

PERSISTENCIA DE PATÓGENOS EN PORCINAZA SECA, EN ENSILADO Y TRANSFORMADA EN LOMBRICOMPOSTAJE Y HARINA DE LOMBRIZ

Persistence of Pathogens in Dry Pig Manure, in Silage, and Transformed in Earthworm Compost and Earthworm Flour

Oscar Jaime Betancur¹, Jesús Antonio Betancourt², Julián Estrada³ y Francisco Javier Henao^{3*}

¹Novartis-Colombia S.A., Sanidad Animal, Bogotá D.C.-Colombia, ²Corpoica, Floridablanca, Santander-Colombia, ³Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Doctorado en Ciencias Agrarias, Manizales-Colombia. *Fhenao@ucaldas.edu.co

RESUMEN

Esta investigación se orientó a establecer la persistencia de virus, bacterias, mohos, levaduras y parásitos, en diferentes formas de utilización de porcinaza sólida. Se hizo un estudio de observación dirigida, analizado descriptivamente en tres granjas ubicadas en el centro-occidente de Colombia, donde se procesó porcinaza en secado, en ensilado, y se produjo lombricompostaje y harina de lombriz. Se muestreó la porcinaza fresca para analizar la presencia de 26 patógenos al comienzo del estudio y al finalizar las anteriores rutas, repitiéndose los muestreos en dos momentos en cada granja. Para el secado se ubicaron tres lechos bajo invernadero y se muestrearon cuando la humedad alcanzó 24-30%; para el ensilado se utilizaron tres microsilos por granja cargados con caña de azúcar y porcinaza fermentada con vitafert®, muestreándose a los 15 días (d). El lombricompostaje se realizó en lechos de madera, utilizando 2 kg de Lombriz (*Eisenia foetida*) y 50 kg de porcinaza; al término de 90 d se muestreó y se extrajo la lombriz para preparar harina. En la porcinaza fresca usada en ensilaje se encontraron 14 de los patógenos investigados, mientras que en la porcinaza usada en secado, lombricompostaje y harina se hallaron 13. No se encontraron virus. No hubo persistencia de parásitos en secado, ensilaje, ni harina. *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras no persistieron en secado ni harina; *Salmonella* spp. no persistió en ninguna ruta; *Listeria monocytogenes* solo persistió en el secado; *Lawsonia intracellularis* no persistió en lombricompostaje ni en harina; mesófilos aerobios, *Clostridium* sulfito-reductores, coliformes totales y *Escherichia coli*, persistieron en todas las rutas, pero no en todos los muestreos. La ruta más eficiente en la eliminación de pató-

genos fue la harina de lombriz. En este estudio, el lombricompostaje no mostró ser un buen medio de sanitización, mientras que el secado y el ensilaje pueden considerarse buenas estrategias para eliminar patógenos.

Palabras clave: Ensilaje, harina de lombriz, lombricompostaje, patógenos, porcinaza.

ABSTRACT

The purpose of this research was to establish the persistence of viruses, bacteria, molds, yeasts, and parasites, in different ways of using the solid pig manure. A directed observational study, descriptively analyzed, was carried out in the Central-Western part of Colombia, where pig manure was processed in dryout, in silage, and earthworm compost and earthworm flour were produced. Fresh pig manure was sampled to analyse the presence of 26 pathogens at the beginning of the study and at the end of the above mentioned routes, repeating the samplings twice at each farm. For the dryout, three beds were allocated under greenhouse, and were sampled when the humidity reached 24-30%; for the silage, three microsilos were used per farm, loaded with sugar cane and pig manure with vitafert®, being sampled at 15 days (d). The earthworm compost was done in wooden beds, using 2 kg of earthworm (*Eisenia foetida*) and 50 kg of pig manure; at the end of 90 d it was sampled and the earthworms were extracted to prepare flour. Of the pathogens investigated, 14 were detected in the fresh pig manure used in the silage, while 13 were found in the one used in the dryout, earthworm compost and flour; no viruses were found; no parasites persisted in dryout, silage, nor in flour. *Staphylococcus aureus*, molds and yeasts did not persist in dryout or in flour; *Salmonella* spp. did not persist in any route; *Listeria monocytogenes* persisted only in dryout;

Lawsonia intracellularis did not persist in earthworm compost, nor in flour; aerobic mesophilic, sulphite-reducing *Clostridium*, total coliforms and *Escherichia coli* persisted in all routes, but not in every sampling. The most efficient route for the elimination of pathogens was the earthworm flour. In this study the earthworm compost was not shown to be an adequate means of sanitation, whilst the dryout and the silage could be considered good strategies to eliminate pathogens.

Key words: Silage, earthworm flour, earthworm compost, pathogens, pig manure.

INTRODUCCIÓN

Se estima que para el 2050, la población humana a nivel mundial sobrepasará los nueve billones de personas [18]; esto le implica un enorme reto al sector pecuario para satisfacer la demanda de proteína de origen animal y es allí donde la carne de cerdo (*Sus scrofa domestica*), que es hoy la que más se consume en el mundo, jugará un papel preponderante; para cubrir tal demanda se requerirá seguir aumentando la población porcina, lo que acarreará un incremento en la generación de porcinaza, que a un ritmo de excreción diaria de hasta 10 kg por cerdo, aumentará de manera sustantiva la disponibilidad de este subproducto.

Históricamente, el estiércol animal ha sido visto como un residuo, concepto que ha venido cambiando en muchos productores, quienes lo aprecian como fuente de nutrientes y energía renovable. El empleo estratégico de porcinaza como materia prima para alimentación animal o biofertilizante, ha sido limitado por las autoridades sanitarias colombianas por su posible riesgo contaminante [22]. La principal barrera se debe a que las excretas pueden contener una carga microbiológica elevada, que podría persistir aún después de someterse a diversos procesos de tratamiento.

En Colombia, en las granjas porcícolas tecnificadas, la porcinaza fresca es sometida a uno o varios procesos de tratamiento antes de su disposición final; los biodigestores y los tanques estercoleros usan la fracción líquida de aquella, mientras que el ensilado, el secado, el lombricompostaje y la harina de lombriz usan la fracción sólida. Esta fracción ha sido utilizada como elemento mejorador de los suelos y alimento de bovinos (*Bos indicus* y *Bos taurus*), tanto en forma fresca como ensilada. El ensilaje es un proceso anaerobio fermentativo en el que bacterias ácido-lácticas convierten carbohidratos solubles en ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico), creando un nivel de acidez que impide que otros microorganismos puedan descomponer el sustrato [49]. La porcinaza seca es aquella que es secada al sol, es una forma más fácil de incorporar excretas en la ración del ganado, es un producto casi inoloro, que demanda mucho espacio para el proceso y en el que se ha comprobado eliminación parcial de agentes patógenos. Se considera que un estiércol está seco cuando su contenido de humedad es inferior al 30% [5]. El lombricompostaje es la biooxidación y la estabilización de la materia orgánica, que implica

la acción conjunta de las lombrices y microorganismos [50]. El paso de porcinaza a través del sistema digestivo de la lombriz permite la reducción de patógenos, aunque ésta puede depender de la cantidad de estiércol [38]. Las lombrices por su alta tasa reproductiva son productoras de carne que comúnmente se usa en forma de harina. En el empleo de lombricompostado o harina elaborada con lombriz de tierra (*Lumbricus terrestris*) es necesario considerar el riesgo de transmisión, especialmente a cerdos, del nematodo pulmonar *Metastrongylus* spp., del cual dichas lombrices son hospedadores intermediarios [15].

A pesar de la implementación de estos sistemas, existe limitada información respecto a la utilidad de estas rutas en la eliminación de patógenos de la porcinaza bajo condiciones de campo en Colombia. De las diferentes formas de tratamiento, solo algunas brindan posibilidades de biorremediación, generándose por tanto, la necesidad de ampliar este horizonte mediante investigación. El presente trabajo se realizó con el propósito de establecer la persistencia de virus, bacterias, mohos, levaduras, y parásitos, en diferentes formas de utilización de la fracción sólida de la porcinaza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio. Se realizó un estudio de observación dirigida analizada descriptivamente.

Sitio y población de estudio. Se realizó un estudio en tres explotaciones porcinas de ciclo completo del centro occidente de Colombia, una granja ubicada en Pereira, de 800 madres (granja grande), a una altitud de 1261 msnm, con temperatura media de 25-30°C, humedad relativa del 76,7% y precipitación anual de 1906,6 mm; otra de 500 madres (granja mediana) en Villamaría, a 1850 msnm, con una temperatura media de 21-22°C, humedad relativa del 80% y precipitación anual de 2053 mm; y una de 280 madres (granja pequeña) en Santa Rosa de Cabal, a 1450 msnm, y 22-26°C de temperatura media, humedad relativa del 85,6% y precipitación anual de 2596,7 mm [14].

Rutas de tratamiento y momentos de muestreo. Se hizo un muestreo de porcinaza fresca al comienzo del estudio (día cero) y otro al final de los procesos de secado, de ensilado y de producción de lombricompostado y harina de lombriz; los muestreos se repitieron en dos ocasiones en las tres granjas con intervalos de un mes. Para el secado de la porcinaza, el cual se hizo al sol, se utilizaron tres lechos sobre tejas de fibrocemento ubicados bajo invernadero, midiéndose la humedad diariamente por el método de gravimetría para determinar el contenido de agua y materia seca, hasta alcanzar una humedad del 24 al 30%, que en promedio tardó 18 d. Para el ensilado se utilizaron para cada granja, tres microsilos de Policloruro de vinilo (PVC) de 2,5 kg, con válvula de vacío y cierre hermético, cargados con caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) integral molida con 40% de porcinaza fresca enri-

quecida con Vitafert® (producto biológicamente activo, rico en levaduras, lactobacilos y sus metabolitos) [12, 19]; el muestreo se llevó a cabo a los 15 d. El lombricompostaje se realizó en lechos de madera, utilizando 2 kg de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) y 50 kg de porcinaza estabilizada en pH (pHmetro SCHOTT® Instruments Lab 850, SI Analytics, Alemania) neutro, temperatura ambiente y humedad del 70%; al término de 90 d se llevó a cabo el muestreo del lombricompostaje y se extrajo la lombriz para la preparación de harina, por el método descrito en Vielma y col. [56]. Los muestreos se hicieron atendiendo a Mason [36] y Estrada y col. [12].

Patógenos y técnicas diagnósticas. En la porcinaza fresca se analizó la presencia de Parvovirus Porcino (PVP), Circovirus Porcino tipo 1 (PCV1), Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2), Herpesvirus Porcino tipo 1 (HVP1) o virus de la enfermedad de Aujeszky [20], *Actinobacillus pleuropneumoniae* [45] y *Lawsonia intracellularis* [32] por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional, cuyo fundamento es la amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos en forma exponencial, mediante ciclos consecutivos de desnaturalización, hibridación de cebadores y extensión de la nueva molécula creada [4]; mientras que el virus del Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (PRRSV) se detectó a través de PCR por Retrotranscriptasa Reversa (RT-PCR) anidada [7], la cual consta de dos reacciones de PCR secuenciales, utilizando como templado para la segunda reacción, el producto obtenido de la primera PCR [4]. *Clostridium* sulfito reductores por recuento en agar TSN [24]; mesófilos aerobios por recuento en placas de Petrifilm mesófilo, con agar Plate Count [30]; *Staphylococcus aureus*, recuento en medio de cultivo Baird Parker con ADN para determinar la producción de ADNsa [27]; coliformes totales (CT) y *Escherichia coli*, recuento en agar Bilis Rojo Violeta más glucorónido [25]; mohos y levaduras por recuentos en placas de Petrifilm específicas para cada uno [28, 29]; *Salmonella* spp., mediante incubación secuencial de 25 g de muestra en caldo lactosado, caldo Rapaport, agar Hecktoen, agar Bismuto Sulfito y agar Tripticasa, coloración de Gram, pruebas de oxidasa y aglutinación con antisuero polivalente "O" [26]; *Listeria monocytogenes*, incubación de 25 g de muestra en caldo Fraser, y prueba ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) en el equipo miniVIDAS (BioMérieux, Craponne, Francia) [23]; *Leptospira* spp., filtración con papel clarificante y membrana de acetato celulosa de 0,45 micras, posterior centrifugación y siembra del sedimento en medio EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) y evaluación por microscopía de campo oscuro (microscopio Nikon Epiaphot 200, Nikon Instruments Inc., Japon) semanalmente por cuatro semanas [17]; *Ascaris suum*, *Trichuris suis*, *Balantidium coli*, *Strongyloides* spp., *Metastrongylus* spp., "estrongilidos" y coccidias, mediante las técnicas de McMaster [57] y Sloss [55]; *Giardia intestinalis* con Ritchie, y *Cryptosporidium parvum* con coloración Zielh-Neelsen [57]. Todas las pruebas diagnósticas se ejecutaron en laboratorios avalados por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

Criterios de selección de los patógenos. La inclusión de los patógenos se hizo bajo los siguientes criterios: PRRSV, PCV2, PVP, *Lawsonia intracellularis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, por su alta prevalencia e impacto económico. El PCV1 se consideró como control de prueba del PCV2. *A. suum*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Giardia* spp., *Leptospira* spp., *S. aureus* por el riesgo zoonótico que conllevan. El virus de la enfermedad de Aujeszky por el riesgo que ésta representa a pesar de no estar reportado oficialmente en Colombia. Mesófilos aerobios, CT, *Clostridium* sulfito reductores, mohos y levaduras por ser indicadores de actividad microbiana en el tiempo. El resto de bacterias y parásitos (*Trichuris suis*, *Balantidium coli*, *Giardia intestinalis*, *Strongyloides* spp., *Metastrongylus* spp., coccidias y "estrongilidos") por su impacto económico, su importancia epidemiológica y por ser potencialmente patógenas para otras especies, incluidos los humanos.

En el presente estudio, la persistencia de virus, parásitos, *Actinobacillus* spp., *Leptospira* spp., *Listeria monocytogenes*, *Lawsonia intracellularis* y *Salmonella* spp. se valoró con la sola presencia del microorganismo, mientras que para los microorganismos diagnosticados por recuento (mesófilos aerobios, *S. aureus*, CT, *E. coli*, *Clostridium* sulfito reductores, mohos, levaduras), la persistencia dependió de que el número final de cada agente superara los niveles máximos permitidos de acuerdo con los valores de referencia de la TABLA I [16, 21, 31].

TABLA I
RECuentos máximos adoptados para
ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES

Microorganismo	Límite máximo en UFC/g	Fuente
Mesófilos aerobios	10x10 ⁷	[21]
<i>Staphylococcus aureus</i>	10x10 ⁴	[31]
Mohos	10x10 ⁴	[21]
Levaduras	10x10 ⁴	[21]
<i>Clostridium</i> sulfito reductores	20x10 ¹	[21]
Coliformes totales	10x10 ⁴	[21]
<i>Escherichia coli</i>	10x10 ¹	[16]

UFC/g: unidades formadoras de colonia/gramo.

La información obtenida se procesó empleando técnicas de estadística descriptiva mediante una hoja de cálculo electrónico. Los datos fueron plasmados en tablas y se codificó el resultado con una cruz (+) cuando se evidenció la presencia del microorganismo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA II se aprecia que de los 26 patógenos estudiados solo se encontraron 13 en la porcinaza fresca con la cual se prepararon los lechos de secado, de ellos persistieron seis: *Lawsonia intracellularis*, solo en uno de los dos mues-

TABLA II
**PATÓGENOS ENCONTRADOS EN TRES GRANJAS DEL CENTRO OCCIDENTE DE COLOMBIA
 EN LECHOS DE SECADO DE PORCINAZA**

Patógeno	GG				GM				GP				
	M1		M2		M1		M2		M1		M2		
	DI	P	DI	P	DI	P	DI	P	DI	P	DI	P	
PVP													
PCV1													
PCV2													
PRRS													
HVP1													
<i>Lawsonia intracellularis</i>						+					+		+
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>													
Mesófilos aerobios	+	+	+		+		+		+	+	+		
<i>Staphylococcus aureus</i>	+		+		+		+		+		+		
Mohos					+		+						
Levaduras	+		+		+		+		+		+		
<i>Clostridium</i> sulfito reductores	+	+	+		+	+	+		+	+	+		
Coliformes totales	+	+	+		+		+		+	+	+		
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>										+	+	+	
<i>Salmonella</i> spp.	+				+					+			
<i>Leptospira</i> spp.													
<i>Ascaris suum</i>													
<i>Cryptosporidium parvum</i>													
<i>Trichuris suis</i>													
<i>Balantidium coli</i>							+					+	
<i>Metastrongylus</i> spp													
<i>Giardia intestinalis</i>													
Estrongilidos													
<i>Strongyloides</i> spp.							+						
Coccidias							+						

GG: granja grande; GM: granja mediana; GP: granja pequeña; M1: muestreo 1; M2: muestreo 2; DI: diagnóstico inicial (porcinaza fresca); P: persistencia; (+): presencia del agente patógeno.

treos de la granja pequeña; mesófilos aerobios y CT, en un solo muestreo de las granjas grande y pequeña; *Clostridium* sulfito reductores, en un muestreo de cada granja; *E. coli* persistió siempre en las tres granjas; *Listeria monocytogenes* en un muestreo de la granja pequeña.

En el presente estudio no persistieron parásitos, mohos, levaduras, *Staphylococcus aureus* ni *Salmonella* spp. en esta vía, la explicación podría ser la deshidratación y la exposición a los rayos ultravioletas (UV) del sol, los cuales afectan los microorganismos [41]. Según Leyva y col. [34], los microorganismos requieren de agua disponible para su desarrollo, técnicamente denominada "Actividad de agua" (Aa), por lo que cualquier mecanismo de deshidratación reducirá la capacidad de sobrevivir de muchos de éstos. En esta investigación, el contenido de humedad de las muestras de porcinaza seca se mantuvo entre 24

a 30%. En esta ruta, mohos y levaduras no persistieron posiblemente porque su crecimiento se da sobre la superficie del sustrato, donde quedan más expuestos a los efectos de la radiación solar [1]. *Salmonella* spp. es una bacteria que tiene una capa de peptidoglicanos delgada que la hace menos resistente a condiciones de sequedad [52], y esto puede explicar su eliminación en esta ruta. La eliminación de *Staphylococcus aureus* pudo deberse a que no sobreviven en condiciones de baja disponibilidad de agua [34]. Se presentó persistencia de mesófilos aerobios, dado que abarcan una amplia población de microorganismos, entre los que se encuentran algunos con capacidad de formar esporas, que les permiten resistir la sequía, calor, y radiación UV [43]. *Lawsonia intracellularis* persistió sólo en uno de los muestreos de la granja pequeña; hay que tener en cuenta que *L. intracellularis* es una bacteria con adap-

tación específica al microambiente intracelular [54], y logra sobrevivir en condiciones extracelulares hasta por dos semanas [6]. Aunque en este estudio sólo persistió en uno de los muestreos habría que descartar que la técnica haya encontrado ADN a partir de células muertas, siendo posible la detección de fragmentos de ADN sin que el microorganismo haya sido viable; CT aparecieron en las tres granjas y en la mediana no persistió en ninguno de los muestreos, posiblemente afectados por la deshidratación y la luz solar [41]; la persistencia de *Clostridium* sulfito reductores puede deberse a su capacidad de formar esporas, las cuales resisten condiciones de estrés ambiental [42]. *Listeria monocytogenes* persistió en uno de los muestreos; esto puede explicarse porque es una bacteria capaz de soportar en gran medida el estrés ocasionado por la desecación [58]; el único patógeno que persistió en todos los muestreos fue *Escherichia coli*, lo cual puede ser debido a su capacidad de sobrevivir durante varios meses en ambientes secos [33]. En este estudio, ningún parásito persistió en la porcinaza seca; al respecto, se sabe que los estados de vida libre de *Strongyloides* spp. son muy sensibles a la desecación. *Balantidium coli* y coccidias sobreviven mejor en un ambiente húmedo protegido de la luz directa del sol [13, 46].

En la TABLA III se observa que 14 de los 26 agentes incluidos en el estudio fueron detectados en la porcinaza sólida empleada para preparar el ensilaje; siete de ellos persistieron al final del proceso: *Lawsonia intracellularis* en los dos muestreos de la granja pequeña; mesófilos aerobios en los dos muestreos de la granja grande y en uno de la mediana; los mohos en los dos muestreos de la granja grande y en uno de la mediana; las levaduras en uno de los muestreos de la

TABLA III
PATÓGENOS ENCONTRADOS EN TRES GRANJAS DEL CENTRO OCCIDENTE DE COLOMBIA
EN ENSILAJE DE PORCINAZA

Patógeno	GG				GM				GP				
	M1		M2		M1		M2		M1		M2		
	DI	P	DI	P	DI	P	DI	P	DI	P	DI	P	
PVP													
PCV1													
PCV2													
PRRS													
HVP1													
<i>Lawsonia intracellularis</i>					+					+	+	+	+
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>													
Mesófilos aerobios	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	
<i>Staphylococcus aureus</i>			+				+					+	
Mohos	+	+			+	+	+						
Levaduras	+	+	+		+	+	+					+	
<i>Clostridium</i> sulfito reductores	+	+	+		+	+	+			+	+	+	
Coliformes totales	+		+	+	+		+			+		+	
<i>Escherichia coli</i>	+		+	+	+		+	+	+	+		+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>												+	
<i>Salmonella</i> spp.					+								
<i>Leptospira</i> spp.													
<i>Ascaris suum</i>													
<i>Cryptosporidium parvum</i>													
<i>Trichuris suis</i>													
<i>Balantidium coli</i>	+						+			+		+	
<i>Metastrongylus</i> spp													
<i>Giardia intestinalis</i>													
Estrongilidos	+				+								
<i>Strongyloides</i> spp.	+						+						
Coccidias	+		+		+		+						

GG: granja grande; GM: granja mediana; GP: granja pequeña; M1: muestreo 1; M2: muestreo 2; DI: diagnóstico inicial (porcinaza fresca); P: persistencia; (+): presencia del agente patógeno.

granja grande y de la mediana; los CT en uno de los muestreos de la granja grande; y *Clostridium* sulfito reductores y *E. coli* en un muestreo de cada granja.

El ensilaje ha sido estudiado como alternativa para la alimentación animal por su capacidad de conservación de forrajes con alta calidad nutritiva y sanitaria. En este estudio, bacterias de importancia como patógenos transmitidos por alimentos como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* no persistieron; no persistió tampoco parásito alguno, lo cual puede entenderse por las condiciones de anaerobiosis del ensilaje, así como por el nivel de acidez alcanzado [39]. Estudios previos han demostrado la eficiencia de esta ruta en la eliminación de *Listeria monocytogenes* [39], *Salmonella* spp. y parásitos [12]. *Lawsonia intracellularis* persistió; sin embargo, no se encontraron reportes asociados a ensilajes; como se indicó anteriormente, la sola presencia de este patógeno no implica su viabilidad, pues la PCR podría estar también detectando fragmentos de ADN de células muertas. El grupo de mesófilos aerobios persistió, posiblemente por la presencia de bacterias anaerobias facultativas, capaces de vivir en ambientes anaerobios [3]. Mohos y levaduras persistieron; la aparición de estos microorganismos en los ensilajes se debe a la presencia de aire dentro del silo por imperfecciones en la fabricación que permiten la esporulación de levaduras y mohos aeróbicos [8]; su persistencia en esta investigación puede entenderse por que algunos géneros de éstos microorganismos que pueden estar presentes en la porcina necesitan tiempos de ensilaje entre 28-56 d para asegurar su eliminación [47]. *Clostridium* sulfito reductores persistieron; estos microorganismos son anaerobios obligados y pueden crecer aún bajo condiciones de pH bajo, haciendo difícil su control [39]. La persistencia de CT y *E. coli* pudo darse probablemente porque el pH no se mantuvo lo suficientemente bajo durante el proceso de ensilaje [44].

Como puede apreciarse en la TABLA IV, de los 26 patógenos considerados al inicio del estudio en porcina sólida fresca usada para preparar el lombricompostaje aparecieron 13, de los cuales nueve persistieron: los mesófilos aerobios, *Clostridium* sulfito reductores, CT, y *E. coli*, en todos los muestreos y en todas las granjas; *Staphylococcus aureus* en los dos muestreos de la granja grande y en uno solo de la mediana; los mohos en los dos muestreos de la granja mediana; y las levaduras en uno de los muestreos de la granja grande y de la pequeña.; *Balantidium coli* y *Strongyloides* spp., en un solo muestreo de la granja mediana.

En el caso del lombricompostaje se observó persistencia de la mayoría de los patógenos. Algunas bacterias como *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* no persistieron, las coccidias tampoco lo hicieron. Se han planteado diferentes mecanismos de eliminación de patógenos, que incluyen el daño mecánico generado por la ingestión y el triturado que se produce en la molleja así como por la acción enzimática durante la digestión [11]. Este fenómeno se

presenta por acción de los músculos internos que ejercen un efecto de presión sobre el alimento; el movimiento continuo de la musculatura interna permite el desplazamiento desde la cavidad bucal, pasando por el esófago y llegando a la molleja [10], lugar en el cual existe una fuerte acción de las paredes musculares que trituran el contenido de alimento y los microorganismos presentes [9], ayudada por la acción de enzimas digestivas como proteasas, lipasas, amilasas, liquenasas, celulasas y quitinasas [10]. De manera indirecta, las lombrices estimulan la acción de otros microorganismos con actividad competitiva, antagonista y fagocítica, tanto dentro de las lombrices como en el sustrato; además, se producen algunas sustancias con actividad antimicrobiana como los ácidos húmicos [11]. Se ha demostrado que altas concentraciones de ácidos húmicos no son favorables para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* [48]. La eliminación de *Salmonella* spp. puede ser debida a la incapacidad de competir con la microflora endémica [11]. En el caso de *Lawsonia intracellularis*, ésta solo logra sobrevivir en el medio externo durante dos semanas [6], tiempo muy inferior a los tres meses que duró esta ruta en el presente estudio. La eliminación de coccidias podría explicarse porque éstas sobreviven mejor en medios líquidos [13]. En el caso de *Balantidium coli* y *Strongyloides* spp. éstos lograron persistir; según Tajbakhsh y col. [51] las esporas de algunas bacterias así como algunos parásitos transitan por el tracto digestivo de las lombrices sin sufrir ningún cambio. El lombricompostaje requiere de temperaturas cercanas a 35°C para el adecuado funcionamiento de las lombrices [11]. Este ambiente favorece la supervivencia de la población de mesófilos aerobios. El lombricompostaje permite la reducción de la población de coliformes, debido al pasaje de estos microorganismos por el tracto gastrointestinal de las lombrices; sin embargo, este proceso solo es efectivo cuando se utilizan bajas dosis de porcina [38]. Bajo las condiciones de esta investigación, no fue posible alcanzar niveles de CT, ni de *E. coli*, por debajo de los valores de referencia; una opción para mejorar el proceso de sanitización es realizar un termocompostaje previo [40]. La persistencia de algunos patógenos como los CT y *Clostridium* spp. puede darse cuando la porcina no es bien digerida por las lombrices, sobre todo cuando los sustratos están muy compactados impidiendo el tránsito de las lombrices a través de éstos; además, es posible que algunos patógenos logren aprovechar la reducción de otras poblaciones de microorganismos para favorecer su supervivencia [2]. La población de *Staphylococcus aureus* puede ser reducida en el lombricompostaje al ser reemplazada por microorganismos comensales del proceso; sin embargo, este mecanismo es dependiente del tiempo [37]. En el caso de mohos y levaduras, se observó persistencia. Algunos autores han encontrado correlación positiva entre la presencia de lombrices y la de mohos y levaduras, aunque esta relación no se entiende completamente, puesto que algunas de sus colonias son fuente de alimento para las lombrices [35].

TABLA IV
PATÓGENOS ENCONTRADOS EN TRES GRANJAS DEL CENTRO OCCIDENTE DE COLOMBIA
EN LOMBRICOMPOSTAJE DE PORCINAZA

Patógeno	GG				GM				GP				
	M1		M2		M1		M2		M1		M2		
	DI	P	DI	P	DI	P	DI	P	DI	P	DI	P	
PVP													
PCV1													
PCV2													
PRRS													
HVP1													
<i>Lawsonia intracellularis</i>					+					+			+
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>													
Mesófilos aerobios	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+		+	+	+			+	
Mohos					+	+	+	+					
Levaduras	+	+	+		+		+		+	+	+		
<i>Clostridium</i> sulfito reductores	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coliformes totales	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>										+		+	
<i>Salmonella</i> spp.	+				+					+			
<i>Leptospira</i> spp.													
<i>Ascaris suum</i>													
<i>Cryptosporidium parvum</i>													
<i>Trichuris suis</i>													
<i>Balantidium coli</i>								+	+				+
<i>Metastrongylus</i> spp													
<i>Giardia intestinalis</i>													
Estrongilidos													
<i>Strongyloides</i> spp.								+	+				
Coccidias				+				+					

GG: granja grande; GM: granja mediana; GP: granja pequeña; M1: muestreo 1; M2: muestreo 2; DI: diagnóstico inicial (porcinaza fresca); P: persistencia; (+): presencia del agente patógeno.

En la TABLA V puede observarse que de los 26 patógenos estudiados, se encontraron 13 en la porcinaza fresca con la cual se alimentaron las lombrices utilizadas para preparar la harina de lombriz; al finalizar esta ruta persistieron cuatro: los mesófilos aerobios en un muestreo de la granja grande; *Clostridium* sulfito reductores en uno solo de los muestreos de cada granja; los CT en uno de los muestreos de las granjas mediana y pequeña; *E. coli*, persistió en todos los muestreos y en todas las granjas.

La harina de lombriz mostró ser eficiente en la eliminación de patógenos, solo lograron persistir los mesófilos aerobios, *Clostridium* sulfito reductores, CT y *E. coli*. La reducción de patógenos puede deberse en primer lugar al contenido de humedad tan bajo que impide el desarrollo de la mayoría de microorganismos [56]; y en segundo lugar, la temperatura de 60°C limita el crecimiento de patógenos, debido a que la mayo-

ría de las bacterias crecen en temperaturas cercanas a los 35°C, mientras los mohos y levaduras a temperaturas próximas a los 30°C [34]. La temperatura jugó un papel importante en la reducción de mohos y levaduras, por ser muy superior a la temperatura que favorece su supervivencia; coincidiendo con los resultados reportados por Vielma y col. [56]. *Lawsonia intracellularis* no persistió, tampoco lo hizo en el lombricompostaje, como ya se había mencionado, sus características intrínsecas no le permiten sobrevivir por más de dos semanas fuera del hospedador [6, 54]. *Staphylococcus aureus* es un microorganismo termolábil y su crecimiento se ve limitado por temperaturas superiores a 47°C, así como por condiciones de baja disponibilidad de agua [34]. *Salmonella* spp. es susceptible a condiciones de sequía [52]. Aunque se conoce la capacidad de *Listeria monocytogenes* para soportar condiciones

TABLA V
PATÓGENOS ENCONTRADOS EN TRES GRANJAS DEL CENTRO OCCIDENTE DE COLOMBIA EN HARINA DE LOMBRIZ

Patógeno	GG				GM				GP				
	M1		M2		M1		M2		M1		M2		
	DI	P	DI	P	DI	P	DI	P	DI	P	DI	P	
PVP													
PCV1													
PCV2													
PRRS													
HVP1													
<i>Lawsonia intracellularis</i>						+					+		+
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>													
Mesófilos aerobios	+	+	+		+		+		+		+		+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+		+		+		+		+		+		+
Mohos						+		+					
Levaduras	+		+		+		+		+		+		+
<i>Clostridium</i> sulfito reductores	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+
Coliformes totales	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>											+		+
<i>Salmonella</i> spp.	+					+					+		
<i>Leptospira</i> spp.													
<i>Ascaris suum</i>													
<i>Cryptosporidium parvum</i>													
<i>Trichuris suis</i>													
<i>Balantidium coli</i>											+		+
<i>Metastrongylus</i> spp													
<i>Giardia intestinalis</i>													
Estrongilidos													
<i>Strongyloides</i> spp.											+		
Coccidias				+							+		

GG: granja grande; GM: granja mediana; GP: granja pequeña; M1: muestreo 1; M2: muestreo 2; DI: diagnóstico inicial (porcinaza fresca); P: persistencia; (+): presencia del agente patógeno.

de estrés, como la desecación [58], pudo removerse en esta ruta, puesto que la harina de lombriz es un proceso complementario al lombricompostaje, donde ya se había determinado su desaparición. En esta ruta ningún parásito persistió debido a que son muy susceptibles a la desecación [13]. Hubo persistencia de mesófilos aerobios, aunque en una sola de las muestras. Según los reportes de Vielma y col. [56], estos microorganismos no deberían persistir; sin embargo, la capacidad que tienen algunos tipos de bacterias incluídas dentro de este grupo para formar esporas pudo favorecer su persistencia, dada su resistencia a condiciones de sequía y temperatura. Esta misma condición de esporulación, pudo favorecer la persistencia de los *Clostridium* sulfito reductores [42]. En la presente investigación, se presentó persistencia de CT y de *E. coli*, a diferencia de lo encontrado por Vielma y col. [56], quienes reportan reducciones de estos microorganismos hasta niveles segu-

ros para la alimentación. Las diferencias en los resultados pueden explicarse por el origen del sustrato utilizado para la alimentación de las lombrices, puesto que la porcinaza presenta una carga inicial de coliformes elevada.

En este estudio, ninguno de los virus analizados pudo ser detectado mediante las pruebas de análisis en la porcinaza fresca, probablemente por la presencia de viricidas en la porcinaza sólida (enzimas bacterianas, amoníaco no ionizado y desinfectantes) [53].

CONCLUSIONES

La ruta de utilización de la porcinaza sólida que mostró mayor eficiencia en la eliminación de patógenos fue la harina de lombriz. Bajo las condiciones de este estudio, en el lombriz-

compostaje hubo persistencia de la mayoría de los agentes patógenos, por lo cual no es un buen medio de sanitización. La porcinaza seca con 24 a 30% de humedad puede ser considerada una buena estrategia para eliminar patógenos; sin embargo, queda el interrogante de lo que ocurriría por debajo del 24%. El ensilaje fue la única ruta que permitió reducciones de *E. coli* por debajo del valor de referencia en tres de los seis muestreos; esto, sumado a la eliminación de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Balantidium coli*, *Strongyloides* spp. y coccidias permite considerarlo como una estrategia de gran valor de biorremediación.

Acorde a los resultados obtenidos y a estudios previos, en todas las rutas de este estudio se observó variación en la persistencia de agentes patógenos, indicando que podrían funcionar como sistemas de transformación de la porcinaza para la remoción de éstos; sin embargo, es necesario realizar algunos ajustes propios para cada ruta con el fin de obtener mejores resultados desde el punto de vista de biorremediación; esto puede llegar a ser un nuevo campo de estudio en la línea de inocuidad de la porcinaza, siendo éste el primer trabajo desarrollado en Colombia acerca de este importante tópico. La persistencia de *Lawsonia intracellularis* y otros agentes deja el interrogante si se trata de organismos viables o no, razón por la cual se recomienda utilizar alguna técnica de cultivo que permita confirmar la viabilidad de tales agentes. Para el caso de *E. coli* valdría la pena diferenciar el tipo de adhesinas pues estas son específicas para cada especie.

AGRADECIMIENTO

A la Vicerectoría de Investigaciones y Posgrados de la Universidad de Caldas, Manizales. Al laboratorio Médico Veterinario (LMV), Bogotá. Al laboratorio ANIMED, Bogotá. Al laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADAN, O.C.G. On the fungal defacement of interior finishes. Technical University of Eindhoven, The Netherlands. Thesis of Grade. 224 pp. 1994.
- [2] AIRA, M.; GOMEZ-BRANDON, M.; GONZALEZ-PORTO, P.; DOMINGUEZ, J. Selective reduction of the pathogenic load of cow manure in an industrial-scale continuous-feeding vermireactor. **Bioresour. Technol.** 102(20): 9633-9637. 2011.
- [3] BALL, H.R.; HAMID-SAMIMI, M.; FOEGEDING, P.M.; SWARTZEL, K.R. Functionality and Microbial Stability of Ultrapasteurized, Aseptically Packaged Refrigerated Whole Egg. **J. Food Sci.** 52(5):1212-1218. 1987.
- [4] BAUMFORTH, K.R.; NELSON, P.N.; DIGBY, J.E.; O'NEIL, J.D.; MURRAY, P.G. Demystified the polymerase chain reaction. **Mol. Path.** 52(1):1-10. 1999.
- [5] BECK, R.W. Dry Animal Manure. In: **Review of Biomass Fuels and Technologies**. Beck, R.W (Ed.). Yakima County Public Works Solid Waste Division, USA. 49 pp. 2003.
- [6] COLLINS, A.; LOVE, R.J.; POZO, J.; SMITH, S.H.; MCORIST, S. Studies on the ex vivo survival of *Lawsonia intracellularis*. **Swine Health Prod.** 8(5): 211-215. 2000.
- [7] CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; NELSON, E.A.; HINES, R.J.; NELSON, J.K.; SWENSON S.L.; ZIMMERMAN, J.J.; CHASE, C.L.; YAEGER, M.J.; BENFIELD, D.A. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. **J. Vet. Diagn. Invest.** 7(4):456-464. 1995.
- [8] DOS SANTOS, V.M.; DORNER, J.W.; CARREIRA, F. Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. **Mycopathol.** 156(2): 133-138. 2003.
- [9] EDWARDS, C.A.; BOHLEN, P.J. Earthworm physiology. In: **Biology and Ecology of Earthworms**. Volume 3. Edwards, C.A.; Bohlen, P.J (Eds). Chapman and Hall, London, England. Pp 71-89. 1996.
- [10] EDWARDS, C.A.; FLETCHER, K.E. Interactions between Earthworms and Microorganisms in Organic-matter Breakdown. **Agr. Ecosyst. Environ.** 24 (1-3): 235-247. 1988.
- [11] EDWARDS C.A.; SUBLER, S. Possible mechanisms of pathogen reduction during vermicomposting. In: **Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management**. Edwards, C.A.; Arancon, N.Q.; Sherman, R (Eds). CRC Press, Boca Raton. Pp 258-259. 2011.
- [12] ESTRADA, J.; ARANDA, E.M.; PICHARD, G.; HENAO, F.J. Efecto de la fermentación en estado sólido de la porcinaza sobre la persistencia de patógenos en el ensilaje. **Bol. Cient. Mus. Hist. Nat.** 15(2): 71-80. 2011.
- [13] FAYER, R. Epidemiology of protozoan infections: the coccidia. **Vet. Parasitol.** 6 (1-3): 75-103. 1980.
- [14] FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS. Anuario Meteorológico Cafetero 2012. Centro Nacional de Investigaciones del Café. Chinchiná, Colombia. 567 pp. 2013.
- [15] GASSÓ, D.; ROSSI, L.; MENTABERRE, G.; CASAS, E.; VELARDE, R.; NOSAL, P.; SERRANO, E.; SEGALÉS, J.; FERNANDEZ-LLARIO, P.; FELIU, C. An identification key for the five most common species of *Metastrongylus*. **Parasitol. Res.** 113(9): 3495-3500. 2014.
- [16] GILBERT, R.J.; DE LOUVOIS, J.; DONOVAN, T.; LITTLE, C.; NYE, K.; RIBEIRO, CD.; RICHARDS, J.; ROBERTS, D.; BOLTON, F.J. Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. **Commun. Dis. Public Health.** 3(3): 163-167. 2000.

- [17] GIRALDO, G.; ORREGO, A.; SANTACRUZ, M.; YEPEZ, E. Leptospirosis. Las aguas de la explotación porcina como vehículo de la Leptospira, en la zona central cafetera de Colombia. **Arch. Med. Vet.** 34 (1):1-12. 2002.
- [18] GRIGGS, D.; STAFFORD-SMITH, M.; GAFFNEY, O.; ROCKSTROM, J.; OHMAN, M.C.; SHYAMSUNDAR, P.; STEFFEN, W.; GLASER, G.; KANIE, N.; NOBLE, I. Policy: Sustainable development goals for people and planet. **Nature.** 495 (March):305-307. 2013.
- [19] GUTIÉRREZ, D.; ELÍAS, A.; GARCÍA, A.; HERRERA, F.; JORDÁN, H.; SARDUY, L. Efecto del aditivo microbiano VITAFERT en el consumo de la materia seca y fibra neutro detergente en cabras Saanen alimentadas con heno de *Brachiaria brizantha*. **Rev. Cub. Cien. Agr.** 46(3): 267-71. 2012.
- [20] HUANG, C.; HUNG, J.J.; WU, C.Y.; CHIEN, M.S. Multiplex PCR for rapid detection of Pseudorabies virus, Porcine Parvovirus and Porcine Circoviruses. **Vet. Microbiol.** 101 (3): 209-214. 2004.
- [21] INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Directiva DIP-30-100-003. Directivas técnicas de alimentos para animales y sales mineralizadas. Alimentos para animales. Instituto Colombiano Agropecuario, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 3 pp. 1999.
- [22] INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Resolución 2640. Reglamentación de las condiciones sanitarias y de inocuidad en la producción primaria de ganado porcino destinado al sacrificio para el consumo humano. Bogotá, D.C.; Colombia. 20 pp. 2007.
- [23] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NTC 4666. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes*. Parte 1. Método de detección. ICONTEC. Santa Fe de Bogotá, D.C.; Colombia. 23 pp. 1999.
- [24] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NTC 4834. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de *Clostridium* sulfito reductores e identificación de *Clostridium perfringens*. Técnica de recuento de colonias. ICONTEC. Santa Fe de Bogotá, D.C.; Colombia. 15 pp. 2000.
- [25] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NTC 4458. Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos. ICONTEC. Santa Fe de Bogotá, D.C.; Colombia. 12 pp. 2007.
- [26] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NTC 4574. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. ICONTEC. Santa Fe de Bogotá, D.C.; Colombia. 32 pp. 2007.
- [27] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NTC 4779. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies). ICONTEC. Santa Fe de Bogotá, D.C.; Colombia. 25 pp. 2007.
- [28] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NTC 5698-1. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 1: técnica de recuento de colonias en productos con Actividad Acuosa (Aw) superior a 0,95. ICONTEC. Santa Fe de Bogotá, D.C.; Colombia. 11 pp. 2009.
- [29] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NTC 5698-2. Microbiología de alimentos y productos de alimentación animal. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 2: técnica de recuento de colonias en productos con Actividad Acuosa (Aw) inferior o igual a 0,95. ICONTEC. Santa Fe de Bogotá, D.C.; Colombia. 12 pp. 2009.
- [30] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NTC 4833. Industria de cosméticos. Requisitos microbiológicos para productos cosméticos. ICONTEC. Santa Fe de Bogotá, D.C.; Colombia. 17 pp. 2012.
- [31] INSTITUTO NACIONAL DE SALUD.; MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Evaluación de riesgos de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social; Instituto Nacional de Salud. Imprenta Nacional de Colombia. 74 pp. 2011.
- [32] JORDAN, D.M.; KNITTEL, J.P.; ROOF, M.B.; SCHWARTZ, K.; LARSON, D.; HOFFMAN, L.J. Detection of *Lawsonia intracellularis* in swine using Polymerase Chain Reaction methodology. **J. Vet. Diagn. Invest.** 11(1):45-49. 1999.
- [33] KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infect. Dis.** 6 (August): 130. 2006.
- [34] LEYVA, V.; MARTINO, T.K.; PUIG, Y. Crecimiento microbiano. En: **Temas de higiene de los alimentos**. Caballero, A.E. (Ed.). Editorial Ciencias Médicas, La Habana, Cuba. Pp 43-54. 2008.
- [35] MAINOO, N.; WHALEN, J.K.; BARRINGTON, S. Earthworm abundance related to soil physicochemical and microbial properties in Accra, Ghana. **Afr. J. Agric. Res.** 3(3): 186-194. 2008.

- [36] MASON, B.J. Preparation of Soil Sampling Protocols: Sampling Techniques and Strategies. EPA/600/R-92/128. Environmental Protection Agency, Las Vegas, USA. 169 pp. 1992.
- [37] MATHUR, U.B.; VERMA, L.K.; SRIVASTAVA, J.N. Effects of Vermicomposting on Microbiological Flora of Infected Biomedical Waste. **J. ISHWM**. 5(1): 21-26. 2006.
- [38] MONROY, F.; AIRA, M.; DOMÍNGUEZ, J. Reduction of total coliform numbers during vermicomposting is caused by short-term direct effects of earthworms on microorganisms and depends on the dose of application of pig slurry. **Sci. Total Environ**. 407(20): 5411–5416. 2009.
- [39] MUCK, R.E. Silage microbiology and its control through additives. **Rev. Bras. Zoo**. 39 (Supl. Esp): 183-191. 2010.
- [40] NAIR, J.; SEKIOZOIC, V.; ANDA, M. Effect of pre-composting on vermicomposting of kitchen waste. **Bioresour. Technol**. 97(16): 2091-2095. 2006.
- [41] NICHOLSON, F.A.; GROVES, S.J.; CHAMBERS, B.J. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. **Bioresour. Technol**. 96(2): 135-143. 2005.
- [42] OLGUIN-ARANEDA, V.; BANAWAS, S.; SARKER, M.R.; PAREDES-SABJA, D. Recent advances in germination of *Clostridium* spores. **Res. Microbiol**. 166(4): 236–243. 2015.
- [43] POSTOLLEC, F.; MATHOT, A.G.; BERNARD, M.; DIVANACH, M.L.; PAVAN, S.; SOHIER, D. Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. **Int. J. Food Microbiol**. 158(1): 1-8. 2012.
- [44] SANTANA-DELGADO, H.; AVILA, E.; SOTELO, A. Preparation of silage from Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*) and its evaluation in broiler diets. **Anim. Feed Sci. Tech**. 141(1-2): 129–140. 2008.
- [45] SCHALLER, A.; DJORDJEVIC, S.P.; EAMENS, G.J.; FORBES, W.A.; KUHN, R.; KUHNERT, P.; GOTTSCHALK, M.; NICOLET, J.; FREY, J. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*. **Vet. Microbiol**. 79(1):47-62. 2001.
- [46] SCHUSTER, F.L.; RAMIREZ-AVILA, L. Current world status of *Balantidium coli*. **Clin. Microbiol. Rev**. 21(4): 626-638. 2008.
- [47] SERRANO-GARCÍA, E.; CASTREJÓN-PINEDA, F.; HERRADORA-LOZANO, M.A.; RAMÍREZ-PÉREZ, A.H.; ANGELES-CAMPOS, S.; BUNTINX, S.E. Fungal survival in ensiled swine faeces. **Bioresour. Technol**. 99(9): 3850-3854. 2008.
- [48] SIDORENKO, M.L.; BUZOLEVA, L.S.; KOSTENKOV, N.M. The Effect of Soil Properties on the Preservation and Reproduction of *Listeria* and *Yersinia*. **Eurasian Soil Sci**. 39(2): 211-217. 2006.
- [49] SILVEIRA, E.A.; FRANCO, R. Conservación de forrajes: segunda parte. **Rev. Electr. Vet**. 7(11): 1-37. 2006.
- [50] SUTHAR S. Vermicomposting of vegetable-market solid waste using *Eisenia fetida*: Impact of bulking material on earthworm growth and decomposition rate. **Ecol. Eng**. 35(5): 914–920. 2009.
- [51] TAJBAKHSI, J.; MOHAMMADI, E.; VARMA, A. Potential for Transmission of Pathogens. In: **Biol. Earthworms**. Karaca, A. (Ed.). Springer. 221 pp. 2011.
- [52] TAKAHASHI, H.; KURAMOTO, S.; MIYA, S.; KIMURA, B. Desiccation survival of *Listeria monocytogenes* and other potential foodborne pathogens on stainless steel surfaces is affected by different food soils. **Food Control**. 22(3-4): 633-637. 2011.
- [53] TURNER, C.; BURTON, C.H. The inactivation of viruses in pig slurries: a review. **Bioresour. Technol**. 61(1): 9-20. 1997.
- [54] VANNUCCI, F.A.; GEBHART, C.J. Recent advances in understanding the pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* infections. **Vet. Pathol**. 51(2): 465-77. 2014.
- [55] VÉLEZ, A. La coprología y otras técnicas de diagnóstico. En: **Guías en Parasitología Veterinaria**. Vélez, A (Ed). Exitodinámica Editores. Medellín, Colombia. Pp 50-88. 1983.
- [56] VIELMA, R.A.; ROSALES, D.; ROSALES, Y.; MEDINA, A.L.; VILLARREAL, J. Perfil electroforético y calidad microbiológica de la harina de lombriz *Eisenia fetida*. **Rev. Chil. Nutr**. 35(3): 225-234. 2008.
- [57] VIGNAU, M.L.; VENTURINI, L.M.; ROMERO, J.R.; EIRAS, D.F.; BASSO, W.U. Técnicas de diagnóstico. Capítulo 6. En: **Parasitología práctica y modelos de enfermedades parasitarias en los animales domésticos**. Vignau, M.L.; Venturini, L.M.; Romero, J.R.; Eiras, D.F.; Basso, W.U (Eds). 1^{ra} Ed. María Laura Vignau, Argentina. Pp 157-185. 2005.
- [58] VOGEL, B.F.; HANSEN, L.T.; MORDHORST, H.; GRAM, L. The survival of *Listeria monocytogenes* during long term desiccation is facilitated by sodium chloride and organic material. **Int. J. Food Microbiol**. 140(2-3): 192-200. 2010.