

# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## TESIS

Determinación de coliformes fecales en  
biosólidos de baños secos en “El Mirador”,  
Berriozábal, Chiapas

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

**MAURICIO ANTONIO CAMERAS PAREDES**

Director

Dr. JAVIER GUTIÉRREZ JIMÉNEZ

**Instituto de Ciencias Biológicas**

**UNICACH**



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Mayo de 2024



**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: 28 de mayo de 2024

C. Mauricio Antonio Camaras Paredes

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:  
Determinación de coliformes fecales en biosólidos de baños secos en "El Mirador",

Berriozábal, 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. Dolores Guadalupe Vidal López

Dr. José Antonio De Fuentes Vicente

Dr. Javier Gutiérrez Jiménez

Firmas:

[Firma]  
[Firma]

Cop. Expediente



## **Agradecimientos**

Al **Dr. Javier Gutiérrez Jiménez** por aceptar dirigir mi tesis y sobre todo por compartirme todos sus conocimientos (tanto científicos y de vida). Sin duda alguna haber tomado clases con usted fue un cambio para mí en la universidad.

A la organización **Operación Bendición México** por brindarme la oportunidad de elaborar este proyecto, así como el apoyo económico para los materiales y reactivos necesarios para hacerlo, y al **Mtro. Carlos Alberto Ríos García**. Trabajar junto a ustedes fue muy grato sabiendo que contaba con su apoyo en todo momento.

A las **familias de la comunidad de “El Mirador”**, Berriozábal, Chiapas por abrirnos las puertas a sus hogares y por confiarnos la elaboración de este estudio dirigido a ellos. Porque la ciencia debe de ser y ayudar a todos.

A la **Dra. María Adelina Schlie Guzmán** por abrirme las puertas al Laboratorio de Biología Molecular y Genética en donde realice todo el trabajo de laboratorio de esta investigación y también por apoyarme en las técnicas moleculares que a veces se pueden complicar.

A la **Dra. Dolores Guadalupe Vidal López** y al **Dr. José Antonio De Fuentes Vicente** por aceptar ser parte del comité revisor de este trabajo y nutrirlos con sus conocimientos científicos.

A mis compañeros de la carrera **Kevin, Joseph, Yvonne y Alan** los cuales pasamos buenos momentos y juntos aprendimos como sobrellevar el semestre. Sobre todas las cosas me enseñaron a tener paciencia y espero que les vaya bien en todo lo que se propongan.

A la **Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas** y al **Instituto de Ciencias Biológicas** por ser uno de los lugares en donde se puede estudiar una de las carreras más importantes hoy y siempre: la vida.

**A mis padres** por apoyarme en todas las decisiones que he tomado y facilitarme todas las cosas que he requerido a lo largo de mis estudios y de mi vida. Mi mayor privilegio es ser un hijo amado por Clary y Toño.

A mi hermano **Luis Daniel Cameras Paredes** que si no lo menciono se va enojar (mentira). Por mostrarme y enseñarme desde que tengo memoria diferentes maneras de aprender y apreciar tanto los buenos como los malos momentos. También por mostrarme canciones y películas que han sido la piedra angular de mis gustos, debido a que una vida sin la apreciación artística es una vida monótona.

A **mis abuelos y tíos** que de igual manera me han amado y apoyado en todo lo que he requerido.

A mis amigos **Grecia** “marukita” Cameras y **Manuel** “spectro” Aguilar que después de tantos años hemos permanecido juntos, gracias por su amistad.

A **Tlacuachín** por ayudarme en la revisión de la redacción de documentos relacionados a este trabajo y por estar en los momentos de ocio necesarios para que el estrés no consuma a una persona.

A mis mascota y compañera **Polaris** por quedarse conmigo en los desvelos y siempre alegrarme la vida con su incondicional amor peludo.

*A Luis Arturo, siempre es hoy.*

# ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- MARCO TEÓRICO	3
2.1. HISTORIA DE LOS BAÑOS	3
2.2. BAÑOS SECOS	3
2.2.1. Percepción de los SES por las comunidades	5
2.2.2. Componentes de un SES	5
2.3. HECES	5
2.3.1. Compostaje	6
2.3.2. Proceso de compostaje	6
2.4. MICROORGANISMOS PRESENTES EN LAS HECES	7
2.4.1. Virus	7
2.4.2. Protozoos	8
2.4.3. Helmintos	8
2.4.4. Bacterias	9
2.4.4.1. <i>Campylobacter</i>	9
2.4.4.2. <i>Vibrio</i>	10
2.4.5. Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	10
2.4.5.1. <i>Salmonella</i>	10
2.4.5.2. Coliformes	11
2.4.5.3. <i>Klebsiella</i>	11
2.4.5.4. <i>Enterobacter</i>	12
2.4.5.5 <i>Escherichia coli</i>	12
2.4.5.6. ETEC	13
2.4.5.7. EPEC	15
2.4.5.8. STEC	18
2.4.5.9. EAEC	21
2.4.5.10. EIEC	24

2.4.5.11. DAEC	26
III.- ANTECEDENTES	29
IV.- OBJETIVOS	31
4.1. GENERALES	31
4.2. PARTICULARES	31
V. ZONA DE ESTUDIO	32
VI. MÉTODOS	34
6.1. OBTENCIÓN DE DATOS DEMOGRÁFICOS	34
6.2. TOMA DE MUESTRAS DE BIOSÓLIDOS	34
6.3. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES	35
6.4. MEDICIÓN DE pH	36
6.5. ENUMERACIÓN DE COLIFORMES MEDIANTE EL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)	36
6.5.1. Diluciones para coliformes fecales	36
6.5.2. Pruebas presuntivas	36
6.5.3. Prueba confirmatoria	36
6.5.4. Expresión del número más probable (NMP)	38
6.6. CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSÓLIDOS	
6.7. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAMNEGATIVAS DEL GRUPO COLIFORME	38
6.7.1. Medios selectivos	38
6.7.2. Pruebas bioquímicas	38
6.7.3. PCR para la identificación de <i>E. coli</i> con genes de virulencia	39
6.8. ENUMERACIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SP. MEDIANTE EL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)	41
6.8.1. Diluciones con medio de enriquecimiento	41
6.8.2. Preparación de diluciones en caldo selectivo	41
6.8.3. Expresión del número más probable (NMP)	41
6.9. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE <i>SALMONELLA</i> SP.	41

6.9.1. Medios selectivos	41
6.9.2. Pruebas bioquímicas	41
6.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
VII.- RESULTADOS	43
7.1. DATOS DEMOGRÁFICOS	43
7.2. VARIABLES DEPENDIENTES DE LOS BIOSÓLIDOS	46
7.3. CLASIFICACIÓN DE BIOSÓLIDOS	49
7.4. IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS	51
7.5. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DISTINTAS A <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>	60
7.6. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE <i>E. COLI</i>	61
VIII.- DISCUSIÓN	64
XI.- CONCLUSIONES	69
X.- RECOMENDACIONES	70
XI.- REFERENCIAS DOCUMENTALES	71
XII.- ANEXOS	82

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diferencias ambientales de los SES respecto al inodoro y la letrina. Modificado de Zúñiga <i>et al.</i> , (2006).....	4
Cuadro 2. Fechas de recolección de los biosólidos de los SES en El Mirador, Berriozábal, Chiapas.....	35
Cuadro 3. <i>Primers</i> utilizados para la identificación de <i>E. coli</i> patógenas (López-Saucedo <i>et al.</i> , 2003; Cerna <i>et al.</i> , 2003).....	40
Cuadro 4. Características fisicoquímicas y bacteriológicas de los biosólidos en El Mirador, Berriozábal, Chiapas.....	47
Cuadro 5. Clasificación de los biosólidos de BSC en el Mirador, Berriozábal, Chiapas.....	50
Cuadro 6. Perfil bioquímico de las enterobacterias aisladas de los biosólidos BSC1 y BSC2.....	52
Cuadro 7. Perfil bioquímico de <i>E. coli</i> del biosólido BSC6 mediante API 20 E.....	56
Cuadro 8. Perfil bioquímico de <i>E. agglomerans</i> del biosólido BSC7 mediante API 20 E.....	57
Cuadro 9. Prueba OF para las muestras de biosólido BSC3 y BSC4.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de patogenicidad de ETEC en el enterocito. Modificado de Farfán-García <i>et al.</i> , (2016) .....	14
Figura 2. Mecanismos de patogenicidad de EPEC hacia el enterocito. Modificado de Farfán-García <i>et al.</i> , (2016) .....	17
Figura 3. Mecanismo de patogenicidad de STEC en el enterocito y la célula endotelial. Modificado de Farfán-García <i>et al.</i> , (2016) .....	20
Figura 4. Mecanismo de patogenicidad de EAEC en el enterocito. Modificado de Farfán-García <i>et al.</i> , (2016).....	23
Figura 5. Mecanismo de patogenicidad de EIEC en el enterocito. Modificado de Farfán-García <i>et al.</i> , (2016).....	25
Figura 6. Mecanismo de patogenicidad de DAEC en el enterocito.....	27
Figura 7. Microorganismos presentes en las heces humanas.....	28
Figura 8. Ubicación de “El Mirador”, comunidad rural cerca de Berriozábal, Chiapas.....	33
Figura 9. Diagrama para la dilución, prueba presuntiva y confirmatoria de coliformes fecales provenientes de biosólidos.....	37
Figura 10. Plano de un SES construido en El Mirador, Berriozábal, Chiapas, (Rivera-Parra, 2022).....	43
Figura 11. Diseño arquitectónico de los SES construidos en El Mirador, Berriozábal, Chiapas (Rivera-Parra, 2022).....	44
Figura 12. Taza con división para orina y heces instalados en los SES de El Mirador, Berriozábal, Chiapas.....	44
Figura 13. Diseño arquitectónico del contenedor “popostero” instalado en El Mirador, Berriozábal, Chiapas (Rivera-Parra, 2022).....	45
Figura 14. Registro de temperatura en una muestra de biosólido dentro del depósito de almacenamiento.....	46
Figura 15. Prueba presuntiva de coliformes fecales en el caldo lauril sulfato de sodio.....	48
Figura 16. Comparación de prueba negativa y positiva para el medio EC.....	49
Figura 17. Biosólidos a los tres meses de almacenamiento.....	50

Figura 18. Colonias rosa mexicano con fenotipo mucoide aisladas de los biosólidos BSC1 y BSC2.....	51
Figura 19. Resultado de pruebas TSI y LIA.....	53
Figura 20. Resultados de la prueba MIO.....	54
Figura 21. Resultados de las pruebas en los medios Citrato de Simmons, RM y VP.....	55
Figura 22. Pruebas bioquímicas que se registran en la galería API 20 E.....	59
Figura 23. Resultados de la prueba OF.....	61
Figura 24. Genes de virulencia de <i>E. coli</i> aislada de la composta BSC6, separados en un gel de agarosa al 2.5 %.....	62
Figura 25. Genes de virulencia de <i>E. coli</i> aislada de la composta BSC7, separados en un gel de agarosa al 2.5 %.....	63

## RESUMEN

El sanitario ecológico seco (SES) es una ecotecnía alternativa para el cuidado del agua en comunidades marginadas donde el recurso hídrico es limitado. Además, los biosólidos generados pueden usarse para restauración de suelos y con fines agrícolas. Para poder reusar estos materiales generados en los SES, debe determinarse la presencia y cantidad de bacterias del grupo de los coliformes, conformados por bacterias Gramnegativas de la familia *Enterobacteriaceae* presentes en las heces, siendo algunos de los géneros importantes *Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. La cantidad de coliformes encontrada en una muestra puede ser usada como indicador de insalubridad. Dentro de los coliformes, *Escherichia coli* se clasifica en distintos patotipos de acuerdo a su mecanismo de patogenicidad como ETEC, EPEC, EIEC, STEC, EAEC y DAEC. En este estudio, se analizaron biosólidos de SES durante nueve meses en el ejido El Mirador, Berriozábal, Chiapas. Los coliformes se midieron con la técnica del número más probable, en tanto que los patotipos de *E. coli* se investigaron mediante PCR. Se identificaron coliformes en el 50 % de los biosólidos muestreados y se aislaron dos cepas de *E. coli* con el gen de virulencia *bfpA* del patotipo *E. coli* enteropatógena (EPEC) en sendas muestras de biosólidos. La mayoría de los biosólidos obtenidos en los SES pueden usarse como composta de plantas de ornato. Estos análisis son importantes para determinar la presencia de coliformes en los biosólidos y plantear estrategias que disminuyan este tipo de microorganismos en los biosólidos generados con esta ecotecnía, para que puedan usarse con fines agrícolas en estas comunidades marginadas de Chiapas.

**Palabras clave:** ETEC, EPEC, EIEC, STEC, PCR.

# I. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso vital para el planeta, sin embargo, el ser humano ha hecho un mal uso de este líquido lo que refleja la contaminación a lo largo del tiempo siendo hasta en los siglos XVIII y XIX cuando se comenzaron a aplicar procesos para tratar de desinfectar el agua (Sierra-Ramírez, 2021).

Se estima que 500 millones de niños sufren de alguna enfermedad diarreica derivada de la mala calidad del agua principalmente en países en vías de desarrollo como lo son los que se encuentran en Asia, África y América Latina. Además 3.4 millones de personas mueren anualmente por la misma problemática (McJunkin, 1988; Boelee *et al.*, 2019).

De acuerdo con lo informado por la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, 2023) en las últimas dos décadas se ha incorporado el servicio de drenaje y agua potable al menos a 35 millones de habitantes a lo largo del territorio mexicano, sin embargo, aún existen alrededor de 4 millones de individuos que carecen de estos servicios de los cuales al menos 570 000 personas habitan en el estado de Chiapas.

Las áreas urbanas y rurales en constante crecimiento de estos países carecen de buenos servicios de drenaje por falta de recursos financieros, insuficiente espacio disponible en las zonas de construcción de los hogares e infraestructura no actualizada por parte de los gobiernos municipales (Redlinger *et al.*, 2001).

Lo anterior ha impulsado la generación de técnicas de saneamiento para cuidar el agua y aplicar este abordaje en zonas donde el acceso a esta no es fácil. De acuerdo con la Comisión Nacional Para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI, 2016) las ecotecnias son instrumentos para aprovechar óptimamente los recursos naturales de una manera sostenible. Una de estas ecotecnias para evitar la contaminación del agua son los baños secos o sanitarios ecológicos secos (SES), los cuales emplean material sólido para mezclarla con las heces, en lugar de utilizar agua. De esta manera, mediante los baños secos es posible reutilizar esta materia orgánica para hacer compostas, pero se deben llevar ciertos tratamientos para asegurar la calidad y seguridad microbiana (Schönning y Stenström, 2004).

Dado que la implementación de esta ecotecnia es relativamente reciente en zonas rurales de Chiapas, se desconoce si hay un procesamiento adecuado para la generación de biosólidos obtenido mediante esta ecotecnia, por lo que en esta investigación se pretende analizar la presencia de coliformes fecales en biosólidos a diferentes tiempos para evaluar la dinámica de este tipo de microorganismos y determinar el tiempo óptimo para su uso.

Estos datos serán útiles para determinar el tiempo adecuado para emplear el biosólido libre de coliformes, lo que incidirá en el cuidado de la salud de las personas en esta localidad, cumpliendo así con lo planeado por Organización Mundial de la Salud (McJunkin, 1988) la que señala que el saneamiento es un componente primario de la atención a la salud de todas las personas.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 HISTORIA DE LOS BAÑOS

Se da por hecho que los espacios para liberarse de la materia fecal y orina siempre han sido privados y delimitados por una construcción, pero esto no siempre ha sido así. El ser humano nómada -y como se sigue haciendo en la actualidad en muchos lugares sin buena infraestructura ni acceso al recurso hídrico- depositaba este material al aire libre en donde la necesidad de hacerlo lo alcanzaba o en un lugar determinado por todas las personas del grupo al que pertenecía (Prignano, 2007).

No se tiene registro en donde o quién fue la primera persona en crear un depósito o artefacto para las heces y orina humana, pero se sabe que este primer artefacto fue una letrina la cual es un agujero en el suelo en donde se coloca una base para sentarse y los desechos caen al fondo, este método sigue siendo usado por 12 % de la población mundial (Climént-Palmer, 2016). En la antigua Roma uno de los placeres más grande era el uso de los baños públicos, ir a uno de estos era una práctica social porque no sólo se cumplía con la acción de lavarse o defecar, sino aquí las personas conversaban. Todo esto fue cambiando en el siglo XV cuando la concepción del cuerpo cambió por el dominio del cristianismo en esa época como un signo pecaminoso y de debilidad convirtiendo el acto de ir al baño en algo privado (Acosta-Collazo y García-Díaz, 2014).

La tecnología que ayudó al buen tratamiento y depósito de heces fecales en el siglo XVIII fue el inodoro con cisterna, pero debido a la ventilación insuficiente estos se pueden convertir en focos de infección por tener rasgos físicos adecuados para los microorganismos como una temperatura y humedad estables (Lee y Tham, 2021).

### 2.2 BAÑOS SECOS

El uso de baños secos o sanitario ecológico seco (SES) es una tecnología de saneamiento *in situ* que aprovecha las heces humanas y también es más barato dado que no requiere agua, además que ocupa menos terreno (Senanu *et al.*, 2021). Disminuye los altos costos de tratamiento de los sistemas convencionales y el tratamiento de aguas por parte de las comunidades; por si fuera poco, esta

ecotecnología también contribuye a que estas viviendas sean sustentables (Zita-Lagos *et al.*, 2017).

Se diferencian también de las letrinas puesto que separan los fluidos de la materia sólida evitando los malos olores resultantes de la mezcla de orina y heces (Flórez-Jiménez *et al.*, 2016). Se muestran algunas diferencias entre un inodoro convencional, una letrina tradicional y el baño seco o SES (ver cuadro 1).

Cuadro 1. Diferencias ambientales de los SES respecto al inodoro y la letrina. Modificado de Zúñiga *et al.* (2006).

Características	Inodoro	Letrina	SES
¿Degrada el ambiente?	Sí, el drenaje tiene el desagüe a ríos, lagos y mares. Contaminación de mantos acuíferos. Destrucción de la vida acuática.	Si, puede filtrarse a los mantos acuíferos y puede desbordarse	No, las excretas quedan aislada por lo que se obtiene un producto inocuo
¿Ahorro de recursos?	No, desperdicia alrededor de seis a 12 L de agua potable por descarga	Si, no requiere agua	Si, no requiere agua
¿Permite uso de nutrientes?	No, debido a la acumulación de metales pesados en los lodos residuales	No, porque es pozo perdido	Si, excreta y materia prima pueden regresar como fertilizante y abono para plantas de ornato y acondicionador del suelo

### **2.2.1 Percepción de los SES por las comunidades**

Una de las principales causas del rechazo de un producto o avance tecnológico por las personas, es debido al poco conocimiento que se tiene sobre él y cómo resolverá la necesidad o problema en cuestión. Es por ello que se debe de hacer una investigación para saber intrínsecamente el pensar y sentir de la población hacia la tecnología a implementar (Zita-Lagos *et al.*, 2017). En el caso de los SES, al ser una técnica *in situ* para el procesamiento de desechos humanos, conlleva a prejuicios culturales por la falta de conocimiento científico hacia esta ecotecnología y el manejo de riesgos asociados. Tampoco ayuda la percepción que se tiene al aplicar estos tratamientos *in situ* en zonas rurales y poblaciones vulnerables, porque automáticamente se asocia a situaciones de pobreza, dejando a un lado la ayuda en calidad de modo de vida que se obtiene de ella (García-Ubaque *et al.*, 2014).

### **2.1.2 Componentes de un SES**

Los SES tienen diferentes partes que les permiten aplicar su tecnología. García-Ubaque *et al.* (2014) menciona que la parte más notoria de éstos es la presencia de dos cámaras de almacenamiento, con usos intercalados porque no se utilizan al mismo tiempo, es decir, primero se usa una y hasta llegar al máximo de su capacidad, se suspende su uso y se comienza a utilizar la segunda, mientras que se trata la primera. Asimismo, Flórez-Jiménez *et al.* (2016) remarcan la importancia de las cámaras de separación debido a que mientras una esté en uso, en la otra se lleva a cabo el proceso de tratamiento, además de mencionar un depósito solo para heces y otro solo de orina en donde el primero se mezcla con materia seca como ceniza, tierra negra o aserrín y el segundo solo se deja madurando.

Por otro lado (Zúñiga *et al.*, 2006) mencionan que deben tener un ducto de ventilación con un diámetro de 10 a 15 cm para mantener el ambiente con fluidez de gases.

## **2.3 HECES**

Se tiene la idea errónea de que las heces humanas son desechos sin alguna utilización, lo que conduce a sistemas de sanitarios que no reciclan esta materia

orgánica. El reciclaje y aprovechamiento de las heces de los humanos tiene una importancia agrícola, debido a que es un sustrato rico en nutrientes que pueden ser aportados a las plantas (Magri *et al.*, 2013).

Los principales nutrientes que contienen son potasio (K), fósforo (P) y nitrógeno (N), debido a que el ser humano aprovecha pequeñas cantidades de estos nutrientes cuando está en proceso de crecimiento. Estos elementos son usados para síntesis de proteínas que aportarán a los huesos, nervios y músculos, pero se aprovechan alrededor de 0.6-6 % de las cantidades consumidas (Jönsson *et al.*, 2004).

### **2.3.1 Compostaje**

El compostaje es un proceso llevado a cabo por microorganismos diversos mediante el cual se descompone materia orgánica mediante una oxidación bioquímica generando CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, energía calórica y biomasa conocida como composta libre de patógenos que puede aplicarse al suelo (Oviedo-Ocaña *et al.*, 2017; Varnero *et al.*, 2007).

Esta tecnología es de bajo costo y tiene como garantía que la materia orgánica se vuelva a incorporar al ciclo de la cadena de producción primaria, así como mejorar las propiedades físico-químicas del suelo y aumentar la productividad de los cultivos (Vargas-Pineda *et al.*, 2019). Este proceso se ha galardonado en los últimos años como la tecnología más utilizada para la reducción y transformación de materiales residuales (Tortarolo *et al.*, 2008).

El compostaje es considerado como uno de los tratamientos secundarios de heces fecales (Jönsson *et al.*, 2004).

### **2.3.2 Proceso de compostaje**

Este proceso va directamente relacionado con la temperatura debido a que esta es la que determina qué tanto se cataliza la descomposición de la materia orgánica. Con base en ello se identifican tres fases en el proceso: fase mesófila, fase termófila y fase de enfriamiento o mesófila II (Bohórquez-Santana, 2019).

En la fase mesófila el biosólido se encuentra a temperatura ambiente donde actúan microorganismos aerobios mesofílicos para degradar azúcares y proteínas de la materia orgánica, en esta parte se forman fitotóxicos como  $\text{NH}_3$  y ácidos grasos volátiles de cadena corta metabolizados por los microorganismos (Tortarolo *et al.*, 2008). Luego en la fase termofílica, la degradación previa conlleva a un incremento de temperatura de hasta  $40^\circ\text{C}$ , lo que facilita la reducción de patógenos y selección de organismos termofílicos, la actividad biológica permanece hasta que se disminuyen los nutrientes (Oviedo-Ocaña *et al.*, 2017). Posteriormente la tasa de descomposición termina y por lo consiguiente la temperatura disminuye habiendo una colonización de microorganismos mesófilos (Bohórquez Santana, 2019).

## **2.4 MICROORGANISMOS PRESENTES EN LAS HECES**

En algunos SES el compostaje no es adecuado, ya que solo se almacena y hay una descomposición anaerobia, deshidratación o alcalinización, lo cual no asegura una óptima reducción de patógenos en la composta obtenida (Fernández-Curutchet *et al.*, 2015).

Se hace énfasis cuando se refiere al buen tratamiento de los residuos fecales porque estos están relacionados con organismos patógenos tales como virus, protozoos, helmintos y bacterias. Existen tres maneras básicas mediante la cual las heces fecales humanas pueden aumentar el crecimiento de estos microorganismos: I) como fuentes de microorganismos enteropatógenos en el medio ambiente, II) al facilitar los ciclos de vida dependientes de las excretas; y III) facilitar la reproducción de los vectores (OMS, 2019). A continuación, se describen los microorganismos que pueden encontrarse en las heces humanas.

### **2.4.1 Virus**

Estos microorganismos están constituidos de material genético que necesitan infectar una célula para poder sobrevivir, generalmente se aíslan del medio ambiente a través de una capa de proteínas y debido a que no cuentan con una maquinaria para replicarse, invaden las de la célula en la que se hospedan en un determinado momento (Santiago Alarcón y Ojeda Flores, 2018).

En general, los virus que son encontrados en restos de heces fecales provienen de tres posibles fuentes: I) de la ingestión en secreciones respiratorias del tracto superior; en este caso la resistencia a un pH bajo o la mezcla con los alimentos puede abrirle paso hacia el intestino; II) residuos de células inmunitarias presentadoras de antígenos infectadas; III) la replicación del virus en las células intestinales (Foladori *et al.*, 2020).

Se estima que alrededor de 120 virus pueden ser encontrados en las heces humanas, siendo los grupos más comunes los enterovirus, adenovirus entéricos y norovirus. Es de particular interés el virus de la Hepatitis A, debido a que en zonas urbanas y periurbanas es bastante frecuente (Fernández-Curutchet *et al.*, 2015).

#### **2.4.2 Protozoos**

El reino Protista constituye a organismos unicelulares eucariotas, con organelos verdaderos cuyos portadores son cosmopolitas incluyendo formas parásitas de plantas y animales, por su forma se pueden clasificar en esféricos, polimorfos o de simetría bilateral (Unzaga y Zonta, 2018).

Los protozoarios han sido estudiados arduamente en la última década, en especial *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* o *G. intestinalis* debido a su alta resistencia ambiental. Se señala que el género *Cryptosporidium* está asociado a los brotes de enfermedades relacionadas con el agua y el género *Giardia* por su alta prevalencia como patógeno (Schönning y Stenström, 2004).

Los protozoarios que infectan a los humanos, en especial a los niños, son de difícil identificación cuando están en forma de quistes. Por otro lado, la detección de los trofozoítos no es posible cuando las muestras no llegan al laboratorio en buenas condiciones (Chávez-Navarro, 2008).

#### **2.4.3 Helmintos**

La palabra helminto se deriva del griego *helmins* que significa “gusano parásito” y son organismos multicelulares que poseen órganos y sistemas diferenciados que pueden parasitar a plantas y animales (Kasper y Harrison, 2016).

Los huevos de los helmintos son bastantes persistentes en el ambiente y se les considera un indicador de la calidad higiénica, siendo de especial interés los géneros *Ascaris* y *Taenia*. Otro de los helmintos de importancia son las uncinarias, las que causan la anquilostomiasis, enfermedad común en zonas tropicales y subtropicales húmedas que afecta alrededor de mil millones de personas en el planeta; puede haber desnutrición y causar indirectamente la muerte de muchos niños ((Schönning y Stenström, 2004).

#### **2.4.4 Bacterias**

Estos organismos son células procariotas sin un núcleo definido, algunas bacterias forman endosporas para sobrevivir a ambientes extremos en estado de latencia; de acuerdo a su forma se pueden clasificar como bacilos (células en forma de bastón); cocos (células en forma redonda) y espirilos (células en forma helicoidal o espiral). Otra forma de clasificar a las bacterias, de acuerdo a las propiedades de su pared celular, que es la base de la reacción de Gram que las clasifica como Gram-positivas y Gram-negativas (Lizarbe-Iracheta, 2009).

Con respecto a la evaluación de los riesgos microbianos de los productos fertilizantes que incluyen a las heces fecales, el lodo residual y el estiércol animal, bacterias como *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) son de suma importancia. Por otro lado, *Salmonella Typhi* y *Vibrio cholera* son bacterias que pueden ocasionar enfermedades infecciosas en áreas donde se presenta contaminación del agua y no hay un saneamiento adecuado

##### **2.4.4.1 *Campylobacter***

El nombre de este género se deriva de las palabras griegas *kampylos* que significa curva y de *baktron* que significa varilla, estas bacterias son bacilos Gram-negativos con forma de coma o de un espiral curvo; se pueden mover debido a un flagelo unipolar o bipolar y son microaerófilos (Orihuel-Lazo *et al.*, 2015). Son capaces de crecer en condiciones con 5 % de oxígeno, 10 % de dióxido de carbono y 85 % de nitrógeno, son bacterias mesófilas creciendo a temperaturas de 37° C a excepción de *C. jejuni* que crece a 42° C (Cervantes-García y Cravioto, 2007). En el ser

humano *C. intestinalis* y *C. jejuni* causan enfermedades como enteritis, bacteriemia y septicemia (Herrera *et al.*, 1984).

#### **2.4.4.2 *Vibrio***

Las bacterias de este género fueron uno de los primeros grupos bacterianos en ser descritos y conocidos taxonómicamente por Pacini en 1854 (Muñoz *et al.*, 2012), son bacterias Gram-negativas, pertenecientes a la familia (Cuéllar-Anjel, 2013), comprendiendo 75 especies de las cuales 12 son consideradas patógenas para el ser humano, siendo *V. cholerae* la que mayor importancia médica ha tenido dado que ha provocado ocho pandemias desde inicios del siglo XIX (Aliaga *et al.*, 2010).

Esta bacteria puede ocasionar una leve diarrea hasta una enfermedad grave con diarrea fulminante, coma y muerte en pocas horas (Castillo *et al.*, 2013).

#### **2.4.5 Familia *Enterobacteriaceae***

Esta familia alberga bacterias que habitan los intestinos de los vertebrados, pueden causar enfermedades como cistitis y pielonefritis con fiebre, septicemia, neumonía, peritonitis y meningitis entre otros padecimientos. Estas bacterias pueden propagarse tan sólo al contacto con una persona que las hospede, por agua y alimentos contaminados (Nordmann *et al.*, 2011).

Entre esta familia, *Escherichia coli* es asociada frecuentemente con infecciones urinarias, *Klebsiella* spp y *Enterobacter* spp en casos importantes de neumonía, y todas las bacterias pertenecientes a esta familia han estado implicadas a infecciones del torrente sanguíneo, peritonitis, colangitis y otras infecciones intraabdominales (Paterson, 2006).

##### **2.4.5.1 *Salmonella***

El nombre *Salmonella* se origina en honor al anatomopatólogo Salmon, a quien se le atribuye la identificación de *S. choleraesuis* en el intestino de un cerdo. Es un bacilo Gram-negativo patógeno intracelular facultativo en condiciones anaerobias, puede colonizar el intestino de los animales sanos, de los cuales, las heces son el principal foco de infección de los alimentos y el agua. Cuando este patógeno llega

a los alimentos, se multiplica rápidamente y es por esto que ingerir alimentos puede llegar a ocasionar una infección gastrointestinal conocida como salmonelosis (Alfaro-Mora, 2018).

En México en la década de los 90 se registraron 215 155 casos de salmonelosis siendo Tabasco, Coahuila, Chiapas y Quintana Roo los estados que concentraron los casos, asimismo este género es el que más ocasiona pérdidas en la industria avícola (Figuroa-Ochoa y Verdugo-Rodríguez, 2005).

Estas bacterias son fermentadoras de glucosa, pero no fermentan lactosa, reducen nitratos y no producen oxidasa, el genoma de las especies contiene alrededor de 4.8 a 4.9 millones de pares de bases (Cárdenas, 2016).

#### **2.4.5.2 Coliformes**

Está formado por un grupo de bacterias presente en las heces pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, son Gram-negativos en forma de bacilos que fermentan la lactosa, son aerobios o anaerobios facultativos, oxidasa negativos, no forman esporas y presentan actividad enzimática beta-galactosidasa, algunos de los géneros que albergan son *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Larrea-Murrell *et al.*, 2014).

La cantidad de coliformes presentes en una muestra puede ser usada como indicador de insalubridad o, dicho de otra forma, de origen fecal, como es el caso de coliformes presentes en el agua potable (Silva *et al.*, 2004).

#### **2.4.5.3 Klebsiella**

Dentro de este género, la especie más estudiada y con más importancia clínica es *K. pneumoniae* la cual es una bacteria anaerobia facultativa, inmóvil y encapsulada esparcida ampliamente en los humanos. *K. pneumoniae* coloniza la nasofaringe y el tracto gastrointestinal. En muestras fecales la detección de esta bacteria en adultos varía de 5 – 38 % y en infantes puede llegar a ser del 100 % (Echeverri-Toro y Cataño Correa, 2010).

Esta bacteria puede ser encontrada en un amplio rango de lugares: el suelo, agua, diferentes plantas, insectos, aves, y diferentes mamíferos en donde puede ser una bacteria comensal o un patógeno (Wyres *et al.*, 2020).

#### **2.4.5.4 *Enterobacter***

Son bacterias Gram-negativas, anaerobias facultativas, en forma de bastón, no producen esporas que se pueden identificar por pruebas bioquímicas convencionales ya que son bacterias mayormente inmóviles, catalasa positiva, oxidasa y ADNasa negativa, fermentadoras de glucosa, reducen los nitritos, no reaccionan al indol, descarboxilan la ornitina, no descarboxilan la lisina y son citrato y ureasa positivo (Davin-Regli y Pagès, 2015; Silva y Martínez, 2018).

Estas bacterias pueden ser encontradas en el suelo y agua, son endófitas y consideradas como patógenas de gran variedad de plantas, asimismo, son comensales de los intestinos de algunos animales incluyendo al ser humano. En el ámbito clínico, especies de este género como *E. aerogenes*, *E. cloacae* y *E. hormaechei* son las que más se aíslan derivadas de alguna infección clínica sobre todo en pacientes inmunocomprometidos (Davin-Regli *et al.*, 2019).

#### **2.4.5.5 *Escherichia coli***

Es un bacilo Gram-negativo de la familia *Enterobacteriaceae*, anaerobio, aislado en infantes por primera vez en 1885 por Theodor Escherich, se encuentra normalmente en la microbiota intestinal del ser humano, usualmente se mantiene de forma inocua, sin embargo, algunas cepas de *E. coli* pueden generar infecciones en sus huéspedes; estas pueden limitarse a las superficies mucosas o pueden distribuirse en todo el cuerpo ocasionando enfermedades entéricas y diarreicas (Canata *et al.*, 2016; (Pakbin *et al.*, 2021).

A continuación, se señalan los grupos de *E. coli* de acuerdo al mecanismo de patogenicidad reconocidos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica conocida como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC, VTEC o STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli*

enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez-Angeles, 2002).

#### **2.4.5.6 ETEC**

La infección por ETEC es causada por comer alimentos y agua contaminados, esto ocurre constantemente en lugares en donde el acceso a agua potable es escaso lo que dificulta la limpieza y eliminación de excretas en las cuales ETEC puede llegar a sobrevivir más de seis meses y en el agua forma una biopelícula que facilita su supervivencia previa infección (Zhang *et al.*, 2022).

ETEC es el patotipo de *E. coli* más asociado con los decesos de infantes menores de 5 años, también se le atribuyen los mayores casos de diarrea del viajero. ETEC se les denomina a aquellas cepas de *E. coli* que contienen la enterotoxina termolábil (LT) y/o la enterotoxina termoestable (ST) las cuales se adhieren al intestino del ser humano (Gómez-Duarte, 2014).

Por otro lado, ETEC también se ha localizado en animales como porcinos, caprinos y perros en los cuales ingresa por vía oral en el estómago, el duodeno y el yeyuno, si bien para que se considere una infección de ETEC en humanos la dosis infectiva debe ser de  $10^8$  microorganismos, en animales la dosis infecciosa puede ser más baja (Dubreuil *et al.*, 2016).

Hay dos etapas en el proceso de infección por ETEC (ver figura 1) la primera es la adherencia al epitelio del intestino y la segunda en la liberación de toxinas. La primera etapa es posible gracias a factores de colonización (CF -*colonization factors*- por sus siglas en inglés) ubicados en la superficie de la bacteria los cuales son fimbrias o polímeros de proteínas filamentosas extracelulares los cuales de acuerdo a su morfología pueden clasificarse como fimbrial, fibrilar, helicoidal o afimbrial y se han descrito hasta ahora 25 tipos diferentes (Zhang *et al.*, 2022).

La segunda etapa consiste en liberar las toxinas como LT y ST; LT está formada por una subunidad A que está rodeada por cinco subunidades B idénticas entre sí y ST es un péptido con alrededor de 18 aminoácidos incluidos en su cadena la cual secreta una toxina que fosforila el canal CFTR (canal regulador transmembrana de fibrosis cística, por sus siglas en inglés) llevando a cabo la salida

de sales y agua que se traduce en una diarrea severa, los estudios han señalado que ETEC puede producir LT, ST o ambas (Ríos-Muñiz *et al.*, 2019).

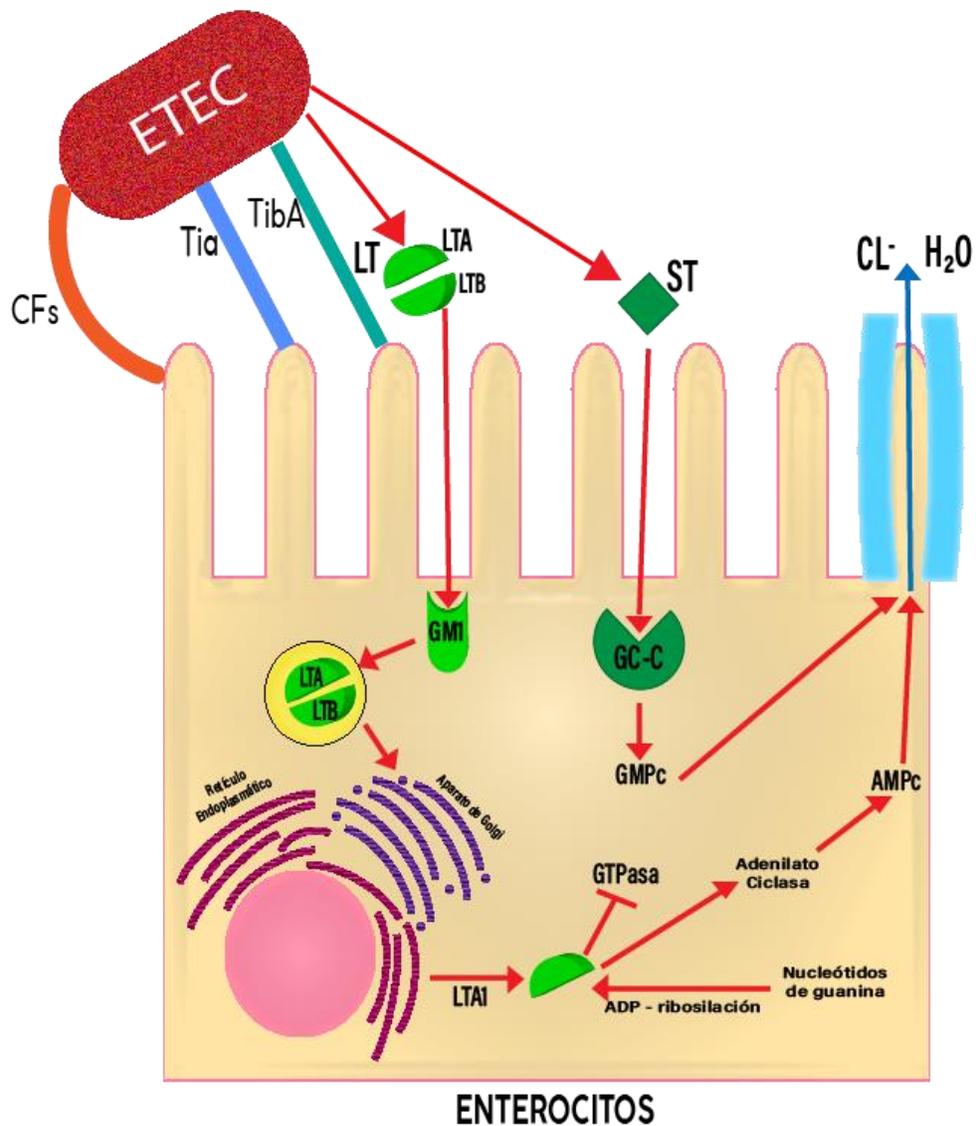


Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de ETEC en el enterocito. Modificado de Farfán-García *et al.*, (2016).

#### 2.4.5.7 EPEC

Este patotipo se caracterizó por primera vez en Reino Unido en 1945 durante un brote de diarrea en lactantes con una alta tasa de morbilidad y mortalidad en infantes menores de seis meses. Dentro de los factores de virulencia de EPEC están el mecanismo de adherencia y esfacelamiento (A/E) compartidos con otros patógenos como EPEC de conejo, *Citrobacter rodentium* en ratones, STEC y *Escherichia albertii*. La leche y carne molida son alimentos en donde EPEC puede estar presente afectar al humano y otros animales (Pakbin *et al.*, 2021).

En países en vías de desarrollo, EPEC ha causado brotes epidémicos especialmente en lugares cerrados en donde concurren infantes como lo son las guarderías y hospitales llegando a tener cifras de 121 455 muertes por este patotipo el cual tiene un periodo de incubación de tres a 24 horas en donde la diarrea puede estar acompañada de fiebre y vómitos (Farfán-García *et al.*, 2016).

De acuerdo al modelo de patogénesis se reconoce tres etapas que ocurren consecutivamente: a) adherencia inicial, b) transducción de señales y c) anclaje íntimo. En la primera etapa EPEC crece en microcolonias en la superficie de los enterocitos, esta unión se da a través de un *pilus* formador de paquetes (BFP) codificado por un plásmido (Savkovic *et al.*, 2005).

Después, EPEC envía señales intracelulares que son inducidas por un grupo de proteínas pertenecientes al sistema de secreción tipo III (T3SS) y son enviadas al enterocito. Estas proteínas se encuentran codificadas en el locus de esfalecimiento del enterocito (LEE) que mediante tres diferentes dominios de virulencia codifica: 1) el sistema de secreción tipo III; 2) proteínas que secreta EPEC (Esp por sus siglas en inglés); y 3) los genes *eae* (para la adhesina bacteriana íntima) y su receptor llamado Tir (receptor de íntima translocado) (Vidal-Grañiel, 2003).

Estas proteínas efectoras tienen un papel en el daño del enterocito: EspA y EspF forman conductos para la translocación de EspB y EspD hacia el enterocito, Map (proteína asociada a la mitocondria) como su nombre lo menciona está presente en los cambios de potencial de membrana, EspF reorganiza la nucleolína para bloquear el proceso del ARN receptor, EspG altera los microtúbulos en células

epiteliales, EspC está involucrada en la citotoxicidad y formación de pedestales y poros (Farfán-García *et al.*, 2016).

La última etapa se reconoce por la unión de EPEC hacia el enterocito mediante la formación de pedestales de actina. Tras haberse unido la proteína Tir con la intimina, ésta se fosforila por la proteína c-Fyn, luego Tir fosforilada recluta e interactúa con proteínas reguladoras del citoesqueleto como WASP (proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich) y el complejo Arp2/3. Estas proteínas se activan y comienza la polimerización de actina en el lugar donde está el Tir fosforilado lo que provoca la reorganización del citoesqueleto, alterando la forma normal del enterocito y pérdida de microvellosidades (Vidal *et al.*, 2007).

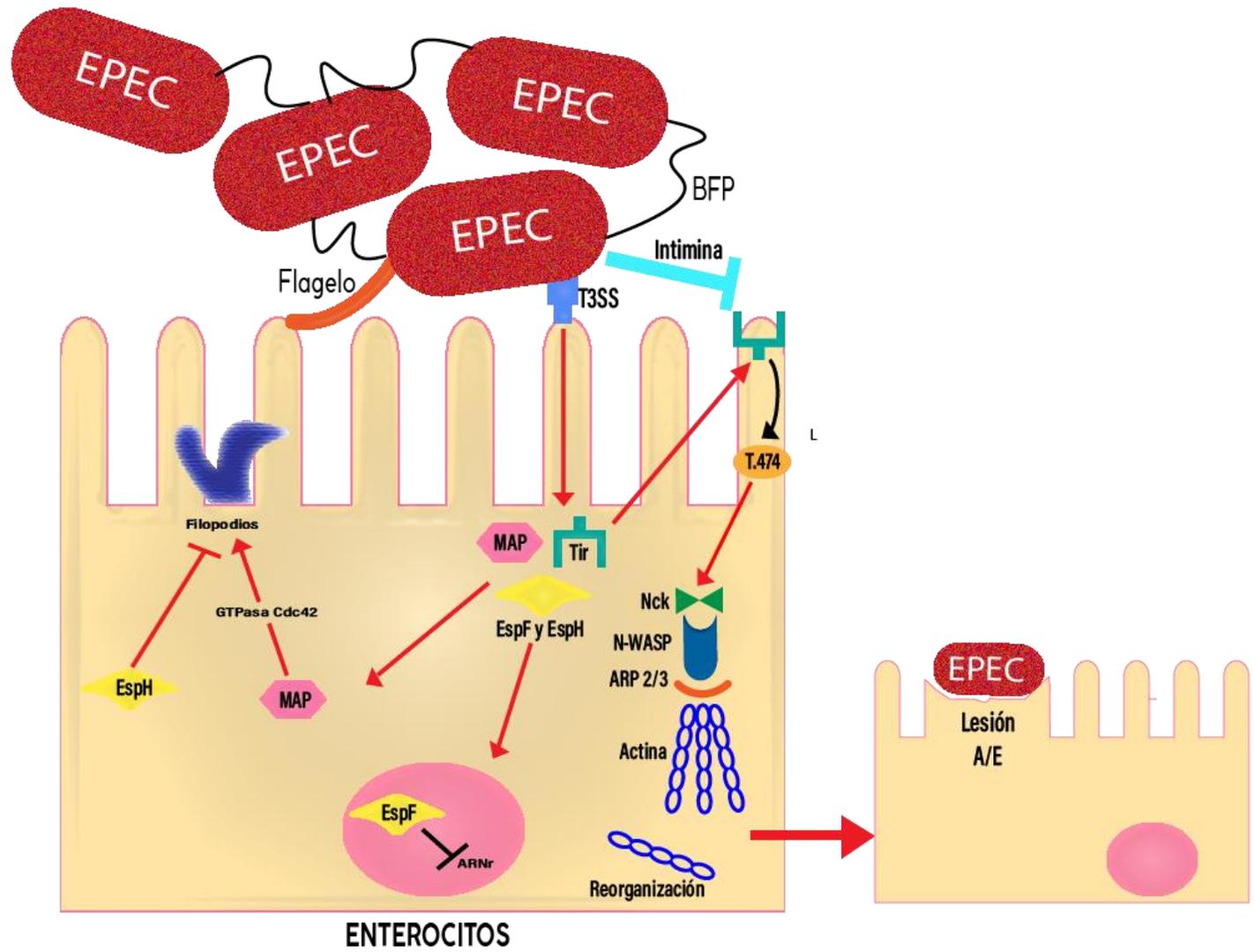


Figura 2. Mecanismo de patogenicidad de EPEC hacia el enterocito. Modificado de Farfán-García *et al.*, (2016).

#### 2.4.5.8 STEC

Las infecciones provocadas por STEC fueron reportadas por primera vez en Estados Unidos de América en 1982, posteriormente, en el 2011 en Alemania se produjo un brote de síndrome urémico hemolítico (SHU) provocado por un serotipo correspondiente a STEC que ocasionó la muerte de al menos 32 personas y más de 1 000 personas infectadas (Seni-Pinoargote, 2015). El SHU es un desorden multisistémico caracterizado por insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia grave, afecta principalmente a infantes de seis meses a cinco años de edad, de clase media, con buenas condiciones sanitarias y ambientales (Rivero *et al.*, 2004). Además de ocasionar SHU, STEC comienza con una diarrea acuosa y sanguinolenta una vez colonizado el intestino, también puede provocar necrosis intestinal, perforación colónica y manifestarse como colitis hemorrágica grave (Detzner *et al.*, 2022).

STEC encuentra su reservorio en el microbiota intestinal de animales que son de importancia alimentaria para el ser humano como es el caso de los bovinos, por lo que se ha encontrado que alimentos derivados de estos mamíferos como carnes, leche no pasteurizada y yogures artesanales son productos en donde STEC puede infectar a los humanos (Bravo y Villalobos de Bastardo, 2002; Seni-Pinoargote, 2015). También se han registrado infecciones de este patotipo a causa de agua contaminada derivada de heces de rumiantes (Detzner *et al.*, 2022).

El primer mecanismo de patogenicidad de este patotipo es la adherencia al enterocito, similar al descrito para EPEC según Farfán-García *et al.*, (2016) quienes mencionan que este proceso se lleva a cabo por la intimina y el T3SS. Como en EPEC, la unión de la intimina y el Tir promueve la unión de STEC al enterocito.

Después STEC libera las exotoxinas Stx1 y Stx2 que son parecidas a las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae* tipo 1; éstas son responsables de ocasionar SHU en el huésped que STEC infecta, pero Stx2 se considera más importante que Stx1 debido a que contiene un gen que exhibe mayor virulencia (Detzner *et al.*, 2022).

Stx1 y Stx2 migran a las células objetivo por diferentes procesos. La macropinocitosis (MPC) ocurre cuando Stx entra en contacto con las células que no

expresan en sus membranas globotriaosilceramida 3 (Gb3) como lo son los enterocitos, después ocurre la transcitosis, en donde Stx migra de los enterocitos hacia otro espacio extracelular a través de vesículas y por último ocurre la endocitosis cuando se une la subunidad B de la toxina al receptor Gb3, que mediante invaginación de la membrana celular la toxina es introducida al citoplasma, donde la subunidad A induce cambios en la célula como la inhibición de las síntesis de proteínas y la apoptosis (Farfán-García *et al.*, 2016).

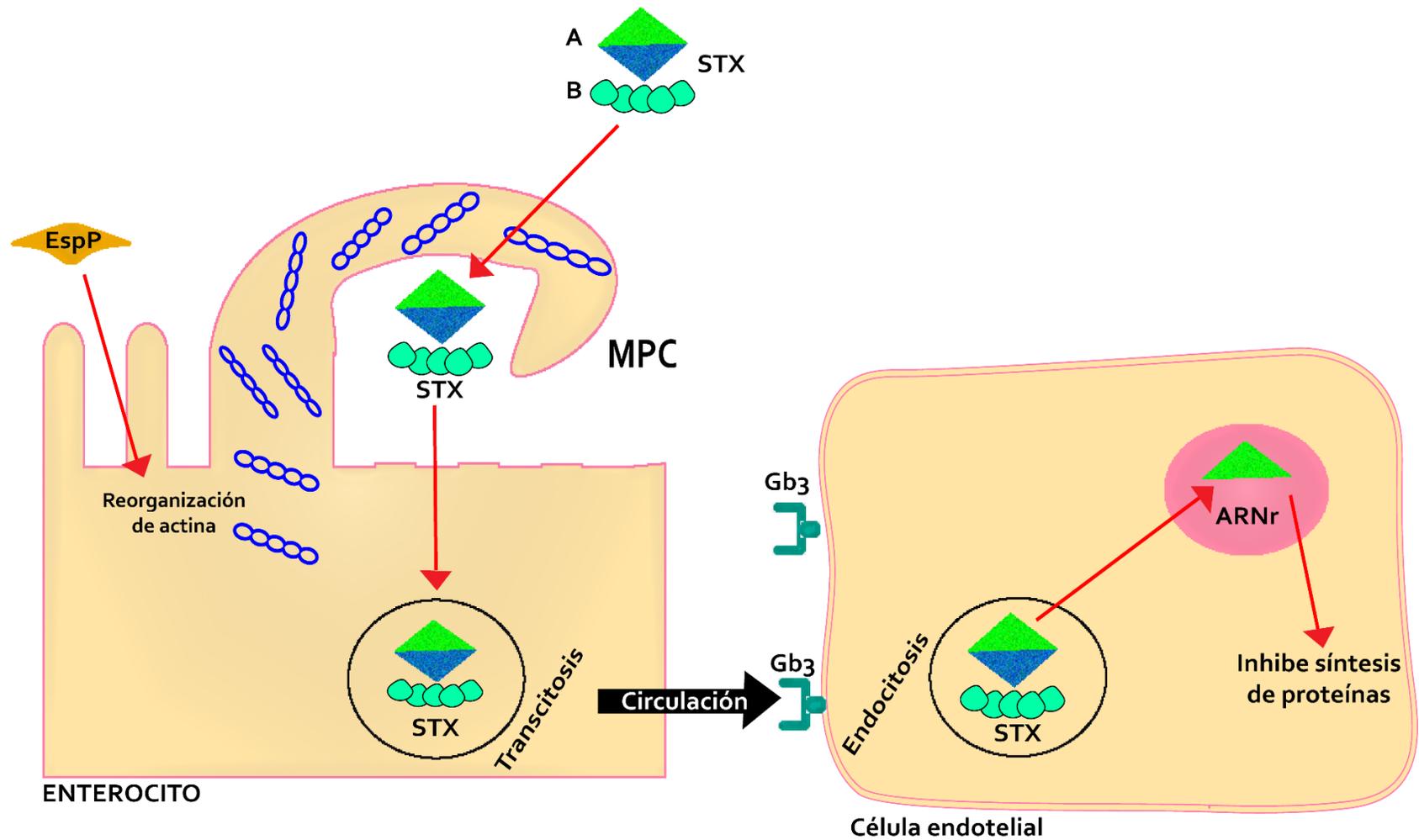


Figura 3. Mecanismo de patogenicidad de STEC en el enterocito y la célula endotelial. Modificado de Farfán-García *et al.*, (2016).

#### 2.4.5.9 EAEC

Uno de los primeros registros de este patotipo data de 1985 cuando se aisló de un niño en Perú (Nataro *et al.*, 1995) desde entonces se han registrado casos sobre infecciones solamente en humanos los cuales presentan diarrea acuosa no necesariamente sangrienta, con moco, fiebre, dolor abdominal, náuseas, vómito y también infecciones en el tracto urinario, bacteriemia y sepsis. También se le destaca como la *E. coli* diarreogénica en individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia adquirida (Ríos-Muñiz *et al.*, 2019; Coveñas *et al.*, 2014). En México, EAEC es el patógeno bacteriano más común aislado de alimentos, dado que un saneamiento deficiente aumenta la propagación de este patotipo (Philipson *et al.*, 2013).

Una característica particular de EAEC es adherirse a las células epiteliales HEp-2 con una forma de ladrillos apilados que si bien está técnica de cultivo celular es útil para la identificación de este patotipo, puede llegar a ser bastante costoso y laborioso en laboratorios de mediana complejidad. Es por ello que las técnicas moleculares permiten una detección más rápida, siendo los genes más estudiados *aggR* (activador transcripcional), el *aap* (codificador de dispersina), el AA probe (codifica una proteína externa) y el gen *astA* (codificador de la enterotoxina) (Lösch *et al.*, 2015).

Las cepas de EAEC cuentan con un plásmido de virulencia denominado pAA de 60 a 67 MDa que codifica las fimbrias de adherencia agregativa (AAF), la toxina Pet (plasmid-encoded toxin), el regulador transcripcional AggR y la proteína de dispersina (codificada por el gen *aap* mencionada anteriormente). En este plásmido se encuentran también codificados los genes para la proteína críptica *shf*, la que fomenta la producción de biopelículas en EAEC. El factor de virulencia clave del plásmido pAA es la proteína AggR que activa un gran grupo de genes de virulencia que permiten la adherencia y la producción de citotoxinas y enterotoxinas (Philipson *et al.*, 2013; Ríos-Muñiz *et al.*, 2019).

En la adhesión también están involucradas proteínas de membrana externa como Hra-1 (Hra: *heat-resistant agglutinin 1*) con actividad aglutinina y adhesina, Hra-2 con actividad adhesina y Tia que es homóloga a Hra-1 con actividad invasora

y adhesina. Por su parte, en la colonización bacteriana participa un complejo denominado Aat, el cual se encarga del transporte de la dispersina codificada por el gen *aap*, esta dispersina que promueve la colonización de la mucosa del intestino del huésped (Farfán-García *et al.*, 2016).

Se pueden reconocer tres estadios en la infección de EAEC hacia su huésped los cuales están descritos por Philipson *et al.*, (2013):

Durante la primera etapa, EAEC se adhiere a la mucosa intestinal en un patrón agregativo (AA) caracterizado porque las células adoptan una forma de ladrillos apilados, mediada por AAF para la propagación, esta bacteria secreta la dispersina la cual es hidrofóbica (cargada positivamente) lo que promueve interacciones electrostáticas con la capa externa de lipopolisacáridos de las bacterias evitando que AAF se adhiera a la membrana bacteriana.

La segunda etapa consiste en la estimulación de las células epiteliales para producir moco sobre los enterocitos formando una biopelícula en la que EAEC está presente formando microcolinas que le protegen.

En la última etapa, EAEC secreta las enterotoxinas y citotoxinas que provocan una respuesta inflamatoria, esta toxicidad puede derivar en cambios morfológicos en las microvellosidades y aumenta la extrusión de células epiteliales.

Se han identificado tres enterotoxinas: la enterotoxina 1 termoestable de EAEC (EAST1), la enterotoxina Pet y la enterotoxina 1 de *Shigella* (ShET1). EAST1 está codificada por el gen *astA* y altera la producción de GMPc, lo cual inhibe el sistema de transporte Na/Cl que reduce la absorción de electrolitos, resultando una secreción alta de agua en las células criptas (Farfán-García *et al.*, 2016); (Philipson *et al.*, 2013). Pet genera toxicidad en las células, alterando el citoesqueleto, lo cual produce un redondeo y desprendimiento de células (Estrada-Garcia y Navarro-Garcia, 2012). ShET1 parece inducir la secreción intestinal a través de cAMP y cGMP, pero su mecanismo no ha sido bastante estudiado (Philipson *et al.*, 2013).

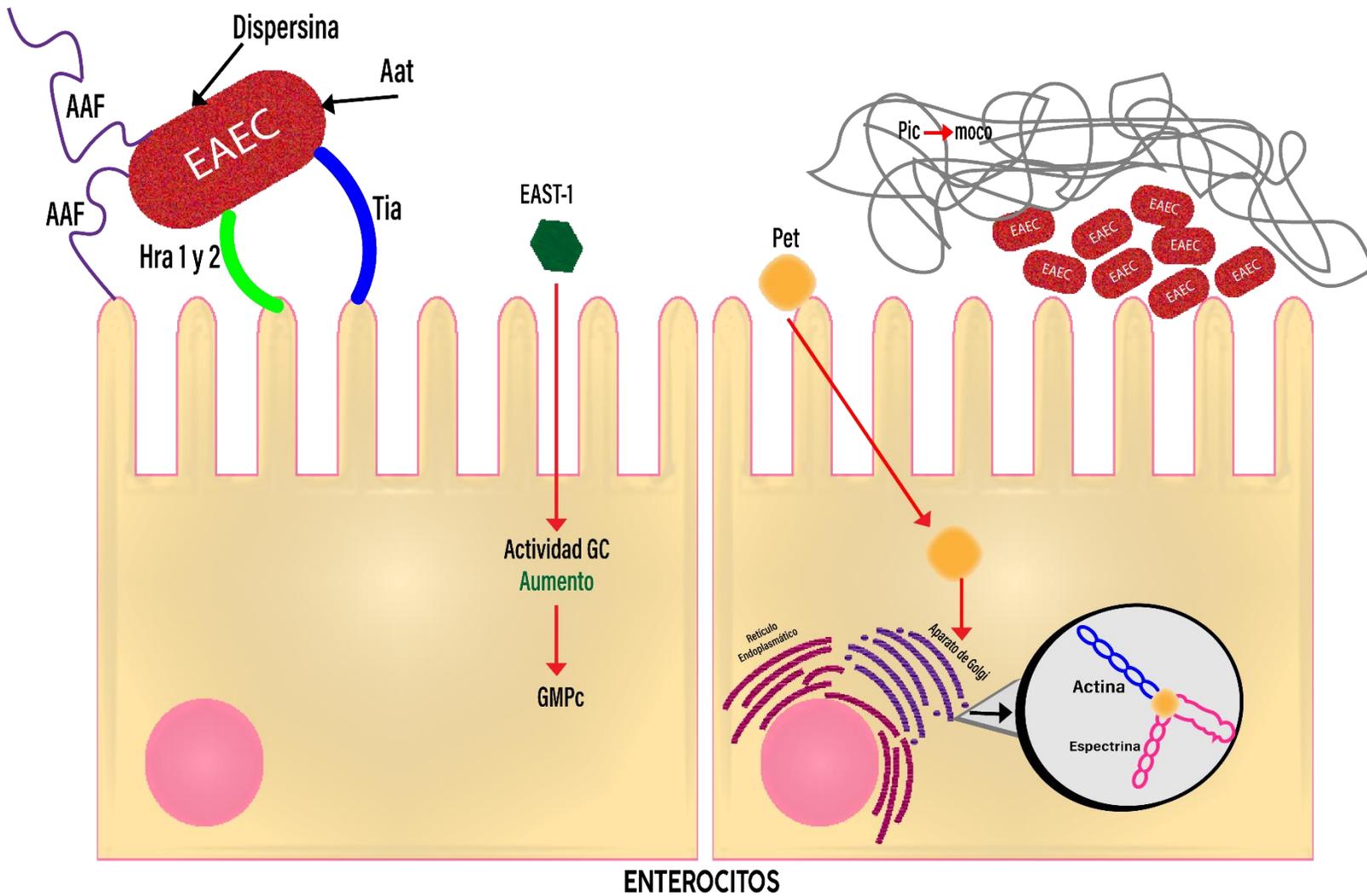


Figura 4. Mecanismo de patogenicidad de EAEC en el enterocito. Modificado de Farfán-García *et al.*, (2016).

#### 2.4.5.10 EIEC

EIEC es uno de los patógenos que causa disentería bacilar, la cual se caracteriza por dolor estomacal, diarrea acuosa con sangre y moco, pero en algunos casos puede presentar únicamente la diarrea; por ello, se confunde con el patotipo ETEC. Sin embargo, una diferencia en EIEC es que es comúnmente identificado en brotes y no en casos únicos, esto se debe a que se puede transmitir de persona en persona, por ingestión de alimentos contaminados y a través del agua contaminada (Rodríguez-Angeles, 2002).

Se han identificado brotes de EIEC en los países en desarrollo en especial aquellos donde hay un déficit de saneamiento, aunque Europa también registra brotes causados por este patotipo, como el brote en Hungría en 1959, en Checoslovaquia en 1982, en Israel en 1990 y en Italia en 2012 (Newitt *et al.*, 2016).

EIEC contiene un plásmido de virulencia de más de 200 kb de nombre pINV (plásmido de invasión grande) el cual codifica un T3SS que contiene los genes *mxi*, *spa*, genes *ipaB*, *ipaC*, *ipaD* e *icsA* que se encargan de efectuar la invasión y diseminación en las células objetivo (Iqbal *et al.*, 2022; Michelacci *et al.*, 2020).

EIEC accede al epitelio intestinal, la bacteria ingresa del lumen hacia la submucosa a través de las células M en las placas de Peyer, después las bacterias son fagocitadas por macrófagos (Pasqua *et al.*, 2017). En este sitio la proteína IpaB lisa la vacuola y se induce una apoptosis vía caspasa 1, donde EIEC accede con libertad y son reconocidas por los receptores CD44 y  $\alpha 5\beta 1$  integrina a través de IpaB y el complejo IpaBCD. Mediante VirG localizada en un extremo de EIEC, se promueve la aproximación de la proteína N-WASP, que por medio de la polimerización de actina se forma un complejo VirG\*N-WASP\*actina lo cual ayuda a la motilidad de EIEC para propagarse a células adyacentes, junto a VirA (localizada en el otro extremo de EIEC) permite en paso a células proximales mediante protuberancias (Farfán-García *et al.*, 2016; Pasqua *et al.*, 2017).

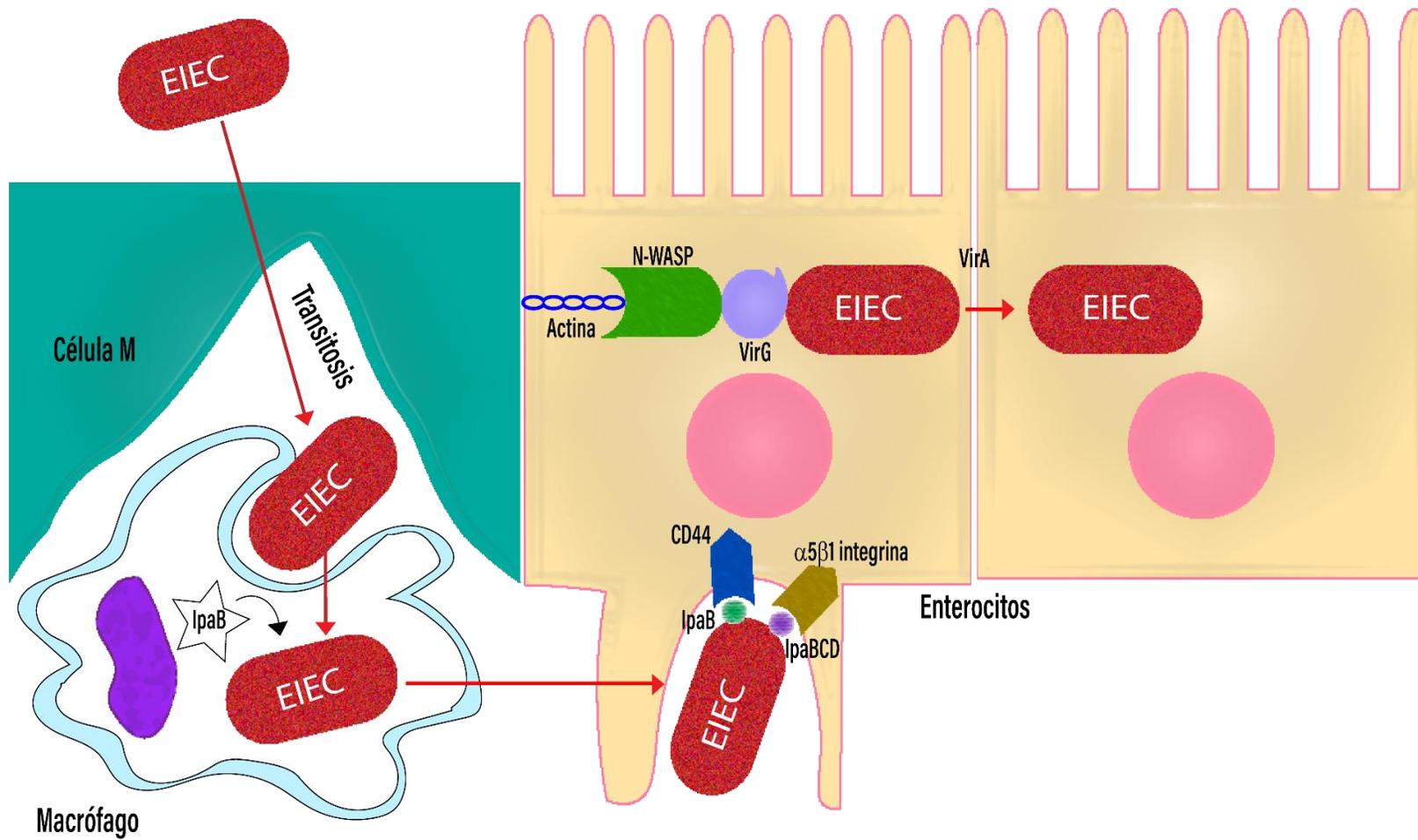


Figura 5. Mecanismo de patogenicidad de EIEC en el enterocito. Modificado de Farfán-García *et al.*, (2016).

#### 2.4.5.11 DAEC

El patotipo DAEC está asociado a enfermedades en el tracto urinario, complicaciones en el embarazo y diarrea en infantes de 18 meses a 5 años, aunque se han presentado casos en donde también ocasiona fiebre (Servin, 2014; Meza-Segura *et al.*, 2020). DAEC ha sido el patotipo de *E. coli* más prevalente que se ha identificado en personas que han visitado América Latina y en pacientes VIH positivos provenientes de Perú (Meza-Segura y Estrada-García, 2016).

DAEC expresa las adhesinas Afa, F1845 y Dr codificadas por los genes *afa*, *daa* y *dra*. La mayoría de estas adhesinas se unen al factor acelerador del deterioro (hDAF o CD55 como también es conocido) o por las moléculas de adhesión celular del antígeno carcinoembrionario (hCEACAM) ambas moléculas localizadas en la superficie de las células epiteliales intestinales (Meza-Segura *et al.*, 2020). Una vez que Afa/Dr se unen a los receptores del enterocito hDAF o hCEACAM se activa la quinasa Src la cual es necesaria para la motilidad y organización de hDAF alrededor de DAEC, se daña la membrana celular lo que ocasiona un elongación, daño en las microvellosidades y reordenamiento de las proteínas del citoesqueleto lo que genera una permeabilidad mayor en el enterocito, también ocurre la activación de MAP quinasa (*Mitogen-Activated Protein*) que induce la producción de IL-8 logrando la migración de polimorfonucleares favoreciendo el daño de los enterocitos mediante las citocinas proinflamatorias (Farfán-García *et al.*, 2016).

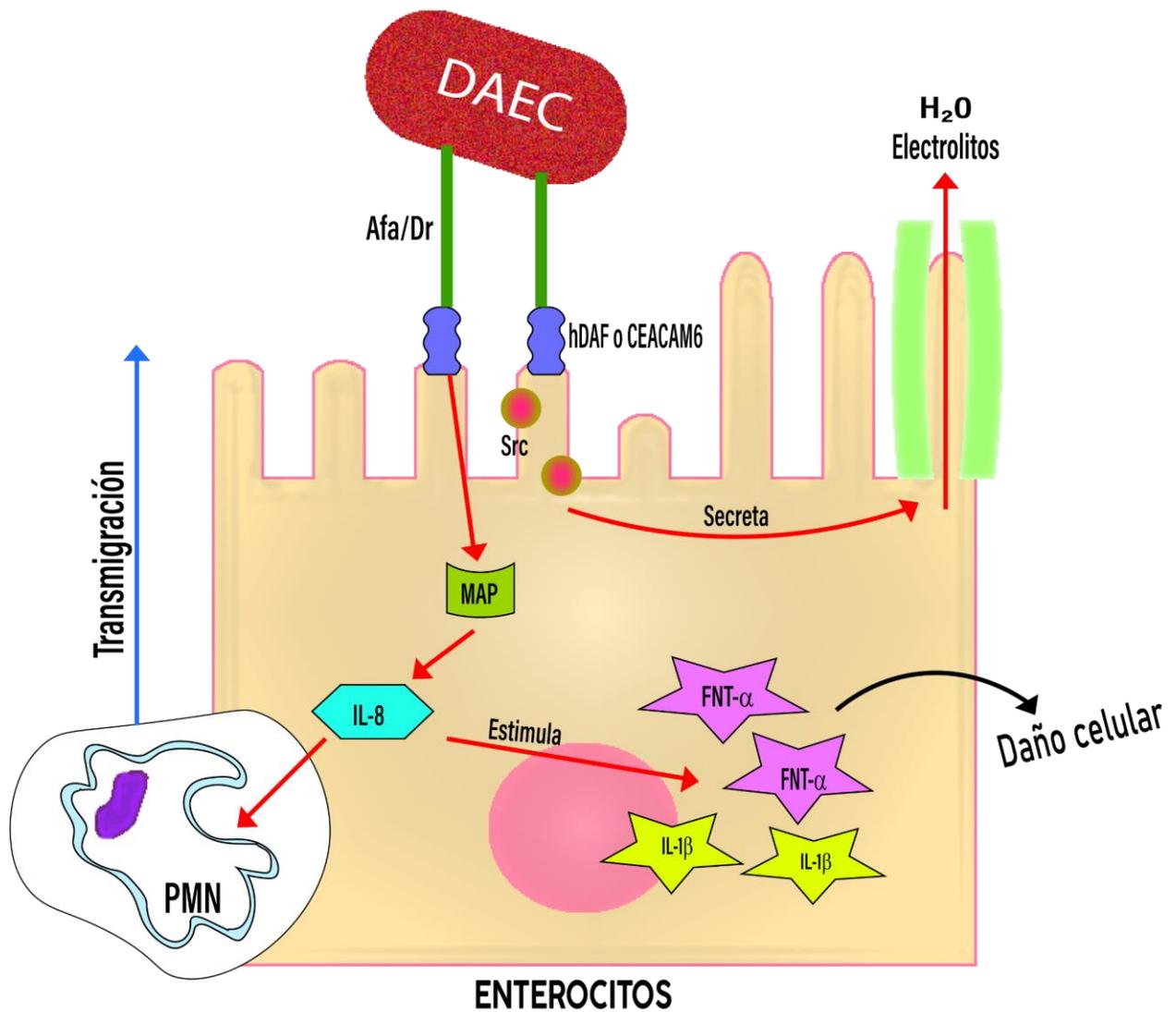


Figura 6. Mecanismo de patogenicidad de DAEC en el enterocito.

Se presentan los diferentes tipos de microorganismos encontrados en las heces de los humanos (figura 7).

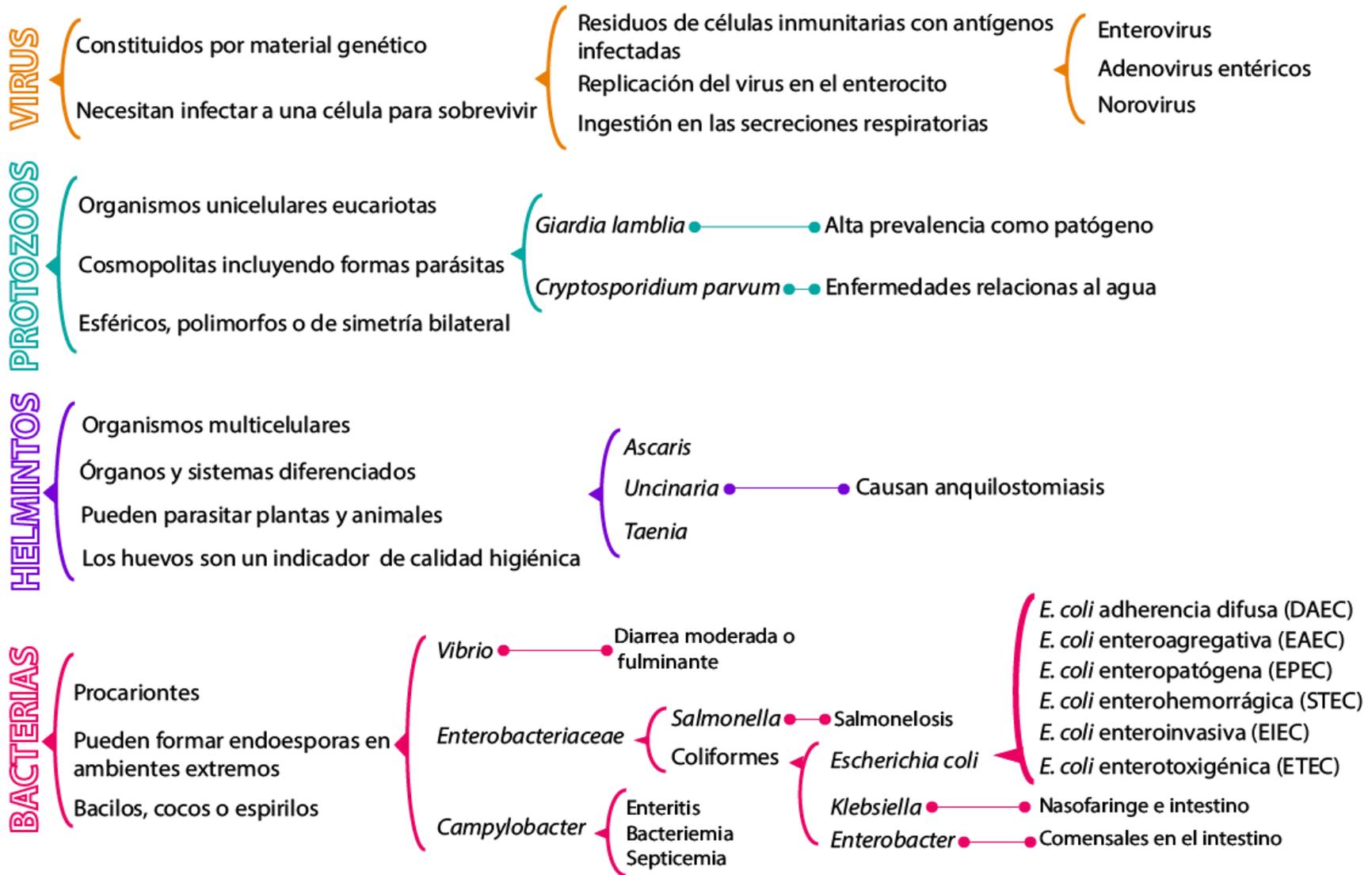


Figura 7. Microorganismos presentes en las heces humanas.

### III. ANTECEDENTES

El estudio de la eficacia de los SES se ha analizado anteriormente, Redlinger *et al.*, (2001) hicieron un estudio acerca de la supervivencia de coliformes fecales en este tipo de baños en tres comunidades de Ciudad Juárez, Chihuahua. Se cuantificaron los coliformes fecales, el contenido de humedad de las compostas, la fluidez de gases, la temperatura y la exposición solar. El estudio concluye que existen diferentes maneras de tratar las compostas y una de ellas es la desecación, la cual es la mejor opción para eliminar los coliformes fecales. Sin embargo, esto no es sinónimo de una composta estéril, debido a que patógenos que forman esporas o huevos podrían quedar latentes.

La implementación de los SES no ha sido solo en México, estudios como los de Mindreau-Ganoza *et al.* (2016) mostraron un tratamiento de las heces fecales depositadas mediante un proceso de fermentación ácido láctica en Pamplona Alta, Lima, Perú. Este estudio se enfoca en las etapas para obtener un abono del compostaje de las heces, menciona que se tiene que tener un pre-tratamiento y de ello se deposita una mezcla que denominan “Biolac” el cual es un insumo bacteriano que contiene *Lactobacillus* sp., los que fermentan este material orgánico, consiguiendo la estabilización e inhibición de patógenos en las heces fecales.

Por otra parte, Piceno *et al.* (2017) investigaron la estructura de la comunidad bacteriana transformada después del compostaje termofílico de desechos humanos en Haití. Las muestras se tomaron de compostajes en *Port-ar-Prince* donde se recolectan heces provenientes de baños públicos y privados de los alrededores. Se hizo una extracción de ADN y se identificaron familias bacterianas como *Erysipelotrichaceae*, *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae*, en tanto que los géneros fueron *Prevotella*, *Escherichia* y *Shigella*.

Otro estudio realizado en México es el de Xicali-Nava (2018), en el que analizaron los coliformes fecales e identificaron *Salmonella* sp. en residuos sólidos provenientes de SES en dos diferentes zonas rurales de Puebla. El estudio concluye que a pesar de tener índices significativos de coliformes fecales (1 100 NMP/g) y *E. coli* (1 100 NMP/g) en los primeros dos meses del muestreo, estos valores irían disminuyendo durante 61 semanas hasta llegar a 0 NMP/g para todos los

coliformes. También se menciona que *Salmonella* sp. está presente en las primeras seis semanas del compostaje y en la séptima semana comienza su inhibición hasta llegar en la semana 61 cuando no se encuentre ningún rastro de ella.

En el presente trabajo se pretende aportar la detección y aislamiento de coliformes fecales que pudieran crecer a diferentes tiempos en biosólidos de los SES usados por la comunidad El Mirador, Berriozábal, Chiapas. También resolver las incógnitas que rodean este propósito como lo pueden ser en qué mes habrá más coliformes, si llegarán a crecer algunas otras bacterias, cuáles serán los parámetros bioquímicos más idóneos para tener un biosólido libre de coliformes y otras bacterias.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 GENERAL

Determinar la dinámica de los coliformes fecales en biosólidos de sanitarios secos ecológicos de “El Mirador”, Berriozábal, Chiapas.

### 4.2 PARTICULARES

- Determinar las variables dependientes como temperatura, pH y humedad de los biosólidos obtenidos periódicamente.
- Cuantificar los coliformes fecales en biosólidos a diferentes tiempos.
- Detectar variantes de *E. coli* diarreogénicas y *Salmonella* spp. en los biosólidos.
- Conocer los datos demográficos de los habitantes de El Mirador, Berriozábal, Chiapas.

## V. ZONA DE ESTUDIO

La zona de estudio se encuentra en la comunidad “El Mirador”, con coordenadas 16°51´55´´N y 93°21´23´´W (ver figura 8) ubicado en el municipio de Berriozábal, Chiapas. Este municipio está a 900 m.s.n.m. y colinda al norte con Tecpatán y Copainalá; al sureste con Tuxtla Gutiérrez; al este con San Fernando y al oeste con Ocozacoautla de Espinoza.

La hidrografía está constituida por la región hidrológica Grijalva-Usumacinta; la cuenca del río Grijalva-Tuxtla Gutiérrez; diferentes subcuencas como El Chapopote, Río Netzahualcóyotl, Río Suchiapa, Río Alto Grijalva y Río de la Venta; así como corrientes de agua perennes como La Florida e intermitentes como El Sabinal. El rango de temperatura es de 22° a 28° C, con un rango de precipitación de 900 – 2000 mm con un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano, una humedad media de 42.68 % de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2010).

Berriozábal cuenta con una gran extensión de bosque a pesar de la tala de árboles y la quema que se propaga en los meses de sequía; cuenta con una población de 51 722 habitantes, quienes viven con una alta marginación (Farrera-Sarmiento *et al.*, 2020).



Fig. 8. Ubicación de “El Mirador”, comunidad rural cerca de Berriozábal, Chiapas.

## VI. MÉTODOS

### 6.1 OBTENCIÓN DE DATOS DEMOGRÁFICOS

Se hicieron encuestas estructuradas a todos los pobladores de la comunidad para conocer características de su vivienda, higiene personal, obtención y resguardo del recurso hídrico y manejo de los SES (ver anexo 1). Las encuestas se hicieron en la casa ejidal de la comunidad en dónde las familias pasaban por turnos y se entrevistaban de uno en uno a todos los miembros, para la encuesta de los infantes estaba presente un tutor.

### 6.2 TOMA DE MUESTRAS DE BIOSÓLIDOS

Los habitantes de El Mirador iniciaron el almacenamiento de los biosólidos en mayo de 2022 y se recolectaron trimestralmente dos muestras de diferentes sanitarios secos ecológicos (SES) a partir de agosto del mismo año hasta mayo de 2023 (ver cuadro 3). La temperatura de los biosólidos se midió aun estando en la cámara de almacenamiento con una sonda térmica (*BIG DADDY DIAL THERMOMETER -20 + 104 °C / 0 + 220 °F*, France®) insertándolo aproximadamente hasta la mitad de profundidad del contenedor.

Las muestras se recolectaron con el método del cuarteo de acuerdo con la NOM-004-SEMARNAT-2002. Para ello se colocó una lona de vinil de 5 x 5 m y se extendió para depositar el material, posteriormente se mezcló con una pala (cubierta con una bolsa de plástico) para homogeneizar. Después se dividió en cuatro sectores: A, B, C y D y se recolectaron partes opuestas: A y C o B y D hasta tener 1 kg de la muestra. Se transportaron en una hielera en frío inmediatamente al Laboratorio de Microbiología Molecular y Genética del Instituto de Ciencias Biológicas (ICBIol) en la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH).

Cuadro 2. Fechas de recolección de los biosólidos de los SES en El Mirador, Berriozábal, Chiapas

Fecha	Código asignado a la muestra
26 de agosto de 2022	BSC1
	BSC2
25 de noviembre de 2022	BSC3
	BSC4
24 de febrero de 2023	BSC5
	BSC6
26 de mayo de 2023	BSC7
	BSC8

### 6.3 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES

Esta determinación se hizo de acuerdo a la NOM-004-SEMARNAT-2002, tomando 10 g de la muestra directa y secarlas en un horno a 105° C durante 16 horas. Posteriormente se obtuvieron los sólidos totales con la siguiente ecuación:

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

En donde:

a = masa en gramos del lodo directo de la muestra más los gramos del recipiente

b = masa en gramos del lodo secado en horno más los gramos del recipiente

c = masa en gramos del recipiente

La humedad se registró de acuerdo al porcentaje faltante para el 100 % en cada muestra, (por ejemplo, si después de aplicar la fórmula se obtiene 80 % de ST, la humedad sería 20 %).

## **6.4 MEDICIÓN DE pH**

Se tomaron 30 g de cada muestra fresca que se disolvieron en 100 mL de agua destilada y se midió con un potenciómetro (OAKTON®).

## **6.5 ENUMERACIÓN DE COLIFORMES MEDIANTE EL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)**

### **6.5.1 Diluciones para coliformes fecales**

Se mezclaron la cantidad de biosólido que correspondía a 4 g de sólidos totales en 36 mL de agua de disolución para obtener una dilución de  $10^{-1}$ . El agua de disolución consiste en un tampón A y tampón B, los cuales contienen 3.4 % de fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y 0.81 % de cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) en agua destilada, respectivamente.

### **6.5.2 Pruebas presuntivas**

De acuerdo con la NOM-004-SEMARNAT-2002 se prepararon diluciones decimales seriadas a partir de la primera dilución ( $10^{-1}$ ) descrita en el punto anterior. Se transfirieron 1 mL a un tubo de ensaye con 9 mL de caldo lauril sulfato de sodio con púrpura de bromocresol al 0.001 % ( $10^{-2}$ ) y así sucesivamente hasta llegar a una dilución de  $10^{-4}$ . Se incubaron a  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$  por 24 - 48 h. Se consideraron pruebas positivas aquellos tubos que presentaran acidificación (cambio de coloración de púrpura a amarillo) con o sin presencia de gas en el tubo Durham. Las series se hicieron por triplicado.

### **6.5.3 Prueba confirmatoria**

A partir de los tubos con una prueba presuntiva positiva, se hicieron resiembras en caldo EC para organismos coliformes fecales (termotolerantes) y se incubaron a una temperatura de  $44.5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$  por  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  para examinar la producción de gas en el tubo Durham. Las diluciones se hicieron de la misma manera que en el punto anterior, pero considerando a los tubos positivos de lauril como la primera dilución ( $10^{-1}$ ).

**Dilución para coliformes  
(Agua de disolución)**

**Prueba presuntiva  
(Lauril sulfato de sodio con  
púrpura de bromocresol)**

**Prueba confirmatoria  
(Caldo EC)**

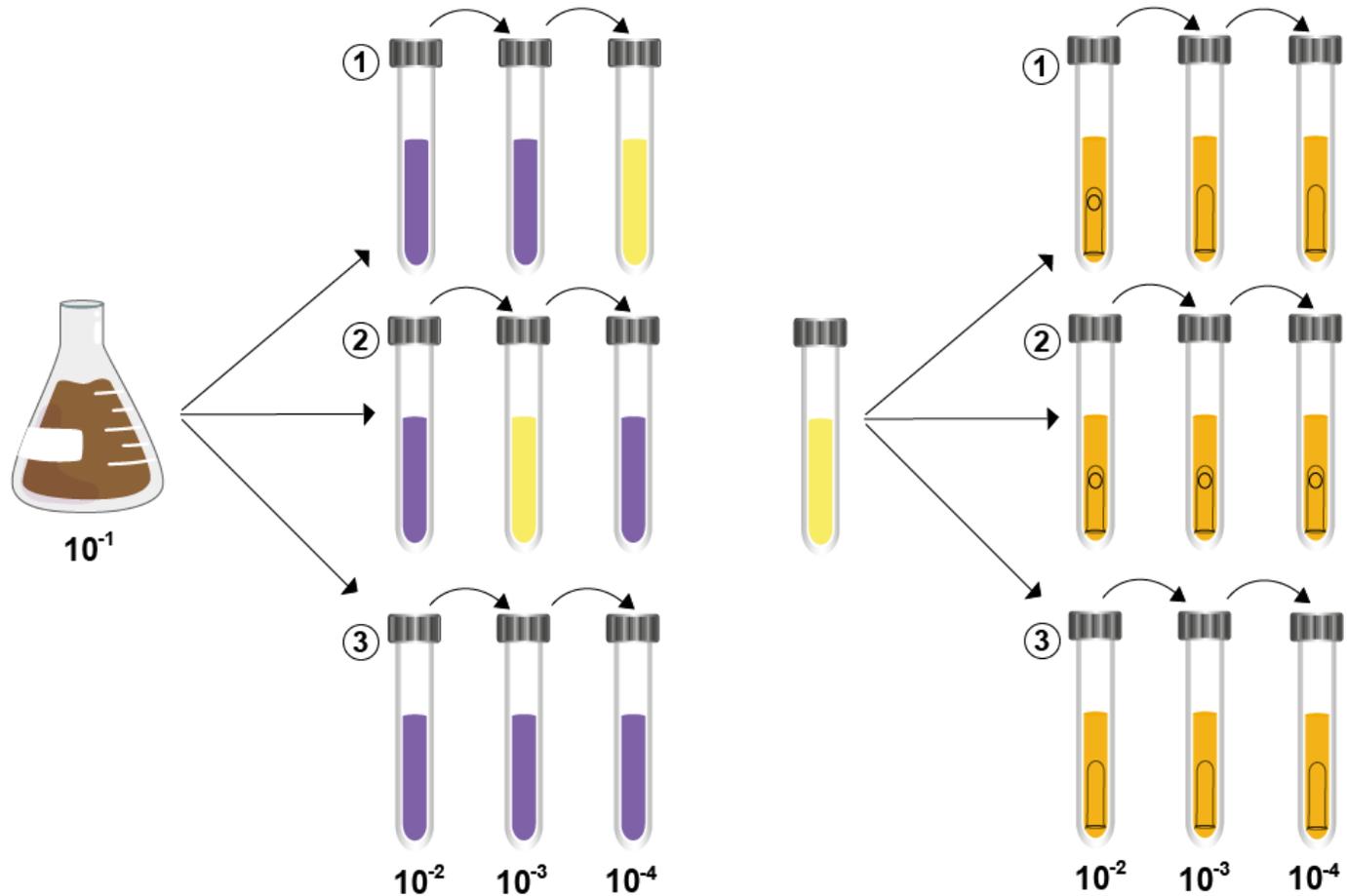


Figura 9. Diagrama para la dilución, prueba presuntiva y confirmatoria de coliformes fecales provenientes de biosólidos.

#### **6.5.4 Expresión del número más probable (NMP)**

De acuerdo a la NOM-004-SEMARNAT-2002 se obtuvo un código considerando únicamente las muestras positivas en el medio EC. Así el NMP se calcula con la siguiente ecuación:

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

### **6.6 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSÓLIDOS**

Los biosólidos se clasificaron de acuerdo a la cantidad de coliformes, expresado como NMP de coliformes en peso seco de acuerdo a la US EPA (1993): tipo A, cuando la densidad de coliformes fecales fue < 1 000 NMP/g ST; tipo B, cuando la densidad de coliformes fecales fue <2 000 000 NMP/g ST.

### **6.7 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAMNEGATIVAS DEL GRUPO COLIFORME**

#### **6.7.1 Medios selectivos**

Partiendo de los tubos positivos en la prueba confirmatoria, se hicieron resiembras en agar Salmonella-Shigella y MacConkey dado que estos medios se utilizan para poner de manifiesto características distintivas de colonias del grupo coliforme que se obtienen (Fernández-Olmos *et al.*, 2011).

#### **6.7.2 Pruebas bioquímicas**

Una vez aisladas las colonias recuperadas en los medios selectivos y diferenciales, se efectuaron pruebas para determinar el perfil bioquímico de las cepas; tales pruebas consistieron en la detección de indol, rojo de metilo, Voges Proskauer, utilización de citrato, movilidad, utilización de lisina y ornitina, fermentación de azúcares en agar de hierro y triple azúcar (MacFaddin, 2003). Alternativamente se usó el sistema miniaturizado comercial API 20 E (BioMerieux, ST Louis, MO, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 6.7.3 PCR para la identificación de *E. coli* con genes de virulencia

Del grupo de coliformes fecales se hizo búsqueda intencionada de los distintos patotipos de *E. coli* diarreogénica mediante PCR y conformes a lo descrito por López-Saucedo *et al.*, (2003) y Cerna *et al.*, (2003) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Se utilizaron cebadores de oligonucleótidos para locus específicos para cada cepa de *E. coli* (ver cuadro 3). Para ello, se prepararon lisados bacterianos en un mililitro de agua desionizada y se sometieron a baño María a punto de ebullición durante un minuto. Cada tubo de PCR contuvo 24 µL de mezcla de reacción, formada por 12 µL de la mezcla *GoTaq Green Master Mix*, 10.5 µL de agua libre de nucleasa y 1.5 µL del lisado bacteriano más un microlitro de cada mezcla de *primers*. Los tubos se sometieron a ciclos de 50° C durante dos minutos (un ciclo); 95° C durante cinco minutos (un ciclo); 95° C, 50° C y 72° C durante 45 segundos cada uno (40 ciclos); y finalmente 72° C durante 10 minutos en un termociclador, para el caso de EAEC, los ciclos fueron de 50° C durante dos minutos (un ciclo); 95° C durante cinco minutos (un ciclo); 95° C, 55° C y 72° C durante 45 segundos cada uno (40 ciclos).

Se usaron como controles los siguientes patotipos que se encuentran depositados en el cepario de la UNICACH (Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2015): *E. coli* enteroagregativa 042 (O44:H18), *E. coli* enteropatógena E2348/69 (O127:H6), *E. coli* secretora de toxina Shiga EDL933 (O157:H7), *E. coli* enteroinvasiva E11 (O124 NM) y *E. coli* enterotoxigénica H10407 (O78:H11).

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2.5 % teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL).

Cuadro 3. *Primers* utilizados para la identificación de *E. coli* patógenas (López-Saucedo *et al.*, 2003); (Cerna *et al.*, 2003).

<b>Categoría de <i>E. coli</i></b>	<b>Locus</b>	<b>Primers (5' a 3')</b>	<b>Tamaño del amplicón (pb)</b>
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
EPEC	<i>bfpA</i>	F: AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC R: GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	324
	<i>eaeA</i>	F: GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC R: CCA CCT GCAGCA ACA AGA GG	384
STEC	<i>stx1</i>	F: CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G R: AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	150
	<i>stx2</i>	F: GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC R: TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	255
EIEC	<i>ial</i>	F: GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA R: GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC	650
EAEC	<i>aap</i>	F: CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG R: AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC	310
	<i>aggR</i>	F: CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA R: AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG	457
	<i>AA probe</i>	F: CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT R: CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T	629

F: *forward* (directo); R: *reverse* (reverso).

## **6.8 ENUMERACIÓN DE *SALMONELLA SP.* MEDIANTE EL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP).**

### **6.8.1 Diluciones con medio de enriquecimiento para *Salmonella sp.***

Se hicieron diluciones decimales seriadas comenzando con  $10^{-1}$  y llegando a  $10^{-4}$ . Las diluciones se hicieron de la misma manera que para los coliformes fecales, aunque se usó como diluyente 36 mL de caldo tetratonato y se incubaron durante  $22 \pm 2$  horas a  $37^{\circ} \text{C} \pm 0.2^{\circ} \text{C}$ .

### **6.8.2 Preparación de diluciones en caldo selectivo para *Salmonella sp.***

A partir de los tubos incubados de caldo de tetratonato se hicieron resiembras en caldo selenito cistina que se incubaron durante  $24 \pm 2$  horas a  $41^{\circ} \text{C} \pm 0.2^{\circ} \text{C}$ . Se tomaron como positivos los tubos que viraron a una coloración anaranjada intensa.

### **6.8.3 Expresión del número más probable.**

Se utilizó la misma fórmula proporcionada por la NOM-004-SEMARNAT-2002 para coliformes fecales.

## **6.9 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *SALMONELLA*.**

### **6.9.1 Medios selectivos**

Se retomaron los tubos positivos del caldo de selenito cistina, se hicieron resiembras en agar *Salmonella-Shigella* que se incubaron a  $35^{\circ} \text{C}$  durante 24 horas. Se tomaron como colonias sospechosas las de tonalidad translúcida (lactosas negativas), transparente u opacas con o sin centro negro.

### **6.9.2 Pruebas bioquímicas.**

Las colonias recuperadas del medio *Salmonella-Shigella* se analizaron con las pruebas bioquímicas mencionadas anteriormente.

## **6.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Las variables dependientes de los biosólidos como temperatura, pH, NMP de coliformes, humedad y sólidos totales se registraron en una base de datos en *Excel*

(<https://data.mendeley.com/datasets/d4yhphvf8w/1>) y se analizaron mediante estadística descriptiva para obtener la media y desviación estándar. La prueba de Shapiro-Wilk se usó para analizar la normalidad de los datos. Para determinar diferencias estadísticamente significativas en los datos de cada biosólido colectado a lo largo de los meses, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis (prueba no paramétrica), el cual es idéntico a la prueba ANOVA con los datos reemplazados por categorías. El valor de significancia estadística se estableció cuando  $p \leq 0.05$ . Los análisis estadísticos se hicieron con el programa SPSS (versión 25), luego de importar los datos capturados en Excel. Además de analizar los datos con el programa antes mencionado, también se usó como alternativa el programa *Sigmaplot* (versión 12.0).

## VII. RESULTADOS

### 7.1 DATOS DEMOGRÁFICOS

A principios del año 2022, se instalaron los SES en la comunidad El Mirador por parte de la organización interdisciplinaria Operación Bendición México, Estos SES cuentan (Figura 10) con un lavamanos, un mingitorio, una regadera y una taza con separación para las heces y orina (Figura 12). Estos SES están hechos principalmente de lámina galvanizada con medidas de 1.91 m de alto por 2.83 m de ancho por 1.90 de profundidad (Figura 11).

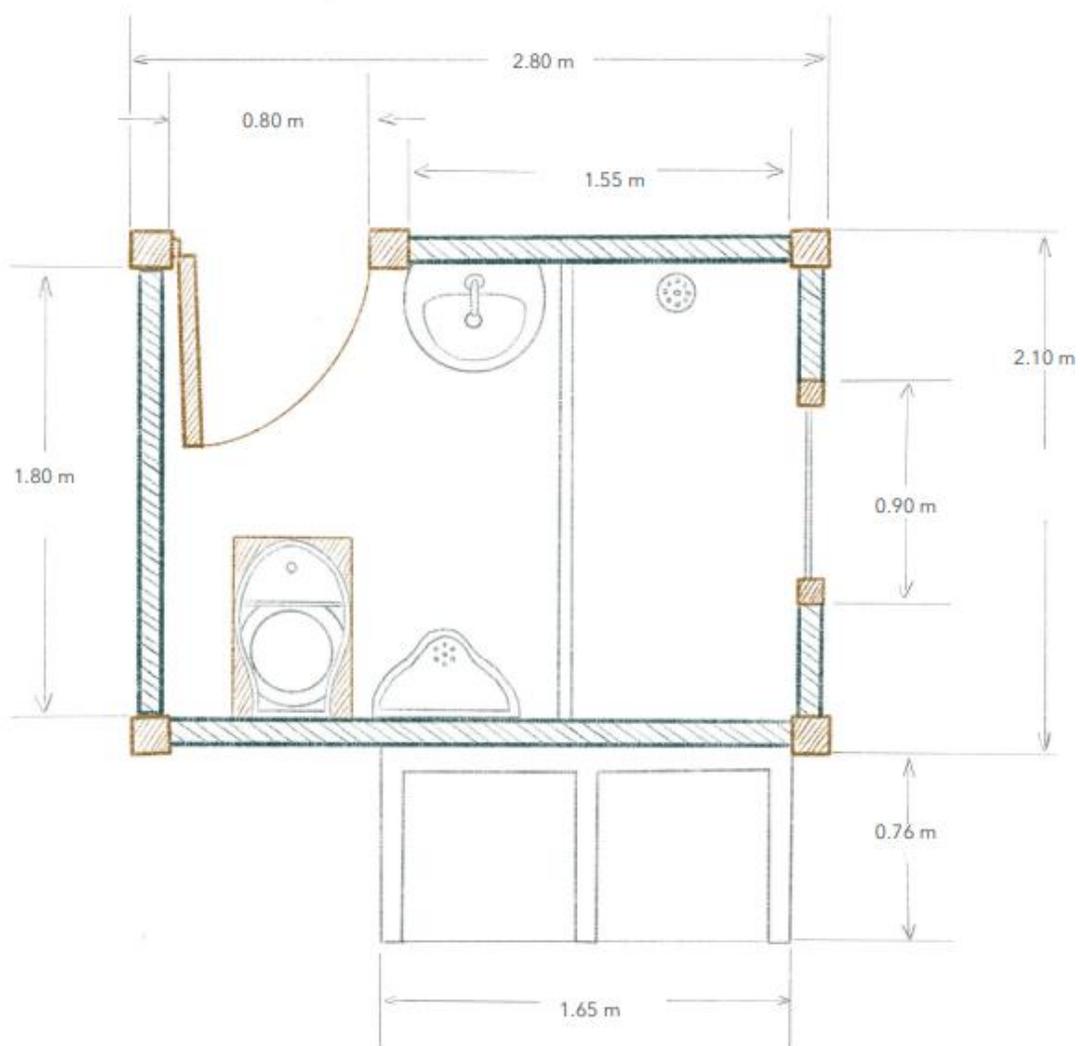


Figura 10. Plano de un SES construido en El Mirador, Berriozábal, Chiapas, (Rivera-Parra, 2022).

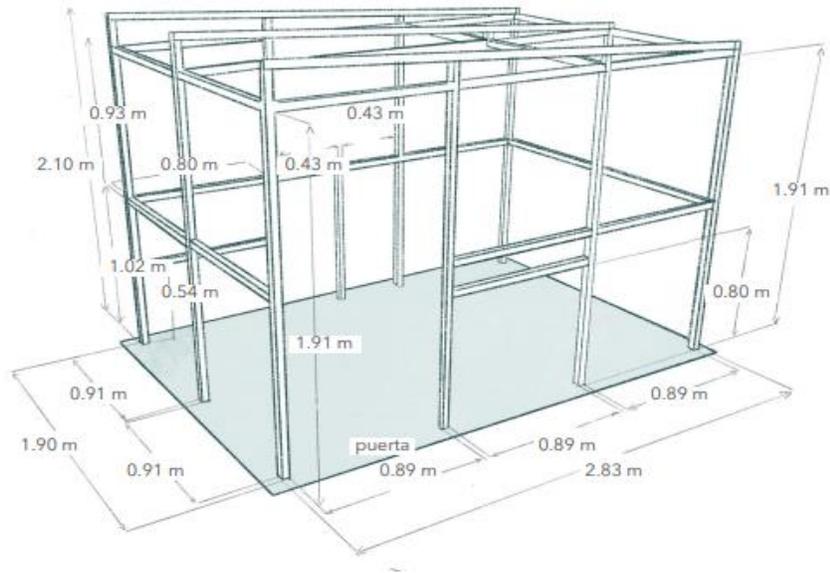


Figura 11. Diseño arquitectónico de los SES construidos en El Mirador, Berriozábal, Chiapas (Rivera-Parra, 2022).



Figura 12. Taza con división para orina y heces instalados en los SES de El Mirador, Berriozábal, Chiapas (Rivera-Parra, 2022).

También se instalaron contenedores en donde se depositan los biosólidos provenientes de los SES el cuál fue denominado “popostero” por la comunidad de El Mirador. Este popostero (Figura 13) cuenta con dos cámaras impermeables hechas con láminas de metal de 0.73 m de ancho por 0.64 m de ancho por 0.60 m

de profundidad, aproximadamente; cada cámara está destinada a contener seis meses de biosólidos, haciendo en conjunto un año de captación.

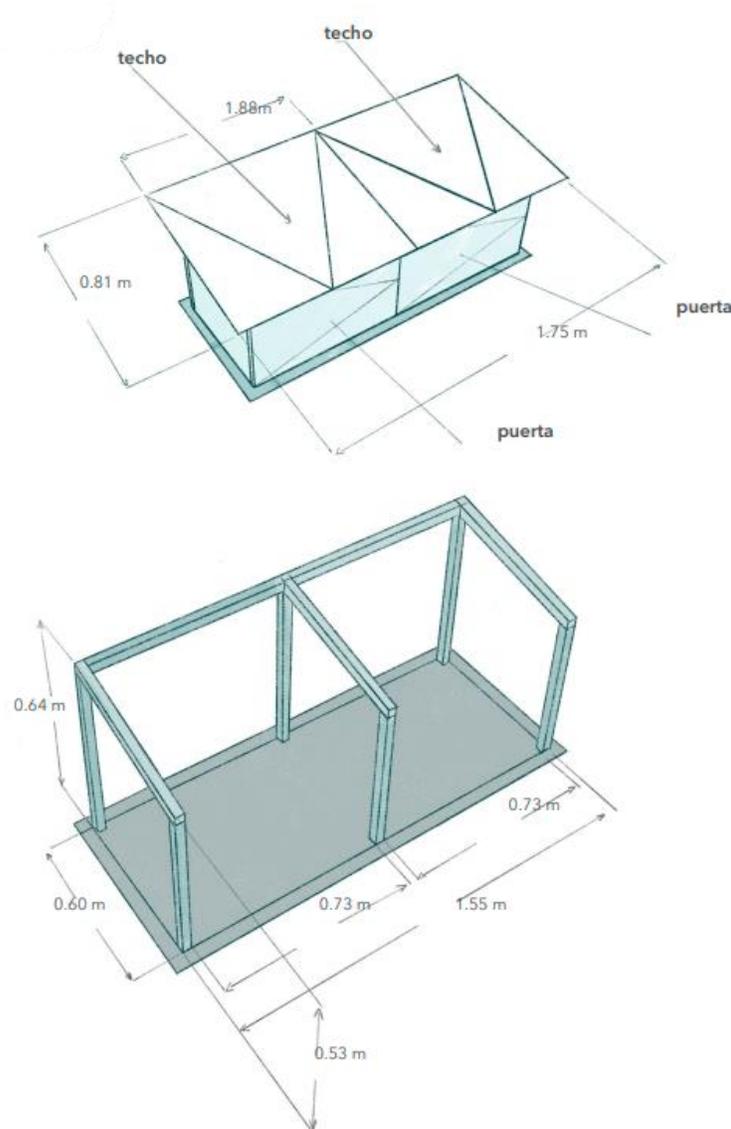


Figura 13. Diseño arquitectónico del contenedor “popostero” instalado en El Mirador, Berriozábal, Chiapas (Rivera-Parra, 2022).

Se recabaron respuestas de todas las personas (38) usuarias de los SES en El Mirador, quienes conforman las 12 familias de dicha comunidad. De estas personas, la mitad son del sexo femenino (50 %) y la otra mitad de sexo masculino (50 %). De acuerdo con el tipo de vivienda, la mayoría viven en una casa con suelo de tierra (72.9 %), en tanto que sólo 10.8 % de las casas tienen piso de cemento. Todas las

personas conservan el agua de consumo y uso en un tinaco equipado con un ecofiltro, proveído por la organización Operación Bendición México (OBM). Respecto a la higiene personal, menos de la mitad (46.6 %) manifestaron lavarse las manos más de cinco veces al día, en tanto que la mayoría lavan sus alimentos antes de consumirlos (89.4 %). Por otro lado, 52.6 % de las personas permanece descalzo dentro de su hogar.

## 7.2 VARIABLES DEPENDIENTES DE LOS BIOSÓLIDOS

La temperatura de los biosólidos fue más alta en los 3 y 12 meses de almacenamiento, en tanto que a los 6 y 9 meses fue menor (cuadro 4), (figura 14).



Figura 14. Registro de temperatura en una muestra de biosólido dentro del depósito de almacenamiento.

El pH fluctuó entre 9.7 a 11.2 unidades, sin embargo, estas variaciones no fueron significativas. Por otro lado, la cantidad de sólidos totales se incrementó de manera significativa con el transcurso de los meses, es decir, las muestras de 3 meses de almacenamiento contenían mayor humedad con respecto a las de 12 meses. Respecto a la cantidad de coliformes fecales, se registraron valores de  $26 \times 10^3$

NMP/g de ST a los 3 meses, de 0 a los seis meses, en tanto que los biosólidos de 9 meses exhibieron las cantidades mayores de coliformes fecales.

Cuadro 4. Características fisicoquímicas y bacteriológicas de los biosólidos en El Mirador, Berriozábal, Chiapas.

Variable	Tiempo de almacenamiento (meses) del biosólido (N=2 muestras de biosólido por mes)				P
	3	6	9	12	
Temperatura (°C) media (±DE)	22 (0)	20 (0)	18 (0)	24 (0)	0.01
pH (unidades) media (±DE)	10.1 (0.7)	11.2 (0.6)	9.7 (2.4)	11 (0.9)	0.60
Sólidos Totales (%) media (±DE)	76 (5.6)	85.5 (2.1)	88.5 (2.1)	92.5 (0.7)	0.01
Humedad (%) media (±DE)	24 (5.6)	14.5 (2.1)	11.5 (2.1)	7.5 (0.7)	0.01
Coliformes fecales (NMP/g ST) media (±DE)	26 x 10 <sup>3</sup> (24041.6)	0 (0)	12 x 10 <sup>5</sup> (1697056.2)	465 x 10 <sup>2</sup> (65760.9)	0.68

En la figura 15A se muestra un tubo con caldo lauril sulfato positivo a coliformes fecales, inoculado con el biosólido BSC1. En la reacción positiva hay un cambio a color amarillo (viraje del indicador de pH púrpura de bromocresol en medio ácido) y presencia de gas en la campana Durham, resultado de la fermentación de lactosa por los coliformes. En contraste, la figura 15B no presenta ningún crecimiento, por

lo tanto, no hay un cambio de color (se mantiene de color morado claro). En la figura 16A se observa una prueba negativa para coliformes en el caldo EC, en tanto que en la figura 16B una prueba positiva, nótese la presencia de una burbuja de gas en la punta de la campana Durham, resultado de la fermentación de lactosa por parte de los coliformes.

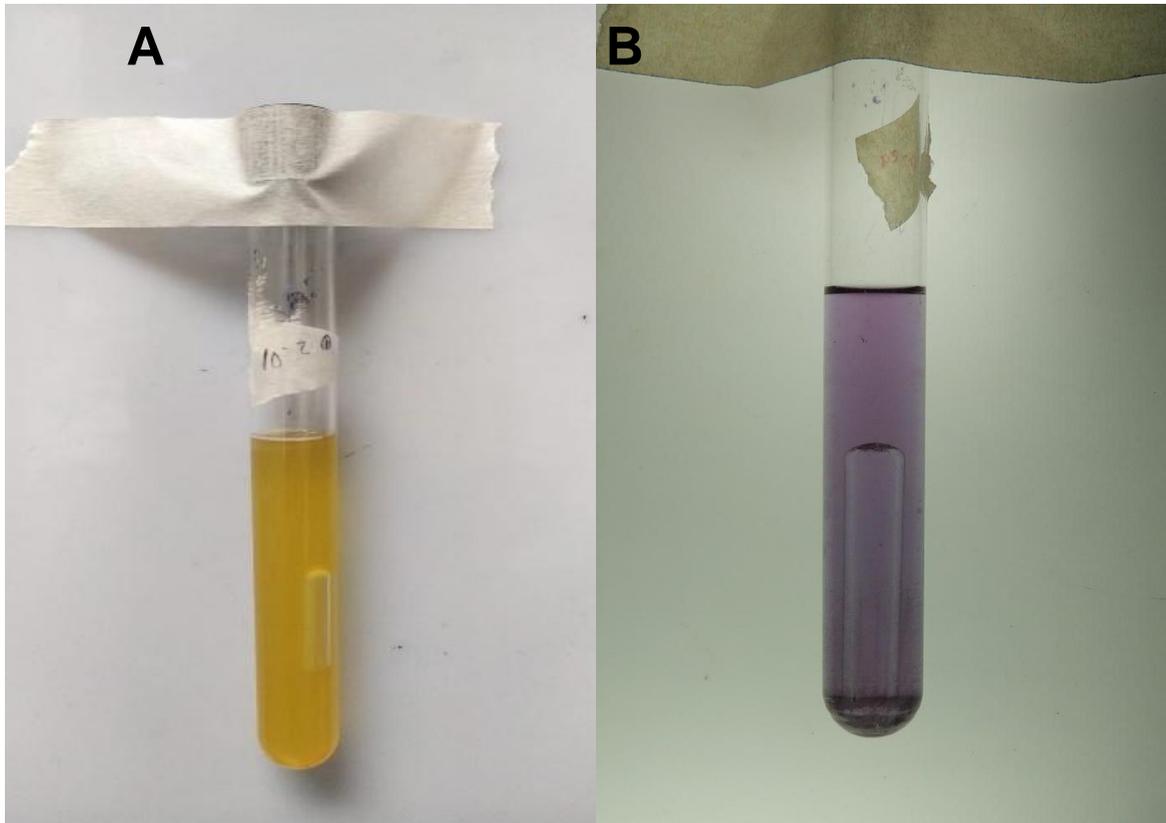


Figura 15. Prueba presuntiva de coliformes fecales en el caldo lauril sulfato de sodio.

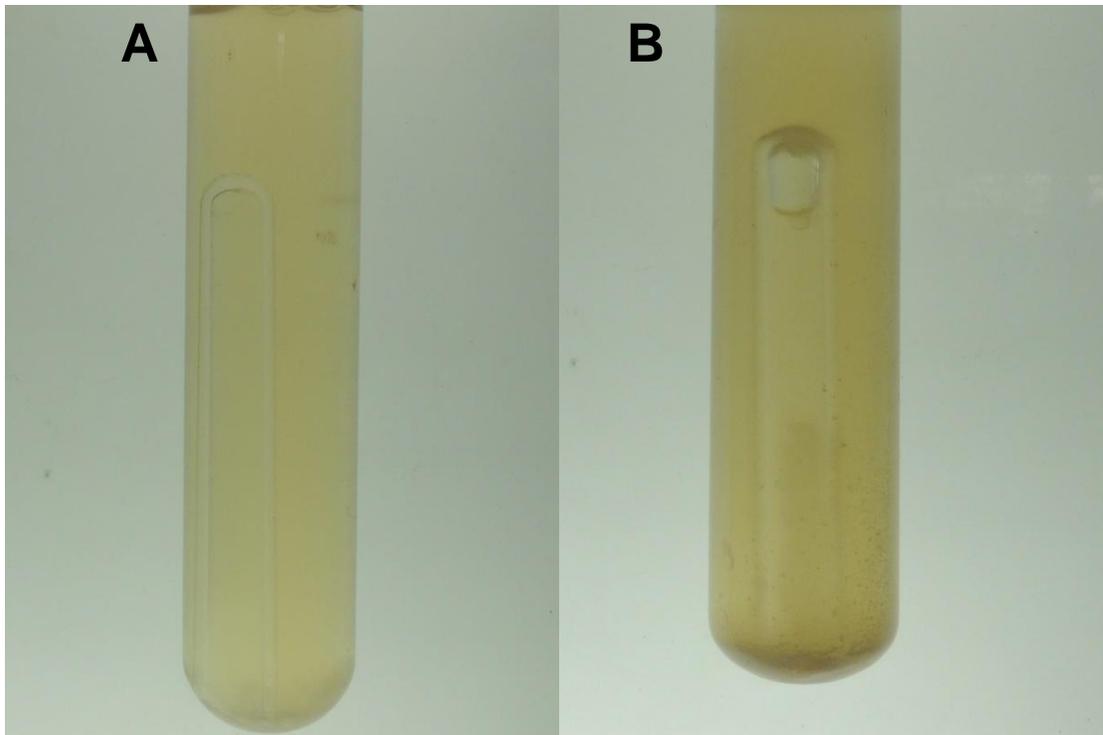


Figura 16. Comparación de prueba negativa y positiva para el medio EC

### 7.3 CLASIFICACIÓN DE BIOSÓLIDOS

Las muestras colectadas a los 3 meses de almacenamiento se clasificaron como tipo B, en tanto que las de 6 meses tuvieron una clasificación tipo A. Una de las muestras de 9 meses tuvo una clasificación tipo A, en tanto que la otra no se ubicó en alguna categoría por exceder el límite permitido de coliformes fecales. Finalmente, las dos muestras de 12 meses de maduración se clasificaron como tipo B (cuadro 5). En la figura 17A se aprecia que a menor tiempo de compostaje el color del biosólido un café intenso y en la figura 17B que cuanto más tiempo de compostaje ocurre, el color es reemplazado por una coloración gris opaca.

Cuadro 5. Clasificación de los biosólidos de BSC en El Mirador, Berriozábal, Chiapas.

Almacenamiento en meses	Muestra	Clasificación (NMP/g ST)
3	BSC1	B ( $43 \times 10^3$ )
	BSC2	B ( $9 \times 10^3$ )
6	BSC3	A (0)
	BSC4	A (0)
9	BSC5	A (0)
	BSC6	N/D ( $24 \times 10^5$ )
12	BSC7	N/D ( $93 \times 10^3$ )
	BSC8	A (0)



Figura 17. A, Biosólido a los tres meses de almacenamiento; B, mismo material a los 12 meses de almacenamiento,

## 7.4 IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS

A partir de las pruebas positivas en el caldo EC, se hicieron resiembras en agar de MacConkey y crecieron colonias de color rosa mexicano con aspecto mucoso (figura 18). De acuerdo a su perfil bioquímico (cuadro 6) se identificaron como bacterias del género *Enterobacter*. Así en la muestra de biosólido BSC1 se recuperaron *E. agglomerans* y *E. cloacae*, mientras que en la muestra BSC2 sólo *E. cloacae*.



Figura 18. Colonias rosa mexicano con fenotipo mucoide aisladas de los biosólidos BSC1 y BSC2.

Cuadro 6. Perfil bioquímico de las enterobacterias aisladas de los biosólidos BSC1 y BSC2.

TSI	LIA	M	I	O	CITRATO	RM	VP	Enterobacteria	Nombre de la cepa
A/A	K/A	-	-	-	+	-	+	<i>Enterobacter agglomerans</i>	BSC1-E1
A/A gas	K/A gas	+	-	+	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>	BSC1-E2
A/A	K/K gas	+	+	+	+	-	+	<i>Enterobacter spp</i>	BSC1-E3
A/A gas	K/A gas	+	-	+	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>	BSC1-E4
A/A	K/A gas	+	-	+	+	-	+	<i>Enterobacter spp</i>	BSC2-E1
A/A	K/A	+	-	+	+	-	+	<i>Enterobacter spp</i>	BSC2-E2
A/A gas	K/A	+	-	+	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>	BSC2-E3

TSI (*Triple Sugar Iron*), agar de hierro y triple azúcar; LIA (*Lysine Iron Agar*), agar de hierro y lisina; M, Movilidad; I, Indol; O, Ornitina; RM, Rojo de Metilo; VP, Voges Proskauer; A/A, Ácido/Ácido; K/A, Alcalino/Ácido; K/K, Alcalino/Alcalino.

En la figura 19 se visualizan los resultados de las pruebas bioquímicas. Para TSI, un resultado A/A significa que el microorganismo presente ha fermentado tanto glucosa como lactosa y/o sacarosa por fermentación anaeróbica y también en la oxidativa siendo el organismo responsable anaeróbico facultativo. Para LIA, la lisina es un sustrato que se utiliza para cuantificar cualitativamente presencia de enzimas decarboxilasa para que el organismo de lugar a una amina alcalinizando el medio en condiciones anaerobias, entonces K/A se considera un resultado negativo (no descarboxilación de lisina), en tanto que K/K significa que tanto la superficie como el fondo son alcalinos, por lo tanto, hubo descarboxilación de lisina.

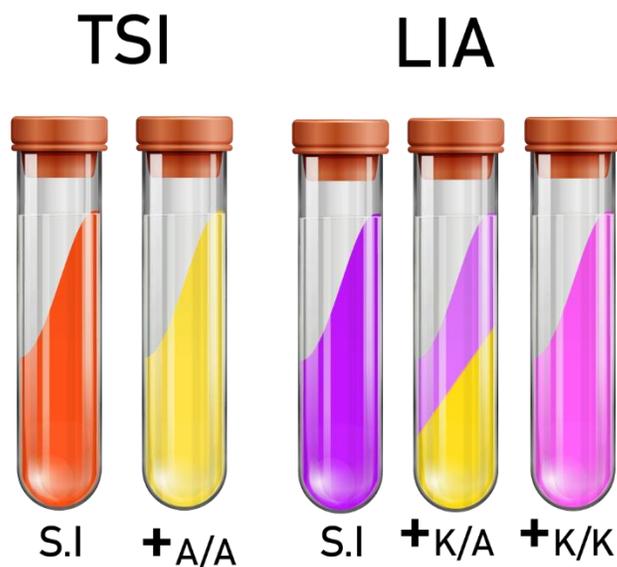


Figura 19. Resultados de pruebas TSI y LIA. En donde: S.I, sin inocular; +A/A, ácido/ácido y +K/A, alcalino/ácido.

El medio MIO (Figura 20) permite observar: la movilidad, la producción de indol y el uso de la ornitina. La movilidad del microorganismo es negativa cuando hay crecimiento en la zona en donde se inoculó y es positiva cuando el crecimiento es alrededor del sitio de inoculación y por todo el tubo. El indol es positivo cuando se visualiza un anillo rojo resultado de la presencia de este compuesto orgánico bicíclico, resultado de la descomposición de triptófano (sustrato de la enzima

triptofanasa bacteriana), finalmente, si la bacteria exhibe la enzima ornitina descarboxilasa, descompondrá a la ornitina alcalinizando el medio.

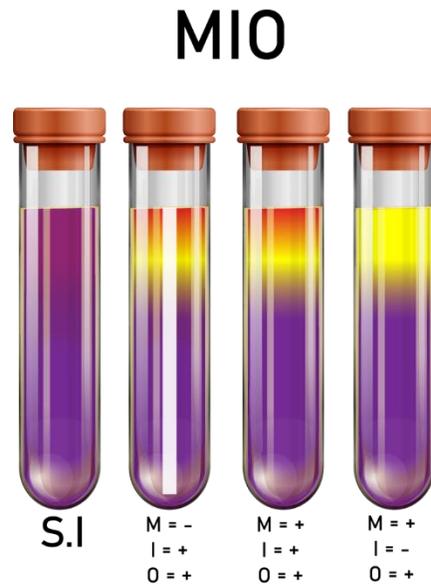


Figura 20. Resultados de la prueba MIO en donde: S.I, sin inocular; M, movilidad; I, indol; O, ornitina; +, positivo y -, negativo.

En la figura 21 se puede observar la prueba de Citrato de Simmons, la cual es positiva cuando el medio pasa de color verde a un azul intenso (contiene el indicador de pH de bromotimol) debido a la alcalinización del medio por virtud que el organismo utiliza al citrato como única fuente de carbono para su metabolismo. La prueba MR-VP (que por sus siglas en inglés significa rojo de metilo y Voges Proskauer), son positivas cuando aparece un color rojo en el medio. Si la bacteria metaboliza la glucosa en la prueba de MR se obtienen productos finales como el ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico, disminuyendo el pH lo que permite la aparición del color rojo intenso. En la prueba VP si la bacteria metaboliza la glucosa el producto final es el acetil metil carbinol que se evidencia al agregar alfa naftol e hidróxido de potasio.

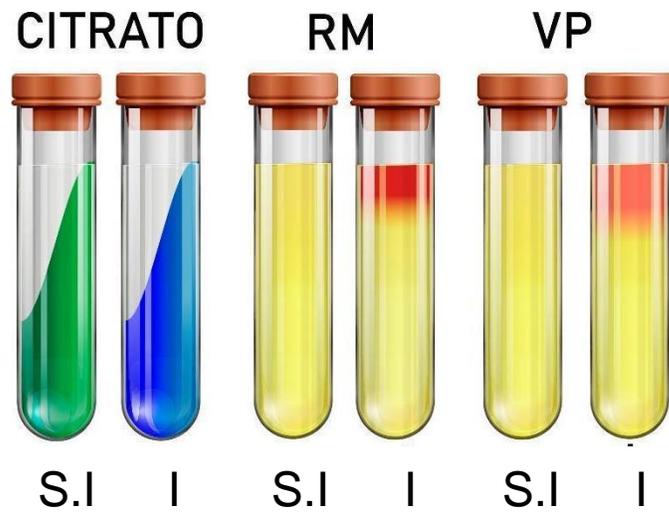


Figura 21. Resultados de las pruebas en los medios Citrato de Simmons, RM y VP. En donde: S.I, sin inocular e I, inoculado.

Mediante el sistema API 20 E el biosólido BSC6 se identificó a *E. coli* (cuadro 7). Para la muestra BSC7 se identificaron *E. agglomerans* (cuadro 8) y *E. coli*.

Cuadro 7. Perfil bioquímico de *E. coli* aislada del biosólido BSC6 mediante API 20 E.

Prueba	Resultado	Suma de pruebas positivas
ONPG (orto-nitrofenil-βD-galactoprianosidasa)	-	4
ADH (arginina-dihidrolasa)	-	
LDC (lisina decarboxilasa)	+	
ODC (ornitina decarboxilasa)	+	1
CIT (utilización del citrato)	-	
H <sub>2</sub> S (producción de ácido sulfhídrico)	-	
URE (ureasa)	-	4
TDA (triptófano desaminasa)	-	
IND (producción de indol)	+	
VP (Voges Proskauer)	-	4
GEL (gelatinasa)	-	
GLU (fermentación-oxidación de glucosa)	+	
MAN (fermentación-oxidación de manitol)	+	5
INO (fermentación-oxidación de inositol)	-	
SOR (fermentación-oxidación de sorbitol)	+	
RHA (fermentación-oxidación de rhamnosa)	+	7
SAC (fermentación-oxidación de sacarosa)	+	
MEL (fermentación-oxidación de melibiosa)	+	
AMY (fermentación-oxidación de amigdalina)	-	2
ARA (fermentación-oxidación de arabinosa)	+	

Cuadro 8. Perfil bioquímico de *E. agglomerans* del biosólido BSC7 mediante API 20 E.

Prueba	Resultado	Suma de pruebas positivas
ONPG (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa)	+	1
ADH (arginina-dihidrolasa)	-	
LDC (lisina decarboxilasa)	-	
ODC (ornitina decarboxilasa)	-	0
CIT (utilización del citrato)	-	
H <sub>2</sub> S (producción de ácido sulfhídrico)	-	
URE (ureasa)	-	4
TDA (triptófano desaminasa)	-	
IND (producción de indol)	+	
VP (Voges Proskauer)	-	4
GEL (gelatinasa)	-	
GLU (fermentación-oxidación de glucosa)	+	
MAN (fermentación-oxidación de manitol)	+	1
INO (fermentación-oxidación de inositol)	-	
SOR (fermentación-oxidación de sorbitol)	-	
RHA (fermentación-oxidación de rhamnosa)	+	7
SAC (fermentación-oxidación de sacarosa)	-	
MEL (fermentación-oxidación de melibiosa)	+	
AMY (fermentación-oxidación de amigdalina)	+	2
ARA (fermentación-oxidación de arabinosa)	+	

Para la prueba ONPG un resultado positivo significa que el microorganismo inoculado contiene la enzima beta galactosidasa y está hidroliza al ONPG liberando o-nitrofenol causando que el medio cambie de incoloro a una coloración amarilla.

En la prueba ADH, la arginina dihidrolasa produce ornitina, amoniaco y CO<sub>2</sub> a partir de la arginina elevando el pH provocando que el indicador azul de bromotimol se torne de color amarillo.

Para la prueba de producción de H<sub>2</sub>S, este se genera a partir de tiosulfato de sodio que en conjunto con sales férricas se forma un precipitado negro, distintivo de un resultado positivo.

La prueba de ureasa consiste en la hidrólisis de la urea produciendo amoníaco, lo que incrementa pH ocasionando que el colorante rojo fenol vire de amarillo a rosa o rojo.

Continuando con la prueba de triptófano desaminasa esta enzima genera ácido indolpirúvico a través de la desaminación de triptófano lo cual genera un color marrón en presencia de iones férricos.

En la prueba de gelatinasa se detecta si el microorganismo tiene la capacidad de licuar la gelatina por medio de enzimas proteolíticas lo cual es visible a partir de una coloración oscura.

Finalmente, para las pruebas de glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina y arabinosa detectan la capacidad del microorganismo de fermentar estos azúcares, esto se identifica debido a que el indicador azul de bromotimol se torna de color amarillo tras la fermentación.

Los fundamentos de las pruebas lisina descarboxilasa, la ornitina descarboxilasa, la utilización del citrato, la producción de indol y en la de Voges Proskauer tienen fundamento comentado anteriormente.

La figura 22 muestra las coloraciones de cada prueba del sistema API 20 E, en una prueba negativa y positiva.

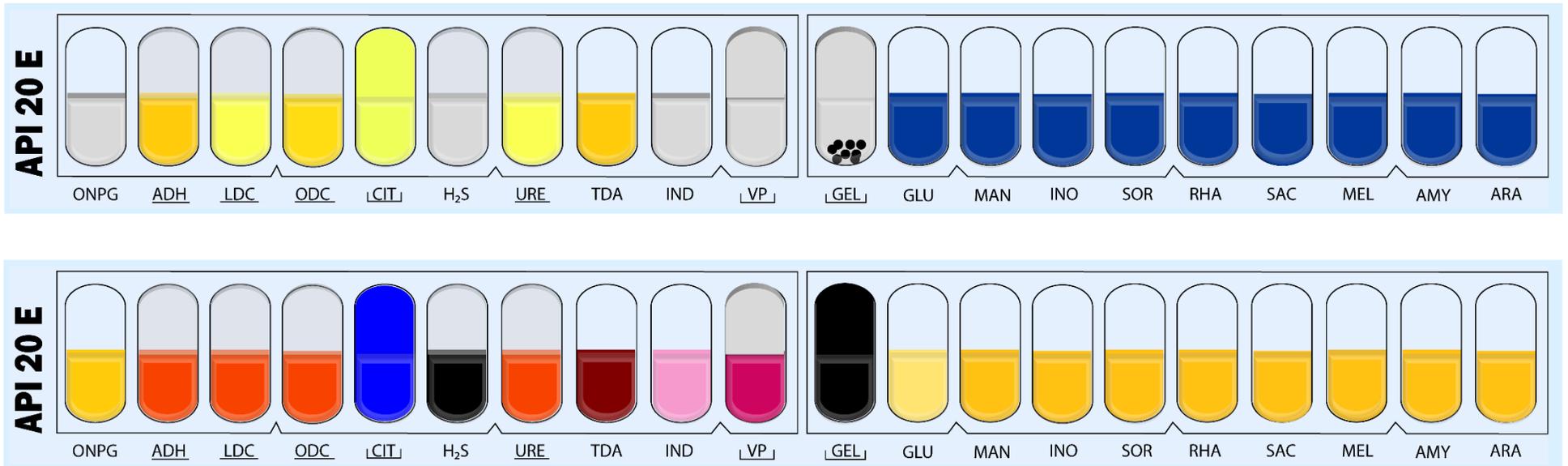


Figura 22. Pruebas bioquímicas que se registran en la galería API 20 E. En la parte superior se muestran las reacciones negativas, en tanto que en la inferior las pruebas positivas.

## 7.5 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DISTINTAS A

### *Enterobacteriaceae.*

A partir de los biosólidos BSC3 y BSC4 se identificaron una bacteria asacarolítica y *Pseudomonas* spp., respectivamente (ver cuadro 9). Para la identificación se usó de manera adicional, la prueba OF (oxidación-fermentación) suplementando con glucosa al 1 %. No se identificaron cepas de *Salmonella* spp. en ninguna de las muestras de biosólidos.

Cuadro 9. Prueba OF para las muestras de biosólido BSC3 y BSC4

Biosólido	OF (abierto)	OF (cerrado)	Bacteria
BSC3	Negativo	Negativo	Asacarolítico
BSC4	Positivo	Negativo	<i>Pseudomonas</i> spp.

En la figura 23 se muestran los resultados en la prueba OF. Las bacterias que usan la vía oxidativa, descomponen la glucosa en un proceso aerobio generando poca acidez, mientras que en la vía de fermentación el proceso es anaerobio y se produce mucha acidez. Estas dos vías, oxidativa o fermentativa se pueden apreciar en pares de tubos del medio OF, uno abierto (aerobio) y otro cerrado con aceite de parafina (anaerobio). El colorante azul de bromotimol es el indicador de pH el cual vira de verde a amarillo si el medio es ácido, resultado del aprovechamiento del azúcar.

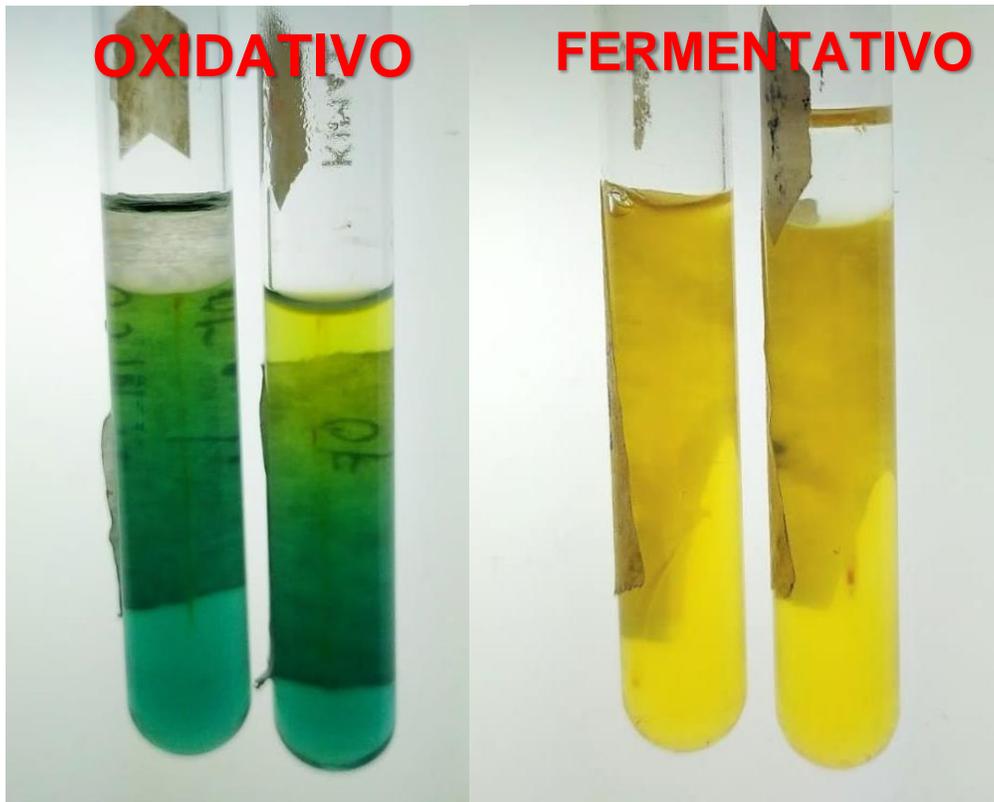


Figura 23. Resultados de la prueba OF.

## 7.6 IDENTIFICACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE *E. COLI*

Mediante PCR se detectó un gen de virulencia en dos cepas de *E. coli* aisladas en sendas muestras de biosólidos BSC6 y BSC7. Este gen corresponde al locus *bfpA* que es típico del patotipo EPEC.

En el carril siete de la figura 24, se observa un amplicón en la cepa de *E. coli* BCS6 que corresponde al locus *bfpA* de EPEC; en los carriles anteriores se observan amplicones que corresponden a genes de virulencia contenidos en cepas de *E. coli* usadas como controles positivos de la reacción.

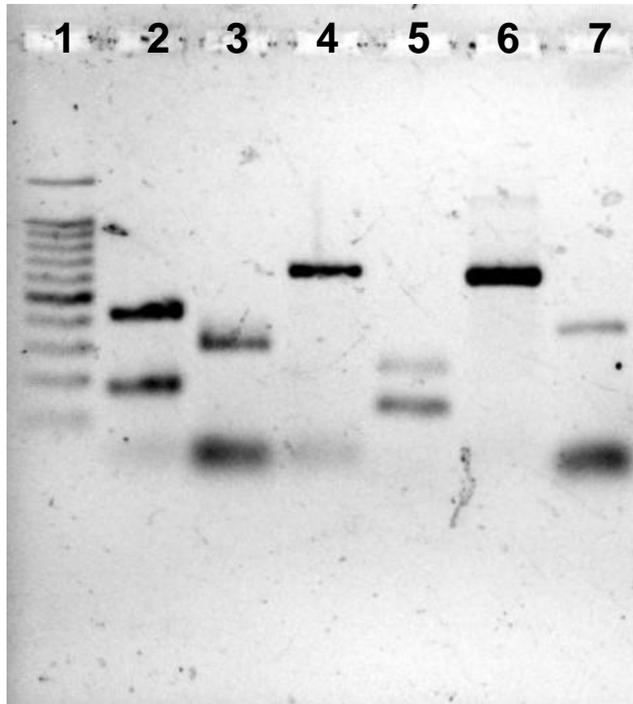


Figura 24. Genes de virulencia de *E. coli* aislada de la composta BSC6, separados en un gel de agarosa al 2.5%. Carriles: 1; MPM escalera de 100 pb; 2, genes *lt* y *st* de *E. coli* ETEC H10407 (O78:H11); 3, gen *bfpA* de *E. coli* EPEC E2348/69 (O127:H6); 4, gen *ial* de *E. coli* EIEC E11 (O124 NM); 5, genes *stx1* y *stx2* de *E. coli* STEC EDL933 (O157:H7); 6, locus *AA probe* de *E. coli* EAEC 042 (O44:H18) y 7, gen *bfpA* de *E. coli* BSC6.

De manera similar a la muestra BSC6, la cepa *E. coli* aisladas del biosólido BSC7 exhibió también la presencia del gen *bfpA* (Figura 25).

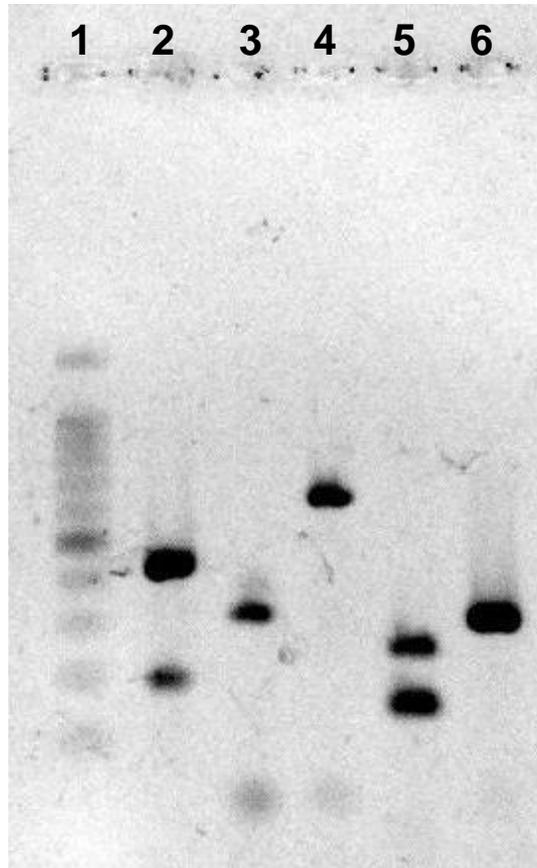


Figura 25. Genes de virulencia de *E. coli* aislada de la composta BSC7, separados en un gel de agarosa al 2.5% Carriles: 1, MPM escalera de 100 pb; 2, genes *It* y *st* de *E. coli* ETEC H10407 (O78:H11); 3, gen *bfpA* de *E. coli* EPEC E2348/69 (O127:H6); 4, gen *ial* de *E. coli* EIEC E11 (O124 NM); 5, genes *stx1* y *stx2* de *E. coli* STEC EDL933 (O157:H7) y 6, gen *bfpA* de la cepa de *E. coli* BSC7.

## VIII. DISCUSIÓN

El dilema de la distribución de agua en todo el mundo es cada vez más preocupante, tanto para las autoridades como para la sociedad en general debido a que menos de la quinta parte de la población mundial no tiene acceso a un recurso hídrico de calidad. En México se estima que este problema está en un nivel crítico ya que este país ocupa el puesto 106 de una lista de 122 países que enfrentan la problemática del uso descontrolado del recurso hídrico y la contaminación de éste por causas diversas (Benez *et al.*, 2010). Chiapas en particular, a pesar de contar con una cantidad muy grande de recursos hidrológicos, el 51 % de la población vive en áreas en donde el acceso a servicios básicos es limitado y es uno de los estados con menor porcentaje de acceso a agua entubada (88.9 %) y sistemas de drenaje (89.7 %) (Cortez *et al.*, 2019; CONAGUA, 2023).

Este estudio elaborado en una comunidad remota en Berriozábal, Chiapas, logra registrar la manera en la que los pobladores de El Mirador, si bien tienen una manera de almacenar de forma limpia el agua gracias a un ecofiltro diseñado por la organización Operación Bendición México, dependen de la temporada de lluvias puesto que el agua almacenada proviene del techo de lámina de las casas cuando ésta se decanta. En cuanto a la higiene personal, se registró que la mayoría de los encuestados no se lavan las manos, lo que puede favorecer la transmisión de agentes patógenos hacia los alimentos que éstos consumen. Abney *et al.* (2021) mencionan que la contaminación por fómites puede ocurrir directamente al contacto con las manos con un área del baño que no se lavó y desinfectó adecuadamente.

Además de implementar las medidas higiénicas de los usuarios en los SES, los que existen en El Mirador cuentan con los espacios arquitectónicos mencionadas por diversos autores (Magri *et al.*, 2013; OMS, 2019), como es el uso de dos cámaras de almacenamiento y un inodoro con separador de heces y orina. Sin embargo, los SES utilizados en El Mirador tienen las cámaras de almacenamiento situadas a nivel de suelo y apartadas del baño, a diferencia de lo señalado por otros autores, en los que el SES tiene las cámaras de almacenamiento de forma subterránea por debajo del inodoro. Dicho cambio en la ubicación de la cámara de compostaje, puede obedecer para evitar la humedad presente en el

subsuelo y, por ende, fomentando la exposición a la luz solar de los biosólidos contenidos en las cámaras ubicadas a nivel del suelo y cubiertas con una lámina galvanizada; ello promueve la destrucción de patógenos (Mihelcic, 2018). Esta práctica ha sido usada en SES en El Salvador registrado por Fernández-Curutchet *et al.* (2015) donde registraron temperaturas promedio de 37° C en cada almacenamiento de biosólidos.

En este estudio se analizaron un total de ocho biosólidos provenientes de sendos SES, colectados cada trimestre hasta completar el año de almacenamiento. El análisis de los parámetros físicos mostró diferencias significativas en la temperatura ( $P = 0.01$ ) y los sólidos totales ( $P = 0.01$ ).

La diferencia de las temperaturas en los biosólidos de diferentes meses (un rango de 18° C a 24° C) en las muestras son pertenecientes a un nivel mesófilo, esto se ha registrado en otros estudios como el de Mehl *et al.*, (2011) en donde el 66 % de los SES registraron una temperatura mesófila. Este nivel de temperatura puede deberse a la aireación, la desecación parcial para reducir el contenido de humedad del biosólido y una relación óptima del carbono-nitrógeno. El rango de temperatura de las muestras de biosólidos (18 – 24° C) favorece el crecimiento de microorganismos mesófilos, por lo que deben de vigilarse otros factores para la inhibición de éstos como la humedad y pH, ya que la temperatura *per se* no eliminará a los patógenos presentes en las heces (Naughton *et al.*, 2019).

Así, el saneamiento de las heces en los SES de El Mirador comienza con la alcalinización, puesto que se agrega cal y tierra, lo que incrementa el nivel de pH (Mihelcic *et al.*, 2018), generando una disminución de olores característicos, ausencia de vectores como las moscas y un secado óptimo de las heces reduciendo la carga de patógenos (Jönsson *et al.*, 2004).

Por otro lado, las muestras de biosólidos revelaron una relación inversamente proporcional entre el tiempo de almacenamiento con la humedad. Es decir, en el primer trimestre la humedad fue de 20 – 28 %, en tanto que al término del año de almacenamiento fue de 7 – 8 %. Además del tiempo de almacenamiento, esto fue favorecido por la adición de un material para el secado del biosólido como lo es la tierra y ceniza, dichos niveles de humedad son los recomendados por otros autores

para los biosólidos generados en los SES (Fernández-Curutchet *et al.*, 2015; Jönsson *et al.*, 2004); ellos señalan que el almacenamiento de heces a niveles inferiores a 20 – 25 % de humedad, fomenta la conservación de los niveles de nitrógeno y también estos niveles de humedad pueden ser obtenidos fácilmente en SES que separan la orina de las heces y los que cuentan con una doble cámara como los que se encuentran en el área estudiada, a diferencia de aquellos SES que no separan la orina de las heces y solo cuentan con una cámara de almacenamiento.

Sólo en el primer trimestre se registraron coliformes fecales en los biosólidos, posteriormente no se encontraron coliformes fecales a excepción de un biosólido del tercer trimestre y otro del último trimestre. La presencia de coliformes fecales en las muestras de biosólidos en el primer trimestre, puede atribuirse al poco tiempo de maduración, en la que aún las muestras no tienen la suficiente alcalinización y desecación (humedad de 20 % para BSC1 y 28 % para BSC2). Dado que el pH fue de 9.60 para el biosólido BSC1 y de 10.65 para el biosólidos BCS2, probablemente la humedad no permitía aún reducir o eliminar la carga de coliformes como lo menciona Fernández-Curutchet *et al.*, (2015) y Mihelcic *et al.*, (2018) que si bien, un pH mayor a 9 reducirá los patógenos en un tiempo prolongado, para un saneamiento seguro se recomiendan niveles de alcalinización con un pH mayor a 11.

En cuanto a la carga de coliformes fecales encontrada en el biosólido BSC6 colectado en el tercer trimestre, pudiera deberse a que a pesar de tener poca humedad (7 %), el pH era cercano a la neutralidad (7.97), lo que fomenta un ambiente propicio para el crecimiento de estas bacterias, coincidiendo con lo descrito por Fernández-Curutchet *et al.*, (2015), quienes mencionan que un pH en rangos de 6 a 8 permite el crecimiento de bacterias y otros organismos patógenos. Para el último biosólido con registro de coliformes fecales (BSC7) se infiere que pudo ser por la contaminación de un ave de corral la cual entró a la cámara de almacenamiento, evento que puede explicar la aparición de patógenos, aunque el biosólido haya registrado datos óptimos para la reducción de los mismos.

De acuerdo a la carga de coliformes fecales hallados en los biosólidos, éstos se clasificaron de acuerdo a la US EPA (1993), aunque existen otras clasificaciones

como el decreto 1 287 de 2014 de Colombia y la NOM-004-SEMARNAT-2002 que, si bien también se basan en la carga de coliformes, consideran otros elementos como la carga de helmintos y presencia de metales pesados, variables que esta investigación no cubre.

Respecto a los microorganismos encontrados, el género *Enterobacter* y *E. coli* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, la cual tiene una distribución ubicua, tales como el suelo, el agua, las plantas, las frutas, los animales y elementos derivados de éstos, así como el tracto digestivo de los humanos. Sin embargo, también es una familia de importancia médica debido a que provocan diferentes enfermedades al ser humano y en los animales (Brenner y Farmer III, 2015; Tadesse *et al.*, 2022). También se encontraron bacterias como *Pseudomonas* spp. la cual tiene la capacidad de poder colonizar diferentes entornos como los insectos y estar presentes en el suelo (Silby *et al.*, 2011), aunque también muchas especies de este género se asocian a contaminantes en fuentes comunes de agua, equipos médicos y antisépticos (Lebeque-Pérez *et al.*, 2006).

De las cepas de *E. coli* aisladas, se encontraron mediante PCR la presencia de genes típicos del patotipo EPEC. Este hallazgo se halla en concordancia con los reportes de que, en México, el patotipo EPEC es de gran prevalencia (Vidal *et al.*, 2007; Mathewson *et al.*, 1987; (Canizalez-Roman *et al.*, 2016), así como en otros países en vías de desarrollo (Gómez-Duarte, 2015; Ochoa *et al.*, 2008), en donde este patotipo afecta principalmente a infantes y adolescentes con diarrea acuosa. Una investigación en infantes de zonas rurales y urbanas de Chiapas, reveló que EPEC fue el segundo patotipo más frecuente (5.6 %), después de EAEC (7.9 %) (Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2019). El haber aislado EPEC en los biosólidos BSC6 y BSC7 en el Mirador, probablemente obedezca a que dentro de los usuarios de estos SES hubo infantes, por ejemplo, en la muestra BSC6 se registraron dos infantes (de uno y nueve años); y en la muestra BSC7 se registraron infantes de cinco y siete años. Para poder determinar con mayor precisión el origen de EPEC, sería necesario incorporar otros estudios como análisis de heces entre los usuarios de los SES.

Este trabajo expone lo recabado por Tilley *et al.* (2014) quienes mencionan que los SES pueden usarse en cualquier lugar, pero son más útiles en zonas con escasez de agua y que el éxito de este sistema de saneamiento depende de la eficiente separación de la humedad sobre las heces, así como el uso de un material de cubierta adecuado como lo es la tierra y ceniza. También se remarca la utilidad sanitaria del seguimiento de la disminución de coliformes fecales en esta ecotecnia por lo señalado por la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID, 2018) quienes adjudican a las heces humanas como uno de los principales riesgos de contraer diarrea, debido a que las heces aunque provengan de personas sanas contienen más patógenos humanos que las heces de los animales y deben de ser el principal objetivo de estudio a menos que haya evidencia de lo contrario.

## IX. CONCLUSIONES

- La mayoría de las viviendas tiene suelo de tierra (72.9 %) y casi la mitad de los habitantes (47.7 %) acostumbra a estar descalzos en ella.
- De manera significativa, la temperatura y humedad de las muestras fue disminuyendo con respecto al tiempo de almacenamiento, por ende, los biosólidos totales tuvieron una relación proporcional al tiempo de almacenamiento.
- En el primer trimestre los biosólidos exhibieron la mayor cantidad de coliformes fecales.
- Los usuarios de los SES emplean la ceniza vegetal y tierra para mezclar las heces.
- El 75% de los biosólidos analizados pueden ser utilizados como composta en plantas ornamentales.
- No se recuperaron colonias de *Salmonella* en ninguna de las muestras.
- Se recuperaron bacterias de los géneros *Enterobacter* y *Escherichia* en el 50 % de muestras de los biosólidos.
- Se detectaron genes de virulencia del patotipo EPEC en dos muestras de biosólidos.

## X. RECOMENDACIONES

Para estudios de la misma índole, se sugiere incorporar otras variables de estudio como determinar la presencia de metales pesados ya que estos pueden ser perjudiciales en el crecimiento de las plantas, organismos en el suelo y salud animal y humana (García-Martínez *et al.*, 2008). Los metales pesados dentro de las compostas influyen en diferentes aspectos como lo son la hidrosolubilidad, intercambio iónico, precipitación, co-precipitación de óxidos metálicos y absorción por ligandos orgánicos.

También es importante la detección y cuantificación de otros patógenos como los helmintos, la NOM-004-SEMARNAT-2002 señala un método para su determinación. Se basa en lavados continuos, combinados con diversas etapas de filtración y flotación, lo que logra la separación de huevos de helmintos del resto de las partículas de mayor y menor tamaño, así como su concentración.

Es necesario un estudio para la identificación de nutrientes en los biosólidos obtenidos para saber si estos serían adecuados de usar como composta para las plantas en las que se podrían utilizar de acuerdo con el nivel de coliformes permitido por la US EPA (1993).

## XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Abney, S.E., Bright, K.R., McKinney, J., Ijaz, M.K. y Gerba, C.P. 2021. Toilet hygiene—review and research needs. *Journal of Applied Microbiology*. 131(6): 2705–2714.
- Acosta-Collazo, A. y García-Díaz, J.R. 2014. Los Baños Grandes de Ojocaliente durante la primera mitad del siglo XIX. Historia, agua y arquitectura. *Letras Históricas*. 11: 123-146.
- Alfaro-Mora, R. 2018. Aspectos relevantes sobre *Salmonella* spp en humanos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*.34(3): 110–122.
- Aliaga, R., Miranda, J. y Zevallos, J. 2010. Aislamiento e identificación de *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 en pescados y moluscos bivalvos procedentes de un mercado pesquero de Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*. 21(3): 139–145.
- Benez, M.C., Kauffer Michel, E.F. y Álvarez Gordillo, G. del C. 2010. Percepciones ambientales de la calidad del agua superficial en la microcuenca del río Fogótico, Chiapas. *Frontera norte*. 22(43): 129–158.
- Boelee, E., Geerling, G., van der Zaan, B., Blauw, A. y Vethaak, A.D. 2019. Water and health: From environmental pressures to integrated responses. *Acta Tropica*. 193: 217–226.
- Bohórquez Santana, W. 2019. El proceso de compostaje. Ed. Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia.
- Bravo, V.J.B. y Villalobos de Bastardo, L.B. 2002. *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 22(2): 119–121.
- Brenner, D.J. y Farmer III, J. J. 2015. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons. Nueva Jersey, Estados Unidos. Pp.1–24.
- Canata, M.G., Navarro, R., Velázquez, G., Rivelli, S., Rodríguez, F., Céspedes, A., Espínola, C., Canese, J. y Guillén, R. 2016. Molecular characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolates obtained from feces of children with gastroenteritis at the Institute for Social Welfare Central Hospital in

2012. *Pediatría (Asunción)*. 43(1): 13–17.
- Canizalez-Roman, A., Flores-Villaseñor, H.M., Gonzalez-Nuñez, E., Velazquez-Roman, J., Vidal, J.E., Muro-Amador, S., Alapizco-Castro, G., Díaz-Quiñonez, J.A. y León-Sicairos, N. 2016. Surveillance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrhea Cases from Children, Adults and Elderly at Northwest of Mexico. *Frontiers in Microbiology*. 7(11): 1-13.
- Cárdenas, S.Q. 2016. Infecciones por bacterias del género *Salmonella*: relevancia en la práctica clínica. *Revista Clínica Escuela de Medicina UCR-HSJD*. 6(4): 11-21.
- Castillo, V.L., Peña, Y.P., Hernández, M.E., Lamela, G.P., López, N.P., Morejón, P.L. y Roble, O. 2013. Especies patógenas de *Vibrio* aisladas en alimentos de origen marino. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 23(1): 31-43.
- Cerna, J.F., Nataro, J.P. y Estrada-Garcia, T. 2003. Multiplex PCR for Detection of Three Plasmid-Borne Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(5): 2138–2140.
- Cervantes-García, E. y Cravioto, A. 2007. *Campylobacter* y enfermedades asociadas. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 50(1): 31–35.
- Chávez Navarro, E. 2008. Diagnóstico de protozoarios intestinales frecuentes en niños. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 47(3): 169–177.
- Climént-Palmer, M. del C. 2016. El Inodoro del siglo XXI. *¿cómoves?* 206: 8–12.
- CONAGUA. 2024. Situación del Subsector Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento. Comisión Nacional del Agua. Ciudad de México, México.
- Cortez, E. F., Mata, D. I. y Molina-Rosales, D. O. 2019. Percepción y Calidad de Agua en Comunidades Rurales del Área Natural Protegida La Encrucijada, Chiapas, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 35(2): 317-334.
- Coveñas, C., Deztre, G., Fernandez, D., Mosquito, S. y Ochoa, T. 2014. Efecto de lactoferrina bovina en la formación de biofilms en cepas clínicas de *E. Coli* enteroagregativa. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 31(3): 454–460.

- Cuéllar-Anjel, J. 2013. Vibriosis. *The Center Food Security & Public Health*. 1: 1–5.
- Davin-Regli, A., Lavigne, J.-P. y Pagès, J.-M. 2019. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 32(4): 1-32.
- Davin-Regli, A. y Pagès, J.-M. 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1-13.
- Detzner, J., Pohlentz, G. y Müthing, J. 2022. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and a Fresh View on Shiga Toxin-Binding Glycosphingolipids of Primary Human Kidney and Colon Epithelial Cells and Their Toxin Susceptibility. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(13): 1-36.
- Dubreuil, J.D., Isaacson, R.E. y Schifferli, D.M. 2016. Animal Enterotoxigenic *Escherichia Coli*. *EcoSal Plus*. 7(1): 1-47.
- Echeverri-Toro, L.M. y Cataño-Correa, J.C. 2010. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *Iatreia*. 23(3): 240–249.
- Estrada-García, T. y Navarro-García, F. 2012. Enteraggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 66(3): 281–298.
- Farfán-García, A.E., Ariza-Rojas, S.C., Vargas-Cárdenas, F.A. y Vargas-Remolina, L.V. 2016. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología*. 33(4): 438–450.
- Farrera-Sarmiento, O., Castillejos-Sarmiento, D. C. y Gómez-Pérez, A. L. 2020. Etnobotánica del Tianguis de las Flores y el Mercado Público Municipal Primero de Mayo de Berriozábal, Chiapas, México. *LACANDONIA*. 14(10): 29-46
- Fernández-Curutchet, M., Hock, D., y Escudero, H. 2015. Sistemas de Saneamiento Seco con Separación de Orina. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Buenos Aires, Argentina.
- Fernández-Olmos, A., Bou, G., García, C., Sáez-Nieto, J.A. y Valdezate, S. 2011.

- Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29(8): 601–608.
- Figueroa-Ochoa, I.M. y Verdugo-Rodríguez, A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* spp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47(1–2): 25–42.
- Flórez-Jiménez, M.P., Aristizábal-Botero, E. y Puentes-Prada, J.J., 2016. Baño Seco. Centro Editorial Uniminuto. Bogotá, Colombia.
- Foladori, P., Cutrupi, F., Segata, N., Manara, S., Pinto, F., Malpei, F., Bruni, L. y La Rosa, G. 2020. SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review. *The Science of the Total Environment*. 743: 1-12.
- García-Martínez, I., Pineda-Rodríguez, J.J., Totosaús-Sánchez, A. y González-González, L.R. 2008. Compostas: Evaluación de la presencia de metales pesados en compostas. *Ciencia y Tecnología*. 7(1): 91–99.
- García-Ubaque, C.A., Vaca-Bohórquez, M.L. y García-Ubaque, J.C. 2014. Sanitario seco: una alternativa para el saneamiento básico en zonas rurales. *Revista de Salud Pública*. 16(4): 638–689.
- Gómez-Duarte, O.G. 2014. Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* patógenas en Colombia. *Revista chilena de infectología: órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*. 31(5): 577–586.
- Gutiérrez-Jiménez, J., Luna-Cázares, L.M., Cruz, L.M. la, De Aquino-López, J.A., Sandoval-Gómez, D., León-Ortiz, A.T., Hernández-Shilón, J.A., Constantino-Jonapa, L.A., Matamoros, W.A. y Vidal, J.E. 2019. Children from a rural region in The Chiapas Highlands, Mexico, show an increased risk of stunting and intestinal parasitoses when compared with urban children. *Boletín Médico Del Hospital Infantil De México*. 76(1): 18–26.
- Gutiérrez-Jiménez, J., Luna-Cazáres, L.M., Mendoza-Orozco, M.I., Díaz-Marina, G. de J., Burguete-Gutiérrez, J.C. y 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. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 35(2): 95–102.

- Herrera, M.L., Guevara, J., Badilla, G. y Rivera, P. 1984. Infección por *Campylobacter* en Humanos Revisión a Propósito del Primer Caso de Septicemia en Costa Rica. *Revista Médica Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 19(1): 9-18.
- INEGI, 2010. Compendio de Información Geográfica Municipal de los Estados Unidos Mexicanos 2010. Chiapas. <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825292942>. Consultado el 16 de Agosto de 2023.
- Iqbal, J., Malviya, N., Gaddy, J.A., Zhang, C., Seier, A.J., Haley, K.P., Doster, R.S., Farfán-García, A.E. y Gómez-Duarte, O.G. 2022. Enteroinvasive *Escherichia coli* O96:H19 is an Emergent Biofilm-Forming Pathogen. *Journal of Bacteriology*. 204(4): 1-17.
- Jönsson, H., Stintzing, A.R., Vinnerås, B. y Salomon, E. 2004. Guidelines on the Use of Urine and Faeces in Crop Production. Stockholm Environment Institute. Estocolmo, Suecia.
- Kasper, D.L. y Harrison, 2016. *Principios de medicina interna*. McGraw-Hill Educación. México D.F.
- Larrea-Murrell, J.A., Rojas-Badía, M.M. y Romeu-Álvarez, B. 2014. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 44(3): 24-34.
- Lebeque Pérez, Y., Morris Quevedo, H.J. y Calás Viamonte, N. 2006. Infecciones nosocomiales: incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Cubana de Medicina*. 45(1).
- Lee, M.C.J. y Tham, K.W. 2021. Public toilets with insufficient ventilation present high cross infection risk. *Scientific Reports*. 11(1): 1-8.
- Lizarbe-Iracheta, M.A. 2009. Bacterias y Virus ¿Cómo Nos Defendemos? *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 103(1): 115–172.
- López-Saucedo, C., Cerna, J.F., Villegas-Sepulveda, N., Thompson, R., Velazquez, F.R., Torres, J., Tarr, P.I. y Estrada-García, T. 2003. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction To Detect Diverse Loci Associated with

- Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*. 9(1): 127–131.
- Lösch, L.S., Gariboglio Vázquez, M.L., Rivas, M. y Merino, L.A. 2015. Detección de genes de virulencia del patotipo enteroagregativo en cepas de *Escherichia coli* aisladas de fuentes de agua subterránea de la provincia del Chaco, Argentina. *Revista argentina de microbiología*. 47(2): 88–94.
- MacFaddin, J.F., 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Magri, M.E., Philippi, L.S. y Vinnerås, B. 2013. Inactivation of Pathogens in Feces by Desiccation and Urea Treatment for Application in Urine-Diverting Dry Toilets. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(7): 2156–2163.
- Mathewson, J.J., Oberhelman, R.A., Dupont, H.L., Javier de la Cabada, F. y Garibay, E.V. 1987. Enteroadherent *Escherichia coli* as a cause of diarrhea among children in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*. 25(10):1917–1919.
- McJunkin, F.E. 1988. Agua y salud humana. Ed. Limusa S.A. de C.V. Ciudad de México, México.
- Mehl, J., Kaiser, J., Hurtado, D., Gibson, D.A., Izurieta, R. y Mihelcic, J.R. 2011. Pathogen destruction and solids decomposition in composting latrines: study of fundamental mechanisms and user operation in rural Panama. *Journal of Water and Health*. 9(1):187–199.
- Meza-Segura, M. y Estrada-Garcia, T. 2016. Diffusely Adherent *Escherichia coli*. En: Torres, A. (eds). *Escherichia coli in the Americas*. Springer International Publishing. Cham, Suiza. Pp.125–147.
- Meza-Segura, M., Zaidi, M.B., Vera-Ponce de León, A., Moran-Garcia, N., Martinez-Romero, E., Nataro, J.P. y Estrada-Garcia, T. 2020. New Insights Into DAEC and EAEC Pathogenesis and Phylogeny. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10: 1-16.
- Michelacci, V., Tozzoli, R., Arancia, S., D'Angelo, A., Boni, A., Knijn, A., Prosseda, G., Greig, D.R., Jenkins, C., Camou, T., Sirok, A., Navarro, A., Schelotto, F., Varela, G. y Morabito, S. 2020. Tracing Back the Evolutionary Route of

- Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and *Shigella* Through the Example of the Highly Pathogenic O96:H19 EIEC Clone. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10(260): 1-13.
- Mihelcic, J.R., 2018. Sludge Management: Biosolids and Fecal Sludge. UNESCO. Michigan, Estados Unidos.
- Mindreau-Ganoza, E., Juscamaita-Morales, J. y Williams-León de Castro, M. 2016. Estabilización de heces humanas provenientes de baños secos por un proceso de fermentación ácido láctica. *Ecología Aplicada*. 15(2): 143–150.
- Muñoz, D., Graü-de Marín, C., Marval, H. y Martínez, C. 2012. Identificación de bacterias del género vibrio asociadas a zonas productoras de moluscos bivalvos, estado Sucre, Venezuela. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*. 22(5): 549-467.
- Nataro, J.P., Deng, Y., Cookson, S., Cravioto, A., Savarino, S.J., Guers, L.D., Levine, M.M. y Tacket, C.O. 1995. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *The Journal of Infectious Diseases*. 171(2): 465–468.
- Naughton, C., Orner, K., Stenstrom, T.-A. y Mihelcic, J. 2019. Composting and Dry Desiccating Toilets (Latrines). UNESCO. Michigan. Estados Unidos.
- Newitt, S., MacGregor, V., Robbins, V., Bayliss, L., Chattaway, M.A., Dallman, T., Ready, D., Aird, H., Puleston, R. y Hawker, J. 2016. Two Linked Enteroinvasive *Escherichia coli* Outbreaks, Nottingham, UK, June 2014. *Emerging Infectious Diseases*. 22(7): 1178–1184.
- NOM-004-SEMARNAT-2002. 2002. Lodos y biosólidos: Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. <https://catalogonacional.gob.mx/FichaRegulacion?regulacionId=25418>. Consultado el 20 de abril de 2023.
- Nordmann, P., Naas, T. y Poirel, L. 2011. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*. 17(10): 1791–1798.
- Ochoa, T.J., Barletta, F., Contreras, C. y Mercado, E. 2008. New insights into the

- epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102(9): 852–856.
- Organización Mundial de la Salud, 2019. Guías para el saneamiento y la salud. OMS. Ginebra, Suiza.
- Orihuel-Lazo, E., Sanz-Jiménez, M., Bertó-Navarro, R., Canet-Gascó, J.J., Lorenzo-Cartón, F., Corujo-Fernández, A. y Milvaques-Cucart, A., 2015. *Campylobacter* la Bacteria Discreta. Betelgeux. Valencia, España.
- Oviedo-Ocaña, E.R., Marmolejo-Rebellon, L.F. y Torres-Lozada, P. 2017. Avances en investigación sobre el compostaje de biorresiduos en municipios menores de países en desarrollo. Lecciones desde Colombia. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 18(1): 31–42.
- Pakbin, B., Brück, W.M. y Rossen, J.W.A. 2021. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(18): 1-18.
- Pasqua, M., Michelacci, V., Di Martino, M.L., Tozzoli, R., Grossi, M., Colonna, B., Morabito, S. y Prosseda, G. 2017. The Intriguing Evolutionary Journey of Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward Pathogenicity. *Frontiers in Microbiology*. 8(1): 1-12.
- Paterson, D.L. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: *enterobacteriaceae*. *The American Journal of Medicine*. 119(6): S20-28.
- Philipson, C.W., Bassaganya-Riera, J. y Hontecillas, R. 2013. Animal models of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *Gut Microbes*. 4(4): 281–291.
- Piceno, Y.M., Pecora-Black, G., Kramer, S., Roy, M., Reid, F.C., Dubinsky, E.A. y Andersen, G.L. 2017. Bacterial community structure transformed after thermophilically composting human waste in Haiti. *PLOS ONE*. 12(6): 1-30.
- Prignano, A.O. 2007. El inodoro y sus conexiones: la indiscreta historia del lugar de necesidad que, por común, excusado es nombrarlo. Editorial Biblos. Buenos Aires, Argentina.
- Redlinger, T., Graham, J., Corella-Barud, V. y Avitia, R. 2001. Survival of Fecal Coliforms in Dry-Composting Toilets. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(9): 4036–4040.

- Ríos-Muñiz, D., Cerna-Cortés, J.F., Morán-García, N., Meza-Segura, M., Estrada-García, T., Ríos-Muñiz, D., Cerna-Cortés, J.F., Morán-García, N., Meza-Segura, M. y Estrada-García, T. 2019. *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: prevalencia, patogénesis y modelos murinos. *Gaceta médica de México*. 155(4): 410–416.
- Rivera-Parra, J. 2022. Manual de Baños Secos Ecológicos. Operación Bendición México A. C. Chiapas, México.
- Rivero, M.A., Padola, N.L., Etcheverría, A.I. y Parma, A.E. 2004. *Escherichia Coli* Enterohemorrágica y Síndrome Uremico Hemolítico en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. 64(1): 352–356.
- Rodríguez-Angeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), pp.464–475.
- Santiago Alarcón, D. y Ojeda Flores, R. 2018. Virus: pequeños gigantes que dominan el planeta. *Ciencia - Academia Mexicana de Ciencias*. 69(2): 64–69.
- Savkovic, S.D., Villanueva, J., Turner, J.R., Matkowskyj, K.A. y Hecht, G. 2005. Mouse Model of Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection. *Infection and Immunity*. 73(2): 1161–1170.
- Schönning, C. y Stenström, T.A. 2004. Guidelines on the Safe Use of Urine and Faeces in Ecological Sanitation Systems. Stockholm Environment Institute. Estocolmo, Suiza.
- Senanu, B.M., Boakye, P., Oduro-Kwarteng, S., Sewu, D.D., Awuah, E., Obeng, P.A. y Afful, K. 2021. Inhibition of ammonia and hydrogen sulphide as faecal sludge odour control in dry sanitation toilet facilities using plant waste materials. *Scientific Reports*. 11(1): 1-13.
- Seni Pinoargote, O.D. 2015. Detección de cepas de *Escherichia coli* Shiga Toxigénica (STEC) y enteropatógena (EPEC) basada en PCR multiplex. *La Técnica: Revista de las Agrociencias*. 215: 78-89.
- Servin, A.L. 2014. Pathogenesis of Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa/Dr Adhesins (Afa/Dr DAEC): Current Insights and Future Challenges. *Clinical Microbiology Reviews*. 27(4): 823–869.

- Sierra Ramírez, C.A. 2021. Calidad del agua: Evaluación y diagnóstico. Ediciones de la U. Medellín, Colombia.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B. y Jackson, R.W. 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*. 35(4): 652–680.
- Silva, F. y Martínez O., T.P. 2018. Complejo *Enterobacter cloacae*. *Revista chilena de infectología*. 35(3): 297–298.
- Silva, J., Ramírez, L., Alfieri, A., Rivas, G. y Sánchez, M. 2004. Determinación de microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Coliformes totales, coliformes fecales y aerobios mesófilos en agua potable envasada y distribuida en San Diego, estado Carabobo, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 24(1–2): 46–49.
- Tadesse, S., Mulu, W., Genet, C., Kibret, M. y Belete, M.A. 2022. Emergence of High Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Species among Patients in Northwestern Ethiopia Region. *BioMed Research International*. 2022: 1-9.
- Tilley, E., Ulrich, L., Lüthi, C., Reymond, P., Schertenleib, R. y Zurbrügg, C. 2014. Compendio de Sistemas y Tecnologías de Saneamiento. Segunda Edición. Instituto Federal Suizo de Ciencia y Tecnología Acuática (EAWAG). Dübendorf, Suiza.
- Tortarolo, M.F., Pereda, M., Palma, M. y Arrigo, N.M. 2008. Influencia de la inoculación de microorganismos sobre la temperatura en el proceso de compostaje. *Ciencia del suelo*. 26(1): 41–50.
- Unzaga, J.M. and Zonta, M.L. 2018. Atlas Comentado de Protozoología. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata (EDULP). La Plata, Argentina.
- USAID, 2018. Toward a hygienic environment for infants and young children – A review of the Literature. Washington D. C., Estados Unidos.
- USEPA, 1994. A Plain English Guide to the EPA Part 503 Biosolids Rule. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Wastewater Management.
- Vargas-Pineda, O.I., Trujillo-González, J.M., Torres-Mora, M.A., Vargas-Pineda, O.I., Trujillo-González, J.M. y Torres-Mora, M.A. 2019. El compostaje, una

- alternativa para el aprovechamiento de residuos orgánicos en las centrales de abastecimiento. *ORINOQUIA*. 23(2): 123–129.
- Varnero M, M.T., Rojas A, C. y Orellana R, R. 2007. Índices de Fitotoxicidad en Residuos Orgánicos Durante el Compostaje. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*. 7(1): 28–37.
- Vidal, J.E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J. y Navarro-García, F. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*. 49(5): 376–386.
- Vidal-Graniel, J.E. 2003. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. *Salud en Tabasco*. 9(1): 188–193.
- Wyres, K.L., Lam, M.M.C. y Holt, K.E. 2020. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*. 18(6): 344–359.
- Xicali-Nava, J. R., 2018. Monitoreo de coliformes fecales e identificación de *Salmonella* spp. y de huevos de helmintos en residuos sólidos provenientes de sanitarios secos con separación de orina situados en San Martín Texmelucan, Puebla y San Bernardino Tepehualtepec, Puebla. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
- Zhang, Y., Tan, P., Zhao, Y. y Ma, X. 2022. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: intestinal pathogenesis mechanisms and colonization resistance by gut microbiota. *Gut Microbes*. 14(1): 1-22.
- Zita-Lagos, M.E., Figueroa-García, E.C., Narváez-Hernández, L.E. 2017. Impacto de los Atributos Determinantes de un Sanitario Seco Urbano en la Aceptación del Consumidor. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 33(4): 671–679.
- Zúñiga, R.M., Tamiset, J.F., Molinar, Y.H. y Hernández, M.T.G. 2006. Diseño y construcción de sanitarios ecológicos secos en áreas rurales. *Revista Cubana de Salud Pública*. 32(3): 1-11.

## XII. ANEXOS

### Anexo 1. Encuesta para usuarios de los baños secos o SES.

  ①

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Encuesta para usuarios de baños secos**

Lugar: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**DATOS DEMOGRÁFICOS**

Nombre del usuario: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_

Escolaridad (marque con una cruz):

Analfabeta	
Primaria incompleta	
primaria	
Secundaria	
Bachillerato	
Universidad	

Ocupación \_\_\_\_\_

¿Cuántas personas habitan la vivienda? \_\_\_\_\_

Tipo de piso de la vivienda: Cemento \_\_\_\_\_ Tierra \_\_\_\_\_ Tierra/cemento \_\_\_\_\_

¿Camina descalzo fuera de casa? NO \_\_\_\_\_ SI \_\_\_\_\_

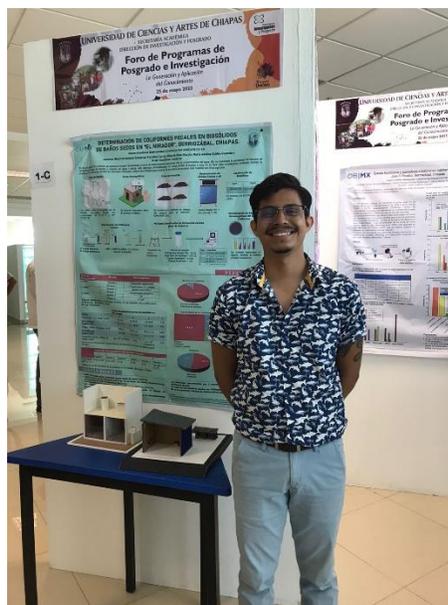
Durante el día ¿Cuánto tiempo está descalzo? \_\_\_\_\_

Tipo de agua que consume: Garrafón: \_\_\_\_\_ Hervida: \_\_\_\_\_ Sin tratar: \_\_\_\_\_ Otros: \_\_\_\_\_

¿Cómo almacena/protege el agua que consume? \_\_\_\_\_

¿Lavan sus alimentos con agua y jabón? NO \_\_\_\_\_ SI \_\_\_\_\_

**Anexo 2.** Constancia de participación en el Foro de Programas de Posgrado e Investigación “La Generación y Aplicación de Conocimiento”, 25 de mayo, 2023.



**Anexo 3.** Participación en conjunto con Operación Bendición en la Feria Ambiental del Colegio de Ingenieros Civiles de Chiapas, 25 de agosto, 2023.



**Anexo 4.** Recolección del biosólido de uno de los SES ubicados en El Mirador, Berriozábal, Chiapas.

