

Trabajo completo

Inactivación de *Cryptosporidium spp.* en estiércol de ganado vacuno por un sistema de compostaje

RECIBIDO: 18/12/2012

ACEPTADO: 13/09/2013

Zerbatto, MG.¹ • Lerman de Abramovich, B.¹ • Groppelli, E.² • Pizarro, AV.¹ • Modini, LB.¹

¹ Sección Aguas – Departamento de Ciencias Biológicas – Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

² Grupo de energía no convencional. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral.

Ciudad Universitaria, S3000ZAA, Santa Fe, Argentina.

Teléfono: 0342-4575211

E-mail: mzerbatto@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Uno de los riesgos potenciales de contaminación de los recursos hídricos asociado con el estiércol de ganado vacuno es la presencia del parásito zoonótico *Cryptosporidium*. Teniendo en cuenta la resistencia del mismo a factores ambientales y al tratamiento de potabilización del agua, se propuso como objetivo estudiar la inactivación de este enteroparásito en estiércol por un sistema de compostaje en hilera. Se trabajó con montículos a escala laboratorio con agregado de materiales habituales de compostaje a escala real. Se los inoculó con suspensiones de *Cryptosporidium spp.* sometiéndolos en estufa con ventilación forzada a temperaturas termofílicas que imitan las que se producen con esta tecnología aplicada en campo. El proceso

completo tuvo una duración de 21 días.

La viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* al principio de las experiencias fue superior a 94 %, disminuyendo significativamente al final de los ensayos a valores inferiores a 20 % ($p < 0,05$).

PALABRAS CLAVE: *Cryptosporidium*, Compostaje, Recursos hídricos.

SUMMARY: *Inactivation of Cryptosporidium spp. in cattle manure for compost system.* One of the potential risks of water resources contamination associated with cattle manure is the presence of *Cryptosporidium*. This zoonotic parasite is highly resistant to environmental factors and drinking water treatment. Objective: to study the

inactivation of this parasite in manure by a windrow composting system. This lab-scale composting was carried out with the same material used in a full-scale composting. The piles were inoculated with a suspension of *Cryptosporidium* spp. and placed in an oven. Later, the piles were submitted to thermophilic temperatures which were similar to the ones produced in the full-

scale composting. The whole process took 21 days.

At the beginning of the experiment, the viability of the oocysts of *Cryptosporidium* was over 94 %, and it was significantly reduced to values below 20 % ($p < 0.05$) at the end of the experiment.

KEYWORDS: *Cryptosporidium*, Composting, Water resources.

Introducción

En los últimos años se ha producido una modificación de la cría extensiva de ganado que caracterizaba a nuestro país. Una considerable cantidad de establecimientos han optado por la cría intensiva o feedlot. Como consecuencia de la elevada concentración de ganado vacuno en las áreas de confinamiento, se acumulan grandes cantidades de estiércol cuya disposición final requiere especial cuidado por el efecto que puede causar en el ambiente (1). Para evaluar la magnitud del problema, se debe tener en cuenta que una vaca lechera produce diariamente un 8 % de su peso vivo en heces (2). Uno de los riesgos potenciales de contaminación asociados con el estiércol, es la presencia de patógenos que pueden alcanzar las fuentes de agua potable por escurrimiento superficial o lixiviación (3). Esto es un motivo de preocupación, debido a que muchos de estos microorganismos pueden ser transmitidos desde los animales a los seres humanos (4).

Entre los microorganismos que pueden hallarse en el estiércol y se transmiten a través del agua se encuentra el parásito zoonótico *Cryptosporidium*. La ingestión de agua contaminada con ooquistes produce

trastornos gastrointestinales leves a severos y otras formas de presentación más graves dependiendo del estado inmunológico del huésped. Este protozooario es de distribución mundial y está considerado entre las causas de diarrea por parásitos en humanos, vacunos y otros animales (5). En ganado vacuno afecta tanto a razas de producción de carne como de leche, siendo más prevalente en terneros menores de 30 días (6). En estos animales infectados, se estima que durante el periodo de máxima eliminación, pueden excretar entre 10^6 – 10^7 ooquistes por gramo de heces (7). En un estudio realizado en la provincia de Santa Fe (Departamento Las Colonias), se encontró *Cryptosporidium* en 72,0 % de los tambos investigados, en los cuales el 28,5 % de terneros estaba parasitado (8).

La contaminación de las fuentes de agua con materia fecal de ganado bovino, debe ser considerada un riesgo para la salud pública, ya que los métodos usuales del tratamiento de agua de bebida no son completamente eficaces en la remoción o inactivación de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. La dosis de cloro utilizada en las plantas de potabilización no afecta la viabilidad de los mismos, pues se necesitan concen-

traciones y tiempo de contacto muy superiores para su eliminación (9). Además, la baja dosis infecciosa, la elevada resistencia de los ooquistes a las condiciones físicas y químicas adversas (10, 11), y el hecho que sean inmediatamente infectantes al salir con las heces de su huésped (12), contribuirían a la persistencia y diseminación de este parásito en el ambiente, especialmente en el agua.

El compostaje aeróbico es un proceso biológico utilizado para residuos orgánicos como el estiércol, que estabiliza la materia orgánica y destruye microorganismos patógenos, de modo de poder ser utilizado para enmienda de suelos. Una de las técnicas más usualmente utilizadas es el sistema en hilera, debido a su sencillez e inversión inicial y mantenimientos menores. En el campo, el material se dispone en grandes montículos de 2 a 4 metros de altura, que pueden o no estar cubiertos. La aireación se lleva a cabo por convección natural ayudada por volteos periódicos que se realizan en forma manual (pequeña escala) o mecánica. En el compostaje en hilera la fermentación puede obtenerse en tres o cuatro semanas (13).

Teniendo en cuenta la resistencia de los ooquistes de *Cryptosporidium*, se propuso como objetivo de este trabajo estudiar la inactivación de estos enteroparásitos en estiércol de ganado vacuno por un sistema de compostaje en hilera.

Materiales y métodos

• Suspensión de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

Se recolectaron heces de ganado vacuno infectado con *Cryptosporidium*. Se

procedió a su concentración por el método de Sheather (14), lográndose una suspensión del orden de 10^5 ooquistes/mL de agua destilada. La cuantificación se llevó a cabo por el método de Breed con coloración de Kinyoun (15). La identificación se realizó teniendo en cuenta su tamaño, coloración y características morfológicas.

• Técnica de compostaje en hilera a escala de laboratorio

Preparación: materia fecal de ganado vacuno no infectado con *Cryptosporidium* fue mezclada con residuos de jardín (hojas caídas recientemente) triturados. La proporción fue la adecuada para obtener una relación Carbono/Nitrógeno (C/N) de 40, valor comprendido en el rango 25–50, que es considerado óptimo para el compostaje aeróbico (13). Los valores de referencia del contenido de nitrógeno y C/N empleados para determinar la proporción de cada componente se muestran en la Tabla 1. Cada montículo del material a compostar pesó aproximadamente 200 g. Para la selección de la cantidad de este material se realizaron investigaciones previas utilizando pilas con pesos de 100; 150 y 200 g. Se comprobó que las de menor peso (100 y 150 g), al ser sometidas a temperaturas termofílicas, perdían demasiada humedad, no permitían la estabilización de la materia orgánica por la acción de los microorganismos, y podían, además, agregar un factor adicional para la disminución de la viabilidad de los ooquistes.

Un volumen de 10 mL de la suspensión de ooquistes, cuya viabilidad fue determinada previamente, se adicionó a cada compostaje y luego se mezcló para homogeneizar. Una alícuota de la misma suspensión se conservó a 4 °C y se utilizó como control.

Tabla 1 Contenido de nitrógeno y relación C/N del material empleado para la preparación del compostaje (base seca).

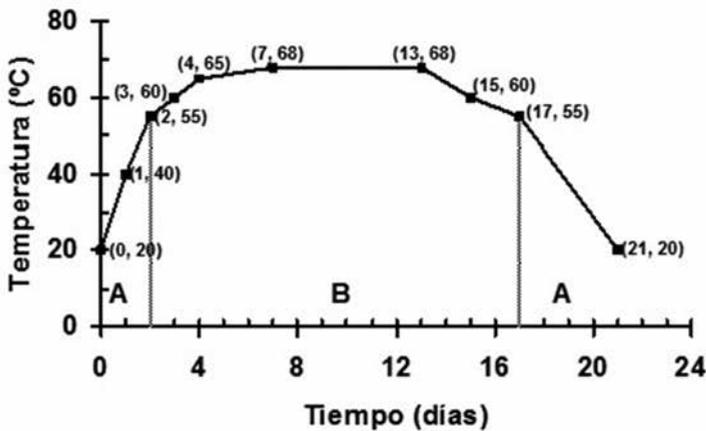
Material	Porcentaje de N	Relación C/N
Estiércol de vaca	1,7	18,0
Hojas (caídas recientemente)	1,0	40,0

Adaptado: Tchobanoglus (13).

Proceso: se utilizó un sistema de compostaje en hilera con volteo manual cada dos o tres días con el objeto de introducir aire y prevenir el secado y el encostramiento. Los compostajes se colocaron en una estufa con ventilación forzada y la temperatura fue modificada a fin de imitar la variación que se produce a escala real de

acuerdo a la Figura 1. Se resalta que la Fase termofílica (temperaturas superiores a 55 °C) se mantuvo durante un período de 15 días, de acuerdo a los requerimientos de EPA para el Control Adicional de Patógenos (PRAP) (16). El proceso completo tuvo una duración de 21 días.

Figura 1. Variación de temperatura típica del compost en hilera. Entre paréntesis se detallan el día y la temperatura registrada. La zona A representa la Fase mesófila. La zona B representa la Fase termofílica.



Diariamente, se controló la temperatura en el centro del montículo con un termómetro digital. A fin de mantener la humedad necesaria para la efectividad de este sistema, se le adicionó agua, realizándose la comproba-

ción de su contenido mediante la "prueba del puño", que consiste en tomar el material en la mano y comprimirlo, observando que no se elimine agua y se forme un puñado que no se desmorone (17). Al final del pro-

ceso, el material compostado se concentró por el método de Sheather para recuperar los ooquistes y determinar su viabilidad.

• **Determinación de la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium spp.***

Se llevó a cabo por una técnica de desenquistación *in vitro*. El desenquistamiento es un proceso que se cumple en parásitos metabólicamente activos (viables). Inicialmente se efectuó el recuento de los ooquistes totales (viables y no viables) por el método de Breed con coloración de Kinyoun. El grado de desenquistamiento se evaluó de la siguiente manera: a un volumen de cada suspensión de ooquistes se le adicionó dos volúmenes de solución de Hank (Sigma, Alemania) con 1 % de bilis y se incubó durante 24 hs a 37 °C en atmósfera con 10 % de CO₂ (Oxoid, Reino Unido). Estas son las condiciones que recrean más ajustadamente lo que sucede *in vivo* con los ooquistes en el medio intestinal (18). Se realizó el recuento del número final de ooquistes intactos (no viables) post desenquistamiento.

El porcentaje de viabilidad se calculó mediante la Ecuación 1.

Ecuación 1

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{(ni - nf)}{ni} \times 100$$

Donde:

ni: recuento de ooquistes totales

nf: número final de ooquistes

Cada recuento se realizó por triplicado, y se llevaron a cabo tres ensayos bajo las mismas condiciones.

• **Determinaciones complementarias**

Para evaluar parámetros complementarios a los objetivos de este trabajo, se efectuaron ensayos con pilas de compostaje en las mismas condiciones que las ya mencionadas pero sin el agregado de enteroparásitos. El pH se midió regularmente durante el período de la experiencia (19). También se determinó la presencia /ausencia del indicador bacteriano de contaminación *Escherichia coli* (20). Para evaluar la efectividad del compostaje sobre el grado de descomposición de materia orgánica, se determinaron los Sólidos Volátiles al principio y al final de cada ensayo (20).

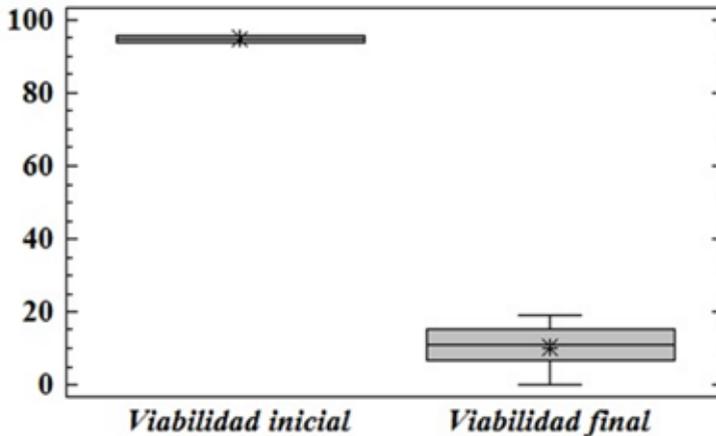
• **Análisis estadístico**

La comparación entre los parámetros evaluados se realizó mediante la prueba t de Student. El nivel de significación adoptado fue $\alpha=0,05$. Los datos fueron procesados utilizando el software SPSS (v. 19.0).

Resultados y discusión

Al inicio de las experiencias, la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* fue superior a 94 %, encontrándose al término de las mismas valores en un rango de 18 % hasta la reducción total, significativamente inferiores a los iniciales ($t, p < 0,05$) (Figura 2). Por otra parte, durante este mismo tiempo no se observaron cambios en la viabilidad de los ooquistes en la suspensión control conservada a 4 °C.

Figura 2. Diagrama de Caja: Viabilidad inicial y final de *Cryptosporidium spp.* en estiércol vacuno mediante el proceso de compostaje



Van Herk *et al.* (21) ensayó la viabilidad de *Cryptosporidium* en compostaje en hilera utilizando, en una experiencia, estiércol vacuno mezclado con paja de cebada y, en otra, con aserrín. La inactivación total de los ooquistes se logró luego de 42 días en el primer caso y a los 56 días cuando se empleó aserrín. En el presente estudio, en cambio, se agregaron hojas como biomasa para ajustar la relación C/N en la mezcla con materia fecal de ganado. Al término de la experiencia se halló una disminución significativa de la viabilidad manteniendo la temperatura por encima de 55°C durante 15 días acorde con lo señalado por EPA (16).

En un trabajo realizado por este equipo de investigación (10), en el cual se sometieron suspensiones de ooquistes en agua destilada durante 10 minutos a 60°C, 65°C y 70°C, temperaturas compatibles con las alcanzadas en el compostaje, se halló que la viabilidad se redujo 74, 77 y 86 % respectivamente. Esto demuestra la importancia

de la acción de la temperatura en la inactivación de los ooquistes en este tipo de tratamiento.

Durante la descomposición de la materia orgánica a pH elevado se puede liberar amoníaco, y los ooquistes quedan expuestos a este gas. Jenkins *et al.* (22) reportó que una alta concentración de amoníaco libre puede inactivar estos parásitos. No obstante, los niveles de este compuesto comúnmente halladas en el estiércol, tendrían sólo un efecto leve sobre los ooquistes. Además, las temperaturas muy elevadas tenderían a enmascarar la acción del amonio (23).

El pH se mantuvo entre 6 y 8 durante el período del compostaje, rango considerado apropiado para lograr una descomposición aeróbica óptima. Se obtuvo una disminución de 30 % de Sólidos Volátiles luego del lapso de 21 días de los ensayos. En la práctica se continúa con una etapa de maduración lenta (que puede llegar hasta los tres

meses), con la finalidad de aumentar la degradación de la materia orgánica más resistente previa a su aplicación al suelo como enmienda.

Por otra parte, al finalizar cada prueba no se halló presencia del indicador bacteriano *Escherichia coli*. Se puede interpretar este resultado, como se ha demostrado en otros trabajos (24), que esta bacteria no es buen indicador de la presencia o ausencia de *Cryptosporidium*, ya que aunque se logró una remoción satisfactoria, continuaban persistiendo ooquistes viables.

En cuanto a las características organolépticas del compostaje, se señala que al principio del proceso se generaron olores fuertes y desagradables, mientras que en la etapa final, éstos desaparecieron. Además, la textura de la mezcla fue mucho más homogénea que al inicio, lográndose un aspecto húmico.

Conclusión

La exposición de los ooquistes de *Cryptosporidium* presentes en el estiércol de ganado a temperaturas superiores a 55 °C por el método de compostaje en hilera, demostró ser un método efectivo para su inactivación. La aplicación de hojas a la materia fecal, es una opción factible a fin de lograr un balance nutricional apropiado.

Se debe destacar que la capacidad de supervivencia de los patógenos en el suelo se considera un factor a tener en cuenta a los fines de su uso como enmienda orgánica. *Cryptosporidium* es capaz de sobrevivir en el suelo hasta 50 días a temperaturas inferiores a 10 °C (25). En el agua a 4 °C, los ooquistes pueden permanecer viables por más de 4 meses (10). Si tenemos

presente que los procesos para potabilizar el agua que se emplean habitualmente no aseguran la eliminación completa de este enteroparásito, se explica la importancia de impedir que llegue al suelo y contamine los recursos hídricos.

En Argentina no se han encontrado reportes de estudios realizados para comprobar la eficacia de la implementación del compost en la eliminación de microorganismos resistentes como *Cryptosporidium*, y de este modo contribuir a su control epidemiológico.

Es fundamental que existan regulaciones a fin de estimular esta incipiente tecnología en nuestro país, con los controles de calidad adecuados (26).

A través de estos procesos, se transforman residuos orgánicos en recursos utilizables, en búsqueda de una agricultura más racional acorde con el respeto a la naturaleza y más sostenible, lográndose mayor rentabilidad a mediano y largo plazo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Mario Alberto Contini y a la Ing. Liliana Contini, por su desinteresada colaboración.

Este trabajo fue realizado en el marco del Proyecto n° PI 08-42 (CAI+D 2009 –UNL) “Inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium* en estiércol de ganado para la protección de los recursos hídricos”, bajo la dirección de Bioq. Beatriz L de Abramovich.

Nota

¹ Trabajo presentado en: XVI Encuentro de Jóvenes Investigadores de la UNL y VII Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe; 18 y 19 de septiembre de 2012, Santa Fe, Argentina.

Referencias bibliográficas

1. Bolton, A.; Studdert, G.A. y Echeverría, H.E., 2004. Utilización de estiércol de animales en confinamiento como fuente de recursos para la agricultura. *Rev. Arg. Prod. Anim.* **24** (1–2): 53–73.
2. Céspedes, C.L. y Cofré, P., 2006. Transforme el residuo de su lechería en abono orgánico compuesto o compost. Informativo agropecuario, Bioleche – Inia Quilamapu (online). Disponible en Internet: <http://www2.inia.cl/medios/quilamapu/pdf/bioleche/BOLETIN146.pdf>. Acceso en octubre de 2011.
3. Modini, L.; Otero, J.C.; Carrera, E.; Zerbato, M.G.; Eliggi, S. y Abramovich, B., 2010. *Cryptosporidium* spp. en ganado bovino: su potencial como contaminante de los recursos hídricos. *Rev. FAVE.* **9**, 1:33–38.
4. Collick, A.S.; Scott, I.; Wright, P.; Steenhuis, T.S.; Dwight D. y Bowman, D.D., 2007. Inactivation of *Ascaris suum* in a Biodrying Compost System. *J. Environ. Qual.* **36**: 1528–1533.
5. Del Cocco, V.F.; Córdoba, M.A. y Basualdo, J.A., 2009. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Rev. Argent. Microbiol.* **41**: 185–196.
6. Modini, L.; Carrera, E.; Otero, J.L.; Zerbato, M.G.; Eliggi, M.S.; Vaira, S. y Abramovich, B., 2011a. Infección por *Cryptosporidium* spp. en ganado vacuno de la cuenca lechera de la provincia de Santa Fe, Argentina. *Rev. FABICIB.* **15**: 97–107.
7. Cordero del Campillo, M.; Rojo, F.A.; Martínez, A.; Sánchez, C.; Hernández, S.; Navarrete, J.; Diez, P.; Quiroz, H. y Carvalho, M., 1999. *Parasitología Veterinaria*. Ed. McGraw–Hill. Madrid. 213–221.
8. Modini, L.B.; Zerbato, M.G.; Eliggi, M.S.; Otero, J.L. y Abramovich, B.L., 2011b. Factores de riesgo potenciales asociados a la excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en terneros. III Convención Alimentación saludable para la comunidad y el turismo, componente del II Congreso Latinoamericano sobre inocuidad y calidad de los alimentos, La Habana, Cuba.
9. Craun, G.F., 1996. Enfermedades transmitidas por el agua en los Estados Unidos de América. En: Craun, G.F. y Castro, R. (eds.), “La calidad del Agua Potable en América latina. Ponderación de los riesgos microbiológicos contra los riesgos de los subproductos de la desinfección química”. IL.SI Press. Washington DC, I: 63–88.
10. Zerbato, M.G.; Herrero Bocco, M.M.; Lerman de Abramovich, B. y Modini, L.B., 2011. Efecto de factores ambientales en la viabilidad de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en agua”. *Rev. Bioquímica: Ciencia y Sociedad.* **8**: 12–15.
11. Zerbato, M.; Modini, L.; Illesca, P.; Gropelli, E. y Lerman de Abramovich, B., 2012. Criptosporidiosis en ganado vacuno. Prevalencia y Factores Ambientales que inciden en su viabilidad. 6to Expo Congreso Bioquímico Rosario 2012. Rosario, Argentina.
12. Fayer, R. y Xiao, L., 2007. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, FL, I: 1–41.
13. Tchobanoglus, G.; Theisen, H. y Vigil, S., 1998. *Gestión Integral de los residuos sólidos*. McGraw Hill, Madrid. II: 770–785.
14. Shore Garcia, L., 2007. *Diagnostic medical parasitology*. Ed. American Society for Microbiology, Washington DC. I: 1–1202.
15. Henriksen, S.A. y Pohlenz, J.F.L., 1981. Staining of *Cryptosporidia* by a modified Ziehl–Neelsen technique. *Acta Vet. Scand.* **22**: 594–596.
16. *Environmental Regulations and Technology. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge*. EPA/625/R–92/013. 2003.
17. Palmero Palmero, R., 2010. Elaboración de compost con restos vegetales por el sistema tradicional en pilas o montones. Servicio técnico de agricultura y desarrollo rural del Cabildo Insular de Tenerife. (online). Disponible en Internet: www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/sost_257_L_sost_elaboracion_compost.pdf. Acceso en noviembre de 2011.

- 18.** Pezzani, B.C.; Bautista, E.; Córdoba, A.; De Luca, M.M. y Basualdo, J.A., 1998. Factores que influyen en el desenquistado in vitro de *Cryptosporidium sp.* Rev. Argent. Microbiol. **30**: 138–142.
- 19.** Barbaro, L.A., Karlanian, M.A. y Morisigue, D., 2010. Utilización de azufre micronizado en la corrección del pH de compost de residuos de poda. Agriscientia (online). **27**, 2: 125–130.
- 20.** APHA – AWWA – WEF, 2005. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 21st ed., Washington DC, I: 1–1368.
- 21.** Van Herk, F.H.; Mc Allister, T.A.; Cockwill, C.L.; Guselle, N.; Lamey, F.J.; Miller, J.J. y Olson, M.E., 2004. Inactivation of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Beef Feedlot Manure by Thermophilic Windrow Composting. Compost Sci Util. **12**, 3: 235–241.
- 22.** Jenkins, M.B.; Bowman, D.D. y Ghiorse, W.C., 1998. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ammonia. Appl. Environ. Microbiol. **64**, 2: 784–788.
- 23.** Finstein, M.S., 1989. Composting Solid Waster–Costly Mismanagement of a microbial ecosystem. ASM News. **55**:11: 599–602.
- 24.** Abramovich, B.; Gilli, M.I.; Haye, M.A.; Carrera, E.; Lurá, M.C.; Nepote, A.; Gómez, P.A.; Vaira, S. y Contini, L., 2001. *Cryptosporidium* y *Giardia* en aguas superficiales. Rev. Argent. Microbiol. **33**, 3: 167–176.
- 25.** Kato, S.; Jenkins, M.; Fogarty, E. y Bowman, D., 2002. Effects of freeze–thaw events on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in soil. J. Parasitol. **88**, 4: 718–722.
- 26.** Mazzarino, M.J. y Satti, P., 2012. Compostaje en Argentina. Experiencias en producción, calidad y uso. Orientación Gráfica. Buenos Aires. I: 1–348.