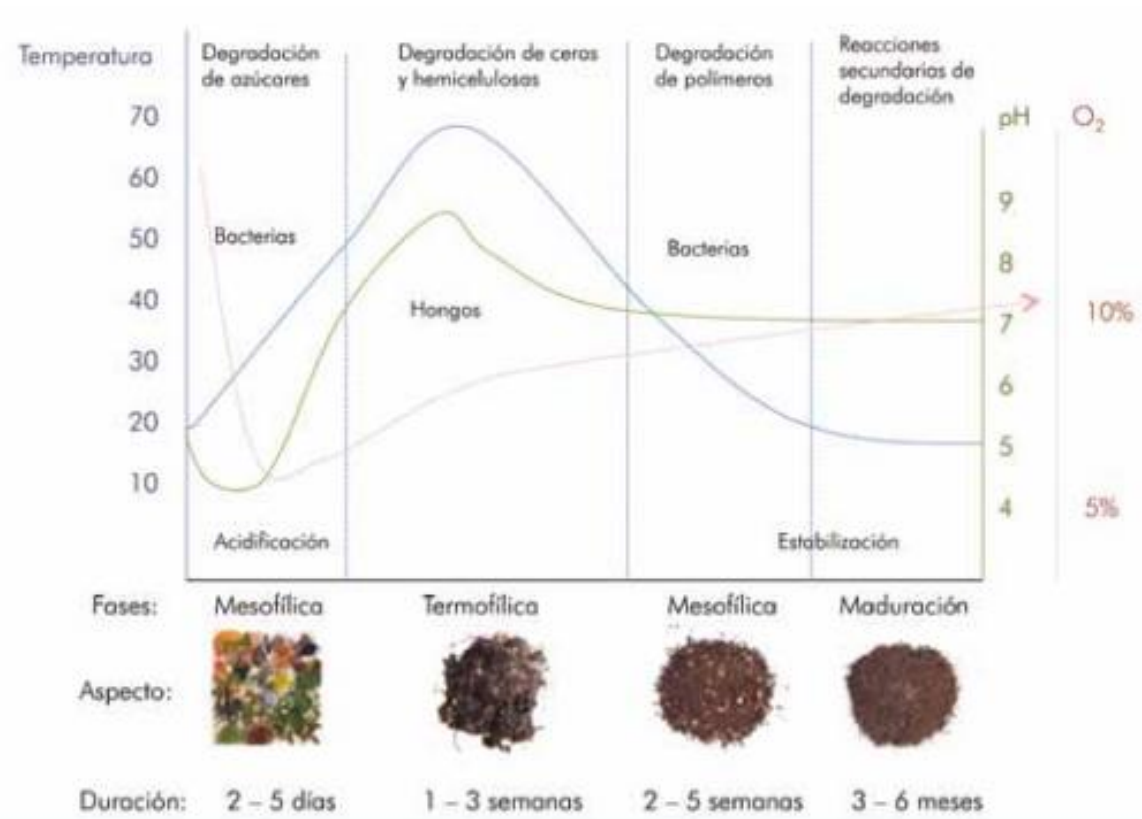


Figura 2. Fases del proceso de compostaje y cambios de temperatura, pH y cantidad de oxígeno durante el proceso. Tomado de Román *et al.* (2013).

2.3.1. Factores que intervienen en el proceso de compostaje.

2.3.1.1. Factores abióticos.

- 1) Temperatura: Tiene un amplio rango de variación dependiendo de la fase del proceso. Las temperaturas elevadas aceleran la descomposición y aumentan la higienización. Está regulada por los microorganismos y otros factores como la aireación. No debe haber ninguna alteración antropogénica (Román *et al.*, 2013).

- 2) pH: Tiene una influencia directa en el compostaje debido a su acción en la dinámica de los procesos microbianos. Se ha mencionado que hay tres fases del pH en el proceso de compostaje (Márquez *et al.*, 2008). En la fase mesófila inicial, el pH desciende debido a la acción de los microorganismos sobre la materia orgánica más sencilla produciendo ácidos orgánicos. En condiciones anaeróbicas, este descenso puede ser mayor por la liberación de más ácidos orgánicos. Posteriormente, en la

segunda fase debería haber una progresiva alcalinización del medio por la desaparición de los ácidos orgánicos y la producción de amoníaco por la descomposición de las proteínas (Sánchez-Monedero *et al.*, 2001). Finalmente, el pH se acerca a la neutralidad por la formación de compuestos húmicos que tienen propiedades de tampón (Márquez *et al.*, 2008; Román *et al.*, 2013).

- 3) Aireación: Para que el compostaje se logre de manera correcta, es necesario asegurar la presencia de oxígeno, ya que los microorganismos que actúan son aerobios. Una aireación insuficiente provoca cambios en la diversidad microbiana, sustituyendo a los aerobios por los anaerobios y por consiguiente retardando la descomposición de la materia orgánica, la producción de sulfuro de hidrógeno y de malos olores (Bidlingmaier, 1996).
- 4) Humedad: Tiene una relación directa con la actividad de los microorganismos, ya que estos ocupan el agua como medio de transporte de los nutrientes. Sin embargo, si tiene un valor elevado puede causar que los espacios o poros estén saturados impidiendo la aireación. El rango óptimo de humedad oscila entre el 45-60% (Román *et al.*, 2013).

2.3.1.2. Factores bióticos.

En el compostaje intervienen e interactúan distintos organismos de forma sucesiva por las condiciones ambientales y nutricionales en la composta. Estos organismos pueden ser animales pequeños y microorganismos. Dependiendo de la eficacia competitiva y de la capacidad de supervivencia frente a las condiciones, es como se encuentran los microorganismos predominantes, básicamente esta selección de microbios ocurre por la disponibilidad de nutrientes y la temperatura (Casco y Bernat, 2008).

Las bacterias son los microorganismos que proliferan principalmente en las fases mesófila y termófila iniciales, aunque están presentes en todas las fases y decrecen considerablemente en la fase de maduración. La razón de su supervivencia radica en su elevada velocidad de crecimiento, su gran diversidad metabólica, la capacidad que tienen algunas para formar esporas resistentes a

condiciones adversas, así también tienen representantes con un amplio rango de temperaturas, a diferencia de los hongos y otros microorganismos (Casco y Bernat, 2008).

2.4. Coliformes.

Son un grupo de bacterias que se caracterizan por ser similares a *Escherichia coli*, de ahí su nombre “con forma de coli”. Son bacilos Gram-negativos, no formadoras de esporas. Estas además poseen ciertas características bioquímicas que permiten que sean utilizadas como indicadores de la calidad de los alimentos y el agua. Se pueden reconocer coliformes totales y fecales (NMX-AA-042-SCFI-2015).

2.4.1. Coliformes totales.

Bacterias aerobias o anaerobias facultativas, capaces de crecer entre 35° y 37°C, fermentan la lactosa (producen ácido y gas), con actividad beta-galactosidasa, son oxidasa negativa. Algunos géneros son *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. (Larrea-Murrell *et al.*, 2013; NMX-AA-042-SCFI-2015).

2.4.2. Coliformes fecales.

Las coliformes fecales poseen las mismas características que las totales, a diferencia de que estas resisten temperaturas más elevadas (44.5°C), por lo que son también llamadas coliformes termotolerantes, son un grupo muy reducido de microorganismos, entre ellos están *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii*, además son indol positivo (Larrea-Murrell *et al.*, 2013).

2.4.2.1. *Escherichia coli*.

Coliforme fecal, bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, móvil, no formadora de esporas, son mesófilas, por lo que pueden crecer en un rango de temperatura de entre 8 y 45 °C (su desarrollo óptimo es entre 35 y 40 °C) y en un rango amplio de pH (~4 a 9.5, pero con desarrollo óptimo en 6-7). Habita de forma natural en el intestino de animales de sangre caliente. Además, puede fermentar la glucosa

y la lactosa produciendo gas, no utiliza citrato como fuente de carbono y no produce acetoina (Molina y Moral, 2018). Aunque es un organismo comensal para el hombre, hay cepas de *E. coli* que pueden ser patógenas y causar daño. Se han reconocido a la fecha 6 grupos de *E. coli* diarreogénicas o que pueden causar diarrea, debido a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez-Angeles, 2002).

2.4.2.2. *Salmonella* spp.

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, no formadoras de esporas. Fenotípica y filogenéticamente este género representa un taxón homogéneo dentro de la familia Enterobacteriaceae dentro de la subclase delta de las proteobacterias. Está estrechamente relacionado con los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Citrobacter* (Cohen *et al.*, 1996). Los valores de similitud del ADN son elevados entre las cepas y revelan que los miembros de este género representan una sola especie, dividida en siete grupos de parentesco de ADN (grupos I, II, IIIa, IIIb, IV y VI) (Crichton y Old, 1990). Se conocen más de dos mil quinientos serotipos diferentes (Popa y Papa, 2021).

2.5. Mecanismos de patogenicidad.

2.5.1. Factores de virulencia.

Un factor de virulencia es un componente o producto de un microorganismo que lo capacita para ser un patógeno (Cortés-Cortés, 2015). Los factores de virulencia bacterianos confieren muchas funciones como la capacidad de adherencia, la invasión, además de la promoción del crecimiento microbiano en el hospedero, evitando su detección y fagocitosis, así como regulando la capacidad de supervivencia intracelular (Rocha-García *et al.*, 2004). Estos factores se han agrupado en cinco clases: 1) Adhesinas, que capacitan al organismo para unirse al tejido del hospedero; 2) Invasinas, promueven que el organismo para invadir a una célula o tejido del hospedero; 3) Impedinas,

fomentan al organismo para evadir los mecanismos de defensa del hospedero; 4) Agresinas, las que causan daño directo en el hospedero, tal como lo hacen determinadas exotoxinas y enzimas; y 5) Modulinas, dañan al hospedero de forma indirecta por perturbación de la red de citocinas, como el LPS (Wilson *et al.*, 2002).

III. ANTECEDENTES

A continuación, se mencionan algunos trabajos de investigación que se han hecho con este tipo de sanitarios y los biosólidos producidos.

- Tønner-Klank *et al.* (2007), evaluaron la capacidad de los sistemas de inodoros de compostaje para reducir ciertos indicadores microbianos y patógenos. Los parámetros indicadores (tiempo de almacenamiento y temperatura) pueden sobrestimar el nivel de otras bacterias (patógenas) presentes en el material.
- Mediante PCR cuantitativa, Wéry *et al.* (2008), evaluaron el comportamiento de bacterias patógenas e indicadoras durante el tratamiento de aguas residuales urbanas y el compostaje de lodos. En general, se observaron diferencias en la supervivencia para todas las bacterias estudiadas, cuando se sometieron a la misma presión ambiental. Según los autores, esto es válido tanto para las diferencias entre indicadores y bacterias patógenas como entre bacterias patógenas. Estos resultados mostraron la dificultad de definir indicadores fiables.
- Germer *et al.* (2010), consideraron que la adición de desperdicios de alimentos y el confinamiento en cámaras, construidas con ladrillos de hormigón y tablas de madera, mejoran significativamente el proceso de compostaje. En estas condiciones, se alcanzaron temperaturas máximas de hasta 70 °C y se mantuvieron temperaturas superiores a 55 ° C durante 2 semanas. La reducción de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Salmonella senftenberg* fue muy eficiente.
- Mehl *et al.* (2011), propusieron modificar el pH con la adición de aserrín y ceniza de madera, para reducir el nivel de humedad y proporcionar carbono para la descomposición. Sin embargo, la cantidad recomendada de desecante agregado fue insuficiente para reducir la humedad al 25%,

sugerido para la destrucción de patógenos y las proporciones C/N permanecieron en el rango de las heces humanas crudas.

- Threedeach *et al.* (2012), realizaron la prueba de susceptibilidad a 31 antibióticos sobre *Escherichia coli* aislada de lixiviados de vertederos semi-aerobios y anaeróbicos. Más del 80% de las cepas de *E. coli* tenían resistencia a los antibióticos. Se encontraron porcentajes de resistencia más altos en los lixiviados de rellenos sanitarios anaeróbicos que en los semi-aeróbicos.
- Hill y Baldwin (2012), compararon los biosólidos obtenidos de los inodoros de vermicompostaje con separación de origen (SSVC) y los inodoros de compostaje microbiano de letrinas mixtas (MLMC). El producto final de los SSVS resultó tener un pH neutro, la presencia de las lombrices aumentó la calidad del abono y disminuyó la cantidad de patógenos. En cambio, el abono de los MLMC era inmaduro, alcalino, inestable y aumentó la contaminación fecal en un 274%.
- Magri y Si (2013), evaluaron los efectos higienizantes de diferentes aditivos (ceniza, concha de ostra, urea y aserrín) en diferentes proporciones para el tratamiento de heces de inodoros secos desviadores de orina, basados en la inactivación de *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, bacteriófagos MS2 y Φ X, y *Ascaris suum*. Los resultados demostraron que los principales factores de inactivación fueron la desecación, el contenido de amoníaco y el pH. De manera que, *S. enterica Typhimurium* y *E. faecalis* se afectaron por el contenido de amoníaco. El bacteriófago MS2 se inactivó con una combinación de pH neutro a alto y desecación, en tanto que la inactivación de Φ X y *A. suum* se consiguió mediante la desecación.
- Anand y Apul (2014), determinaron los factores que afectan el proceso de compostaje e identificaron a los siguientes: aireación, contenido de humedad (50–60%), temperatura (40–65 °C), proporción de carbono a nitrógeno (25–35), pH (5.5–8.0) y porosidad (35–50%).

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General:

Determinar los coliformes fecales e identificar bacterias patógenas en biosólido de baños secos composteros de Chiapas, México.

4.2. Objetivos específicos:

1. Cuantificar los coliformes fecales en muestras de composta de BSC.
2. Identificar la presencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* diarreogénica en compostas de BSC.
3. Determinar la utilidad de los abonos producidos de acuerdo a las categorías establecidas por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA).
4. Conocer la relación entre la presencia o ausencia de bacterias patógenas con el tiempo de compostaje, temperatura, humedad y pH del biosólido.

V. ZONA DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo en los municipios de Montecristo de Guerrero y Pijijiapan, Chiapas.

Montecristo de Guerrero se ubica en la Región Frailesca, entre los paralelos 15°36' y 15°46' de latitud norte y los meridianos 92°34' y 92°46' de longitud oeste. La altitud es entre 800 y 2 800 msnm.

Colinda al norte y este con el municipio de Ángel Albino Corzo; al sur y oeste con los municipios de Mapastepec y Ángel Albino Corzo. Tiene un rango de temperatura promedio de entre 14 y 24 °C, con precipitaciones de entre 2500 y 4000 mm al año.

Pijijiapan pertenece a la Región Istmo-Costa y está ubicado entre los paralelos 15°24' y 15°53' de latitud norte y los meridianos 92°50' y 93°31' de longitud oeste. La altitud es entre los 0 y 2500 msnm. Colinda al norte con los municipios de Tonalá, Villa Corzo y La Concordia; al este con los municipios de La Concordia y Mapastepec; al sur con el municipio de Mapastepec y el Océano Pacífico; al oeste con el Océano Pacífico y el municipio de Tonalá. Su rango de temperatura va de los 16 a los 30 °C en promedio y las precipitaciones son de 1500 a 4000 mm al año.

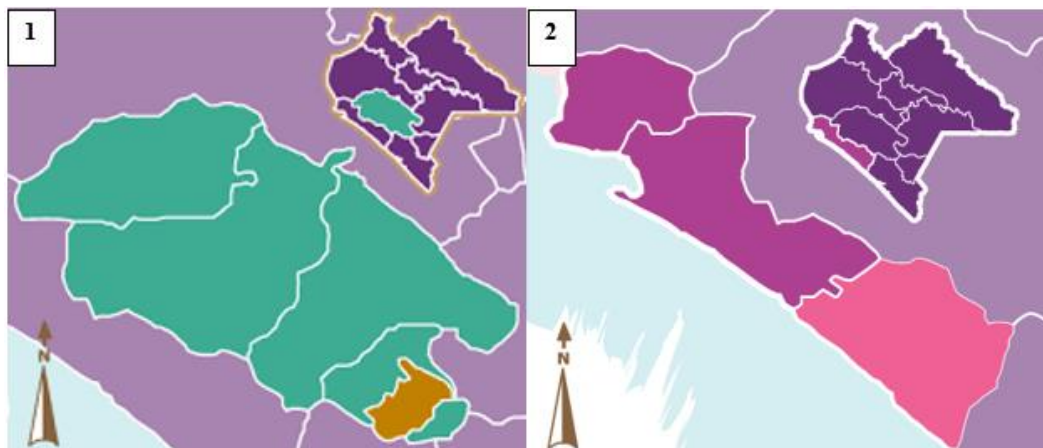


Figura 3. (1) Mapa de la ubicación del municipio de Montecristo de Guerrero, Chiapas. En verde se aprecia la región Frailesca, en color café Montecristo de Guerrero. (2) Mapa de la ubicación del municipio de Pijijiapan, Chiapas. En morado se aprecia la región Istmo-Costa y en color rosa. Pijijiapan.

VI. MÉTODOS

Obtención de muestras de composta.

Las muestras se obtuvieron en febrero y marzo de 2021, en las localidades Palenque II, Vista Alegre y Toluca pertenecientes a Montecristo de Guerrero y en la localidad El Vergel del municipio de Pijijiapan, ambos del estado de Chiapas, México. Para ello, se efectuó una encuesta a los usuarios de los BSC, mediante la que se investigó el tiempo en que el baño comenzó a ser usado, el tiempo en que se cambió la cámara de compostaje por última vez y cada cuánto se airea, el tipo de material con el que se cubren las heces y si se suele agregar otros compuestos (Ver apartado 12.3 en Anexos). Se obtuvo la georreferencia y se registró la temperatura (ver abajo). Posteriormente se colectó la muestra de composta, usando el método del cuarteo según la NOM-004-SEMARNAT-002 de la siguiente manera: se trasladó la máxima cantidad de composta a una lona limpia y extendida sobre un área plana horizontal, se depositó en montículo y se mezcló con una pala para obtener una mezcla homogénea. Se dividió en cuatro partes aproximadamente iguales (A, B, C y D) y se colectaron las partes opuestas A y C o B y D. Esta operación se repitió hasta tener aproximadamente 1 kg de biosólido por cada BSC. Dicho material se etiquetó con un número de muestra, localidad, municipio, estado; fecha y hora del cuarteo, responsable del muestreo y observaciones. Las muestras se trasladaron inmediatamente al Laboratorio de biología molecular y genética de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), se mantuvieron en refrigeración por no más de 48 h para efectuar los análisis.

Determinación de temperatura y pH en compostas.

Con una sonda térmica (BIG DADDY DIAL THERMOMETER -20 + 104 °C / 0 + 220 °F, France®), se midió la temperatura del biosólido dentro de las cámaras de compostaje. Se registró la temperatura superficial (a 10 cm) y profunda (a 24 cm).

Para medir el pH, se utilizó un potenciómetro (OAKTON®), el biosólido que se colectó en campo se trasladó al laboratorio en donde se disolvieron 30 g de la muestra de la composta en 100 mL de agua destilada.

Determinación de sólidos totales y humedad en las muestras.

Se determinaron los sólidos totales (ST) en por ciento en peso, para obtener 4 g de cada muestra. Para ello, se secaron 10 g de muestra fresca en un horno a 105°C por 16 horas y teniendo la muestra seca se realizaron los cálculos correspondientes con la siguiente ecuación:

$$\text{Sólidos totales (\%)} = [(b-c) / (a-c)] * 100$$

En donde:

a = masa en g del lodo tal como se colectó + recipiente

b = masa en g del lodo secado en horno + recipiente

c = masa en g del recipiente

La diferencia entre el peso de la muestra húmeda y de su peso seco representa la cantidad de agua que contenía (NOM-004-SEMARNAT-002).

.

Diluciones para coliformes fecales.

Se hicieron diluciones decimales seriadas, partiendo de 10⁻¹ (mezclando X g de materia fresca correspondientes a 4 g de sólidos totales en 36 mL de agua de dilución) hasta 10⁻⁴. Todas las diluciones se hicieron por triplicado. Las muestras diluidas se agitaron 25 veces por 7 segundos, haciendo un arco con la muñeca de 30 cm de arriba abajo o con un sistema de agitación para proporcionar resultados equivalentes (NOM-002-SEMARNAT-002).

Determinación de coliformes fecales.

1. Prueba presuntiva con caldo lauril triptosa o caldo lactosado

Se transfirió 1 mL de las diluciones hechas a cada una de las series de tubos correspondientes conteniendo el caldo lauril o caldo lactosado y se incubaron a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24-48 h. La acidificación, con o sin producción de gas (cambio de coloración de púrpura a amarillo) indicó una prueba presuntiva positiva de la presencia de bacterias del grupo coliformes. En ausencia de la acidificación del medio, se consideró que la prueba fue negativa (NOM-002-SEMARNAT-002).

2. Prueba confirmatoria (Medio EC).

Se transfirió 1 mL de las diluciones hechas a cada una de las series de tubos correspondientes conteniendo el caldo EC y se incubaron a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Un resultado positivo se registró cuando hubo producción de gas a partir de la fermentación de la lactosa contenida en el medio EC. Los tubos sin formación de gas se desecharon (NOM-002-SEMARNAT-002).

3. Aislamiento de *E. coli* en agar MacConkey y pruebas bioquímicas

A partir de los medios de prueba presuntiva positiva, se hicieron resiembras en agar MacConkey con la técnica de estría cruzada. Se incubaron a $37^{\circ}\text{C}/24\text{ h}$ y se buscaron colonias sugestivas de *E. coli* (forma circular, secas, de coloración rosa mexicano). El perfil bioquímico de las colonias sugestivas de esta bacteria se analizó en cuanto a la descarboxilación de la lisina, producción de indol, sin producción de ácido sulfhídrico (agar de hierro y lisina) y tampoco utilización del citrato como fuente de carbono (agar Citrato de Simmons).

Cálculos del NMP (número más probable).

La densidad de los coliformes fecales se expresa como el número más probable (NMP) de coliformes por g de materia seca o ST (sólidos totales), de acuerdo al cuadro de referencia (Anexos 12.4). Dado que las diluciones se hicieron por triplicado, el NMP de coliformes fecales se obtuvo a partir de un código compuesto por tres dígitos que resultan del número de tubos con una reacción positiva en el medio EC en las tres series consecutivas. Con el código se pudo buscar el índice de coliformes en los cuadros que se muestran en el Anexo 12.4 y calcular valor del NMP correspondiente, a través de la siguiente fórmula:

$$\text{NMP} = (\text{NMP de tablas}) \times (10/\text{mayor volumen inoculado})$$

Por ejemplo: en el medio EC se obtiene que los 3 tubos tienen reacción positiva en la serie de la dilución 0.01; para la serie de la dilución 0.001 son 2 los tubos con reacción positiva y solo 1 tubo para la serie de la dilución 0.0001.

El código es de 3, 2, 1, por lo que, de acuerdo al cuadro, el índice de coliformes es de 150, por lo que el resultado será:

$$\text{NMP/g ST} = (150) \times (10/0,01) = 150\ 000$$

NMP/g ST=1,5 x10⁵ coliformes fecales (NOM-002-SEMARNAT-002).

Diluciones para Salmonella spp.

Se prepararon diluciones decimales seriadas, partiendo de 10⁻¹ (mezclando X g de materia fresca correspondientes a 4 g de sólidos totales en 36 mL de caldo tetracionato) hasta 10⁻⁴. Todas las diluciones se hicieron por triplicado como en las diluciones para coliformes fecales y la técnica agitación de los tubos fue como se describió anteriormente (NOM-002-SEMARNAT-002).

Determinación de Salmonella spp.

1. Prueba presuntiva (caldo Selenito cistina)

Se transfirió 1 mL de las diluciones hechas en caldo de tetracionato a cada una de las series de tubos correspondientes conteniendo el caldo selenito cistina y se incubaron por 24 ± 2 horas a 41°C ± 0.2 °C. Luego del tiempo de incubación se observó el virado de coloración, considerando un color anaranjado intenso como positivo de la prueba correspondiente (NOM-002-SEMARNAT-002).

2. Prueba confirmatoria.

A partir de las pruebas presuntivas positivas en caldo Selenito cistina, se hicieron resiembras en agar SS por estría cruzada y se incubaron a 37° C/24 h. Posteriormente se buscaron colonias sugestivas de Salmonella, cuyo fenotipo son colonias transparentes con centro negro (NOM-002-SEMARNAT-002).

El cálculo del NMP se llevó a cabo con los tubos que tuvieron una reacción positiva en los caldos selenito cistina, el procedimiento fue el mismo que el de los coliformes fecales (NOM-002-SEMARNAT-002).

Clasificación de los abonos de acuerdo a los estándares de la USEPA.

Con base en lo establecido por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, los biosólidos que contenían cantidades menores a 1,000 NMP de coliformes fecales por gramo se catalogaron en el tipo A. Esto indica que la composta es segura, ya que contiene un nivel de patógenos reducido y que el abono puede ser usado en plantas alimentarias (US EPA, 1994). En la categoría B, los abonos se pueden emplear solamente en plantas ornamentales y los niveles del NMP de coliformes fecales deben ser menores a 2, 000,000/g (US EPA, 1994).

Identificación de *E. coli* diarregénica por PCR.

A partir de las colonias aisladas de las muestras de composta e identificadas como *E. coli*, se buscaron genes de virulencia típicos de *E. coli* diarregénica mediante PCR múltiple. Para ello, se hizo un lisado celular con tres colonias aisladas y se transfirieron a 1 mL de agua grado biología molecular, estéril y se sometieron a baño maría en ebullición, por un minuto. Las reacciones se ajustaron a un volúmen final de 15 microlitros, conteniendo 7.5 microlitros de la mezcla de GoTaq® Green Master mix (Promega), 2 microlitros de la mezcla de los primers (Forward y Revers, Integrated DNA Technologies, IDT®) (Véase Cuadro 1), 1 microlitro del lisado bacteriano y 4.5 microlitros de agua libre de nucleasa (Promega). Las reacciones se colocaron en un termociclador (Eppendorf) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 50 °C (1 ciclo, 2 min), 95 °C (1 ciclo, 5 min), 95, 50 y 72 °C (40 ciclos, 45 seg. cada temperatura) y extensión final a 72 °C (1 ciclo, 10 min) (López-Saucedo *et al.*, 2003). Para la identificación de *E. coli* enteroagregativa se se empleó el gen *app* como marcador y las condiciones de reacción fueron: desnaturalización inicial a 50 °C (1 ciclo, 2 min), 95 °C (1 ciclo, 5 min), 95, 55 y 72 °C (40 ciclos, 45 seg.

para cada temperatura) y la extensión final a 72 °C (1 ciclo, 10 min) (Cerna *et al.*, 2003).

Las cepas usadas como control positivo fueron: EIEC E11, ETEC H10407 (O78:H11), EAEC 042, EPEC E2348/69 (O127:H6) y EHEC EDL933 (O157:H7); como control negativo: *E. coli* ATCC 25922; todas ellas del cepario del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH (Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2015).

Los amplicones se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, usando TBE al 0.5x como solución tampón. Como marcador de peso molecular se usó la escalera de 100 pares de bases (pb, Invitrogen®), los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) por 20 min; las imágenes se documentaron en un transiluminador de luz UV (Enduro™ GDS®). Se consideraron positivas aquellas muestras que exhibieron bandas del mismo peso molecular que las de las cepas de *E. coli* control.

Cuadro 1. Primers utilizados en la PCR. Se muestran las secuencias a las que se alinean el Forward (F) y el Reverse (R).

| Variante de <i>E. coli</i> | Iniciadores (Primers) | Secuencia (5´-3´) | Tamaño de amplicón (pb) |
|----------------------------|-----------------------|---|-------------------------|
| EAEC | <i>aap</i> | F: CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG R: AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC | 310 |
| EPEC | <i>bfpA</i> | F: AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC R: GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA | 324 |
| STEC | <i>stx1</i> | F: CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT R: AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC | 150 |
| EIEC | <i>ial</i> | F: GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA R: GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC | 650 |
| ETEC | <i>lt</i> | F: GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC R: CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT | 450 |
| | <i>st</i> | F: ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T R: CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT | 190 |

Análisis estadístico.

Los datos de temperatura, pH, coliformes fecales se registraron en una base de datos en Excel® y se analizaron con estadística descriptiva (media, mediana, desviación estándar). La normalidad de los datos se analizó con la prueba de Shapiro-Wilk. Para conocer si existe una diferencia significativa entre las medias de los datos analizados para los biosólidos de cada municipio se empleó la prueba T de student para datos normales y la prueba de U-Mann Whitney para los no normales. El valor de significancia estadística se estableció cuando $p \leq 0.05$. También se hicieron regresiones lineales entre las variables temperatura, pH, humedad y la cantidad de coliformes en las muestras. Todos los análisis se hicieron con el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS statistics) versión 25.

VII. RESULTADOS

Se colectaron un total de ocho muestras de composta. Cinco de ellas (62.5%) fueron de BSC de Montecristo de Guerrero, específicamente en las localidades de Palenque II, Vista Alegre y Toluca. Las tres muestras de composta restantes (37.5%), se obtuvieron del ejido El Vergel en Pijijiapan, Chiapas.

7.1. Análisis de las encuestas realizadas.

En los BSC de Pijijiapan, al menos 5 personas son usuarios de esta ecotecnia, en tanto que en los de Montecristo de Guerrero, el promedio de usuarios fue tres; dichas diferencias no fueron significativas. En ambos casos, en el momento de la toma de muestras, el tiempo que permanecieron los biosólidos fueron de al menos 6 meses (Cuadros 2 y 3); el 62.5% de las compostas se airean por lo menos una vez cada tres meses. En todas las compostas, la tierra negra es el principal material para cubrir las heces, sin embargo, en algunas se agregan otros materiales como hojarasca (25%), broza de café (37.5%) y aserrín (12.5%); en el 50% de las compostas se ha agregado cal o ceniza (aunque no se especificó la cantidad que se añade). Respecto a los malos olores percibidos por los usuarios, han ocurrido en el 25% de los baños, no obstante, se mencionó que lo notaron durante las lluvias y cuando en época de calor. La temperatura de las compostas de Pijijiapan fue mayor significativamente con respecto a las de Montecristo de Guerrero, en tanto que el pH y humedad de las muestras fue mayor en las procedentes de Pijijiapan, aunque dichas diferencias no fueron significativas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de los factores evaluados en las muestras de composta obtenidos en ambas regiones.

| Factor | Montecristo de Guerrero, Chiapas. | Pijijiapan, Chiapas | Valor de P |
|---|--|----------------------------|-------------------|
| Número de usuarios Media (\pm DE) | 3.4 (\pm 1.14) | 5.3 (\pm 2.51) | 0.314 |
| Tiempo de uso del BSC desde su habilitación (meses) Media (\pm DE) | 33.4 (\pm 24.3) | 20 (\pm 6.9) | 0.761 |
| Tiempo de compostaje (meses) Media (\pm DE) | 7.4 (\pm 3.8) | 6.3 (\pm 0.57) | 0.573 |
| Temperatura superficial (a 10 cm) de la composta ($^{\circ}$ C) Media (\pm DE) | 18.8 (\pm 1.78) | 26.3 (\pm 0.57) | 0.016* |
| Temperatura profunda (a 24 cm) de la composta ($^{\circ}$ C) Media (\pm DE) | 20.6 (\pm 0.89) | 27.6 (\pm 0.57) | 0.021* |
| pH de la composta Media (\pm DE) | 7.37 (\pm 1.24) | 8.53 (\pm 2.36) | 0.495 |
| Humedad (%) Media (\pm DE) | 27.152 (\pm 21.06) | 39.1 (\pm 7.45) | 0.297 |

7.2. Comparación de las variables independientes por composta y de las medias estadísticas de cada posible factor involucrado en la presencia/ausencia de bacterias.

En el Cuadro 3 se muestran los valores de temperatura tomadas en campo; la variación entre la temperatura superficial y profunda no representa una diferencia en la composición microbiana de ambos estratos. También se observan los valores de pH con un mínimo de 5.64 (composta 3) y un máximo de 10.17 (composta 6), siendo el rango de 4.53. La humedad fue mayor en la composta 5 (55.39%), mientras que en la composta 4 se registró el valor mínimo (9.68%). La media y desviación estándar de estos factores se reportan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Ubicación de los BSC muestreados, tiempo de compostaje y factores fisicoquímicos de cada composta.

| Municipio | Localidad | ID de muestra | Tiempo de compostaje | Temperatura (°C) | | pH | Humedad (%) |
|-------------------------|--------------|---------------|----------------------|---------------------|------------------|-------|-------------|
| | | | | Superficial (10 cm) | Profunda (24 cm) | | |
| Montecristo de Guerrero | Palenque II | M1 | 7 meses | 18 | 20 | 6.54 | 12.07 |
| | Palenque II | M2 | 2 meses | 22 | 22 | 8.34 | 14.56 |
| | Palenque II | M3 | 10 meses | 18 | 21 | 5.64 | 44.06 |
| | Toluca | M4 | 6 meses | 18 | 20 | 7.76 | 9.68 |
| | Vista Alegre | M5 | 12 meses | 18 | 20 | 8.57 | 55.39 |
| Pijijiapan | El Vergel | P6 | 6 meses | 26 | 28 | 10.17 | 33.68 |

| | | | | | | | |
|--|-----------|----|---------|----|----|------|-------|
| | El Vergel | P7 | 7 meses | 27 | 27 | 9.6 | 47.60 |
| | El Vergel | P8 | 6 meses | 26 | 28 | 5.82 | 36.02 |

7.3. Cuantificación de coliformes fecales y clasificación de la composta de acuerdo a la Agencia de protección ambiental de Estados Unidos (US EPA).

De acuerdo a la clasificación de esta agencia americana, los abonos producidos se clasifican en: aquellos que pueden usarse para cultivos alimentarios (A) y en los que únicamente pueden ser aprovechados por plantas ornamentales (B). De acuerdo a este criterio, más de la mitad de las compostas analizadas se clasificaron como del tipo B, es decir, superaron los 1000 NMP de coliformes fecales/g de sólidos totales (Cuadro 4 y Figura 4).

Cuadro 4. Clasificación de los abonos según la US EPA (1994).

| ID de muestra | Localidad | NMP/g de muestra | Bacteria identificada | Categoría según la USEPA |
|---------------|--------------|------------------|--|--------------------------|
| M1 | Palenque II | 1,500 | <i>E. coli</i> | B |
| M2 | Palenque II | 15,000 | <i>E. coli</i> <i>Klebsiella sp.</i> | B |
| M3 | Palenque II | 2,000 | <i>E. coli</i> <i>Klebsiella sp.</i> | B |
| M4 | Vista Alegre | 0 | Ninguna | A |
| M5 | Toluca | 240,000 | <i>E. coli</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | B |
| P6 | El Vergel | 0 | Ninguna | A |
| P7 | El Vergel | 24,000 | <i>Klebsiella sp.</i> | B |
| P8 | El Vergel | 900 | <i>E. coli</i> | A |

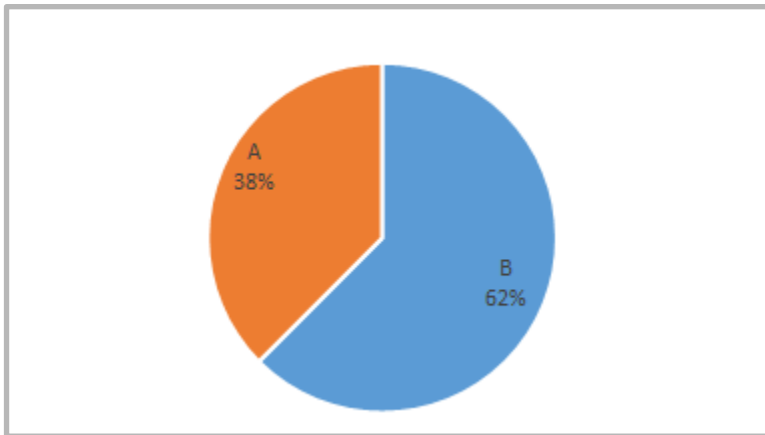


Figura 4. Proporción de compostas de acuerdo a las categorías “A” y “B” que se establecen en la US EPA.

Respecto a la investigación de cepas de *Salmonella*, no se registró crecimiento en los caldos de Selenito Cistina, por lo que entre las muestras analizadas no se recuperó este tipo de bacilo Gramnegativo.

7.4. Búsqueda y aislamiento de bacilos Gramnegativos.

De la resiembra de bacterias a partir de los caldos E.C. y Lauril en medios selectivos-diferenciales (MacConkey y Salmonella Shigella), se recuperaron bacilos Gramnegativos, siendo *E. coli* la bacteria más frecuente, presente en el 62.5% de las compostas, seguido de *Klebsiella* sp. (50% de las muestras) y *Pseudomonas aeruginosa* (12.5%) (Fig. 5).

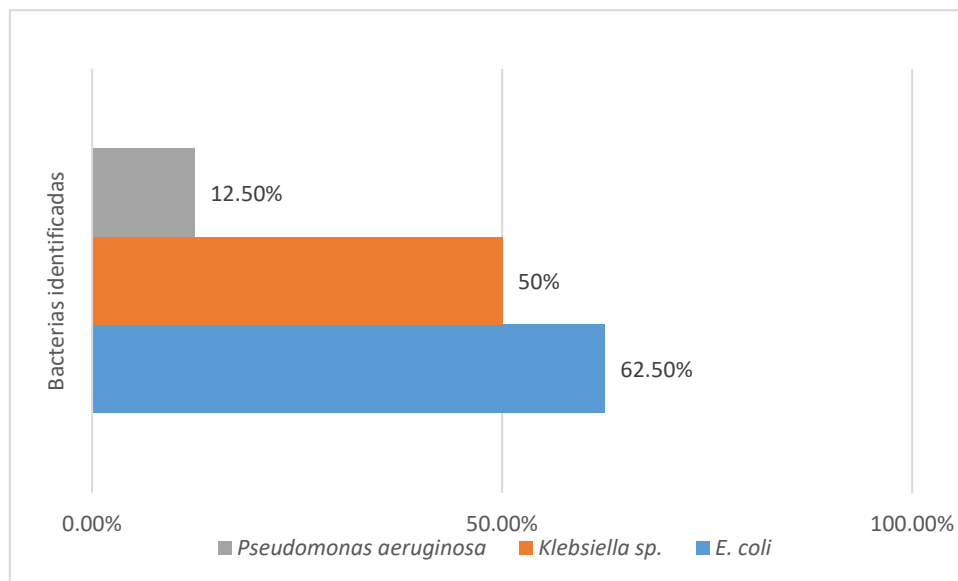


Figura 5. Proporción de bacterias halladas en las compostas muestreadas en ambas localidades.

Se aislaron 6 cepas de *E. coli* y el análisis de genes de virulencia en las cepas (4 de Montecristo de Guerrero y 1 de Pijijiapan), reveló que dos de las recuperadas de Montecristo (M1S3L2 y M2S1L2) contenían el gen de virulencia *aap*, en tanto que también se detectó dicho gen en una cepa de *E. coli* aislada de una muestra de composta de Pijijiapan (P8S2L2; Figura 6). No se visualizó la presencia de los otros genes buscados en este estudio.

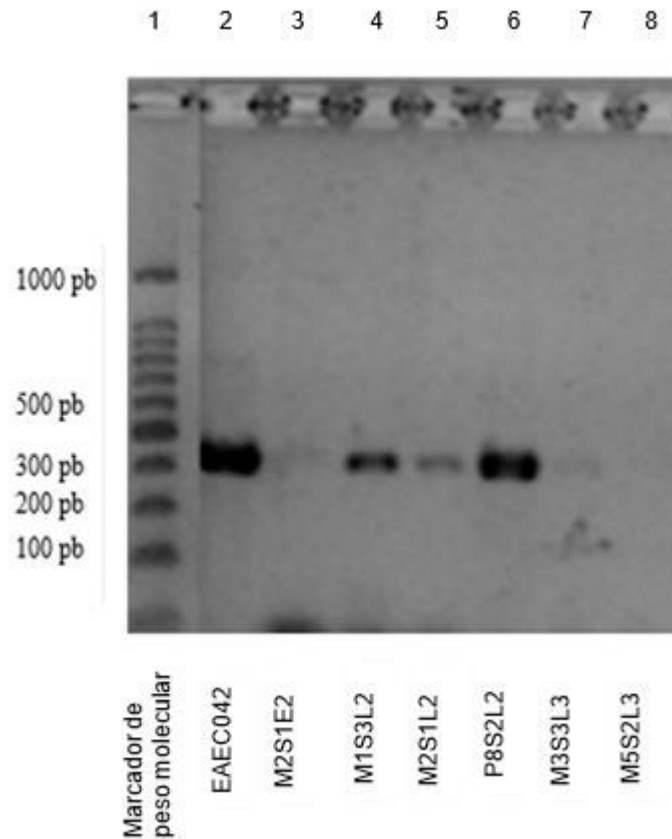
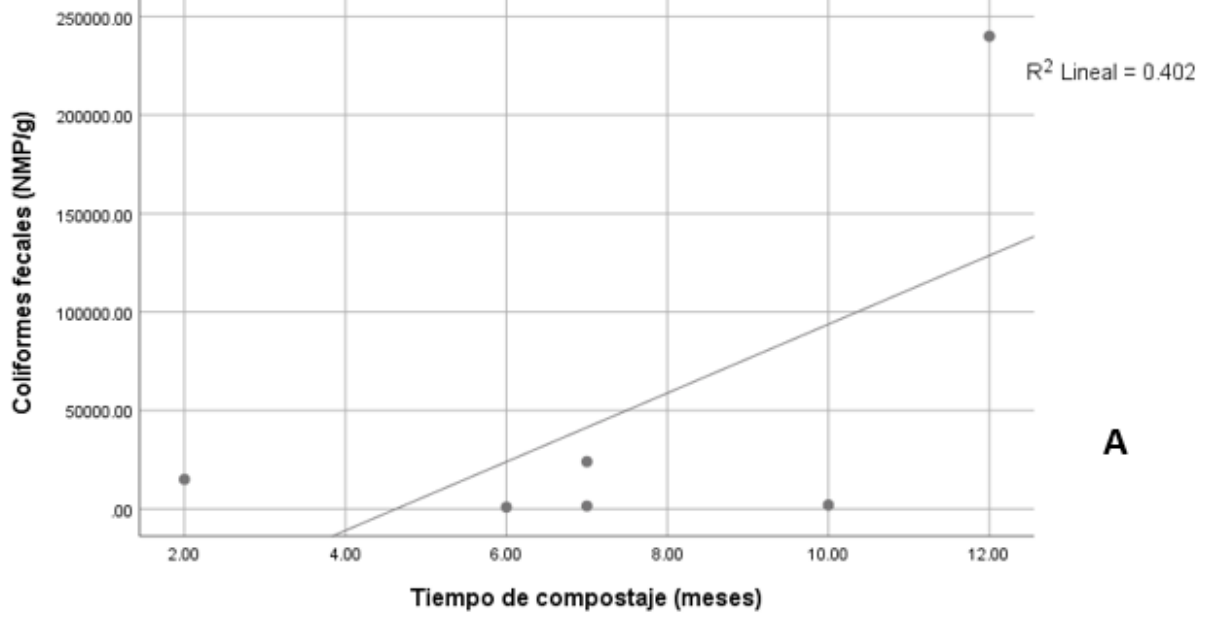


Figura 6. Carril: 1, MPM de 100 pb; 2, gen *aap* de cepa control EAEC 042; 3, 7 y 8, cepas de *E. coli* M2S1E2, M3S3L3 y M5S2L3 respectivamente, sin el gen *aap*. Los carriles 4, 5 y 6 mostraron a las cepas con el gen *aap* (M1S3L2, M2S1L2 y P8S2L2).

7.5. Relación entre la cantidad de coliformes y otras variables.

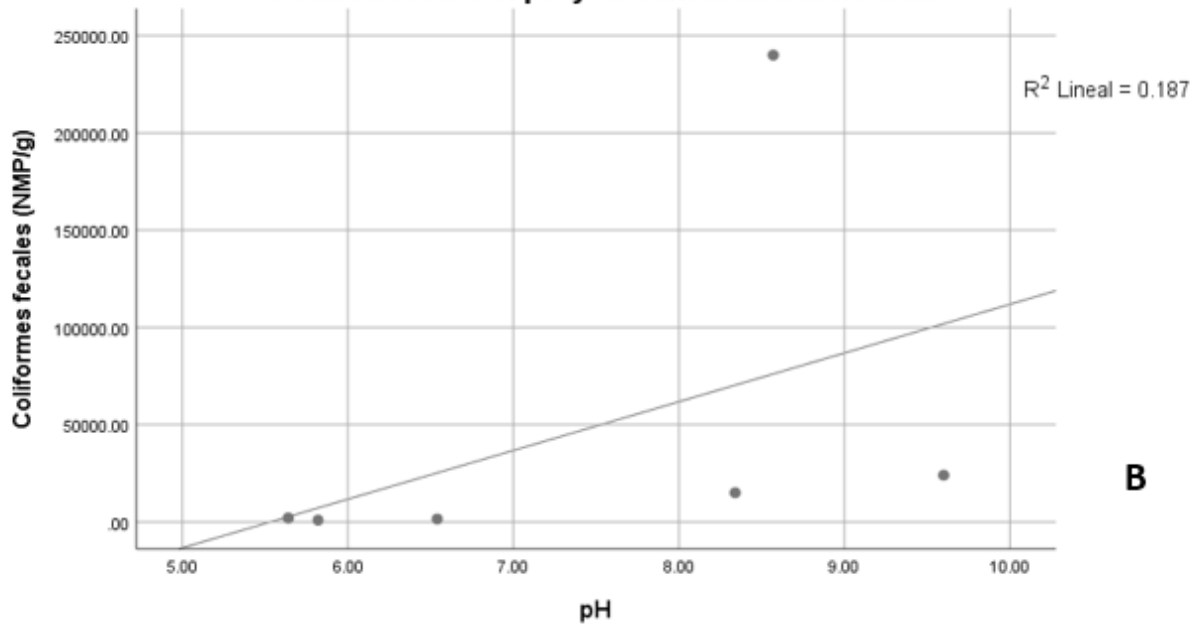
El análisis de regresión lineal mostró una tendencia en el sentido de que, a mayor tiempo de compostaje, hubo una mayor cantidad de coliformes (Figura 8-A). De manera similar, se observó este comportamiento entre la cantidad de coliformes fecales con el pH y la humedad (Fig. 8-B y 8-C, respectivamente). Una tendencia inversa se observó entre la cantidad de usuarios del baño seco y los valores de temperatura, con la cantidad de coliformes (Figuras 8-D, 8-E y 8-F). El análisis mediante regresión lineal no reveló una relación positiva o negativa significativa entre las variables antes mencionadas y la cantidad de coliformes. Sin embargo, se encontró una correlación positiva, fuerte ($P=0.003$), entre el tiempo de uso del baño seco desde su habilitación y el número de coliformes fecales (Fig. 8-G).

Relación entre el tiempo de compostaje y la densidad bacteriana.



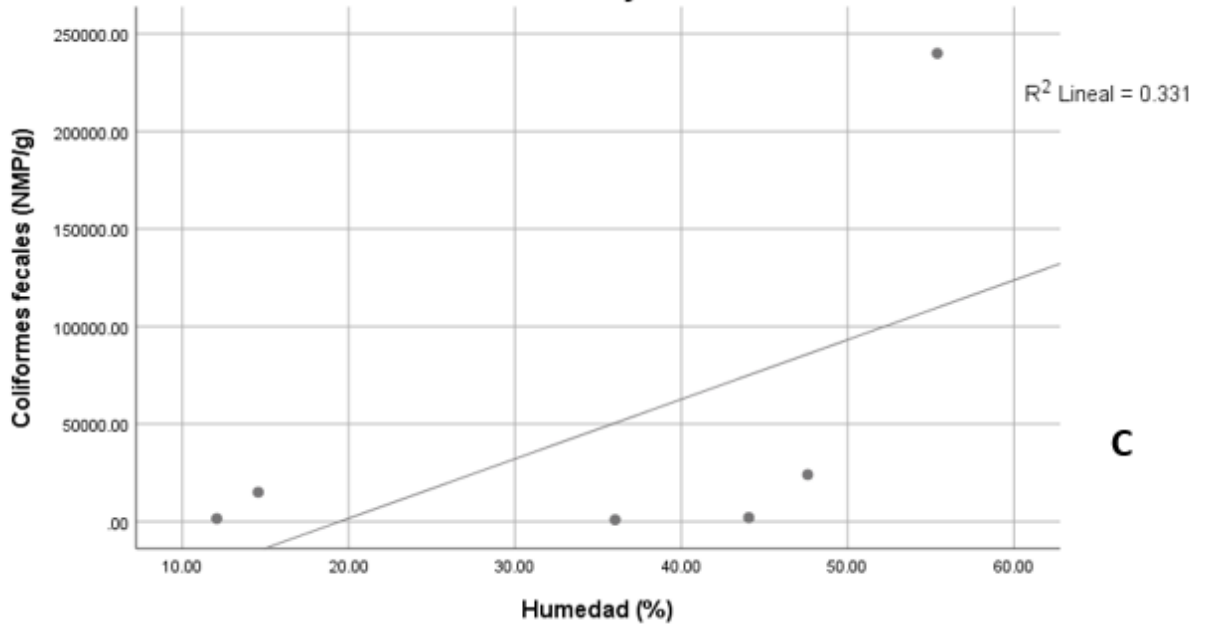
A

Relación entre el pH y la densidad bacteriana.



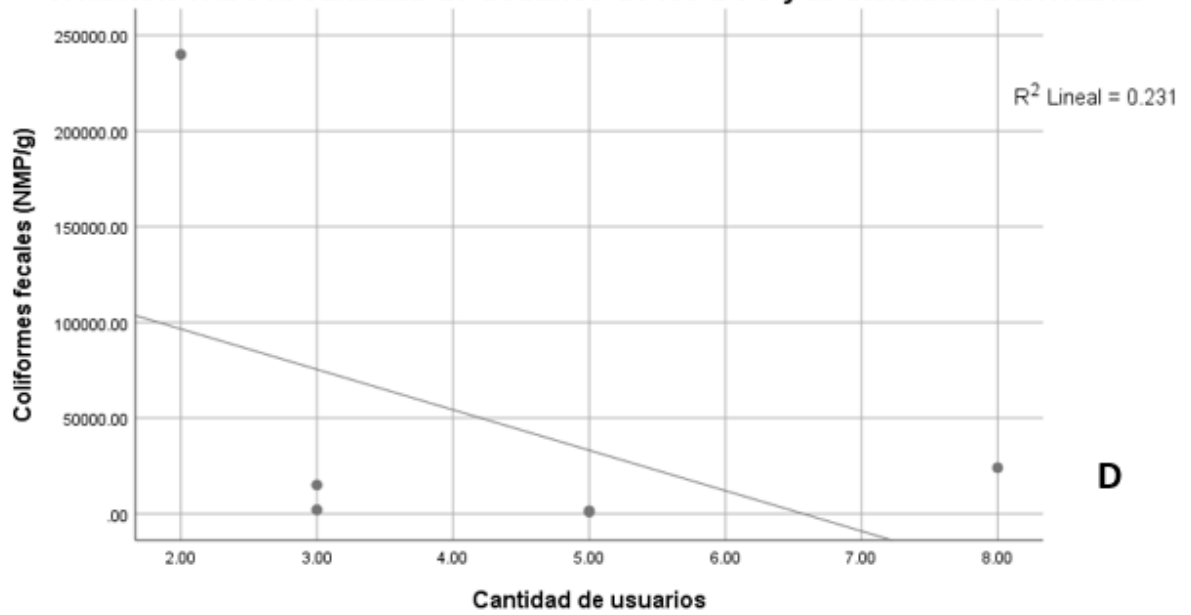
B

Relación entre la humedad y la densidad bacteriana.



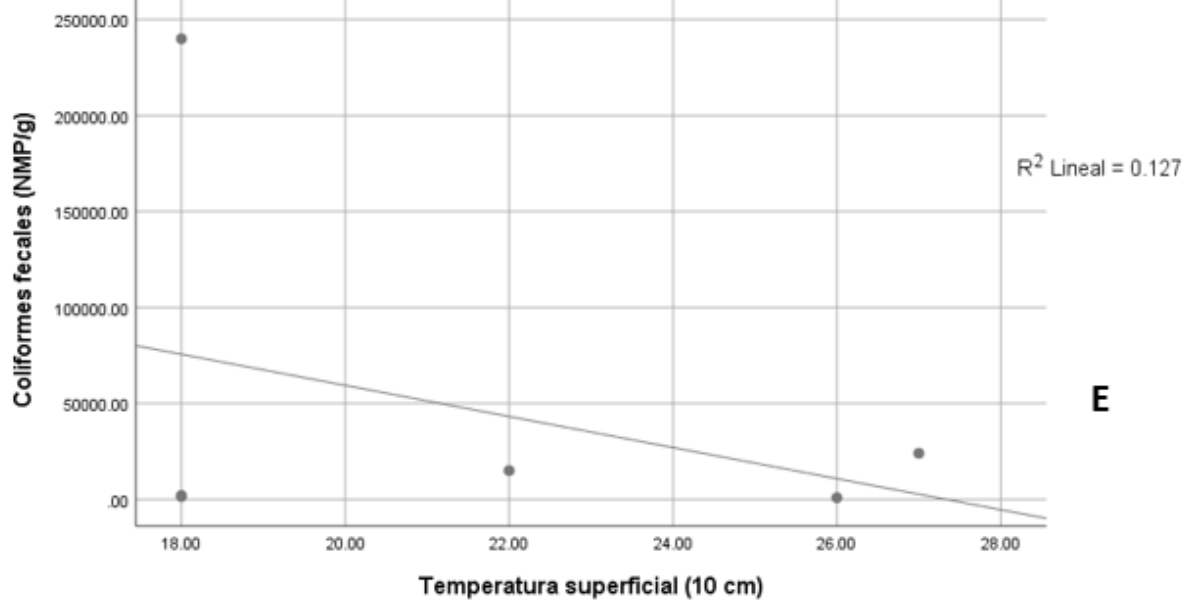
C

Relación entre la cantidad de usuarios de los BSC y la densidad bacteriana.

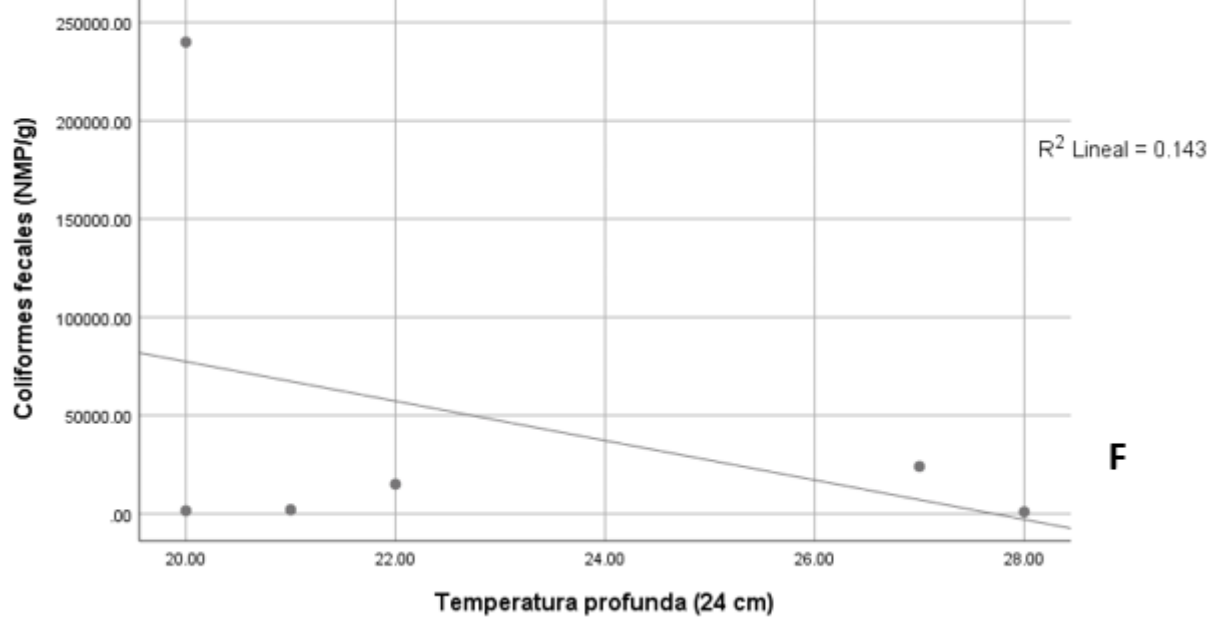


D

Relación entre la temperatura superficial y la densidad bacteriana.



Relación entre la temperatura profunda y la densidad bacteriana.



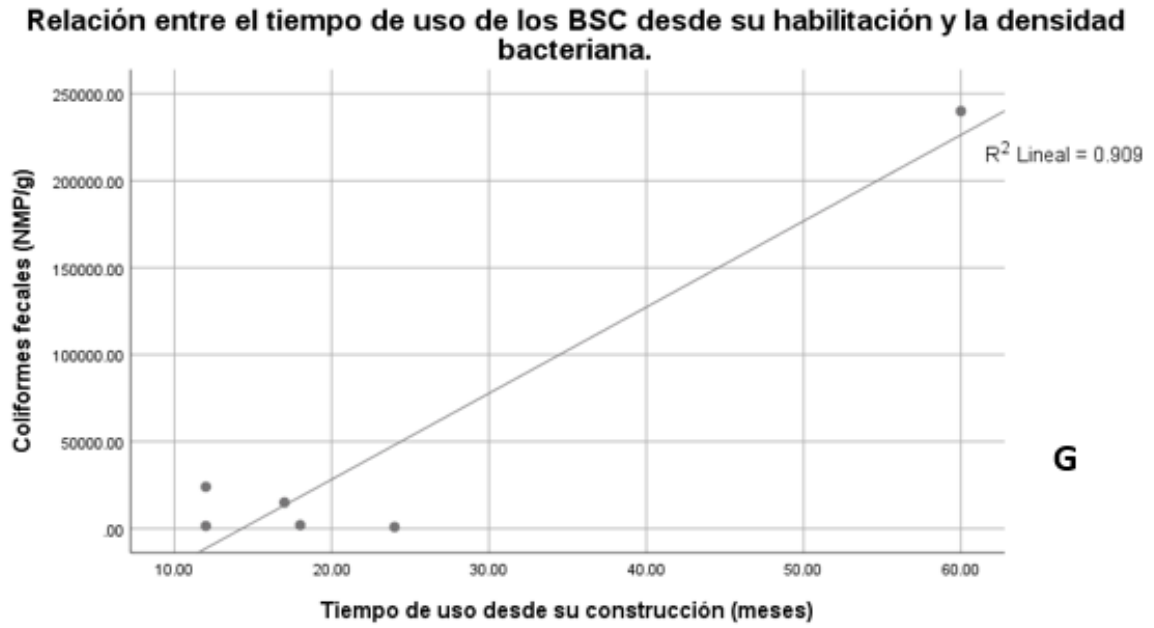


Figura 7. Dispersión simple del número de coliformes fecales por A) el tiempo de compostaje, B) el pH, C) la humedad, D) la cantidad de usuarios, E) la temperatura superficial, F) la temperatura profunda y G) el tiempo de uso del baño seco desde que se comenzó a utilizar a partir de su habilitación.

VIII. DISCUSIÓN

La constante búsqueda de alternativas que respondan a problemáticas sociales y ambientales siempre ha sido de suma importancia, ya que la demanda de los recursos naturales va en aumento con la sobrepoblación. El agua es un recurso relativamente escaso, en México se prioriza el abastecimiento de agua a la industria, a la agricultura de exportación y a las grandes urbes, dejando en el rezago a ciudades de menor tamaño y zonas rurales (Zárate-Toledo, 2017). Chiapas es uno de los estados que cuenta con una media superior al promedio nacional en la captación de agua, esto debido a que es territorio de bosques de niebla y las precipitaciones son en mayor cantidad (Consejo Consultivo del Agua A.C, n.d.). Además, se encuentran dos de las regiones hidrográficas más importantes para el país, La Costa y Grijalva-Usumacinta. Aun así, el 70% de la población no cuenta con agua potable y saneamiento (Rondón-Sulbarán *et al.*, 2021).

La práctica del saneamiento seco no es nueva y ha sido impulsada para: 1) satisfacer una necesidad básica con la que muchas personas no cuentan, 2) reducir el impacto ambiental negativo en los recursos hídricos. En este sentido, se han llevado a cabo investigaciones en diferentes partes del mundo (Rumania, Sudáfrica, Reino Unido, México) evaluando que sea una práctica segura para la salud humana y del ambiente (Rautanen y Viskari, 2006).

En el presente estudio, de tipo transversal en el fenómeno del proceso de compostaje, se analizaron muestras de este tipo de biosólidos en fase de maduración, puesto que fueron colectadas con más de tres meses (Arce, 2014; Román *et al.*, 2013). Además, se compararon las medias estadísticas de diferentes factores que pueden afectar la cantidad de coliformes fecales. Por ello, se agruparon las muestras de Montecristo de Guerrero y se compararon con las muestras de Pijijiapan, esto para asegurar que hubiese una igualdad entre todas las compostas producidas mediante el uso del baño seco. En el cuadro 3 se observan los resultados de dichos análisis y como se esperaba, no hubo una diferencia significativa entre la mayoría de las variables, con excepción de las temperaturas superficial ($P= 0.016$) y profunda ($P= 0.021$). Dicha diferencia

puede deberse a que en la fase de maduración las temperaturas de las compostas son similares a las temperaturas ambientales (externas a la composta), no obstante, esta diferencia entre las temperaturas no afecta en la presencia o ausencia de bacterias o en la diversidad que pueda encontrarse en ellas, ya que las bacterias denominadas mesófilas pueden desarrollarse en un rango amplio de temperaturas (15-46 °C) (Molina y Moral, 2018).

En dos de las muestras analizadas (M4 y P6; ver cuadro 2), el valor del NMP de coliformes fue cero. Se observó que en la muestra M4 el porcentaje de humedad registrado fue el menor (9.68%), comparado con el resto de las muestras. Tratándose de una composta con baja humedad es probable que las bacterias se hayan desecado o que la falta de agua impida la actividad metabólica de las mismas. Redlinger *et al.* (2001), analizaron 90 muestras a los 3 y 6 meses de compostaje, observando una relación entre la densidad de coliformes y bajos niveles de humedad, por la exposición solar, provocando la desecación de las bacterias.

Por otro lado, la composta P6 mostró un valor de pH superior a todas las demás (10.17), lo que probablemente explique la razón de no aislar bacterias en dicha muestra, dado que las bacterias coliformes fecales toleran un rango de pH de 4.4 a 9 (Moreno-Márquez, 2006). De manera similar, la muestra P7 tuvo un pH de 9.6 (Cuadro 2), por lo que tampoco hubo crecimiento de este tipo de bacterias (Figura 6), sin embargo, se aisló a *Pseudomonas aeruginosa*, de la cual se ha documentado que tiene mayor capacidad de resistencia al pH elevado (Torres-Kam, 1991).

La composta con mayor cantidad de coliformes fecales fue la muestra M5, que a pesar de haber tenido 12 meses almacenada en la cámara, fue la que tuvo mayor humedad (55.39%). Cabe mencionar que las compostas con mayor humedad (muestras M5 y P7, cuadro 2) fueron las que presentaron además un olor desagradable.

En la mayoría de las muestras de compostas (75%) se registró un porcentaje de humedad por debajo de los valores óptimos para iniciar el proceso de compostaje, que va del 45 al 60% (Roman *et al.*, 2013), aunque esto dependerá de la materia orgánica que se agregue (Félix Herrán *et al.*, 2010), ya que

materiales como el aserrín, las hojas secas o la paja, pueden aumentar la aireación y reducir la humedad. Esto es importante, porque las bacterias requieren de una humedad mayor a la encontrada en las compostas para desarrollarse de manera óptima en las fases iniciales, sin embargo, en la fase de maduración es prescindible (Roman *et al.*, 2013).

La aireación de las compostas se puede estimar de manera indirecta mediante el valor de pH. De acuerdo a Bohórquez-Santana (2019), durante el compostaje los valores de pH menores a 7 pueden indicar una falta de aireación, ya que en condiciones anaeróbicas los microorganismos producen ácidos orgánicos.

Respecto a los géneros bacterianos recuperados (Figura 5), tales como *E. coli* y *Klebsiella*, éstos pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y son constituyentes de la microbiota intestinal del humano (Amor-Espín, 2015). Hasta cierto punto, la presencia de estas bacterias en las muestras de composta puede considerarse normal, aunque a ciertos niveles, pueden indicar infecciones (Saborido *et al.*, 2014). También se aisló *Pseudomonas aeruginosa*, este bacilo pertenece a la familia Pseudomonadaceae y su origen puede ser tanto del suelo, agua y es oportunista de animales y plantas (Marchand-Pajares, 2002). Así, su presencia pudo obedecer a material vegetal que se agregó a la muestra de composta para cubrir las heces. La detección de estas bacterias puede indicar que no se alcanzan temperaturas tan elevadas o que estas recolonizan en las fases de enfriamiento o maduración (Herrera-Ortíz *et al.*, 2015).

Moreno-Casco y Herrera (2008), mencionan que no solo es suficiente con alcanzar temperaturas superiores a 50 °C, sino que esta debe mantenerse por al menos tres días para la disminución de las bacterias. Además, los mismos autores infieren que la temperatura es el factor determinante para la eliminación de patógenos y que el término “eliminación” de patógenos hace referencia a una disminución en la carga de microorganismos a tal punto que sean cantidades por debajo del límite de detección de la prueba que se usa para tal fin.

Otros autores, mencionan que la humedad es el principal factor a controlar en el compostaje, ya que si se controla la humedad, también se controlarán la temperatura y el pH (Haug, 2018; Madejón *et al.*, 2002). Por lo que, para obtener

un abono de calidad y libre de patógenos se debe monitorear que se cumplan las condiciones óptimas en cada fase del proceso.

Para este trabajo se tomó como referencia el criterio establecido por la USEPA para la clasificación de los abonos, es decir, después de la cuantificación de coliformes se consiguió determinar el posible uso del producto final. Sin embargo, existen otros estándares internacionales, como la Agencia Ambiental de Reino Unido y EAS del Banco Mundial que utilizan otros métodos para determinar y cuantificar coliformes (Environment Agency UK, 2003; “Estándares Ambientales y Sociales (EAS),” n.d.).

En cuanto a los resultados de la PCR, estos mostraron la presencia de un solo tipo de *E. coli* diarreogénica, la *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Figura 6).

De forma paralela a este trabajo, se hicieron coprocultivos a los usuarios de esta ecotecnia. Los resultados mostraron que el patotipo EAEC fue el más frecuente con respecto a otros patotipos de *E. coli* diarreogénica, incluso se identificó este patotipo tanto en los usuarios y en la composta analizada en este estudio, por lo que se puede inferir que este tipo de patógeno presente en los usuarios, resistió las variaciones ambientales dentro de la cámara de compostaje y no se cumplieron las condiciones necesarias para su eliminación. Fane *et al.*, (2021) demostraron que para la eliminación de *E. coli* es crítico el control de la temperatura, manteniendo la temperatura a $>25^{\circ}\text{C}$ por 28 días y consiguieron una reducción significativa de esta bacteria.

En la búsqueda de factores determinantes en la presencia o ausencia de bacterias en las compostas maduras, se hicieron las correlaciones univariadas que se observan en la figura 7. Sin embargo, no se observó una relación significativa, con excepción del tiempo de habilitación del baño seco y la cantidad de coliformes (Figura 7-G), lo que reafirma la posibilidad de recolonización de las bacterias. De igual manera, se observó que los BSC con un tiempo de compostaje de 6 meses eran los que presentaban una menor o nula cantidad de bacterias (Cuadros 3 y 4).

Dado que la implementación de esta ecotecnia suple una necesidad básica en comunidades rurales (por ahora), y en donde la principal actividad económica es la agricultura, el tipo de producto emanado de dicha ecotecnia puede ser útil. Por ello, es necesario que se procure una calidad de abono o se le dé seguimiento en el tratamiento para su uso; en el caso que se presenta en este estudio, es necesario implementar un proceso adicional de tratamiento de los biosólidos generados, a fin de usarlos o reintegrarlos a los suelos libre de patógenos. Lo anterior para ir en concordancia con que entre mayor sea la cantidad de abonos de clase A, se disminuye considerablemente el riesgo de propagación de enfermedades y contaminación fecal a los cuerpos de agua. Esseili *et al.*, (2012), evaluaron la cantidad de coliformes en los cuerpos de agua cerca de los campos agrícolas en donde se aplican los abonos de clase B, ya que con las lluvias, este material añadido puede ser arrastrado. Mediante técnicas genéticas lograron reconocer el transporte de *E. coli*, y comprobaron el aumento de este coliforme, por lo que incluso el uso del abono de clase B debe ser regulado.

Una de las ventajas de estos sistemas de saneamiento es que, al contar con cámaras de compostaje, se evita la filtración del biosólido y puede procurarse que el abono sea seguro antes de ser esparcido en los suelos.

Este es el primer estudio sobre el análisis microbiológico de compostas de BSC en Chiapas, por lo que de las observaciones y resultados que se dan aquí se pueden buscar soluciones o alternativas para obtener mejores biosólidos con fines agrícolas, tales como se mencionó anteriormente, el tratamiento posterior de este tipo de materiales con calor, para conseguir la eliminación efectiva de patógenos potenciales como *E. coli* enteroagregativa.

IX. CONCLUSIONES

- Se evaluaron 8 compostas en total, todas en fase de maduración.
- No se registraron diferencias significativas de las variables pH, humedad y tiempo de compostaje entre las compostas de Montecristo de Guerrero y Pijijiapan, con excepción de la temperatura.
- Se encontraron bacterias en el 75% de las muestras, particularmente *E. coli*, *Klebsiella* sp. y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Se aislaron cepas de *E. coli* en el 62.5% de las muestras, de las cuales el 66.66% presentaron el gen de virulencia *app*, identificándose como EAEC (*E. coli* enteroagregativa).
- Según la US EPA, el 62.5% de las compostas analizadas en este estudio tienen clasificación B, mientras que el 37.5% son A.
- No se encontró una correlación entre el tiempo de compostaje, número de usuarios del BSC, temperatura, pH y humedad con la cantidad de coliformes fecales. No obstante, mientras mayor fue el tiempo transcurrido desde la habilitación de los BSC, fue mayor la cantidad de coliformes ($R^2=0.909$; $P=0.003$).

X. RECOMENDACIONES

Para obtener un abono útil y de calidad, es necesaria la regulación de las variables que intervienen en el proceso de compostaje, tanto que, si se hace una composta de manera espontánea, no se garantiza que el producto final pueda ser seguro. Respecto a las compostas con cantidades elevadas de coliformes, se sugiere un tratamiento previo, ya que utilizarlas puede ser peligroso para el ambiente. Algunos de estos tratamientos incluyen la utilización de cal o ceniza (Anand y Apul, 2014), sin embargo, solo se podrá aprovechar en plantas que toleren la alcalinidad del suelo. También se han agregado antibióticos (Anand y Apul, 2014) impregnados en sustratos como paja para cubrir las heces.

Para estudios posteriores, se sugiere que se recabe información más precisa en cuanto al uso del baño, es decir, sobre la cantidad que se agrega de cenizas o cal y si se remueve la composta. De igual manera, si se detectan fugas en las cámaras de compostaje, por donde el agua de lluvia pueda filtrarse y acarrear el biosólido.

Documentar si los usuarios han presentado alguna enfermedad gastrointestinal de tipo infecciosa. Es deseable incorporar la investigación de otros microorganismos indicadores, como helmintos, hongos y virus.

Para estudios transversales como este, contar con un mayor número de compostas a analizar. Por el contrario, si las compostas son escasas, se puede monitorear cada determinado tiempo el comportamiento de las variables involucradas en el proceso de compostaje y la cantidad de patógenos.

XI. LITERATURA CITADA

- Alizadeh, A. Chogha Mish. 2008. El desarrollo de un centro regional prehistórico en las tierras bajas de Susiana, suroeste de Irán: Informe final sobre las últimas seis temporadas de excavaciones, 1972–1978; Publicaciones del Instituto Oriental, OIP 130; El Instituto Oriental de la Universidad de Chicago: Chicago, IL, EE. UU.
- Amor Espín, M.J. del, 2015. Colonización gastrointestinal por enterobacterias en niños sanos: influencia del tipo de alimentación. *Proy. Investig.*
- Anand, C.K., Apul, D.S., 2014. Composting toilets as a sustainable alternative to urban sanitation—A review. *Waste Manag.* 34, 329–343.
- Antoniou, G.P., De Feo, G., Fardin, F., Tamburrino, A., Khan, S., Tie, F., Reklaityte, I., Kanetaki, E., Zheng, X.Y., Mays, L.W., 2016. Evolution of toilets worldwide through the millennia. *Sustainability* 8, 779.
- Arce, T.S., 2014. Actividad microbiana en el proceso de compostaje aerobio de residuos sólidos orgánicos. *Rev. Investig. Univ.* 3. <https://doi.org/10.17162/riu.v3i2.524>
- Berger, W., 2003. Results in the Use and Practise of Composting Toilets in Multi Storey Houses in Bielefeld and Rostock, Germany 8.
- Bidlingmaier, W., 1996. Odour emissions from composting plants, in: *The Science of Composting*. Springer, pp. 71–80.
- Bohórquez Santana, W., 2019. El proceso de compostaje. Universidad de la Salle.
- Casco, J.M., Bernat, S.M., 2008. Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. *Compostaje* 112–39.
- Castillo-Castillo, L. 2002. *Sanitario Ecológico Seco. Manual de diseño, construcción, uso y mantenimiento*. Guadalajara, México. 98 pp.
- Cerna, J.F., Nataro, J.P., Estrada-Garcia, T., 2003. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2138–2140.
- Cohen, H.J., Mechanda, S.M., Lin, W., 1996. PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4303–4308.
- Consejo Consultivo del Agua A.C, S., n.d. Publicaciones [WWW Document]. URL

- <https://www.aguas.org.mx/sitio/de-interes/publicaciones.html> (accessed 10.15.21).
- Cortés-Cortés, I. L. 2015. Diversidad genética, genes de virulencia y estructuras de superficie implicadas en la patogenicidad del género *Aeromonas*. Tesis de Doctorado. Universitat de Barcelona.
- Costner, P., Booth, G.M., Gettings, H., 1990. We all live downstream: for everyone who wants clean water: a guide to waste treatment that stops water pollution. Rev.
- Crichton, P.B., Old, D.C., 1990. Salmonellae of serotypes gallinarum and pullorum grouped by biotyping and fimbrial-gene probing. J. Med. Microbiol. 32, 145–152. <https://doi.org/10.1099/00222615-32-3-145>
- Dumontet, S., Scopa, A., Kerje, S., Krovacek, K., 2001. The Importance of Pathogenic Organisms in Sewage and Sewage Sludge. J. Air Waste Manag. Assoc. 1995 51, 848–60. <https://doi.org/10.1080/10473289.2001.10464313>
- Environment Agency (UK), 2003. The Microbiology of Sewage Sludge - Part 3 - Methods for the Isolation and Enumeration of *Escherichia coli*, Including Verocytotoxic *Escherichia coli* (Bristol).
- Ersson, O., King, K., 2019. The Kailash Ecovillage project converting human excreta into organic foodstuffs and sanitized compost using new international building codes for compost toilet and urine diversion systems. Blue-Green Syst. 1, 33–54.
- Esseili, M.A., Kassem, I.I., Sigler, V., Czajkowski, K., Ames, A., 2012. Genetic evidence for the offsite transport of *E. coli* associated with land application of Class B biosolids on agricultural fields. Sci. Total Environ. 433, 273–280.
- Estándares Ambientales y Sociales (EAS) [WWW Document], n.d. World Bank. URL: <https://ww-w.bancomundial.org/es/projects-operations/environmental-and-social-framework/brief/environmental-and-social-standards> (accessed 11.15.21).
- Fane, S., Nocker, A., Vale, P., Casado, M.R., Cartmell, E., Harris, J., Fernández, Y.B., Tyrrel, S., 2021. Characterisation and control of the biosolids storage environment: Implications for *E. coli* dynamics. Sci. Total Environ. 752, 141705.

- Félix Herrán, J.A., Serrato Flores, R., Armentanhjvogg Bojorquez, A.D., Rodríguez Quiroz, G., Martínez Ruiz, R., Azpiroz Rivero, H.S., Olalde Portugal, V., 2010. Propiedades microbiológicas de compostas maduras producidas a partir de diferente materia orgánica. *Ra Ximhai* 105–114. <https://doi.org/10.35197/rx.06.01.2010.13.ja>
- Germer, J., Boh, M.Y., Schoeffler, M., Amoah, P., 2010. Temperature and deactivation of microbial faecal indicators during small scale co-composting of faecal matter. *Waste Manag.* 30, 185–191.
- Gutiérrez-Jiménez, J., Luna-Cazáres, L.M., Mendoza-Orozco, M.I., Díaz-Marina, G. de J., Burguete-Gutiérrez, J.C., Feliciano-Guzmán, J.M., 2015. Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Rev. Soc. Venez. Microbiol.* 35, 95–102.
- Haug, R.T., 2018. *The practical handbook of compost engineering*. Routledge.
- Herrera-Ortíz, V., Hernández-Rodríguez, O.A., González-Franco, A.C., Núñez-Barrios, A., Robles-Hernández, L., Pérez-Leal, R., 2015. Identificación de bacterias cultivables patógenas al humano en semicompostas de residuos agrícolas. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 6, 1189–1201.
- Hill, G.B., Baldwin, S.A., 2012. Vermicomposting toilets, an alternative to latrine style microbial composting toilets, prove far superior in mass reduction, pathogen destruction, compost quality, and operational cost. *Waste Manag.* 32, 1811–1820.
- INEGI. 2015. Catálogo de claves de entidades federativas, municipios y localidades, <http://geoweb.inegi.org.mx/mgn2k/catalogo.jsp>
- Larrea-Murrell, J.A., Rojas-Badía, M.M., Romeu-Álvarez, B., Rojas-Hernández, N.M., Heydrich-Pérez, M., 2013. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Rev. CENIC Cienc. Biológicas* 44, 24–34.
- López Báez, W., Camas Gómez, R., Reynoso Santos, R., Cadena Íñiguez, P., Castro Mendoza, I., López Báez, W., Camas Gómez, R., Reynoso Santos, R., Cadena Íñiguez, P., Castro Mendoza, I., 2014. Conectividad hídrica entre cuencas, municipios y reserva de la biósfera El Triunfo, Chiapas, México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 5, 1417–1423.

- López-Saucedo, C., Cerna, J.F., Villegas-Sepulveda, N., Thompson, R., Velazquez, F.R., Torres, J., Tarr, P.I., Estrada-García, T., 2003. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 127.
- Madejón, E., Díaz, M.J., López, R., Cabrera, F., 2002. New approaches to establish optimum moisture content for compostable materials. *Bioresour. Technol.* 85, 73–78.
- Magri, M.E., Sï, L., 2013. Inactivation of pathogens in feces by desiccation and urea treatment for application in urine-diverting dry toilets. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2156–2163.
- Marchand-Pajares, E.O., 2002. Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo humano en Lima Metropolitana.
- Márquez, P.B., Blanco, M.J.D., Capitán, F.C., 2008. 4. Factores que afectan al proceso de compostaje. *Compostaje* 93.
- Mehl, J., Kaiser, J., Hurtado, D., Gibson, D.A., Izurieta, R., Mihelcic, J.R., 2011. Pathogen destruction and solids decomposition in composting latrines: study of fundamental mechanisms and user operation in rural Panama. *J. Water Health* 9, 187–199.
- Molina, H., Moral, R., 2018. Cuantificación de cepas de *Escherichia coli* y *Escherichia coli* BLEE aisladas de carcasas de pollo en percha en el cantón Quito.
- Moreno Casco, J., Herrera, M., 2008. *Compostaje*. Mundi-Prensa Libros.
- Moreno Márquez, L., 2006. Frecuencia y comportamiento de salmonella, escherichia coli y organismos coniformes en Chile y Jalapeño.
- Mourad, K.A., Berndtsson, J.C., Berndtsson, R., 2011. Potential fresh water saving using greywater in toilet flushing in Syria. *J. Environ. Manage.* 92, 2447–2453.
- Nasri, B., Brun, F., Fouché, O., 2019. Evaluation of the quality and quantity of compost and leachate from household waterless toilets in France. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 2062–2078.
- NMX-AA-042-SCFI-2015-Norma Mexicana, Análisis de agua - Enumeración de organismos coliformes totales, organismos coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* –Método del número más probable en tubos múltiples (cancela a la NMX-AA-42-1987). Recuperado el 29 de

- abril de 2021. En: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/aa/aa042-2015.pdf>
- Popa, G.L., Papa, M.I., 2021. *Salmonella* spp. infection-a continuous threat worldwide. *Germs* 11, 88.
- Pritchard, J. B. 1969. Textos del Antiguo Cercano Oriente relacionados con el Antiguo Testamento, 3ª ed.; Prensa de la Universidad de Princeton: Princeton, Nueva Jersey, EE. UU.
- Opitz, E.M., Kiefer, J.C., Davis, W.Y., Dziegielewski, B., Nelson, J.O., 1999. RESIDENTIAL END USES OF WATER 18.
- Redlinger, T., Graham, J., Corella-Barud, V., Avitia, R., 2001. Survival of fecal coliforms in dry-composting toilets. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4036–4040.
- Rocha-Garcia, Rosa del C., Martínez-Laguna, Lozano-Zaraín, 2004. Mecanismos de Patogenicidad e Interacción: Parásito-Hospedero. BUAP.
- Rodríguez-Angeles, G., 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública México* 44, 464–475. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342002000500011>
- Roman, P., Martínez, M.M., Pantoja, A., 2013. Manual de compostaje del agricultor: experiencias en América Latina. FAO, Santiago de Chile.
- Rondón-Sulbarán, J., Balam, I., Brennan, M., 2021. A Transdisciplinary Approach to Water Access: An Exploratory Case Study in Indigenous Communities in Chiapas, Mexico. *Water* 13, 1811.
- Saborido, D.G., Guerrero, P.P., Blasco, E.R., Holgado, I.R., 2014. Formas clínicas de infecciones por enterobacterias. *Med.-Programa Form. Médica Contin. Acreditado* 11, 3283–3290.
- Salud Sin Límites Perú. 2015. Manual de construcción de baño ecológico seco. Recuperado el 29 de abril de 2021. En: https://sswm.info/sites/default/files/reference_attachments/SALUD%20SIN%20LIMITES%20PER%C3%9A%202015%20Manual%20de%20construcci%C3%B3n%20de%20Ba%C3%B1o%20%20Seco..pdf
- Sánchez-Monedero, M., Roig, A., Paredes, C., Bernal, M., 2001. Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. *Bioresour. Technol.* 78, 301–308.

- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) 2002 Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002, Protección ambiental. Lodos y biosólidos. Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. SEMARNAT, Ciudad de México, México.
- Threedeach, S., Chiemchaisri, W., Watanabe, T., Chiemchaisri, C., Honda, R., Yamamoto, K., 2012. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* in leachates from municipal solid waste landfills: Comparison between semi-aerobic and anaerobic operations. *Bioresour. Technol.* 113, 253–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.086>
- Tønner-Klank, L., Møller, J., Forslund, A., Dalsgaard, A., 2007. Microbiological assessments of compost toilets: *in situ* measurements and laboratory studies on the survival of fecal microbial indicators using sentinel chambers. *Waste Manag.* 27, 1144–1154.
- Torrentó, M.S., Martínez, M.L., Pujol, Ó.H., 2008. Antecedentes y fundamentos del proceso de compostaje. *Compostaje* 75.
- Torres Kam, Y., 1991. Utilización de *Pseudomonas aeruginosa* como indicador de contaminación en el agua de tanques y cisternas. *Nov* 1991 No 78 P 27-28.
- USEPA, 1994. A Plain English Guide to the EPA Part 503 Biosolids Rule. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Wastewater Management.
- Wéry, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenès, J.-P., Godon, J.-J., 2008. Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Res.* 42, 53–62.
- Wichuk, K.M.W.M., McCartney, D.M., 2007. A review of the effectiveness of current time–temperature regulations on pathogen inactivation during composting. *J. Environ. Eng. Sci.* <https://doi.org/10.1139/S07-011>
- Willis, R.M., Stewart, R.A., Giurco, D.P., Talebpour, M.R., Mousavinejad, A., 2013. End use water consumption in households: impact of socio-demographic factors and efficient devices. *J. Clean. Prod.* 60, 107–115.
- Wilson, M., Henderson, B., McNab, R., 2002. Bacterial disease mechanisms: an introduction to cellular microbiology. Cambridge University Press.
- Zárate Toledo, A., Zárate Toledo, A., 2017. Retos y alternativas de la gestión

local del agua en la periferia urbana de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas. *LiminaR* 15, 126–139. <https://doi.org/10.2536/liminar.v15i2.535>

XII. ANEXOS

12.1. Medios de cultivo y soluciones

Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución de hidróxido de sodio al 1 N.
- Solución de hidróxido de sodio al 0.1 N.
- Solución madre de tampón A, disolviendo 17 g de fosfato monopotásico en agua destilada con un volumen final de 500 mL y con pH ajustado a 7.2 ± 0.2 .
- Solución madre de tampón B, disolviendo 4.05 g de cloruro de magnesio en agua destilada con un volumen final de 500 mL.
- Solución tampón de fosfatos (agua de disolución). Se adicionaron 1.25 mL de la solución madre de tampón A y 5 mL de solución madre de tampón B y se aforó a 1 L con agua destilada. Se distribuyeron volúmenes de 9 mL y 36 mL en tubos de ensayo con rosca y frascos con tapa, respectivamente y se esterilizó en autoclave a 121 °C, durante 15 min.

Medios de cultivo para coliformes fecales:

- Caldo Lauril Triptosa, con pH de 6.8 ± 0.2 , distribuido en volúmenes de 10 mL en tubos de ensayo.
- Medio EC, con pH de 6.9 ± 0.2 , distribuido en volúmenes de 10 mL en tubos de ensayo que contenían en su interior campanas Durham invertidas.

Medios de cultivo para la determinación de *Salmonella* spp:

- Caldo tetrionato, se distribuyó en volúmenes de 9 mL y 36 mL en tubos de ensayo con rosca y en frascos con tapa. Al momento de usarlo se añadió un 2% de solución yodo yoduro y no se volvió a calentar.
- Caldo selenito cistina, con pH de 7.0 ± 0.2 , se distribuyó en volúmenes de 10 mL en tubos de ensayo.

12.2. Figuras citadas en el texto.



Figura 9. Ubicación de la Reserva de la Biosfera El Triunfo. Se muestran las regiones de los municipios que la conforman. Imagen de la CONANP-FMCN (2003).

12.3. Formato de la encuesta aplicada a los usuarios de los BSC.



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Encuesta para beneficiarios de baños secos

Lugar: _____ Fecha: _____

Nombre de usuario: _____

Sexo: _____ Fecha de nacimiento: _____

CONSIDERACIONES SOBRE EL USO CORRECTO DEL BAÑO SECO

¿Cuánto tiempo tiene que el baño comenzó a ser usado?

¿Cuántas personas ocupan el baño?

¿Cada cuánto tiempo se remueve o airea la composta?

¿Con qué materiales cubre el excremento (qué tipo de tierra, u otro material como hojas secas, **aserrín**)?

¿Qué otros materiales desecha en la composta? (papel higiénico, papel de libreta u hojas de **resaca**, **olote**, hojas de plantas, residuos de alimentos, etc.)

¿Suele agregarle cal? SI NO

¿Con qué frecuencia?

¿Cuándo fue la última vez?

¿Percibe olores desagradables? SI NO

12.4. Tabla del NMP (Número más probable).

Valores del NMP por cada 100 mL de muestra y 95 % de límite de confianza (para diversas combinaciones de resultados positivos cuando se utilizan tres alícuotas de muestra de 10 mL, tres de 1 mL y tres de 0,1 mL).

| Número de tubos que dieron reacción positiva | | | NMP por 100 mL | Límite de confianza al 95 % | |
|--|-----------|-------------|----------------|-----------------------------|----------|
| 3 de 10 mL | 3 de 1 mL | 3 de 0,1 mL | | Inferior | Superior |
| 0 | 0 | 0 | <3 | ---- | ----- |
| 0 | 0 | 1 | 3 | < 1 | 9 |
| 0 | 1 | 0 | 3 | < 1 | 13 |
| 1 | 0 | 0 | 4 | < 1 | 20 |
| 1 | 0 | 1 | 7 | 1 | 21 |
| 1 | 1 | 0 | 7 | 1 | 23 |
| 1 | 1 | 1 | 11 | 3 | 36 |
| 1 | 2 | 0 | 11 | 3 | 36 |
| 2 | 0 | 0 | 9 | 1 | 36 |
| 2 | 0 | 1 | 14 | 3 | 37 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 3 | 44 |

| | | | | | |
|---|---|---|-------|-------|-------|
| 2 | 1 | 1 | 20 | 7 | 89 |
| 2 | 2 | 0 | 21 | 4 | 47 |
| 2 | 2 | 1 | 28 | 10 | 149 |
| 3 | 0 | 0 | 23 | 4 | 120 |
| 3 | 0 | 1 | 39 | 7 | 130 |
| 3 | 0 | 2 | 64 | 15 | 379 |
| 3 | 1 | 0 | 43 | 7 | 210 |
| 3 | 1 | 1 | 75 | 14 | 230 |
| 3 | 1 | 2 | 120 | 30 | 380 |
| 3 | 2 | 0 | 93 | 15 | 380 |
| 3 | 2 | 1 | 150 | 30 | 440 |
| 3 | 2 | 2 | 210 | 35 | 470 |
| 3 | 3 | 0 | 240 | 36 | 1300 |
| 3 | 3 | 1 | 460 | 71 | 2400 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 | 150 | 4800 |
| 3 | 3 | 3 | ≥2400 | ----- | ----- |

12.5. Memoria fotográfica.



Figura 10. Primer baño seco construido, localizado en El Vergel, Pijijapan, Chiapas; de donde se tomó la muestra P6.



Figura 11. Leyenda y contribuidores del proyecto.



Figura 12. Muestreo mediante la técnica de cuarteo.



Figura 13. Determinación de los Sólidos Totales. Se observan las muestras secas.

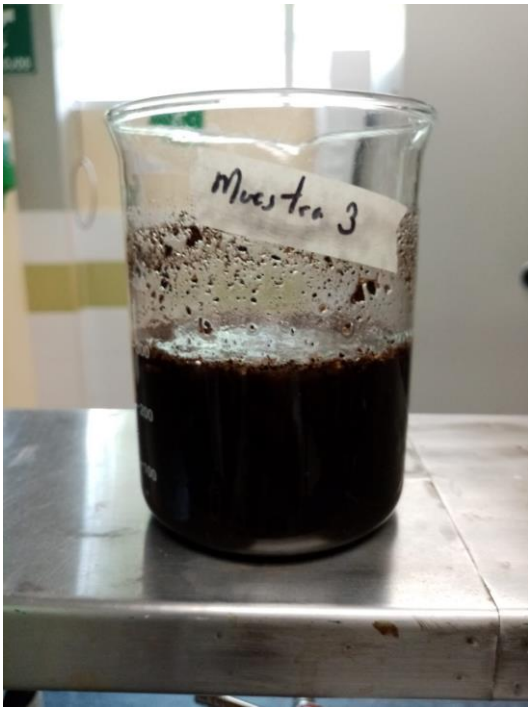


Figura 14. Solución de las muestras en agua destilada para determinar el pH.



Figura 15. Medio E.C. estéril con campanas Durham en su interior.



Figura 16. Caldo Lauril, estéril, con campanas Durham en su interior.

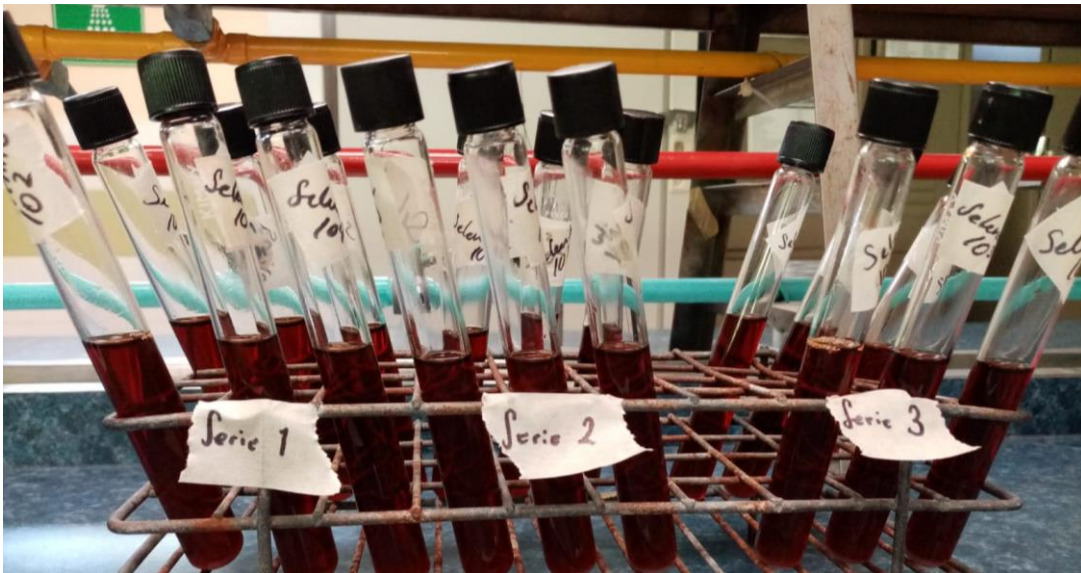


Figura 17. Caldo Selenito cistina, estéril.

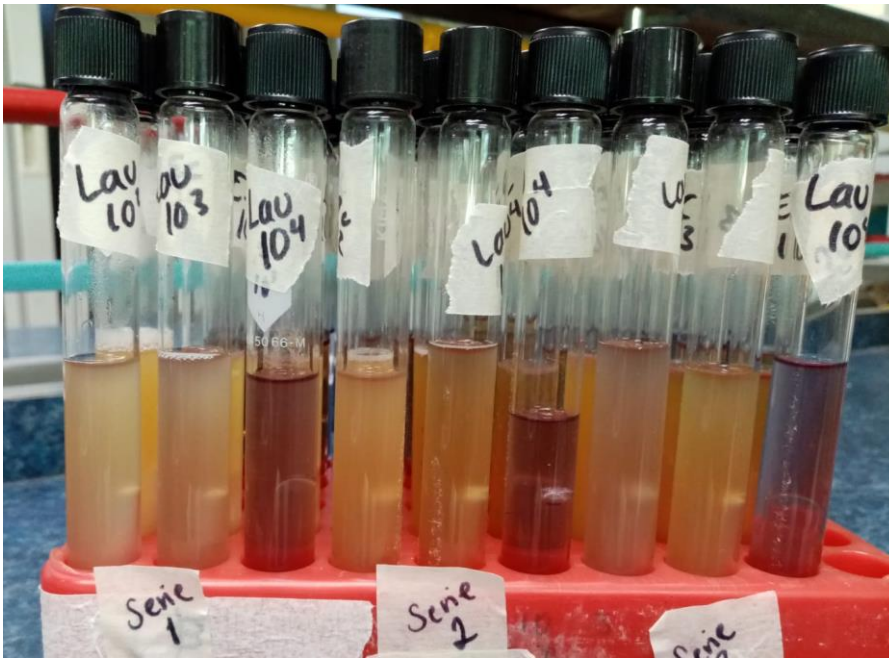


Figura 18. Medios inoculados y con reacción positiva. El medio Lauril vira a una coloración amarilla indicando una disminución del pH, mientras que en el medio E.C. se observa turbidez y una tonalidad amarilla más intensa. En ambos tubos se observa gas en la campana Durham.

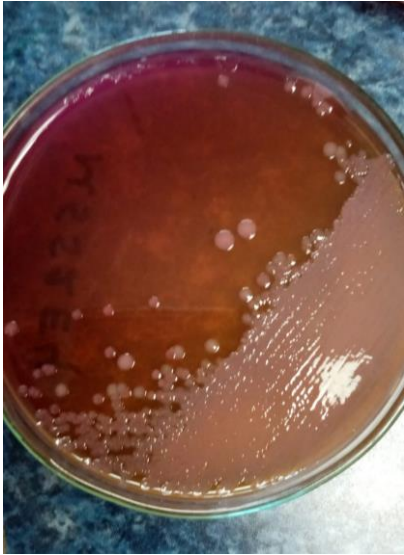


Figura 19. Resiembras en medios sólidos.



Figura 20. Prueba indol para la identificación de *E. coli*.

12.6. Difusión de resultados en foro académico.



CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN

ISSN 2448-6035

MULTIDISCIPLINARIO

UNIVERSIDAD CENTRO DE ESTUDIOS CORTAZAR

OTORGA EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A: Moisés Horacio Colunga Peña

Por su valiosa participación con el trabajo en la MODALIDAD DE PONENCIA titulado:
EVALUACIÓN BACTERIOLÓGICA DE BIOSÓLIDOS DE BAÑOS SECOS COMPOSTEROS EN ZONAS RURALES DE CHIAPAS

Dr. Florentino Vázquez Puente
DIR. DPTO. DE INVESTIGACIÓN

Mtro. Julio Sias Anaya
SECRETARIO ACADÉMICO

Dr. J. Artemio Pérez Muñoz
RECTOR UCEC

Cortazar, Guanejuato, México, abril 2022.

P-UJEC1132



GTR3SOLUCIONES
Impresión y comunicación integral.
www.gtr3soluciones.com