



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**PREVALENCIA DE COLIFORMES FECALES Y EVALUACIÓN DE SU  
RESISTENCIA A LOS METALES PESADOS Cu Y Cd EN SUELO  
AGRÍCOLA ACONDICIONADO CON BIOSÓLIDOS**

**T E S I S**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO INDUSTRIAL**

**P R E S E N T A**

**MONSERRAT MALDONADO ALVAREZ**

**MODALIDAD: TESIS**

**ASESORES: DOCTORA MARINA ISLAS ESPINOZA Y M. EN C. MARÍA**

**EUGENIA GUADARRAMA GUADARRAMA**



**CAMPUS UNIVERSITARIO "EL CERRILLO", MUNICIPIO DE  
TOLUCA, MÉX., OCTUBRE DE 2009**

## RESUMEN

Los biosólidos son lodos residuales que fueron sometidos a procesos de estabilización y que por su contenido de materia orgánica, nutrientes y características adquiridas pueden ser susceptibles de aprovechamiento. En esta investigación se tomaron muestras de suelo del Campus Universitario El Cerrillo y de biosólidos de la Macroplanta Toluca Norte. Se incubaron 5 tratamientos diferentes de suelo y/o biosólidos a temperatura ambiente y humedad constante en invernadero. La incubación duró 30 días y se dividió en 2 fases: Fase 1 (día 0), donde se determinó el NMP/g de sólidos totales de coliformes fecales y la concentración ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de los metales pesados cobre (Cu) y cadmio (Cd); la Fase 2 (día 30) donde se realizaron los mismos análisis que en la fase 1 para cumplir con el objetivo de monitorear el número de coliformes fecales en el suelo agrícola acondicionado con biosólidos y evaluar su resistencia al Cu y Cd contenidos en el mismo. Después del día 30 se estableció la prevalencia de los coliformes fecales y su resistencia a los metales pesados Cu y Cd asociada con la resistencia a tres antibióticos. Se realizó un análisis estadístico donde las variables estudiadas fueron: NMP/g de sólidos totales de coliformes fecales, Cd y Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) al día 0 y 30, evaluadas mediante un análisis de varianza y comparación de medias de tratamientos con la prueba de Tukey al nivel de significancia del 5%. La metodología empleada en los análisis microbiológicos y físico-químicos se hizo con base en la NOM-004-SEMARNAT-2002. Los resultados obtenidos fueron que los coliformes fecales prevalecen después de 30 días en menor número que el día 0 y resisten concentraciones de 11.93-197.85 ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de Cu y 2.37-5.70 ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de Cd, presentes en suelo, biosólidos y suelo acondicionado con biosólidos. Los coliformes fecales resistieron concentraciones de 200 ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de Cu y 0.10 ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de Cd y se mostró que estas bacterias entéricas fueron resistentes a los antibióticos ampicilina (50  $\text{mg kg}^{-1}$ ) y cloramfenicol (5  $\text{mg kg}^{-1}$ ) pero no a la tetraciclina. Por tanto, la resistencia de los coliformes fecales a los metales estuvo asociada con la resistencia a dos antibióticos, lo que incrementa el riesgo ambiental y a la salud humana. De esta forma, el suelo no está exento de presentar algún riesgo por el uso repetido de biosólidos en el largo plazo.

**Palabras clave:** biosólidos, coliformes fecales

## ABSTRACT

The biosolids are the sewage sludge after being stabilized and by its content of organic matter, nutrients and characteristics acquired may be susceptible to exploitation. In this research, samples of agricultural soil were obtained from the University Campus El Cerrillo and the biosolids from the Wastewater Treatment Plant North Toluca. Five different treatments of soil and/or biosolids were incubated at room temperature and constant humidity in a greenhouse. The incubation lasted 30 days, divided in 2 phases: Phase 1 (day 0), where the MPN/g total solids of fecal coliforms and the concentration (mg kg<sup>-1</sup>) of the heavy metals copper (Cu) and cadmium (Cd) were determined; Phase 2 (day 30) where the same analyses from the previous phase were carried out to achieve the objective of monitoring the number of fecal coliforms in the soil conditioned with biosolids and to evaluate its resistance to Cu and Cd contained in it. After the day 30 it was established the prevalence of fecal coliforms and its resistance to Cu and Cd associated with the resistance to three antibiotics. An statistical analysis was performed where the studied variables were: MPN/g total solids of fecal coliforms, Cd and Cu (mg kg<sup>-1</sup>) after day 0 and 30, these were evaluated by analysis of variance and mean comparison of the treatments, using the Tukey test at a significance level of 5%. The methodology used in the microbiological and physico-chemical analyses was based on the NOM-004-SEMARNAT-2002. The results were that fecal coliforms prevail after 30 days in less number that in day 0 and resist concentrations of Cu of 11.93-197.85 (mg kg<sup>-1</sup>), and 2.37-5.70 (mg kg<sup>-1</sup>) of Cd present in soil, biosolids and soil conditioned with biosolids. The fecal coliforms resisted concentrations of 200 (mg kg<sup>-1</sup>) of Cu and 0.10 (mg kg<sup>-1</sup>) of Cd and showed that these enteric bacteria were resistant to the antibiotic ampicillin (50 mg kg<sup>-1</sup>) and chloramphenicol (5 mg kg<sup>-1</sup>), but not to tetracycline. So, resistance of the fecal coliforms to the heavy metals was associated with resistance to antibiotics, which increases the environmental and human health risks. In that way, the soil was not exempt from presenting any risk by the repeated use of biosolids in the long term.

Keywords: biosolids, fecal coliforms

## I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el reúso de lodos residuales y de los biosólidos para el acondicionamiento de suelos es una práctica aceptada en la mayoría de los países, principalmente por que es considerada como la opción más aceptable desde el punto de vista ambiental y productivo. Sin embargo, para que esta práctica pueda ser llevada a cabo se requiere que los lodos y los biosólidos cumplan con ciertos criterios de calidad para disminuir los riesgos a la salud y al ambiente.

Particularmente, en países en vías de desarrollo como México, estos criterios se enfocan a la reducción del contenido microbiológico de estos materiales, debido a los altos valores encontrados, situación que refleja los niveles de salud de la población que genera el agua residual y, a su vez, lodo residual y biosólidos. Sin embargo, su contenido microbiológico ha cobrado gran importancia también en países desarrollados debido al potencial de transmisión de enfermedades al reutilizar lodos residuales y biosólidos (Barrios, 2002).

La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) es la institución encargada en México de monitorear y dictaminar si los lodos residuales y los biosólidos están dentro de los límites permisibles para ser reutilizados y así minimizar los riesgos a la salud y al ambiente.

La presente investigación se hizo para dar un uso alternativo a los biosólidos generados en la Macroplanta Toluca Norte debido a que pueden ser utilizados en la agricultura por su cantidad importante de nutrientes que intervienen en el desarrollo y crecimiento de las plantas. Sin embargo los biosólidos presentan problemas en su composición como son los metales pesados

y los microorganismos patógenos, que pueden originar daños al ambiente y a la salud de la población cuando se está en contacto directo. Debido a estos factores negativos, fue importante cuantificar la concentración de coliformes fecales en los biosólidos cuando salen de la planta tratadora de Aguas Residuales y su prevalencia después de 30 días con el fin de determinar la cantidad que continuó presente. Se consideró el periodo de 30 días porque es el límite que establece la Environmental Protection Agency (EPA), USA, Part 503 rule para llevar a cabo la siembra de productos agrícolas previo a la aplicación de biosólidos clase B, que pueden ser usados de forma restringida y cuya clasificación fue determinada en este estudio. Además fue necesario establecer las concentraciones en  $\text{mg kg}^{-1}$  de cadmio (Cd) y cobre (Cu) que los coliformes fecales pueden tolerar y determinar si existe una relación entre su resistencia a los metales pesados y los antibióticos, ya que si son resistentes se agudiza el riesgo de ser causantes de enfermedades gastrointestinales en la población y de problemas ambientales. De acuerdo con la problemática mencionada se plantearon los siguientes objetivos:

## **OBJETIVOS**

### **General**

Monitorear el número de coliformes fecales en suelo agrícola acondicionado con biosólidos y evaluar la resistencia de los coliformes fecales a los metales pesados Cu y Cd contenidos en el mismo y su relación con la resistencia a antibióticos.

## **Específicos**

Cuantificar el número de coliformes fecales y la concentración en  $\text{mg kg}^{-1}$  de los metales pesados Cu y Cd en los biosólidos de la Macroplanta Toluca Norte.

Estimar el número de coliformes fecales y la concentración remanente de los metales pesados Cu y Cd en el suelo, biosólidos y suelo agrícola acondicionado con biosólidos.

Determinar la concentración mínima inhibitoria de los coliformes fecales al Cu y Cd para establecer el riesgo ambiental y a la salud humana.

Evaluar la relación entre la resistencia de los coliformes fecales al Cu y Cd, y a los antibióticos de uso en la medicina humana.

## **HIPÓTESIS**

Si los coliformes fecales prevalecen en el suelo agrícola acondicionado con biosólidos después de 30 días, además son resistentes a los metales pesados Cu y Cd y a los antibióticos ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina, entonces se agudiza el riesgo al ambiente y a la salud humana.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Biosólidos

El proceso de depuración de aguas residuales tiene como producto principal el agua depurada que se incorpora a los cauces, pero también conlleva la producción de gran cantidad de subproductos, especialmente los lodos residuales ricos en materia orgánica que se producen en el tratamiento biológico (IEA, 2008).

Los biosólidos son los lodos residuales que han sido sometidos a procesos de estabilización y que por su contenido de materia orgánica, nutrientes y características adquiridas después de su estabilización, pueden ser susceptibles de aprovechamiento (SEMARNAT, 2002).

Los lodos residuales procedentes de la depuración de aguas residuales causan efectos nocivos al ambiente, y por ende al ser humano, si estos lodos no son tratados adecuadamente antes de su disposición final. En la actualidad se están instalando gran cantidad de plantas depuradoras de aguas residuales. Éstas en muchos casos suponen una solución parcial al no contemplar de forma integral, el tratamiento de los lodos producidos durante el tratamiento de las aguas residuales. Ello es en parte, debido al limitado desarrollo de políticas ambientales con relación a la generación de residuos sólidos y al alto costo que representa su tratamiento (Campos *et al.*, 1998).

Es importante considerar que los lodos residuales están constituidos por bacterias aerobias que se encargan de degradar orgánicamente el desecho mediante un proceso natural llamado fermentación o degradación aerobia, conteniendo en su mayor parte sólidos sedimentables y cerca del 60% de sólidos suspendidos. Estos lodos son clasificados en lodos crudos y biosólidos, siendo los primeros los que no han sido sometidos a tratamientos de estabilización (espesamiento, flotación, lechos de secado, digestión anaerobia, etc.), mientras que los segundos se refieren a los lodos que han sido sometidos a tratamiento de estabilización antes de su disposición final (Campos *et al.*, 1998).

Investigaciones y experimentos han demostrado que los biosólidos son ricos en nutrientes (fósforo, nitrógeno y potasio) y presentan un alto contenido de materia orgánica. Estas características los hacen aptos para ser usados como fertilizantes y acondicionadores/regeneradores del suelo, ya que facilitan el transporte de nutrientes a través de la interrelación suelo/planta. Sin embargo, los aspectos de mayor incidencia en la disposición de lodos residuales lo constituye el contenido de metales y la presencia de microorganismos patógenos. Los primeros están presentes a niveles trazas, quedando retenidos en el lodo sobrenadante y en los sedimentos de los sistemas de tratamiento y los segundos varían en su número dependiendo del sistema de tratamiento y del agua del que provienen (Cuadros 1 y 2) representando un riesgo alto para la salud pública al entrar en contacto directo (Lane, 1998).

Cuadro 1. Concentración de microorganismos en biosólidos de diferentes países.

País	Coliformes fecales (mg kg <sup>-1</sup> base seca)	<i>Salmonella</i> (mg kg <sup>-1</sup> base seca)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (mg kg <sup>-1</sup> base seca)	Bacteriófagos (mg kg <sup>-1</sup> base seca)	Quistes Protozoos (mg kg <sup>-1</sup> base seca)	Huevos de helminto (mg kg <sup>-1</sup> base seca)
Brasil	5	-----	-----	< 1-3	1-3	1-75
México	10	6	5-7	3-6	2-4	73-177
Japón	5	1	-----	3-4	-----	-----
Reino Unido	4-6	2-4	3-5	-----	-----	< 6
E.U	-----	3	-----	3	2	2-13

Fuente: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América USEPA, 1993.

Cuadro 2. Concentración de ciertos patógenos en lodos residuales de México y los Estados Unidos de América.

	Parásito	Concentración (mínima y máxima)		Referencia
		México	E. U. A.	
Colifagos	<i>Escherichia coli</i> CN-13	1.0x10 <sup>6</sup> -1.9x10 <sup>6</sup>	1.3x10 <sup>5</sup>	Pedersen, 1981
PFU/gST	<i>Escherichia coli</i> F+	2.0x10 <sup>3</sup> -3.2x10 <sup>4</sup>	1.3x10 <sup>3</sup>	
Bacterias	Coliformes fecales	2.3x10 <sup>7</sup> -9.3x10 <sup>10</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	Pedersen, 1981
MPN/gST	<i>Salmonella typhi</i>	9.5x10 <sup>6</sup> -1.4x10 <sup>8</sup>	2.8x10 <sup>3</sup>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.4x10 <sup>5</sup> -4.6x10 <sup>7</sup>	2.8x10 <sup>3</sup>	
Protozoarios	<i>Giardia lamblia</i>	1.3x10 <sup>2</sup> -4.2x10 <sup>4</sup>	2.1x10 <sup>2</sup>	
Quistes/gST	<i>Entamoeba spp.</i>	2.6x10 <sup>2</sup> -3.8x10 <sup>8</sup>	Not reported	
Helminthos	<i>Ascaris spp.</i>	66-136	1.4-9.7	Pedersen, 1981
Ova viables/gST	<i>Trichuris sp.</i>	8-17	<0.01-1.4	
	<i>Hymenolepis spp.</i>	3-10	0.02	Reimers <i>et al.</i> , 1986
	<i>Toxocara sp.</i>	1-5	0.3-1.2	
	<i>Enterobius sp.</i>	0-4	0.02	Hays, 1977
	<i>Trichosomoides sp.</i>	0-3	Not reported	Hays, 1977
	<i>Taenia sp.</i>	0-2	0.41	

Fuente: Jiménez, 2002.

### 2.1.1 Microorganismos patógenos

Los biosólidos contienen una cantidad importante de microorganismos patógenos, por lo que es necesario buscar lugares adecuados para su disposición con objeto de evitar problemas de salud. Los agentes patógenos más importantes que existen en el agua y que se han encontrado en los biosólidos son los coliformes fecales, las bacterias (como la *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*), los virus (sobre todo, enterovirus), los protozoos, los tremátodos, los céstodos y los nemátodos (IEA, 2008). Como resultado, para que cualquier vertido de los biosólidos sea seguro se precisa la eliminación, o al menos una inactivación suficiente de estos agentes patógenos.

Para la desinfección de los biosólidos se pueden aplicar una serie de tratamientos, como la pasteurización, la digestión aerobia o anaerobia, el compostaje, la estabilización con cal, el almacenamiento en estado líquido y la desecación y almacenamiento en seco (Martínez, 2004).

Algunos estudios sugirieron que los biosólidos obtenidos en las plantas de tratamiento de la Ciudad de Toluca pueden ser aptos para la agricultura si se tienen en cuenta sus características nutrimentales como nitrógeno y fósforo respecto a algunos abonos comunes como la gallinaza y el vacuno, así como por sus bajos contenidos en metales pesados (Martín del Campo, 1996).

### **2.1.1.1 Coliformes totales**

Las bacterias que se encuentran con mayor frecuencia en las Plantas Tratadoras de Aguas Residuales son las bacterias entéricas que colonizan el tracto gastrointestinal del ser humano y son eliminadas a través de la materia fecal. Cuando estos microorganismos se introducen en el agua, las condiciones ambientales son muy diferentes y por consiguiente su capacidad de reproducirse y de sobrevivir son limitadas. Debido a que su detección y recuento a nivel de laboratorio son lentos y laboriosos, se ha buscado un grupo alternativo de indicadores que sean de más rápida y fácil detección. El grupo más utilizado es el de las bacterias coliformes (Guzmán, 2005).

El grupo de microorganismos coliformes es adecuado como indicador de contaminación bacteriana ya que los coliformes:

- Son contaminantes comunes del tracto gastrointestinal tanto del ser humano como de los animales de sangre caliente.
- Están presentes en el tracto gastrointestinal en grandes cantidades.
- Permanecen por más tiempo en el agua que las bacterias patógenas.
- Se comportan de igual manera que los patógenos en los sistemas de desinfección (Guzmán, 2005).

La característica que diferencia los coliformes totales de los fecales, es que los segundos tienen la capacidad de reproducirse a temperaturas más elevadas por lo tanto los coliformes totales funcionan como un alerta de que ocurrió contaminación, sin identificar el origen. Indican que hubo fallas en el tratamiento, en la distribución o en las propias fuentes domiciliarias. Su presencia acciona los mecanismos de control de calidad y de procesamiento dentro de la planta de tratamiento de agua, e intensifica la vigilancia en la red de distribución (Guzmán, 2005).

#### **2.1.1.2 Coliformes fecales**

Los coliformes fecales son un subgrupo de los coliformes totales, capaces de fermentar la lactosa a 44.5°C. Aproximadamente el 95% del grupo de los coliformes presentes en heces fecales, están formados por *Escherichia coli* y ciertas especies de *Klebsiella*. Ya que los coliformes fecales se encuentran casi exclusivamente en las heces de animales de sangre caliente y en el ser humano, se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal (Guzmán, 2005).

Los coliformes fecales se denominan termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas más elevadas. Esta denominación está ganando más adeptos actualmente, pues sería una forma más apropiada de definir este subgrupo que se diferencia de los coliformes totales por la característica de crecer a una temperatura superior. La capacidad de reproducción de los coliformes fecales fuera del intestino de los animales homeotérmicos es favorecida por la existencia de condiciones adecuadas de materia

orgánica, pH, humedad, temperatura y oxígeno. Pueden reproducirse en las biopelículas que se forman en las tuberías de distribución de agua potable (Guzmán, 2005).

#### **2.1.1.2.1 Determinación de coliformes fecales por el Número Más Probable (NMP)**

El método del número más probable (NMP) es una estrategia eficiente de estimación de densidades poblacionales especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible. La técnica se basa en la determinación de presencia o ausencia (positivo o negativo) en réplicas de diluciones consecutivas de atributos particulares de microorganismos presentes en muestras de suelo u otros ambientes. Por lo tanto, un requisito importante de este método es la necesidad de poder reconocer un atributo particular de la(s) población(es) en el medio de crecimiento a utilizar. El estimado de densidad poblacional se obtiene del patrón de ocurrencia de ese atributo en diluciones seriadas y el uso de una tabla probabilística (NMX-F-187-1978).

Algunas de las ventajas del NMP son: (i) la capacidad de estimar tamaños poblacionales basados en atributos relacionados a un proceso (selectividad); por ejemplo se puede determinar la densidad poblacional de organismos que pueden nodular leguminosas en una muestra de suelo usando el método de infección de plantas, (ii) provee una recuperación uniforme de las poblaciones microbianas de suelos diversificados, (iii) determina sólo organismos vivos y activos metabólicamente, y (iv) suele ser más rápido e igual de confiable que los métodos tradicionales de esparcimiento en platos de cultivo, entre otros (NMX-F-187-1978).

#### **2.1.1.2.2 Prevalencia de los coliformes fecales después de 30 días**

La normatividad mexicana e internacional restringe el uso de biosólidos tipo B, en sitios donde van a pastar los animales y aquellos que tienen contacto directo con el público. Se permite el uso de biosólidos tipo B en suelos agrícolas, forestales o para la restauración de suelos erosionados o contaminados. Sin embargo, el uso de esta clase de biosólidos en suelos agrícolas también debe cumplir ciertas restricciones como el tipo de contacto del cultivo con el biosólido cuando se aplica al suelo y el tiempo de espera antes de la cosecha (EPA, 2003).

Cuando el biosólido va a ser aplicado a un cultivo alimenticio que toca el suelo o se va a cosechar la fruta que cae al suelo, entonces se sugiere cosechar después de 30 días de la aplicación (EPA, 2003). Esta fue la razón de elegir este periodo para llevar a cabo la presente investigación.

Existen varios estudios que ilustran el uso de biosólidos para acondicionar suelos en diferentes países. En un estudio reciente, los biosólidos de una planta de tratamiento de aguas residuales, contenían una importante concentración de materia orgánica y nutrientes. Su aplicación estuvo condicionada a la concentración de microorganismos patógenos presentes, ya que generaban un riesgo sanitario para las personas que lo manipularan o entraran en contacto directo con él. El objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento de los coliformes fecales como indicadores bacterianos de contaminación fecal en mezclas de biosólido y estériles en diferentes proporciones utilizadas para la restauración ecológica de una cantera en un período de 60 días. Se realizaron tres

tratamientos con tres réplicas cada uno y un control negativo, únicamente con estériles. El porcentaje final de reducción de los coliformes fecales fue de 38.1, 53.8 y 78.5% respectivamente. La radiación solar, la temperatura ambiente, la humedad y la precipitación influyeron significativamente en la reducción de la concentración de coliformes fecales (Fuccz *et al.*, 2007).

Los factores que más inciden en la persistencia de las bacterias en el suelo son la humedad y la temperatura. Fuccz *et al.* (2007) investigaron la supervivencia de *Salmonella typhi* y de *Shigella dysenteriae* en diferentes tipos de suelo a temperatura ambiente, mostrando que algunas bacterias sobrevivían por 70 días en suelos húmedos, aunque un 90% de éstas eran eliminadas en 30 días. En suelos secos, ninguna bacteria logró sobrevivir más de 20 días, y en suelos ácidos, independientemente del contenido de humedad, este tiempo se redujo a 10 días. Durante el estudio la humedad osciló entre 5.81 y 31.36% lo que influye en la supervivencia de los coliformes fecales en el suelo a través del tiempo, ya que generalmente los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad inhibe el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo (Fuccz *et al.*, 2007).

La influencia de la temperatura en la evolución de la población de microorganismos patógenos de origen fecal, como coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis*, tanto en muestras de suelo, como en muestras de suelo más biosólido, durante un

período de 80 días favoreció mayores poblaciones tanto de coliformes fecales como de *Escherichia coli* en las muestras de suelo más biosólido, a temperatura de 25°C a partir del día 5 de incubación, mientras que para las muestras de suelo la máxima población de coliformes fecales se alcanzó el mismo día de incubación, a temperatura de 15°C. Estos resultados coinciden con el comportamiento presentado en el control; el cual muestra aumento en la concentración de coliformes fecales a partir del día 8 aproximadamente; alcanzando un máximo para el día 15, con una temperatura promedio de 12.5°C. Generalmente las bacterias sufren un período de latencia o de aclimatación, en el que se van adaptando progresivamente a las condiciones del medio donde se encuentran; luego suelen tener una fase de crecimiento logarítmico, en el que comienzan su división y aumento a velocidad constante como consecuencia de la disponibilidad de aporte de nutrientes siendo mayor este aporte en el caso en el que se adiciona biosólido, ya que cuenta no sólo con los nutrientes propios del suelo sino con aquellos que se han adicionado junto con los lodos o biosólidos (Fuccz *et al.*, 2007).

Factores como el tipo de suelo también influyen en la supervivencia de bacterias coliformes fecales. Se determinó que la supervivencia de *Escherichia coli* en suelo que ha sido regado con agua residual luego de un período de 8 días es mayor que en suelo que no ha sido regado; esto se debe en parte a que los suelos regados aumentan la capacidad del suelo para retener humedad. Además, partículas finas de suelo pueden incrementar la supervivencia bacteriana ya que se asocian a la habilidad para retener nutrientes. Por tanto, la aplicación de biosólidos al suelo determina una mejoría en la estructura del suelo, ya que la materia orgánica ayuda a mantener la porosidad del suelo lo que permite el paso del agua y aire a través del mismo (Fuccz *et al.*, 2007).

En el estudio de Fuccz *et al.* (2007), los valores promedio de pH para cada tratamiento fueron de 7.3 para T1, 7.2 para T2 y 7.3 para T3, mientras que el control mostró tendencia a la acidez. La influencia del pH del medio puede ir desde su efecto sobre la expresión de genes y regulación del transporte de protones, la degradación de los aminoácidos, la adaptación a condiciones ácidas o básicas y la virulencia. A un pH mayor de 6.0 las células bacterianas ajustan su pH interno a través de la respuesta homeostática modulando la actividad de las bombas de protones. Los autores establecen que el mecanismo por el cual niveles elevados de pH causan mayor alteración en coliformes fecales, así como la capacidad de inactivación por longitudes de onda larga, puede deberse a que el pH disminuye la resistencia de los microorganismos a los efectos de la radiación solar o incrementa la producción de formas tóxicas de oxígeno e induce cambios en la ionización o configuración de algunas moléculas implicadas en este proceso. De esta manera, la alteración en las membranas hace pensar que frente a un aumento en el pH, puede generar flujo de iones hidroxilos los cuales incrementan el pH interno de los coliformes fecales o enterococos, alterando su funcionamiento y viabilidad.

En la inactivación de los coliformes fecales se deben tener en cuenta factores ambientales como: humedad, temperatura, luz ultravioleta, pH, ya que estos microorganismos al no encontrarse en un ambiente favorable y al no obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento se hacen más susceptibles a la inactivación. Para evaluar la reducción o aumento de coliformes fecales a través del tiempo, se determinó el porcentaje de reducción entre muestreos y el porcentaje final comparado con la concentración inicial (Fuccz *et al.*, 2007).

Las conclusiones de este estudio fueron:

- No se presentó una diferencia estadísticamente significativa en la reducción de coliformes fecales entre los tratamientos, durante el período de evaluación.
- La reducción de coliformes fecales para cada uno de los tratamientos fue mayor al 30%. El tratamiento que presentó mayor disminución en la concentración de coliformes fecales fue T3 con un porcentaje de reducción de 78.5%; y para los demás tratamientos fue de 38.1% para T1 y 53.8% para T2. El tratamiento T3 puede ser utilizado para la restauración de áreas disturbadas debido al alto porcentaje de reducción que presentó: 78.5%.
- La radiación solar, temperatura ambiente, el porcentaje de humedad y precipitación influyen significativamente en la reducción de coliformes fecales (Fuccz *et al.*, 2007).

#### **2.1.1.2.3 Efectos de los coliformes fecales en suelo agrícola acondicionado con biosólidos**

En un experimento de incubación se monitoreó el efecto de la aplicación de los biosólidos en suelo agrícola referente a los cambios en números de coliformes fecales sobre determinado tiempo de la aplicación de dicho material y la evaluación de los riesgos a la salud. En el suelo los coliformes fecales fueron contados después de 1, 7, 14, 28, 56 y 84 días de incubación. Los coliformes fecales contados en suelos tratados con biosólidos decrecieron substancialmente con el tiempo y fueron similares en suelos no tratados después de la incubación durante 56 días. El tratamiento para secar los biosólidos

denominado secado al aire libre para su aplicación en el campo, incrementó los riesgos a la salud por el recrecimiento de coliformes fecales, y el número de estos microorganismos en suelo acondicionado con biosólidos secados al aire libre fueron 50 veces más altos que en suelos acondicionados con biosólidos frescos después de 7 días de incubación. Los principales factores que influyeron en el cambio del número de los coliformes fecales fueron el tipo de biosólido y el tiempo de incubación. El tipo de biosólido determinó el incremento o decremento de los coliformes fecales en el suelo y la habilidad de éstos para restablecerse, y los microorganismos nativos compitieron con los coliformes fecales por nutrientes durante el proceso de incubación (Sun *et al.*, 2006).

#### **2.1.1.2.4 Enfermedades causadas por los coliformes fecales debido a la aplicación de biosólidos sobre suelo agrícola**

La relación entre una higiene deficiente, las aguas negras sin procesar y las enfermedades infecciosas está bien establecida. La mayoría de las bacterias, virus y parásitos patógenos en los biosólidos son entéricos, lo que quiere decir que están presentes en el tracto intestinal de los humanos y los animales. Los organismos entéricos que pueden encontrarse en los biosólidos incluyen, pero no se limitan a, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, el virus de *Norwalk* y los virus entéricos. El contacto puede resultar potencialmente en enfermedades (por ejemplo, gastroenteritis, diarrea e infecciones del tracto urinario) o en un estado portador en el que una infección no se manifiesta clínicamente por sí misma en el individuo, pero puede propagarse a otros.

Estos organismos entéricos por lo general están asociados con enfermedades gastrointestinales autolimitadas, pero que pueden convertirse en enfermedades más graves en poblaciones sensibles como individuos con sistemas inmunológicos comprometidos, recién nacidos, niños pequeños y especialmente los ancianos (INSSO, 2002).

El riesgo de enfermedad está en función del número y tipos de patógenos en los biosólidos relativa a los niveles de exposición y a la dosis infecciosa. Debido a que son escasos los datos sobre lo que constituye una dosis infecciosa, es una práctica de salud pública prudente reducir al mínimo el contacto de las personas encargadas de tener contacto directo con los biosólidos y con los suelos o el polvo que contiene biosólidos durante su producción y aplicación, y en sitios de aplicación de suelos durante el período en el que se restringe el acceso al público (INSSO, 2002).

### **2.1.2 Metales pesados**

En la aplicación de biosólidos sobre el suelo agrícola se presenta un alto contenido de metales pesados como: Zn, Pb, Cu y Cd en el suelo hasta una profundidad de 30 o 40 centímetros, apareciendo su máximo incremento en los primeros 5 centímetros de la superficie. El problema está en saber si la parte asimilable para las plantas sigue el mismo proceso o si, por el contrario, su distribución es totalmente diferente. Según varios autores, los metales como contaminantes del suelo son persistentes e irreversibles, especialmente el Cadmio, el cual es asimilado por la vegetación, lo que puede perturbar gravemente a las plantas y a los mamíferos que las consuman (Vélez, 2007).

La absorción de las plantas está condicionada tanto por el elemento, su concentración y grado de disponibilidad, como por la especie vegetal y la interacción con macronutrientes. La biodisponibilidad de metales en el sistema suelo-planta por aporte de los biosólidos se ha estimado a partir de los coeficientes de transferencia, observándose que el Cd y el Zn poseen los valores más elevados. En general parece que la biodisponibilidad es superior para Cd, Cu, Ni y Zn que para Pb, Hg y Cr, pero incluso para los elementos más móviles la cantidad de metal transferida al cultivo es inferior a 0.05% de la cantidad aplicada anualmente por aporte de biosólidos (Vélez, 2007).

La acumulación en determinados tejidos u órganos es variable. Algunos como por ejemplo el Cr y el Pb son bloqueados a nivel radicular. Otros como Cd y Hg son más zootóxicos que fitotóxicos, es decir, pueden acumularse en tejido vegetal hasta concentraciones que serían tóxicas para animales, sin efecto adverso para la planta. Por el contrario, la elevada fitotoxicidad del Cu, Ni y Zn hacen que el vegetal haga de barrera de protección frente a la cadena trófica (Vélez, 2007).

En general, parece ser que en hortalizas los metales tienden a asimilarse con mayor facilidad que en las gramíneas, siendo al mismo tiempo más sensibles a la toxicidad las primeras y más tolerantes estas últimas (Vélez, 2007).

### **2.1.2.1 Efectos de los metales pesados en suelo agrícola acondicionado con biosólidos**

En algunas ciudades de Estados Unidos de Norteamérica, Europa y África han logrado que los biosólidos tengan una aplicación en las tierras de cultivo ya que contienen nutrimentos que son indispensables para el crecimiento de las plantas; además de que mejoran las propiedades físicas y químicas del suelo (Scott and Ahlstrom, 1985; Hue, *et al.*, 1988, Oberhaster, 1991). Sin embargo, desde los años 70 ha sido extensamente estudiada la acumulación de metales pesados (Cu, Ni, Zn, Cd y Cr) presentes en los biosólidos (Alloway, 1991), siendo un factor limitante para su disposición en las tierras de cultivo, ya que los elementos tóxicos pueden acumularse en las plantas ocasionando, baja producción de sustancias nutritivas. Se han realizado diversos estudios sobre el comportamiento de los metales pesados en plantas (Watson *et al.*, 1985).

#### **2.1.2.1.1 Efectos del Cu en suelo agrícola acondicionado con biosólidos**

En un estudio realizado por Martín del Campo *et al.*, (2002) a los biosólidos de una Planta Tratadora de Aguas Residuales ubicada en Toluca, Estado de México, se demuestra que el Cu es el de mayor disponibilidad seguido del Zn y Ni. El Cu tiene la capacidad de interactuar químicamente con componentes orgánicos y minerales del suelo formando fuertes enlaces (Zhu y Alva, 1993). En el suelo las concentraciones de Cu se presentan en 53 mg kg<sup>-1</sup> y en biosólidos 335 mg kg<sup>-1</sup> (Ortiz, *et al.*, 1999).

Las poblaciones de *Rizhobium* en el suelo pueden ser reducidas cuando las concentraciones de Cu están cerca de 27-48 mg kg<sup>-1</sup>. En el suelo viven libremente bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias heterotróficas y cianobacterias que son sensibles a los metales pesados en concentraciones muy bajas. La biomasa microbiana del suelo es reducida por las concentraciones de Cu cuando éstas oscilan entre 70-384 mg kg<sup>-1</sup> (Harrison, 1999).

Algunos cultivos como lechuga, zanahoria, espinaca, brócoli, coliflor, calabaza y maíz son sensibles a la aplicación de biosólidos con concentraciones de Cu en suelo agrícola (Harrison, 1999).

En un estudio realizado por Álvarez (2004), el objetivo principal fue determinar si los biosólidos al interactuar con el suelo originaban un cambio en sus propiedades químicas. El suelo y los biosólidos se incubaron 7 semanas a temperatura y humedad constantes. Las concentraciones de Cu demostraron diferencias significativas por la influencia de factores como: el tipo de suelo, tiempo de incubación y dosis. Las concentraciones de Cu al día cero en el suelo y biosólidos fueron de 6.5 y 7 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, al día 30 en el suelo fueron de 7 y en biosólidos 8 mg kg<sup>-1</sup> y al día 49 en suelo y biosólidos 6.6 y 7.1 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente.

La fuerte absorción del elemento Cu puede conducir a la acumulación del mismo en la capa superior del suelo. Existen estudios donde el uso intensivo de fungicidas cúpricos (hasta

100 kg ha<sup>-1</sup>) dio lugar a niveles de más de 1 000 mg kg<sup>-1</sup> en los 5 cm superiores del suelo. A mayor profundidad (>30 cm), sólo se detectaron concentraciones de 30 a 50 mg kg<sup>-1</sup> de Cu; estos niveles no causaron problemas. La contaminación del suelo por Cu es de origen antrópico, ya que es el resultado de la utilización de fertilizantes, sprays, desechos municipales en la agricultura, así como de emisiones industriales que se vierten en ríos y son utilizados por los agricultores (Martínez, 2004).

#### **2.1.2.1.2 Efectos del Cu a la salud humana**

El cuerpo requiere cobre como nutriente esencial y diariamente necesita que en la dieta alimenticia exista entre 1 y 2 miligramos en el caso de los adultos y entre 0.5 y 1 miligramo en el caso de los niños. Esta cantidad se puede obtener si se ingieren cantidades normales de alimentos ricos en cobre, mencionados anteriormente. Las cañerías para el agua fabricadas con cobre ayudan a mantener el agua limpia. Cuando estas cañerías son nuevas o cuando el agua que se encuentra dentro de ellas posee ciertas características químicas, liberan cobre en pequeñas cantidades al agua potable. Para la población en general, el cobre no es tóxico durante el curso normal de la vida diaria. Las plantas y los animales también requieren del cobre para mantener un crecimiento saludable que también beneficia al ser humano mediante la cadena alimenticia (Torres, 2005).

El envenenamiento agudo de cobre es un suceso raro, y solo ocasionado por la ingestión accidental de soluciones del cobre o nitrato de sulfato de cobre. Las sales anteriores y aquellas sales orgánicas de cobre son poderosos eméticos (sustancias que inducen al vómito) por lo que las dosis grandes que se ingieran de manera inadvertida son rechazadas normalmente. El envenenamiento crónico de cobre por la ingestión en alimentos es también muy raro y los pocos informes existentes se refieren a pacientes con enfermedades del hígado. La capacidad del hígado humano saludable para excretar cobre es considerable y es la principal razón por la que ningún caso de envenenamiento crónico de cobre se ha reportado (Torres, 2005).

En determinados casos se ha mostrado que el Cu puede ocasionar enfermedades gastrointestinales y enfermedades del hígado (Stephens, 2008). Las concentraciones letales de Cu van de 700-2100 mg g<sup>-1</sup> y la muerte se presenta por cirrosis hepática (Sorbe, 1988).

#### **2.1.2.1.3 Efectos del Cd en suelo agrícola acondicionado con biosólidos**

El Cd puede ser transportado a grandes distancias cuando es absorbido por los biosólidos. Los biosólidos ricos en Cd pueden contaminar las aguas superficiales y los suelos (Lue-Hing *et al.*, 1992).

En el suelo las concentraciones de Cd se presentan en 0.3-0.6 mg kg<sup>-1</sup> y en biosólidos 3.28 mg kg<sup>-1</sup> (Ortiz *et al.*, 1999).

Las poblaciones de Rizhobium en el suelo pueden ser reducidas cuando las concentraciones de Cd están cerca de 0.8-1.0 mg kg<sup>-1</sup> (Harrison, 1999).

El Cd es un metal pesado más zootóxico que fitotóxico, es decir, pueden acumularse en tejido vegetal hasta concentraciones que serían tóxicas para animales, sin efecto adverso para la planta (Vélez, 2007).

Álvarez (2004) incubó suelo y biosólidos con Cd por 7 semanas a temperatura y humedad constantes. Las concentraciones de Cd estuvieron bajo el límite de detección durante toda la incubación debido a que su concentración en el suelo fue muy baja. No se produjo una diferencia significativa en el Cd por la incorporación de biosólido al suelo dado su bajo aporte de 0.016 mg kg<sup>-1</sup>. Los resultados fueron variables en los tratamientos durante la incubación. Las concentraciones de Cd al día cero en el suelo y biosólidos fueron de 0.06 mg kg<sup>-1</sup> y al día 30 en suelo fueron de 0.03 y en biosólidos 0.04 mg kg<sup>-1</sup> y al día 49 en suelo fueron de 0.09 y en biosólidos 0.091 mg kg<sup>-1</sup>.

#### **2.1.2.1.4 Riesgo ambiental causado por el Cd**

El Cd es fuertemente adsorbido por la materia orgánica del suelo. Cuando el Cd está presente en el suelo este puede ser extremadamente peligroso. En los suelos que son ácidos, aumenta la absorción de Cd por las plantas. Esto es un daño potencial para los animales que dependen de las plantas para sobrevivir. El Cd puede acumularse en sus cuerpos, especialmente cuando estos comen muchas plantas diferentes. Las vacas pueden acumular grandes cantidades de Cd en sus riñones debido a esto. Las lombrices y otros animales esenciales para el suelo son extremadamente sensibles al envenenamiento por Cd. Pueden morir a muy bajas concentraciones y esto tiene consecuencias en la estructura del suelo. Cuando las concentraciones de Cd en el suelo son altas esto puede influir en los procesos del suelo por los microorganismos y amenazar a todo el ecosistema (Martín del Campo, 1996).

En ecosistemas acuáticos el Cd puede bioacumularse en mejillones, ostras, gambas, langostas y peces. La susceptibilidad al Cd puede variar ampliamente entre organismos acuáticos. Organismos de agua salada se sabe que son más resistentes al envenenamiento por Cd que organismos de agua dulce. Los animales que ingieren o beben Cd algunas veces tienen la presión sanguínea alta, daños del hígado y daños en nervios y el cerebro (Tessier *et al*, 1979).

#### **2.1.2.1.5 Efectos causados por el Cd a la salud humana**

Se ha demostrado que el Cd puede ocasionar problemas renales en los seres humanos (Stephens, 2008) y puede concentrarse en el hígado, riñones y páncreas (Arboleda, 2000). Además del tracto gastrointestinal y el pulmón, es el riñón el órgano más afectado por exposición crónica al cadmio. El cadmio es una toxina de acumulación; su rápida solvólisis en ácidos débiles constituye un prerrequisito fundamental para su fácil asimilación en el organismo: en el tracto gastrointestinal se reabsorbe un 5% del cadmio, que se deposita en el hígado y en los riñones. En Asia, las altas concentraciones de cadmio en el arroz, son las responsables de la enfermedad "Itai-Itai" que destruye los eritrocitos y produce proteinuria, rinitis, enfisema y bronquitis crónica. El cadmio y sus compuestos son carcinógenos. Un síntoma típico de intoxicación crónica es la excreción de  $\beta$ -microglobulina en la orina debido a la disfunción renal. También puede producir deformaciones óseas. La dosis letal para los mamíferos es a partir de  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  (Sorbe, 1988).

#### **2.2. Riesgos ambientales y a la salud por la aplicación de biosólidos al suelo agrícola**

La calidad agronómica de los biosólidos es buena debido a su alto contenido de materia orgánica y nutrientes, sin embargo estos residuos tienen poca estabilidad del componente orgánico, alta concentración de patógenos y algunos metales. Para usar los biosólidos en la

agricultura se deben implementar prácticas de control que reduzcan el riesgo para el buen crecimiento de los cultivos y protejan la cadena alimenticia (Cardoso, 2002).

Las características que podrían resultar potencialmente contaminantes si los biosólidos se usan en agricultura son: biosólidos poco estabilizados; alta conductividad eléctrica y alto contenido de metales (Cardoso, 2002).

### **2.3 Resistencia de los coliformes fecales a Cu y Cd agregados artificialmente**

Se realizó un estudio sobre la distribución de las bacterias enteropatógenas en los biosólidos. En cada punto se tomaron 12 muestras, que se analizaron en busca de coliformes fecales (CF) y de *Escherichia coli*. Se analizó también la resistencia a antibióticos y a metales pesados. Casi el 36% de las cepas de *E. coli* aisladas eran resistentes a más de un antibiótico. Todas las cepas eran resistentes al zinc y al cobre a la mayor concentración probada  $250 \text{ mg kg}^{-1}$ , varias cepas (23.4%) eran resistentes al mercurio a  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  y al cadmio a  $0.8\text{-}1.0 \text{ mg kg}^{-1}$ . Estos resultados coinciden con trabajos anteriores que indican que en bacterias patógenas la resistencia a antibióticos suele ir asociada a la resistencia a metales pesados (Cardhona, 2004).

## **2.4 Resistencia de los coliformes fecales a los antibióticos**

Los efectos a largo plazo que los antibióticos y pesticidas tienen en la salud humana y el ambiente han comenzado a provocar estragos, los antibióticos y sus metabolitos, pasan directamente al ambiente poniéndose en contacto con las poblaciones microbianas, generando la resistencia a dichos antibióticos y a agentes antibacterianos. Cuando ésta resistencia es adquirida o desarrollada en las bacterias patógenas, se vuelve un problema no tan solo de contaminación del agua, sino de salud ambiental, representando un fuerte impacto en la salud y en la economía de las poblaciones (Castillo *et al.*, 2007).

Aunado a esto se tiene conocimiento de que los mecanismos de resistencia a metales pesados aumentan la posibilidad de que las bacterias desarrollen la resistencia a los antibióticos (Kapil, 2005, Kümmerer, 2004, Lenski, 1998).

La resistencia a los antibióticos se define como una propiedad bacteriana que confiere la capacidad de inactivar o excluir antibióticos de las células, o un mecanismo que bloquea el efecto letal o inhibitorio de los antibióticos (Castillo *et al.*, 2007).

Aunque se sabe que algunas especies bacterianas poseen resistencia intrínseca previa a la introducción de los antibióticos, la emergencia de la resistencia a los antibióticos en poblaciones previamente susceptibles ha sido asociada con el mal uso y abuso de los antibióticos (Wilkinson, 1999).

Se sabe que las bacterias responden al cada vez mayor empleo de los antibióticos y otros agentes inhibitorios, generando progenies resistentes a estas sustancias (Salysers *et al.*,

2004). Mientras que algunas cepas bacterianas adquieren estas características de resistencia de otras bacterias, muchas desarrollan mutaciones cromosómicas en el sitio blanco del compuesto antibacteriano (Sader *et al.*, 2005). Otro tipo de mutación las lleva a activar sus llamadas bombas de expulsión (drug efflux system) que son una respuesta a señales ambientales o a una mutación en el gen que regula su expresión (Sader *et al.*, 2005).

Las conclusiones obtenidas por Castillo *et al.*, (2007) en su investigación fueron que los coliformes fecales son capaces de resistir concentraciones de: 50 mg kg<sup>-1</sup> de Ampicilina, 10 mg kg<sup>-1</sup> de Tetraciclina y 10 mg kg<sup>-1</sup> de Cloramfenicol.

## 2.5 Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes

En la NOM-004-SEMARNAT-2002 se citan los límites máximos permisibles que los biosólidos pueden cumplir para su reúso (Cuadros 3 y 4)

Cuadro 3. Límites máximos permisibles para patógenos y parásitos en lodos y biosólidos.

Clase	Indicador bacteriológico de contaminación	Patógenos	Parásitos
	Coliformes fecales NMP g <sup>-1</sup> en base seca	<i>Salmonella spp.</i> NMP g <sup>-1</sup> en base seca	Huevos de helmintos g <sup>-1</sup> en base seca
A	Menor de 1 000	Menor de 3	Menor de 1(a)
B	Menor de 1 000	Menor de 3	Menor de 10
C	Menor de 2 000 000	Menor de 300	Menor de 35

Fuente: SEMARNAT-2002. (a) Huevos de helminto

Cuadro 4. Límites máximos permisibles de metales en lodos y biosólidos.

Contaminante (determinados en forma total)	Excelentes (mg kg <sup>-1</sup> en base seca)	Buenos (mg kg <sup>-1</sup> en base seca)
Cadmio	≤ 39	≤ 85
Cobre	≤ 1 500	≤ 4 300

Fuente: SEMARNAT-2002.

El aprovechamiento de los lodos y biosólidos, se establece en función del tipo, clase y contenido de humedad.

### 2.5.1 Aprovechamiento de los biosólidos

El tipo de aprovechamiento de los biosólidos según su clase se presenta en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Aprovechamiento de biosólidos

Tipo	Clase	Aprovechamiento
EXCELENTE	A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Usos urbanos con contacto público directo durante su aplicación.</li> <li>• Los establecidos para clase B y C</li> </ul>
EXCELENTE Ó BUENO	B	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Usos urbanos sin contacto público directo durante su aplicación.</li> <li>• Los establecidos para clase C</li> </ul>
EXCELENTE Ó BUENO	C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Usos forestales.</li> <li>• Mejoramientos de suelos.</li> <li>• Usos agrícolas.</li> </ul>

Fuente: SEMARNAT-2002.

## 2.6 Macroplanta Toluca Norte

La planta Toluca Norte sirve a la ciudad de Toluca, en beneficio de 490 mil habitantes; se ubica al lado derecho del río Verdiguél, en un terreno de 16 hectáreas dentro de la propiedad conocida como Rancho San Blas, sobre el camino a Villa Cuauhtémoc. La planta tiene una capacidad de entre 1000-1100 L día<sup>-1</sup> y el origen de las aguas residuales son 20% de la industria y 80 % de los hogares. Para conducir las aguas residuales hasta la planta y sanear su zona de influencia, fue necesario la construcción del colector Toluca Norte de 9.7 km de longitud, con tuberías de concreto reforzado de 1.8 m de diámetro (Beltrán *et al*, 2006).

Toluca Norte es una planta tipo dual o combinado, cuya variante de filtros rociadores-tanques de contacto de sólidos permite obtener efluentes de buena calidad. Antes de iniciar el proceso biológico dual, las aguas residuales reciben un pre-tratamiento que permite suprimir el uso de sedimentadores primarios, al pasar a través de rejillas de desbaste grueso, seguido de cribas finas de limpieza mecánica y gracias a esto el agua residual queda libre de residuos mayores de 6 milímetros. Posteriormente, pasa a unos desarenadores denominados vórtice y después a un cárcamo de bombeo, desde donde se envía a los filtros rociadores empacados con medio plástico; ahí la materia orgánica se transforma en materia celular, bióxido de carbono y agua. La materia celular se adhiere al medio plástico, de donde se desprende periódicamente por la acción cortante del agua, en su paso a través del filtro rociador. La mezcla se conduce a los tanques de contacto de

sólidos, donde se aplica aire por difusión, lo cual ayuda a estabilizar la materia orgánica y permite la floculación del material celular, para mejorar la eficiencia de los tanques sedimentadores. El cultivo biológico que se sedimenta, se extrae y recircula continuamente a través de los tanques de contacto de sólidos. El agua clarificada se recolecta en un canal perimetral y se conduce al tanque de contacto de lodo para su desinfección, previo a su disposición final. De este modo, el agua tratada resultante es clara y sin olor.

Los sólidos que se retienen en las rejillas se manejan como basura; las arenas se transportan a un relleno sanitario y el exceso de lodos biológicos, previo espesamiento, se someten a estabilización por digestión aerobia para disminuir la concentración de bacterias patógenas. En los filtros banda se disminuye el porcentaje de humedad quedando aproximadamente 22% y se disponen en terrenos aledaños como acondicionadores de suelo. Por día se generan aproximadamente 140 m<sup>3</sup> de lodos residuales (Beltrán *et al*, 2006).

## **2.7 Caracterización del suelo agrícola y los biosólidos**

Se realizó un estudio sobre la aplicación de biosólidos estabilizados acondicionados para su aplicación en la agricultura a través del cultivo de lechuga de hoja rizada (*Lactuca sativa* var. *Intybacea Hort*). Los biosólidos utilizados se obtuvieron del tratamiento secundario de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Toluca Norte, ya estabilizados y prensados. El suelo y los biosólidos fueron caracterizados antes de la experimentación y se obtuvieron los siguientes resultados que se presentan en los cuadros 6 y 7 (Beltrán *et al*, 2006).

Cuadro 6. Caracterización del suelo.

Análisis	pH	Materia orgánica (%)	Composición textural	% HUMEDAD	Espacio poroso (%)
Suelo	6.5	3.63	87.5% limoso-12.5% arcilloso	35%	53.60%

Caracterización del suelo (Beltrán *et al*, 2006).

Cuadro 7. Caracterización de biosólidos.

Análisis	pH	Materia orgánica (%)	Capacidad de intercambio catiónico (CIC) (meq/100g)	Nitrógeno (ppm)	Fósforo (ppm)	Potasio (ppm)	Huevos de helminto
Suelo	7.8	55.2	33.11	5600	553.5	1395	No detectados

Resultados de la caracterización de biosólidos (Beltrán *et al*, 2006).

Como se puede apreciar en el cuadro 7, los biosólidos presentan un pH alcalino debido a que se obtuvieron estabilizados de la planta de tratamiento de aguas residuales. Existe un alto contenido de materia orgánica y un valor elevado para la capacidad de intercambio catiónico lo que es favorable al realizar la mezcla con el suelo. Los biosólidos presentan alta humedad y el contenido de nutrientes es elevado. No se registró presencia de huevos de helmintos (Beltrán *et al*, 2006).

En estudios realizados para la clasificación taxonómica de los suelos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEM, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Los suelos presentan un alto contenido de arcilla, mayor al 30% a los 50 cm de profundidad.
- Se indica un pH de moderadamente a fuertemente ácido

- Las cantidades de materia orgánica y nitrógeno se reportaron bajos y a medida que la profundidad es mayor las concentraciones disminuyen drásticamente (Valencia y Casado, 2004).

En un estudio microbiológico alterno realizado a los biosólidos de la Macroplanta Toluca Norte se detectaron 4 huevos de helmintos  $\text{g}^{-1}$  en base seca, por lo tanto estos subproductos fueron clase B de acuerdo a la NOM-004-SEMARNAT-2002 (Proyecto Conacyt/P1-58215).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Descripción general del experimento

Previo al muestreo de biosólidos, se realizaron los análisis físico-químicos para la caracterización del suelo agrícola que se utilizó en la investigación, donde se obtuvieron 3 muestras del Campus Universitario “El Cerrillo” a las cuales se les determinó pH, materia orgánica, % de humedad, capacidad de campo, granulometría, NMP  $\text{g}^{-1}$  de sólidos totales de coliformes fecales y determinación de los metales pesados Cu y Cd. Estos análisis se realizaron a partir del día 8 al 12 de junio de 2009 en el laboratorio de suelos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEM.

Para el principal objetivo del proyecto se tomaron 6 kg de muestra de biosólidos procedentes de la Macroplanta Toluca Norte el día lunes 22 de junio de 2009.

El experimento se dividió en 2 fases:

Fase 1: día 0 (Incubación). Se inició a partir del día miércoles 24 de junio de 2009.

- a) Se realizó la incubación de suelo, biosólidos, mezcla de suelo+biosólidos, mezcla de suelo+biosólidos+Cd y mezcla de suelo+biosólidos+Cu en macetas de plástico. Para realizar las mezclas de los 3 tratamientos se utilizaron 100 g de suelo (20%) más 400 g de biosólidos (80%), dando un total de 500 g (100%) que se llevaron a cabo en

las instalaciones del invernadero número 3 ubicado en la Facultad de Ciencias Agrícolas.

- b) Después de la incubación, se tomaron 15 muestras de los tratamientos para realizar los análisis microbiológicos para la cuantificación de los coliformes fecales de los tratamientos en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Agrícolas.
- c) Al término de los análisis microbiológicos y a partir de 15 muestras obtenidas de los tratamientos se determinó la concentración de los metales pesados Cu y Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) por medio del espectrofotómetro de absorción atómica ubicado en las instalaciones del laboratorio de Calidad del Agua del Centro Interamericano de Recursos del Agua (C.I.R.A).

Fase 2: día 30. Se inició a partir del día viernes 24 de julio de 2009.

Para la obtención de los resultados de esta fase, se utilizó la misma metodología empleada en la Fase 1 y se llevó a cabo en las mismas instalaciones mencionadas anteriormente, tanto para la cuantificación de los coliformes fecales, como para la concentración de los metales pesados Cu y Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) por medio del espectrofotómetro de absorción atómica.

En la Fase 2 del proyecto y con los resultados obtenidos de la Fase 1 se determinó:

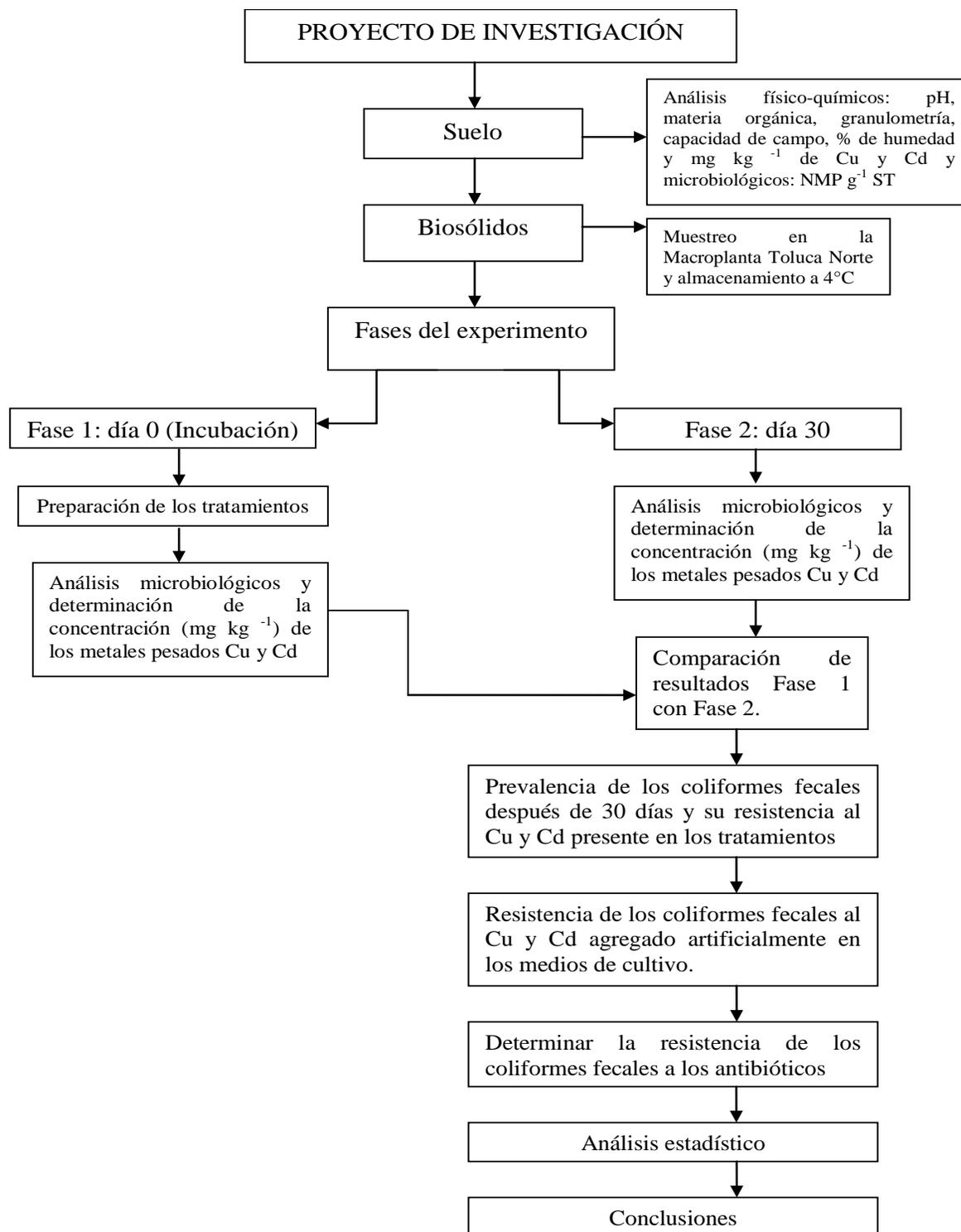
- a) Si los coliformes fecales prevalecieron después de 30 días.
- b) El porcentaje de coliformes fecales que disminuyó en los 30 días que duró el experimento.

- c) Las concentraciones en  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu y Cd presentes de manera natural en el suelo, biosólidos y suelo+biosólidos y las concentraciones en  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu y Cd que fueron agregadas artificialmente en los tratamientos suelo+biosólidos+Cu y suelo+biosólidos+Cd que los coliformes fecales pudieron resistir.
- d) La concentración en  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu y Cd agregados artificialmente en los medios de cultivo que los coliformes fecales pudieron resistir.
- e) Las concentraciones en  $\text{mg kg}^{-1}$  de los antibióticos: ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina que los coliformes fecales resistieron.
- f) La asociación que existe entre la resistencia a los metales pesados y a los antibióticos por parte de los coliformes fecales.
- g) El análisis estadístico para establecer las medias y el coeficiente de correlación entre 6 variables: NMP  $\text{g}^{-1}$  de sólidos totales de coliformes fecales día 0 (X1), NMP  $\text{g}^{-1}$  de sólidos totales de coliformes fecales día 30 (X2),  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cd día 0 (X3),  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cd día 30 (X4),  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu día 0 (X5) y  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu día 30 (X6).

Cabe señalar, que durante los 30 días que duró el experimento, se realizaron 3 riegos en las siguientes fechas: 1, 8 y 15 de julio del presente año.

Los análisis microbiológicos y la determinación de metales pesados se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002, Protección Ambiental, Lodos y Biosólidos, Especificaciones y Límites Máximos Permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final (SEMARNAT-2002).

A continuación se presenta una descripción general del proyecto en la Figura 1. Diagrama general del experimento.



**Figura 1. Diagrama general del experimento**

## **3.2 Análisis del suelo**

### **3.2.1 Ubicación geográfica de la muestra de suelo**

Las muestras de suelo se obtuvieron de suelo del Campus Universitario “El Cerrillo”, que se localiza entre los 99° 39’ latitud oeste y 19° 17’ latitud norte, con temperatura media anual de 12.82°C, precipitación media anual de 900 mm, el tipo de suelo es vertisol y se presenta a una altura de 2 600 msnm (García, 1988).

### **3.2.2 Procedimiento**

- Las muestras se obtuvieron de suelos del Campus Universitario “El Cerrillo”, a una profundidad de 0-20 cm.
- Secado: sobre 3 charolas de plástico la muestra se extendió y se colocó a la sombra a temperatura ambiente.
- Molienda: se eliminó todo el material orgánico visible y rocas. Se realizó con un mazo de madera.
- Tamizado: el suelo molido se hizo pasar por un tamiz con aberturas de 2 mm de diámetro (malla 10) de acero inoxidable y ya tamizado se separó 1.5 kg de suelo.

- Homogeneizado: el suelo se mezcló perfectamente bien hasta lograr una mezcla homogénea.
- Pesada: previamente tamizada y homogeneizada la muestra, se extrajo la submuestra.
- Se almacenó a 4°C.

### **3.2.3 Análisis físico-químicos del suelo**

Los siguientes análisis se realizaron en el Laboratorio de suelos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEM, utilizando la técnica recomendada por Serrato y Landeros (2001 a y 2001 b).

- Granulometría del suelo por análisis de vía seca
- Determinación del contenido de humedad por el método gravimétrico
- pH mediante el potenciómetro en una relación 1:25
- Materia orgánica por el método de Walkley & Black modificado

### **3.3 Muestreo de los biosólidos**

El muestreo de biosólidos se llevo a cabo el 22 de junio de 2009, en la Macroplanta Toluca Norte, las muestras se tomaron al final del proceso de estabilización en 6 bolsas estériles, en las cuales se colocó 1 kg de muestra de biosólidos, evitándose la exposición de las muestras al sol durante su transporte desde la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales al Laboratorio del Centro Interamericano de Recursos del Agua (CIRA). Previamente etiquetadas, se mantuvieron almacenadas en refrigeración a 4°C hasta sus análisis microbiológicos antes de 48 horas y para la determinación de metales pesados antes de 180 días.

### **3.4 Fases del experimento**

#### **3.4.1 Fase 1: día 0**

Esta fase comenzó a realizarse el día miércoles 24 de junio de 2009.

##### **3.4.1.1 Preparación de los tratamientos**

La preparación de los tratamientos se realizó en el Invernadero número 3 de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEM para proteger los tratamientos de condiciones climáticas. Para las mezclas se utilizaron 15 macetas de plástico con capacidad de 1 kg, el experimento contó con 5 tratamientos y 3 repeticiones (Cuadro 8). Cada maceta fue llenada con 100 g de

biosólidos que representan 20% y 400 g de suelo que representan 80%, para un contenido total de 500g/maceta que es el 100%.

### 3.4.1.2 Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques al azar con 5 tratamientos y 3 repeticiones. A los días 0 y 30 se realizaron los muestreos (Cuadro 8). Para comparar por separado los resultados entre los diferentes tratamientos, se realizó un análisis de varianza con  $\alpha = 0.01$ .

A continuación, se presentan los tratamientos y las repeticiones en el siguiente cuadro.

Cuadro 8. Tratamientos y repeticiones

Tratamientos	Repeticiones
Suelo (testigo)	S
Biosólidos (testigo)	B
Suelo+biosólidos	S+B
Suelo+biosólidos+Cobre	S+B+Cu
Suelo+biosólidos+Cadmio	S+B+Cd

Los conteos de coliformes fecales fueron evaluados por análisis de varianza (ANOVA) y en caso de encontrar diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey al 0.01 de probabilidad. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete SAS versión 1998.

### 3.4.1.3 Técnica empleada para la cuantificación de coliformes fecales

La metodología que se describe a continuación para los análisis microbiológicos se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEM.

### 3.4.1.3.1 Determinación del peso fresco

A la muestra fresca primero se le pesó y se registró su peso, después se le determinó el contenido de sólidos totales (ST), es decir la muestra fue deshidratada a 100°C y nuevamente se volvió a pesar para conocer su peso seco o peso sin humedad. Una vez obtenido el peso de la muestra fresca y el peso seco, se obtuvo el peso de la muestra fresca que correspondió a 4 g de sólidos totales para conocer el peso de la muestra fresca que se necesitó. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$PMF2 = (4 \text{ g} * PMF1) / ST$$

Donde:

PMF2 = peso de la muestra fresca que corresponde a 4 g ST

PMF1 = mayor cantidad de peso de la muestra fresca en g

ST = mayor cantidad del peso seco en g

En el siguiente cuadro, se presentan los pesos de la muestra fresca que corresponden a los 4 g de sólidos totales.

Cuadro 9. Tratamientos, sólidos totales y pesos de la muestra fresca.

Tratamientos	Sólidos totales	Pesos muestra fresca
Suelo (testigo)	4 g	4.42
Biosólidos (testigo)	4 g	12.52
Suelo+biosólidos	4 g	5.27
Suelo+biosólidos+Cobre	4 g	5.33
Suelo+biosólidos+Cadmio	4 g	5.21

#### **3.4.1.3.2 Dilución de la muestra**

Se suspendió el peso de la materia fresca en g que correspondió a 4 g de sólidos totales en 36 mL de agua de dilución o agua peptonada obteniendo una dilución de  $10^{-1}$  y se mezclaron durante 2 minutos hasta la completa disolución. El agua de dilución o agua peptonada, se obtuvo con peptona al 15%.

Se prepararon diluciones decimales seriadas a partir del homogeneizado resultante ( $10^{-1}$ ), y se redujo al mínimo la sedimentación. Se transfirió 1 mL en 9 mL de agua de dilución ( $10^{-2}$ ) y así sucesivamente hasta que se obtuvo la dilución  $10^{-5}$ . Cada dilución se homogeneizó perfectamente y se utilizó una pipeta estéril diferente para cada una de las diluciones decimales subsecuentes.

#### **3.4.1.3.3 Determinación de coliformes totales por la prueba presuntiva (caldo lactosado con púrpura de bromocresol)**

a) Se transfirió 1 mL de las diluciones seleccionadas a cada una de las series de tubos correspondientes conteniendo el caldo lactosado y se incubó a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

b) Se examinó cada tubo a las  $24 \pm 2$  horas. Si hubo acidificación, con o sin producción de gas (cambio de coloración de púrpura a amarillo), a partir de la fermentación de la lactosa en el medio de cultivo, se interpretó como una prueba presuntiva positiva de la presencia de bacterias del grupo coliformes. Cuando ocurrió lo contrario se reincubó durante otras 24 horas.

c) Cuando hubo acidificación del medio, con o sin formación de gas dentro de las  $48 \pm 3$  horas, constituyó una prueba presuntiva positiva. Cuando no existió acidificación del medio, constituyó una prueba negativa.

#### **3.4.1.3.4 Determinación de coliformes fecales por la prueba confirmativa flama del medio EC**

a) Los tubos positivos de la prueba presuntiva se resembraron por triple asada (esterilizada al mechero y enfriada) en tubos de fermentación presuntiva negativa que contenían caldo EC y se incubaron a  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ .

b) Se examinó cada tubo a las  $24 \pm 2$  horas.

c) El resultado fue positivo cuando hubo producción de gas a partir de la fermentación de la lactosa que contenía el medio EC. Los tubos sin formación de gas se desecharon.

#### **3.4.1.3.5 Cálculos**

El NMP de coliformes fecales se obtuvo a partir del código compuesto por los tubos con resultado positivo en el medio EC a través de la siguiente fórmula:

$$\text{NMP/g de sólidos totales} = (\text{NMP de tablas}) * (10/\text{mayor volumen inoculado})$$

Cuando se inocularon más de tres volúmenes decimales, para la composición del código se utilizaron los resultados positivos correspondientes a tres series consecutivas inoculadas.

A continuación se presenta el cuadro del Número Más Probable:

Cuadro 10. Cuadro del Número Más Probable (NMP) por mL g<sup>-1</sup> de muestra.

10	1	.1	NMP/ml	10	1	.1	NMP/ml
0	0	0	0	2	0	0	9
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	3.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29	3	3	3	>1100

Fuente: SEMARNAT-2002.

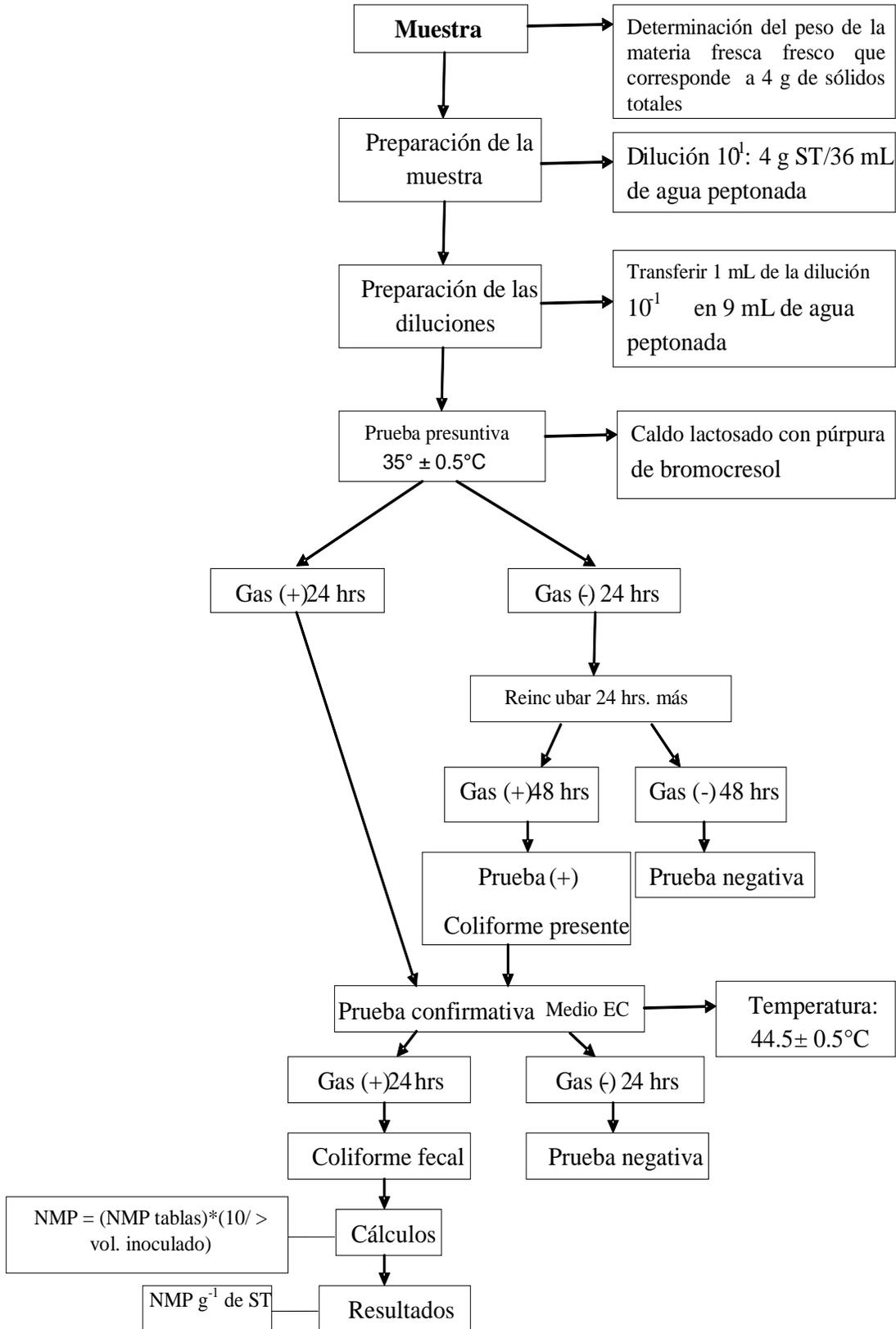
#### **3.4.1.3.6 Interpretación de resultados**

La densidad de los coliformes fecales se expresó como NMP de coliformes por g de materia seca o ST, el cual se obtuvo a partir del Cuadro 10, que incluye los límites de confianza al 95% para cada una de las combinaciones de tres series de tubos positivos posibles. Para su utilización se proporcionaron códigos formados por tres algoritmos correspondientes al número de tubos con resultados positivos en tres series consecutivas.

#### **3.4.1.3.7 Manejo de residuos**

El material usado con los microorganismos patógenos, primero fue esterilizado durante 15 minutos a 125°C en autoclave para evitar cualquier contaminación microbiológica y después fue lavado.

A continuación se presenta la Figura 2. Diagrama de la técnica para la cuantificación de los coliformes fecales.



**Figura 2. Diagrama de la técnica para la cuantificación de los coliformes fecales**

### 3.4.1.4 Técnica empleada para la cuantificación de metales pesados (Cu y Cd) en biosólidos

La técnica que se describe a continuación se realizó en el Laboratorio de Calidad del Agua del Centro Interamericano de Recursos del Agua (CIRA) dependencia de la Facultad de Ingeniería de la UAEM.

Las muestras se refrigeraron a 4 °C por un tiempo máximo de 6 meses (180 días).

#### 3.4.1.4.1 Preparación de los estándares en $\text{mg kg}^{-1}$ para la curva de calibración

Se utilizaron las soluciones estándares de Cu y Cd de 100 ml con  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  cada una y se fueron diluyendo en Ácido nítrico 0.5 M, hasta obtener la dilución deseada.

A continuación, se presentan la concentración de los estándares en  $\text{mg kg}^{-1}$  que se utilizaron para leer los metales pesados en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica.

Cuadro 11. Estándares para Cu y Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

$\text{mg kg}^{-1}$ de Cu	$\text{mg kg}^{-1}$ de Cd
0.1	0.01
0.2	0.05
0.5	0.1
1.0	0.5
2.0	1

#### 3.4.1.4.2 Digestión de la muestra en horno de microondas

A continuación, se presenta la técnica que se realizó para obtener la digestión de los biosólidos.

- a) Se secaron en la estufa 10 g de muestra durante 24 horas para quitarle la humedad y después se colocaron en el desecador.
- b) Se utilizaron los vasos de teflón del horno de microondas, se pesaron, se agregaron 0.5 g de las muestras mezcladas y molidas y se registró su peso. Se adicionaron 10 mL de ácido nítrico al 0.5 M bajo la campana de extracción y se colocaron sus accesorios (tapa+tapón). Se pesaron el vaso+tapa+tapón+muestra+ácido y se registraron nuevamente los pesos. Para que la digestión fuera más eficiente, se dejaron las muestras en los vasos con el ácido nítrico toda la noche.
- c) Al día siguiente se colocaron los vasos de teflón con su chaqueta de asbesto en el carrusel del horno de microondas y se programó la digestión. Sus variables fueron las siguientes: 10 minutos a 170°C y a una presión de 135 psi. Al término de la digestión se dejaron enfriar los vasos aproximadamente durante 2 horas. Se pesaron y registraron los pesos de cada vaso (vaso+tapa+tapón+muestra+ácido).
- d) Se agregó ácido nítrico al vaso de teflón enjuagándolo por las paredes y se aforó con ácido nítrico 0.5 M a 50 ml en un matraz filtrado con papel Whatman #40.

- e) Finalmente, se aguardó en un frasco de plástico para su lectura en absorción atómica.

#### 3.4.1.4.3 Análisis instrumental

- Se determinó Cd y Cu por aspiración directa flama-aire-acetileno, se conectó la lámpara de cátodo hueco o descarga sin electrodos y se encendió el equipo. Se seleccionó la longitud de onda y el ancho de banda espectral de acuerdo al metal que se analizó (ver Cuadro 12).

Cuadro 12. Relación de longitud y ancho de banda para los elementos analizados por flama

Elemento	Longitud de onda ( $\lambda$ )	Ancho de banda espectral (nm)
Cd	228.8	0.7
Cu	324.8	0.7

Fuente: SEMARNAT-2002

- Se alineó la lámpara vertical, horizontal y rotacionalmente, hasta obtener la máxima energía.
- Se esperaron 10 minutos para que se estabilizara el instrumento.
- Se ajustaron las condiciones de la flama aire-acetileno, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se encendió la flama y se dejó que el sistema alcanzará el equilibrio de temperatura.
- Se aspiró el blanco y ajustó el instrumento a cero.
- Se aspiraron cinco concentraciones ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), para que se realizará la curva de calibración y un blanco.

- Se procedió a analizar las muestras problema y las muestras control.

#### 3.4.1.4.4. Cálculos

Para la obtención de los  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu y Cd en biosólidos, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{mg kg}^{-1} = \text{mg kg}^{-1} * (d/m)*(d/v)$$

Donde:

$\text{mg kg}^{-1}$  = miligramos/kilogramo

d = densidad

m = peso de la muestra

v = alícuota

\* Multiplicación

A continuación, se muestra la Figura 3. Diagrama de la técnica para la cuantificación de los metales pesados Cu y Cd.

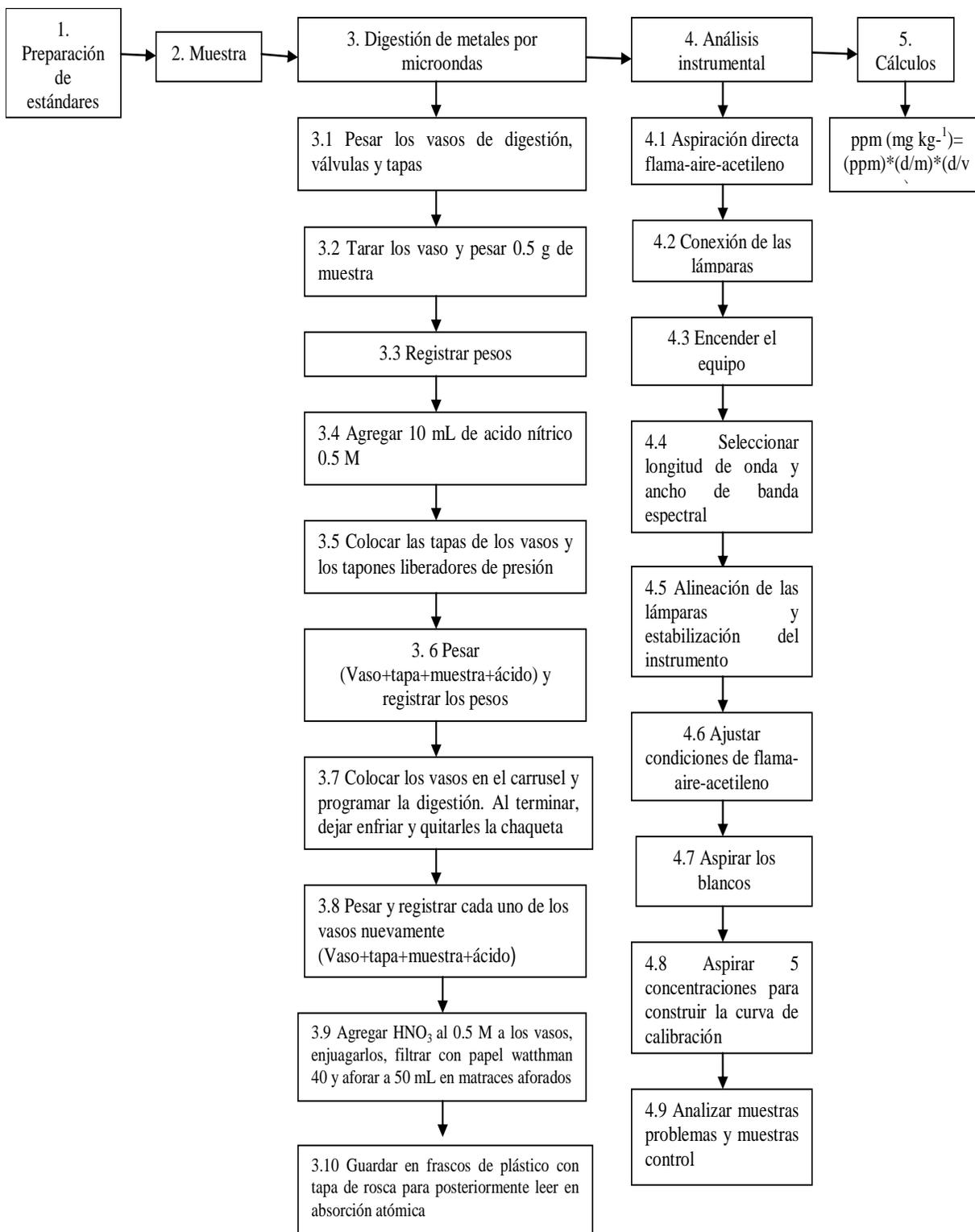


Figura 3. Diagrama de la técnica para la cuantificación de los metales pesados Cu y Cd

### 3.4.2 Fase 2: día 30

Esta segunda y última fase comenzó a realizarse el día viernes 24 de julio de 2009.

A continuación se mencionan los análisis que se realizaron en la segunda fase. Cabe señalar, que los análisis 1 y 2 se hicieron usando la misma metodología que se describe en la fase 1.

1. Cuantificación de los coliformes fecales
2. Concentración en  $\text{mg kg}^{-1}$  de los metales pesados Cu y Cd
3. Prevalencia de los coliformes fecales a los 30 días.
4. Evaluación de la resistencia de los coliformes fecales a los metales pesados Cu y Cd después de 30 días presentes de forma natural en suelo, biosólidos y suelo acondicionado con biosólidos.
5. Evaluación de la resistencia de los coliformes fecales a los metales pesados Cu y Cd agregados artificialmente en los medios de cultivo.
6. Resistencia de los coliformes fecales a los antibióticos
7. Análisis estadístico (paquete estadístico SAS)

Los resultados de la primera fase fueron comparados con la segunda para determinar:

- El porcentaje de reducción a los días 30.

- El incremento o decremento de la concentración en  $\text{mg kg}^{-1}$  de los metales pesados Cu y Cd entre los días 0 y 30.

#### **3.4.2.1 Prevalencia de los coliformes fecales a los 30 días**

Se realizó la comparación entre los resultados obtenidos en la cuantificación de los coliformes fecales de los días 0 y 30, para obtener si estas bacterias entéricas fueron capaces de prevalecer después de 30 días en el suelo agrícola y los biosólidos.

#### **3.4.2.2 Evaluación de la resistencia de los coliformes fecales al Cu y Cd después de 30 días**

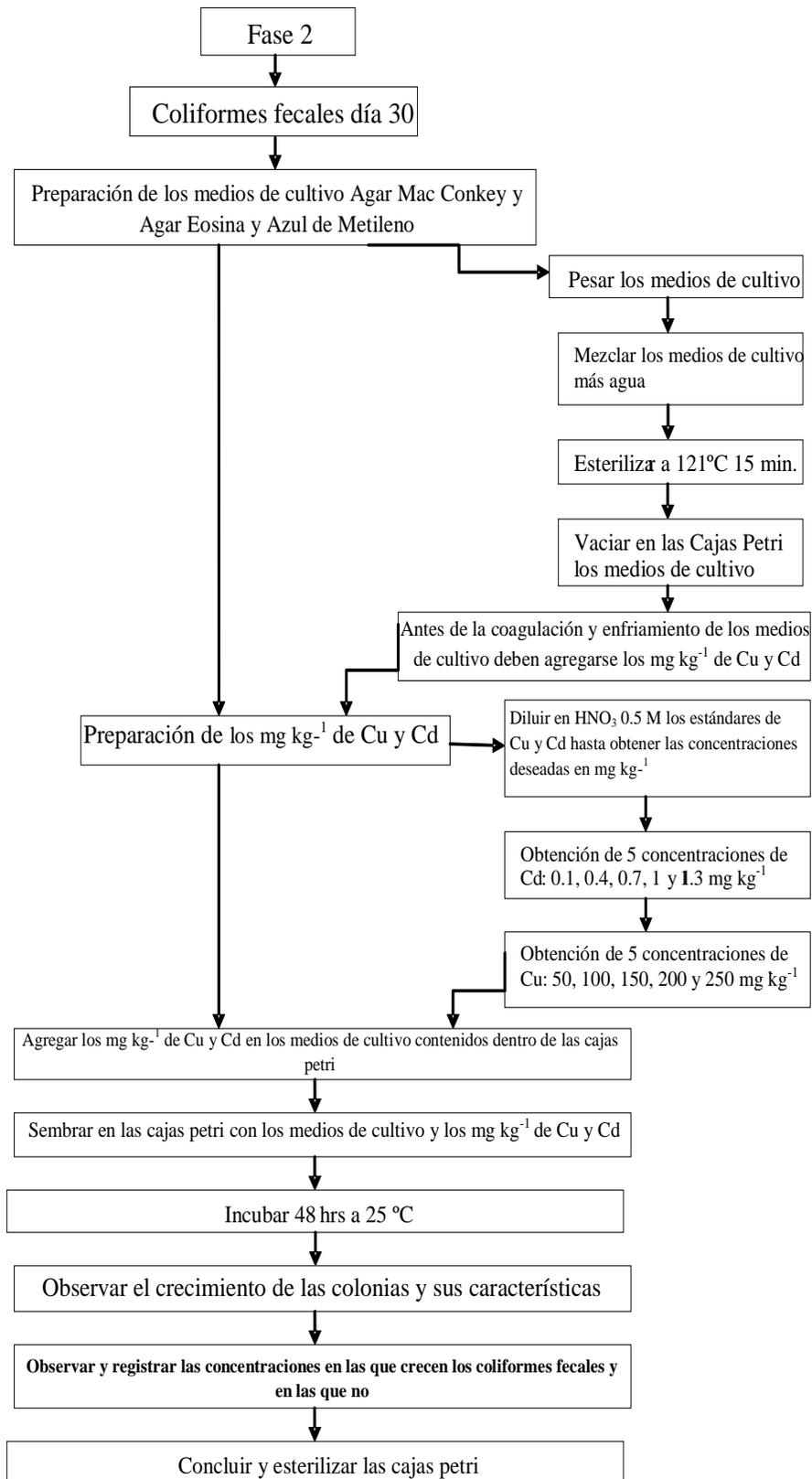
El objetivo de la evaluación fue conocer la concentración en  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu y Cd que los coliformes fecales son capaces de resistir.

Cabe señalar, que se utilizaron los tubos positivos con cultivos de coliformes fecales obtenidos del medio EC de la muestra del día 30 (Fase 2) de donde se obtuvo la cepa para incubar en las cajas Petri y medir la resistencia de estos microorganismos a los metales pesados. Se usaron los medios de cultivo Agar Mac Conkey (aislamiento e identificación de enterobacterias) y Agar Eosina y Azul de Metileno (Identificación y diferenciación de enterobacterias) para aislar los coliformes fecales en las cajas Petri.

Para este análisis, se utilizaron las soluciones estándar de Cu y Cd que se agregaron de forma artificial en los medios de cultivo contenidos dentro de las cajas Petri.

Las concentraciones utilizadas de Cd fueron de: 0.1, 0.4, 0.7, 1 y 1.3 mg kg<sup>-1</sup> y de Cu: 50, 100, 150, 200 y 250 mg kg<sup>-1</sup>.

En la Figura 4. Diagrama de la resistencia de los coliformes fecales al Cu y Cd agregados artificialmente a los medios de cultivo, se observa la técnica empleada en este análisis.



**Figura 4. Diagrama de la resistencia de los coliformes fecales al Cu y Cd agregados artificialmente a los medios de cultivo**

### **3.4.2.3 Evaluación de la resistencia de los coliformes fecales a los antibióticos**

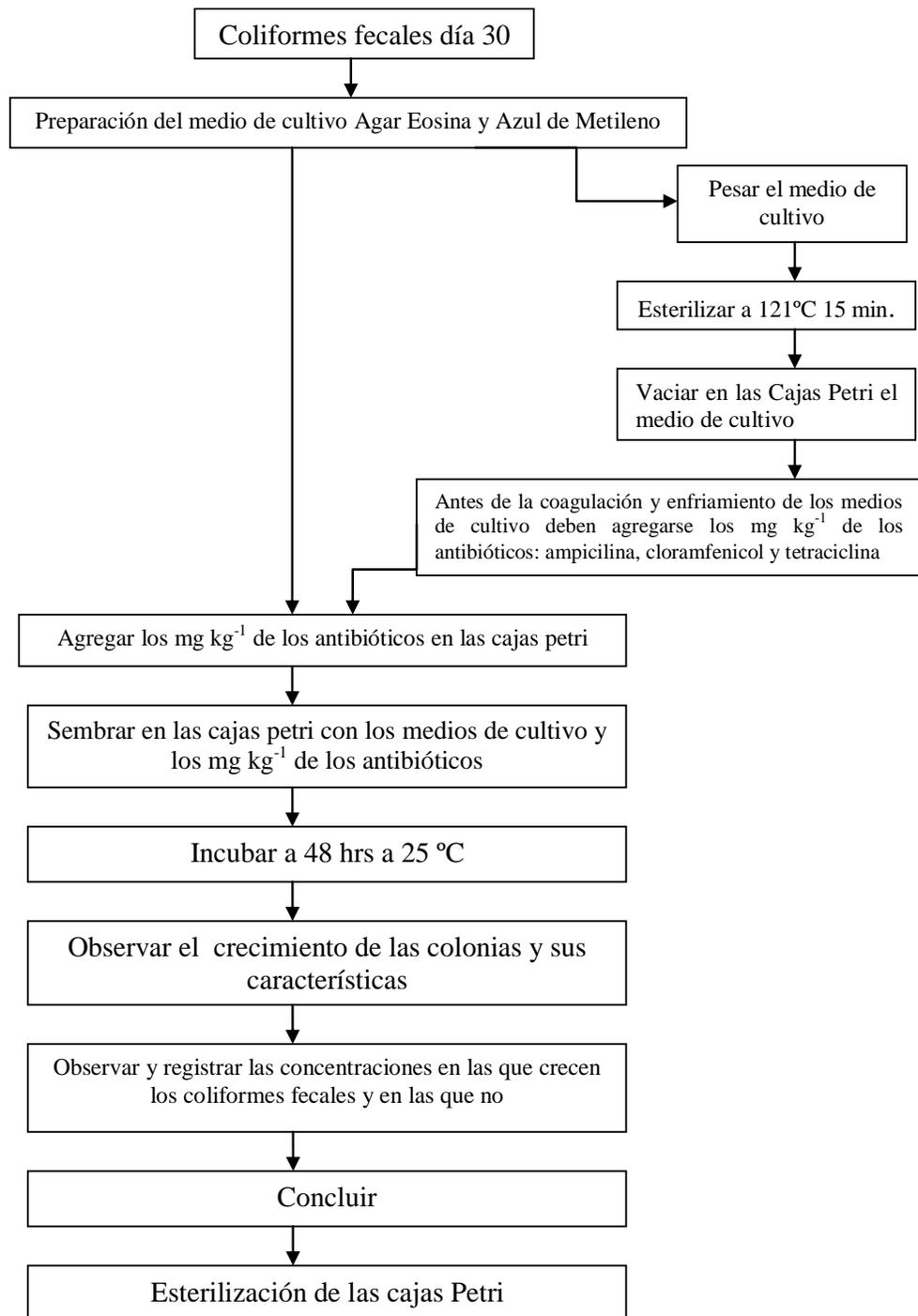
El objetivo principal de la evaluación fue determinar si la resistencia de los coliformes fecales a metales pesados aumenta la posibilidad de que las bacterias desarrollen la resistencia a los antibióticos y obtener la concentración en  $\text{mg kg}^{-1}$  de antibióticos que los coliformes fecales son capaces de resistir.

Cabe señalar, que se utilizaron los tubos positivos con cultivos de coliformes fecales obtenidos del medio EC de la muestra del día 30 (Fase 2) de donde se obtuvo la cepa para incubar en las cajas Petri y medir la resistencia de estos microorganismos a los antibióticos. Se usó el medio de cultivo Agar Eosina y Azul de Metileno (identificación y diferenciación de enterobacterias) para aislar los coliformes fecales resistentes en las cajas Petri.

Para este análisis, se utilizaron los antibióticos: tetraciclina, cloramfenicol y ampicilina que se agregaron de forma artificial en el agar contenido dentro de las cajas Petri.

Las concentraciones utilizadas de ampicilina fueron de: 10, 20, 30 y 50  $\text{mg kg}^{-1}$ , de cloramfenicol 5, 10, 20 y 50  $\text{mg kg}^{-1}$  y de tetraciclina 5, 10, 20 y 50  $\text{mg kg}^{-1}$ . Para cada antibiótico se utilizó un blanco que contenía solamente el medio de cultivo estéril.

A continuación se presenta la Figura 5. Diagrama de la resistencia de los coliformes fecales a los antibióticos.



**Figura 5. Diagrama de la resistencia de los coliformes fecales a los antibióticos**

#### **3.4.2.4 Análisis estadístico**

Se utilizaron las siguientes técnicas: análisis de varianza y comparación de medias de tratamientos con la prueba Tukey (DMSH) al nivel de significancia del 5%.

##### **3.4.2.4.1 Variables evaluadas**

Se realizaron 5 tratamientos con 3 repeticiones para establecer la concentración de coliformes fecales,  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cd y  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu, los días 0 y 30, para un total de 90 muestras. Las variables evaluadas fueron: Coliformes fecales día 0, Coliformes fecales día 30, Cd día 0, Cd día 30, Cu día 0 y Cu día 30.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización del suelo agrícola y los biosólidos

En el Cuadro 13 se observa que el suelo presentan un pH ácido de 5.74, 4.7% de materia orgánica, 51.8% de partículas finas, 17.12% de humedad, 48.41% de capacidad de campo y NMP g<sup>-1</sup> de sólidos totales de coliformes fecales de 1.1X10<sup>6</sup>. En la presente investigación se tuvo un pH ácido de 5.74, que es comparado con el mencionado por Valencia y Casado (2004) que obtuvieron un pH de moderadamente a fuertemente ácido; que se relaciona porque las muestras de suelo fueron tomadas del mismo lugar.

En cuanto a la concentración de coliformes fecales que fue de 1.1X10<sup>6</sup> g<sup>-1</sup> de sólidos totales mostrada en el Cuadro 13, se puede mencionar que posiblemente un factor importante que influyó en el desarrollo de los coliformes fecales fue el 51.8% de partículas finas del suelo, ya que en ellas se almacenaron nutrientes que los coliformes fecales utilizan como fuente de alimentación (Fuccz *et al.*, 2007).

Cuadro 13. Resultados de los análisis físico-químicos del suelo y los biosólidos.

Análisis	pH	Materia orgánica	Granulometría	% Humedad	Capacidad de campo	Coliformes fecales
Suelo	5.74	4.7	48.2% arena y 51.8% de limo + arcilla	17.12%	48.41%	NMP g <sup>-1</sup> ST = 1.1X10 <sup>6</sup>
Biosólidos	6.63	65.2	44.9% arena y 55.1% de limo + arcilla	40%	55.94%	NMP g <sup>-1</sup> ST= 4.3X10 <sup>6</sup>

Se puede observar que en el Cuadro 13, los biosólidos presentan un pH ácido de 6.63, 65.2% de materia orgánica, 55.1% de porcentaje de partículas finas, 40% de humedad,

55.94% de capacidad de campo y  $4.3 \times 10^6$  coliformes fecales  $\text{g}^{-1}$  de sólidos totales. El resultado mostrado en el Cuadro 13 de 65.2% de materia orgánica, pueden ser comparado con el obtenido por Beltrán (2006) de 55.2% de materia orgánica.

En los resultados de los biosólidos mostrados en el Cuadro 13, la concentración de coliformes fecales fue de  $1.1 \times 10^6$   $\text{g}^{-1}$  de sólidos totales, donde se puede mencionar que la concentración mostrada es baja, comparada con la obtenida por Jiménez (2002), que fue de  $2.3 \times 10^7$ - $9.3 \times 10^{10}$  coliformes fecales  $\text{g}^{-1}$  de sólidos totales. Cabe mencionar, que posiblemente el desarrollo de los coliformes fecales en los biosólidos se vio favorecido por el 65.2% de materia orgánica presente.

## **4.2 Coliformes fecales a los días 0 y 30.**

Como se observa en el Cuadro 14, en los 5 tratamientos, los resultados de la concentración de coliformes fecales por g de sólidos desde el día 0 al día 30 disminuyen trascendentalmente. El tratamiento 1 tuvo una reducción del 99.54%, el tratamiento 2 disminuyó hasta 99.66%, el tratamiento 3 a 99.87%, el tratamiento 4 a 98.51% y el tratamiento 5 a 99.46% durante los 30 días que duró el experimento. Estos resultados nos indican que hubo pérdidas significativas en los 5 tratamientos, donde el promedio de reducción de los coliformes fecales fue de 99.60% después de 30 días de tratamiento. El porcentaje de reducción obtenido en los 5 tratamientos de la presente investigación es comparado con el que obtuvo Fuccz *et al.* (2007), ya que menciona que el tratamiento que presentó mayor disminución en la concentración de coliformes fecales tuvo un porcentaje de reducción de 78.5% y este puede ser utilizado para la restauración de áreas disturbadas. La técnica utilizada para obtener el porcentaje de reducción de los coliformes fecales en la presente investigación, se determinó por el porcentaje de reducción entre muestreos y el porcentaje final comparado con la concentración inicial (Fuccz *et al.*, 2007).

Cuadro 14. Resultados de los análisis microbiológicos (NMP g<sup>-1</sup> de sólidos totales de coliformes fecales) y pH a los días 0 y 30 de los tratamientos.

Número de tratamientos	Tratamientos	NMP g <sup>-1</sup> ST de Coliformes fecales día 0	pH día 0	NMP g <sup>-1</sup> ST de Coliformes fecales día 30	pH día 30
1	Suelo	1.10X10 <sup>6</sup>	5.74	5X10 <sup>3</sup>	6.12
2	Biosólidos	4.30X10 <sup>6</sup>	6.63	1.43X10 <sup>4</sup>	6.07
3	Suelo+Biosólidos	4.46X10 <sup>6</sup>	6.18	5.36X10 <sup>3</sup>	6.93
4	*Suelo+Biosólidos+Cd	2.96X10 <sup>6</sup>	5.24	1.43X10 <sup>4</sup>	5.55
5	*Suelo+Biosólidos+Cu	2.43X10 <sup>6</sup>	5.78	1.30X10 <sup>4</sup>	5.9

\*En los tratamientos 4 y 5 se adicionó de manera artificial 4.61 ml de cadmio y 10 ml de cobre, respectivamente.

En los tratamientos 1.Suelo y 3.Suelo+Biosólidos, se mostró que las concentraciones a los días 0 y 30 fueron las siguientes: 1.10X10<sup>6</sup>-5X10<sup>3</sup> y 4.46X10<sup>6</sup>-5.36X10<sup>3</sup>, respectivamente. Como se puede observar se muestra una reducción similar en los 2 tratamientos. Sun *et al.*, (2006), mencionan que realizaron un experimento de incubación donde los coliformes fecales fueron contados en suelos tratados con biosólidos y decrecieron substancialmente debido a 2 principales factores que fueron: el tipo de biosólidos (de origen municipal-industrial) y el tiempo de incubación. El tipo de biosólidos determinó el decremento de los coliformes fecales en el suelo y la habilidad de éstos para restablecerse, y los microorganismos nativos compitieron con los coliformes fecales por nutrientes durante el proceso de incubación. Además mencionan que hubo una reducción de los coliformes fecales cuando los biosólidos se aplicaron en fresco sobre el suelo.

En el tratamiento 1.Suelo, la reducción en la concentración de los coliformes fecales de los días 0 y 30, probablemente se debió a que dicho tratamiento tuvo contacto directo en

algunas ocasiones con la luz solar comparada con el resto de los tratamientos y en el tratamiento 3.Suelo+Biosólidos, la reducción de los coliformes fecales se debió a 3 factores: el tipo de biosólidos con el que se acondicionó el suelo fue de origen municipal-industrial, los microorganismos nativos del suelo compitieron con los coliformes fecales de los biosólidos por los nutrientes y que los biosólidos se aplicaron en fresco sobre suelo.

En los tratamientos 2.Biosólidos, 4.Suelo+Biosólidos+Cd y 5.Suelo+Biosólidos+Cu, las concentraciones de los coliformes fecales a los días 0 y 30 fueron las siguientes:  $4.30 \times 10^6$ - $1.43 \times 10^4$ ,  $2.96 \times 10^6$ - $1.43 \times 10^4$  y  $2.43 \times 10^6$ - $1.30 \times 10^4$ , respectivamente. Un factor importante en la prevalencia de los coliformes fecales en los 3 tratamientos, es que los coliformes fecales requieren condiciones mínimas de humedad (5.81%) para su crecimiento y supervivencia; y se mencionó anteriormente, que se realizaron 3 riegos a los tratamientos, lo que incrementó la humedad además el suelo acondicionado con biosólidos contuvo una importante cantidad de partículas finas del suelo. Por lo tanto factores como: condiciones mínimas de humedad (5.81%) y las partículas finas del suelo intervinieron en la baja disminución de los coliformes fecales; esto se relaciona con los estudios que hizo Fuccz *et al.*, (2007), donde mencionó que las partículas finas de suelo pueden incrementar la supervivencia bacteriana ya que se asocian con la habilidad para retener nutrientes y la humedad influye en la supervivencia de los coliformes destacando que generalmente los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad (5.81%) para su crecimiento.

Como se mencionó, en los tratamientos 4 y 5 se agregaron de forma artificial 4.61 ml de Cd y 10 ml de Cu respectivamente, esto con el objetivo de observar la reacción de los coliformes fecales, en la cual se obtuvo que éstas bacterias entéricas al día 0 prevalecieron en concentraciones similares que en los 5 tratamientos y al día 30 su concentración por g de sólidos totales fue de las más altas junto con el tratamiento 2. Biosólidos. Por lo tanto se concluye que los coliformes fecales se pueden adaptar a condiciones de pH ácidas sin que afecte significativamente su crecimiento y desarrollo. La NOM-004-SEMARNAT-2002 señala que los coliformes fecales son capaces de acidificar su medio y Fuccz *et al.* (2007) señala que la influencia del pH del medio en los coliformes fecales influye en la adaptación a condiciones ácidas o básicas.

Los 5 tratamientos al día 30, de acuerdo al Cuadro 3. Límites máximos permisibles para patógenos y parásitos en lodos y biosólidos, indican que son clase C, ya que presentan una concentración > de 2 000 000 de coliformes fecales g<sup>-1</sup> de sólidos totales (SEMARNAT-2002).

### 4.3 Cadmio y cobre a los días 0 y 30.

Como se observa en el Cuadro 15, las concentraciones de Cd al día 0 en los 5 tratamientos fueron entre 3.23-5.56 mg kg<sup>-1</sup> de Cd y al día 30 estuvieron entre 2.36- 3.13 mg kg<sup>-1</sup> de Cd, lo que significa que estas concentraciones disminuyeron al paso de los 30 días de tratamiento. Podemos observar que en el tratamiento 2.Biosólidos, se encontró la concentración más alta en los 30 días que duró la investigación de 5.56-3.13 mg kg<sup>-1</sup>. Comparando los resultados mostrados en el Cuadro 15 con los de Álvarez (2004), menciona que sus resultados fueron variables en los tratamientos durante la incubación, por la influencia de factores como: suelo, tiempo de incubación y dosis. Las concentraciones al día cero en el suelo y biosólidos fueron de 0.06 mg kg<sup>-1</sup> para ambos y al día 30 en suelo fueron de 0.03 y en biosólidos 0.04 mg kg<sup>-1</sup> de Cd, lo que indica que sus concentraciones disminuyeron (Álvarez, 2004). Lo mismo ocurrió en los 5 tratamientos de la presente investigación; en el día 0 concentraciones de 3.23-5.56 mg kg<sup>-1</sup> de Cd y al día 30 de 2.36- 3.13 mg kg<sup>-1</sup>.

Cuadro 15. Resultados de las concentraciones en mg kg<sup>-1</sup> de los metales pesados Cd y Cu a los días 0 y 30 de los tratamientos.

Número de tratamientos	Muestra	DÍA 0	DÍA 30	DÍA 0	DÍA 30
		Metales pesados mgkg <sup>-1</sup> Cd	Metales pesados mgkg <sup>-1</sup> Cd	Metales pesados mgkg <sup>-1</sup> Cu	Metales pesados mgkg <sup>-1</sup> Cu
1	Suelo	3.23	2.36	11.93	18.13
2	Biosólidos	5.56	3.13	170.30	197.85
3	Suelo+Biosólidos	3.70	2.70	22.70	26.43
4	Suelo+Biosólidos+Cd	4.61	2.69	22.72	26.52
5	Suelo+Biosólidos+Cu	3.71	2.50	72.55	81.10

En el Cuadro 15, los  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu en los 5 tratamientos incrementaron al día 30 en comparación con el día cero. En los resultados obtenidos al día 0 las concentraciones oscilaron entre 11.93-170.30  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu y al día 30 fueron de 18.13-197.85  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu. De igual forma que en las concentraciones obtenidas de Cd, las mayores concentraciones de Cu se registraron en el tratamiento 2.Biosólidos. La conclusión que se obtuvo del incremento de las concentraciones de Cu al día 30 fue comparada con la que obtuvo Álvarez (2004), donde demostró que las diferencias significativas de las concentraciones de Cu se debieron a la influencia de factores como: suelo, tiempo de incubación y dosis. Las concentraciones de Cu que obtuvo su estudio al día cero en el suelo y biosólidos fueron de 6.5 y 7  $\text{mg kg}^{-1}$  respectivamente, al día 30 en el suelo fueron de 7 y en biosólidos 8  $\text{mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Podemos observar que las concentraciones obtenidas por Álvarez (2004), no son estables, pues al día 30 incrementan y en la investigación realizada la variación en los resultados es similar, ya que al día 0 las concentraciones oscilaron entre 11.93-170.30  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu y al día 30 fueron de 18.13-197.85  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu, que nos indica que incrementaron.

Los 5 tratamientos al día 30, de acuerdo al Cuadro 4. Límites máximos permisibles de metales en lodos y biosólidos, se clasifican como Excelentes, ya que presentan una concentración  $>$  de 39  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cd y una concentración  $>$  de 1 500  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu (SEMARNAT-2002).

#### **4.4 Resistencia de los coliformes fecales al Cd en los tratamientos**

Como se observa en los Cuadros 14 y 15 después de 30 días, los coliformes fecales resistieron concentraciones de 2.36-3.13 mg kg<sup>-1</sup> de Cd en suelo, biosólidos, suelo+biosólidos, suelo+biosólidos+Cd y suelo+biosólidos+Cu. Las concentraciones anteriores estuvieron presentes en los tratamientos mencionados, es decir no hubo intervención antrópica. Como se observa en el Cuadro 15, las concentraciones de Cd fueron de 2.36-3.13 mg kg<sup>-1</sup> que los coliformes fecales resistieron después de 30 días.

Ortiz *et al* (1999), señala que en el suelo las concentraciones de Cd se presentan entre 0.3-0.6 mg kg<sup>-1</sup> y en biosólidos 3.28 mg kg<sup>-1</sup>, resultados que son comparados con los mostrados en el Cuadro 15, donde el tratamiento 1.Suelo presentó una concentración de 2.36 mg kg<sup>-1</sup> y el tratamiento 2.Biosólidos presentó una concentración de 3.13 mg kg<sup>-1</sup> de Cd.

#### **4.5 Resistencia de los coliformes fecales al Cu presente en los tratamientos**

De acuerdo a los resultados mostrados en los Cuadros 14 y 15, después de 30 días los coliformes fecales resistieron concentraciones de 18.13-197.85 mg kg<sup>-1</sup> de Cu suelo, biosólidos, suelo+biosólidos, suelo+biosólidos+Cd y suelo+biosólidos+Cu. Cabe señalar, que estas concentraciones de Cu se presentaron en los 5 tratamientos. Harrison (2009), menciona que la biomasa microbiana del suelo es reducida por las concentraciones de Cu que oscilan entre 70-384 mg kg<sup>-1</sup> y las concentraciones mostradas en el Cuadro 15 están

por debajo de sus rangos, lo que nos indica que la biomasa microbiana y entre ella los coliformes fecales se adaptaron a estas concentraciones.

Ortiz *et al* (1999), menciona que en suelo las concentraciones de Cu se presentan en 53 mg kg<sup>-1</sup> y en biosólidos 335 mg kg<sup>-1</sup> y las concentraciones mostradas en el Cuadro 15 al día 30, en el tratamiento 1.Suelo fueron de 11.93-18.13 mg kg<sup>-1</sup> y en el tratamiento 2.Biosólidos fueron de 170.30-197.85 mg kg<sup>-1</sup>, lo que nos indica que los resultados obtenidos en la presente investigación estuvieron por debajo de las concentraciones mostradas por Ortiz *et al* (1999).

#### **4.6 Prevalencia de los coliformes fecales después de 30 días**

Con los resultados obtenidos del Cuadro 14, podemos observar que los coliformes fecales prevalecen en el suelo, biosólidos y suelo acondicionado con biosólidos después de 30 días. Cabe mencionar, que las concentraciones al día 0, fueron desde 1.1X10<sup>6</sup> a 4.46X10<sup>6</sup> coliformes fecales g<sup>-1</sup> sólidos totales, ya que tuvieron condiciones ideales de crecimiento y al día 30 sus concentraciones fueron desde 5X10<sup>3</sup> a 1.43X10<sup>4</sup> coliformes fecales g<sup>-1</sup> sólidos totales, lo que significa que disminuyeron significativamente pero no desaparecieron. Es decir, que los coliformes fecales prevalecieron en los tratamientos después de 30 días.

Como se menciono anteriormente, los tratamientos de la presente investigación estuvieron bajo la protección de condiciones climáticas en el invernadero número 3 de la Facultad de Ciencias Agrícolas, lo cual contribuyó a que estos microorganismos prevalecieran. Como menciona Fuccz *et al.*, (2007), los factores que más inciden en la persistencia de las bacterias en el suelo son la humedad y la temperatura. Además, partículas finas de suelo

pueden incrementar la supervivencia bacteriana ya que se asocian a la habilidad para retener nutrientes (Fuccz *et al.*, 2007).

Fuccz *et al.*, (2007), menciona que la radiación solar, temperatura ambiente, el porcentaje de humedad y precipitación influyen significativamente en la reducción de coliformes fecales, por lo tanto en los resultados del experimento ayudó a que los tratamientos fueron protegidos de las condiciones climáticas antes mencionadas lo que nos indica que por estas razones la concentración de coliformes fecales después de 30 días no desapareció.

#### **4.7 Resistencia de los coliformes fecales a Cd y Cu agregados artificialmente**

Por la naturaleza del cadmio como metal pesado, las colonias de coliformes fecales solo resistieron hasta  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ . Las concentraciones en  $\text{mg kg}^{-1}$  a las que fueron sometidos a prueba los coliformes fecales fueron: 0.1, 0.4, 0.7, 1 y  $1.3 \text{ mg kg}^{-1}$ . A concentraciones superiores a  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ , los coliformes fecales ya no crecieron ni en el Agar Mac Conkey ni en el Agar Eosina y Azul de Metileno presente en las cajas Petri.

Las colonias de coliformes fecales crecieron y se desarrollaron en las cajas Petri con los medios de cultivo Agar Mac Conkey y Agar Eosina y Azul de Metileno resistiendo hasta  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu agregado artificialmente. Las concentraciones a las que fueron sometidos a prueba los coliformes fecales fueron: 50, 100, 150, 200 y  $250 \text{ mg kg}^{-1}$ . Estas bacterias entéricas ya no presentaron ningún tipo de crecimiento en la concentración de  $250 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Cardhona (2004), menciona que las cepas de coliformes fecales pueden resistir al zinc y al cobre a la mayor concentración probada  $250 \text{ mg kg}^{-1}$ , varias cepas (23.4%) eran resistentes al mercurio a  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  y al cadmio a  $0.8-1.0 \text{ mg kg}^{-1}$ . Estos resultados coinciden con trabajos anteriores que indican que en bacterias patógenas la resistencia a antibióticos suele ir asociada a la resistencia a metales pesados.

#### **4.8 Resistencia de los coliformes fecales a los antibióticos**

Los coliformes fecales presentaron resistencia a los antibióticos ampicilina  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ , de cloramfenicol  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  y no toleraron ninguna concentración de tetraciclina. Estos resultados pueden ser comparados con los de Castillo *et al.*, (2007), donde los coliformes fecales fueron capaces de resistir concentraciones de:  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de Ampicilina,  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cloramfenicol y  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de Tetraciclina.

Las concentraciones utilizadas de ampicilina fueron de 10, 20, 30 y  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  y los coliformes fecales crecieron y se desarrollaron adecuadamente, de cloramfenicol 5, 10, 20 y  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  y los microorganismos solo pudieron crecer y desarrollarse en concentraciones de  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  y de tetraciclina 5, 10, 20 y  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  y cabe destacar que en este antibiótico no hubo ningún crecimiento microbiano. Para cada antibiótico se utilizó un blanco en los cuales se observó el crecimiento de los coliformes fecales entre ellos *Escherichia coli*.

## 4.9 Análisis estadístico

### 4.9.1 Comparación de medias

Cuadro 16. Comparación de medias de 6 variables evaluadas por Tukey

Número de tratamiento	Tratamientos	Coliformes fecales día 0	Coliformes fecales día 30	Cd día 0	Cd día 30	Cu día 0	Cu día 30
1	Suelo	1100000 a	5000 b	3.23 a	2.36 a	11.93 c	18.13 b
2	Biosólidos	4300000 a	14333 a	5.56 a	3.13 a	170.30 a	197.85 a
3	Suelo+Biosólidos	4466667 a	5367 b	3.70 a	2.70 a	22.70 b	26.43 b
4	Suelo+Biosólidos+Cd	2966667 a	14333 a	3.60 a	2.69 a	22.72 b	26.52 b
5	Suelo+Biosólidos+Cu	2433333 a	13000 a	3.71 a	2.71 a	20.88 b	26.45 b

\* Las medias con la misma letra no difieren estadísticamente.

En el Cuadro 16, se observa que en las variables NMP  $g^{-1}$  de sólidos totales de coliformes fecales día 0, concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cd día 0 y concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cd día 30 no mostraron diferencias estadísticas significativas y las variables NMP  $g^{-1}$  de sólidos totales de coliformes fecales día 30 concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cu día cero y concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cu día 30 mostraron diferencias significativas.

En el tratamiento 1.Suelo, para la comparación de las variables de NMP  $g^{-1}$  de sólidos totales de coliformes fecales al día 0 y NMP  $g^{-1}$  de sólidos totales de coliformes fecales día 30 se mostró que hubo diferencia significativa. En las variables concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cd día 0 y concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cd día 30 se mostró que no hubo diferencia significativa y en las variables concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cu día 0 y concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cu día 30 se mostraron diferencias significativas.

En el tratamiento 2.Biosólidos, en ninguna de las 6 variables se mostraron diferencias significativas.

En el tratamiento 3.Suelo+Biosólidos, para la comparación de las variables de NMP  $g^{-1}$  de sólidos totales de coliformes fecales al día 0 y NMP  $g^{-1}$  de sólidos totales de coliformes fecales día 30 se mostró que hubo diferencias significativas. En las variables concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cd día 0 y concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cd día 30 se mostró que no hubo diferencias significativas y en las variables concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cu día 0 y concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cu día 30 se mostraron diferencias significativas.

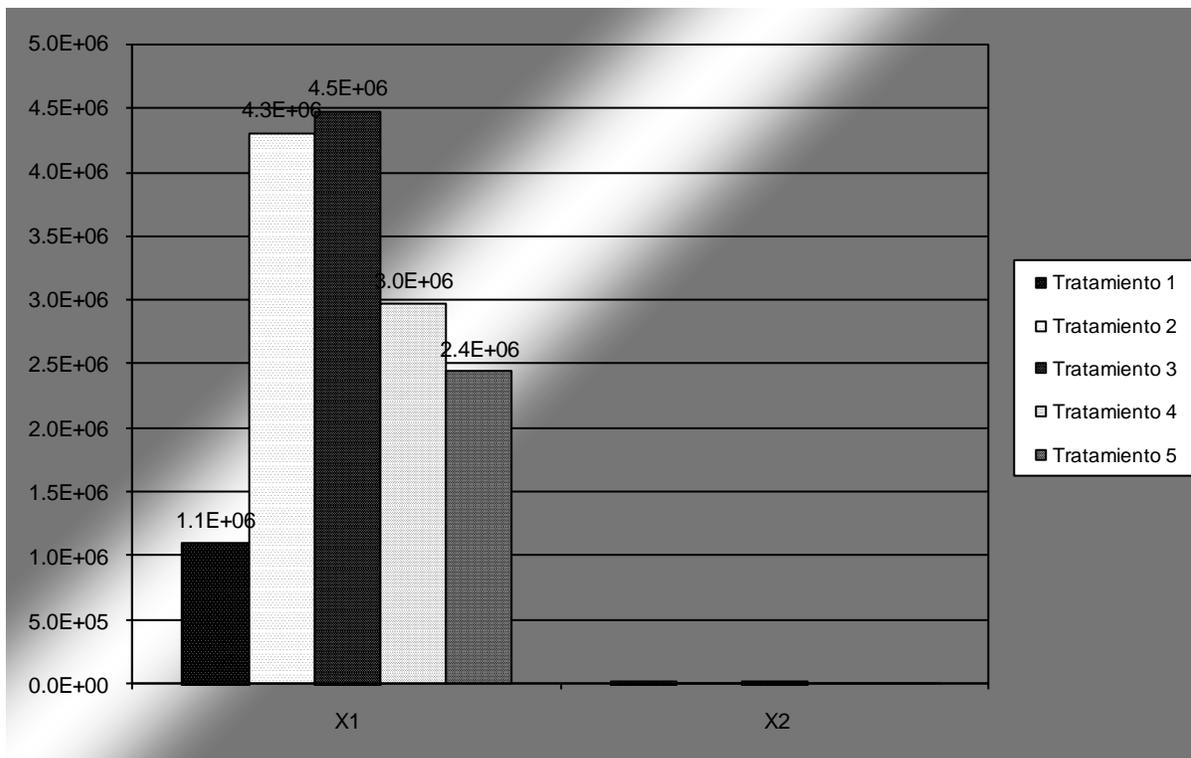
En el tratamiento 4.Suelo+Biosólidos+Cd, para la comparación de las variables de NMP  $g^{-1}$  de sólidos totales de coliformes fecales al día 0 y NMP  $g^{-1}$  de sólidos totales de coliformes fecales día 30 se mostró que no hubo diferencias significativas. En las variables concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cd día 0 y concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cd día 30 se mostró que no hubo diferencias significativas y en las variables concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cu día 0 y concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cu día 30 se mostraron diferencias significativas.

En el tratamiento 5.Suelo+Biosólidos+Cu, para la comparación de las variables de NMP  $g^{-1}$  de sólidos totales de coliformes fecales al día 0 y NMP  $g^{-1}$  de sólidos totales de coliformes fecales día 30 se mostró que no hubo diferencias significativas. En las variables concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cd día 0 y concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cd día 30 se mostró que no hubo diferencias significativas y en las variables concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cu día 0 y concentración en  $mg\ kg^{-1}$  de Cu día 30 se mostraron diferencias significativas.

Para los tratamientos 1.Suelo y 3.Suelo+Biosólidos respectivamente, mostrados en el Cuadro 16. Comparación de medias, se mostraron diferencias significativas, ya que hubo una importante reducción en la concentración de coliformes fecales entre los días 0 y 30. Los resultados obtenidos en la presente investigación son comparados con los obtenidos por Sun *et al.*, (2006), que mencionan que en su experimento de incubación hubo decrementos en la cantidad de coliformes fecales, debido a 2 factores que fueron: el tipo de biosólido (municipal-industrial) y el tiempo de incubación. Además mencionan que cuando se acondicionó el suelo agrícola con biosólidos frescos, hubo una reducción en la concentración de los coliformes fecales.

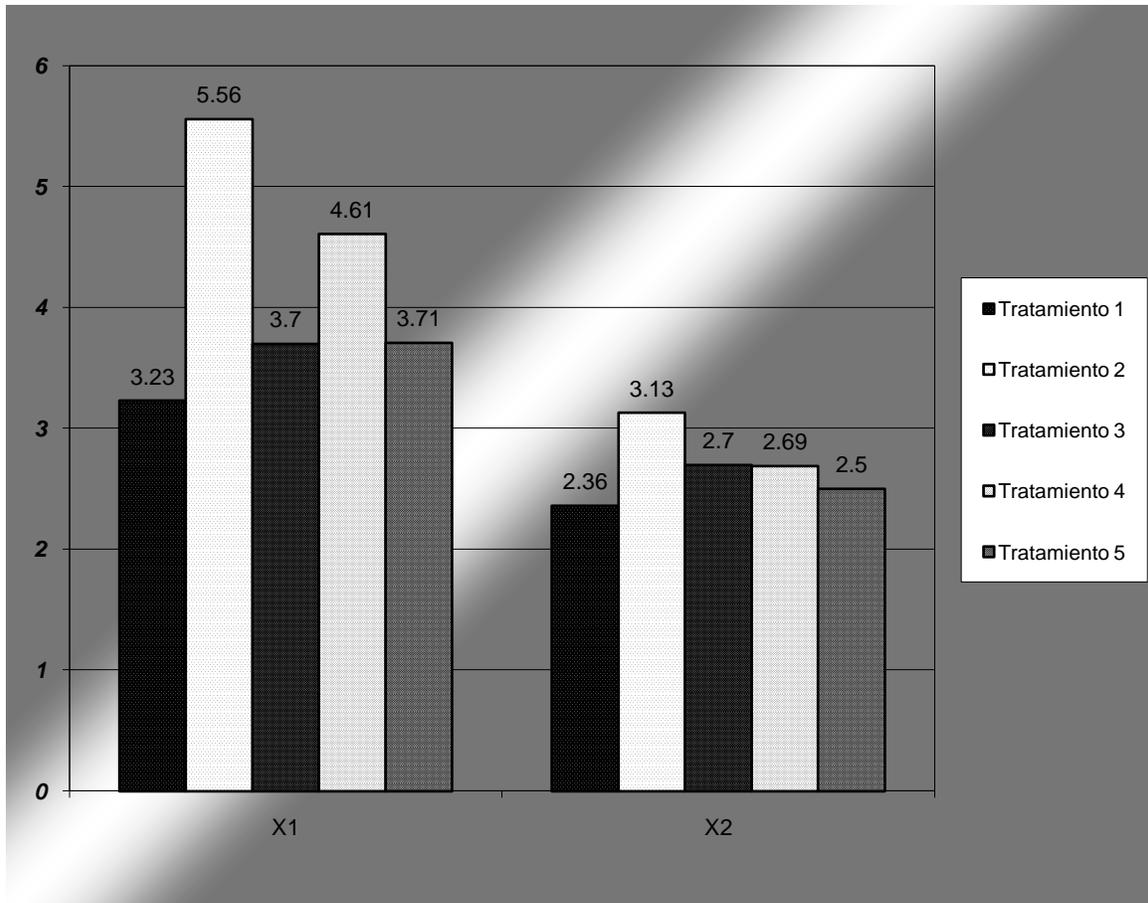
En los tratamientos 2.Biosólidos, 4.Suelo+Biosólidos+Cd y 5.Suelo+Biosólidos+Cu, se mostró que no hubo diferencias significativas, ya que no hubo una importante reducción en la concentración de los coliformes fecales entre los días 0 y 30. Como se mencionó anteriormente, se realizaron 3 riegos a los tratamientos, lo que provocó humedad y el suelo acondicionado con biosólidos contuvo un importante porcentaje de partículas finas; por lo tanto factores como: humedad y un importante porcentaje de partículas finas intervinieron en la baja tasa de disminución de los coliformes fecales; esto se relaciona con los estudios que hizo Fuccz *et al.*, (2007), donde mencionó que factores como el tipo de suelo también influyen en la supervivencia de las bacterias coliformes fecales por que las partículas finas de suelo pueden incrementar la supervivencia bacteriana por que se asocian con la habilidad para retener nutrientes y la humedad es uno de los factores que más incide en la persistencia de las bacterias en el suelo.

Los resultados de la comparación de medias indican que se acepta la hipótesis inicial, debido a que las concentraciones de Cd no afectaron el número de coliformes fecales en los tratamientos y la concentración de Cu, si afectó la cantidad de coliformes fecales en dichos tratamientos.



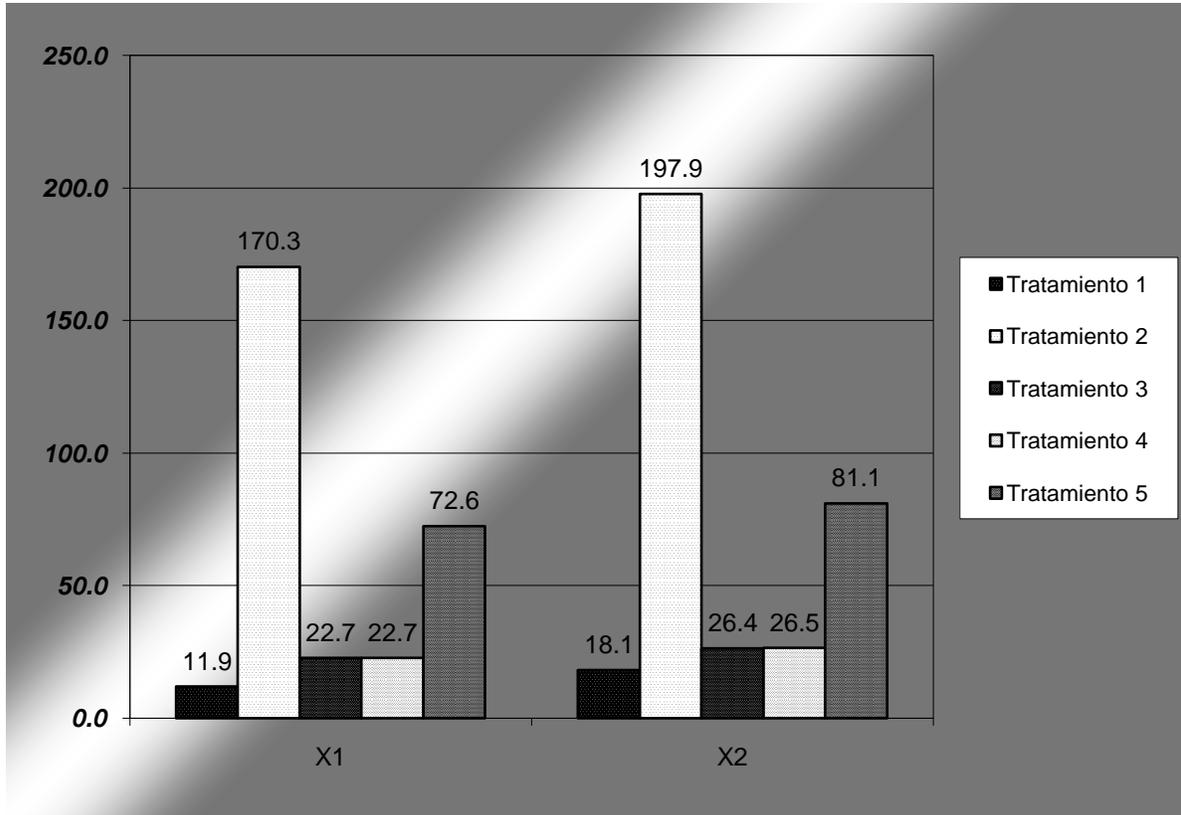
**Figura 6. Comparación de las medias para las variables X1 y X2 NMP g<sup>-1</sup> de sólidos totales de coliformes fecales entre los días 0 y 30.**

Como se observa en la Figura 6, la concentración de coliformes fecales en NMP g<sup>-1</sup> de sólidos totales en los análisis microbiológicos realizados al día cero se presenta en mayor cantidad en rangos entre  $1.10 \times 10^6$  y  $4.46 \times 10^6$  y en el día 30 la concentración de estos microorganismos patógenos se reduce considerablemente hasta rangos de  $5 \times 10^3$  y  $1.43 \times 10^4$ .



**Figura 7. Comparación de las medias para las variables concentración en  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cd entre los días 0 y 30**

Las concentraciones en  $\text{mg kg}^{-1}$  de cadmio mostradas en la Figura 7, se presentaron en mayor cantidad al día 0 entre rangos de  $3.23\text{-}5.56 \text{ mg kg}^{-1}$  y al día 30 concentraciones de  $2.36\text{-}3.13 \text{ mg kg}^{-1}$ , lo cual significa que en los 5 tratamientos se reduce la concentración de cadmio a través de los días.



**Figura 8. Comparación de las medias para las variables concentración en  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu entre los días 0 y 30**

De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 8, se observa que la concentración de Cu al día cero estuvo en rangos de  $11.93\text{-}170.33 \text{ mg kg}^{-1}$  y al día 30 fue de  $18.13\text{-}197.85 \text{ mg kg}^{-1}$  en los 5 tratamientos, lo que nos indicó que estas concentraciones incrementaron al paso de los días; presentándose la mayor concentración en el tratamiento Biosólidos de  $170.3 \text{ mg kg}^{-1}$  y  $197.8 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu, a los días 0 y 30 respectivamente y la menor concentración en el tratamiento suelo con concentraciones de  $11.9$  y  $18.1 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu a los días 0 y 30 respectivamente.

#### 4.9.2 Análisis de correlación para variables

Cuadro 17. Análisis de correlación para variables

	<b>Coliformes fecales día 0</b>	<b>Coliformes fecales día 30</b>	<b>Cd día 0</b>	<b>Cd día 30</b>	<b>Cu día 0</b>	<b>Cu día 30</b>
<b>Coliformes fecales día 0</b>	1.00000	0.11586 0.6809	0.49861 0.0585	0.36491 0.1811	0.47260 0.0752	0.46304 0.0822
<b>Coliformes fecales día 30</b>		1.00000	0.46231 0.0827	0.24101 0.3869	0.46300 0.0822	0.45091 0.0916
<b>Cd día 0</b>			1.00000	0.47637 0.0726	0.80630** 0.0003	0.80780** 0.0003
<b>Cd día 30</b>				1.00000	0.22870 0.4123	0.24624 0.3763
<b>Cu día 0</b>					1.00000	0.99790** < 0.0001
<b>Cu día 30</b>						1.00000

\*\* Correlación altamente positiva.

En el Cuadro 17 se observa la matriz de correlación entre las variables que se estudiaron, en donde se encontró existe una correlación positiva entre las variables  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cd día 0 y  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu día 0, esto sugiere que los niveles de Cu y Cd en el día 0 son altos.

Entre las variables  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cd día 0 y  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu día 30, presentaron una correlación positiva significativa, indicando que al incrementarse el número de días, los niveles de Cd disminuyen. Para las variables  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu día 0 y  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu día 30 también presentaron una correlación positiva alta, en donde al incrementarse el número de días se redujo el nivel de Cd.

## V. CONCLUSIONES

- La concentración de coliformes fecales en los 5 tratamientos al día 0 fueron de  $1.10 \times 10^6$  a  $4.46 \times 10^6$  y al día 30 fueron de  $5 \times 10^3$  a  $1.43 \times 10^4$  coliformes fecales  $g^{-1}$  sólidos totales. Las concentraciones de Cd al día 0 fueron de 3.23-5.56  $mg\ kg^{-1}$  y de Cd al día 30 fueron de 2.36-3.13  $mg\ kg^{-1}$  y de Cu al día 0 de 11.93-170.30  $mg\ kg^{-1}$  y al día 30 de 18.13-197.85  $mg\ kg^{-1}$  en los 5 tratamientos.
- Los biosólidos de la Macroplanta Toluca Norte después de 30 días de investigación fueron clasificados por el NMP  $g^{-1}$  de sólidos totales de coliformes fecales =  $5.36 \times 10^3$ ,  $mg\ kg^{-1}$  de Cu = 2.70,  $mg\ kg^{-1}$  de Cd = 26.43, como tipo excelente o bueno, clase C y su aprovechamiento se recomienda a: usos urbanos sin contacto público directo durante su aplicación, usos forestales, mejoramientos de suelos y usos agrícolas, de acuerdo a la NOM-004-SEMARNAT-2002.
- Los coliformes fecales prevalecen en suelo agrícola, biosólidos y suelo agrícola acondicionado con biosólidos después de 30 días en concentraciones de  $5 \times 10^3$  a  $1.43 \times 10^4$  coliformes fecales  $g^{-1}$  sólidos totales.
- Los coliformes fecales resistieron concentraciones de 11.93-197.85  $mg\ kg^{-1}$  de Cu y concentraciones de 2.37-5.70  $mg\ kg^{-1}$  de Cd presentes en suelo, biosólidos y suelo acondicionado con biosólidos.
- Los coliformes fecales presentes en los biosólidos de la Macroplanta Toluca Norte fueron resistentes a los metales pesados agregados artificialmente en los medios de

cultivo en concentraciones de  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu y  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd y presentaron resistencia a los antibióticos a concentraciones de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de ampicilina y  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  de cloramfenicol. Lo que nos indicó que los coliformes fecales agudizan el riesgo de contaminación al ambiente y a la salud humana.

- Se mostraron diferencias significativas en la reducción de los coliformes fecales entre los días 0 y 30 en los tratamientos: 1.Suelo y 3.Suelo+Biosólidos, debido a factores como: tipo de biosólidos (municipal-industrial), tiempo de incubación y el acondicionamiento en suelo agrícola con biosólidos frescos, y no hubo diferencias significativas en los tratamientos: 2.Biosólidos, 4.Suelo+Biosólidos+Cd y 5.Suelo+Biosólidos+Cu porque un mínimo porcentaje de humedad y la capacidad de las partículas finas del suelo, influyeron en la supervivencia de las bacterias coliformes.
- Se encontró que al incrementarse el número de días, las concentraciones de Cd decrecieron debido a factores como: suelo, tiempo de incubación y dosis y las de Cu incrementaron por los mismos factores mencionados.
- Se acepta la hipótesis inicial de la prevalencia de los coliformes fecales en el suelo después de 30 días de aplicación de biosólidos, ante la presencia de Cu y Cd contenidos en los biosólidos.

## VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda a los trabajadores que manipulan los biosólidos Clase C, usen equipo de protección para evitar contraer alguna enfermedad originada por los microorganismos patógenos y por el contenido de metales pesados.
- Se sugiere que los límites máximos permisibles de patógenos y parásitos y las concentraciones en  $\text{mg kg}^{-1}$  de los metales pesados en lodos y biosólidos que se encuentran en la NOM-004-SEMARNAT.2002, se replanteen, ya que estos límites no garantizan la eliminación del riesgo de contaminación por el recrecimiento de coliformes fecales, ni la acumulación de metales en el suelo a largo plazo.

## VII. LITERATURA CITADA

1. Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América USEPA, 1993. Reglamentación de la USEPA para el uso o aplicación de lodos de drenaje. Federal Registry. pp. 23.
2. Álvarez, G. L. 2004. Mineralización in vitro de nitrógeno y fósforo y contenido de metales pesados en suelo acondicionados con lodo proveniente de una planta de tratamiento de aguas servidas. Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. pp. 27-28.
3. Alloway, B. J. 1991. Heavy metals in soils. USA. John Wiley & Sons.
4. Arboleda V. J. 2000. Teoría y práctica de la purificación del agua. Volumen I. Tercera edición. Mc Graw Hill. p. XXV.
5. Barrios, P.J.A. 2002. Tratamiento ácido de lodos residuales fisicoquímicos para reducir el contenido de microorganismos. Congreso Interamericano de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Cancún, México, 27 al 31 de octubre, 2002. pp. 1.
6. Beltrán, V.M., Vaca M.M., Vázquez M. A., López C. R. y Hachec R. 2006. Fertilización dosificada con biosólidos acondicionados. Universidad Autónoma

Metropolitana-Azcapotzalco. Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica. Volumen 1, número 1, Año 2006. pp. 1, 5.

7. Campos, R., Vaca P. R., Lugo F. J. y Garrido Hoyos S.E., 1998. “Estabilización Térmica Alcalina de Lodos Químicos con un Alto Contenido de Microorganismos Patógenos”. XIX Encuentro Nacional AMIDIQ, Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C. Memorias pp. 365-366..
8. Cardhona, A. M., 2004. Contaminación fecal en lodos residuales (Rio Grande do Norte, Brasil). International Microbiology. 2004, vol.7, n.3, pp. 213-218. ISSN 1139-6709.
9. Cardoso, V.L. 2002. Uso potencial de lodos residuales como biosólidos en México. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, México, IMPTA. pp 1.
10. Castillo, L., Martínez, A. R., López, L., Ticante, A.J., Muñoz, A.A., 2007. Aislamiento y selección de coliformes fecales resistentes a antibióticos provenientes de dos plantas de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Puebla. Posgrado en Ciencias Ambientales Área: Medio Ambiente y Salud. Facultad de Ingeniería Química. Ciudad Universitaria. Puebla, Puebla. CICM-Lab. de Microbiología de Suelos. ICUAP. Benemérita Universidad Aut. de Puebla. pp. 1-9.

11. EPA, 1995. Pathogen risk assessment methodology for municipal sewage sludge landfilling and surface disposal. Washington, DC: Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, EPA/600/R-95/016.
12. EPA, 2003. Environmental Regulations and Technology. Control of pathogens and Vector attraction in Sewage Sludge. (Including Domestic Septage). Under 40 CFR Part 503. EPA/625/R-92/013.
13. Fuccz, G. J., Gómez M. R., Cárdenas G. M. y Campos P.C. 2007. Comportamiento de coliformes fecales como indicadores bacterianos de contaminación fecal en diferentes mezclas de biosólido y estériles utilizados para la restauración ecológica de la cantera Soratama, Bogotá. Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Revista de la Facultad de Ciencias. Edición especial II, Vol. 12, 111-120.
14. García, M. E. 1998. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. México, D.F.
15. Guzmán, C. 2005. Detección de microorganismos indicadores y patógenos en lodos de depuradora. DEA. Departamento de Microbiología. Universidad de Barcelona. Capítulo 20. pp. 15,30.
16. Harrison, E. Z. 1999. Land application of sewage sludges: an appraisal of the US regulations. Institute J. Environment and Pollution. pp. 1-36.

17. Hue, N. V., Silva, J. A. and Arifin, R., 1988. Sewage sludge-soil interactions as measured by plant and soil chemical composition. *J. Environ. Qual.* 17 (3): 384-390.
18. Instituto Estatal del Agua (IEA), 2008. Lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua y Comisión Estatal del Agua de Baja California. Tomo 1. pp. 31-61.
19. Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (INSSO). Indicaciones para controlar los riesgos potenciales que corren los trabajadores expuestos a los biosólidos de clase B. Publicación Número 2002-149 de United States Department of Health and Human Services (NIOSH), 2002.
20. Jiménez B. 2002. Comparison of the quality of the microbiological content of sludge in countries with low and high content of pathogens. *Water Science and Technology*. Vol. 46 (17-24).
21. Kapil, A. 2005. The challenge of antibiotic resistance: needs to contemplate. *Indian J. Med. Res.* **121**: 83-91.
22. Kümmerer, K. 2004. Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**: 311-320.

23. Lane, R. 1998. The effects of sewage sludge application to Bermudagrass on forage quality production, and metal accumulation. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 20: 209-219.
24. Lenski, R. E. 1998. Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *Internatl. Microbiol.* 1: 265-270.
25. Lue-Hing, C., Zenz R. y Kuchenrither D. 1992. Municipal Sewage Sludg management, processing, utilization and disposal. *Technomic. U.S.A.* 69: 653.
26. Martín del Campo, S. M. 1996. Caracterización de lodos residuales de dos plantas tratadoras de agua del Estado de México para una propuesta de utilización en la agricultura. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UAEMéx. pp 64.
27. Martín del Campo, S. M., Mier V. M. y Hachec, R., 2002. Aplicación de lodos residuales municipales en el cultivo de haba (*Vicia faba L.*) en suelos agrícolas del Valle de Toluca. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental Cancún, México, 27 al 31 de octubre, 2002. UAEMéx. pp 1-7.
28. Martínez, G. R. 2004. Efecto del acondicionamiento de suelo con lodos residuales municipales y composta en el cultivo del maíz: Evaluación de metales, productividad y calidad. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UAEMéx. pp. 37-39.

29. NMX-F-187-1978. Determinación del Número Más Probable de gérmenes. Method of test for germs most probable number. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. pp 1.
30. Oberhaster, G. 1991. South African practice in land disposal of sludge, including legislation and health aspects. *Wat. Sci. Tech.* 15: 151-155.
31. Ortiz, H.M., Morillo, V.A. y Villavicencio, B.M., 1999. Efectos de la adición de lodos residuales sobre un suelo agrícola y un cultivo de maíz. Laboratorio de Investigaciones Ambientales, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 15(2) 69-77.
32. Proyecto Conacyt/P1-58215. Informes de avances del proyecto “Suelos acondicionados con lodos residuales: dinámica de la materia orgánica, nutrimentos (N y P) y calidad del cultivo *Zea mays*”.
33. Sader, H. S., M. Castanheira, R. E. y Mendes, M. T. 2005. Dissemination and diversity of metallo- $\beta$ -lactamases in Latin America: report from the 39. SENTRY antimicrobial surveillance program. *Internatl. J. Antimicrob. Agents.* 25: 57-61.
34. Salyers, A., Gupta y Wang, Y. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.* 12 (9): 412-416.

35. Scott, B. and Ahlstrom P. E. 1985. Irradation of municipal sludge for agricultural use radiat. Chem. p. 8: 1-3.
36. Secretaría de Marina y Recursos Naturales (SEMARNAT), 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002, Protección Ambiental.- Lodos y Biosólidos.-Especificaciones y Límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. Secretaría de Gobernación. Diario Oficial de la Federación.
37. Serrato, C. R. y Landeros, F. V., 2001 a. Instructivo para análisis de suelo. Propiedades físicas. Laboratorio de suelos CIEAF. Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. pp 11-17, 46-48, 49-57, 64-65 y 81-83.
38. Serrato, C. R. y Landeros, F. V., 2001 b. Instructivo para análisis de suelo. Propiedades químicas. Laboratorio de suelos CIEAF. Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. pp 9-11 y 21-24.
39. Sorbe, G. 1988. "Sicherheitstechnische Kenndaten chemischer Stoffe" (Identificación de sustancias químicas por razones de seguridad). Landsberg/Lech. pp. 15, 20.
40. Stephens, K. U. 2008. Lessons learned from Hurricane Katrina. Environ Geochem Health. City of New Orleans Health Department. pp. 492.

41. Sun, Y. H., Luo, Y. M., Wu, L. H., Li, Z. G., Song, J., and Christie, P. 2006. Survival of faecal coliformes and hygiene risks in soil treated with municipal sewage sludges. *Environmental Geochemistry and Health*. pp. 97.
42. Tessier, A., Campbell, P. y Bisson, G. 1979. Sequential extraction procedur for the speciation of particulate trace metals. *Analysis Chemistries* 51(7):935-948.
43. Torres, P. J.C. 2005. Cobre, Medio Ambiente y Salud, Aportes de la Ciencia. Instituto de Innovación en Minería y Metalurgia, IM2. pp 214.
44. Vélez, Z. J. A. 2007. Los biosólidos: ¿una solución o un problema? *Producción + limpia*. Vol. Número 2. pp. 8-9.
45. Valencia, B. I. y Casado O. L. X. 2004. Clasificación taxonómica de los suelos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias UAEM. pp 40.
46. Watson, J. E., Pepper, I.L., Unger, M. and Fuller, W.H. 1985. Yields and leaf elemental composition of cotton grown on sludge amended soil. *J. Environ. Qual.* 14: 174-177.
47. Wilkinson D.M. 1999. Bacterial ecology, antibiotics and selection for virulence. *Ecology Lett.* 2: 207-209.

48. Zhu, B. and Alva, K. A. 1993. Comparison of single and sequential soil extractions for predicting copper phytotoxicity. *Soil Sci. Plant Anal.* 24 (56): 475-486.