

01177



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA  
FACULTAD DE INGENIERIA  
(CAMPUS MORELOS)**

**CINETICAS DE INACTIVACION  
MICROBIANA EN PROCESOS DE  
DIGESTION ANAEROBIA TERMOFILICA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN INGENIERIA AMBIENTAL**

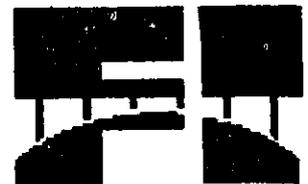
**P R E S E N T A :**

**INGENIERO ANDRES  
HUMBERTO PINZON OCHOA**

**ASESORA DE TESIS:**

**Dra. Gabriela Moeller Chávez**

**FACULTAD DE  
INGENIERIA**



**U N A M**

**MEXICO, D.F.**

**2000**

283-11177



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

- A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería (DEPFI) tanto en la Ciudad de México como en Cuernavaca, por facilitarme los recursos necesarios para un adecuado desempeño en mis estudios.
  
- Al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), particularmente a las subcoordinaciones de Tratamiento de Aguas Residuales y de Calidad del Agua, por las instalaciones y equipos requeridos para el desarrollo de mis experimentos de tesis.
  
- A mis asesores de tesis: **M.C. Juana E. Cortés Muñoz**, **Dra. Petia Mijaylova Nacheva**, **M.I. Esperanza Ramírez Campero**, **M.C. Juan García** por sus valiosas aportaciones tanto en el trabajo experimental como en la redacción de la tesis.
  
- A la Doctora **Alejandra Martín Domínguez** por su gran ayuda durante la parte experimental de la tesis.
  
- Finalmente, dos agradecimientos muy especiales; el primero para la **señora Marilú** (así, sin apellido, porque así la conocimos todos) por ser tan fuerte respaldo para todos los que cruzamos por la DEPFI, Morelos y, el segundo para la **Dra. Gabriela Moeller Chávez** por brindarme su atención, su tiempo, sus conocimientos y su acertada dirección no sólo durante la tesis sino también a lo largo de mis estudios de maestría.

## DEDICATORIAS

- A mis **papás** y a **mi sisterna**, mi pequeña gran familia, por brindarme incondicionalmente todo su amor y su apoyo, lo que soy y he conseguido hasta ahora es en gran parte por ustedes. Aunque casi siempre estoy lejos, hay recuerdos, acciones y sentimientos que diario vuelan hacia ustedes y viceversa, ya que no hay día que no se abalance sobre mí lo mucho que los quiero. Muchas gracias por todo. Los amo. Atentamente Andy, Deco y los improperios que Mar me adjudicaba.
  
- A mis cuates de todos lados, de la universidad, de la maestría, de la calle, etc. Por hacerme la vida más alegre y permitirme devolverles tal atención cada vez que me es posible. Una especial dedicatoria a los de la maestría: Tico, Pily, Sandra y Ruby (mis niñas) por ser ese grupo tan especial. Los quiero mucho. Atentamente el Gazny, el Tata y todos los demás.
  
- A todos los que para bien o para mal han influido en mi vida. De todo se aprende.
  
- A mi **Tripa voladora**, el amor de mi vida. Por todo lo que me ha brindado en todos los sentidos. Cuánto me debía el destino que contigo me pagó. TE AMO. Tripo.

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
Lista de tablas	I
Lista de figuras	III
Resumen	V
Introducción	VII
Objetivos	IX
<b>1. GENERALIDADES DE LOS LODOS RESIDUALES</b>	<b>1</b>
1.1. Características de los lodos residuales	1
1.1.1. Características físicas	1
1.1.2. Características químicas	3
1.1.3. Características biológicas	3
1.2. Clasificación de los lodos residuales	6
1.2.1. Lodos primarios	6
1.2.2. Lodos secundarios	6
1.3. Tratamiento de los lodos residuales	7
1.3.1. Pretratamiento	7
1.3.2. Espesamiento	7
1.3.3. Estabilización	8
1.3.4. Acondicionamiento	9
1.3.5. Deshidratación	9
1.3.6. Secado	9
1.4. Normatividad de los lodos residuales	9
1.4.1. En México	9
1.4.2. En los Estados Unidos de América	10
1.4.2.1. Lodos clase B	10
1.4.2.2. Lodos clase A	11
1.4.2.3. Reducción de las condiciones de atracción de organismos vectores	13
1.5. Uso (aplicación) o disposición del lodo residual	15
1.5.1. Características como fertilizante	15
1.5.2. Aplicación de lodos residuales a suelos	16
1.5.3. Disposición superficial de lodos residuales	17
<b>2. DIGESTIÓN ANAEROBIA TERMOFÍLICA</b>	<b>20</b>
2.1 Estado del arte	20
2.2. Bioquímica y microbiología	21
2.2.1. Bioquímica	21
2.2.1.1. Hidrólisis	22
2.2.1.2. Fermentación de aminoácidos, azúcares y alcoholes y $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadena larga	22
2.2.1.3. Acetogénesis y deshidrogenación	22
2.2.1.4. Metanogénesis a partir de acetato	24
2.2.1.5. Metanogénesis a partir de hidrógeno y dióxido de carbono	25
2.2.1.6. Vías metabólicas que compiten con la metanogénesis	27
2.2.2. Microbiología	28
2.2.2.1. Microorganismos anaerobios termofílicos	28

2.2.2.2. El dominio Archae	29
2.3. Factores ambientales que afectan la digestión anaerobia	32
2.3.1. Temperatura	32
2.3.2. pH y alcalinidad	33
2.3.3. Nutrientes	34
2.4. Consideraciones técnicas de la digestión anaerobia termofílica	36
2.4.1. Digestores de baja tasa	36
2.4.2. Digestores de alta tasa	37
2.4.3. Digestores de dos etapas	37
2.4.4. Diseño de digestores anaerobios	37
2.4.5. Control de digestores anaerobios	39
2.4.6. Arranque de digestores anaerobios	42
2.4.7. Aspectos inhibitorios de la digestión anaerobia	43
2.5. Ventajas y desventajas de la digestión anaerobia termofílica	44
2.5.1. Con respecto a la digestión anaerobia mesofílica	44
2.5.2. Con respecto a otros métodos de estabilización	44
3. FUNDAMENTOS DE LA INACTIVACIÓN TÉRMICA MICROBIANA	47
3.1 Inactivación térmica de microorganismos	47
3.1.1. Efecto de la temperatura sobre la constante de inactivación térmica	48
3.1.2. Inactivación térmica por lote	49
4. ASPECTOS GENERALES DE <i>Candida albicans</i> Y EL GRUPO COLIFORME	51
4.1. Infecciones relacionadas con el agua	51
4.2. Coliformes totales y <i>Escherichia coli</i>	51
4.2.1. Aspectos ecológicos	51
4.2.2. Aspectos microbiológicos	51
4.2.3. Cepas patógenas	52
4.3. <i>Candida albicans</i>	52
4.3.1. Aspectos ecológicos	52
4.3.2. Aspectos microbiológicos	53
4.3.3. Aspectos clínicos	54
5. METODOLOGÍA	57
5.1. Digestores	57
5.2. Lodo inóculo	57
5.3. Lodo crudo y alimentación de los digestores	57
5.4. Acondicionamiento y estabilización de los digestores	59
5.4.1. Digestor a 55 °C	59
5.4.2. Digestor a 65 °C	59
5.5. Parámetros de control para evaluar el desempeño de los digestores	60
5.5.1. DQO	60
5.5.2. Sólidos totales	61
5.5.3. Sólidos suspendidos totales y volátiles	61
5.5.4. Alcalinidad total y relación alcalinidad intermedia : alcalinidad parcial	61
5.5.5. pH	61
5.5.6. Producción de biogás	61
5.5.7. Ácidos grasos volátiles	62
5.6. Cinéticas de inactivación microbiana	62
5.6.1. Realizada a 55 °C	62
5.6.2. Realizada a 65 °C	63

5.6.3. Consideraciones estadísticas	64
5.6.4. Análisis de coliformes totales, <i>E. coli</i> y <i>Candida albicans</i>	65
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
6.1. Acondicionamiento y estabilización del digestor a 55 °C	66
6.1.1. Acondicionamiento para obtener la temperatura deseada	66
6.1.2. Estabilización	71
6.2. Acondicionamiento y estabilización del digestor a 65 °C	78
6.2.1. Acondicionamiento	78
6.2.2. Estabilización	82
6.3. Cinéticas de inactivación de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i>	91
6.3.1. Cinéticas a 55 °C	91
6.3.2. Cinéticas a 65 °C	93
6.4. Cinéticas de inactivación de <i>Candida albicans</i>	99
6.4.1. Cinética a 55 °C	99
6.4.2. Cinética a 65 °C	101
 CONCLUSIONES	 105
 RECOMENDACIONES	 106
 REFERENCIAS	 107
 <b>Anexo 1. Técnicas empleadas para determinar los parámetros fisicoquímicos utilizados.</b>	 111
<b>Anexo 2. Técnicas empleadas para determinar la concentración de los microorganismos evaluados.</b>	120

## LISTA DE TABLAS

1. Patógenos potencialmente presentes en lodos residuales y las enfermedades que ocasionan	4
2. Niveles de microorganismos indicadores en las distintas clases de lodos	6
3. Características fisicoquímicas típicas de lodos crudos	7
4. Condiciones tiempo – temperatura para la alternativa 1	13
5. Requerimientos de reducción de patógenos y de atracción de vectores para lodos residuales aplicables al suelo	16
6. Límites de contaminantes químicos	17
7. Límites de contaminantes para disposición superficial	18
8. Características de las bacterias presentes en la digestión anaerobia termofílica	31
9. Características de los archae (metanogénicos) presentes en la digestión anaerobia termofílica	32
10. Diferencias entre la digestión anaerobia termofílica y la mesofílica	33
11. Concentraciones de macro y micronutrientes presentes en metanógenos	35
12. Tiempos de retención hidráulico para el diseño de digestores de alta tasa	38
13. Tecnologías utilizadas para la reducción de patógenos	45
14. Comparación entre la digestión anaerobia termofílica y otros métodos de estabilización	45
15. Cronología del acondicionamiento del reactor a 55 °C	66
16. Producción de biogás a lo largo del acondicionamiento a 55 °C	70
17. Intervalos en los valores registrados para varios parámetros en el lodo crudo durante el acondicionamiento a 55 °C	70
18. Cronología de la estabilización del reactor a 55 °C	71
19. Eficiencias de remoción de DQO con TRH = 10 días y TRH = 20 días en la estabilización del reactor a 55 °C	74
20. Eficiencias de remoción de SSV con TRH = 10 días y TRH = 20 días en la estabilización del reactor a 55 °C	74
21. Valores registrados en el lodo crudo durante la estabilización a 55 °C	75
22. Producción de biogás durante la estabilización a 55 °C	76
23. Cronología del acondicionamiento a 65 °C	78
24. Intervalos registrados en el lodo crudo durante el acondicionamiento a 65 °C	82
25. Producción de biogás durante el acondicionamiento a 65 °C	82
26. Cronología de la estabilización a 65 °C	82
27. Remoción de DQO durante la estabilización a 65 °C	86
28. Remoción de SSV durante la estabilización a 65 °C	86

29. Valores registrados en el lodo crudo durante la estabilización a 65 °C	87
30. Producción de biogás a TRH = 10 días y TRH = 20 días a 65 °C	87
31. Comparación de los procesos anaerobios termofílicos a 55 y 65 °C con TRH = 20 días	88
32. Comparación entre los resultados obtenidos y otros reportados en literatura	89
33. Concentración de coliformes totales y <i>E. coli</i> en lodo crudo	91
34. Resultados de la cinética de inactivación de coliformes totales y <i>E. coli</i> a 55 °C	91
35. Ecuaciones ajustadas de las cinéticas de inactivación de coliformes totales y <i>E. coli</i> a 55 °C	93
36. Análisis estadístico de las rectas ajustadas para el grupo coliforme a 55 °C	93
37. Resultados de la cinética de inactivación de coliformes totales y <i>E. coli</i> a 65 °C	93
38. Ecuaciones ajustadas de las cinéticas de inactivación de coliformes totales y <i>E. coli</i> a 65 °C	99
39. Análisis estadístico de las rectas ajustadas para el grupo coliforme a 65 °C	99
40. Concentración de <i>Candida albicans</i> en el lodo crudo	99
41. Resultados del primer experimento con <i>C. albicans</i> a 55 °C	99
42. Concentración de <i>Candida albicans</i> del inóculo para el segundo experimento a 55 °C	100
43. Resultados del segundo experimento con <i>C. albicans</i> a 55 °C	100
44. Ecuación ajustada de la cinética de inactivación de <i>Candida albicans</i> a 55 °C	101
45. Análisis estadístico de la recta ajustada para <i>Candida albicans</i> a 55 °C	101
46. Resultados del primer experimento con <i>C. albicans</i> a 65 °C	101
47. Resultados del segundo experimento con <i>C. albicans</i> a 65 °C	103
48. Comparación entre los resultados obtenidos y otros reportados en literatura	103
49. Comparación de la relación tiempo:temperatura entre los experimentos realizados y lo propuesto por la U.S. EPA para considerar un lodo como clase A	104

## LISTA DE FIGURAS

1. Digestión anaerobia	23
2. Metanogénesis a partir de acetato	25
3. Metanogénesis a partir de la reducción de CO <sub>2</sub>	27
4. Microbiología de la digestión anaerobia	30
5. Estructura de la coenzima F <sub>430</sub>	36
6. Recta típica obtenida a partir de la ecuación $\ln N = -k(t) + \ln N_0$	50
7. Recta típica obtenida a partir de la ecuación $\ln k = \alpha' - E/RT$	50
8. Reactor operado a 55 °C	58
9. Reactor operado a 65 °C	58
10. Evolución del pH durante el acondicionamiento del reactor a 55 °C	67
11. Incremento de la temperatura durante el acondicionamiento del reactor a 55 °C	67
12. Evolución de la alcalinidad durante el acondicionamiento del reactor a 55 °C	68
13. Relación alcalinidad intermedia/alcalinidad parcial durante el acondicionamiento del reactor a 55 °C	68
14. Evolución de la DQO durante el acondicionamiento del reactor a 55 °C	69
15. Evolución de los SST y SSV durante el acondicionamiento del reactor a 55 °C	69
16. Evolución del pH durante la estabilización del proceso a 55 °C	71
17. Evolución de los AGV durante el proceso a 55 °C con TRH = 20 días	73
18. Evolución de la alcalinidad durante el proceso a 55 °C	73
19. Relación Alc intermedia/Alc parcial en el proceso a 55 °C	74
20. Evolución de la DQO en la estabilización a 55 °C	75
21. Evolución de los SST y SSV durante el proceso a 55 °C	76
22. Evolución del pH durante el acondicionamiento a 65 °C	78
23. Incremento de la temperatura durante el acondicionamiento a 65 °C	79
24. Evolución de la alcalinidad en el reactor durante el acondicionamiento a 65 °C	80
25. Relación Alc intermedia/Alc parcial durante el acondicionamiento a 65 °C	80
26. Evolución de la DQO durante el acondicionamiento a 65 °C	81
27. Evolución de los SST y SSV durante el acondicionamiento a 65 °C	81

28. Evolución del pH durante la estabilización a 65 °C	83
29. Evolución de la alcalinidad durante la estabilización a 65 °C	84
30. Relación Alc intermedia/Alc parcial en la estabilización a 65 °C	84
31. Concentración de AGV durante un ciclo operativo con TRH = 20 días	85
32. Evolución de la DQO durante la estabilización a 65 °C	85
33. Evolución de los SST y SSV durante la estabilización a 65 °C	86
34. Comparación entre el color del lodo crudo y el del digerido	90
35. Cinética de inactivación de coliformes totales y <i>E. coli</i> a 55 °C	92
36. Celdas de colilert para coliformes totales a 55 °C	94
37. Celdas de colilert para <i>E. coli</i> a 55 °C	95
38. Cinéticas de inactivación de coliformes totales y <i>E. coli</i> a 55 y 65 °C	96
39. Celdas de colilert para coliformes totales a 65 °C	97
40. Celdas de colilert para <i>E. coli</i> a 65 °C	98
41. Cinéticas de inactivación de coliformes totales, <i>E. coli</i> y <i>C. albicans</i> a 55 °C	100
42. Comparación entre las células de <i>C. albicans</i> a 55 °C y a condiciones normales	102

## RESUMEN

Se realizó un estudio acerca de la inactivación del grupo coliforme y de la levadura *Candida albicans* en procesos de digestión anaerobia termofílica de lodos secundarios. El objetivo fue obtener las cinéticas de inactivación de los microorganismos mencionados así como una buena estabilización de la materia orgánica para poder determinar si un lodo tratado de manera anaerobia a altas temperaturas cumplía con los requerimientos propuestos por la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos de América (U.S. EPA) para considerar a un lodo como clase A. Además se evaluó a *Candida albicans* como microorganismo indicador de calidad microbiológica bajo condiciones anaerobias termofílicas; esto basado en el hecho de que esta levadura resiste condiciones de estrés que no toleran las bacterias incluyendo al grupo coliforme, condiciones como altas dosis de cloro y ozono. Por otro lado, también se consideró importante determinar las velocidades de inactivación de *C. albicans* por ser un patógeno oportunista humano de importancia.

Para lograr los objetivos planteados se manejaron dos temperaturas, 55 y 65 °C, utilizándose reactores con volúmenes de trabajo de 4 y 1.8 litros respectivamente. Se utilizó como inóculo un lodo proveniente de un digestor anaerobio mesofílico al que gradualmente se le incrementó la temperatura hasta 55 °C; al alcanzar la temperatura de 44.2 °C se tomó un inóculo que se llevó gradualmente hasta 65 °C. El lodo crudo para ambos reactores fue obtenido de un reactor biológico con aireación intermitente. Se trabajó una modalidad de alimentación semicontinua semanal con un tiempo de retención hidráulico de 20 días, habiendo pasado primero por TRH de 10 y 15 días sin lograr estabilidad. Se escogió dicha modalidad de alimentación para tener las condiciones que nos permitieran cinéticas de inactivación tipo lote.

En ambos casos el desempeño de los reactores fue evaluado midiendo la demanda química de oxígeno (DQO), sólidos totales (ST), sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV), alcalinidad total (ALC), relación entre alcalinidad intermedia (AI):alcalinidad parcial (AP), ácidos grasos volátiles (AGV) y volumen de biogás producido.

Los resultados obtenidos en el reactor a 55 °C mostraron una eficiencia en la estabilización de la materia orgánica de 48.55 a 51.07% para SSV y de 42.4 a 59.7% para DQO, pH final de 7.4 a 7.6, relación AI:AP de 0.25 a 0.33, concentración final de AGV de 24.8 mg/L (Ac. Acético) y producción promedio de biogás de 23.71 L/d. Mientras que el digestor a 65 °C tuvo eficiencias de 43.3 a 55.7% para SSV y 37 a 44.5% para DQO, pH final de 7.7 a 7.9, relación AI:AP de 0.23 a 0.37, concentración final de AGV de 29.89 mg/L (Ac. Acético) y producción promedio de biogás de 20.178 L/d.

Se lograron obtener las cinéticas de decaimiento del grupo coliforme a 55 y 65 °C y de *Candida albicans* sólo a 55 °C, teniendo tiempos de inactivación de ocho horas a 55 °C y una hora a 65 °C para el grupo coliforme y de menos de una hora a 55 °C para la levadura. Las ecuaciones de decaimiento obtenidas para los microorganismos en cuestión fueron las siguientes:

Microorganismo	Ecuación	R <sup>2</sup>
Coliformes totales (55 °C)	$\ln \text{NMP/g ST} = -1.5829 (t) + \ln \text{NMP}_0/\text{g ST}$	0.9788
<i>E. coli</i> (55°C)	$\ln \text{NMP/g ST} = -1.6819 (t) + \ln \text{NMP}_0/\text{g ST}$	0.9803
<i>C. albicans</i>	$\ln \text{UFC/g ST} = -17.638 (t) + \ln \text{UFC}_0 / \text{g ST}$	0.9549
Coliformes totales (65 °C)	$\ln \text{NMP/g ST} = -7.5186 (t) + \ln \text{NMP}_0/\text{g ST}$	0.9713
<i>E. coli</i> (65 °C)	$\ln \text{NMP/g ST} = -7.1679 (t) + \ln \text{NMP}_0/\text{g ST}$	0.9784

Se concluyó que bajo las condiciones trabajadas de TRH de 20 días, alimentación semicontinua semanal y un lodo crudo secundario, la digestión anaerobia a 55 y 65 °C logró un buen desempeño en la estabilización del lodo residual así como una completa inactivación del grupo coliforme y de *Candida albicans*. Lo anterior nos indica que el lodo estable que se obtenía del proceso de digestión cumplía con los requisitos para ser considerado como un lodo clase A.

Además se demostró que *C. albicans* no es una buena alternativa como microorganismo indicador de calidad microbiológica comparado con el grupo coliforme, cuando se trata de inactivación térmica en condiciones de anaerobiosis.

## INTRODUCCIÓN

Los lodos resultantes del tratamiento de las aguas residuales son utilizados en rellenos sanitarios, en cementerios, en autopistas, y como mejoradores de suelo tanto en áreas rurales (uso agrícola) como urbanas (parques y jardines), por mencionar algunas aplicaciones (U.S. EPA, 1992). Es evidente que dichos lodos aportan grandes beneficios, sin embargo, no se debe olvidar que su origen son las aguas residuales y por ende conservan algunas características negativas de las mismas, en particular la presencia de organismos tales como bacterias, protozoarios, virus, hongos y huevos de helmintos, los cuales pueden causar enfermedades al estar en contacto con el ser humano. El contacto puede ser directo o indirecto, este último se da a través del transporte de los organismos patógenos mediante roedores, insectos e incluso ganado; a dichos animales se les denomina vectores (U.S. EPA, 1992). Por lo tanto, para que un lodo no represente riesgo alguno para la salud humana, debe cumplir ciertos requisitos relacionados tanto con la reducción en la concentración de ciertos patógenos como con la reducción de las condiciones de atracción para los vectores.

En México, no existen aún regulaciones ambientales específicas para los lodos residuales. Estos están legislados dentro de la NOM-052-ECOL-93 para residuos peligrosos en general, en donde se puntualiza que se consideraran riesgosos aquellos residuos que no cumplan con las características denominadas en su conjunto como **CRETIB** (corrosividad, reactividad, explosividad, toxicidad, inflamabilidad y biológico-infeccioso). En lo que respecta al rubro biológico-infeccioso, se establece que biológico infeccioso es aquel residuo que contiene microorganismos o sus toxinas que pueden causar efectos nocivos a los seres vivos, pero, la norma no menciona indicadores específicos, ni establece límites que ayuden a acotar esta característica en los residuos (IMTA, 1998). Por lo que al necesitar criterios para garantizar la seguridad en el manejo y uso del lodo residual se suele recurrir a lo propuesto por la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos de América (U.S. EPA). Esta agencia en su guía de control de patógenos y de atracción de vectores en lodos residuales (EPA/625/R-92/013) clasifica a los lodos en dos clases, clase **B**, que no cuentan con una gran calidad microbiológica y pueden ser aplicados en campos de cultivo, bosques, zonas de pastoreo de animales y lugares de acceso público, bajo la restricción de disponerlos hasta que los factores ambientales reduzcan sustancialmente los patógenos y, lodos clase **A**, que presentan una mejor calidad microbiológica, no implican riesgos para la salud humana y pueden ser aplicados incluso en jardines de casas particulares.

Dentro de las alternativas propuestas por la U.S. EPA para lograr un lodo clase A, se encuentra una serie de "procesos para la reducción adicional de patógenos" (PFRP), entre los cuales están el composteo, el secado por calor, el tratamiento térmico, la digestión aerobia termofílica, la radiación con rayos beta o gamma y la pasteurización. Como puede notarse, de entre los procesos mencionados que involucran el uso de altas temperaturas, no se incluye a la digestión anaerobia termofílica, debido a que la U.S. EPA considera inestable dicho proceso, basándose en un trabajo realizado por Garber en 1982 en la planta de tratamiento de la ciudad de los Ángeles (Garber, 1982). No obstante, pueden encontrarse otros autores que afirman precisamente lo contrario (Fisher y Greene,

1945; Smart y Boyko, 1977; Rimkus *et al*, 1982 y Aitken y Mullennix, 1992), considerando que la digestión anaerobia termofílica es una alternativa para producir un lodo que no represente peligro alguno para la salud humana.

Por otro lado, los requerimientos microbiológicos para considerar a un lodo como clase A, se basan en bajos niveles de coliformes fecales o la no detección de salmonellae como indicadores de la destrucción de bacterias patógenas (Yanko, 1987). Los organismos indicadores permiten evaluar el grado en que ha sido contaminado el lodo residual por la presencia de heces humanas y de otros animales de sangre caliente, sin embargo, los indicadores no consideran patógenos específicos sino que se refieren a la posibilidad, en general, de contraer una gran variedad de enfermedades, por eso es que aun existe una gran polémica en relación con el uso de dichos organismos (IMTA, 1998).

Basado en lo anterior, este trabajo pretende aportar más información sobre el desempeño de la digestión anaerobia termofílica tanto en la estabilización como en la desinfección de los lodos, realizando para este último propósito las cinéticas de inactivación tanto de microorganismos indicadores típicos (grupo coliforme) como de *Candida albicans*, evaluando a *Candida* como un posible microorganismo indicador ya que al igual que el grupo coliforme, es un habitante común de la flora microbiana del tracto gastrointestinal (Rogers y Balish, 1980) y además, se ha demostrado su capacidad para resistir condiciones especiales de estrés como concentraciones de cloro y ozono que son normalmente usadas para inhibir la contaminación bacteriana incluyendo a los coliformes (Fischer, 1982). Por otra parte, obtener las cinéticas de decaimiento y sus respectivos parámetros cinéticos, pueden servirnos en algún momento como criterios de diseño.

Con esto no sólo se contribuye al mayor entendimiento de la digestión anaerobia termofílica, sino también se abarca un problema que tiene que ver con la salud pública: la desinfección de los lodos residuales.

## OBJETIVOS

### GENERAL

\* Obtener las cinéticas de inactivación microbiana de *coliformes totales*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* en un proceso de digestión anaerobia termofílica.

### PARTICULARES

- \* Obtener los tiempos y las constantes de inactivación microbiana.
- \* Evaluar la capacidad del proceso para reducir la atracción de vectores, medida como reducción de sólidos suspendidos volátiles (SSV), así como el desempeño del mismo en la estabilización de la materia orgánica.
- \* Verificar si se cumple lo propuesto por la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos de América para el control de patógenos en lodos clase A.
- \* Comprobar que las cinéticas son de primer orden, de lo contrario, generar un modelo que sí represente las cinéticas.
- \* Determinar si los coliformes cumplen adecuadamente su papel como microorganismos indicadores.
- \* Evaluar el comportamiento de *Candida albicans* como microorganismo indicador.

# CAPÍTULO 1

## GENERALIDADES DE LOS LODOS RESIDUALES

### 1.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS LODOS RESIDUALES

Dentro de los subproductos presentes en las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales, encontramos basuras (ropa, botellas, animales muertos), arena, espumas y lodo. De todos estos residuos, el lodo es el de mayor volumen, siendo un líquido semisólido cuyas características físicas, químicas y biológicas, varían dependiendo del proceso u operación que le dio origen (Winkler, 1994).

Las características más importantes a considerar en un lodo residual son las siguientes:

#### 1.1.1 Características físicas

##### a) Gravedad específica

La gravedad específica de un fluido representa el peso del fluido por unidad de volumen, sus dimensiones son  $[FL^{-3}]$ , pero, como un lodo está constituido por más de un tipo de sólido, la gravedad específica promedio se calcula considerando cada uno de los sólidos presentes utilizando la ecuación 1:

$$1/S_s = \sum_{i=1}^n (W_i/S_i) \quad (1)$$

donde:

$S_s$  = Gravedad específica del lodo.

$W_i$  = Fracción de peso del *iésimo* componente.

$S_i$  = Gravedad específica del *iésimo* componente.

##### b) Contenido de sólidos

Los lodos son suspensiones con un porcentaje de sólidos considerable, por lo que es importante tenerlos en cuenta. En el lodo podemos encontrar sólidos en cualquiera de sus formas, siendo algunas más importantes que otras por estar relacionadas con el tratamiento de los lodos como los SSV. Los sólidos generalmente se expresan en mg/L o porcentaje de sólidos.

- **Sólidos totales**

Es la materia que se obtiene como residuo después de someter al lodo a un proceso de evaporación a 103 –105 °C. (Metcalf & Eddy, 1996)

- **Sólidos sedimentables**

Son aquellos que sedimentan en el fondo de un recipiente de forma cónica (cono Imhoff) en un período de 60 minutos. (Metcalf & Eddy, 1996). Estos se expresan en mL/L.

- **Sólidos suspendidos**

Se obtienen haciendo pasar un volumen conocido de lodo por un filtro, lo que no atraviesa el filtro son los sólidos suspendidos, mientras que lo que sí lo hace son los **sólidos filtrables o disueltos**. Ambos tipos de sólidos pueden separarse en **fijos y volátiles**

sometiéndolos a una temperatura de  $550 \pm 50$  °C. A esta temperatura, la materia orgánica se oxida y se pierde en forma de gas, quedando como cenizas la materia inorgánica (Metcalf & Eddy, 1996).

### c) Tamaño de partícula

El tamaño de partícula en un lodo es altamente variable y es un factor que incide directamente en la facilidad para desaguar un lodo. Si las partículas tienen un tamaño entre 1 y 10 micras, el secado es más difícil.

### d) Sedimentabilidad o velocidad de sedimentación

La capacidad de sedimentación de un lodo depende de la concentración de sólidos suspendidos del mismo, de la viscosidad del líquido, del tamaño y forma del sedimentador y de las propiedades químicas, físicas y electrostáticas de la materia en suspensión. Los lodos, al tener normalmente una concentración elevada de sólidos, no sedimentan de manera discreta sino zonal, es decir, la sedimentación individual de las partículas se ve obstaculizada debido a la presencia de partículas colindantes.

A pesar de que la sedimentabilidad no nos dice mucho de las propiedades de un lodo residual, sí nos aporta información con respecto al comportamiento que puede esperarse del lodo en los sedimentadores primarios y/o secundarios, incluso puede ser un análisis fácil y barato para el control de la operación de una planta de tratamiento cuyo proceso secundario sea el de lodos activados, para esto, tiene que calcularse el índice volumétrico de lodos (IVL), que es el volumen de lodo ocupado por un gramo de sólidos; el IVL se cuantifica en un cilindro de un litro de capacidad, dejando sedimentar al lodo por 30 minutos. Se mide la profundidad del lodo en mL y se divide entre la concentración de sólidos suspendidos (IMTA, 1998).

$$\text{IVL} = (\text{mL lodo} * 1000) / \text{mg/L sólidos suspendidos} \quad (2)$$

Un IVL < 100 nos habla de un lodo con buena sedimentabilidad mientras que un IVL > 100 nos indica un lodo difícil de sedimentar.

### e) Forma en la que se encuentra el agua.

La manera en que se encuentra el agua en los lodos determina la mejor forma de separarla del sólido. El agua puede encontrarse en cuatro formas distintas (Vesilind *et al*, 1986) :

- *Agua libre*: Es el agua que se encuentra débilmente ligada a las partículas, incluso puede considerarse que no está adherida a los sólidos y que puede liberarse al sedimentar las partículas por acción de su propio peso.
- *Agua de flóculo*: Es el agua atrapada en los flóculos formados y cuya liberación se logra al comprimirlos. Los métodos empleados para removerla son mecánicos como los filtros banda o prensa.
- *Agua capilar*: Es el agua presente en los flóculos, pero unida por fuerzas capilares. Esta puede eliminarse si el lodo es compactado a presiones muy altas.
- *Agua particulada*: Es el agua que forma parte de la composición química de las partículas y su eliminación se logra únicamente por acción química o térmica, modificando la estructura de las partículas.

## f) Reología

Es importante para el estudio de los lodos, su caracterización como fluido. Colin (1983) distingue cuatro categorías de lodo desde el punto de vista reológico: Lodos líquidos, lodos plásticos, lodos sólidos susceptibles de ser compactados y lodos con volumen constante.

### 1.1.2. Características químicas

Las características químicas de un lodo definen sus opciones de tratamiento y en cierta forma su disposición final. Las propiedades químicas pueden dividirse en inorgánicas y orgánicas.

#### a) Inorgánicas

Son todos aquellos parámetros a considerar que no incluyen carbono orgánico. Los dos más importantes son:

- *Metales pesados*: Su acumulación produce impactos ambientales negativos, causando trastornos no sólo en el ser humano sino también en especies animales, vegetales e incluso de otros reinos. Entre los de más relevancia encontramos al arsénico, al cadmio y al mercurio por mencionar algunos.
- *Nutrientes*: Considerando el hecho de que el lodo es ampliamente usado con fines agrícolas, es muy importante conocer su contenido de nitrógeno, fósforo y potasio, para determinar su valor como mejorador de suelos.

#### b) Orgánicas

La materia orgánica en los lodos es generalmente de origen animal y vegetal, así como de microorganismos y sus productos de desecho. Dentro de este rubro, es particularmente importante considerar a la **materia orgánica** susceptible de ser degradada por acción microbiana y que se considera como una medida de la carga contaminante de los residuos y a los **tóxicos orgánicos**, difícilmente biodegradables, poco solubles en agua, lipofílicos y por ende altamente acumulables en los tejidos. En general, estos compuestos son altamente tóxicos y potencialmente carcinogénicos. Dentro de los tóxicos orgánicos encontramos dos grupos prioritarios por su alta toxicidad: los pesticidas organohalogenados como el DDT y los hidrocarburos aromáticos polinucleares. Una vez que el lodo es dispuesto en el suelo, estos compuestos pueden dispersarse por volatilización, dependiendo de la temperatura ambiental, el método de aplicación y la velocidad del viento, y por fotodescomposición, que se da por la incidencia de la radiación solar en el lodo.

### 1.1.3. Características biológicas

Las propiedades biológicas de un lodo dependen de la naturaleza de sus constituyentes orgánicos, el contenido de nutrientes y factores de crecimiento, y de la toxicidad de los materiales que lo constituyen. En general, los lodos son un buen sustrato para una amplia gama de organismos como bacterias, hongos, virus, protozoarios, crustáceos, parásitos entre otros, sin embargo, no todos los microorganismos sobreviven debido principalmente a fenómenos de competencia (cuando no existen tóxicos relevantes), generándose entonces una flora típica del lodo residual.

La característica biológica más importante en los lodos residuales es la presencia de

microorganismos patógenos.

### a) Microorganismos patógenos

Los lodos al ser el subproducto obligado del tratamiento de las aguas residuales, acarrean de ellas a organismos patógenos que si el lodo no es tratado adecuadamente pueden causar problemas sanitarios al ser dispuestos en el suelo. Debido a que los lodos son obtenidos generalmente por procesos de sedimentación de las aguas residuales, la concentración de microorganismos en estos es mucho mayor, variando en especies y densidad dependiendo de las condiciones de salud de la población y de las diferentes épocas del año.

La tabla 1 muestra algunos de los principales patógenos que es probable encontrar en lodos residuales y las enfermedades que ocasionan.

Debido a los problemas de tiempo y costo que representa el monitoreo de microorganismos patógenos, se recurre al uso de un indicador que permite estimar el grado de contaminación biológica presente en las aguas y lodos residuales. El grupo de microorganismos denominados **coliformes** es el generalmente utilizado como indicador. Los coliformes son el conjunto de bacilos cortos, gram negativos, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con producción de gas en 48 horas a 35°C. Han sido utilizados como indicadores porque muchos son originarios del tracto digestivo del hombre y de los animales de sangre caliente, no son patógenos, son fáciles de aislar y normalmente sobreviven más tiempo que los microorganismos que producen enfermedades. Los coliformes pueden dividirse en coliformes totales y fecales, siendo la principal diferencia entre ambos, la capacidad de estos últimos de crecer a mayor temperatura en condiciones de laboratorio. (Pelczar, Reid y Chan, 1988)

En la tabla 2 pueden observarse los niveles de microorganismos indicadores en las distintas clases de lodos.

**TABLA 1 Patógenos potencialmente presentes en lodos residuales y las enfermedades que ocasionan.**

Patógeno	Enfermedad
<b>Virus</b>	
Enterovirus	Gastroenteritis, enfermedades cardíacas y meningitis
Rotavirus	Gastroenteritis
Parovirus	Gastroenteritis
Adenovirus	Infecciones del tracto respiratorio y conjuntivitis
Virus de la Hepatitis A	Hepatitis A
Poliovirus	Poliomielitis
Ecovirus	Meningitis
Coxsachivirus	Meningitis

**Tabla 1. Continuación**

<b>Bacterias</b>	
Salmonella (1700 tipos)	Fiebre tifoidea y salmonelosis
Shigellae	Disentería bacilar
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenteritis
<i>Yersinia enterocolica</i>	Gastroenteritis
<i>Clostridium perfringens</i>	Gangrena
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
<i>Listeria monocytogenes</i>	Meningo-encefalitis
<b>Hongos</b>	
Candida sp.	Micosis de la piel y sistémicas
<i>Tricosporon cutaneum</i>	Micosis de la piel
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Micosis pulmonar
Tricophyton sp.	Micosis de la piel
Epidemophyton sp.	Micosis de la piel
Microsporium sp.	Micosis de la piel
<b>Protozoarios</b>	
Eutamoeba	Amebiasis
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis
<i>Balantidium coli</i>	Balantidiasis
<i>Naegleria fowleri</i>	Meningo-encefalitis
<i>A. canthamoeba</i>	Meningo-encefalitis
<b>Helmintos</b>	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariosis
Ancylostoma sp.	Ancilostomiosis
<i>Necator americanus</i>	Necatoriasis
<i>Enterobius vermicularis</i>	Enterobiasis
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Strongiloidiasis
Toxocara sp.	Larvas en las vísceras
<i>Trichuris trichuria</i>	Tricuriasis
<i>Taenia saginata</i>	Solitaria
<i>Hymenolepis nana</i>	Solitaria

**Tabla 1 Continuación**

<i>Echinococcus granulosus</i>	Echinococcosis
<i>Echinococcus multilocularis</i>	Echinococcosis

## 1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS LODOS RESIDUALES

Los lodos en base a su procedencia, pueden clasificarse en primarios y secundarios. En la tabla 3, se muestran algunas características fisicoquímicas de los diferentes tipos de lodos residuales.

### 1.2.1. Lodos primarios

Son procedentes del proceso de sedimentación primaria. Las cantidades del lodo primario, dependen del tipo de red de alcantarillado y de la existencia o no de vertidos industriales. Contienen un porcentaje de sólidos de alrededor del 5%, son generalmente de color gris, grasientos y en la mayoría de los casos producen un olor extremadamente molesto. (Winkler, 1994). En los lodos primarios existe una gran variedad de microorganismos cuyo origen es primordialmente intestinal aunque puede ser de otras fuentes.

### 1.2.2. Lodos secundarios

Las características de un lodo secundario dependen básicamente del proceso biológico empleado en el tratamiento de las aguas residuales y del sustrato. En este caso consideraremos dos de los procesos biológicos más comunes en el tratamiento de aguas residuales: los lodos activados y los filtros percoladores.

#### a) Provenientes de lodos activados

Presentan una apariencia floculenta de color marrón. Si el color es muy oscuro puede estar próximo a volverse séptico, pero si es muy claro significa que no estuvo aireado suficientemente y los sólidos sedimentaran lentamente. Si esta en buenas condiciones tendrá un olor a tierra que no es molesto. (Metcalf & Eddy, 1996)

#### b) Provenientes de filtros percoladores

Los lodos en este caso, tienen una coloración pardusca, son floculentos y relativamente inodoros cuando están frescos. Su descomposición es más lenta que otros lodos crudos. (Metcalf & Eddy, 1996).

**TABLA 2. Niveles de microorganismos indicadores en las distintas clases de lodos.**

Tipo de lodo	Coliformes totales	Coliformes fecales
Primarios	$1.2 * 10^8$	$2.0 * 10^7$
Secundarios	$7.0 * 10^8$	$8.3 * 10^6$
Mezclados	$1.1 * 10^9$	$1.1 * 10^5$

Lue-Hing *et al*, 1992.

**TABLA 3. Características fisicoquímicas típicas de lodos crudos.**

Característica	Lodo primario (intervalo)	Lodo secundario (Lodos activados) (Intervalo)
Sólidos totales (%)	2-8	0.83-1.16
Sólidos volátiles (% de ST)	60-80	59-88
Grasas y aceites (% de ST)		
Solubles en éter	6-30	-
Extraíbles en éter	7-35	5-12
Proteínas (% de ST)	20-30	32-41
Nitrógeno (% de ST)	1.5-4	2.4-5
Fósforo (% de ST)	0.8-2.8	2.8-11
Potasio (% de ST)	0-1	0.5-0.7
pH	5-8	6.5-8
Alcalinidad (mg/L como CaCO <sub>3</sub> )	500-1,500	580-1,100
Ácidos orgánicos (mg/L como acético)	200-2,000	1,100-1,700

U.S. EPA, 1979.

### 1.3 TRATAMIENTO DE LOS LODOS RESIDUALES

Los objetivos principales del tratamiento de los lodos son reducir su volumen, facilitando de esta manera su manipulación y aumentar su estabilidad biológica, a fin de producir un material suficientemente inofensivo para su disposición. Generalmente, los lodos residuales pasan por el siguiente tren de tratamiento para su disposición final: pretratamiento, espesamiento, estabilización, acondicionamiento (incluyendo desinfección), deshidratación y secado.

#### 1.3.1. Pretratamiento

Los procesos de pretratamiento de un lodo tienen la finalidad tanto de que la alimentación a las instalaciones de tratamiento sea relativamente constante y homogénea así como prevenir el desgaste de ciertos equipos como bombas y sistemas de distribución. En el pretratamiento se manejan generalmente cuatro operaciones (Metcalf y Eddy, 1996): Dilaceración, desarenado, mezclado y almacenamiento.

#### 1.3.2. Espesamiento

Consiste en reducir el volumen del lodo a manipular, aumentando la concentración de los sólidos en el mismo. En esta etapa, un pequeño incremento en la concentración de los sólidos, redundará en una enorme reducción en el volumen de los lodos. El espesado se suele llevar a cabo mediante procedimientos físicos, que incluyen la flotación, el espesado por gravedad y la centrifugación (Winkler, 1994).

### 1.3.3. Estabilización

Es el proceso en el que se busca eliminar los olores desagradables, inhibir, reducir o eliminar el potencial de descomposición espontánea, reducir la presencia de patógenos, disminuir la posibilidad de atracción de vectores y transformar en la medida de lo posible a la materia orgánica en compuestos más simples y asimilables, esto último sobre todo si se le va a dar un uso agrícola al lodo. Los procesos de estabilización pueden dividirse en: biológicos y químicos (Metcalf y Eddy, 1996).

#### a) Estabilización biológica

La estabilización de los lodos se da a través de la acción de microorganismos, principalmente bacterias, existen tres tipos principales de procesos biológicos para la estabilización.

- **Digestión anaerobia:** Este proceso se encuentra entre las formas de tratamiento de residuos más antiguas y es la más empleada en la actualidad para la estabilización de lodos. En la digestión anaerobia la materia orgánica se estabiliza mediante microorganismos en ausencia de oxígeno, produciendo principalmente metano y dióxido de carbono, si el proceso es manejado adecuadamente. Los reactores de digestión anaerobia pueden ser cilíndricos, rectangulares o con forma de huevo, los cilíndricos son los más populares aunque actualmente han proliferado los reactores tipo huevo por favorecer los fenómenos de transferencia de masa y eliminar la necesidad de limpiar los tanques.
- **Digestión aerobia:** En este caso, la estabilización de los lodos se da en presencia de oxígeno, obteniendo como productos finales dióxido de carbono, agua y amoníaco, el cual puede oxidarse, si las condiciones lo permiten, hasta nitrato. Este proceso suele emplearse en el tratamiento de lodos secundarios y en plantas con capacidad inferior a 20,000 m<sup>3</sup>/d, sin embargo, recientemente se ha empleado en plantas de mayor capacidad. Al igual que en la digestión anaerobia, los reactores son preferentemente cilíndricos.
- **Composteo:** Es un proceso generalmente aerobio que implica una compleja destrucción de la materia orgánica junto con la producción de ácido húmico para dar lugar a un producto final estable. A diferencia de la digestión tanto aerobia como anaerobia, en el composteo se necesita deshidratar el lodo, es decir, se requiere un porcentaje de sólidos entre 40 - 60%. El sistema de composteo más utilizado es la **pila estática aireada**, que consiste en una red de tuberías de conducción de aire sobre las que se distribuye una mezcla de lodo deshidratado y un material de soporte, este último es un material orgánico o inorgánico, astillas de madera, por ejemplo, que se añade al lodo para proporcionarle soporte estructural y aumentar su porosidad con el fin de mejorar la aireación. Una característica importante del composteo es que conforme se estabiliza la materia orgánica, la pila se va calentando hasta alcanzar temperaturas que permiten la destrucción de organismos patógenos.

#### b) Estabilización química

La estabilización química de lodos consiste en el uso de compuestos químicos como la cal y el cloro. La estabilización con cloro se usa escasamente, mientras que la cal es ampliamente usada, siendo de bajo costo (Lue-Hing *et al*, 1992).

En la estabilización con cal se añade suficiente cal al lodo para elevar su pH por encima de 12, lo cual desfavorece la supervivencia de microorganismos. Mientras se mantenga dicho pH, el lodo no se pudrirá, no creará olores y no representará problemas de salud

pública.

#### **1.3.4. Acondicionamiento**

Se utiliza para facilitar la concentración del lodo con fines de su subsecuente deshidratación. El acondicionamiento puede lograrse mediante la adición de tierra, iones inorgánicos polivalentes o polielectrolitos, logrando reducir la humedad del lodo hasta niveles del 65%.

Otro tipo de acondicionamiento es el térmico el cual requiere altas temperaturas (180 - 200 °C) y presiones (10 - 20 atm) durante cortos periodos de tiempo. En este tipo de acondicionamiento, aparte de destruir la afinidad al agua de los sólidos, se consigue la esterilización de los lodos.

#### **1.3.5 Deshidratación**

Es la remoción física de suficiente cantidad de agua de los lodos para que adquiera características casi sólidas. El lodo se desea de esta manera por alguna o varias de las siguientes razones: Se reduce el costo de transporte al reducir el volumen del lodo, es más fácil de manipular que un lodo líquido, es necesario para procesos subsecuentes como incineración o composteo, se reduce el potencial de putrefacción en algunos casos y se reduce la producción de lixiviados si el lodo se dispone en un relleno sanitario.

Para la deshidratación se utilizan tecnologías como la filtración al vacío con tambor rotatorio, filtros banda, filtros prensa, lechos de secado y en mucha menor proporción el centrifugado, a pesar de ser el más eficiente (Winkler, 1994)

#### **1.3.6. Secado**

Es una operación unitaria que involucra la reducción del contenido de agua por la vaporización de ésta al aire. Si se utilizan lechos de secado, la evaporación a la atmósfera se produce por la diferencia en las presiones de vapor. Pero, si se utiliza secado mecánico se aporta calor externo para aumentar la capacidad de retención de vapor del aire ambiental y para proporcionar el calor latente necesario para la evaporación. Después del secado, el contenido de humedad del lodo es menor al 10%. Los lodos secos pueden aprovecharse como fertilizantes o acondicionadores del terreno, pero los costos de secado son elevados.

### **1.4. NORMATIVIDAD DE LOS LODOS RESIDUALES**

#### **1.4.1. En México**

El tratamiento y evacuación de los lodos tanto primarios como secundarios, es una necesidad apremiante no sólo de la República Mexicana, sino también de la ingeniería ambiental en el ámbito mundial. La gran mayoría de las plantas de tratamiento de aguas residuales en el país no ven de buena manera el tratamiento y disposición de sus lodos, debido a la inversión que representa, de ahí la necesidad de imponer criterios que aseguren un buen tratamiento de los lodos y por ende un uso o disposición que represente el menor riesgo posible para el ser humano y el ecosistema.

En México, es escasa e inespecífica la normatividad tanto federal como estatal que regula el tratamiento y disposición de los lodos residuales, por el momento, los lodos residuales están regulados por la NOM-052-ECOL/93 referente a desechos peligrosos en general. La NOM especifica que se consideraran peligrosos aquellos que no cumplan con las características denominadas en su conjunto como **CRETIB** (corrosividad, reactividad, explosividad, toxicidad, inflamabilidad y biológico-infeccioso). La norma no menciona microorganismos indicadores específicos, ni establece límites que ayuden a restringir la característica biológica – infecciosa en los lodos residuales. Por lo que al necesitar criterios para garantizar la seguridad en el manejo y uso del lodo residual se suele recurrir a lo propuesto por la U.S. EPA (IMTA, 1998).

#### **1.4.2. En los Estados Unidos de América**

En los Estados Unidos de América, el uso y disposición de lodos residuales está regulado bajo el capítulo 40 del reglamento del código federal (CFR), apartado 503 (U.S. EPA, 1992).

En el apartado se contempla:

- Las características de los biosólidos, en general.
- Los sitios de disposición.
- Métodos y formas de transportar, distribuir y comercializar los biosólidos.
- Los lineamientos específicos para la aplicación.
- Los lineamientos específicos y tecnologías requeridas para llevar a cabo la reducción de organismos patógenos y la atracción de organismos vectores.
- Lineamientos específicos para realizar la incineración de los lodos.
- Las prácticas de administración y manejo de biosólidos, estándares de operación y el tipo y frecuencia de concentración.

Particularizando en los lineamientos específicos y tecnologías requeridas para llevar a cabo la reducción de organismos patógenos y la atracción de organismos vectores con el fin de delimitar la calidad microbiológica que debe cumplir un lodo dependiendo de su disposición final, la U.S. EPA ha clasificado a los lodos en clase B y clase A. Ambos tipos de lodo deben cumplir con requerimientos relacionados con microorganismos patógenos y con la atracción de organismos vectores (organismos que pueden transportar los patógenos, pudiendo ser insectos, roedores, pájaros, etc.)

##### **1.4.2.1. Lodos clase B**

Un lodo clase B, no cuenta con una gran calidad microbiológica y puede ser aplicado en campos de cultivo, bosques, zonas de pastoreo de animales y lugares de acceso público bajo la restricción de disponerlos hasta que los factores ambientales reduzcan sustancialmente los patógenos (U.S. EPA, 1994).

Para obtener un lodo clase B, se pueden cumplir cualquiera de las siguientes alternativas:

#### **a) Monitoreo de coliformes fecales**

Esta opción requiere que siete muestras de lodo tratado sean colectadas al momento de su uso o disposición y que la densidad media de coliformes fecales de esas muestras sea menor que 2,000,000 UFC o NMP por gramo de sólidos totales en base seca. La densidad de coliformes es utilizado como un indicador de la densidad promedio de patógenos virales y bacterianos.

**b) Uso de procesos que reducen significativamente los patógenos (PSRP).** Esta opción no requiere monitoreo microbiológico, únicamente pide que el lodo sea tratado bajo alguno de los siguientes procesos:

- Digestión aerobia.
- Secado con aire.
- Digestión anaerobia.
- Composteo.
- Estabilización con cal.

#### **c) Uso de procesos equivalentes a PSRP**

En este caso, la equivalencia se hace con respecto a las restricciones de patógenos.

#### **1.4.2.2. Lodos clase A**

Un lodo clase A presenta una alta calidad microbiológica y puede ser destinado para cualquier uso, incluso para su aplicación en jardines de casas particulares. Existen seis alternativas para lograr un lodo clase A, todas deben cumplir al momento de usar o disponer del lodo o al momento de darlo o venderlo empacado para su uso en suelo, con el siguiente requerimiento:

- Que la densidad de coliformes fecales en el lodo sea menor a 1,000 NMP por gramo de sólidos totales en base seca o que la densidad de *Salmonella sp.* en el lodo sea menor a 3 NMP por 4 gramos de sólidos totales en base seca.

Las seis alternativas son:

#### **a) Lodo residual tratado térmicamente**

Esta alternativa puede ser usada cuando el proceso de reducción de patógenos usa las condiciones tiempo-temperatura para reducir patógenos (tabla 4). Bajo esas circunstancias, la medición de patógenos específicos no es necesaria y solo es necesario demostrar que la densidad de coliformes fecales es menor a 1,000 NMP por gramos de sólidos totales o que los niveles de *Salmonella sp.* están por debajo de 3 NMP por 4 gramos de sólidos totales y que las condiciones tiempo – temperatura se cumplieron.

#### **b) Lodo residual tratado en procesos que involucren alto pH y alta temperatura**

Esta opción describe condiciones de proceso que mezclan altas temperaturas con altos valores de pH, lo cual ha demostrado ser efectivo en la reducción de patógenos por debajo de los niveles detectables. Las condiciones requeridas para este tipo de procesos son:

- Elevar el pH por encima de 12 por más de 72 horas.
- Mantener la temperatura por arriba de 52°C al menos por 12 horas durante el periodo

en que el pH es mayor a 12.

- Secado con aire por encima del 50% de sólidos después de un periodo de 72 horas de pH elevado.

#### **c) Lodo residual tratado con otros procesos**

Aplica para lodos tratados en procesos que no cumplen con las condiciones de operación de las alternativas a y b. Esta opción debe cumplir los siguientes requerimientos para demostrar una adecuada reducción de patógenos:

- Que la densidad de coliformes fecales sea menor que 1,000 NMP por gramo de sólidos totales o la densidad de *Salmonella sp.* sea menor que 3 NMP por 4 gramos de sólidos totales, en el momento en que el lodo es usado o dispuesto.
- La densidad de virus entéricos debe ser menor que 1 UFP por 4 gramos de sólidos totales.
- La densidad de huevos viables de helmintos debe ser menor que 1 por 4 gramos de sólidos totales.

#### **d) Lodo residual tratado en procesos desconocidos**

Esta alternativa aplica en las siguientes situaciones:

- El proceso de tratamiento del lodo es desconocido.
- El lodo tratado fue producido bajo condiciones de operación menos restrictivas que las que convencionalmente se utilizan para producir un lodo clase A bajo otras alternativas.
- Los antecedentes del lodo en cuestión no son conocidos.

Los requerimientos que debe cumplir para demostrar una adecuada reducción de patógenos son los mismos que para la opción anterior.

#### **e) Uso de procesos para la reducción adicional de patógenos, PFRP**

Esta alternativa establece que un lodo residual puede considerarse como clase A si:

- Ha sido tratado con alguno de los PFRP: Digestión aerobia termofílica, pasteurización, composteo, secado con calor, tratamiento con calor y radiación con rayos beta o gamma.
- La densidad de coliformes fecales es menor que 1,000 NMP por gramo de sólidos totales o la densidad de *Salmonella sp.* es menor que 3 NMP por 4 gramos de sólidos totales, al momento de usar o disponer el lodo.

#### **f) Uso de procesos equivalentes a los PFRP**

Usando esta alternativa, un lodo puede ser considerado como clase A si:

- Ha sido tratado con algún proceso equivalente a PFRP.
- La densidad de coliformes fecales es menor que 1,000 NMP por gramo de sólidos totales o la densidad de *Salmonella sp.* es menor que 3 NMP por 4 gramos de sólidos totales, al momento de usar o disponer el lodo.

Para propósitos prácticos, un proceso puede considerarse como equivalente de PFRP si cumple exitosamente con los requerimientos de la alternativa c.

**TABLA 4. Condiciones tiempo-temperatura para la alternativa a.**

Condición	Aplica a	Relación tiempo-temperatura requerida
A	Lodos con al menos 7% de sólidos (excepto aquéllos que aplican a la condición B)	$D = 131,700,000/10^{0.1400t}$ $t \geq 50^{\circ}\text{C}$ $D \geq 0.0139$
B	Lodos con al menos 7% de sólidos que están constituidos por pequeñas partículas calentadas con gases calientes o líquidos inmiscibles	$D = 131,700,000/10^{0.1400t}$ $t \geq 50^{\circ}\text{C}$ $D \geq 1.74 \times 10^{-4}$
C	Lodo con menos de 7% de sólidos tratado en procesos de menos de 30 minutos de contacto	$D = 131,700,000/10^{0.1400t}$ $1.74 \times 10^{-4} \leq D \leq 0.021$
D	Igual que C pero al menos 30 minutos de contacto	$D = 50,070,000/10^{0.1400t}$ $t \geq 50^{\circ}\text{C}$ $D \geq 0.021$

U.S. EPA, 1992

#### 1.4.2.3. Reducción de las condiciones de atracción de organismos vectores

Los patógenos en un lodo residual representan un riesgo para la salud únicamente si existe la manera de que se pongan en contacto con humanos y/o animales. El contacto puede darse de dos tipos: Directo o indirecto.

- a) *Directo*: como su nombre lo indica, sucede cuando humanos o animales entran en contacto directamente con el lodo residual e,
- b) *Indirecto*: a través de organismos vectores. Un vector es cualquier organismo capaz de transmitir un patógeno de un organismo a otro ya sea mecánicamente (transportando al patógeno de un lugar a otro) o biológicamente (teniendo un papel específico en el ciclo de vida del patógeno).

Dentro de vectores típicos encontramos principalmente insectos, roedores y pájaros.

El apartado 503 ofrece 12 alternativas para demostrar la reducción de las condiciones de atracción de vectores. Esas alternativas están diseñadas ya sea para reducir la atracción del lodo hacia los vectores (de la opción a a la h y la l) o para prevenir que los vectores entren en contacto con el lodo residual (de la opción i a la k). Por supuesto que la demostración de una reducción exitosa en la atracción de vectores, debe estar acompañada de un cumplimiento exitoso de los requerimientos para patógenos, tanto para lodos clase A como clase B, excepto para lodos en donde la reducción en las condiciones de atracción de vectores se realizó mediante tratamiento alcalino.

Las 12 opciones son:

##### a) Reducción en el contenido de sólidos volátiles

Bajo esta opción, la reducción en la atracción de vectores es lograda si la masa de sólidos

volátiles en el lodo es reducida al menos en un 38% durante el tratamiento. La reducción de los sólidos volátiles es lograda típicamente mediante digestión aerobia o anaerobia.

#### **b) Digestión adicional de lodo digerido anaerobicamente**

Frecuentemente, los lodos residuales son recirculados hacia el tratamiento biológico del agua residual o han estado por mucho tiempo en el sedimentador secundario, por lo que puede ya haber sido parcialmente digerido, así que la reducción de sólidos en el tratamiento del lodo puede ser menor al 38%. En esta opción se considera que un lodo digerido anaerobicamente cumple de manera satisfactoria con la reducción en la atracción de vectores si pierde menos del 17% de sólidos volátiles cuando es digerido por lote en condiciones anaerobias a 30 – 37 °C durante 40 días.

#### **c) Digestión adicional de lodo digerido aerobicamente**

En esta opción, se considera que un lodo residual tratado aerobicamente con un porcentaje de sólidos del 2% o menos, cumple adecuadamente con la reducción de la atracción de vectores si pierde menos del 15% de sólidos volátiles cuando es digerido por lote de manera aerobia a 20 °C o más durante 30 días. Las razones para esto son básicamente las mismas que para la alternativa b.

#### **d) Velocidad específica de consumo de oxígeno (SOUR) para lodo digerido aerobicamente**

Para esta alternativa, la reducción de las condiciones de atracción de vectores puede también ser demostrada si la SOUR del lodo a ser usado o dispuesto es igual o menor que 1.5 mg de oxígeno/h\*gST a 20 °C. Estas consideraciones están basadas en el hecho de que si el lodo consume muy poco oxígeno, su valor como fuente alimenticia para los vectores es bajo y por ende les resultara poco atractivo.

#### **e) Procesos aerobios a más de 40 °C**

El lodo residual debe ser tratado por 14 días o más en procesos aerobios a más de 40°C y cuya temperatura promedio haya sido mayor que 45 °C. Esta opción aplica principalmente a lodo residual composteado, pero la legislación no lo limita específicamente a tal proceso.

#### **f) Tratamiento alcalino**

Se considera que un lodo residual cumple con la reducción de la atracción de vectores si un tratamiento alcalino generó las siguientes condiciones:

- Alcanzar un pH de al menos 12.
- Mantener un pH de al menos 12 sin la adición de más compuestos alcalinos por 2 horas.
- Mantener un pH de al menos 11.5 sin la adición de más compuestos alcalinos por 22 horas.

#### **g) Reducción de la humedad del lodo residual conteniendo sólidos estabilizados**

Se considera bajo esta opción que un lodo residual cumple con la reducción de la atracción de vectores si no contiene sólidos primarios no estabilizados y si el contenido de sólidos es de al menos 75% antes de que el lodo sea mezclado con otros materiales. La reducción debe ser lograda removiendo agua y no adicionando sólidos inertes.

#### **h) Reducción de la humedad del lodo residual conteniendo sólidos no estabilizados**

En este caso, el contenido de sólidos debe ser del 90% o más, al igual que en la opción

anterior, se debe remover agua y no diluir con sólidos inertes. Un secado tan extremo como en este caso, limita severamente la actividad biológica y descompone los compuestos volátiles que atraen a los vectores.

#### **i) Inyección**

Se acepta la reducción en la atracción de vectores si el lodo es inyectado por debajo del suelo. Se debe comprobar que dentro de la hora posterior a la inyección, no existen cantidades significativas del mismo en la superficie y, si el lodo es clase A con respecto a patógenos, debe ser inyectado dentro de las 8 posteriores a su salida del proceso de reducción de patógenos. En esta alternativa lo que se hace es poner una barrera de tierra entre el lodo y los vectores.

#### **j) Incorporación del lodo residual al suelo**

En este caso, el lodo debe ser incorporado al suelo dentro de las 6 horas subsecuentes a su aplicación superficial. Si el lodo es clase A, el tiempo entre procesamiento e incorporación después de la aplicación superficial, no debe exceder las 8 horas.

#### **k) Cobertura del lodo residual**

El lodo dispuesto superficialmente debe ser cubierto con suelo o algún otro material, al final de cada día de operación. Esto al igual que en la opción i, crea una barrera entre el lodo y los vectores, mientras el suelo hace su trabajo de reducción de patógenos.

#### **l) Elevación del pH de fosas sépticas**

Esta alternativa aplica solo para fosas sépticas. Para lograr la reducción de las condiciones de atracción de vectores, el pH debe elevarse hasta 12 o más por 30 minutos sin adicionar más compuestos alcalinos. Esta opción es un poco menos severa que la f.

### **1.5. USO (APLICACIÓN) O DISPOSICIÓN DEL LODO RESIDUAL**

El lodo generado durante el tratamiento de las aguas residuales puede ser aplicado en suelos agrícolas, áreas dañadas (campos minados, sitios de construcción, etc.), bosques, sitios de recreo (parques, canchas de golf, etc), cementerios, autopistas y aeropuertos o dispuesto mediante incineración y disposición superficial.

#### **1.5.1. Características como fertilizante**

Los lodos residuales contienen compuestos orgánicos e inorgánicos que se remueven del agua residual durante su tratamiento. Los cultivos, para crecer, necesitan nutrientes y agua. Los nutrientes que fertilizan al suelo incluyen carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y potasio principalmente. Las plantas toman estos elementos para fabricar compuestos que le son esenciales y que también lo son para los seres humanos y animales. Los lodos residuales cuentan con estos nutrientes y son, en consecuencia, una rica fuente de los mismos para las plantas (U.S. EPA, 1994b).

Algunos de los beneficios de la aplicación de lodos al suelo incluyen el reciclaje de nutrientes esenciales (como ya se mencionó), el mejoramiento de suelos por la aportación de materia orgánica, incremento en el rendimiento de cultivos (Cheremisinoff, 1994), fijación de contaminantes en la matriz orgánica de los lodos residuales, evitando su presencia en los cultivos (U.S. EPA, 1994c), en el caso de lodos estabilizados con cal, existe una inmovilización adicional de metales pesados (Lue-Hing *et al.*, 1992). Algunos de los problemas asociados con la aplicación de lodos residuales pueden ser el riesgo de la contaminación de plantas y acuíferos con patógenos y elementos químicos, la

presencia de olores desagradables en los sitios de aplicación o puede ocasionarse contaminación por nitratos en acuíferos.

### 1.5.2. Aplicación de lodos residuales a suelos

Los lodos provenientes del tratamiento de las aguas residuales son materiales que pueden ser reciclados para obtener un beneficio de ellos. El término **aplicación** significa que los lodos se colocan en los suelos para obtener alguna ventaja de su contenido de nutrientes o de sus propiedades para acondicionar suelos. Existen dos grupos de suelos a los que pueden aplicarse lodos residuales:

- Suelo agrícola, forestal y sitios de acondicionamiento, denominados en su conjunto como sitios de contacto no público.
- Parques públicos, viveros, campos de golf, jardines familiares, denominados en su conjunto como sitios de contacto público.

Los lodos destinados a la aplicación se dividen en varios tipos dependiendo principalmente de su contenido de elementos químicos contaminantes, sin embargo, su contenido de microorganismos patógenos y la reducción en las condiciones de atracción para los vectores también son determinantes para esta clasificación (tabla 5 y 6).

**TABLA 5. Requerimientos de reducción de patógenos y de atracción de vectores para lodos residuales aplicables al suelo**

Tipo de lodo aplicable al suelo	Clase de lodo por su contenido de patógenos	Opciones para la reducción de atracción de vectores
EQ	A	1 a 8
PC	A	9 ó 10
	B	1 a 10
CPLR	A	1 a 10
	B	1 a 10
APLR	A	1 a 8

U.S. EPA, 1994a.

EQ = Lodos de calidad excepcional. PC = Lodos con concentración admisible de contaminantes

CPLR = Lodos con una tasa de aplicación acumulativa de contaminante

APLR = Lodos con tasa anual de aplicación del contaminante

**TABLA 6. Límites de contaminantes químicos**

Contaminante	Concentraciones tope para todo lodo que se aplique al suelo (mg/kg, en base seca)	Límites para lodos EQ y PC (mg/kg, en base seca)	Carga acumulativa para lodos CPLR (kg/Ha)	Carga anual de contaminantes para lodos APLR (kg/Ha*Año)
Arsénico	75	41	41	2.0
Cadmio	85	39	39	1.9
Cromo	3000	1200	3000	150
Cobre	4300	1500	1500	75
Plomo	840	300	300	15
Mercurio	57	17	17	0.85
Zinc	7500	2800	2800	140
Molibdeno	75	-	-	-
Níquel	420	420	420	21
Selenio	100	36	100	5.0

U.S. EPA, 1994a.

### 1.5.3. Disposición superficial de lodos residuales

La **disposición** superficial consiste en colocar lodos en un área de suelo como su destino final, aunque en algunos casos los lodos depositados pueden aportar beneficios. Las formas de disposición incluyen: Monodepósito, embalses y lagunas, pilas, sitios específicos de disposición (generalmente en la planta de tratamiento) y sitios específicos para usos benéficos.

Para disponer un lodo residual, se establecen límites para el contenido de arsénico, cromo y níquel, de acuerdo a la distancia entre el lodo que se dispone y el perímetro del área destinada para su disposición como puede observarse en la tabla 7. Estos límites se aplican a sitios de disposición superficial sin capas impermeables (arcilla o geomembranas sintéticas, por ejemplo) ni sistemas de colección de lixiviados. Hay dos formas para cumplir con los criterios de concentración de contaminantes. La primera es cumplir con lo estipulado en la tabla 7 y la segunda es cumplir con los límites establecidos por la autoridad local, si es que dichos límites son diferentes a los expuestos en la tabla 7.

**TABLA 7. Límites de contaminantes para disposición superficial**

Distancia entre el lodo y el perímetro del terreno (m)	Contaminante (mg/kg, en base seca)		
	Arsénico	Cromo	Níquel
0-25	30	200	210
25-50	34	220	240
50-75	39	260	270
75-100	46	300	390
100-125	53	360	390
125-150	62	450	420
150	73	600	420

U.S. EPA, 1994a.

**a) Prácticas de manejo para la disposición superficial.**

La mayoría de estas prácticas se aplican a todos los sitios de disposición, algunas, sin embargo, se aplican sólo para sitios con capas impermeables, sistemas de recolección de lixiviados y con cubiertas. Las prácticas a seguir son las siguientes:

- No deben afectar a especies en peligro de extinción.
- No deben interrumpir el flujo de una inundación con un período de retorno de 100 años.
- El sitio de disposición debe encontrarse en terrenos geológicamente estables, y no en terrenos donde ha habido gran movimiento como pendientes abruptas o superficies que se colapsan por estar en zonas calcáreas o terrenos de minas, mucho menos en zonas con una sismicidad considerable (con más de 10% de probabilidad de tener movimientos de aceleración horizontal de 0.10 veces la gravedad en 250 años).
- No se pueden colocar sitios de disposición en suelos saturados de humedad como pantanos.
- Se debe tener la capacidad de coleccionar el escurrimiento del sitio de disposición superficial tras una tormenta de 24 horas con periodo de retorno de 25 años.
- Sólo donde existan capas impermeables, debe colocarse el lixiviado.
- Sólo donde exista cubierta del sitio de disposición, debe cumplirse con los límites de concentración de metano en el aire.
- Se prohíbe el crecimiento de cultivos (excepto si lo permite la autoridad competente).
- Se prohíbe la práctica del pastoreo de animales en el sitio de disposición (excepto si lo permite la autoridad competente).
- Debe restringirse el acceso público.

- Los lodos residuales no deben contaminar acuíferos.

**b) Requerimientos de reducción de patógenos y de atracción de vectores para lodos dispuestos superficialmente.**

Los requerimientos para la reducción de patógenos son:

- Cubrir diariamente los lodos con una capa de suelo u otro material.
- Cumplir con los requerimientos de reducción de patógenos para lodos clase A o clase B, dependiendo del lodo en que se vaya a disponer.

La reducción de las condiciones de la atracción de vectores se alcanza con cualquiera de las opciones propuestas anteriormente para este fin.

**c) Disposición de lodos residuales como cubierta diaria y final en rellenos sanitarios.**

Una de las prácticas de manejo para lodos residuales que ha sido menos divulgada es su uso como cubierta diaria y final en rellenos sanitarios municipales. Los rellenos sanitarios municipales requieren grandes cantidades de material para su operación. Cuando un relleno se cierra es necesaria la aplicación de una capa final sobre la que crezca vegetación evitando la erosión de la celda.

# CAPÍTULO 2

## DIGESTIÓN ANAEROBIA TERMOFÍLICA

### 2.1 ESTADO DEL ARTE

La digestión anaerobia es el método más común de estabilización de lodo con producción simultánea de energía. El primero en tener conocimiento de que se producía un gas combustible que contiene metano fue Donald Cameron, que construyó el primer tanque séptico en la ciudad de Exeter, Inglaterra, en 1895, del que recogió y utilizó el gas para el alumbrado de los alrededores de la planta.

En el periodo comprendido entre 1920 y 1935 se estudió ampliamente el proceso de digestión anaerobia, realizando mejoras considerables en los reactores, principalmente el calentamiento y el mezclado, logrando con esto mejores rendimientos. De hecho, los conceptos de digestión de alta y baja tasa son aplicables independientemente de que el proceso sea mesofílico o termofílico.

La digestión anaerobia termofílica de lodos ha sido investigada desde los años veinte, encontrando estudios muy importantes sobre la producción termofílica de metano a partir de residuos, como el realizado por Rudolfs y Heukelekian a fines de esa década (Zinder, 1988). Desde ese tiempo, se encontró que la digestión anaerobia termofílica tenía velocidades de reacción mayores a las experimentadas en condiciones mesofílicas y favorecía la sedimentabilidad de los sólidos, esos dos aspectos han sido ampliamente corroborados en fechas más recientes (Hashimoto, 1982; Varel *et al.*, 1980), además, se ha demostrado que la reducción de microorganismos indicadores y patógenos es más eficiente a altas temperaturas (Varel *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1989). Hashimoto en 1982 encontró que la velocidad máxima de crecimiento,  $\mu_m$ , y la tasa de utilización de sustrato para la digestión anaerobia de residuos, incrementa linealmente con la temperatura entre 20 y 60 °C y que por encima de los 60 °C había un descenso en el valor de  $\mu_m$ . Hashimoto también encontró que cuando las cargas orgánicas eran altas o los tiempos de retención cortos, la digestión anaerobia a altas temperaturas podía ser mucho más favorable que bajo condiciones mesofílicas, y de hecho lo es, ya que se ha demostrado en experimentos de laboratorio que la digestión termofílica aumenta las capacidades de los digestores mediante la adición de calor, no representa a la larga costos adicionales (Rowe, 1971) y puede tener una tasa de producción de biogás hasta 50% más alta que la digestión mesofílica (Pfeffer, 1974)

Por otro lado, se han hecho algunos estudios examinando el efecto combinado de la temperatura y el ion amonio. El ion amonio es un nutriente necesario para el crecimiento del consorcio bacteriano anaerobio (McCarty, 1964), pero cuando las concentraciones exceden un cierto límite, la metanogénesis se inhibe (McCarty y McKinney, 1961; McCarty, 1964; Koster y Lettinga, 1984). Se ha encontrado también, que la cantidad de amonio libre, incrementa con la temperatura, lo cual redundaría en un incremento de los ácidos grasos volátiles (metabolitos intermedios del proceso anaerobio), por lo que se tiene mayor concentración de estos en la digestión anaerobia termofílica que en la mesofílica (Garber *et al.*, 1975; Zeeman *et al.*, 1985).

Desde el punto de vista microbiológico, el primer hecho importante fue el aislamiento de la primera especie anaerobia termofílica, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, de un digestor de lodos en 1972 por Zeikus y Wolfe, la cual crecía de manera óptima entre los 65 y 70 °C. A partir de ahí se intensificaron los esfuerzos para develar los aspectos

fundamentales de la microbiología termofílica, descubriendo, tal vez, como lo más importante, el hecho de su versatilidad nutricional, existiendo representantes tanto autótrofos como heterótrofos, así como fotótrofos y quimiótrofos (Sundaram, 1986). La gran duda de cómo es que los termofílicos resistían tales temperaturas, no ha sido resuelta del todo, pero se ha encontrado que cuentan con proteínas más estables térmicamente debido al aumento de interacciones moleculares entre residuos de aminoácidos específicos y la intervención de diversos cofactores, su citoplasma contiene menos agua interna, ya que la empaquetan, tienen un alto grado de hidrofobicidad y cuentan en su cubierta celular con ácidos grasos más largos y más saturados (Koga *et al*, 1993).

Una de las desventajas que se le ha atribuido a la digestión anaerobia, es su supuesta inestabilidad, sin embargo, lo más probable es que falta entender y aplicar correctamente los fundamentos de la misma. La falta de capacitación en este sentido, redundará en ingenieros ambientales y personal de plantas de tratamiento que no tienen la habilidad suficiente para manejar un proceso anaerobio.

## **2.2. BIOQUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA**

El tratamiento biológico anaerobio de lodos es un proceso microbiano complejo que involucra muchos tipos de bacterias trabajando en consorcio. El adecuado funcionamiento de la digestión anaerobia es dictado por el balance de los principales tipos de bacterias, por lo que sólo se puede entender la digestión anaerobia, entendiendo los fundamentos del desarrollo de las diferentes bacterias tanto anaerobias como facultativas que participan en el proceso.

### **2.2.1. Bioquímica**

El objetivo principal de la digestión anaerobia de lodos residuales es la estabilización de la materia orgánica, dándose fenómenos simultáneos como la producción de energía a través de biogás y la reducción de olores, de patógenos y de la masa de sólidos. La estabilización de la materia orgánica se consigue transformándola en biomasa y compuestos inorgánicos en su mayoría volátiles: CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>S, todo esto en ausencia de oxígeno molecular. Lo ideal en un digestor anaerobio es que la transformación se incline hacia la formación de metano como principal producto final, para esto debe evitarse que existan concentraciones limitantes de nitratos y sulfatos en el influente. Pero, no debe asumirse que cualquier proceso anaerobio en la naturaleza tendrá como principal producto final al metano. Cuando la digestión anaerobia se lleva a cabo a temperaturas elevadas ( 40 - 70 °C ), estamos hablando de digestión anaerobia termofílica.

La degradación de la materia orgánica en un digestor anaerobio se da en cinco etapas (esquemáticas en la figura 1): 1)hidrólisis (incluyendo la lisis de células bacterianas), 2) fermentación de aminoácidos, azúcares y alcoholes y β-oxidación de ácidos grasos de cadena larga, 3)acetogénesis y deshidrogenación, 4)metanogénesis a partir de acetato y 5)metanogénesis a partir de hidrógeno y dióxido de carbono. Como ya se mencionó, en la medida en que se incorporen sulfatos y nitratos, la eficiencia del sistema disminuye debido a que asumen la función de aceptores finales de la cadena de electrones, apareciendo N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S y mayor cantidad de CO<sub>2</sub>.

### **2.2.1.1. Hidrólisis**

En general las bacterias son incapaces de alimentarse de material orgánico particulado e insoluble, por lo que tienen que hidrolizar de manera extracelular tanto a los sólidos biológicos contenidos en el lodo (si los hay) como a los biopolímeros resultantes de esa primera hidrólisis (proteínas, carbohidratos y lípidos). Para eso cuentan con enzimas que liberan al medio o están asociadas a la pared celular. Una vez realizada la hidrólisis, los productos de la misma penetran a la célula y pueden ser metabolizados. El rompimiento de los biopolímeros genera a sus monómeros: aminoácidos, azúcares simples y ácidos grasos y alcoholes respectivamente, los cuales son rápidamente incorporados al ciclo metabólico celular.

Esencialmente, no ocurre estabilización del residuo orgánico durante esta fase, la materia orgánica es simplemente convertida para que pueda ser asimilada por las bacterias. Obviamente, bajo condiciones termofilicas, la hidrólisis se favorece y en general todo el proceso, pues se mejoran las interacciones microorganismo - sustrato.

### **2.2.1.2. Fermentación de aminoácidos, azúcares y alcoholes y $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadena larga.**

Una vez que se han obtenido los aminoácidos, azúcares, alcoholes y ácidos grasos de cadena larga, estos son fermentados o  $\beta$ -oxidados (ácidos grasos), dando lugar a metabolitos intermedios, principalmente ácidos carboxílicos de cadena corta como el propionato, el butirato y el acetato, hidrógeno y biomasa.

Como en la gran mayoría de ciclos degradativos de azúcares simples (hexosas o pentosas), el piruvato es el intermediario clave a partir del cual y según el tipo de microorganismo y las condiciones del medio, se forman los diferentes productos. Los productos más importantes de esta fermentación son lactato, propionato, acetato, butanodiol, formiato, isopropanol e hidrógeno.

Los aminoácidos generados en la etapa de hidrólisis pueden fermentarse directamente o en pares (funcionando uno como dador de protones y otros como aceptor de protones). Los productos de la degradación de los aminoácidos son acetato,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , metilaminas y ácidos carboxílicos de cadena corta con radicales metilo o fenilo, como el 2 - metilpropionato o el fenilacetato.

La  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos implica que estos son oxidados en el átomo de carbono  $\beta$  para dar un  $\beta$ -oxoácido, el cual sufre una escisión para dar ácido acético (o acetato) y un ácido graso con dos átomos de carbono menos (Lehninger, 1991). De esta manera, los principales productos de la transformación de los ácidos grasos de cadena larga, son acetato y ácidos carboxílicos de cadena corta (volátiles).

### **2.2.1.3. Acetogénesis y deshidrogenación.**

En esta etapa, los alcoholes, ácidos carboxílicos de cadena corta y compuestos aromáticos generados en la fase anterior, se degradan con producción de acetato,  $\text{CO}_2$  e hidrógeno, que son los sustratos principales de los microorganismos metanogénicos, aunque existen otros como el formiato, las metil, dimetil y trimetilaminas y los metilmercaptanos entre otros. La gama de sustratos para los microorganismos metanogénicos es tan reducida por que los potenciales de óxido - reducción propios de su

condición de anaerobios estrictos, no les permite oxidar otro tipo de sustratos

El balance entre la producción de hidrógeno y su consumo, es básico para que el proceso, termodinámicamente, sea factible.

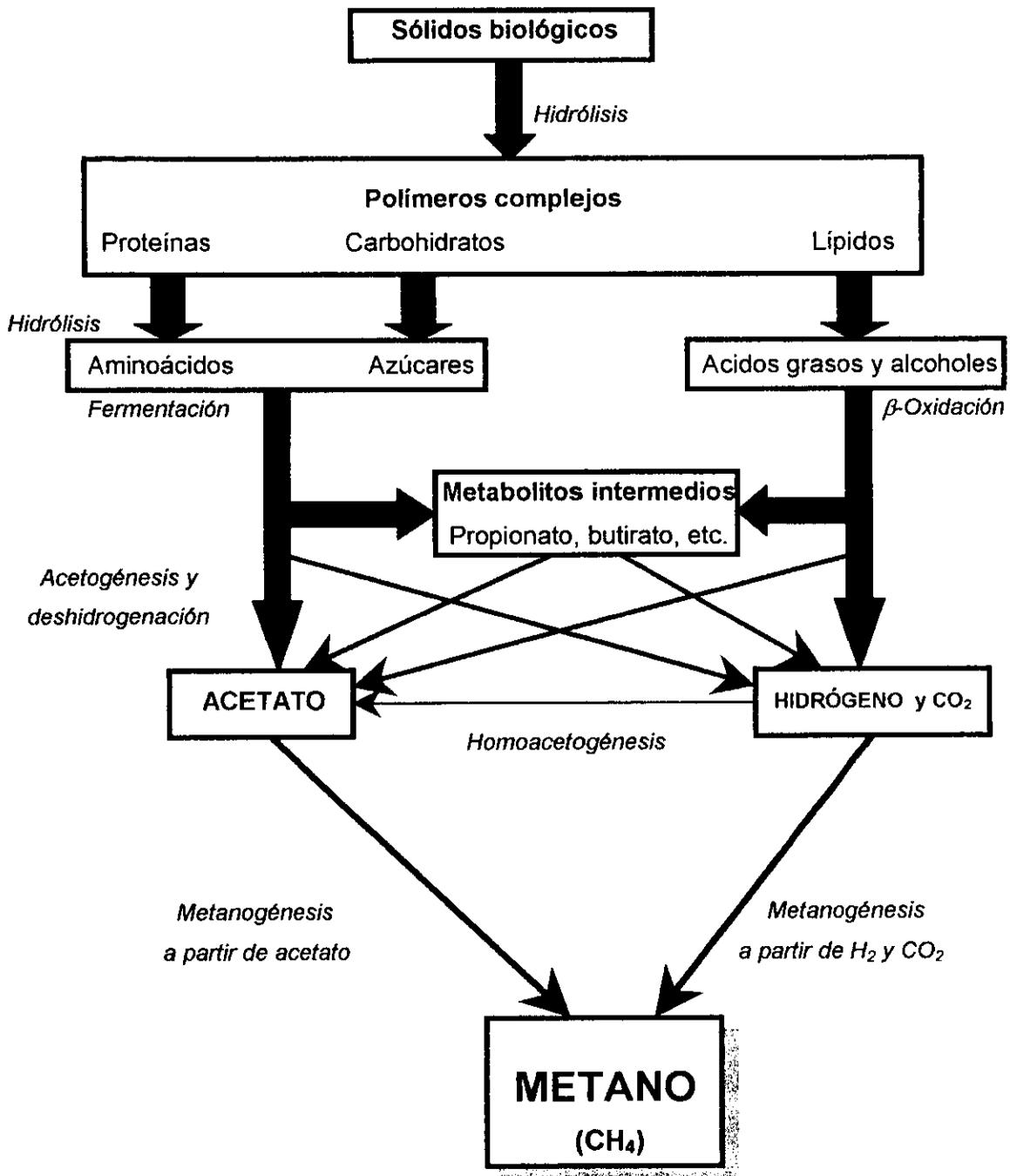


FIGURA 1. Digestión anaerobia

Parkin y Owen, 1986

#### 2.2.1.4. Metanogénesis a partir de acetato.

La producción de metano es el último paso en la digestión anaerobia y es donde se considera la completa estabilización de los residuos. Es la etapa limitante del proceso junto con la hidrólisis (cuando el sustrato es complejo). Una vez formado el metano, debido a que es altamente insoluble, abandona fácilmente el lodo dentro del gas que escapa del sistema. Desde el punto de vista termodinámico, si las condiciones son adecuadas, las reacciones de generación de metano son favorables aún cuando la energía disponible para el crecimiento es baja. La metanogénesis es una reacción muy delicada, que ocurre muy cerca del equilibrio y puede ser fácilmente inhibida. En general, la metanogénesis depende del consorcio microbiano para obtener las fuentes de energía y las condiciones de bajo potencial REDOX y pH que necesita para su desarrollo. En un digestor anaerobio, el metano generado a partir de acetato representa aproximadamente el 70% del total, dependiendo del tipo de sustrato orgánico. El restante 30% surge del CO<sub>2</sub> reducido por el hidrógeno.

La habilidad de convertir acetato a metano y CO<sub>2</sub> esta restringida a unos cuantos microorganismos, denominados **metanogénicos acetoclásticos**.

La energía libre de reacción asociada con la formación de metano a partir de acetato es muy baja y sólo alcanza para sintetizar 0.5 mol de adenosín trifosfato (ATP) (Thauer y Morris, 1984). Es evidente que la conversión de acetato a metano no le reporta gran ganancia energética a los metanogénicos, por lo que para obtener energía recurren a rutas metabólicas de formación de metano energéticamente más favorables como la reducción del dióxido de carbono a través del hidrógeno o la degradación de compuestos de un solo carbono como el formiato o las metilaminas. Lo anterior no ocurre cuando el acetato funciona como única fuente de energía, en ese caso, el microorganismo solo cuenta con la energía proveniente de la conversión de acetato a metano y por lo tanto, sus tiempos de duplicación son muy grandes (incluso días).

El metano surge principalmente a partir del grupo metilo del acetato (figura 2). Para que se dé la formación de metano, el acetato primero tiene que ser activado a acetil - CoA mediante la acetato cinasa y la fosfotransacetilasa (Kenealy y Zeikus, 1982), teniendo como intermediario al acetil-fosfato (Acetil - P). Una vez formado, el acetil - CoA es desdoblado en dos unidades de un carbono, una oxidándose para dar la metil-H<sub>4</sub>-metanopterin (CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>-MPT) y la otra oxidándose para dar CO (Fischer y Thauer, 1989). La CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>-MPT pasa a formar la metil-Coenzima M (CH<sub>3</sub>-S-CoM) debido a la acción de la Coenzima M (HS-CoM) que funciona como acarreadora de grupos metilo. Finalmente, la CH<sub>3</sub>-S-CoM se reduce a través de la metil-CoM reductasa para dar metano, mientras que el CO es oxidado a CO<sub>2</sub>. En este proceso, tanto el hidrógeno como el CO actúan como donadores de electrones.

Existen otras coenzimas y cofactores que participan en la metanogénesis a partir de acetato, pero el sodio es tal vez el más importante, ya que de él depende el desdoblamiento de la acetil-CoA y además, su intercambio con protones a nivel celular está involucrado en la síntesis de ATP.

En general, la reacción que da lugar a metano a partir de acetato es la siguiente:



Como puede verse en la ecuación 3, al final de la reacción no aparece el dióxido de

carbono, y esto es porque o se escapa al ambiente o pasa a formar parte de la alcalinidad de carbonatos, es decir, se convierte en  $\text{HCO}_3^-$ .

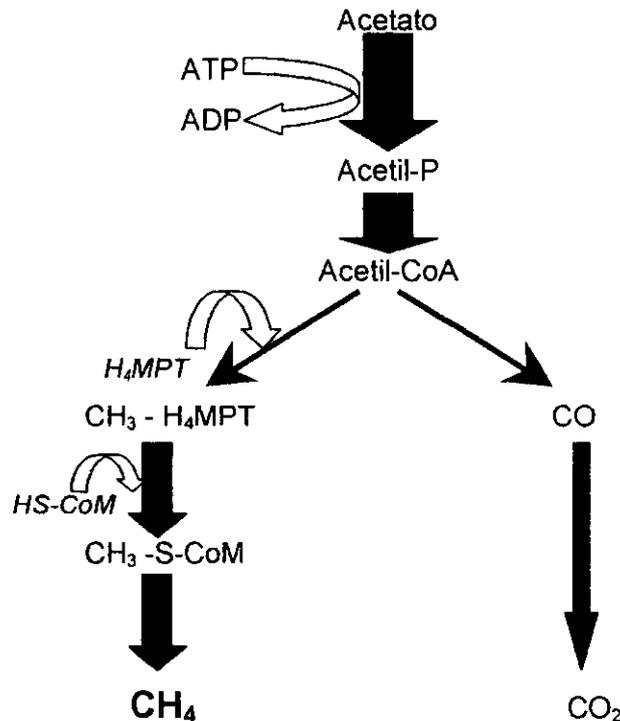


FIGURA 2. Metanogénesis a partir de acetato

Thauer, *et al.*, 1989

#### 2.2.1.5. Metanogénesis a partir de hidrógeno y dióxido de carbono.

La asociación sintrófica que debe existir entre las bacterias productoras de hidrógeno y los metanógenos oxidadores de hidrógeno o **hidrogenofílicos**, de manera que se aseguren concentraciones bajas de hidrógeno ( $< 1$  atm), es sumamente importante para el desempeño exitoso de la digestión anaerobia. De hecho, si la digestión anaerobia se encuentra operando bien, el hidrógeno es difícilmente detectable, ya que es rápidamente oxidado, reduciendo el  $\text{CO}_2$  hasta metano. Si el hidrógeno no es removido, las condiciones se vuelven termodinámicamente desfavorables y se acumula una mezcla de productos intermedios que retroinhiben su utilización como sustratos. La oxidación del hidrógeno no solo aporta energía para las bacterias metanógenicas, sino que representa el mecanismo global de remoción terminal de electrones de la digestión anaerobia (reduciendo al  $\text{CO}_2$ ), permitiendo el rompimiento de metabolitos intermedios hasta acetato con la subsecuente formación de metano.

La ruta de formación de metano por medio de la reducción del dióxido de carbono (FIG. 3), involucra 3 coenzimas únicas de los metanógenicos y que funcionan como acarreadoras de moléculas de un solo carbono durante la producción de metano. Las tres coenzimas son: la  $\text{H}_4\text{MPT}$  (presente también en la metanogénesis a partir de acetato), el metanofurano (MFR) que se encarga de acarrear grupos formilo y la  $\text{HS-CoM}$  (también

presente en la metanogénesis a partir de acetato). La reducción del CO<sub>2</sub> se da en 7 etapas, primero el CO<sub>2</sub> es fijado y transformado a formilMFR (HCO - MFR) por medio del MFR (Leigh *et al.*, 1985), después, el grupo formilo del HCO - MFR es transferido a la H<sub>4</sub>MPT para dar el formilH<sub>4</sub>MPT (HCO - H<sub>4</sub>MPT). El paso tres de la ruta es catalizado por una ciclohidrolasa que convierte el HCO - H<sub>4</sub>MPT en metenil - H<sub>4</sub>MPT ((=C-) H<sub>4</sub>MPT) (Donnelly *et al.*, 1985), después, el (=C-) H<sub>4</sub>MPT da lugar al metilénH<sub>4</sub>MPT (CH<sub>2</sub>=H<sub>4</sub>MPT) mediante la acción de la enzima (=C-) H<sub>4</sub>MPT deshidrogenasa (Hartzell *et al.*, 1985). El paso 5 es catalizado por la enzima CH<sub>2</sub>=H<sub>4</sub>MPT reductasa, formando el metilH<sub>4</sub>MPT (CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>MPT) a partir del CH<sub>2</sub>=H<sub>4</sub>MPT, para que después, el grupo metil del CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>MPT sea transferido al metilCoM (CH<sub>3</sub> - S - CoM) por la acción, precisamente, de la HS - CoM. Finalmente, a través de la CH<sub>3</sub> - S - CoM reductasa y la presencia del hidrógeno se forma el metano. La formación de metano a partir de CO<sub>2</sub> se propone como un ciclo ya que la fijación y reducción inicial del CO<sub>2</sub> requiere de la reducción final de CH<sub>3</sub> - S - CoM hasta metano (Gunsalus y Wolfe, 1977).

La ecuación general que describe la formación de metano a partir de la reducción del CO<sub>2</sub> por la acción del hidrógeno es la siguiente:



Uno puede darse cuenta que la gran importancia de la metanogénesis a partir de la reducción del dióxido de carbono mediante la oxidación del hidrógeno, en digestores anaerobios, no es la producción de metano en sí, de hecho, como ya se mencionó, solo aporta aproximadamente el 30% del metano total. La gran importancia radica en tres aspectos: el mecanismo oxidación del hidrógeno - reducción del CO<sub>2</sub> como último aceptor de electrones en el proceso global, el hecho de que las bacterias metanogénicas tienen en este mecanismo CO<sub>2</sub> - H<sub>2</sub> de generación de energía, mayor aporte que a través del acetato, además, muy poca competencia conocida y el papel que juegan los metanogénicos hidrogenofílicos en el metabolismo de los organismos no metanogénicos que llevan a cabo las fermentaciones de los compuestos orgánicos más complejos. Este último factor, ha generado lo que se denomina transferencia de hidrógeno entre especies.

El término transferencia de hidrógeno entre especies se utiliza para describir las reacciones acopladas de oxidación-reducción entre dos o más bacterias anaerobias interactuando durante la fermentación de un sustrato. Esto incluye a las interacciones entre las bacterias no metanogénicas y los metanogénicos en la degradación anaerobia de compuestos orgánicos. De hecho, algunas investigaciones han establecido que además de la remoción de hidrógeno para volver termodinámicamente favorables las reacciones de deshidrogenación de ácidos grasos y por ende la no interrupción de la serie de reacciones de la digestión anaerobia, la presencia de microorganismos metanogénicos determina algunas veces el metabolismo de los microorganismos de la fase de fermentación, fomentando la producción de mayor cantidad de acetato e hidrógeno (Thauer *et al.*, 1989).

La transferencia de hidrógeno entre especies está dada por la necesidad de remoción constante del hidrógeno con el fin de evitar la inhibición termodinámica del proceso. Hay que aclarar que si bien los metanogénicos hidrogenofílicos son los principales removedores de hidrógeno, existen también, dentro de los procesos anaerobios, bacterias no metanogénicas que utilizan hidrógeno como las sulfatoredutoras, las cuales son parte importante del consorcio anaerobio aún en ausencia de sulfatos.

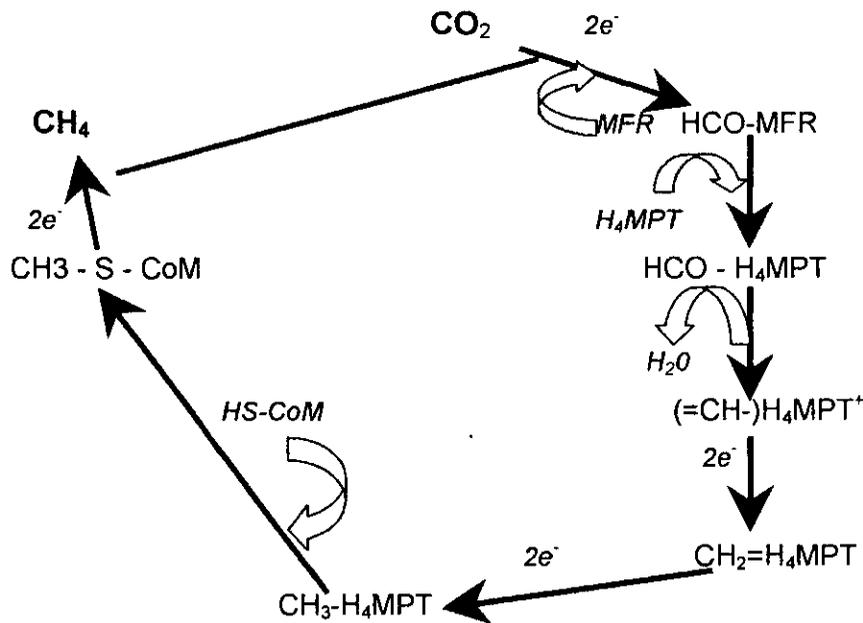


FIGURA 3. Metanogénesis a partir de la reducción del  $CO_2$

Jones *et al.*, 1987

#### 2.2.1.6. Vías metabólicas que compiten con la metanogénesis

En general, hay dos grupos que compiten con los metanogénicos, los sulfatoredutores y los denitrificantes.

Los microorganismos sulfatoredutores, al igual que los metanogénicos, están obligados a formar parte de consorcios microbianos debido a que su situación de anaerobiosis obligada les impone una gama reducida de sustratos. El metabolismo sulfatoreductor, es importante dentro de la ingeniería de digestores anaerobios, porque no sólo compite con la metanogénesis sino también porque es el principal responsable de la corrosión en los reactores.

Como su nombre lo indica, las bacterias sulfatoredutoras usan el sulfato como último aceptor de electrones, reduciéndolo a ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ), aunque algunas pueden, ocasionalmente, usar nitrato o fumarato como último aceptor de electrones o crecer de manera fermentativa.

El sulfato, es el único, de entre todos los aceptores terminales de electrones, que debe ser activado por ATP, formando adenosin fosfosulfato (APS), este es reducido a sulfito y finalmente a  $H_2S$ . Esta reducción final presenta un potencial de oxido - reducción muy bajo de  $-116$  mV comparado con los valores de oxígeno y nitrato de  $+820$  mV y  $+433$  mV respectivamente. Sin embargo el potencial REDOX de la formación del  $H_2S$  es alto comparado con el de la formación de metano que se encuentra en el intervalo de  $-340$  a  $-350$  mV. Este hecho es el principal factor por el que la metanogénesis se inhibe cuando el metabolismo sulfatoreductor se impone en un digestor anaerobio, ya que los sulfatoredutores no compiten ni por el hidrógeno ni por el acetato, aunque si los utilizan, ya que pueden oxidar al hidrógeno como fuente de energía, pero prefieren la reducción del sulfato cuando este se encuentra en concentraciones adecuadas. Y con respecto al

sulfatoredutoras.

Por otra parte, las bacterias denitrificantes utilizan al nitrato como último aceptor de electrones reduciéndolo a  $\text{NH}_3$  o a nitrógeno molecular  $\text{N}_2$ .

A diferencia del metabolismo sulfatoredutor, el denitrificante si cuenta con más de un aspecto que inhibe la metanogénesis, uno es, por supuesto, la modificación del potencial REDOX del medio, otros son la competencia con los microorganismos metanogénicos tanto por el hidrógeno como por el acetato y que el nitrito tiene por sí mismo cierto poder inhibitorio.

### **2.2.2. Microbiología**

La microbiología de la digestión anaerobia termofílica está constituida por un consorcio bacteriano que funciona a altas temperaturas. En la medida en que el consorcio funcione bien, el proceso funcionará bien, aunque el paso más crítico sea la oxidación del hidrógeno y la subsecuente formación de metano.

#### **2.2.2.1. Microorganismos anaerobios termofílicos**

El término termofílico significa "amante del calor". Los microorganismos termofílicos presentan temperaturas óptimas de crecimiento por encima de los 45 °C y comprenden especies de protozoarios, algas, hongos y principalmente bacterias. Los microorganismos termofílicos fueron descubiertos en los géisers del parque nacional Yellow Stone, pero después se encontró que existían en otros ambientes como las chimeneas hidrotermales en el fondo del mar, volcanes, pantanos y también en digestores anaerobios de lodos, como lo descubrieron Zeikus y Wolfe en 1972.

Estos organismos resisten altas temperaturas porque cuentan con proteínas más estables térmicamente debido al aumento de interacciones moleculares entre residuos de aminoácidos específicos y la intervención de diversos cofactores, un citoplasma que contiene menos agua interna, ya que la empaquetan, tienen un alto grado de hidrofobicidad, cuentan en su cubierta celular con ácidos grasos más largos y más saturados y además, tienen mecanismos de protección para su material genético, como altos contenidos de guanina y citosina. (Koga *et al*, 1993). La mayoría de los microorganismos termofílicos son anaerobios debido a la baja solubilidad del oxígeno a altas temperaturas, lo cual representa una ventaja para la digestión anaerobia de residuos.

La microbiología de la digestión anaerobia termofílica está dividida en función de su bioquímica (figura 4) en: bacterias de hidrólisis y fermentación, bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno, bacterias acetogénicas consumidoras de hidrógeno, metanogénicos acetoclásticos y metanogénicos hidrogenofílicos.

Dentro del primer grupo de bacterias podemos encontrar anaerobias facultativas y anaerobias estrictas. Este grupo de bacterias cumplen principalmente con dos funciones, hidrolizar los biopolímeros y fermentar los monómeros y oligómeros resultantes para producir acetato, hidrógeno,  $\text{CO}_2$ , ácidos carboxílicos de cadena corta, alcoholes y otros productos de fermentación como el lactato, necesarios para las fases subsecuentes, y remover el oxígeno (1, figura 4).

#### **2.2.2.1.2. Bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno**

Las bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno también conocidas como sintróficas obligadas, necesitan asociarse estrechamente con microorganismos consumidores de hidrógeno. Estas bacterias son responsables de la generación de acetato e hidrógeno a partir de ácidos carboxílicos de cadena corta, principalmente, aunque también pueden utilizar algunos otros compuestos como etanol y benzoato, entre otros (2, figura 4).

Las bacterias acetogénicas consumidoras de hidrógeno u homoacetogénicas cumplen, junto con otras, el importante papel de remover el hidrógeno en el proceso de la digestión anaerobia. En este caso en particular, este grupo de bacterias utiliza el hidrógeno para generar acetato (3, figura 4).

#### 2.2.2.2. El dominio Archae

Antes de describir las características de los metanogénicos, es necesario, hablar del grupo de microorganismos denominados Archae.

En el verano de 1996, el trabajo conjunto de muchos investigadores permitió la obtención de la secuencia completa de nucleótidos del cromosoma de *Methanococcus jannaschii*, metanogénico que vive a temperaturas cercanas a los 85 °C. Los resultados confirmaron una vieja hipótesis, antaño ridiculizada, según la cual, la vida está constituida por tres grandes líneas evolutivas, y no por las dos que consagraban los libros de texto.

Los archaea no lucen muy distintos de las bacterias cuando se observan al microscopio, pero presentan marcadas diferencias tanto bioquímicas como genéticas. Los archaea suelen habitar algunos de los ambientes más extremos del planeta, pueden vivir a temperaturas hasta de más de 100 °C, en ambientes extremadamente alcalinos o ácidos o en ambientes extremadamente salinos.

Las diferencias más destacadas entre las bacterias y los archaea son (Koga *et al* , 1993 y Madigan y Mairs, 1997):

1. Sus lípidos de membrana están constituidos por enlaces éter de fitanol y bifitol con glicerol en vez de enlaces éster de ácidos grasos con el glicerol.
2. Presentan pseudopéptidoglicanos en su pared celular o simplemente no cuentan con pared celular, en vez de péptidoglicano en pared celular.
3. Presentan enzimas únicas como algunas que utilizan los metanogénicos.
4. Desde el punto de vista metabólico, son los únicos capaces de generar metano.
5. El aminoácido iniciador en la síntesis de proteínas es la metionina en vez de la formilmetionina

Los metanogénicos son, dentro de los archaea, los únicos que se pueden considerar como cosmopolitas, ya que pueden encontrarse casi en cualquier hábitat, desde agua fresca, sedimentos marinos y tractos intestinales animales hasta digestores anaerobios. Se pueden encontrar representantes tanto mesófilicos como termo e hipertermofílicos. La única restricción para los metanogénicos es la anaerobiosis total.

A las temperaturas en que generalmente se maneja la digestión anaerobia termofílica, los únicos representantes del dominio archaea son los metanogénicos, que como ya se mencionó, se encuentran, principalmente, de dos tipos, los acetoclásticos y los hidrogenofílicos. Los metanogénicos acetoclásticos son aquellos que producen metano y

CO<sub>2</sub> a partir del grupo metilo del acetato y la oxidación del CO respectivamente (4, FIG.4). Mientras que los hidrogenofílicos son capaces de producir metano a partir de la reducción del CO<sub>2</sub> y la correspondiente oxidación del hidrógeno (5, FIG.4).

Resumiendo, dentro de la digestión anaerobia termofílica, encontramos, principalmente, dos tipos de microorganismos, las bacterias (tabla 8) y los archae (tabla 9) que son los responsables de la estabilización final de la materia orgánica, produciendo metano.

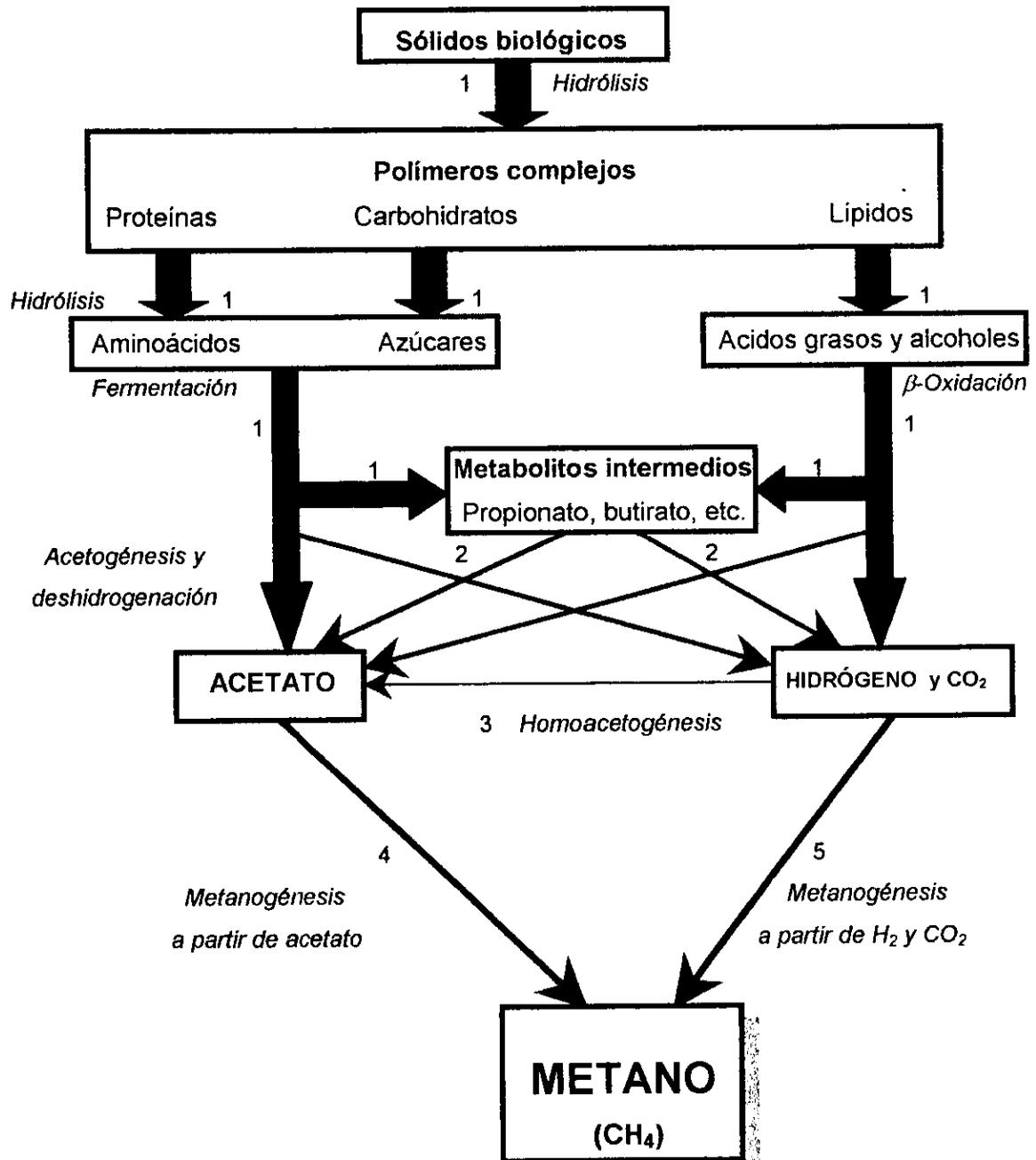


FIGURA 4. Microbiología de la digestión anaerobia

Parkin y Owen, 1986

**Tabla 8. Características de las bacterias presentes en la digestión anaerobia termofílica**

Organismo	Sustratos	Productos	pH	Temp. Óptima (°C)
<i>Acetobacterium faecalis</i>	Azúcares	Acetato, lactato, hidrógeno y CO <sub>2</sub>	6.5 – 7	70 – 73
<i>Acetomicrobium flavidum</i>	Azúcares	Acetato, hidrógeno y CO <sub>2</sub>	6.2 – 8	58
<i>Acetothermus paucivorans</i>	Azúcares	Acetato, hidrógeno y CO <sub>2</sub>	7 – 8	58
<i>Clostridium stercorarium</i>	Celulosa y azúcares	Acetato, etanol, hidrógeno y CO <sub>2</sub>	7.3	65
<i>Clostridium thermoaceticum</i>	Piruvato y glucosa	Acetato y CO <sub>2</sub>	No determinado	55 – 60
<i>Clostridium thermoautotrophicum</i>	Azúcares	Acetato, hidrógeno, CO <sub>2</sub> y CO	5.7	55 – 60
<i>Clostridium thermobutyricum</i>	Azúcares	Acetato, butirato, hidrógeno y CO <sub>2</sub>	6.8 – 7.1	55
<i>Clostridium thermocellum</i>	Celulosa, hemicelulosa, azúcares, metanol, glicerato y formiato	Acetato, lactato, etanol, hidrógeno y CO <sub>2</sub>	7	60 – 64
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	Azúcares, sulfito y tiosulfato	Acetato, lactato, hidrógeno, CO <sub>2</sub> y H <sub>2</sub> S	6.9 – 7.5	68
<i>Clostridium thermolacticum</i>	Azúcares	Acetato, etanol, lactato, hidrógeno y CO <sub>2</sub>	7 – 7.2	60 – 65
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	Dextrina, pectinas, sulfito y tiosulfatos	Acetato, butirato, succinato, hidrógeno y H <sub>2</sub> S	No determinado	55 – 62
<i>Clostridium thermosuccinogenes</i>	Azúcares	Acetato, formiato, succinato e hidrógeno.	7.6	58
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	Lactato, propionato e hidrógeno	H <sub>2</sub> S	No determinado	55
<i>Desulfotomaculum thermoacetoxidans</i>	Lactato, propionato, acetato, etanol, hidrógeno y CO <sub>2</sub>	Acetato y H <sub>2</sub> S	6.5	55 – 60
<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i>	Benzoato y ácidos grasos	Acetato y CO <sub>2</sub>	7.2	62
<i>Desulfovibrio thermophilus</i>	Hidrógeno, lactato y piruvato	No indicado	No indicado	65
<i>Selenomonas acidominovorans</i>	Aminoácidos, azúcares y glicerol	Ácidos grasos y propionato	No determinado	55

**Tabla 8. Continuación**

<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	Glucosa	Acetato, etanol, isobutirato, hidrógeno y CO <sub>2</sub>	No determinado	69
<i>Thermobacteroides proteolyticus</i>	Proteínas y péptidos	Acetato, hidrógeno y CO <sub>2</sub>	7.5	63

Winter y Zellner, 1990

**Tabla 9. Características de los archaea (metanogénicos) presentes en la digestión anaerobia termofílica.**

Organismo	Sustrato	pH	Temp. Óptima (°C)
<i>Methanobacterium</i> CB12	Hidrógeno/CO <sub>2</sub> y formiato	7.4	56
<i>Methanobacterium</i> FTF	Hidrógeno/CO <sub>2</sub> y formiato	7.5	55
<i>Methanobacterium thermoaggregans</i>	Hidrógeno/CO <sub>2</sub>	7 – 7.5	65
<i>Methanobacterium thermoalcaliphilum</i>	Hidrógeno/CO <sub>2</sub>	7.5 – 8.5	60
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	Hidrógeno/CO <sub>2</sub>	7.2 – 7.6	65 – 75
<i>Methanobacterium thermoformicum</i>	Hidrógeno/CO <sub>2</sub> y formiato	7 – 8	55
<i>Methanobacterium wolfei</i>	Hidrógeno/CO <sub>2</sub>	7 – 7.5	55 – 65
<i>Methanogenium thermophilum</i> UCLA	Hidrógeno/CO <sub>2</sub> y formiato	7.2	55 – 60
<i>Methanosarcina</i> CHTI 55	Acetato, metanol y metilaminas.	6.8	57
<i>Methanosarcina thermophila</i>	Acetato, Hidrógeno/CO <sub>2</sub> , metil y trimetilaminas	6 – 7	50
<i>Methanotherix thermoacetophila</i>	Acetato	No determinado	62
<i>Methanotherix</i> CALS – 1	Hidrógeno/CO <sub>2</sub>	6.5	60 – 62
<i>Methanosæta</i> PT	Hidrógeno/CO <sub>2</sub>	6.7	55

Winter y Zellner, 1990

### 2.3. FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

Los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia requieren condiciones ambientales específicas para su crecimiento y actividad óptima, lo cual redundará en mejores porcentajes de remoción de materia orgánica. Entre los parámetros ambientales más importantes que inciden en la digestión anaerobia, están, la ausencia de oxígeno, que no requiere ninguna explicación, la temperatura, el pH y alcalinidad y los nutrientes.

#### 2.3.1. Temperatura

La temperatura a la que opera un reactor biológico influye de manera importante en su

comportamiento, ya que las reacciones bioquímicas son directamente afectadas por este parámetro. Las altas temperaturas permiten la reducción de la tensión superficial de la fase acuosa del lodo, el aumento en las tasas de difusión y solubilidad de los compuestos no gaseosos presentes permitiendo con esto mejor interacción microorganismo – sustrato, y por ende, mayores velocidades de reacción, mayor capacidad en la hidrólisis de materiales poliméricos y además, algo de suma importancia, la disminución de la solubilidad del oxígeno. En la tabla 10 pueden verse algunas diferencias entre la digestión anaerobia mesofílica y termofílica.

Los cambios de temperatura, afectan en general a los microorganismos presentes en el digestor, sin embargo, lo hacen de manera más drástica en los metanogénicos (Zinder *et al*, 1984). Por lo que es muy importante que en un reactor anaerobio no existan cambios continuos de temperatura, y que si desea pasar de temperaturas mesofílicas a termofílicas, se haga de manera gradual (Garber, 1982).

**Tabla 10. Diferencias entre la digestión anaerobia termofílica y mesofílica**

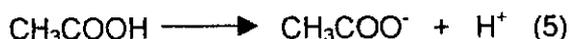
MESOFÍLICA (20 – 40 °C)	TERMOFÍLICA (40 – 70 °C)
Menor vapor de agua en el gas	Mayor actividad
Menor porcentaje de CO <sub>2</sub> en el biogas	Menores TRH, debido al crecimiento más rápido de los metanogénicos acetoclásticos termofílicos (Zinder <i>et al</i> , 1984).
Balance energético más favorable	Destrucción de microorganismos patógenos
Mayor experiencia en su aplicación	Equilibrio microbiano frágil
	Mayor actividad metanógena
	Favorece el desaguado de los lodos

IMTA, 1993

### 2.3.2. pH y alcalinidad

De forma similar a la temperatura, el pH en los reactores anaerobios, y en general en cualquier proceso biológico, ejerce una gran influencia sobre la actividad de los microorganismos. El pH óptimo para la actividad de los diferentes grupos involucrados en la digestión anaerobia termofílica, depende del grupo al que pertenecen, como puede verse en las tablas 8 y 9, sin embargo, el intervalo al que los microorganismos involucrados pueden actuar, es alrededor de la neutralidad (6.2 – 8 ). Al igual que en el caso de la temperatura, modificaciones en el pH afectan de manera más significativa a los microorganismos metanogénicos. En general, el pH de la digestión anaerobia termofílica es mayor al de la mesofílica, a pesar de que las concentraciones de ácidos grasos volátiles producidas, sin dañar al sistema por supuesto, son mayores (Pohland y Bloodgood, 1963; Rimkus *et al*, 1982; Watanabe *et al*, 1997).

Si el proceso de digestión anaerobia no se controla, la producción de ácidos grasos volátiles y de CO<sub>2</sub> tiende a disminuir el pH en el reactor. (Ecuaciones 5 y 6).





La regulación del pH en un reactor anaerobio se lleva a cabo mediante la alcalinidad producida por las reacciones que ocurren durante los procesos de degradación de la materia orgánica. La **alcalinidad**, es entonces, la capacidad que tiene un sistema para mantener un determinado valor o intervalo de pH, por lo que, para mantener un nivel óptimo de pH es necesario tener una buena capacidad amortiguadora, generalmente mayor a 1000 mg/L, aunque al igual que la concentración de ácidos grasos volátiles o de cualquier otro metabolito de la digestión anaerobia, depende de la carga orgánica, llegando a encontrar alcalinidades de hasta 4,500 mg/L con valores de DQO de 56, 900 mg/L (Rimkus *et al*, 1982).

Cuando el sistema no contiene suficiente alcalinidad, el pH del sistema puede controlarse mediante la adición de materiales alcalinos, sin embargo, se debe tener cuidado con el uso de agentes químicos ya que pueden causar efectos colaterales adversos como por ejemplo la cal, que es uno de los álcalis más baratos, puede precipitarse como carbonato de calcio causando serios problemas de acumulación de sólidos o el ion sodio que, a determinadas concentraciones, resulta tóxico.

### 2.3.3. Nutrientes

La digestión anaerobia, como cualquier otro proceso biológico, necesita además de una fuente de carbono, nutrientes inorgánicos esenciales para el adecuado crecimiento de los microorganismos involucrados, así como para incrementar la actividad específica de utilización de sustrato. Los nutrientes más importantes son el nitrógeno y el fósforo (macronutrientes).

Los valores recomendados varían con la concentración de DQO (DQO:N de 400:7 a 1000:7 y relación N:P de 7:1). Generalmente, si el lodo es municipal, no es necesario adicionar nutrientes, pero de no ser así, el nitrógeno puede adicionarse como urea, amonio acuoso o cloruro de amonio, mientras que el fósforo puede agregarse como ácido fosfórico o como alguna sal fosfatada.

El azufre es otro elemento esencial para el desarrollo microbiano. Los sulfuros son la mayor fuente de este elemento, jugando un doble papel: a bajas concentraciones estimula la actividad metanógena y, a elevadas concentraciones (100 – 150 mg/l) la inhibe, ya que favorece el metabolismo sulfatoreductor. Además, los sulfuros pueden causar la precipitación del hierro, cobalto y níquel.

Existen otros nutrientes, conocidos como elementos traza o micronutrientes, son necesarios para el buen funcionamiento del consorcio microbiano, principalmente para la actividad de los metanógenos. A diferencia de los macronutrientes, los nutrientes traza se requieren en cantidades muy pequeñas (partes por millón). En la tabla 11 se pueden ver las concentraciones típicas de macro y micronutrientes en los metanógenos.

El hierro, cobalto y níquel se consideran micronutrientes obligatorios. El níquel es esencial para los metanógenos ya que es constituyente del citocromo de la coenzima  $F_{430}$  (el número se debe a los nanómetros a los que tiene su máxima absorción). La coenzima  $F_{430}$  es un tetrapirrol que como se dijo contiene níquel (FIG. 5), siendo el único con esta característica encontrado hasta ahora en la naturaleza, por lo que se considera exclusivo de los metanógenos. La importancia de la  $F_{430}$  es que es el grupo próstetico (fracción de una enzima que no está constituida por aminoácidos) del sistema enzimático reductor de

la  $\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CoM}$ , es decir, es requerida para el paso final de la formación de metano tanto a partir de acetato como a partir de la reducción del  $\text{CO}_2$  (Jones *et al*, 1987).

El hierro es importante para la conversión de ácido acético a metano, mientras que el cobalto es necesario en la formación de la metilcobalamina, la cual es una coenzima que activa la producción de metano.

La vitamina B, en algunas de sus variedades, también es importante para los metanógenos (Jones *et al*, 1987):

**Tabla 11. Concentraciones de macro y micronutrientes presentes en metanógenos**

ELEMENTO	CONCENTRACIÓN (mg/kg células secas)
N	65000
P	15000
S	10000
Ca	4000
K	10000
Mg	3000
Fe	1800
Ni	100
Co	75
Mo	60
Zn	60
Mn	20
Cu	10
Tiamina (B1)	1 – 2
Riboflavina (B2)	40
Biotina	40

Jones *et al*, 1987; IMTA, 1993

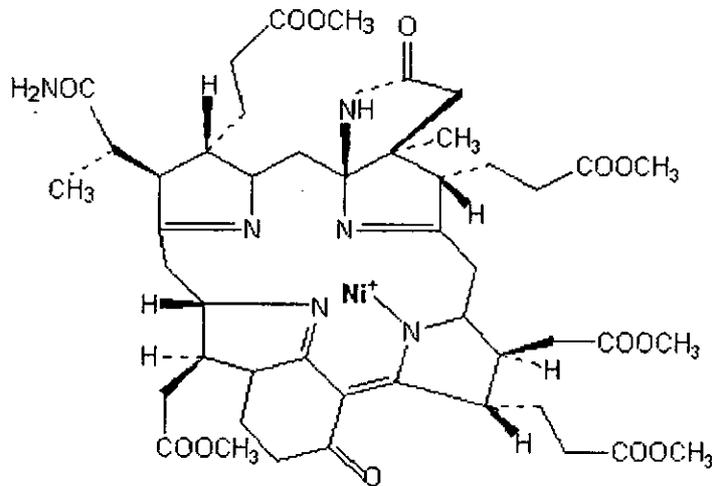


FIGURA 5. Estructura de la coenzima F<sub>430</sub>

Jones *et al*, 1987

## 2.4. CONSIDERACIONES TÉCNICAS DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA TERMOFÍLICA

La digestión anaerobia ha tenido o tuvo por mucho tiempo, la fama de ser un proceso inestable, sin embargo, gran parte de este problema se debe a la falta de comprensión de los fundamentos del proceso, y de hecho, este desconocimiento dio lugar a que el diseño y el seguimiento de digestores anaerobios se realizara y se realice con criterios empíricos, los cuales a fin de cuentas, nos sirven de manera indirecta para lograr digestiones anaerobias que cumplan cabalmente con su objetivo, que es la adecuada estabilización de los lodos, transformando la materia orgánica hasta metano, sabiendo, por ende, que tenemos una población de microorganismos metanogénos abundante y estable. La digestión anaerobia, tanto mesofílica como termofílica, ha probado estabilizar satisfactoriamente muchos tipos de lodos residuales: primario y cal, primario y lodos activados, primario, lodos activados y cal, primarios y sulfato de aluminio, entre otros.

La tecnología empleada actualmente para el tratamiento de los lodos residuales, tiene alrededor de 40 años. Existen tres variantes de digestores anaerobios, los de baja tasa, los de alta tasa y los de dos etapas, cualquiera puede ser operado ya sea por lote, en continuo o en semi - continuo. Los digestores son generalmente cilíndricos. Con diámetros no mayores a 35 metros. Su profundidad varía entre 6 y 14 metros, o inclusive más, y el fondo tiene una pendiente del 25%. Actualmente se han popularizado los digestores en forma de huevo, los cuales poseen condiciones geométricas adecuadas para mantener un mezclado homogéneo de los lodos. Además consumen solamente una fracción de la energía que requiere un digestor cilíndrico para mantener las mismas condiciones de mezclado y elimina el problema de los depósitos de sólidos en el fondo, de modo que no requieren limpiezas periódicas y se alcanzan buenas eficiencias en la reducción de sólidos volátiles y en la producción de gas metano.

### 2.4.1 Digestores de baja tasa

También conocidos como convencionales, se llevan a cabo en un tanque sin mezclado, con o sin calentamiento. Al no estar mezclado, el reactor se estratifica y esto hace que las

reacciones biológicas se lleven a cabo aproximadamente en el 50% del volumen del reactor. Su aplicación es principalmente en plantas pequeñas.

En este caso, los tiempos de retención hidráulica se encuentran entre 30 a 90 días, con cargas orgánicas volumétricas recomendadas entre 0.5 y 1.6 kgSSV/m<sub>3</sub>\*día (IMTA, 1993).

#### 2.4.2 Digestores de alta tasa

En este tipo de digestores sí se aplica mezclado, ya sea mediante agitación mecánica, recirculación de líquido o gas o una mezcla de ambos sistemas. También cuentan con un sistema de calentamiento para obtener la temperatura deseada. Con esas mejoras, los TRH son de 10 a 20 días y las cargas orgánicas volumétricas van de 1.6 a 6.4 kgSSV/m<sub>3</sub>\*día (IMTA, 1993).

Tanto en los digestores convencionales como en los de alta tasa el efecto en el incremento de la temperatura es notorio, ya que en fase termofílica, los digestores pueden operar bien incluso a cargas orgánicas volumétricas mayores y con TRH mucho más cortos, incluso hasta de 3 días en un digestor termofílico de alta tasa (Zinder *et al*, 1984).

#### 2.4.3 Digestores de dos etapas

Son la combinación de alta tasa y baja tasa. El objetivo principal de la segunda etapa (baja tasa) es separar los sólidos digeridos del sobrenadante, sin embargo, pueden ocurrir producción de gas y digestión adicionales.

#### 2.4.4 Diseño de digestores anaerobios

Los dos métodos generalizados para el diseño de digestores anaerobios se basan en el tiempo de retención celular y en la carga orgánica volumétrica ya sea de SSV o de DQO.

Generalmente los digestores de lodos no presentan recirculación, así que el tiempo de retención celular es igual al TRH, por lo que el volumen de un digestor puede ser calculado así:

$$V = Q(\text{TRH}) \quad (7)$$

Donde:

Q = gasto [=] m<sup>3</sup>/d

TRH = tiempo de retención [=] d

Lawrence y McCarthy en 1969 presentaron un modelo cinético (no empírico) de diseño para un reactor de mezcla completa sin recirculación, donde el valor de TRH se puede calcular mediante la ecuación 8 y la cantidad de biomasa producida, mediante la ecuación 9:

$$\frac{1}{\text{TRH}} = Y_t \frac{K S_o}{K_s + S_o} - K_d \quad (8)$$

Donde:

TRH = Tiempo de retención hidráulico mínimo [=] día. Se calcula de datos de laboratorio.

$Y_1$  = Coeficiente de rendimiento

$K$  = Tasa máxima de utilización de sustrato específico [=] día<sup>-1</sup>

$S_0$  = concentración de sustrato en el influente

$K_s$  = Constante de saturación [=] kg/m<sup>3</sup>

$K_d$  = Coeficiente de decaimiento [=] días<sup>-1</sup>

$$X = \frac{Y_1 Q S_0 E}{1 + K_d TRH} \quad (9)$$

Donde:

TRH = Tiempo de retención hidráulico de diseño [=] días

$E$  = Eficiencia = 0.6 – 0.9 (generalmente 0.8)

$Q$  = Flujo [=] m<sup>3</sup>/día

Se tiene valores de  $Y_1$ ,  $K_d$ ,  $K$  y  $K_s$  para lodo municipal mesofílico de 0.04, 0.015 por día, 6.67 por día y 2.224 kg/m<sup>3</sup> respectivamente, teniendo que ajustar los valores de  $K$  y  $K_s$  para temperaturas debajo de 35 °C. Para el caso de lodo termofílico, Hashimoto en 1982 encontró que la velocidad máxima de crecimiento,  $\mu_m$ , y la tasa de utilización de sustrato para la digestión anaerobia de residuos, incrementa linealmente con la temperatura entre 20 y 60 °C, y que por encima de los 60 °C había un descenso en el valor de  $\mu_m$ .

El tiempo de retención, debe manejarse con el fin de obtener una población metanógena abundante y estable, al igual que la carga orgánica. En la tabla 12, se encuentran tiempos de retención hidráulico para el diseño de digestores de lodos de alta tasa.

Cabe destacar, que en la tabla 12 no aparecen valores para procesos termofílicos (a excepción de 40 °C) pues estos aún no están bien establecidos, solo se sabe que en general, la experiencia ha demostrado que se logran TRH más cortos.

**Tabla 12 Tiempos de retención hidráulico para el diseño de digestores de alta tasa**

Temperatura °C	TRH mínimo (días)	TRH de diseño (días)
18	11	28
24	8	20
30	6	14
35	4	10
40	4	10

IMTA, 1993

Cuando se diseña por carga orgánica volumétrica ya sea de SSV o de DQO, el TRH debe ser siempre considerado para evitar el lavado de microorganismos (TRH < TRH mínimo),

sobre todo de los metanógenos.

La carga orgánica volumétrica es la cantidad de sustrato (kg DQO o kg SSV) que se introduce por unidad de volumen ( $m^3$  de reactor) por día. En este caso, el volumen del digestor se puede calcular de la siguiente manera:

$$COV = S_o / TRH \quad (10)$$

Donde:

COV = Carga orgánica volumétrica [=] kg DQO o SSV /  $m^3 \cdot d$

$S_o$  = Concentración de sustrato en el influente [=] kg DQO o SSV /  $m^3$

TRH = Tiempo de retención hidráulico [=] días

El biogas producido en un digestor anaerobio, ya sea mesofílico o termofílico, contiene entre 60 y 70 % de metano, 25 a 30% de  $CO_2$  y trazas de nitrógeno, hidrógeno y ácido sulfhídrico. En general, la calidad de biogás (mayor porcentaje de metano) es mejor en reactores mesofílicos que termofílicos.

Los valores típicos de producción de biogás en digestores de lodos son 0.5 a 0.75  $m^3 CH_4/kg$  SSV alimentados ó 0.75 a 1.12  $m^3 CH_4/kg$  de SSV eliminados. Entre mayor sea el porcentaje de grasas y aceites en el lodo crudo, mayor será la producción específica de gas (IMTA, 1993).

El biogas se recolecta ya sea en el mismo digestor equipado con cubiertas flotantes o en un tanque independiente con el mismo tipo de cubierta. Es importante no permitir la entrada de aire en los tanques y tuberías que contienen biogás, ya que se pueden formar mezclas explosivas (7 a 20%  $V_{biogás}/V_{aire}$ ). El gas si no se utiliza debe ser preferentemente quemado.

#### 2.4.5 Control de digestores anaerobios

Para el control de los digestores anaerobios, se deben considerar parámetros físicos, químicos y biológicos (IMTA, 1993).

Dentro de los parámetros físicos se encuentran:

a) *pH*: Como ya se mencionó, para mantener un equilibrio entre las especies microbianas involucradas en el proceso, y por ende, asegurar un adecuado funcionamiento de la digestión, los valores de pH deben encontrarse cerca de la neutralidad en un rango de 6.2 – 8. A un pH menor que 6 se inhiben los metanógenos y se acumulan los ácidos volátiles en el reactor.

b) *Temperatura*: Los cambios de temperatura en un proceso anaerobio, repercuten en todas las especies microbianas, pero lo hace de manera más significativa sobre los metanógenos. De hecho, mientras la digestión anaerobia sea a mayor temperatura, se vuelve más susceptible a los cambios de este parámetro físico (Garber, 1975). Es evidente entonces, que deben evitarse los cambios continuos de temperatura en un reactor anaerobio.

c) *Sólidos totales y volátiles*: Los sólidos, sobre todos los volátiles, nos permiten evaluar la eficiencia del proceso. Si los sólidos no están suficiente tiempo en el digestor, se logran estabilizaciones incompletas. Se considera que un digestor tiene estabilizaciones satisfactorias si cuenta con porcentajes de remoción de Sólidos volátiles entre 30 y 50%.

d) *Mezclado*: Este parámetro es sumamente importante en la digestión anaerobia, ya que es el precursor principal de una adecuada interacción microorganismo – sustrato. De hecho, es la razón primordial por la que los tiempos de retención de digestores de baja tasa son mayores que los de digestores de alta tasa. En la digestión termofílica, un adecuado mezclado aunado al incremento de temperatura, redundará en una degradación más rápida de los lodos residuales.

Entre los parámetros químicos están:

a) *Alcalinidad*: Una capacidad amortiguadora adecuada en el sistema, nos asegura su estabilidad, sobre todo en el sentido de reducir el efecto de una posible sobreproducción de acidez en el reactor, proveniente de la generación excesiva de ácidos grasos volátiles o un alto contenido de CO<sub>2</sub>. Los valores más comunes de alcalinidad en un reactor operado adecuadamente son mayores o igual a 1000 mg/L, aunque la concentración de alcalinidad depende realmente de la concentración de materia orgánica introducida al reactor. Las dos alcalinidades más importantes en un sistema anaerobio son la debida a bicarbonatos y la debida a los ácidos grasos volátiles. La primera es realmente la única alcalinidad útil como amortiguador y se consigue titulando hasta un pH de 5.75 (alcalinidad parcial), la otra se consigue titulando hasta un pH de 4.3 (alcalinidad total). La diferencia entre ambas titulaciones se conoce como alcalinidad intermedia (Ripley *et al*, 1986). A partir de estos conceptos se emplea una relación conocida como  $\alpha$ , que no es otra cosa que la relación entre alcalinidad intermedia y parcial. Se considera que un reactor anaerobio operado adecuadamente, debe tener relaciones  $\alpha$  cercanas a 0.3, teniendo 0.4 como máximo.

b) *Ácidos volátiles*: Son producidos en la etapa de fermentación acetogénica de la materia orgánica. Un incremento en la producción de estos puede ocasionar desequilibrio en los reactores anaerobios al reducirse los valores de pH, por lo que es necesario controlarlos para que su efecto no incida sobre la población metanógena. La concentración de ácidos volátiles se incrementa en la digestión anaerobia termofílica, por ejemplo, en la planta de Chicago, Illinois, en los Estados Unidos, la concentración de ácidos volátiles en el digestor termofílico era de 270 mg/l, mientras que en el mesofílico era de 40 mg/l (Rimkus *et al*, 1982).

c) *Producción de gas*: La medición del biogas producido proporcionará información sobre la estabilidad o inestabilidad del proceso anaerobio. Una baja producción indicará problemas en la digestión de lodo residual. La causa de un decremento en la producción de biogas es debida, como casi todos los problemas de un digestor anaerobio, a una afección en la actividad de los metanógenos. También encontramos que la producción de biogas es mayor en la digestión termofílica que mesofílica, un ejemplo lo encontramos otra vez en la planta de Chicago, Illinois, en donde la producción de biogas era de 0.40 m<sup>3</sup> biogas/kg de sólidos volátiles alimentados para el proceso termofílico y de 0.32 m<sup>3</sup> biogas/kg de sólidos volátiles alimentados para el digestor mesofílico, a pesar de que el contenido de metano fue el mismo para ambos digestores (Rimkus *et al*, 1982).

d) *Nitrógeno amoniacal y total*: A pesar de que el nitrógeno es sumamente importante en el desarrollo microbiano, su presencia en forma amoniacal inhibe el proceso anaerobio si se encuentra en concentraciones mayores de 1500 mg/L. Además, debe evitarse, al igual que con el metabolismo sulfatoreductor, que el metabolismo denitrificante tenga

relevancia en el proceso anaerobio. La presencia de nitritos también tiene un efecto inhibitorio sobre el proceso.

e) *Fosfatos totales*: El fósforo, al igual que el nitrógeno, es un nutriente esencial para la actividad microbiana, pero, también hay que tener cuidado de cumplir con las recomendaciones dadas en el apartado 2.3.3 con respecto a su requerimiento.

f) *Sulfuros*: En este caso, también debe seguirse lo recomendado en el apartado 2.3.3 con respecto a las concentraciones que son toleradas por el proceso anaerobio, para no sufrir la inhibición en la producción de metano.

g) *DBO y DQO*: La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) es una medida del oxígeno requerido para la oxidación de la materia orgánica biodegradable, en un lapso específico. La DQO es una medida de la cantidad de oxígeno necesario para la oxidación de la materia orgánica e inorgánica, valga la redundancia, oxidable. Ambos parámetros miden la capacidad de biodegradación de la materia orgánica presente en lodos residuales y son útiles para determinar cinéticas de reacción. Generalmente, la variable más utilizada de las dos es la DQO, sobre todo por la rapidez en su medición, aunque aun no es posible determinarla en línea. La DQO está dividida en total, soluble (que es la fracción que teóricamente es utilizada por los microorganismos), coloidal y suspendida. De todas estas, la DQO total es la más empleada ya que sirve para definir parámetros como la carga orgánica volumétrica, másica y las relaciones metano/DQO y carga orgánica volumétrica/producción de biogás.

La carga orgánica tanto de DQO como de SSV (la que se este manejando) debe ser controlada para evitar el arrastre de la biomasa, provocado por un aumento en la producción de biogás, y que se agote la alcalinidad del medio, disminuyendo el pH, por un aumento en la concentración de ácidos carboxílicos volátiles en el reactor.

h) *Metales*: Los metales cumplen su importante función de nutrientes traza, formando parte de diversas coenzimas presentes en los sistemas enzimáticos necesarios para las transformaciones microbianas. Sin embargo, en concentraciones mayores de 1 mg/L algunos metales pueden considerarse como tóxicos al proceso.

Metales pesados como CU, Ni y Zn son tóxicos en bajas concentraciones. La toxicidad de los metales puede ser reducida por la presencia de sulfuros que facilitan su precipitación.

Por el contrario, existen otros metales como el hierro, aluminio y cobalto que no solo no considerados tóxicos, sino que mejoran el desempeño del proceso de digestión anaerobia.

Por otro lado, los lodos residuales representan un peligro potencial para la salud pública, ya que cuentan con una amplia gama de microorganismos patógenos y la posibilidad de que tengan contacto con personas y animales es relativamente alta. Los tres parámetros comúnmente empleados son huevos de helmintos, coliformes totales y fecales y virus entéricos.

a) *Huevos de helmintos*: Los lodos residuales representan un peligro potencial de infección parasitaria debido a la presencia de organismos resistentes (huevos de helmintos) e infectivos a bajas dosis (OMS, 1990).

b) *Coliformes totales y fecales*: Son el grupo de microorganismos comúnmente empleados para conocer la calidad microbiológica de un lodo. Su empleo es muy importante puesto que hasta ahora han probado ser buenos indicadores de la presencia de bacterias patógenas en el lodo.

c) *Virus entéricos*: Este parámetro se incluyó recientemente ya que se ha encontrado de

manera frecuente la presencia de virus patológicamente muy importantes en los lodos como el causante de la meningitis, algunos causantes de gastroenteritis y el que ocasiona la hepatitis A.

Es importante insistir que los microorganismos indicadores no consideren patógenos específicos sino que se refieren a la posibilidad de que haya patógenos presentes, por eso es que aún existe una gran polémica en relación al uso de dichos organismos (IMTA, 1998).

#### 2.4.6 Arranque de digestores anaerobios

Si bien el adecuado diseño y control de un reactor son muy importantes para que un reactor opere correctamente, el arranque del mismo también es de suma importancia, sobre todo debido a la baja velocidad de crecimiento de los metanógenos, aunque en el caso de los metanógenos termofílicos, esta velocidad ya no sea tan baja. Hay que considerar que si bien la velocidad de crecimiento es inherente al microorganismo, se puede ver disminuida si no existen suficientes nutrientes, la concentración de sustrato no es la adecuada y se encuentran compuestos inhibidores.

Durante la fase de arranque, la biomasa se reproduce, por lo que es un periodo inestable y de transición, así que debe hacerse de manera lenta y cuidadosa. El arranque de un digestor anaerobio puede requerir de varios meses, Rinkus *et al* en 1982 reportan que les tomo un año estabilizar exitosamente un digestor anaerobio termofílico a 54 °C.

La duración del arranque depende de parámetros biológicos, químicos y físicos, como la concentración y composición de los lodos, el volumen, la actividad y adaptación del inóculo, factores ambientales adecuados, parámetros de operación (carga orgánica, TRH y mezclado) e incluso de la configuración del reactor (geometría y tamaño).

En general, para iniciar de manera correcta el arranque de un digestor anaerobio, debe contarse con un inóculo proveniente de un digestor mesofílico o termofílico según sea el caso. Muchas veces es difícil conseguir inóculo termofílico, ya que el uso de este tipo de digestores no es muy común y mucho menos en México, por lo que tiene que tomarse un inóculo mesofílico y adaptarlo de manera gradual a las condiciones de temperatura deseadas. El inóculo generalmente debe representar entre el 10 y el 30% del volumen de operación del reactor.

Otro aspecto importante para un arranque exitoso es empezar con cargas orgánicas bajas, para permitir que el consorcio microbiano se adapte al sustrato. Cuando se cuenta con valores de actividad metanogéna del lodo de inóculo, se puede definir de manera más confiable la carga de arranque de la siguiente manera (IMTA, 1998):

$$M_{\max} = V_L X_{ASp} \quad (11)$$

Donde:

$M_{\max}$  = cantidad de DQO que puede degradar diariamente el reactor como máximo teórico a 37 °C [=] kg DQO/d.

$V_L$  = volumen del lodo de inóculo [=] m<sup>3</sup>

X = es la concentración de sólidos suspendidos volátiles del lodo de inóculo [=] kg SSV/m<sup>3</sup>

A<sub>SP</sub> = actividad metanógena específica del inóculo a 37 °C [=] kg CH<sub>4</sub> – DQO/kg SSV\*d.

El cálculo mostrado en la ecuación 11 es solo un límite teórico máximo, ya que se basa en la actividad metanógena específica, calculada a 37 °C y con ácido acético como sustrato. El valor debe ser ajustado, disminuyéndolo en un 10% por cada grado centígrado debajo de 37 °C. No se tiene mucha referencia en este sentido para los casos termofílicos, pero el dato puede obtenerse en laboratorio.

A pesar de que los procesos termofílicos han demostrado soportar mayores cargas orgánicas, también se ha demostrado que su equilibrio microbiano es más frágil, por lo que también hay que tener cuidado a la hora de seleccionar la carga orgánica de arranque.

La evolución del arranque del digestor puede seguirse mediante la medición de los parámetros estipulados en el apartado 2.4.4.

#### 2.4.7 Aspectos inhibitorios de la digestión anaerobia

La mayoría de las veces en que un digestor se encuentra inestable es por causa de una sobrecarga orgánica, un diseño inapropiado, fallas en el equipo, operación deficiente, infiltración de sustancias tóxicas y en el peor de los casos, la conjunción de todas esas circunstancias.

Las sobrecargas o choques orgánicos son causadas por un aumento en el caudal o en la concentración de sustrato.

Cuando se da un choque orgánico se dan los siguientes eventos (IMTA, 1993):

- Aumento en las concentraciones de hidrógeno y de CO
- Mayor proporción del CO<sub>2</sub> en el biogás.
- Acumulación de ácidos grasos volátiles.
- Abatimiento de la alcalinidad de bicarbonatos.
- Reducción de los valores de pH.
- Acidificación del reactor.
- Inhibición de la metanogénesis.

Cuando existen sustancias tóxicas, estas Inhiben la actividad metabólica de la especie o el grupo de microorganismos al que afectan y, como la digestión anaerobia solo se concibe mediante el consorcio microbiano, esto redundando en la inhibición del proceso completo. Sin embargo, los tóxicos presentes en el agua residual con frecuencia están en concentraciones bajas, por lo cual el efecto que ejercen es bacteriostático reversible. Los compuestos tóxicos se pueden agrupar en tres categorías (IMTA, 1993):

- Aquellos cuya toxicidad está relacionada con el pH, por ejemplo los ácidos grasos volátiles, amoníaco y H<sub>2</sub>S.
- Compuestos con una toxicidad inmediata y/o irreversible, como el tetracloruro de carbono, cloruro de etileno y cloruro de metilo, en cuyo caso se habla de un efecto

bactericida.

- Sustancias que con un pequeño aumento en su concentración se vuelven tóxicos, como los iones metálicos.

Como ya se vio también, hay que cuidar que no se den las condiciones para que la digestión anaerobia se desvíe hacia el metabolismo sulfatoreductor o denitrificante.

Otro aspecto que inhibe fuertemente a la digestión anaerobia es el cambio en la temperatura, sobre todo abruptos, generando efectos adversos sobre el crecimiento de los microorganismos, especialmente sobre los metanógenos, produciendo un desequilibrio que conduce a la acumulación de ácidos grasos volátiles y finalmente a la acidificación del reactor.

## **2.5 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA TERMOFÍLICA**

La digestión anaerobia termofílica puede tener ventajas y desventajas con respecto a la digestión anaerobia mesofílica y a otros métodos de estabilización de lodos.

### **2.5.1. Con respecto a la digestión anaerobia mesofílica**

En la tabla 10 podemos ver algunas de estas ventajas y desventajas. Destacando entre las ventajas a la mayor actividad metanógena, la destrucción de microorganismos patógenos y los menores TRH. Encontrando entre las desventajas un equilibrio microbiano más frágil, una menor calidad del biogás y una menor experiencia en su aplicación. Otras ventajas encontradas son la menor formación de espuma, la mayor facilidad para el desaguado del lodo digerido, la resistencia a cargas orgánicas más altas y la mayor producción de biogás. Sin embargo, entre otras desventajas encontramos que el contenido de humedad (vapor de agua) en los digestores es más alto y esto demanda mucha atención del personal hacia las trampas de humedad y los drenes, además el costo por mantener las temperaturas deseadas es muy elevado.

### **2.5.2. Con respecto a otros métodos de estabilización**

Las dos cuestiones más importantes a considerar a la hora de comparar procesos de tratamiento de lodos es la inactivación de microorganismos patógenos y la estabilización de la materia orgánica. En la tabla 13 podemos ver las principales tecnologías que se utilizan para reducir los patógenos y que clase de lodos se obtienen.

**Tabla 13. Tecnologías utilizadas para la reducción de patógenos**

Tecnología	Clase de lodos que se pueden obtener	
	Clase A	Clase B
Digestión aerobia	X	X
Estabilización alcalina	X	X
Composteo	X	X
Secado	X	X
Tratamiento con calor	X	
Pasteurización	X	
Irradiación	X	
Digestión anaerobia termofílica	X	X

En la tabla 14 se muestra la comparación entre la digestión anaerobia termofílica y la digestión aerobia, el composteo y la estabilización alcalina.

**Tabla 14. Comparación de la digestión anaerobia termofílica con respecto a otros métodos de estabilización**

PROCESO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Digestión aerobia	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El proceso es capaz de producir calor, incluso hasta 60 °C</li> <li>- Bajo costo inicial, sobre todo en plantas pequeñas</li> <li>- Sobrenadante de mejor calidad</li> <li>- Bajo potencial de producción de olores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Menor reducción de SSV</li> <li>- La adición de grandes flujos de aire ocasiona pérdidas de calor, esto puede remediarse inyectando O<sub>2</sub>, pero esto es costoso.</li> </ul>
Composteo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Excelente como mejorador de suelo</li> <li>- Bajo potencial de producción de olores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Necesita que el lodo tenga bajos porcentajes de humedad</li> <li>- Requiere amplias extensiones de terreno para su utilización</li> </ul>

**Tabla 14 Continuación**

<p><b>Estabilización con cal</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Es más barata que la digestión anaerobia y aerobia</li> <li>- Bueno como método emergente de estabilización</li> <li>- Fijación de metales pesados</li> <li>- Fácil operación</li> <li>- Cuando el lodo es clase A, se tienen menos restricciones para su distribución y aplicación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No reduce el contenido de sólidos volátiles, por lo que si el pH desciende de 11, los procesos biológicos se pueden reactivar</li> <li>- No solo no reduce el contenido de sólidos volátiles, sino que aumenta la masa total del lodo.</li> <li>- Su aplicación solo es útil en suelos ácidos</li> </ul>
<p><b>Digestión anaerobia termofílica</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Generación de un biogás combustible utilizable</li> <li>- Mayor facilidad del lodo para desaguarse</li> <li>- Los costos de operación pueden ser bajos si se utiliza el biogás</li> <li>- Buena reducción de SSV             <ul style="list-style-type: none"> <li>- El lodo digerido es apropiado para uso agrícola y puede disponerse de manera líquida</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Equilibrio microbiano frágil, por lo que se recupera lentamente después de un colapso</li> <li>- Puede haber olores desagradables</li> <li>- Requiere más capacidad de los operadores</li> <li>- Limpieza difícil</li> <li>- Medidas de seguridad adicionales, debidas a la producción del biogás, que es inflamable</li> <li>- Menor experiencia en su aplicación</li> <li>- Pueden formarse espumas al igual que en digestores aerobios</li> </ul>

WEF y ASCE, 1992

# CAPÍTULO 3

## FUNDAMENTOS DE LA INACTIVACIÓN TÉRMICA MICROBIANA

Uno de los problemas prioritarios de los lodos de desecho es que acarrean de las aguas residuales a microorganismos patógenos, los cuales representan un riesgo de transmisión de enfermedades si el lodo es dispuesto en donde existe posibilidad de contacto con el ser humano y/o animales. Por lo que el lodo debe ser tratado no sólo para estabilizar su contenido de materia orgánica, sino también para reducir su contenido de patógenos de manera que no represente riesgo alguno para la salud pública.

Los microorganismos pueden ser removidos a través de medios mecánicos como la filtración, centrifugación y flotación, agentes químicos, radiación y calor. Los agentes químicos y el calor son los métodos comúnmente usados para la desinfección de los lodos residuales. También se emplea la radiación aunque en menor medida.

### 3.1 INACTIVACIÓN TÉRMICA DE MICROORGANISMOS

La destrucción de microorganismos por calor implica la pérdida de viabilidad y no realmente una destrucción en el sentido físico. La destrucción de organismos por calor a una temperatura dada sigue una tasa de reacción de primer orden (Aiba *et al*, 1973) como se muestra en la ecuación 12:

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad (12)$$

Donde :

k = Constante de inactivación térmica [=] tiempo<sup>-1</sup>

N = Número de organismos viables [=] NMP/g ST o UFC/g ST, en este caso en particular.

t = tiempo

Integrando la ecuación 12, tenemos:

$$\ln N = -k(t) + \ln N_0 \quad (13)$$

o, quitándole el ln a la ecuación 13, tenemos:

$$N = N_0 e^{-kt} \quad (14)$$

Donde:

N<sub>0</sub> = Número de organismos viables en el tiempo 0.

Si utilizamos la ecuación 13 y graficamos  $\ln N$  como función del tiempo, obtendremos una recta cuya pendiente será el valor de  $k$  (figura 6). Con ese valor de  $k$  es posible predecir el tiempo en que cualquier concentración del microorganismo estudiado será inactivada bajo las condiciones en que se obtuvo  $k$ . Esto último es muy importante, ya que no hay que olvidar que  $k$  como cualquier otra constante cinética, sólo es útil cuando se manejan condiciones similares a las que se tenían cuando se obtuvo.

Los microbiólogos algunas veces prefieren utilizar el concepto de tiempo de reducción decimal ( $D$ ), que significa el tiempo de exposición a una temperatura dada durante la cuál el número original de organismos viables es reducido en un décimo. Utilizando la ecuación 14 obtenemos que  $D$  se puede calcular de la siguiente manera:

$$N/N_0 = 1/10 = e^{-kD}, \text{ entonces } D = 2.303/k \quad (15)$$

### 3.1.1 Efecto de la temperatura sobre la constante de inactivación térmica

El efecto de la temperatura sobre la constante de inactivación microbiana, puede ser expresado mediante la ecuación de Arrhenius (Aiba *et al*, 1973):

$$k = \alpha' e^{-E/RT} \quad (16)$$

Donde:

$\alpha'$  = Constante empírica.

$T$  = temperatura absoluta [=] K

$E$  = energía de activación o en este caso de inactivación.

$R$  = constante de los gases

Integrando la ecuación 16 tenemos:

$$\ln k = \alpha' - E/RT \quad (17)$$

Para cada temperatura dada podemos obtener un valor de  $k$ , utilizando la ecuación 13. Si estos valores de  $k$  son graficados como  $\ln k$  en función de  $1/T$  (Ec. 17), obtendremos una línea recta cuya pendiente será  $E/R$  y de la cual podemos calcular  $E$  (figura 7). Además la ordenada al origen nos dará el valor de  $\alpha'$ . Con el valor de  $E$  obtenido podemos calcular la  $k$  y por ende el tiempo requerido para la inactivación de cualquier concentración del microorganismo estudiado a cualquier temperatura dada. Obviamente, los valores de  $k$  utilizados para obtener la línea recta con pendiente  $E/R$ , debieron haber sido obtenidos bajo las mismas condiciones.

### 3.1.2 Inactivación térmica por lote

Cuando uno trabaja con un consorcio microbiano obtenido del mismo sustrato, en vez de una cepa aislada como sucede con las fermentaciones en la industria, la esterilización del sustrato, en este caso el lodo, no es concebible, por lo que a la hora de hablar de inactivación microbiana en un proceso de digestión anaerobia de lodos uno no se está refiriendo propiamente a esterilización, sino a la remoción térmica de microorganismos patógenos a una temperatura que permita funcionar al consorcio microbiano que se encarga de la estabilización de la materia orgánica.

Cuando uno trabaja cepas puras y tiene que esterilizar el medio de cultivo por lote, lo hace simulando una autoclave típica de laboratorio, sometiendo al medio, primero a un incremento en la temperatura durante la fase de calentamiento, un mantenimiento de la temperatura durante la fase fuerte de esterilización y finalmente, una disminución en la temperatura durante la fase de enfriamiento. Después, ya puede entrar en contacto con la cepa, evitando de esta manera la contaminación microbiana y por ende la posibilidad de no obtener el producto deseado. En cambio, en un digestor anaerobio termofílico, el sustrato que entra tiene que alcanzar la temperatura del digestor de manera inmediata, sin necesidad, como ya se mencionó, de estar estéril. Por lo que sólo se cuenta con la fase de mantenimiento.

Para evaluar en lote la remoción de microorganismos patógenos en un proceso de digestión anaerobia termofílica, hay dos posibilidades, medir la concentración del microorganismo patógeno deseado, al principio y al final del tratamiento, o realizar la cinética de inactivación del microorganismo en cuestión, midiendo la concentración del mismo a varios tiempos (suficientes para una cinética) a lo largo del tratamiento. Con el fin de saber si el tratamiento removió o no, al o a los microorganismos deseados, ambas posibilidades son igual de útiles, sin embargo, para el fin de obtener parámetros cinéticos que puedan servirnos en algún momento como criterios de diseño, sólo es útil la segunda posibilidad.

Cuando lo que se desea es obtener cinéticas de inactivación microbiana, es necesario medir la concentración del o de los microorganismos deseados a varios tiempos a lo largo del tratamiento. Una vez obtenidos estos datos, se emplea la ecuación 13 para obtener la constante de inactivación microbiana ( $k$ ) y si se desea, pueden evaluarse las cinéticas a varias temperaturas y entonces utilizar la ecuación 17 para obtener la energía de inactivación ( $E$ ). Cabe resaltar que la ecuación 13, así como la 17 sólo son aplicables para la fase de mantenimiento, donde la temperatura se mantiene constante. Si esto no fuera así (fase de calentamiento y enfriamiento), tendrían que modificarse en función del incremento o disminución que sufre la temperatura a lo largo del tiempo.

Por último, para realizar una cinética de decaimiento térmico adecuada, es necesario controlar todos los factores, sobre todo el pH, para garantizar que la inactivación sea sólo llevada a cabo por la temperatura. Esto en un digestor de lodos es muy difícil, sin embargo, se puede suponer que a elevadas temperaturas, el principal factor para la inactivación microbiana es la temperatura. Otra recomendación para el éxito de una cinética de inactivación térmica es que esta no se realice a temperaturas exageradamente altas (entre 80 y 100 °C o más) ni con concentraciones iniciales de microorganismos muy bajas, puesto que los tiempos de inactivación serían muy cortos y la obtención de concentraciones de microorganismos a varios tiempos sería operativamente muy compleja (Aiba *et al*, 1973).

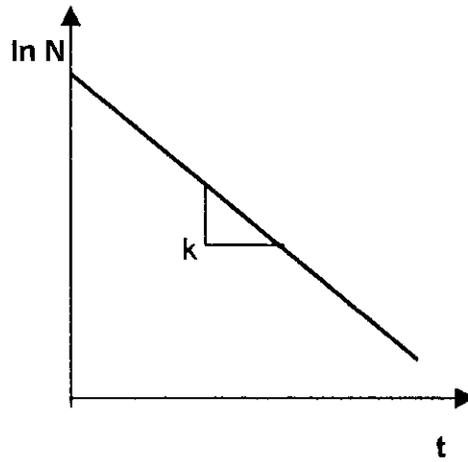


FIGURA 6. Recta típica obtenida a partir de la ecuación  $\ln N = -k (t) + \ln N_0$   
 Aiba *et al*, 1973

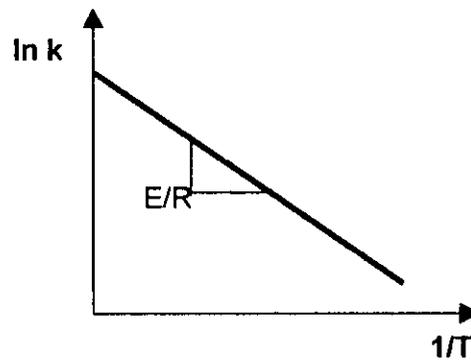


FIGURA 7. Recta típica obtenida a partir de la ecuación  $\ln k = \alpha' - E/RT$   
 Aiba *et al*, 1973

# CAPÍTULO 4

## ASPECTOS GENERALES DE *Candida albicans* Y EL GRUPO COLIFORME

### 4.1. INFECCIONES RELACIONADAS CON EL AGUA

Una enfermedad relacionada con el agua es aquélla que tiene que ver en gran medida con el agua en el ambiente (cuerpos de agua, no agua molecular (H<sub>2</sub>O)) o impurezas dentro del agua. Las enfermedades relacionadas con el agua pueden dividirse en aquéllas causadas por alguna sustancia química en el agua y aquéllas ocasionadas por un agente biológico (patógeno). El primer tipo incluye enfermedades como la fluorosis y la metahemoglobinemia infantil (altos niveles de nitratos en agua potable). Al segundo tipo de enfermedades se les denomina **Infecciones relacionadas con el agua**, e incluye algunas de las más grandes causas de enfermedad y muerte en los países en vías de desarrollo como las enfermedades diarreicas y la malaria (I.W.E.S., 1983). Cabe aclarar que el concepto de enfermedad relacionada con el agua no se limita al agua, sino que puede ser extrapolado a cuestiones estrechamente vinculadas con ella como los lodos resultantes del tratamiento de aguas residuales o la industria de los alimentos.

En el caso de las infecciones relacionadas con el agua, el grupo de microorganismos denominados en su conjunto como coliformes ha sido utilizado durante mucho tiempo como indicador de calidad microbiológica en el agua, suponiendo que bajos niveles de estos microorganismos representan la ausencia de patógenos, sin embargo, los indicadores no consideran patógenos específicos sino que se refieren a la posibilidad en general de contraer una gran variedad de enfermedades, por eso es que aún existe una gran polémica en relación con el uso de dichos organismos (IMTA, 1998). En este trabajo, se ha considerado el estudio de la inactivación del grupo coliforme, en su papel de indicador convencional, así como el estudio de la levadura *Candida albicans* como un posible microorganismo indicador de calidad microbiológica en lodos residuales.

### 4.2. COLIFORMES TOTALES Y *Escherichia coli*

#### 4.2.1 Aspectos ecológicos

Los microorganismos coliformes, sobre todo *E. coli*, son originarios del tracto digestivo del hombre y de los animales de sangre caliente y en consecuencia, siempre están en las heces fecales. Así pues, la presencia de cualquiera de ellos en el agua es evidencia de contaminación fecal. Se estima que una persona, en promedio, excreta al día miles de millones de estos microorganismos. Algunos coliformes, por ejemplo *Enterobacter aerogenes* pueden encontrarse en otros ambientes como granos y plantas (Pelczar, Reid y Chan, 1988).

#### 4.2.2 Aspectos microbiológicos

El grupo de microorganismos denominados coliformes es el generalmente utilizado como indicador de calidad microbiológica en el agua. Los coliformes son el conjunto de bacilos cortos (0.5 por 1 a 3 µm), gram negativos, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas en 48 horas a 35°C. Han sido utilizados como indicadores porque muchos no son patógenos, son fáciles de aislar y normalmente sobreviven más tiempo que los microorganismos que producen enfermedades. Los coliformes pueden dividirse en coliformes totales y fecales, siendo la

principal diferencia entre ambos, la capacidad de estos últimos de crecer a mayor temperatura en condiciones de laboratorio (Pelczar, Reid y Chan, 1988).

#### **4.2.3 Cepas patógenas**

##### **a) *E. coli* oportunista**

Las cepas oportunistas de *E. coli* generalmente son inofensivas en su hábitat normal, pero en otros sitios o tejidos pueden producir infecciones del aparato urinario, pulmonares, de la piel y heridas, bacteriemias (septicemias), meningitis y abscesos (Pelczar, Reid y Chan, 1988).

##### **b) *E. coli* enteropatógena**

Estas cepas causan gastroenteritis aguda en el tubo digestivo principalmente a los recién nacidos o los niños hasta de dos años, afectando a personas adultas solamente cuando se encuentran inmunocomprometidas. Se ha encontrado que casi todos los brotes de diarrea producidos por *E. coli* enteropatógena en humanos son causados por 12 – 15 serotipos (subtipo de una especie que esta basado en diferencias antigénicas) diferentes; estos serotipos son completamente distintos de los serotipos oportunistas. Su facultad de infección se basa en su capacidad para penetrar las células epiteliales de la mucosa intestinal y reproducirse dentro de éstas. Este mecanismo de infección causa el síndrome denominado **disentería** que se caracteriza por dolor abdominal y presencia de pus y sangre en las heces fecales. Estos síntomas son resultado de la necrosis epitelial así como de la ulceración y respuesta inflamatoria aguda que se manifiesta por la presencia de glóbulos rojos y gran número de neutrófilos (Pelczar, Reid y Chan, 1988).

##### **c) *E. coli* enterotoxigénica**

Este tipo es incapaz de invadir la mucosa intestinal, pero dejan en libertad una enterotoxina que es absorbida por las membranas de las células epiteliales, incrementando la producción del AMP cíclico, el cuál tiene un papel preponderante en el aumento de la secreción electrolítica del intestino. Esto genera un síndrome de diarrea que se caracteriza por evacuaciones líquidas profusas, generalmente provenientes del intestino delgado. El síndrome no produce cambios histopatológicos en la mucosa o submucosa del intestino delgado o grueso, y no hay aumento de células inflamatorias en las heces fecales diarreicas (Pelczar, Reid y Chan, 1988).

##### **d) *E. coli* 0157:H7 enterohemorrágica**

Estas cepas producen una poderosa toxina que causa diarrea hemorrágica severa, dolor abdominal y si se complica da lugar al Síndrome Hemolítico Uremico, en el cuál los eritrocitos son destruidos provocando daño renal. Esta infección está principalmente relacionada con alimentos contaminados mal cocidos, aunque también puede ser causada por estar en contacto con agua contaminada (Osaka University Medical School, 1996).

#### **4.3. *Candida albicans***

##### **4.3.1 Aspectos ecológicos**

Las características ecológicas, bioquímicas y morfológicas de *Candida albicans* lo hacen un microorganismo único y muy interesante no sólo biológicamente sino también médicamente ya que tiene un potencial patológico importante. *Candida albicans* es un habitante común de las membranas mucosas (incluyendo el tracto digestivo) de una

amplia variedad de pájaros y mamíferos. En el ser humano, uno de los primeros microorganismos eucarióticos que entran en contacto con el feto durante su pasaje por el canal de nacimiento es *Candida albicans*, a partir de ese momento esta levadura persiste de por vida, en mayor o menor grado, en el organismo, pudiendo llegar a ser patógena cuando existen desequilibrios hormonales (naturales o inducidos), disfunciones endocrinas e inmunosupresiones.

Como una consecuencia de la colonización y persistencia en las membranas mucosas, ya sea mediante infecciones mucocutáneas subclínicas o invasión sistémica, *C. albicans* induce un estado de hipersensibilidad en la mayoría de adultos "saludables" así como la formación de anticuerpos. De hecho, algunos de los análisis más comunes para determinar la inmunocompetencia celular de un individuo están basados en esta levadura. A diferencia de *C. albicans* la mayoría de los miembros procariotas de la flora microbiana humana no estimulan tales respuestas inmunológicas, a pesar de estar en cantidades mucho mayores (Rogers y Balisch, 1980).

*C. albicans* es también única con respecto al amplio espectro de enfermedades infecciosas que puede causar en humanos y en otros animales. *C. albicans* puede causar infecciones dérmicas en piel y uñas, o puede invadir células epiteliales de la cavidad oral, esófago, estómago o vagina. Incluso puede ocasionar cuadros clínicos muy serios, invadiendo tejidos internos y causando infecciones en órganos internos que deben ser tratadas de por vida. La ocurrencia y severidad de las enfermedades causadas por *C. albicans* se ha incrementado, irónicamente, gracias a los avances de la medicina moderna como el uso de antibióticos, inmunosupresores y terapias citotóxicas, entre otros, además de la proliferación de malas costumbres en la población como la automedicación. Desgraciadamente, aún no existe una terapia adecuada para tratar las infecciones, en su conjunto, ocasionadas por *C. albicans*. Es importante entonces que se disperse información básica concerniente a *C. albicans* y a sus interacciones con el ser humano, de manera que sea más sencillo controlar las enfermedades causadas por esta levadura oportunista (Joklik, Willet y Amos, 1983).

#### 4.3.2 Aspectos microbiológicos

Entre los hongos, la estructura vegetativa característica es el micelio. Sin embargo, hay unos cuantos grupos que han perdido en gran parte el tipo de crecimiento micelial y se han hecho unicelulares. Tales organismos se conocen colectivamente como levaduras. Una levadura típica consta de pequeñas células ovales que se multiplican generalmente por gemación. Aunque las levaduras constituyen una pequeña rama de los hongos en lo que se refiere a número de especies, microbiológicamente son muy importantes. Como células solas, crecen y se reproducen más rápido y en proporción a su peso, son más aptas para efectuar cambios químicos porque tienen mayor área superficial con relación a su volumen. Con facilidad se diferencian de la mayor parte de las bacterias por su tamaño relativamente grande y su morfología.

No obstante lo dicho, las levaduras no forman un grupo bien definido, es decir, no son una entidad taxonómica natural aunque guardan uniformidad morfológica y así, por lo escaso del criterio morfológico, las especies de levaduras se diferencian menos en base a su morfología que a sus características fisiológicas. Algunas son esporógenas y se las reconoce como miembros de los hongos imperfectos y otras forman esporas sexuales y de esta manera muestran relación con los ascomicetos o los basidiomicetos (Pelczar, Reid y Chan, 1988).

Las levaduras pueden clasificarse en tres clases (Pelczar, Reid y Chan, 1988):

1. *Ascomycetes*
2. *Basidiomycetes* y
3. *Deuteromycetes*

*Candida albicans* es una levadura que pertenece a la clase Deuteromycetes y a la familia *Cryptococcaceae*, la cuál se caracteriza por células que se reproducen generalmente por gemación, pueden formar pseudomicelio, micelio verdadero y artrosporas (esporas sexuales formadas por la desarticulación de un micelio). Los cultivos típicos son color crema, amarillo, naranja o rojo.

En particular, *C. albicans* se manifiesta como células ovaladas entre 2 – 6  $\mu\text{m}$  cuando se observa en tejidos y exudados. Cuando es en agar presenta dimorfismo ya que por crecimiento sumergido se encuentra en forma de pseudomicelio constituido por la adhesión de largas células que geman y si el crecimiento es en superficie origina células levaduriformes típicas.

A pesar de que *C. albicans* presenta características similares a la mayoría de las levaduras, por ejemplo las usadas para alimentos, sólo *Candida albicans* tiene la capacidad de adherirse y colonizar las membranas mucosas de algunos especies de pájaros y mamíferos.

#### **4.3.3 Aspectos clínicos**

En humanos, la patogenicidad de *C. albicans* esta estrechamente asociada con disfunciones endocrinas, inmunosupresiones y desequilibrios hormonales (naturales o inducidos). *C. albicans* no es considerada un miembro normal de la microflora de la piel y solo puede ser encontrada en ella si existen heridas superficiales. La incapacidad de *C. albicans* de persistir y colonizar la piel aún no es comprendida ya que puede utilizar queratina y bajo las condiciones adecuadas de factores ambientales y nutrientes la puede invadir fácilmente, sin embargo, se cree que la flora bacteriana normal juega un papel muy importante en evitar la colonización y subsecuente invasión por parte de *C. albicans*. Por el contrario, en las membranas mucosas la exposición a *C. albicans* da como resultado una persistencia de este microbio de por vida, siendo de más relevancia su presencia en el tracto digestivo y en la vagina. Como ya se dijo, *C. albicans* es un patógeno oportunista que no infecta a menos que se le den las facilidades para proliferar, de hecho, se ha demostrado que las bacterias intestinales inhiben su crecimiento, pero, cuando esta flora bacteriana se ve deprimida, *C. albicans* se multiplica rápidamente en el tracto digestivo pudiendo causar enfermedades si no se utiliza oportunamente algún antibiótico contra ella. Lo mismo sucede en la vagina cuando las condiciones hormonales y de pH se ven modificadas (Rogers y Balisch, 1980).

En general, las patologías más importantes causadas por *Candida albicans* son el Síndrome de Candidiasis Crónico y la infección vaginal.

##### **a) Síndrome de Candidiasis Crónico (International Health Foundation (a), 1999)**

El Síndrome de Candidiasis Crónico también conocido como Complejo Relacionado con Candida (CRC) es el resultado de la proliferación intestinal de *C. albicans*. El CRC se presenta en infantes, diabéticos y/o individuos inmunocomprometidos, actualmente este síndrome ha tomado mucha relevancia puesto que se presenta en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

El CRC presenta una serie de síntomas muy vagos y que algunas veces parecen no tener relación entre ellos, al grado de que algunos pacientes han sido remitidos con el psiquiatra debido a su condición neurótica y a la incapacidad médica de emitir un diagnóstico de tipo fisiológico.

El principal factor para la proliferación intestinal de *C. albicans* es el uso de antibióticos orales antibacterianos. Es bien conocido que el uso de antibióticos por tiempo prolongado elimina a mucha de la flora bacteriana del tracto gastrointestinal, al suceder esto, las levaduras tienen las facilidades para crecer excesivamente ya que sus enemigos

naturales han sido eliminados. En pacientes con SIDA o inmunodeprimidos, la necesidad de usar masiva y frecuentemente antibióticos ha tenido consecuencias fatales en algunos casos, debido a la proliferación de *C. albicans*.

Los síntomas del CRC pueden ser tantos fisiológicos como psicológicos, ya que *Candida albicans* es capaz de producir 79 toxinas diferentes, algunas de las cuales atacan el sistema nervioso central.

Dentro de los síntomas fisiológicos encontramos:

- Inflamación de los folículos capilares de varias partes del cuerpo (pies, piernas y brazos)
- Extrema fatiga
- Diarrea, flatulencia crónica y calambres abdominales
- Intolerancia a la lactosa
- Ansiedad, Hiperactividad y dificultad para concentrarse
- Alergias
- Sinusitis
- Fatiga ocular
- Debilidad muscular y dolor de huesos
- Lengua y mucosa bucal con una cubierta blanca (comúnmente llamado algodoncillo)
- Mucha frecuencia al orinar
- Hinchazón de labios y de cara.
- Inflamación crónica de los ojos y las conjuntivas

Dentro de los síntomas psicológicos están:

- Ataques de pánico
- Sentimiento de estar intoxicado
- Desorden compulsivo obsesivo

Es indudable que *Candida albicans* se está convirtiendo en un problema importante de salud pública a pesar de ser un patógeno oportunista y de ser parte de nuestra microflora normal desde que nacemos, sin embargo, parece que nosotros mismos nos hemos encargado de darle precisamente las oportunidades que necesita.

#### **b) Candidiasis vaginal (International Health Foundation (b), 1999)**

*Candida albicans* se encuentra normalmente en cantidades muy pequeñas en la vagina, sin embargo cuando se da un cambio en las condiciones dentro del ambiente vaginal como un incremento en el pH, incremento de la temperatura o la humedad, reacciones alérgicas, elevados niveles de azúcar, flujos hormonales y reducción de la concentración de las poblaciones bacterianas presentes normalmente, la levadura empieza a multiplicarse hasta dar lugar a lo que se conoce como **Candidiasis vaginal**.

Las principales causas para que se den los cambios mencionados son:

- **Los antibióticos bacterianos:** El uso de antibióticos es probablemente la principal causa de la candidiasis vaginal. Los antibióticos, efectivamente, matan a las bacterias no deseadas, pero también lo hacen con las útiles al organismo, incluyendo las que se encuentran en la microflora vaginal, causando un desequilibrio y permitiendo la proliferación de la levadura.
- **Ropa:** El uso de ropa apretada o de materiales sintéticos (no algodón) atrapa el calor y la humedad favoreciendo la proliferación de *C. albicans*. Lo recomendable en estos casos es no utilizar ropa interior a menos que sea de algodón y cambiársela diariamente.

- **Compuestos químicos:** Tales como tintes y perfumes que pueden causar un desequilibrio vaginal y provocar alergias que conduzcan a la proliferación de *C. albicans*. Un ejemplo de esto es el uso de las duchas vaginales, que no tienen ningún beneficio real y en cambio, sí causan cambios importantes en el ambiente vaginal. Otros ejemplos podrían ser los papeles de baño perfumados y/o de colores. El uso de condones con aditivos químicos (como el espermaticida nonoxynol – 9 ) también causan los mismos efectos.
- **Hormonas:** De manera natural o inducida, un desequilibrio hormonal ocasiona cambios en el pH vaginal, favoreciendo la proliferación de *C. albicans*. Entre las sustancias o productos que inducen estos desequilibrios hormonales están los productos anticonceptivos y los esteroides usados en el tratamiento de enfermedades como la artritis, el asma o el lupus; desgraciadamente, es muy difícil evitar el uso de dichas sustancias.
- **Sistema inmunológico debilitado:** La proliferación de *C. albicans* es muy común en personas inmunocomprometidas como los pacientes con SIDA, desgraciadamente, estas personas no solo se ven expuestas a sufrir candidiasis vaginal, sino también CRC y muchas otras enfermedades.

Existen tres síntomas típicos de la candidiasis vaginal:

- Ardor y comezón intensos en la vagina y vulva. La comezón no está siempre presente, pero cuando se aparece puede ser, en algunas ocasiones, bastante molesta, al grado de no poder caminar rápido.
- Presencia de un flujo blanco espeso y
- Olor como a pan o cerveza. De hecho, para quien tiene experiencia microbiológica, el olor es típico a levadura. Este es un síntoma inequívoco ya que ninguna bacteria puede generar olores de este tipo.

# CAPÍTULO 5

## METODOLOGÍA

### 5.1 Digestores

El reactor utilizado para el proceso a 55 grados centígrados era cilíndrico (figura 8) y tenía un volumen total de seis litros y uno de trabajo de 4 litros. El calentamiento y la agitación se realizaron en un equipo de ambiente controlado marca Labline con una precisión de  $\pm 0.1$  °C y una agitación de 105 rpm. El material del digestor era aluminio y contaba con cuatro mamparas equidistantes a lo largo del perímetro del reactor. Las mamparas tenían un porcentaje de ocupación interna del 26.3 %, este porcentaje está dentro del recomendado en procesos de fermentación (Aiba *et al*, 1973). La relación L/D fue igual a 1.1, Lema *et al* en 1991 proponen que la relación L/D depende de la manera en que se encuentre presente la biomasa, aumentando conforme esta va encontrándose más fija, de ahí que las relaciones L/D para biomasa suspendida deben ser bajas, no así para un lecho fluidizado.

El reactor utilizado para el proceso a 65 °C fue un matraz Erlenmeyer de dos litros (figura 9), ocupando uno punto ocho litros como volumen de trabajo. El calentamiento y la agitación se realizaron en un baño con agitación magnética marca Labline, desconociéndose las rpm que se tenían y considerando de manera visual que la agitación era la adecuada (no estratificación ni vortex). No tenía mamparas y la relación L/D no aplicaba puesto que el matraz se va estrechando conforme se pasa de la base a la boca.

En ambos casos los digestores contaban con una entrada para la alimentación, una salida de biogás y una salida para toma de muestra.

### 5.2 Lodo inóculo

El lodo de inóculo para el reactor a 55 °C fue tomado de un digestor anaerobio mesofílico en un porcentaje del 25 % (1 litro lodo / 4 litros reactor), lo cual entra dentro del rango recomendado de 10 a 30%.

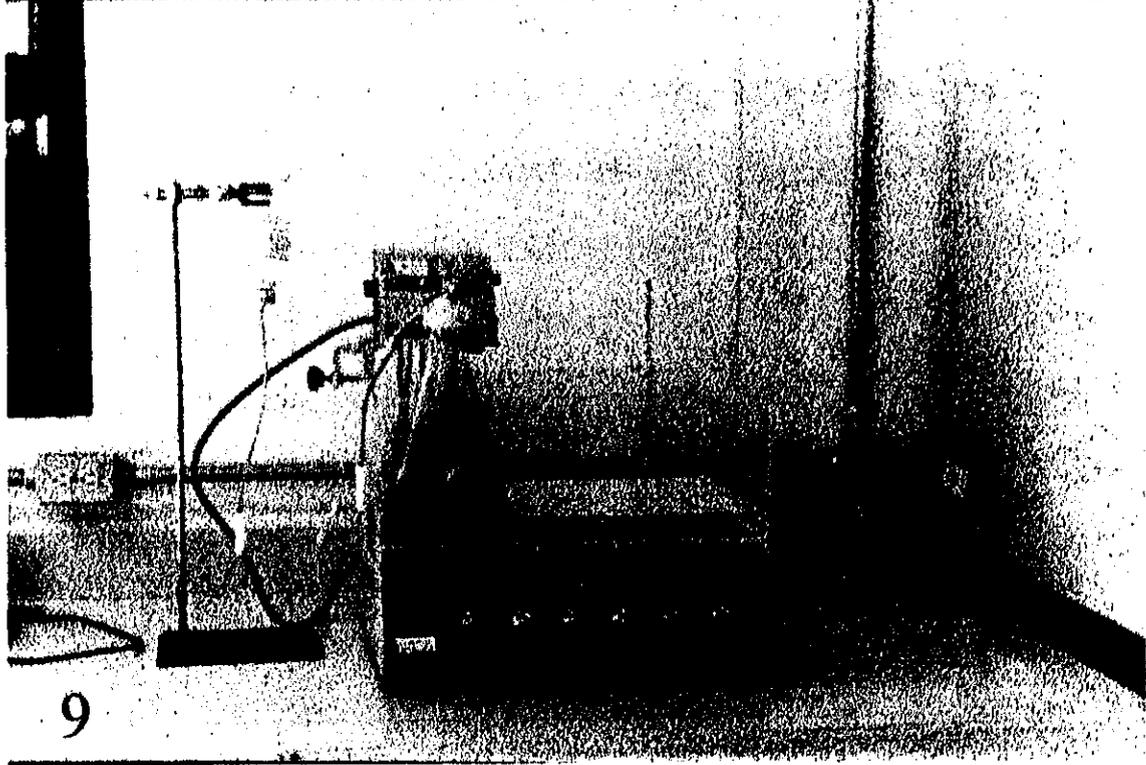
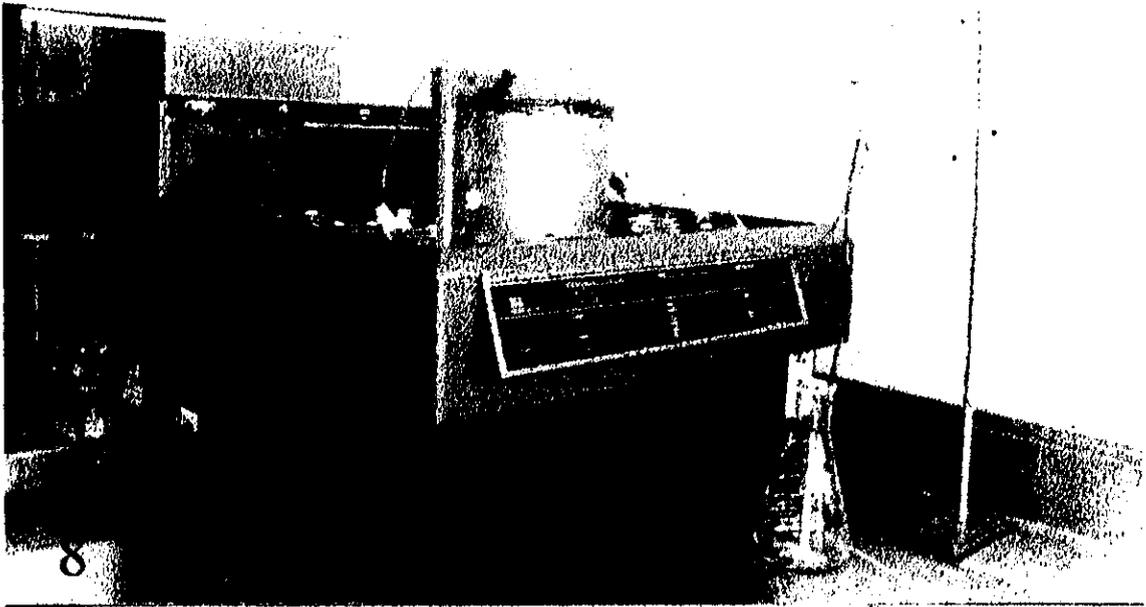
En el caso del reactor a 65 °C, el lodo de inóculo fue tomado del digestor a 55°C cuando este último se encontraba a 44.2 °C. El porcentaje del lodo de inóculo fue de 16.6 % (0.3 litros lodo / 1.8 litros reactor).

### 5.3 Lodo crudo y alimentación de los digestores

El lodo utilizado como sustrato, para ambos reactores, se obtuvo del sedimentador secundario de la planta de tratamiento de aguas residuales del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). Dicha planta opera un proceso biológico de lodos activados con aireación intermitente, mezclando condiciones aerobias y anóxicas con el fin de remover nutrientes (nitrógeno y fósforo).

El lodo, antes de entrar a los reactores, se colaba para evitar la presencia de partículas grandes que pudieran dificultar la operación de los digestores. Además se calentaba a la temperatura en la que el reactor estuviera en ese momento para evitar choques térmicos.

Desgraciadamente, las características del lodo crudo cambiaban con relativa frecuencia por modificaciones que se efectuaban en la planta de tratamiento, además si se hubiera decidido tomar un gran volumen de lodo de una sola vez, para evitar cambiarlo constantemente, las condiciones del mismo hubieran variado durante el largo



Figuras 8 y 9. Digestores operados a 55 y 65 °C respectivamente

almacenamiento de cualquier manera.

#### **5.4 Acondicionamiento (alcance de las temperaturas de trabajo) y estabilización de los digestores a las temperaturas deseadas**

En ambos casos, para alcanzar las temperaturas requeridas se siguió el procedimiento propuesto por Garber en 1982 elevando la temperatura 0.6 °C / día. Una misma temperatura se mantenía durante los fines de semana o cuando el reactor lo requería (malos olores o descensos en el pH).

##### **5.4.1 Digestor a 55 °C**

Se arrancó el día 17 de Mayo de 1999 a una temperatura de 37 °C. Al principio se operó por lote hasta que la remoción de DQO no aumentó más. Esto se llevó 18 días, tiempo que se tomó como TRH para el resto del acondicionamiento. El digestor empezó a producir biogás a partir del segundo día del arranque, además, durante esos primeros 18 días (25/Mayo/1999) se alcanzaron las temperaturas termofílicas llegando a 40 °C.

El resto del acondicionamiento se trabajó con un TRH de 18 días (excepto la primera semana después del régimen por lote que fue con TRH = 8.75 días) y una alimentación semicontinua semanal, es decir, se realimenta y no se vuelve a alimentar hasta una semana después. La razón para este tipo de alimentación fue semejar condiciones por lote para las cinéticas de inactivación que se pretendía realizar.

Cuando el reactor se recargó después de los primeros 18 días, se hizo agregando 3.2 litros a los restantes 0.8 litros del reactor (17.5%). A partir de ahí el pH empezó a bajar, aunado a esto, el 12 de junio de 1999 la agitación del equipo con ambiente controlado se descompuso, por lo que se dejó el reactor tres días sin agitación pero con temperatura. Con todos estos sucesos, el 18 de Junio de 1999 y a pesar de que el reactor ya se encontraba en condiciones normales de agitación, se tuvo que subir el pH con NaOH 1N puesto que había bajado hasta un valor de 6.35. Fuera de este incidente, el resto del acondicionamiento se llevo a cabo de manera normal.

Los 55 °C se alcanzaron el 29 de julio de 1999. A partir de ahí se decidió trabajar con un TRH de 10 días debido a que ya no habría aumentos en la temperatura y a que teóricamente los procesos termofílicos operan con menores TRH. Sin embargo, se determinó que el digestor no operaba bien, sobre todo por los olores (lodo no estable) y la alcalinidad, ya que otros parámetros como los AGV y el pH se encontraban dentro de los valores recomendados, aunque después se comprobó que estaban altos y bajo, respectivamente, con respecto a los valores obtenidos una vez que se considero estable el reactor (TRH de 20 días). Al decidir que el TRH de 10 días no era el adecuado, el 23 de septiembre de 1999 se cambió a 15 días sin conseguir que los olores cambiaran. Por lo que finalmente el 30 de septiembre de 1999 se cambió el TRH a 20 días, en donde a la primera semana el olor cambió a tierra mojada, que es el olor típico de un lodo estable, además los valores de pH y alcalinidad empezaron a subir y los valores de AGV a bajar. El reactor se mantuvo bajo estas condiciones de trabajo hasta el 3 de Noviembre de 1999.

##### **5.4.2 Digestor a 65 °C**

Se arrancó el día 16 de junio de 1999 con un TRH de 9.33 días (alimentación semicontinua semanal) solo por una semana ya que el resto del acondicionamiento fue con un TRH de 18 días y alimentación semicontinua semanal. El lodo de inóculo fue tomado del digestor que se estaba acondicionando para 55 °C cuando recién había salido de la descompostura del equipo de ambiente controlado. Se tomó en estas condiciones

porque el equipo ya había sido reparado y a pesar de que el pH estaba disminuyendo en el reactor para 55 °C no se pensó que la situación empeorara, pero sí empeoró.

El 21 de Junio de 1999 el pH del digestor bajo hasta 6.3, teniendo que subirlo con NaOH 1N. Después de este incidente no sucedió nada fuera de lo normal y el reactor alcanzó la temperatura de 65 °C el 2 de septiembre de 1999.

Por las mismas razones que con el digestor a 55 °C, una vez alcanzada la temperatura requerida se disminuyó el TRH hasta 10 días, elevándose a 15 y finalmente a 20 días el 23 de septiembre de 1999 y el 30 de septiembre de 1999 respectivamente. El incremento en los TRH se debió a los mismos motivos que con el reactor a 55 °C, la única diferencia fue que gracias a la experiencia obtenida con el reactor a 55 °C la decisión no se llevó tanto tiempo. El reactor se mantuvo operando con esas condiciones finales de TRH hasta el 27 de octubre de 1999.

En ambos digestores, tanto durante el acondicionamiento como durante la estabilización, se tomaban muestras diariamente para analizar los parámetros que nos indicaban el desempeño de los reactores. El volumen diario de muestra dependía del TRH que se estuviera manejando de modo que se tenía que retirar en una semana el volumen que habría de añadirse de lodo crudo al reactor cuando se le alimentara. Por ejemplo:

TRH = 10 días y  $V_{\text{reactor}} = 4$  litros

$TRH = V_{\text{reactor}} / Q$

$Q = X / 7$  días. Donde X [=] litros y 7 días porque la alimentación era semicontinua semanal. Entonces, sustituyendo Q en  $TRH = V_{\text{reactor}} / Q$  y despejando X, tenemos que:

$X = (V_{\text{reactor}} \times 7 \text{ días}) / TRH$  o sea,  $X = (4 \text{ litros} \times 7 \text{ días}) / 10 \text{ días}$ . Resultando que el valor de X es igual a 2.8 litros (esto era el volumen que se debía alimentar al reactor cada semana). Retomando la ecuación de  $Q = X / 7$  días, entonces el volumen que se tenía que tomar diariamente era el resultado de dividir 2.8 litros (X) entre 7 días, o sea 400 mL.

## 5.5 Parámetros de control para evaluar el desempeño de los digestores.

Para evaluar el comportamiento de los reactores, se analizaron la DQO, los sólidos totales y suspendidos totales y volátiles, el pH, la alcalinidad total y la relación alcalinidad intermedia:alcalinidad parcial, la producción de biogas y los ácidos grasos volátiles (ocasionalmente).

### 5.5.1 DQO

La demanda química de oxígeno fue determinada mediante el método colorimétrico 5220 D propuesto por los Standard Methods de 1995. (Digestión y lectura espectrofotométrica en equipo Hach). Cuando el digestor que se estaba acondicionando a 55°C se trabajó por lote durante los primeros 18 días de operación, la DQO se analizó diario, fuera de eso, se analizó tres veces por semana en ambos reactores.

La dilución manejada fue 1/100.

Durante el transcurso del experimento, se manejaron tres curvas patrón:

1.  $DQO = (abs - 0.0038) / 0.0004$

2.  $DQO = (abs + 0.00318) / 0.0004$  (a partir del 29 de julio de 1999)
3.  $DQO = (abs + 0.0019) / 0.0004$  (a partir del 27 de agosto de 1999)

### **5.5.2 Sólidos totales**

Los sólidos totales se analizaron mediante el método gravimétrico 2540 B propuesto por los Standard Methods de 1995.

### **5.5.3 Sólidos suspendidos totales y volátiles**

Este tipo de sólidos se evaluaron mediante el método gravimétrico 2540 E propuesto por los Standard Methods de 1995. Tanto los sólidos totales como los suspendidos totales y volátiles se analizaron 3 veces por semana en ambos digestores.

El porcentaje de todos los tipos de sólidos manejados, se determinó utilizando el método 2540 G de los Standard Methods de 1995.

### **5.5.4 Alcalinidad total y relación alcalinidad intermedia:alcalinidad parcial**

La alcalinidad total así como la relación entre la alcalinidad intermedia y parcial, se obtuvieron siguiendo el método propuesto por Ripley *et al* en 1986, en donde se propone que la alcalinidad total es la alcalinidad obtenida a partir de la titulación de la muestra hasta un valor de pH de 4.3 y comprende a la alcalinidad tanto de AGV como de bicarbonatos. La alcalinidad parcial (la realmente útil para el proceso) es la obtenida a partir de la titulación de la muestra hasta un valor de pH de 5.75 (solo comprende a los bicarbonatos) y la alcalinidad intermedia es la diferencia entre las dos primeras alcalinidades. También Ripley *et al* propusieron que un digestor se podía considerar estable si el valor de la relación alcalinidad intermedia:alcalinidad parcial era de 0.3 o muy cercano.

La alcalinidad total y la relación alcalinidad intermedia:alcalinidad parcial se midieron diariamente en ambos reactores.

### **5.5.5 pH**

El valor del pH se midió de manera directa mediante un potenciómetro, es decir, no se diluía el lodo con agua destilada. El pH se midió diariamente en ambos reactores.

### **5.5.6 Producción de biogás**

El volumen de biogás se midió mediante desplazamiento de una solución de agua destilada con 0.05 g/L de rojo de metilo. La solución se encontraba saturada con cloruro de sodio. Los litros por día de biogás se calculaban promediando tres repeticiones del análisis. Los análisis se efectuaban casi al final de la semana operativa por considerarlo más representativo ya que, debido al procedimiento de alimentación (semicontinuo semanal), los primeros días la concentración de AGV debía ser más alta que al final y por

consecuencia habría un exceso en la producción de CO<sub>2</sub> (Zinder *et al*, 1984).

### 5.5.7. Ácidos grasos volátiles

Los ácidos grasos volátiles se determinaron por destilación (Standard Methods, 1995) y su medición no fue de manera cotidiana. En el caso del digester a 55 °C, los AGV se midieron el 21 de septiembre de 1999 cuando el TRH era de 10 días, los olores eran de un lodo inestable y se pensó que los AGV eran la causa. Las otras tres ocasiones que se midieron fueron el 20, 25 y 27 de octubre de 1999 cuando el reactor ya tenía un TRH de 20 días y sólo se quería determinar como evolucionaba su concentración a lo largo de los siete días de operación.

En el caso del reactor a 65 °C, los AGV se midieron el 20 y el 23 de octubre de 1999 cuando el digester ya tenía un TRH de 20 días y se quería observar la evolución de los AGV a lo largo de la semana de operación.

En el **anexo 1** se presentan las técnicas utilizadas para determinar los parámetros mencionados.

## 5.6 Cinéticas de inactivación microbiana

### 5.6.1 Realizada a 55 °C

Las cinéticas de inactivación de coliformes totales y *E. coli* se tomaron el 20 de Octubre de 1999 justo después de alimentar al reactor, mientras que la cinética de inactivación de *C. albicans* se tomó el 27 de octubre de 1999 también justo después de alimentar al reactor.

En el caso de las cinéticas de inactivación de coliformes totales y *E. coli* se utilizó el siguiente procedimiento:

1. Se obtuvieron las concentraciones de ambos microorganismos en el lodo crudo. Estos valores sirvieron para determinar cuáles serían las diluciones más convenientes para las cinéticas, más que como un dato de la cinética misma.

De los datos obtenidos se determinó que las diluciones adecuadas eran 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-1</sup>

2. Se calentó el lodo crudo a 55 °C.
3. Se introdujo el lodo al reactor y se tomaron concentraciones a los siguientes tiempos:  
0, 1", 5", 10", 30", 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas y 1 día.
4. Una vez obtenidas las concentraciones (en NMP/gST) se graficó el ln NMP/gST en función del tiempo para obtener una ecuación de primer orden como la #14 del capítulo 3.

En este caso, no se realizó repetición puesto que el método de análisis no lo requiere ya que es muy preciso y además el método es caro y se tenían limitaciones económicas.

Para el caso de la cinética de inactivación de *C. albicans* se realizaron dos procedimientos, el primero consistió en lo siguiente:

1. Se obtuvieron las concentraciones de *C. albicans* en el lodo crudo con el fin de determinar las diluciones que procederían para la cinética.

Los datos obtenidos revelaron una concentración muy pequeña de *C. albicans* por lo que se decidió que las muestras no serían diluidas.

2. Se calentó el crudo a 55 °C.

3. Se introdujo el lodo al reactor y se tomaron concentraciones a los siguientes tiempos:  
Calentado, 0, 5", 10", 30", 1 hora, 2 horas y 3 horas.

No se apreció crecimiento alguno, entonces se decidió realizar un segundo procedimiento:

1. Se aisló *C. albicans* del lodo crudo y se dejó crecer en caldo nutritivo a 37 °C por un día.
2. Se midió la concentración de *C. albicans* en el caldo nutritivo y se determinó que las concentraciones apropiadas eran  $10^{-2}$  y sin diluir.
3. Se tomaron 200 mL a 37 °C y se inocularon en el reactor (a 55 °C). Se tomaron 200 mL por ser un volumen pequeño, evitando de esta manera choques térmicos y fenómenos diáuxicos.
4. Se tomaron concentraciones a los siguientes tiempos:  
0, 1", 2", 3", 5", 7", 9", 11", 13" y 15".
5. Una vez obtenidas las concentraciones (en UFC/gST) se graficó el  $\ln$  UFC/gST en función del tiempo para obtener una ecuación de primer orden como la #14 del capítulo 3.

En este caso sí se hicieron repeticiones de ambos procedimientos.

#### 5.6.2 Realizada a 65 °C

Las cinéticas de inactivación para coliformes totales y *E. coli* se tomaron el 20 de octubre de 1999 justo después de alimentar al reactor. Mientras que la cinética de inactivación de *C. albicans* se tomó el 27 de octubre de 1999, recargando el reactor únicamente para tomar la cinética.

En el caso de las cinéticas de inactivación de coliformes totales y *E. coli*, se siguió este procedimiento:

1. Las concentraciones de ambos microorganismos en el lodo crudo eran las mismas que para 55 °C, pero como se supuso que la inactivación sería más rápida, los valores de dilución tomados fueron  $10^{-2}$  y  $10^{-1}$ .
2. Se calentó el lodo crudo a 65 °C.
3. Se introdujo el lodo al reactor y se tomaron concentraciones a los siguientes tiempos:  
0, 1", 4", 6", 10", 12", 15", 18", 21", 25", 30", 45" y 1 hora.
4. Una vez obtenidas las concentraciones (en NMP/gST) se graficó el  $\ln$  NMP/gST en función del tiempo para obtener una ecuación de primer orden como la #14 del capítulo 3.

En este caso, tampoco se realizó repetición por los mismos motivos que en el caso a 55 grados centígrados.

Para el caso de la cinética de inactivación de *C. albicans* también se realizaron dos procedimientos, el primero consistió en lo siguiente:

1. Las concentraciones de *C. albicans* en el lodo crudo fueron las mismas que para 55°C, por lo que se decidió que las muestras tampoco serían diluidas.
2. Se calentó el crudo a 65 °C.

3. Se introdujo el lodo al reactor y se tomaron concentraciones a los siguientes tiempos:  
Calentado, 0, 20", 40", y 1 día

No se detectó crecimiento alguno, entonces se decidió realizar un segundo procedimiento:

1. Se aisló *C. albicans* del lodo crudo y se dejó crecer en caldo nutritivo a 37 °C por un día. El aislamiento de *C. albicans* fue el mismo que para 55 °C.
2. Con base en las concentraciones obtenidas en el lodo crudo y considerando que a esta temperatura la inactivación sería más rápida. Se determinó que las muestras se trabajarían sin diluir.
3. Se tomaron 100 mL a 37 °C y se inocularon en el reactor (a 65 °C). Se tomaron 100 mL por los mismos motivos que en el procedimiento a 55 °C.
4. Se tomaron concentraciones a los siguientes tiempos:  
0, 1", 2", 3", 4", 5", 6", 7", 8", 9" y 10".

Tampoco se encontró algo.

En este caso también se hicieron repeticiones de ambos procedimientos.

### 5.6.3. Consideraciones estadísticas

Siguiendo la ecuación 13 del capítulo 3, uno obtiene una recta que tiene que ajustarse. El procedimiento más común de ajuste es el de mínimos cuadrados, del cual no tiene mucho sentido explicar sus fundamentos matemáticos y además dicho ajuste puede ser hecho fácilmente a través de algún computador. Lo que sí es importante inferir, una vez ajustada la recta son tres cosas: la primera es calcular la dispersión de los datos experimentales con respecto a la recta ajustada. Esto nos será de utilidad para los siguientes dos aspectos, además es una medida de la bondad o linealidad de nuestra recta. La dispersión de los datos no es otra cosa que la desviación estándar ( $\sigma$ ), obteniéndola, nosotros podemos asegurar que los valores experimentales de Y estarán, como máximo, a una distancia  $2\sigma$  de la recta ajustada en el 95% de los casos (Mendenhall, 1987). El segundo aspecto es determinar si realmente existe una relación entre X y Y, es decir, ¿Presentan los datos suficiente evidencia que indique que el aumento o disminución lineal de Y depende de X? ¿O podría darse el caso de que X y Y no estuvieran relacionadas linealmente pero pareciera que sí?. Lo que hay que hacer en estos casos es una inferencia con respecto a la pendiente (M) de la recta. Dicha inferencia tiene que hacerse a través de la siguiente prueba de hipótesis:

Hipótesis nula:  $H_0 : M = 0$

Hipótesis alternativa :  $H_a: M \neq 0$

Estadístico de prueba :  $t = (M / \sigma) * (SC_x)^{1/2}$

Donde:

$\sigma$  = Desviación estándar y  $n$

$SC_x =$  Suma de cuadrados de los valores de X =  $\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2$

En este caso, la relación lineal entre la inactivación microbiana y la temperatura es algo ampliamente conocido y comprobado, por lo que el estadístico de prueba anterior puede omitirse, sobre todo si los coeficientes de regresión son altos.

Una vez demostrada que X y Y están relacionados linealmente, debemos inferir el tercer aspecto, que es el intervalo de confianza para la pendiente obtenida. Esto es una medida de la confianza que se tiene al predecir un valor de Y a partir de un cambio en X. El intervalo de confianza al 95 % se calcula a partir de la ecuación 18:

$$M \pm (t_{\alpha/2} \sigma) / (SC_x)^{1/2} \quad (18)$$

Con n - 2 grados de libertad, donde n es el tamaño de la muestra.

#### **5.6.4. Análisis del grupo coliforme y de *Candida albicans***

Para los análisis tanto de coliformes totales como de *E. coli*, una vez tomadas las muestras, se ponían en hielo dentro de bolsas de plástico estériles sin pastillas de tiosulfato (puesto que elevan el pH) y se analizaban en menos de 30 minutos.

La técnica utilizada para medir tanto a los coliformes totales como a *E. coli* fue la de sustrato cromogénico específico, conocida comercialmente como colilert.

Al igual que en el caso de los coliformes, una vez tomadas las muestras para *Candida albicans*, éstas se ponían en hielo dentro de bolsas de plástico estériles sin pastillas de tiosulfato y se analizaban en menos de 30 minutos.

La técnica utilizada fue inoculación superficial sobre agar selectivo para *Candida*. Se escogió dicha técnica para tener células levaduriformes típicas y fáciles de contar, en vez de la posible presencia de pseudomicelios si la inoculación hubiera sido de manera sumergida.

En el **anexo 2** se presentan las técnicas utilizadas para determinar las densidades de los microorganismos evaluados

# CAPÍTULO 6

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 ACONDICIONAMIENTO Y ESTABILIZACIÓN DEL DIGESTOR A 55 °C

#### 6.1.1. Acondicionamiento para obtener la temperatura deseada)

En la tabla 15 se muestra una reseña de lo que sucedió durante el acondicionamiento del digestor a 55 °C. La evolución del pH y el incremento gradual de temperatura que se dieron durante el acondicionamiento en el digestor a 55 °C pueden verse en las figuras 10 y 11. En la figura 10 se observa que los primeros 18 días de operación, cuando se trabajó por lote, el digestor incrementó su pH, sin embargo, cuando fue realimentado con 3.2 L de lodo crudo, el pH comenzó a descender llegando hasta un valor de 6.35, que fue cuando se decidió subirlo con una solución de NaOH 1N. El reactor tardó 34 días en volver a alcanzar los valores de pH que tuvo después de los primeros 18 días de operación. Una vez recuperado el reactor, el pH bajaba cuando se realimentaba el reactor y subía conforme y transcurría la semana sin alimentación. Cabe aclarar que en los días en que se realimentó el reactor con 3.2 L y el pH bajó hasta 6.35 falló la agitación del equipo.

Los efectos de la realimentación y la falla que sufrió la agitación del equipo también pueden verse en la evolución de la alcalinidad (Figuras 12 y 13), notando que a pesar de que la alcalinidad total subía, la relación alcalinidad intermedia:alcalinidad parcial aumentó hasta un valor de 2.12, volviendo a niveles cercanos de 0.3 en aproximadamente 29 días. La alcalinidad se comportó como el pH una vez recuperado el proceso. La DQO y los SSV tuvieron altos porcentajes de remoción durante los primeros 18 días en lote, sin embargo, también disminuyó considerablemente con la realimentación posterior y la falla en el equipo, pero, una vez recuperado el reactor, el comportamiento de la DQO y los SSV fue un ciclo de incremento – disminución hasta el final del acondicionamiento (figuras 15 y 16). A pesar de la recuperación, en ningún parámetro se alcanzaron los niveles de remoción que se obtuvieron por lote los primeros 18 días. El biogás por su parte, se incrementó conforme transcurría el tiempo y se elevaba la temperatura (tabla 16).

Tabla 15. Cronología del acondicionamiento del reactor a 55 °C

Día	Evento
1 (17 de mayo de 1999)	Arranque por lote
2	Producción de biogás
9	Inicio de temperaturas termofílicas (40 °C)
18	Se pasa de la modalidad por lote a un TRH de 8.75 días con alimentación semicontinua semanal
25	Comienza la alimentación semicontinua semanal con TRH = 18 días
27	Falla en la agitación del equipo
29	Compostura del equipo
33	Descenso del pH hasta 6.35. Se incrementa con una solución de NaOH 1 N
74	Se alcanzan los 55 °C

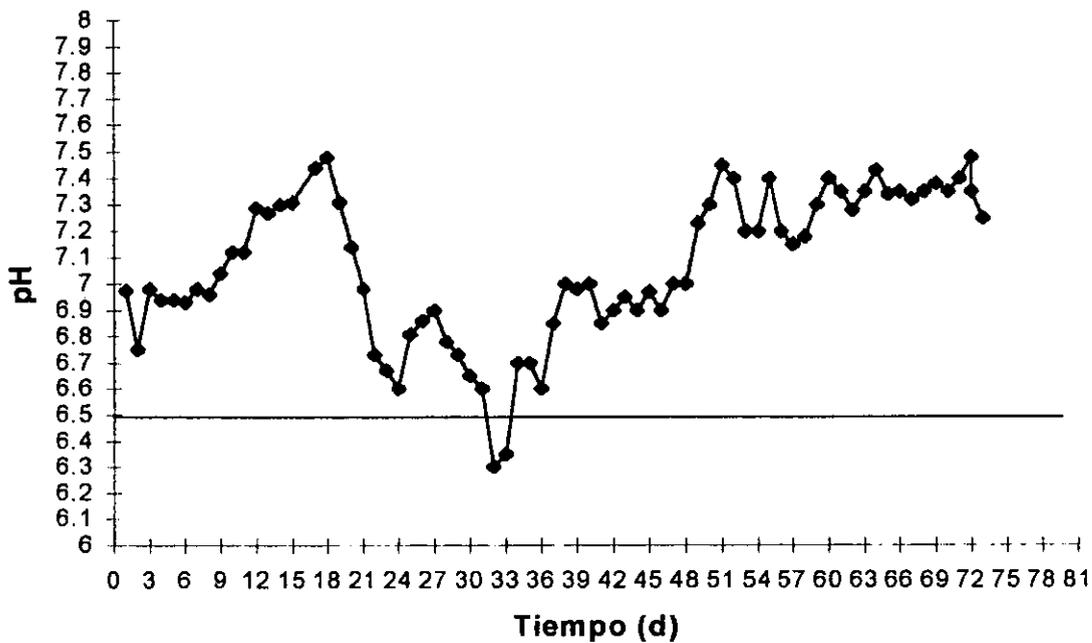


FIGURA 10. Evolución del pH durante el acondicionamiento del reactor a 55 °C

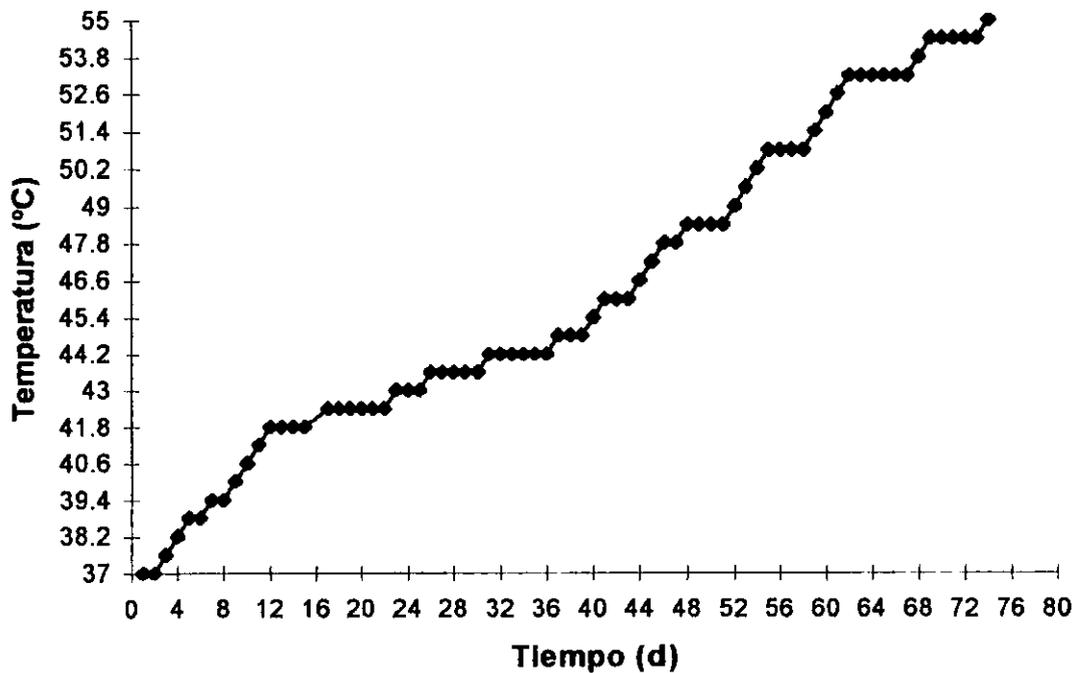


FIGURA 11. Incremento de la temperatura durante el acondicionamiento a 55 °C

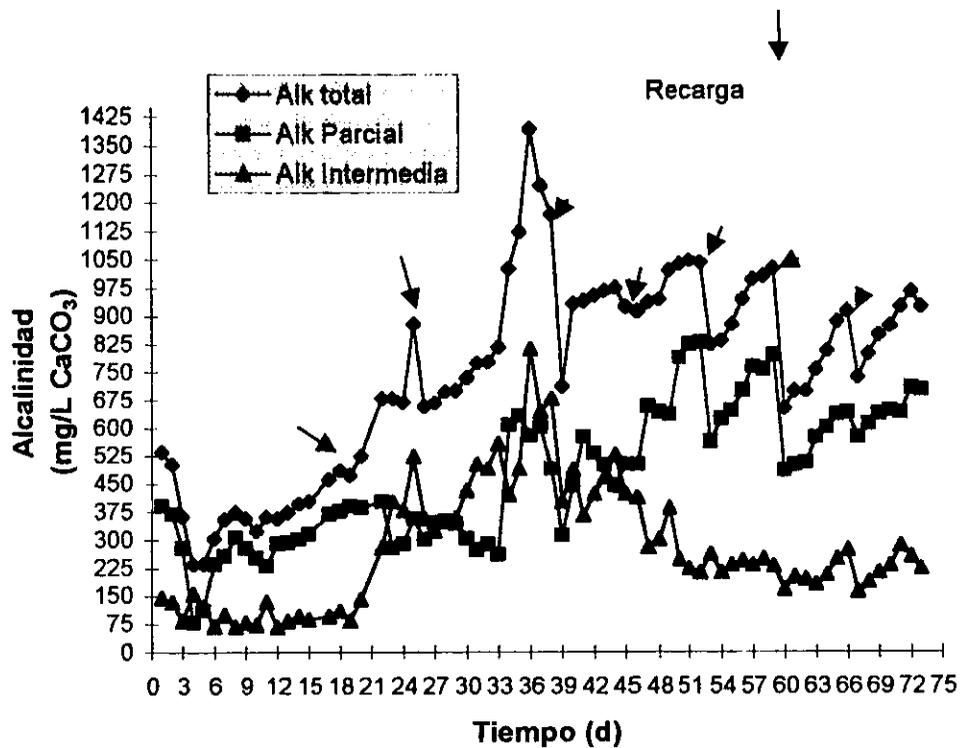


FIGURA 12. Evolución de la alcalinidad durante el acondicionamiento a 55 °C

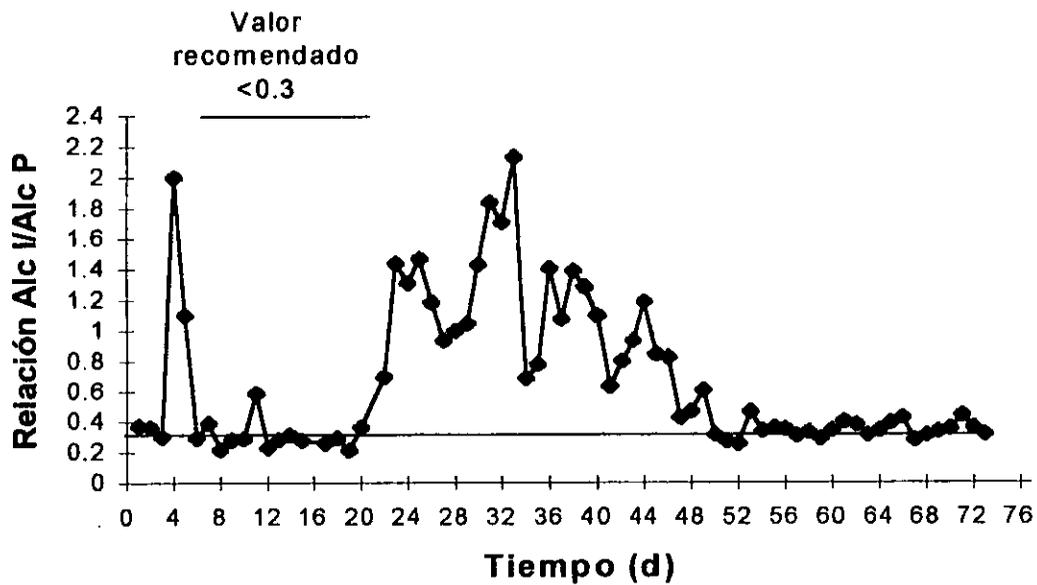


FIGURA 13. Relación Alc I : Alc P a lo largo del acondicionamiento a 55 °C

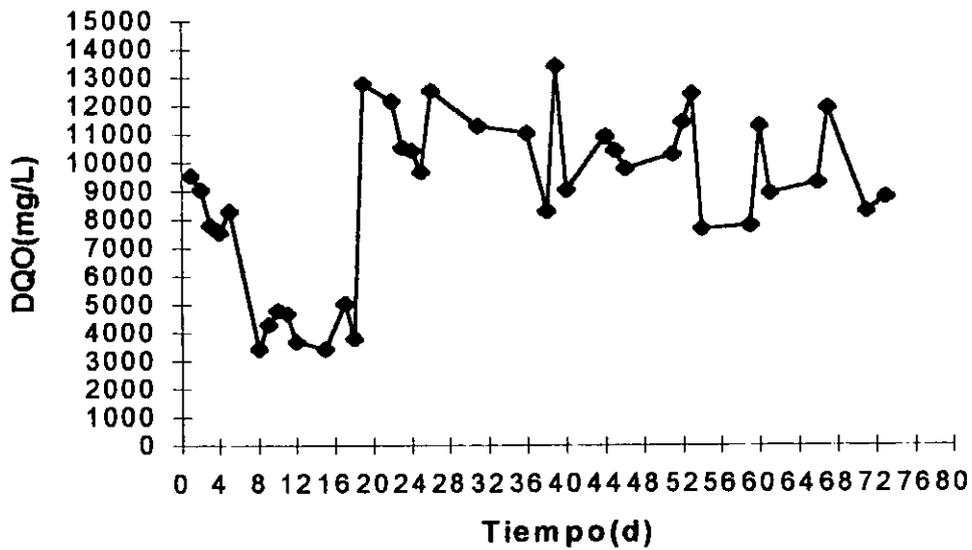


FIGURA 14. Evolución de la DQO durante el acondicionamiento a 55 °C

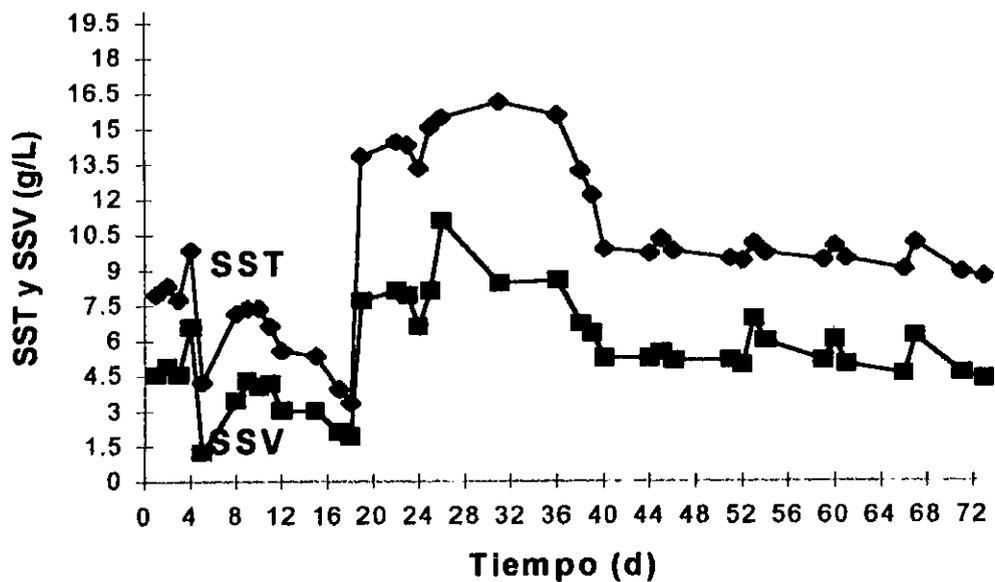


FIGURA 15. Evolución de los SST y SSV durante el acondicionamiento a 55 °C

**TABLA 16. Producción de biogás a lo largo del acondicionamiento a 55 °C**

Día	Biogás (L / d) X̄ (3 observaciones)	Desviación Estándar (L / d)
7	5.188	0.2088
10	4.53	0.1118
13	4.04	0.1142
40	16.488	0.6943
51	18.192	0.3623
58	14.832	0.432
65	17.1408	0.2924
72	14.736	0.5819

La inestabilidad del reactor cuando se pasó de la modalidad en lote a la modalidad semicontinua semanal parece estar dada por dos factores, por un lado, la sobrealimentación del digester pasando del régimen por lote a un TRH de 8.75 días y COV de DQO y de SSV de 1.97 y 1.14 kg/m<sup>3</sup>\*d, respectivamente. Dichas cargas fueron las más altas que se tuvieron durante el acondicionamiento. Por otro lado, la falla en la agitación del equipo, a pesar de que se mantuvo la temperatura constante, disminuyó considerablemente la interacción microorganismo (principalmente los metanógenos) - sustrato. Una vez recuperado el reactor, el comportamiento de remoción de los parámetros medidos fue un ciclo incremento – disminución conforme transcurría la semana, manteniendo un intervalo constante de remoción a pesar de las variaciones en el lodo crudo (tabla 17). Vale la pena destacar que a pesar de que la alcalinidad se mantuvo por debajo de 1000 mg/L se consideró como estable al proceso por otras características como la relación alcalinidad intermedia : alcalinidad parcial, constancia en el pH, remoción de DQO y SSV y olor a tierra mojada. Los valores relativamente bajos de alcalinidad pueden explicarse tanto por la baja alcalinidad del lodo crudo como por las bajas COV trabajadas (tabla 17), bajas en comparación con las que generalmente se manejan en digestores anaerobios de alta tasa. Como puede verse más adelante, en el apartado 6.1.2, si bien la alcalinidad es baja, la concentración de ácidos grasos volátiles, aun en una inestabilidad del proceso, también es baja en comparación con las reportadas por la literatura como concentraciones problemáticas. Estas alcalinidades bajas se mantienen en todo el experimento, no sólo a 55 °C sino también a 65 °C. Las únicas ocasiones en que se alcanzan alcalinidades cercanas o por encima de 1000 mg/L es cuando el reactor se encuentra operando mal (figura 12) y se puede constatar que el mayor aporte para dicha alcalinidad proviene de la alcalinidad intermedia, es decir, de la alcalinidad correspondiente a los ácidos grasos volátiles.

**TABLA 17. Intervalos en los valores registrados para varios parámetros en el lodo crudo durante el acondicionamiento a 55 °C**

Parámetro	Intervalo
Carga orgánica volumétrica de DQO (kg / m <sup>3</sup> *d)	0.4125 – 1.97. La mayor carga fue al cambiar a TRH de 8.75 días
Carga orgánica volumétrica de SSV (kg / m <sup>3</sup> *d)	0.22 – 1.14. La mayor carga fue al cambiar a TRH de 8.75 días
Alcalinidad (mg CaCO <sub>3</sub> / L)	139.37 – 500
pH	6.8 – 7

En este caso no se manejaron porcentajes de remoción (DQO y/o SSV) porque no sería representativo ya que la temperatura se varió todo el tiempo (figura 11).

### 6.1.2 Estabilización

La tabla 18 muestra una reseña de lo sucedido durante la estabilización del reactor a 55 ° C.

Tabla 18. Cronología de la estabilización del reactor a 55 ° C

Día	Evento
1 (29 de julio de 1999)	TRH = 10 días, alimentación semicontinua semanal.
57	Cambio del TRH a 15 días
63	Cambio del TRH a 20 días
70	El olor del lodo comienza a ser el de un lodo estable (olor a tierra mojada)
84	Realización de las cinéticas de inactivación para coliformes totales y <i>E.coli</i>
91	Realización de las cinéticas de inactivación para <i>Candida albicans</i>
98	Fin del experimento

El objetivo fue obtener un lodo estable para poder realizar las cinéticas y que éstas fueran representativas de un proceso de digestión termofílica operando normalmente, y no comparar el comportamiento del proceso a diferentes TRH. El reactor tuvo que pasar de 10 días de TRH a 15 y finalmente a 20 en donde se estabilizó. En este apartado se presentan los resultados obtenidos cuando el digestor operaba a 10 y 20 días de TRH, respectivamente. En la figura 16 podemos observar la evolución del pH a ambos TRH.

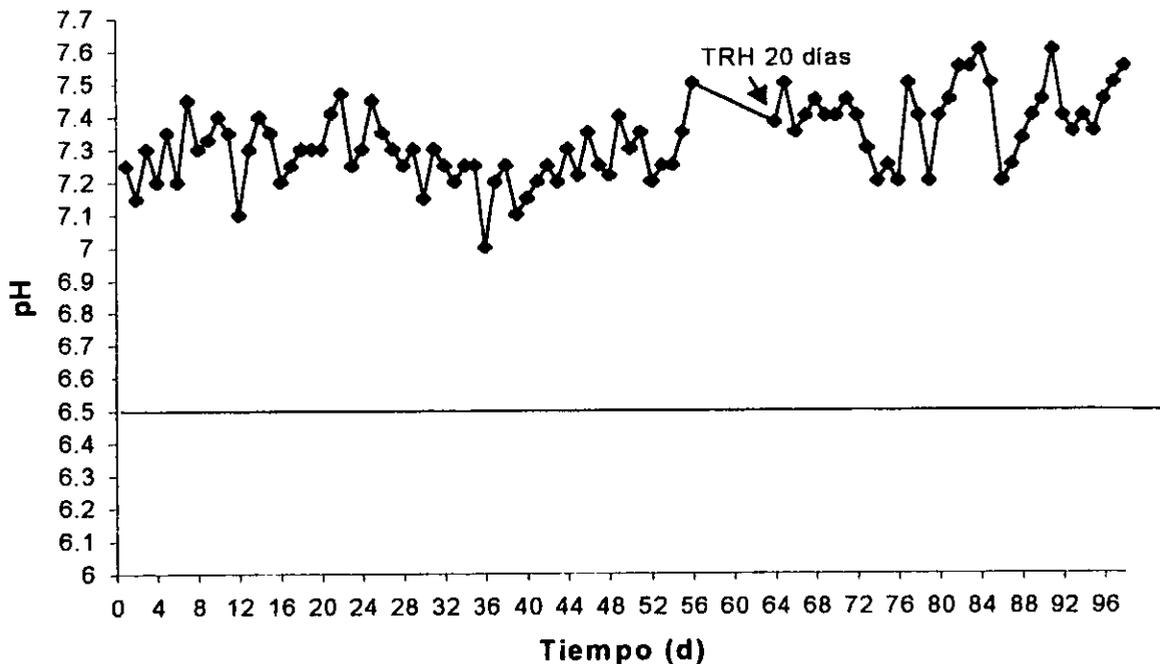


FIGURA 16. Evolución del pH durante la estabilización a 55 ° C

El pH a tiempo de retención de 20 fue mayor que el de 10 días, aunque en ambos casos el pH nunca pareció tener problemas ya que se mantuvo por encima de 7. También, en ambos casos, el comportamiento del pH subía y bajaba conforme se realimentaba el reactor y transcurría la semana sin alimentación. Dicho fenómeno de incremento - disminución se registra también en el resto de los parámetros.

Los motivos para cambiar el TRH fue que los olores que se percibían no eran de un lodo estable, la alcalinidad total iba en descenso y la relación alcalinidad intermedia:alcalinidad parcial no era muy buena (FIG. 19). Fuera de esto, no existió realmente otro factor que indicará que el reactor operaba mal puesto que los valores de remoción de DQO y de SSV y la producción de gas se encontraban dentro de lo considerado como normal, aunque después se observó que sus valores eran distintos a los del proceso con TRH = 20 días con el cual sí se obtuvo un olor de lodo estable (tierra mojada) y se mejoró el comportamiento del resto de los parámetros.

La concentración de AGV en el lodo cuando el proceso estaba con TRH de 10 días y se pensó que eran la razón del problema, fue de **91.95 mg / L** como ácido acético. La muestra para este análisis fue tomada el sexto día de la semana operativa correspondiente, por lo que se cree (no se comprobó), con base en la bibliografía (Zinder *et al*, 1984), que la concentración de AGV al principio de la semana operativa, justo después de realimentado el reactor, debía ser mayor pero aún así no lo suficiente como para encontrarse fuera de los valores considerados normales y por ende desestabilizar al reactor. Al analizar las concentraciones de AGV en el reactor cuando estaba a 20 días de TRH y ya con olores de lodo estable, se encontró que estas eran mucho menores al valor obtenido de 91.95 mg / L y además se confirmó que los AGV se incrementaban a partir de que se realimentaba el reactor y hasta muy entrada la semana y disminuían al final de la misma (FIG 17). Aunado a la disminución en las concentraciones de los AGV, se detuvo el decaimiento de los valores de alcalinidad y estos empezaron a subir con el TRH de 20 días (FIG 18), además la relación alcalinidad intermedia:alcalinidad parcial mejoró significativamente (FIG 19).

A diferencia de la alcalinidad, el pH y los AGV, el desempeño del digestor con respecto a la remoción de DQO con TRH de 10 días fue en general mejor que cuando el tiempo de retención se modificó a 20 días (tabla 19 y figura 20). Lo mismo sucedió con respecto a la remoción de SSV (tabla 20 y figura 21). Cabe aclarar que al igual que en el acondicionamiento el lodo crudo sufrió variaciones relativamente frecuentes a lo largo del tiempo que duró el experimento (tabla 21).

La explicación para la inestabilidad a 10 días de TRH está fundamentada en el hecho de que la modalidad de alimentación es fundamental en el desempeño de un digestor, existiendo mejores comportamientos conforme la modalidad es en continuo o muy cercana (Farrel *et al*, 1988). El TRH de 10 días fue entonces demasiado corto para lograr la estabilización bajo una modalidad de alimentación semicontinua semanal y las COV comparativamente más altas que de esto se generaba. Incluso existen casos de digestores operando mal a 55 °C con un TRH de 10 días y una alimentación semicontinua diaria (Watanabe *et al*, 1997).

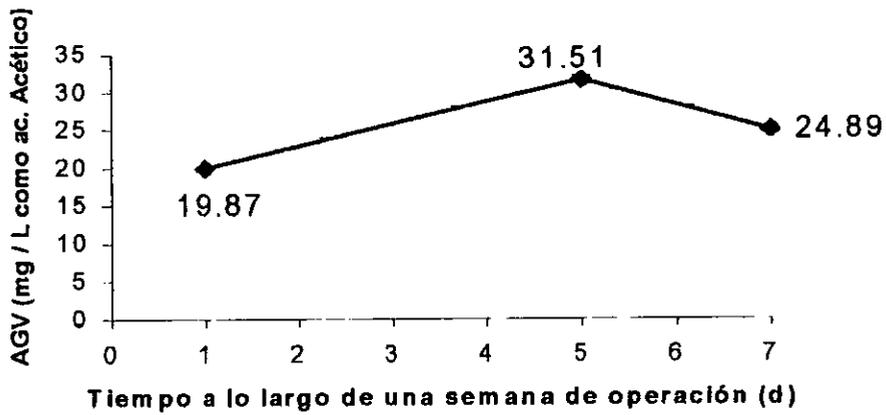


FIGURA 17. Evolución de los AGV durante una semana operativa

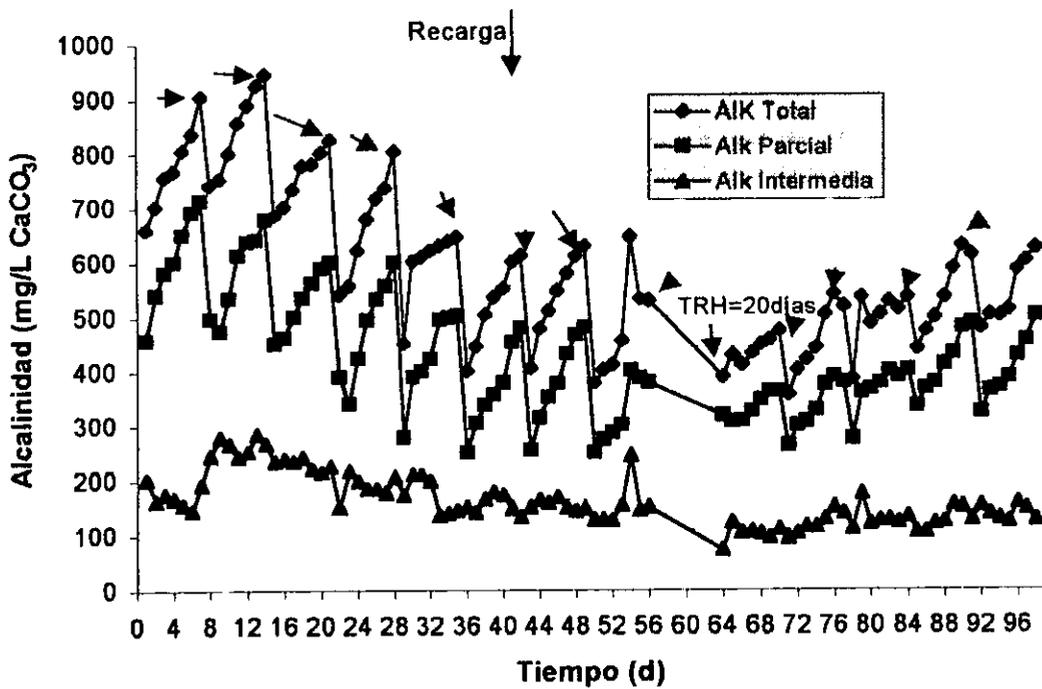


FIGURA 18. Evolución de la alcalinidad durante al estabilización a 55 °C

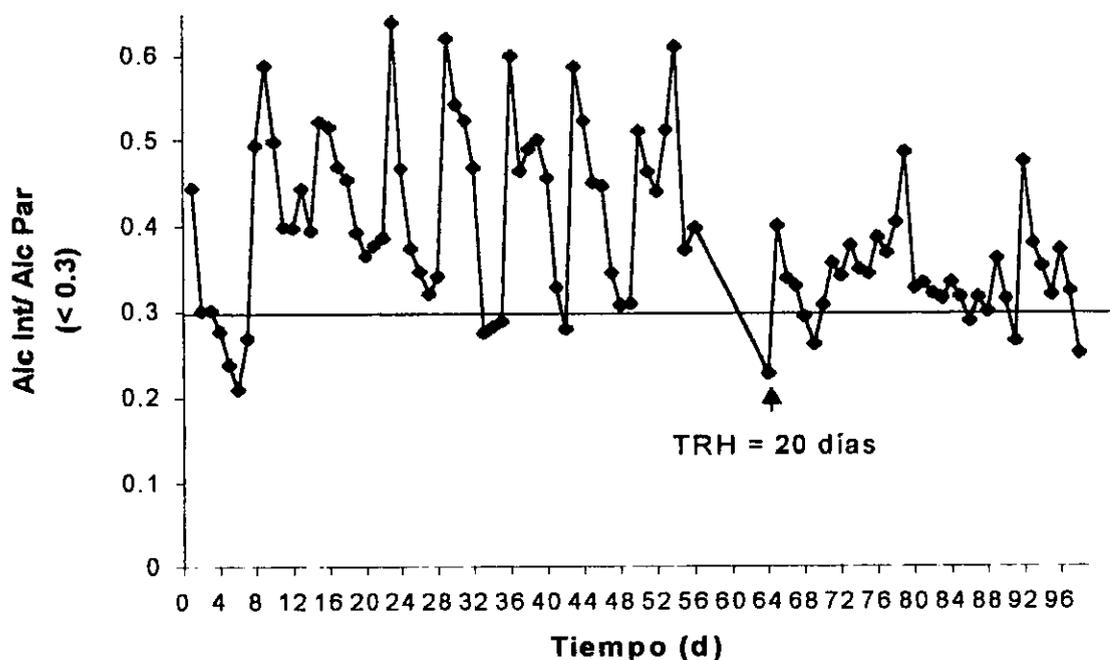


FIGURA 19. Relación alcalinidad intermedia:alcalinidad parcial durante la estabilización a 55 °C

Tabla 19. Eficiencias de remoción de DQO en la estabilización del reactor a 55 °C (TRH = 10 días y TRH = 20 días)

TRH (días)	COV-DQO (kg/m <sup>3</sup> *d)	% remoción DQO (promedio)	Desviación Estándar
10	1.88	53.274	4.88
10	1.44	55.325	1.1950
20	0.405	42.43	1.088
20	0.44	59.735	12.027

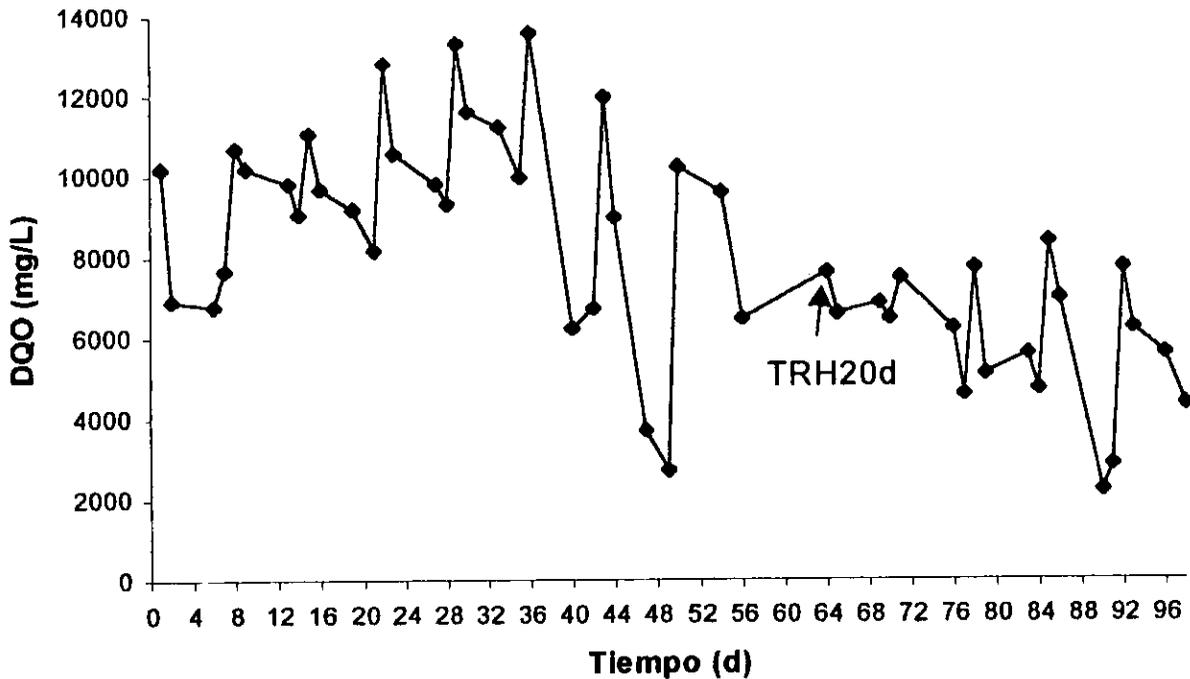
Tabla 20. Eficiencias de remoción de SSV en la estabilización del reactor a 55 °C (TRH = 10 días y TRH = 20 días)

TRH (días)	COV – SSV (kg/m <sup>3</sup> *d)	% remoción de SSV(promedio)	% remoción de SSV/SST (promedio)	Desv. Estándar SSV	Desv. Estándar SSV/SST
10	0.745	46.6	19.04	3.1411	1.579
10	0.748	55.4	23.7	3.1240	
20	0.23	51.07	8.3266	17.15	2.7288
20	0.226	48.55	9.995	2.05	1.0111

- La remoción de SSV es el balance global entre los SSV del lodo crudo que entran al reactor y los SSV que se tienen al final de la semana operativa.
- La remoción de SSV/SST es la comparación entre la relación de SSV/SST del lodo crudo que entra al reactor y la relación SSV/SST que se tienen al final de la semana operativa.

**Tabla 21. Valores registrados en el lodo crudo durante la estabilización a 55 °C**

Parámetro	Valores	Días
DQO (mg / L)	18889.13, 14475, 6725, 8100 y 8975	1-35, 36-56, 57-63, 64-84 y 85-98 respectivamente
SSV (mg / L)	7450, 7480, 5290, 4600 y 4520	1-35, 36-56, 57-63, 64-84 y 85-98 respectivamente
COV - DQO (kg / m <sup>3</sup> *d)	1.88, 1.44, 0.44, 0.405 y 0.44	1-35, 36-56, 57-63, 64-84 y 85-98 respectivamente
COV - SSV (kg / m <sup>3</sup> *d)	0.745, 0.748, 0.35, 0.23 y 0.226	1-35, 36-56, 57-63, 64-84 y 85-98 respectivamente
Alcalinidad (mg CaCO <sub>3</sub> / L)	239.725, 211.85, 172.825 y 217.42	1-35, 36-63, 64-84 y 85-98 respectivamente
pH	7.25, 7.1 y 7.3	1-56, 57-84 y 85-98 respectivamente



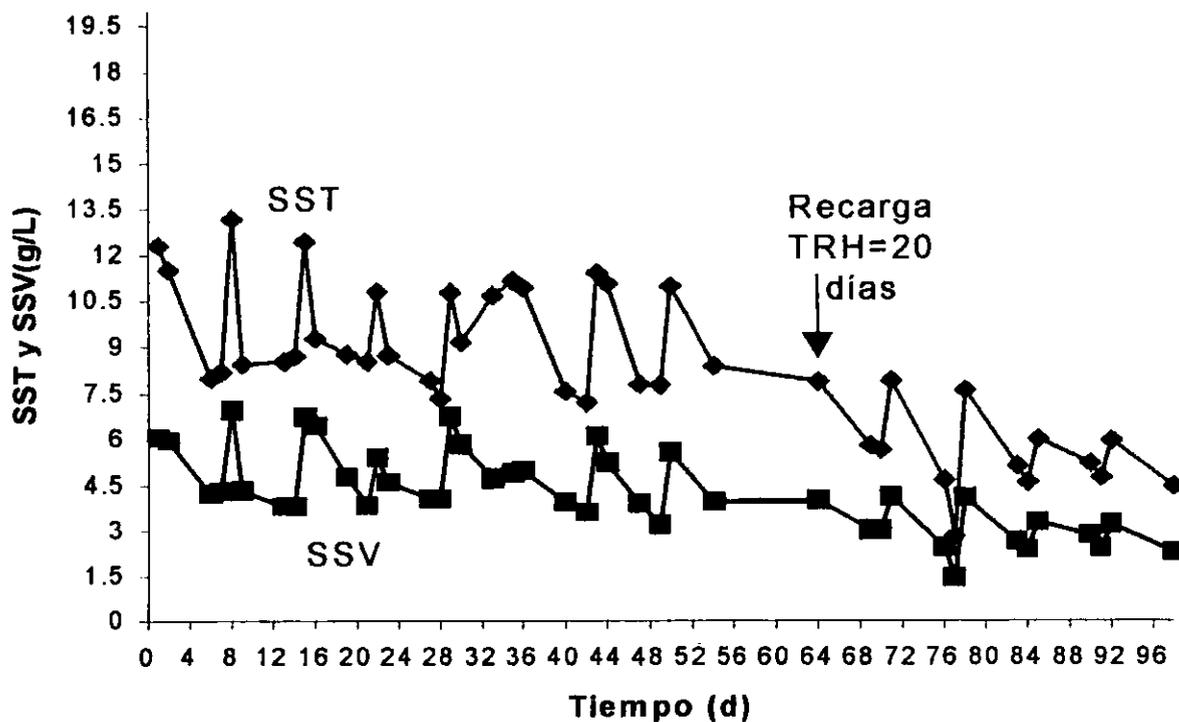
**FIGURA 20. Evolución de la DQO durante la estabilización a 55 °C**

La tabla 22 muestra la producción de biogás con TRH de 10 y 20 días, respectivamente.

**Tabla 22. Producción de biogás durante la estabilización a 55 °C**

TRH (días)	Producción promedio de biogás (3 observaciones por día) (L/d)				
	Día 6	Día 13	Día 27	Día 48	Día 55
10	22.3968	23.136	19.724	20.2848	19.2768
Media	20.96736				
Des. Estándar	1.7007				
20	Día 69	Día 76	Día 83	Día 90	Día 97
	22.3968	23.9904	23.1936	23.9904	24.9936
Media	23.71296				
Des. Estándar	0.9741				

- Cada punto es la media de tres observaciones



**FIGURA 21. Evolución de los SST y SSV durante la estabilización a 55 °C**

Como puede observarse en las gráficas 20 y 21, los porcentajes de remoción eran muy similares, incluso llegaban a ser mejores con el TRH de 10 días. La explicación que se tiene para esto es que, como se muestra en los resultados, las COV tanto de SSV como de DQO son mayores cuando el digester operó bajo un TRH de 10 días, entonces, aunque lograba remover las mismas cantidades de DQO y SSV que se removían en el digester a 20 días, todavía tenían carga orgánica por estabilizar, de ahí que los olores no fueran de un lodo estable, sino más bien de uno parcialmente digerido, y esto puede en cierta forma corroborarse con la diferencia en las concentraciones de AGV que existió entre los dos TRH.

Otro aspecto interesante es la baja concentración de alcalinidad que se tuvo. Esto se puede explicar con lo mencionado en el acondicionamiento, el lodo crudo venía con muy baja alcalinidad y además, las cargas orgánicas que se trabajaron fueron muy bajas. De hecho, así como había bajas alcalinidades, había bajas concentraciones de AGV, lo cual es congruente y lleva a pensar que el reactor estaba estable aunque no contará con las concentraciones de alcalinidad recomendadas ( $> 1,000$  mg/L). Cabe destacar que la relación alcalinidad intermedia:alcalinidad parcial resultó un parámetro más confiable que la alcalinidad total para determinar estabilidad en el reactor ya que cuando el reactor se encontraba mal, la relación subía, mientras que cuando el reactor se encontraba estable, la relación se mantenía cercana a 0.3. Y es que dicha relación no es dependiente de bajas COV o bajas alcalinidades de lodo crudo, sino que es resultado del equilibrio entre los AGV y la alcalinidad carbonatada y si el reactor está estable, tenga la alcalinidad total que tenga, esta relación se conservará cercana a 0.3.

## 6.2 ACONDICIONAMIENTO Y ESTABILIZACIÓN A 65 °C

### 6.2.1 Acondicionamiento

En la tabla 23 se encuentra un resumen de lo acontecido durante el acondicionamiento del reactor a 65 °C. En las figuras 22 y 23 puede verse la evolución del pH y de la temperatura (inducida).

Tabla 23. Cronología del acondicionamiento a 65 °C

Día	Evento
1 (16 de junio de 1999)	Arranque. TRH = 9.33 días con alimentación semicontinua semanal. Temperatura = 44.2 °C
6	Descenso del pH hasta 6.3, el cual se incremento con una solución de NaOH 1N
8	Comienza el TRH = 18 días
79	Se alcanzaron los 65 °C

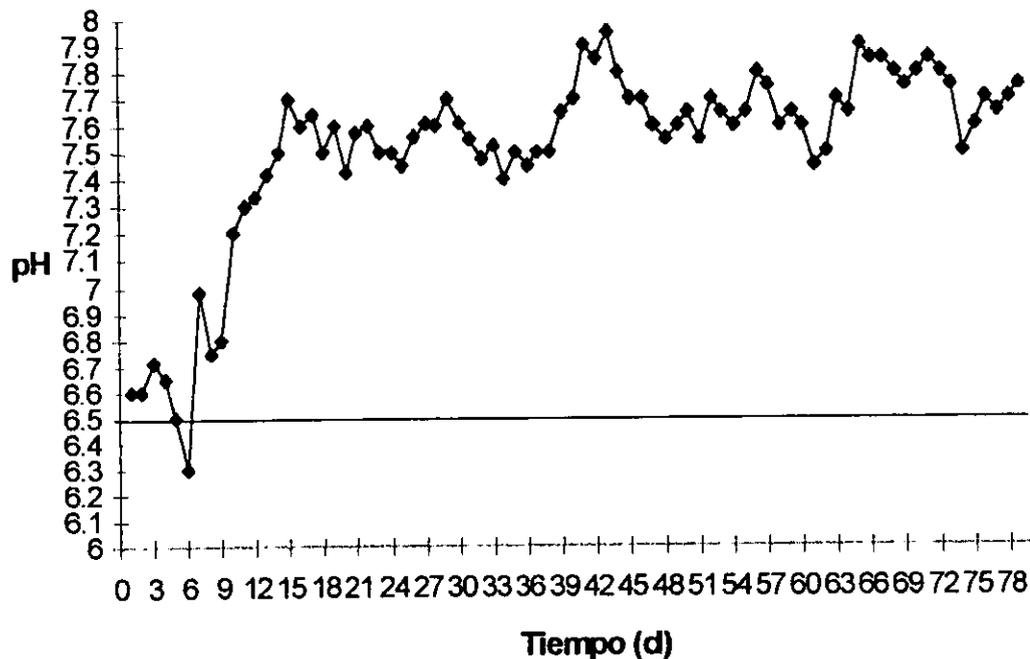
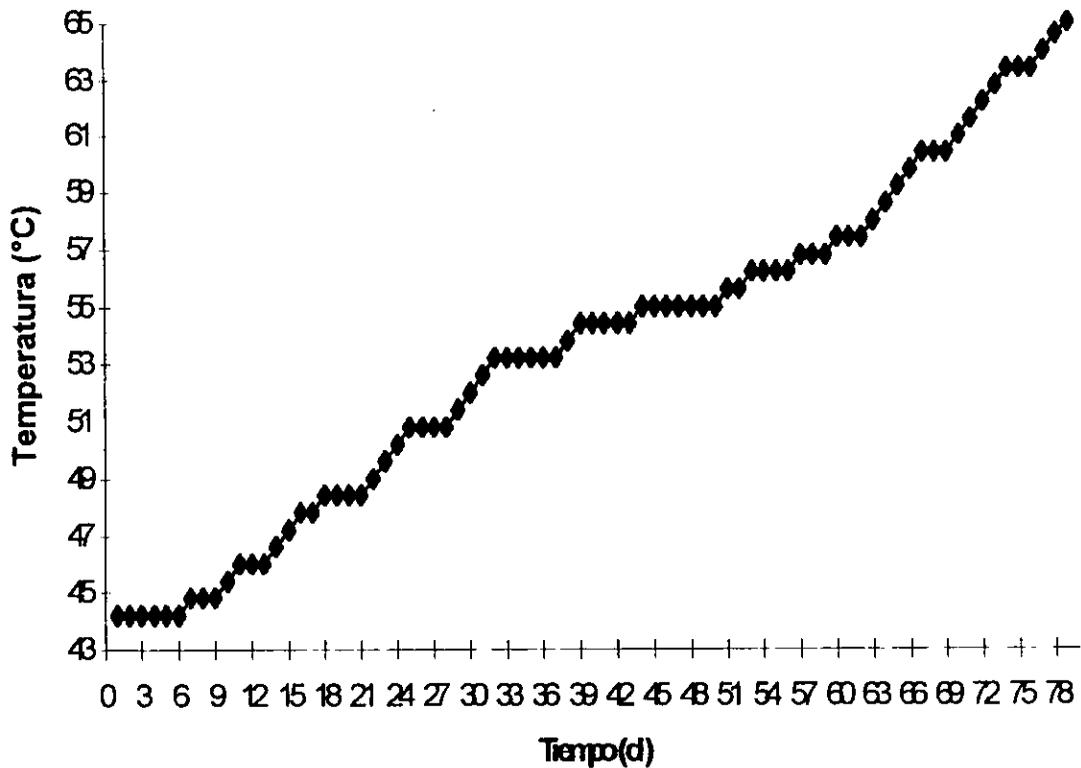


FIGURA 22. Evolución del pH durante el acondicionamiento a 65 °C



**FIGURA 23. Incremento de la temperatura durante el acondicionamiento a 65 °C**

El inóculo del reactor fue tomado del digestor que se estaba acondicionando para 55 °C cuando este último estaba a 44.2 °C y su pH estaba descendiendo después del cambio de modalidad por lote a alimentación semicontinua semanal. Como se ve en la figura 22, el pH empezó a descender desde el arranque, llegando a valores de 6.3 el día 6, por lo que tuvo que subirse con una solución de NaOH 1N. A partir de ese día, el pH empezó a subir recuperándose rápidamente, a diferencia de lo que sucedió en el reactor a 55 °C, de modo que el día 15 ya tenía un valor de 7.7, aunque todavía subió más a lo largo del acondicionamiento. A partir de que el pH del reactor se recuperó, comenzó a bajar y subir conforme se realimentaba el reactor y transcurría la semana operativa sin alimentación, igual que lo sucedido a 55 °C.

Conforme el pH empezó a bajar, la alcalinidad empezó abajar y la relación alcalinidad intermedia:alcalinidad parcial se alejó de los valores recomendados (cercaos a 0.3). Una vez que el pH se subió con la solución de NaOH 1N empezaron a recuperarse rápidamente (figura 24 y 25) de modo que el día 15 ya mostraba signos de recuperación teniendo un valor de relación alcalinidad intermedia:alcalinidad parcial de 0.38. A partir de ese momento, la alcalinidad siguió el comportamiento disminución – incremento típico de la alimentación semicontinua semanal.

Con respecto a la DQO; las eficiencias de remoción fueron muy bajas hasta el día 22, donde ya empezó a tener mejores remociones y el típico comportamiento de incremento – disminución del experimento (figura 26). Mientras que con los SST y SSV si empezó a haber remoción desde el arranque aunque el comportamiento típico de incremento – disminución comenzó a partir del día 15 (figura 27). Cabe aclarar que al igual que en el proceso a 55 °C, el crudo tuvo variaciones frecuentes a lo largo del experimento (tabla 24).

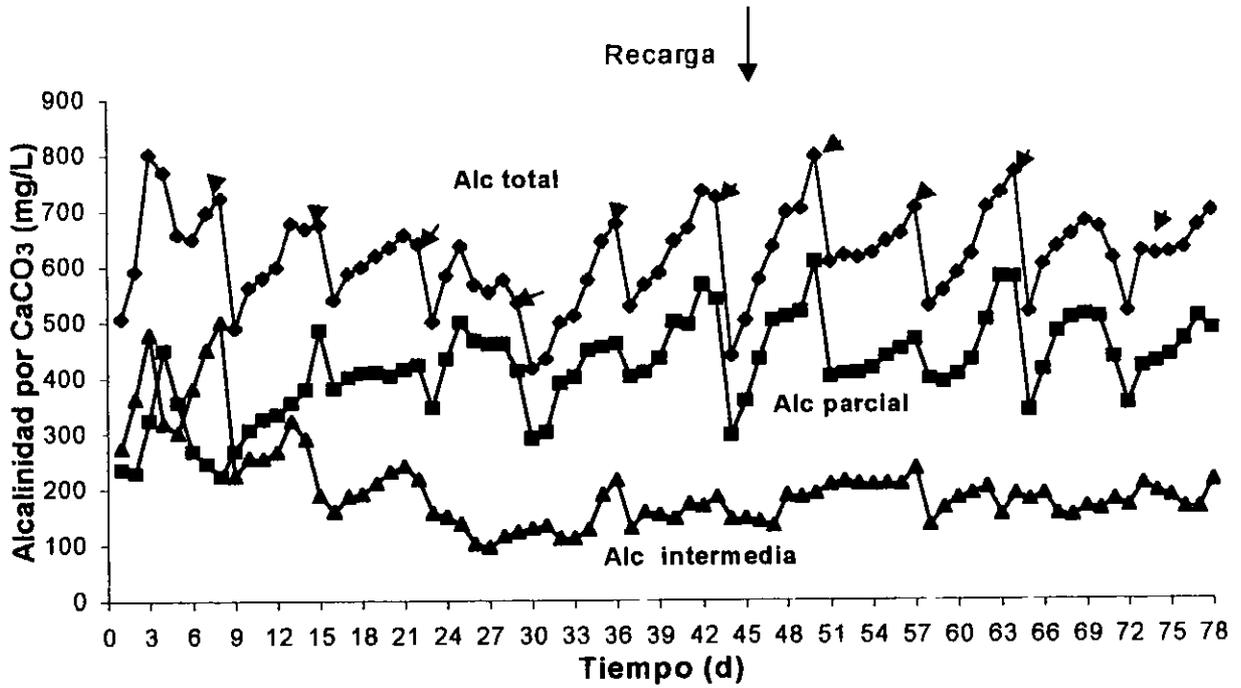


FIGURA 24. Evolución de la alcalinidad durante el acondicionamiento a 65 °C

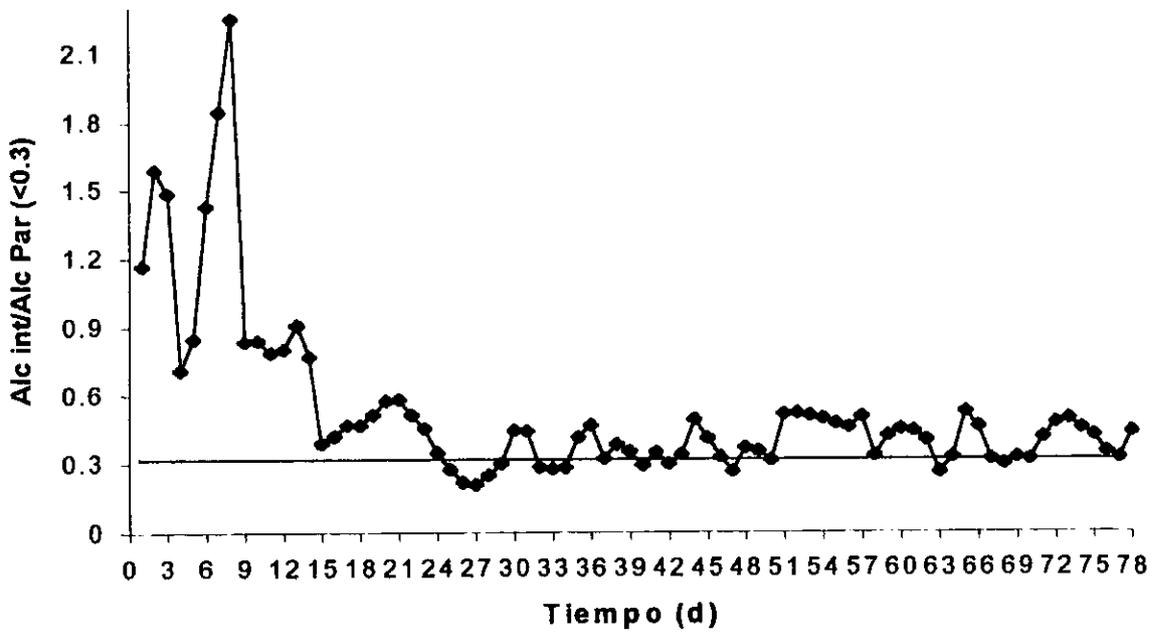


FIGURA 25. Relación alcalinidad intermedia:alcalinidad parcial durante el acondicionamiento a 65 °C

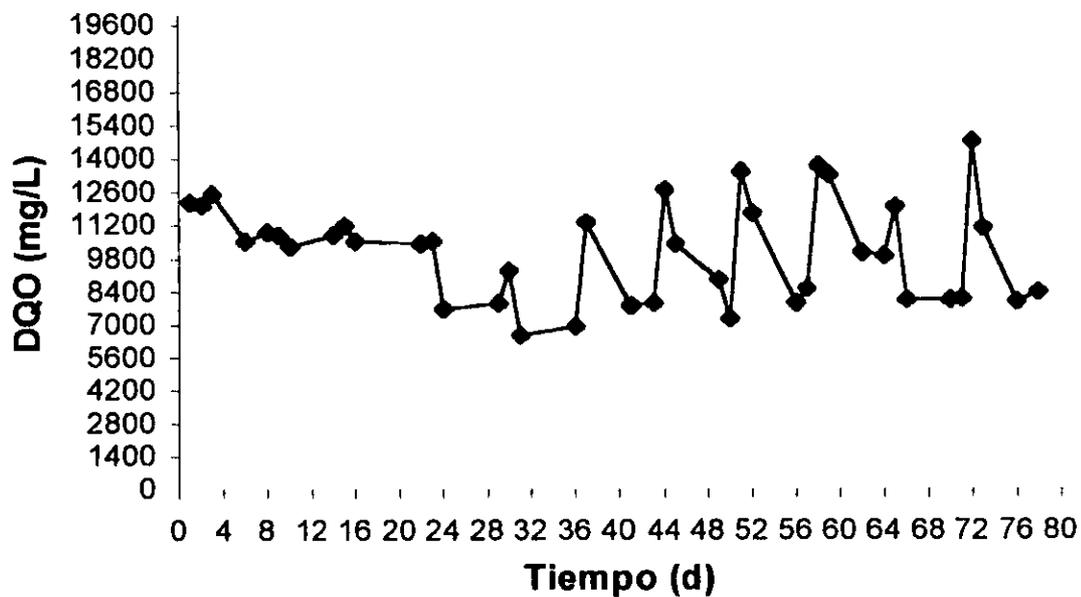


FIGURA 26. Evolución de la DQO durante el acondicionamiento a 65 °C

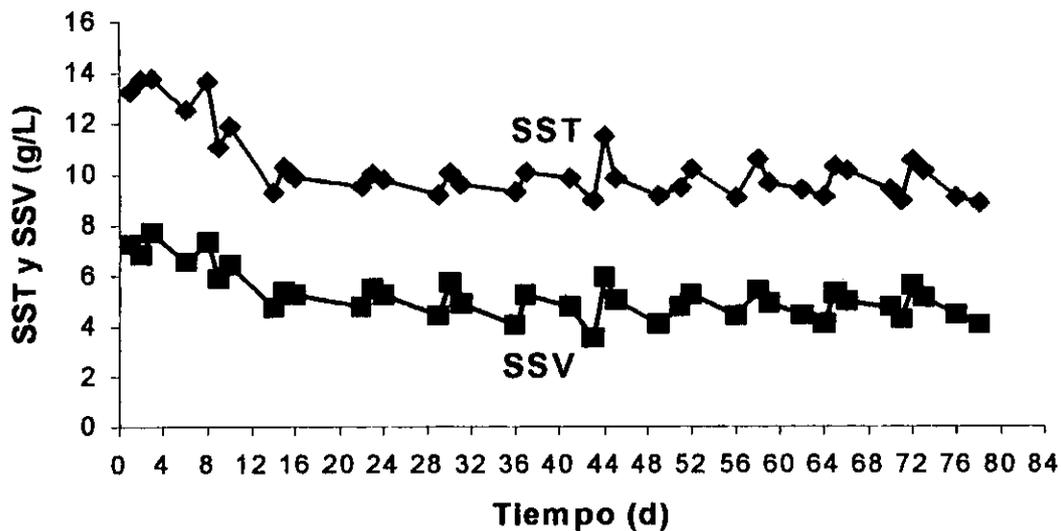


FIGURA 27. Evolución de los SST y SSV durante el acondicionamiento a 65 °C

**Tabla 24. Intervalos registrados en el lodo crudo durante el acondicionamiento a 65 °C**

Parámetro	Intervalo
COV – DQO (kg/m <sup>3</sup> *d)	0.48 – 1.37. La carga mayor se tuvo en el arranque
COV – SSV (kg/m <sup>3</sup> *d)	0.226 – 0.87. La carga mayor se tuvo en el arranque
Alcalinidad (mg CaCO <sub>3</sub> / L)	139.375 – 440.42
pH	6.65 – 7.25

Con respecto a la producción de biogás, al igual que a 55 °C, se elevó conforme la temperatura se incrementaba (tabla 25). La diferencia con respecto a los 55 °C es que se tuvieron altas producciones de biogás desde el arranque puesto que el lodo de inóculo ya estaba aclimatado a condiciones termofilicas.

**Tabla 25. Producción de biogás durante el acondicionamiento a 65 °C**

Día	Biogás (L / d)	Desviación estándar
	$\bar{X}$ (3 observaciones)	
3	10.735	0.5328
11	15.0816	0.4196
22	15.3456	0.2993
28	17.496	0.2598
43	18.768	0.15275
53	20.352	1.0263
67	20.9424	0.79096
74	23.232	0.41633

La razón del desequilibrio inicial del reactor, parece ser la misma que para el caso del acondicionamiento a 55 °C, una sobrealimentación, ya que las cargas de arranque fueron 1.37 y 0.87 kg/m<sup>3</sup>\*d de DQO y SSV, respectivamente, a un TRH de 9.33 días por una semana. Además, el inóculo fue tomado del digester a 55 °C cuando este último empezaba a tener problemas (después de los 18 días en lote y la falla en la agitación del equipo). Fuera de ese suceso, el reactor operó muy bien, como puede verse en los resultados.

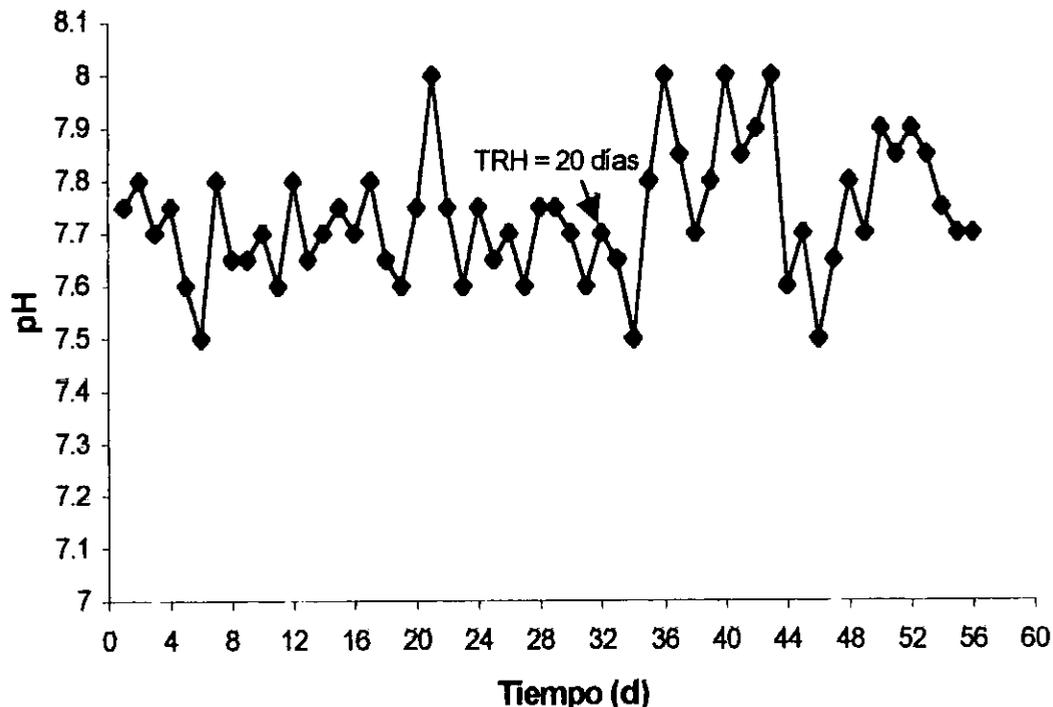
### 6.2.2. Estabilización

En la tabla 26 se muestra una reseña de lo sucedido durante la estabilización a 65 grados centígrados.

**Tabla 26. Cronología y sucesos acontecidos durante la estabilización a 65 °C**

Día	Evento
1 (2 septiembre de 1999)	TRH = 10 días con alimentación semicontinua semanal
22	TRH = 15 días
29	TRH = 20 días
49	Cinética de coliformes totales y <i>E. coli</i>
56	Cinética de <i>Candida albicans</i> y fin del experimento.

El pH fue más alto en el TRH de 20 días que en el de 10 días y el comportamiento del pH fue el típico disminución – incremento en ambos tiempos de retención (figura 28). Los olores en el reactor con TRH de 10 días fueron fuertemente a pescado todo el tiempo (metilaminas) mientras que con el TRH de 20 días, los primeros días de la semana operativa se tenía un fuerte olor a pescado, sin embargo, al acercarse el final de la semana, los olores empezaban a ser de tierra mojada.

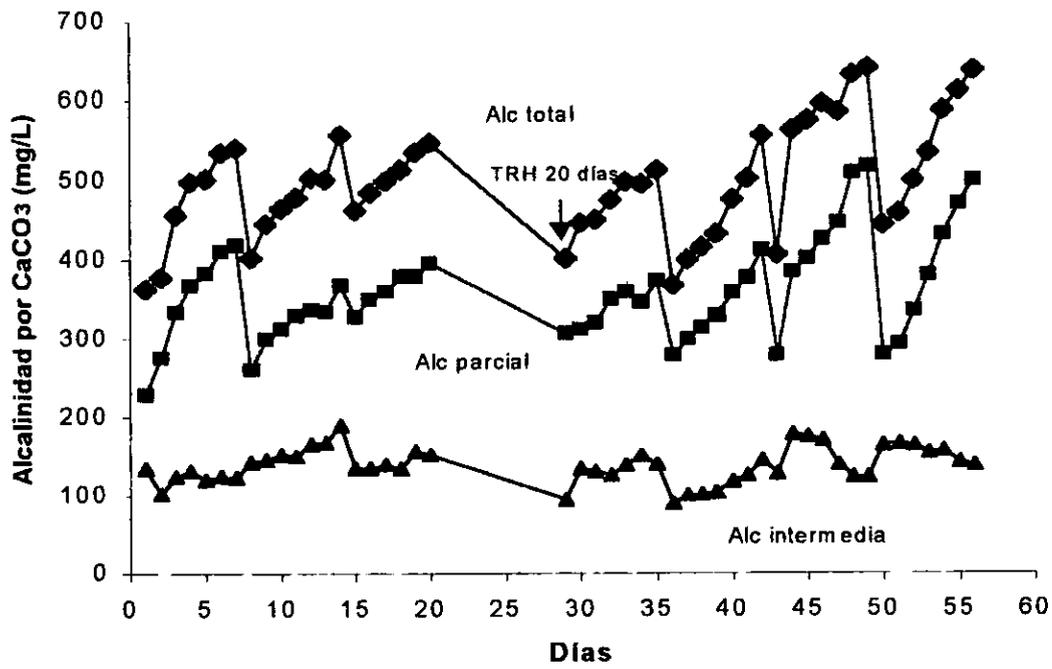


**FIGURA 28.** Evolución del pH durante la estabilización a 65 °C

La alcalinidad también subió con el TRH de 20 días (figura 29) y la relación alcalinidad intermedia:alcalinidad parcial bajó hasta valores recomendados.

Los AGV durante el TRH de 20 días fueron más altos que los obtenidos a 55 °C, pero también llegaban a sus valores máximos a la mitad de semana y disminuían al final de la misma (figura 31). En este caso, no se midieron los AGV a 10 días porque basados en la experiencia a 55°C se decidió que los motivos de la inestabilidad del reactor podrían ser los mismos y la solución era cambiar el TRH. Esta decisión resultó ser correcta y se puede constatar en los resultados y los olores finales (tierra mojada) que se tuvieron con el TRH = 20 días.

La remoción de DQO fue ligeramente mayor a un TRH = 10 días (figura 32 y tabla 27) mientras que la remoción de SSV fue ligeramente mayor a un TRH de 20 días (figura 33 y tabla 28). Aquí, al igual que a 55 °C, las características del lodo crudo variaron a lo largo del experimento (tabla 29) y las cargas orgánicas tanto de DQO como de SSV fueron mayores para el tiempo de retención de 10 días.



Tiempo (d)

FIGURA 29. Evolución de la alcalinidad durante la estabilización a 65 °C

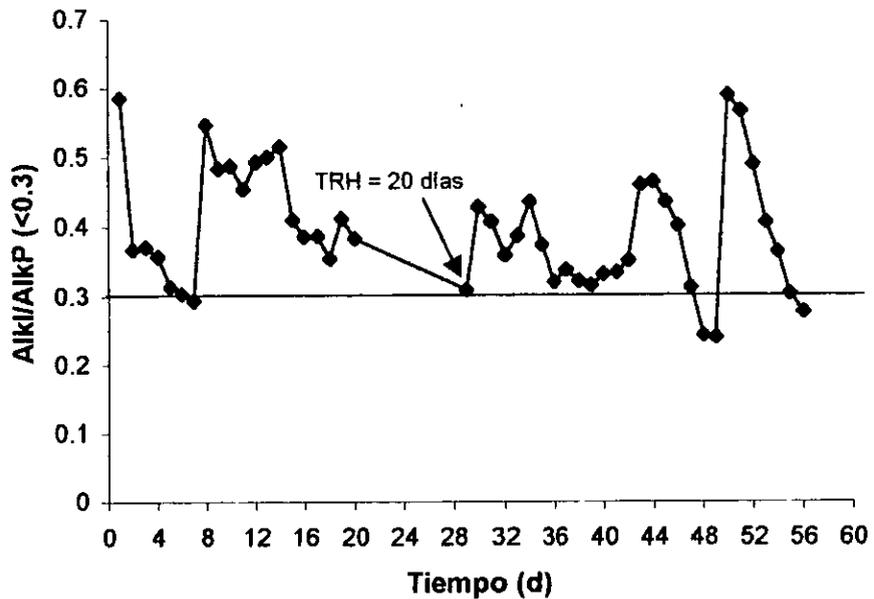


FIGURA 30. Alcalinidad intermedia : alcalinidad parcial durante la estabilización a 65 °C

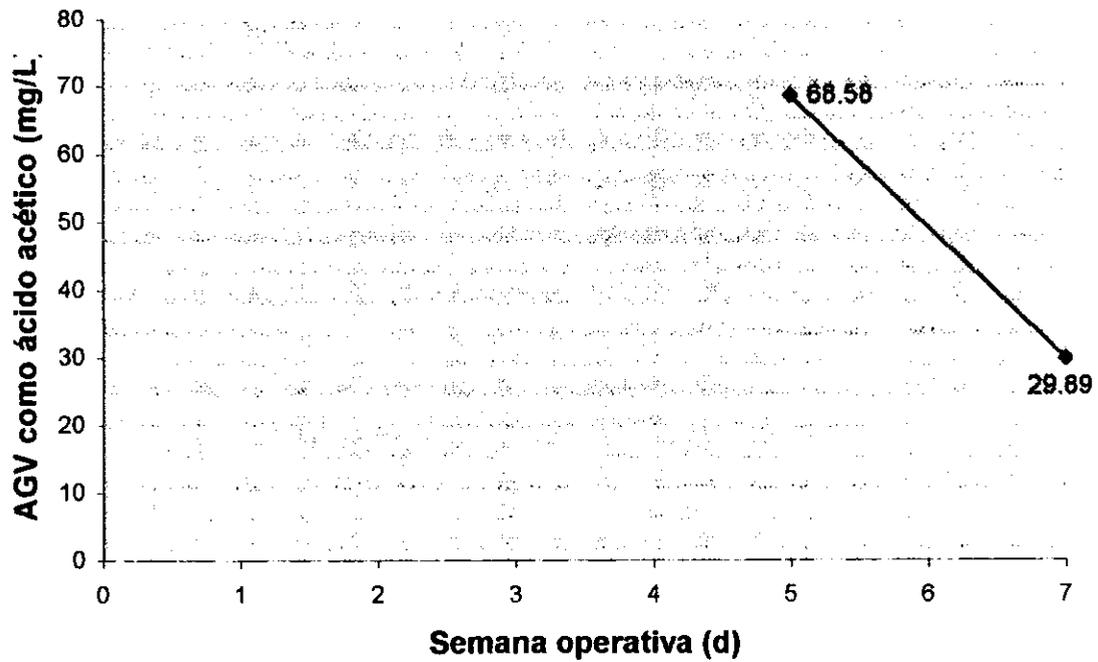


FIGURA 31. Evolución de los AGV a 65 °C con TRH de 20 días

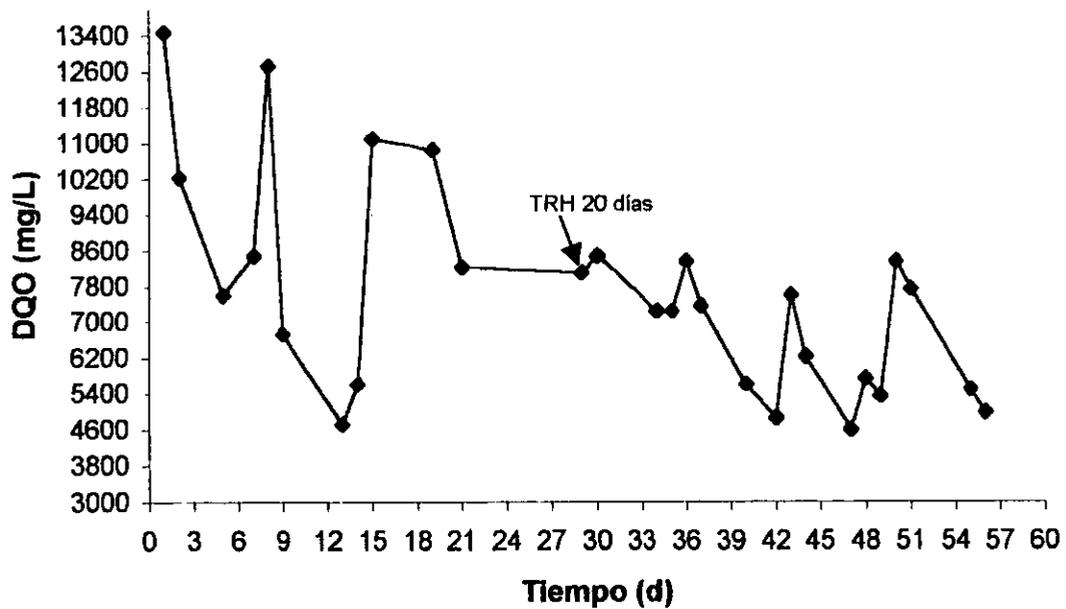


FIGURA 32. Evolución de la DQO durante la estabilización a 65 °C

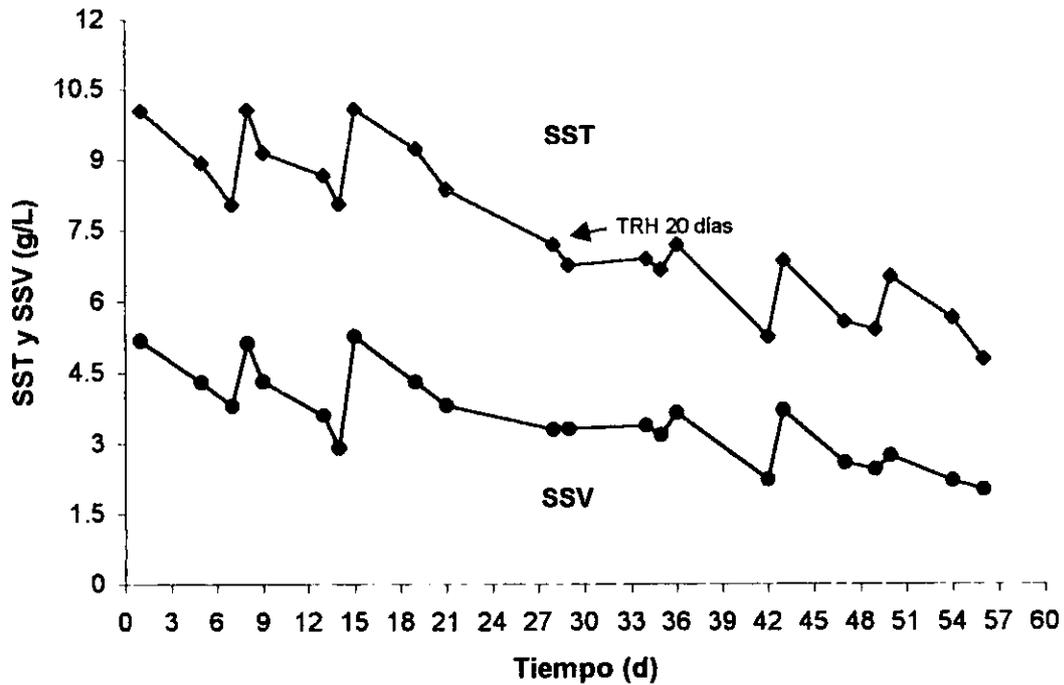


FIGURA 33. Evolución de los SST y SSV durante la estabilización a 65 °C

Tabla 27. Remoción de DQO durante la estabilización a 65 °C

TRH (días)	COV – DQO (kg/m <sup>3</sup> *d)	% remoción (promedio)	Desviación estándar
10	1.44	42.275	1.166
20	0.405	37	4.384
20	0.448	44.5	

Tabla 28. Remoción de SSV durante la estabilización a 65 °C

TRH (días)	COV – SSV (kg/m <sup>3</sup> *d)	% remoción SSV/SST (promedio)	% remoción SSV (promedio)	Desv. est. SSV/SSV	Desv. est. SSV
10	0.748	18.58	53.28	12.36	6.94
20	0.23	19.93	43.3	4.921	10.66
20	0.226	26.78	55.7		

**Tabla 29. Valores registrados en el lodo crudo durante la estabilización a 65 °C**

Parámetro	Valores	Días
SSV (mg/L)	7480, 4600 y 4520	1-21, 22-49 y 50-56 respectivamente
DQO (mg/L)	14475, 8100 y 8975	1-21, 22-49 y 50-56 respectivamente
COV – DQO (kg/m <sup>3</sup> *d)	1.44, 0.405 y 0.448	1-21, 22-49 y 50-56 respectivamente
COV – SSV (kg/m <sup>3</sup> *d)	0.748, 0.23 y 0.226	1-21, 22-49 y 50-56 respectivamente
Alcalinidad (mg CaCO <sub>3</sub> / L)	211.85, 172.825 y 217.42	1-21, 22-49 y 50-56 respectivamente
pH	7.25, 7.1 y 7.3	1-21, 22-49 y 50-56 respectivamente

La producción de biogás fue ligeramente mayor cuando el reactor operó a 20 días de tiempo de retención (tabla 30).

**Tabla 30 Producción de biogás a TRH = 10 días y 20 días a 65 °C**

TRH (d)	Producción promedio de biogás (3 observaciones por día) (L / d)			
	Día 7	Día 14	Día 21	
10	18	21.6	18.9952	
Media	19.537			
Desv. Estándar	1.8590			
20	Día 35	Día 42	Día 49	Día 56
	19.0848	19.7424	20.2848	21.6
Media	20.178			
Desv. Estándar	0.9244			

\*Cada punto es la media de tres observaciones

La inestabilidad presentada por el proceso a 65 °C operado con TRH de 10 días obedece a las mismas razones que el proceso a 55 °C. El TRH de 10 días resultó un tiempo muy corto para estabilizar el lodo bajo una modalidad de alimentación semicontinua semanal. Finalmente, se presenta la tabla 31 en donde se compara el desempeño de ambos reactores a 20 días de TRH. En dicha tabla y en el resto de los resultados concernientes a la estabilización, se puede observar que ambos reactores logran estabilizar los lodos adecuadamente, pero, el digestor a 55°C logra no sólo mejores eficiencias sino que lo hace más rápido. Esto es opuesto a lo que podría esperarse. La explicación es que cuando se manejan temperaturas tan elevadas, conforme la temperatura se incrementa, el equilibrio microbiano se vuelve más frágil. Pero, como ya se mencionó, ambos reactores se comportaron lo suficientemente estables para realizar de manera representativa las cinéticas de inactivación microbiana planeadas.

**Tabla 31. Comparación de los procesos anaerobios termofílicos a 55 y 65 °C con un TRH = 20 días**

Parámetro	Lodo crudo	Lodo a 55°C	Lodo a 65°C
pH	7.10 – 7.30	7.40 – 7.60	7.70 – 7.90
DQO (mg/L)	8100 – 8975	2850 – 6475	4850 – 7225
ALC (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	172.82 – 217.42	473.87 – 625.30	512.90 – 638.05
Al/AP	-	0.25 – 0.33	0.23 – 0.37
ST (%)	1.12 – 1.30	0.48 – 0.68	0.65 – 0.75
SSV (g/L)	4.52 – 4.60	1.42 – 2.99	2 – 3.16
% reducción de SSV	-	48.55 – 51.07	43.3 – 55.7
% reducción de DQO	-	42.4 – 59.7	37 – 44.5
AGV (mg/L Ac. acético)	-	24.8	29.89
Biogás (L/d)	-	23.71	20.178

Adicionalmente, en la figura 34 puede verse la diferencia entre el color de un lodo crudo (marrón) y el de un lodo estabilizado (negro), lo cual no es precisamente la manera más racional de comprobar la estabilización de un lodo, sin embargo y junto con el olor fueron pruebas de estabilización que coincidían con otras como una buena relación alcalinidad intermedia :alcalinidad parcial. Para tomar la foto que aparece en la figura 34, se tomó el mismo volumen de lodo en ambos casos y se dejaron sedimentar por 5 minutos y, a pesar de que puede ser difícil establecer la diferencia entre el marrón y el negro (en la foto), sí se nota claramente el sobrenadante en el lodo digerido, lo cual no sucede con el lodo crudo, cuyo sobrenadante no clarifica bien y es casi del mismo color que el lodo, esto es congruente con lo que reporta la literatura con respecto a que un lodo digerido anaeróticamente es fácil de desaguar (Metcalf y Eddy, 1996).

Comparar las eficiencias obtenidas con respecto a otros estudios, ya sea de digestión anaerobia (mesofílica o termofílica) o de algún otro método de estabilización no es el objetivo de este trabajo, ya que sólo se buscaba corroborar la estabilidad de la digestión anaerobia termofílica; además, es difícil comparar debido a la modalidad de alimentación que se manejó, ya que generalmente se opera en continuo o semicontinuo diario. A pesar de lo mencionado, se presenta una tabla (32) en donde se comparan los resultados con algunos otros experimentos. En dicha tabla puede apreciarse que los resultados obtenidos cumplen con lo que generalmente se obtiene de una buena estabilización de lodos.

**Tabla 32. Comparación entre los resultados obtenidos y otros reportados en literatura**

Parámetro	Proceso a 55 °C	Proceso a 65 °C	1 (55 °C) *1	2 (55 °C) *2	3 (35 °C) *3
TRH (días)	20	20	10 días	28 días	20 días
Modo de alimentación	Semicontinuo semanal	Semicontinuo semanal	Semicontinuo diario	Semicontinuo diario	Semicontinuo diario
Tipo	Anaerobio	Anaerobio	Anaerobio	Aerobio	Anaerobio
pH	7.40 – 7.60	7.70 – 7.90	7.54	7.2	7.08
Alcalinidad (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	473.87 a 625.30	512.90 a 638.05	1120	-	2306
Al:AP	0.25 a 0.33	0.23 a 0.37	0.45	-	-
AGV (mg/L ácido acético)	24.8	29.89	-	-	219
% remoción de SSV	48.55 a 51.07	43.3 a 55.7	43.6	35	55.1

\*1 (Aitken y Mullenix, 1992)

\*2 (Carrington *et al*, 1991)

\*3 (Watanabe *et al*, 1997)

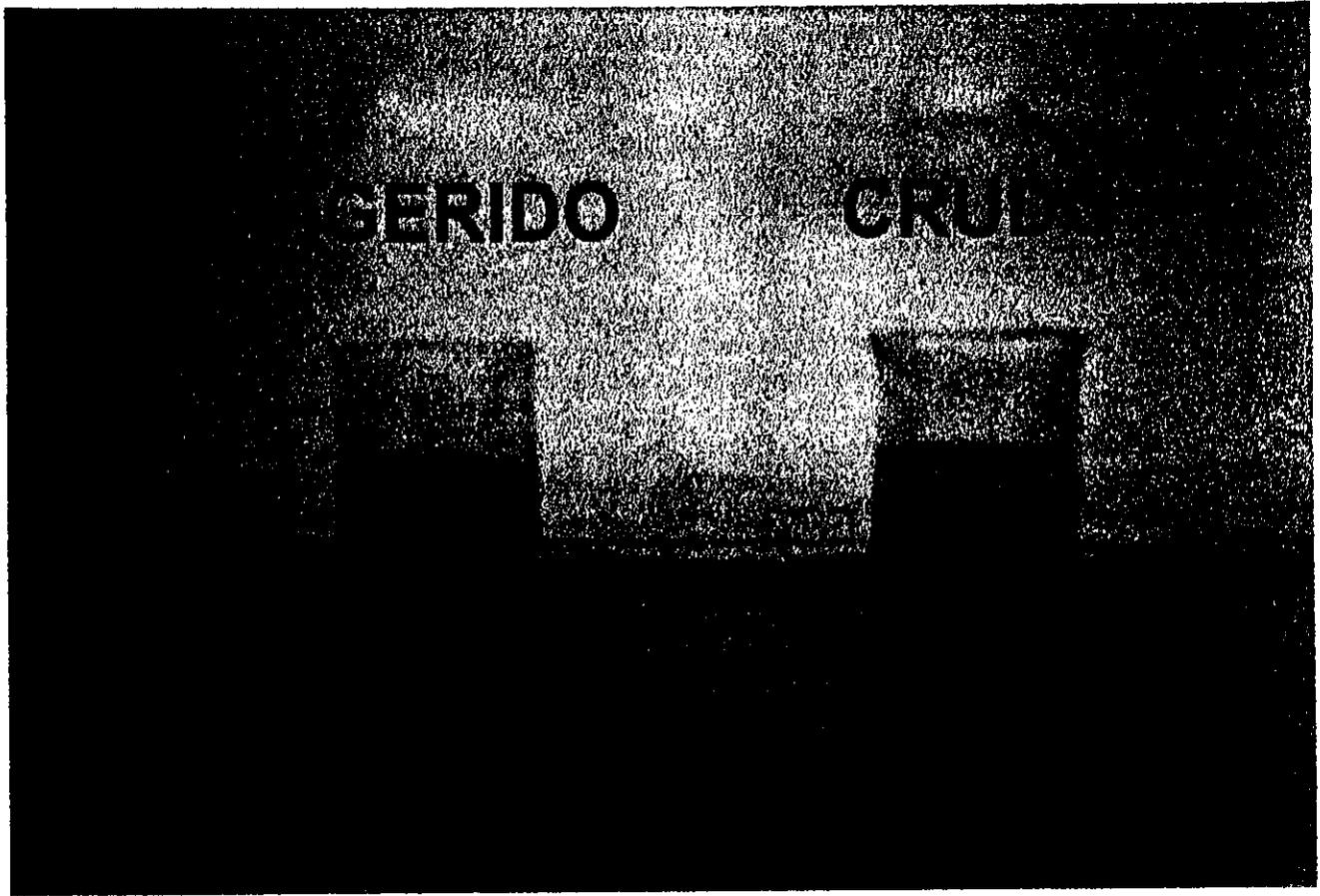


Figura 34. Comparación entre la apariencia del lodo crudo y del digerido

### 6.3 CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y *Escherichia coli*

#### 6.3.1 Cinéticas a 55 °C

En la tabla 33 se presentan las concentraciones de coliformes totales y *E. coli* contenidas en el lodo crudo utilizado para hacer las cinéticas de inactivación de dichos microorganismos a 55 °C y a 65 °C. La concentración de sólidos totales en el lodo crudo fue de 9.61 g / L.

**Tabla 33. Concentración de coliformes totales y *E. coli* en lodo crudo.**

Lodo crudo	NMP/100mL	NMP/gST
Col.totales	$1986.2 \times 10^4$	$2066.88 \times 10^4$
<i>E.coli</i>	$488.4 \times 10^4$	$508.22 \times 10^4$

En la tabla 34 se encuentran los resultados de la cinética, mientras que en la figura 35 se observa la gráfica resultante de dicha cinética, la cual obedece a un comportamiento de primer orden. Las ecuaciones ajustadas correspondientes pueden verse en la tabla 35. La concentración de sólidos totales para el análisis fue de 6.59 g / L y no corresponde a la concentración de sólidos del lodo crudo debido a que el tiempo cero de la cinética se mide una vez que el lodo crudo se ha mezclado y por lo tanto diluido dentro del digester.

**Tabla 34. Resultados de la cinética de inactivación de coliformes totales y *E. coli* a 55 °C**

Coliformes totales		
Tiempo (h)	NMP/gST	ln NMP/gST
0	$270.4 \times 10^4$	14.81
0.016	$47.5 \times 10^4$	13.07
0.083	$40.7 \times 10^4$	12.91
0.16	$33.53 \times 10^4$	12.72
0.5	$18.61 \times 10^4$	12.13
1	$842.3 \times 10^2$	11.34
2	$351.07 \times 10^2$	10.46
3	$16 \times 10^2$	7.37
4	$8 \times 10^2$	6.68
5	$30.6 \times 10^1$	5.72
6	$8 \times 10^1$	4.38
7	$1.53 \times 10^1$	2.72
8	0	0
24	0	0

Tabla 34. Continuación

<i>E. coli</i>		
Tiempo (hrs)	NMP/gST	In NMP/gST
0	$160.4 \times 10^4$	14.28
0.016	$24.6 \times 10^4$	12.41
0.083	$22.4 \times 10^4$	12.31
0.16	$16.92 \times 10^4$	12.03
0.5	$11.38 \times 10^4$	11.64
1	$504.9 \times 10^2$	10.82
2	$181.23 \times 10^2$	9.8
3	$9.6 \times 10^2$	6.86
4	$3.07 \times 10^2$	5.72
5	$14.76 \times 10^1$	4.99
6	$1.53 \times 10^1$	2.72
7	0	0
8	0	0
24	0	0

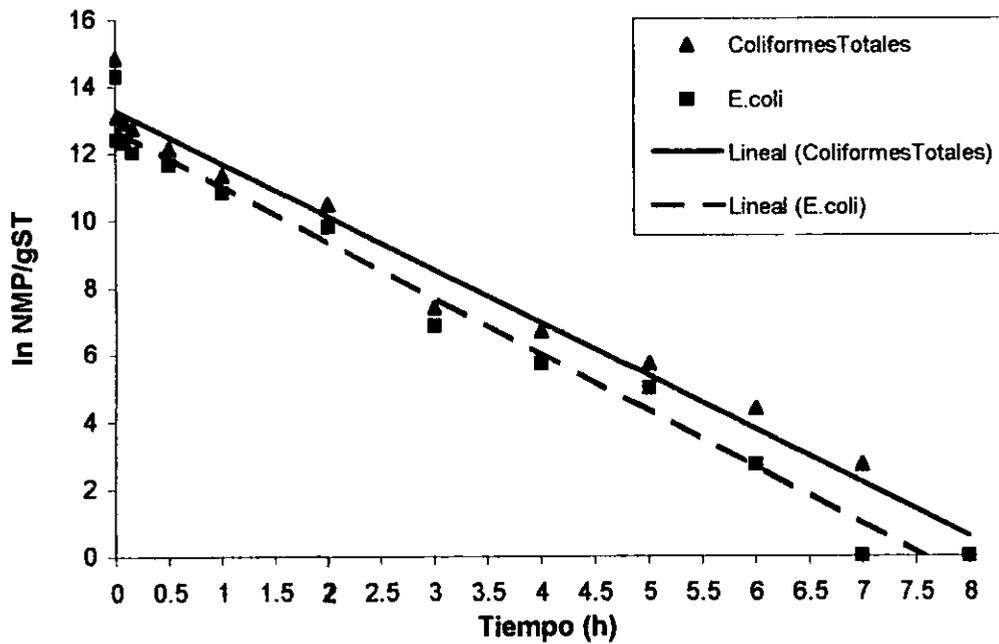


FIGURA 35. Cinética de inactivación de coliformes totales y *E. coli* a 55 °C

**Tabla 35. Ecuaciones ajustadas de las cinéticas de inactivación de coliformes totales y *E. coli* a 55 °C.**

Microorganismo	Ecuación	D (h)	R <sup>2</sup>
Coliformes totales	$\ln \text{NMP/g ST} = -1.5829 (t) + \ln \text{NMP}_0 / \text{g ST}$	1.454	0.9788
<i>E. coli</i>	$\ln \text{NMP/g ST} = -1.6819 (t) + \ln \text{NMP}_0 / \text{g ST}$	1.369	0.9803

En la tabla 36 se observa el análisis estadístico de la recta ajustada, conteniendo la desviación estándar de la recta y el intervalo de confianza de la pendiente.

En la figura 36 y 37 se observan las celdas de colilert con los resultados de los coliformes totales y *E. coli* a 55 °C respectivamente.

**Tabla 36. Análisis estadístico de las rectas ajustadas para el grupo coliforme a 55°C**

Microorganismo	Intervalo de confianza de la pendiente a 95 %	Desv. Estándar (ln NMP / gST)
Coliformes totales	$-1.5829 \pm 0.154$	0.704359
<i>E. coli</i>	$-1.6819 \pm 0.2893$	1.0968

### 6.3.2. Cinéticas a 65 °C

En la tabla 37 se encuentran los resultados de la cinética, mientras que en la figura 38 se observa el gráfico comparativo de esta cinética con la de 55°C. Las ecuaciones ajustadas correspondientes pueden verse en la tabla 38. La concentración de sólidos totales para el análisis fue de 7.96 g / L.

**Tabla 37. Resultados de la cinética de inactivación de coliformes totales y *E. coli* a 65 °C**

Tiempo (h)	Coliformes totales	
	NMP/gST	ln NMP/gST
0	5163	8.54
0.016	2826	7.94
0.066	2110.5	7.65
0.1	1575.3	7.36
0.16	1042.7	6.94
0.2	515.07	6.24
0.25	412	6.02
0.3	341.17	5.83
0.35	298.99	5.7
0.416	195.9	5.27
0.5	150.7	5.01
0.75	25.12	3.22
1	0	0



Figura 36. Celdas de colilert para coliformes totales a 55 °C

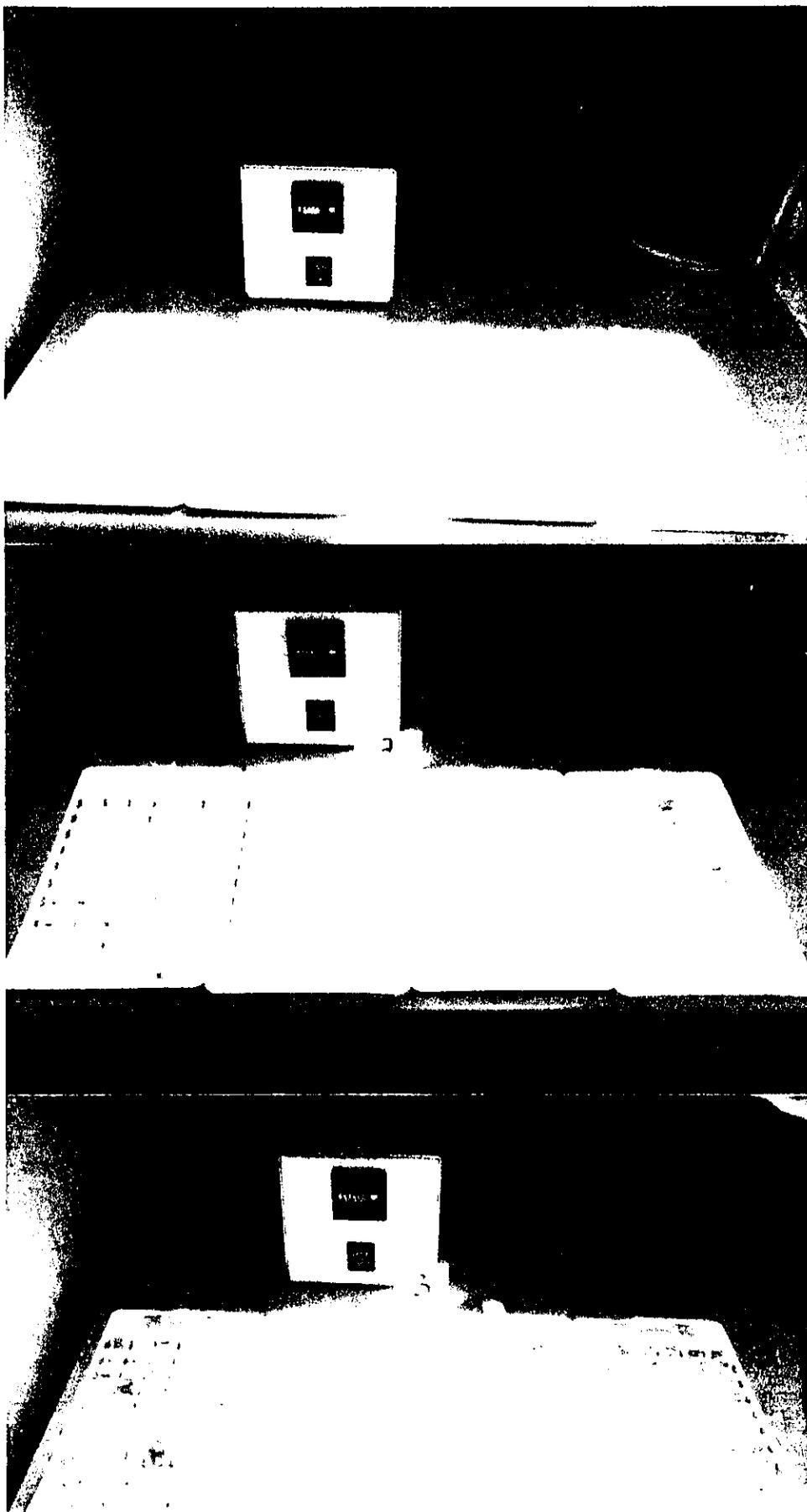


Figura 37. Celdas de coliert para *E. coli* a 55 °C

Tabla 37. Continuación

<i>E.coli</i>		
Tiempo (h)	NMP/gST	In NMP/gST
0	3228.64	8.07
0.016	1356.78	7.21
0.066	1017.58	6.92
0.1	778.8	6.65
0.16	502.51	6.21
0.2	251.25	5.52
0.25	234.92	5.45
0.3	232.4	5.44
0.35	108.04	4.68
0.416	79.14	4.37
0.5	65.32	4.17
0.75	12.56	2.53
1	0	0

En la tabla 39 se observa el análisis estadístico de la recta ajustada, conteniendo la desviación estándar de la recta y el intervalo de confianza de la pendiente. En la figura 39 y 40 se observan las celdas de colilert con los resultados de los coliformes totales y *E. coli* a 65 °C respectivamente.

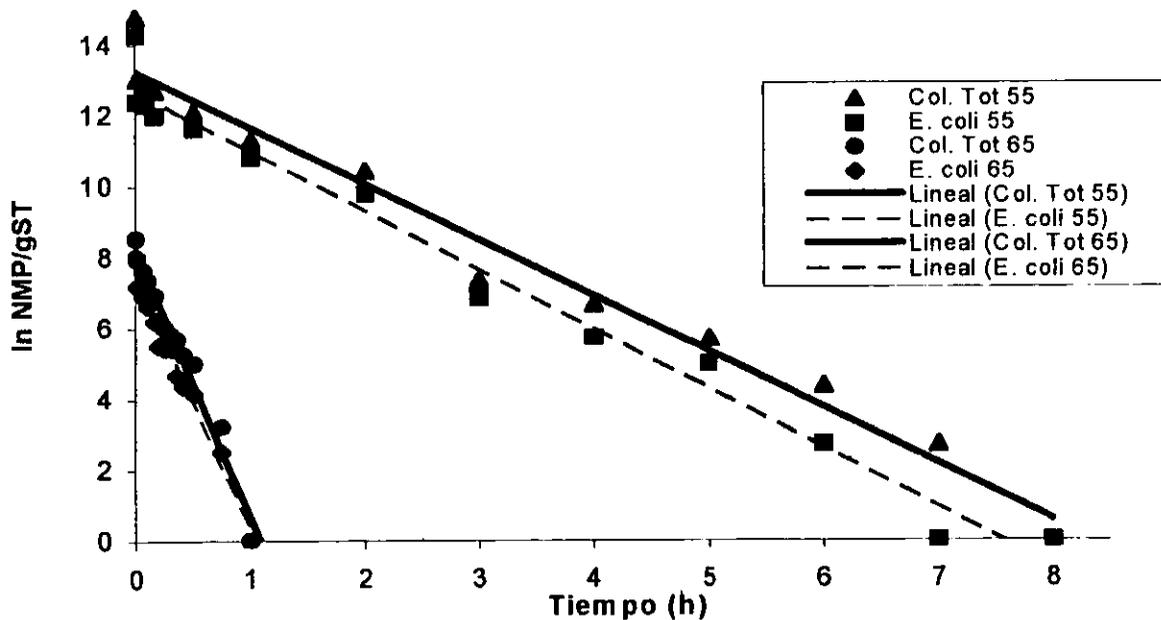


FIGURA 38. Cinéticas de inactivación de coliformes totales y *E. Coli* a 55 y 65 °C

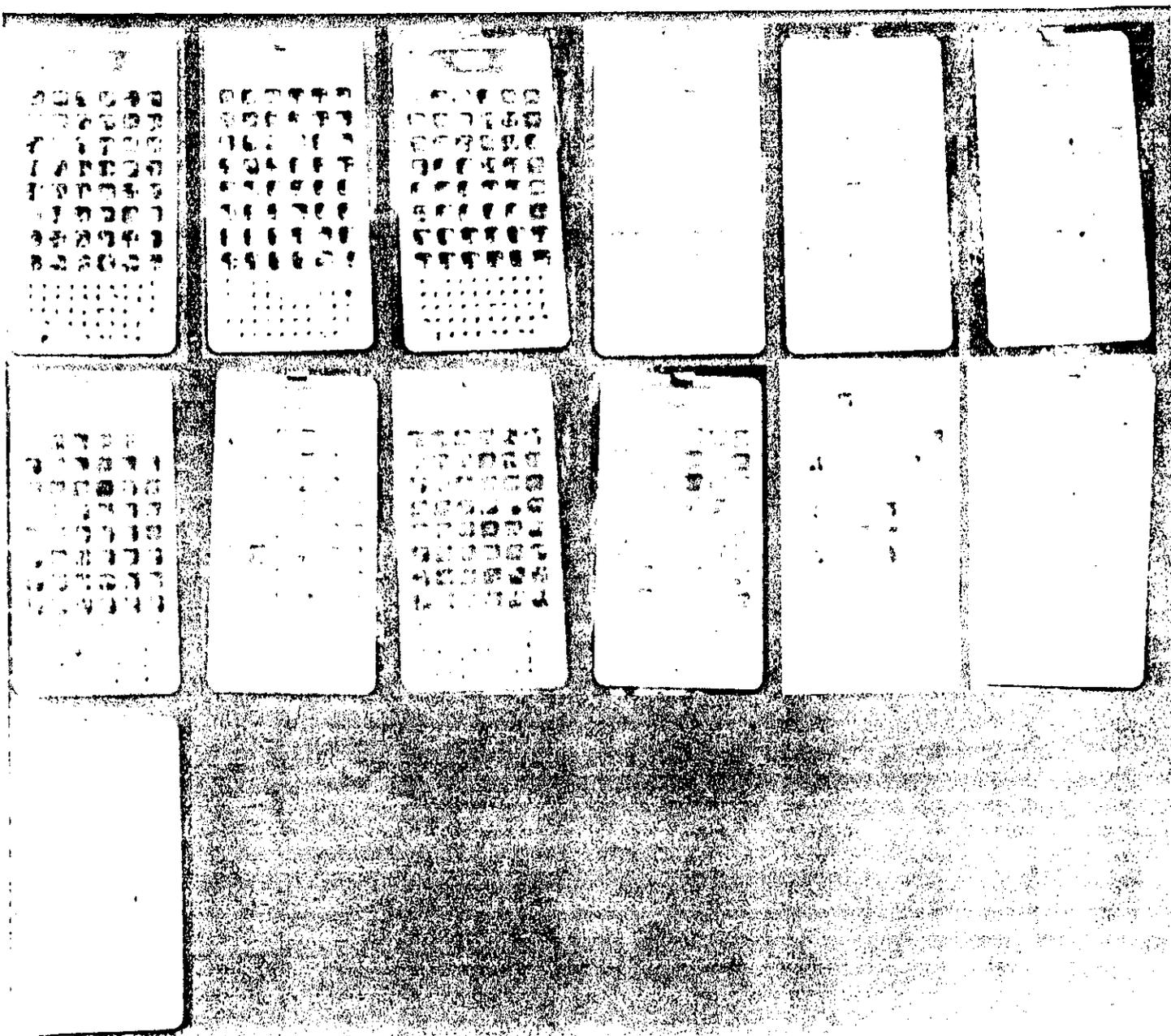


Figura 39. Celdas de colilert para coliformes totales a 65 °C

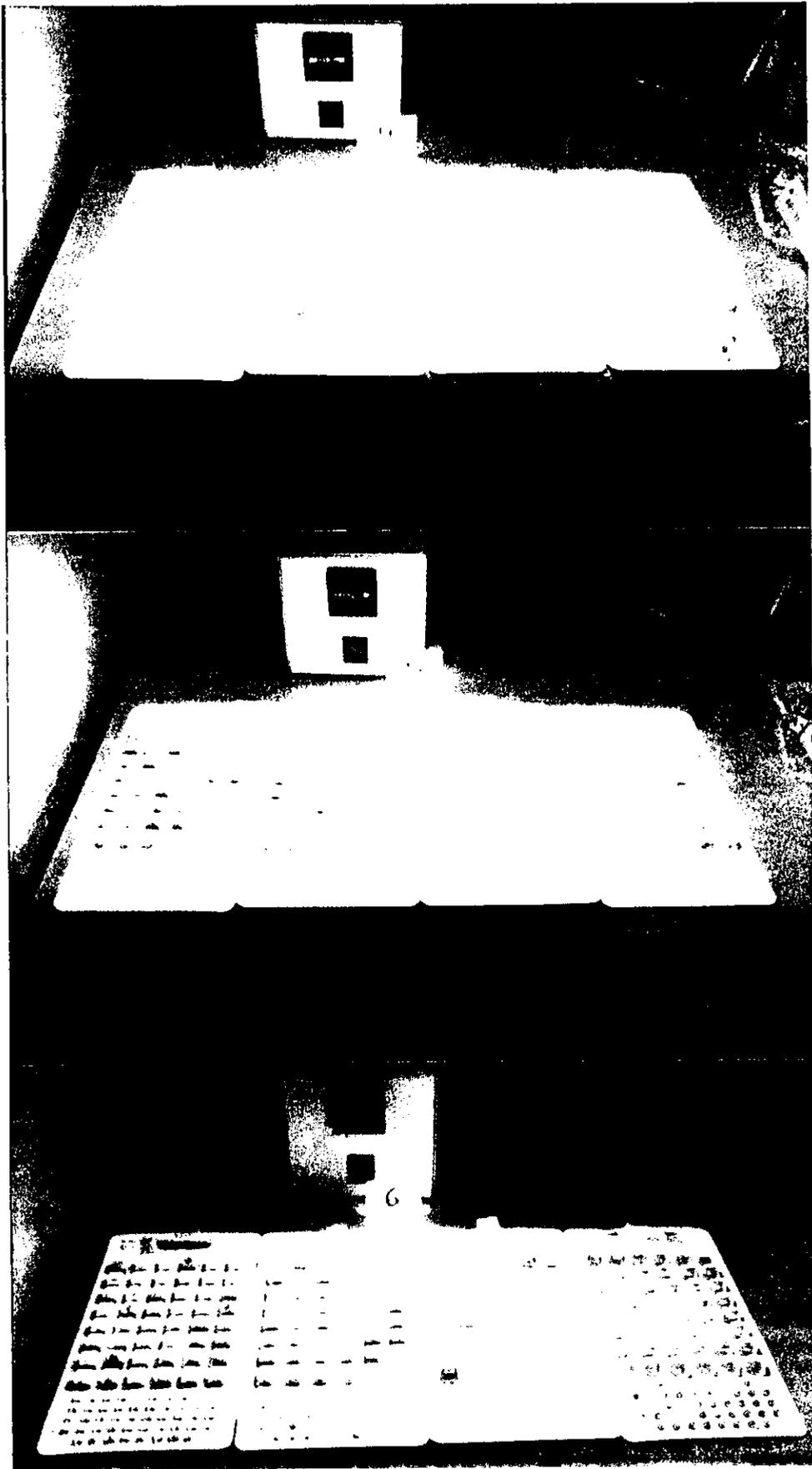


Figura 40. Celdas de colilert para *E. coli* a 65 °C

**Tabla 38. Ecuaciones ajustadas de las cinéticas de inactivación de coliformes totales y *E. coli* a 65 °C.**

Microorganismo	Ecuación	D (h)	R <sup>2</sup>
Coliformes totales	$\ln \text{NMP/g ST} = -7.5186 (t) + \ln \text{NMP}_0 / \text{g ST}$	0.308	0.9713
<i>E. coli</i>	$\ln \text{NMP/g ST} = -7.1679 (t) + \ln \text{NMP}_0 / \text{g ST}$	0.321	0.9784

**Tabla 39. Análisis estadístico de las rectas ajustadas para el grupo coliforme a 65°C**

Microorganismo	Intervalo de confianza de la pendiente a 95 %	Desv. Estándar (ln NMP / gST)
Coliformes totales	$-7.5186 \pm 0.8584$	0.3982
<i>E. coli</i>	$-7.1679 \pm 1.054$	0.4893

#### 6.4 CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN DE *Candida albicans*

##### 6.4.1 Cinética a 55 °C

En la tabla 40 se observa la concentración de *C. albicans* en el lodo crudo, mientras que en la tabla 41 están los resultados del primer experimento.

**Tabla 40. Concentración de *Candida albicans* en el lodo crudo**

	UFC/100 mL			
	24 h	36 h	24 h	36 h
Lodo crudo	1800	2500	700	2200

Repetición

**Tabla 41. Resultados del primer experimento con *C. albicans* a 55 °C**

	UFC/100ml			
	24horas	36horas	24horas	36horas
Crudo	1800	2500	700	2200
Calentado	0	1100	0	1200
Mezclado	0	0	0	0
5"	0	0	0	0
10"	0	0	0	0
30"	0	0	0	0
1h	0	0	0	0
2h	0	0	0	0
3h	0	0	0	0

Repetición

Para el segundo experimento, *C. albicans* se tomó de un inóculo previamente crecido y cuya concentración se puede ver en la tabla 42, mientras que en la tabla 43 se ven los resultados de la cinética.

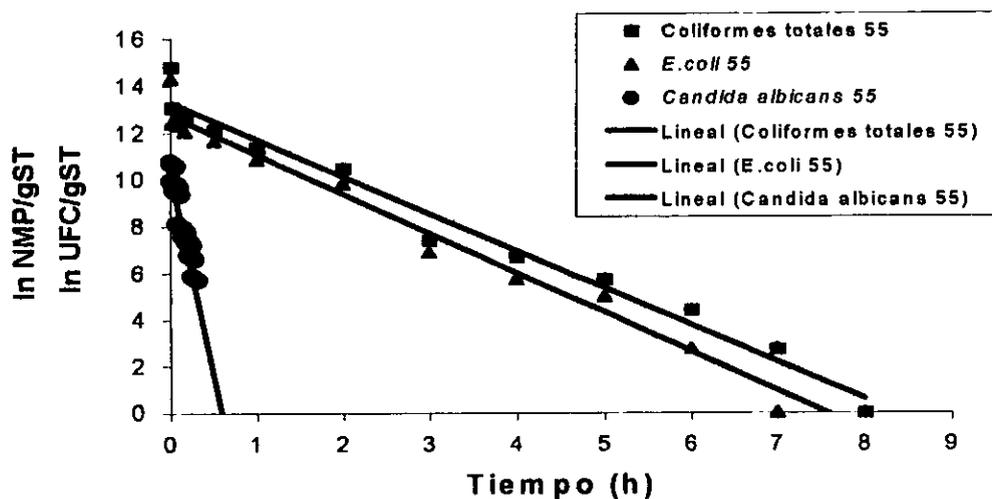
En la figura 41 se observa el gráfico comparativo de esta cinética con la de coliformes totales y *E. coli* a 55°C. La gráfica de *C. albicans* se obtuvo del valor medio de las dos repeticiones. La ecuación ajustada correspondiente puede verse en la tabla 44. La concentración de sólidos totales para el análisis fue de 5.8 g / L.

**Tabla 42. Concentración de *C. albicans* del inóculo para el segundo experimento a 55 °C.**

INÓCULO DE <i>Candida albicans</i> (Crecimiento en caldo de cultivo)	
	UFC/100ml
Sin diluir	Incontable
10 <sup>(-2)</sup>	Incontable
10 <sup>(-4)</sup>	11000

**Tabla 43. Resultados del segundo experimento con *C. albicans* a 55 °C**

Tiempo (h)	Sin diluir		10 <sup>(-2)</sup>		Promedio ln UFC/gST
	UFC/100mL	ln UFC/gST	UFC/100mL	ln UFC/gST	
0	23200	10.59	30000	10.85	10.72
0.016	13000	10.01	11200	9.86	9.935
0.033	11600	9.9	10200	9.77	9.835
0.05	8000	9.53	7600	9.47	9.5
0.083	1800	8.03	2000	8.14	8.085
0.1166	1600	7.92	1600	7.92	7.92
0.15	1200	7.63	1000	7.45	7.54
0.183	1000	7.45	800	7.22	7.335
0.2166	400	6.53	600	6.93	6.73
0.25	200	5.84	200	5.84	5.84



**FIGURA 41. Cinéticas de inactivación de coliformes totales, *E. Coli* y *C. Albicans* a 55 °C**

**Tabla 44. Ecuación ajustada de la cinética de inactivación de *Candida albicans* a 55 °C**

Microorganismo	Ecuación	D (h)	R <sup>2</sup>
<i>Candida albicans</i>	$\ln \text{UFC/g ST} = -17.638 (t) + \ln \text{UFC}_0 / \text{g ST}$	0.13	0.9549

En la tabla 45 se observa el análisis estadístico de la recta ajustada conteniendo la desviación estándar y el intervalo de confianza de la pendiente.

**Tabla 45. Análisis estadístico de la recta ajustada para *Candida albicans* 55°C**

Microorganismo	Intervalo de confianza de la pendiente a 95 %	Desv. Estándar (ln UFC / gST)
<i>Candida albicans</i>	$-17.638 \pm 3.125$	0.356339

Además de la cinética obtenida de *C. albicans* se encontró que las colonias obtenidas de la levadura después de estar sometidas a 55 °C, eran más pequeñas que las obtenidas a condiciones normales. Esta comparación puede verse en la figura 42.

#### 6.4.2. Cinética a 65 °C

En este caso, los dos experimentos fracasaron ya que, como puede observarse en las tablas 46 y 47, no se pudieron obtener UFC de *Candida albicans* en tiempos operativamente prácticos.

**Tabla 46. Resultados del primer experimento con *C. albicans* a 65 °C**

	UFC/100ml			
	24horas	36horas	24horas	36horas
	Repetición			
Crudo	1000	3000	1500	2500
Calentado	0	0	0	0
Mezclado	0	0	0	0
20"	0	0	0	0
40"	0	0	0	0
1día	0	0	0	0

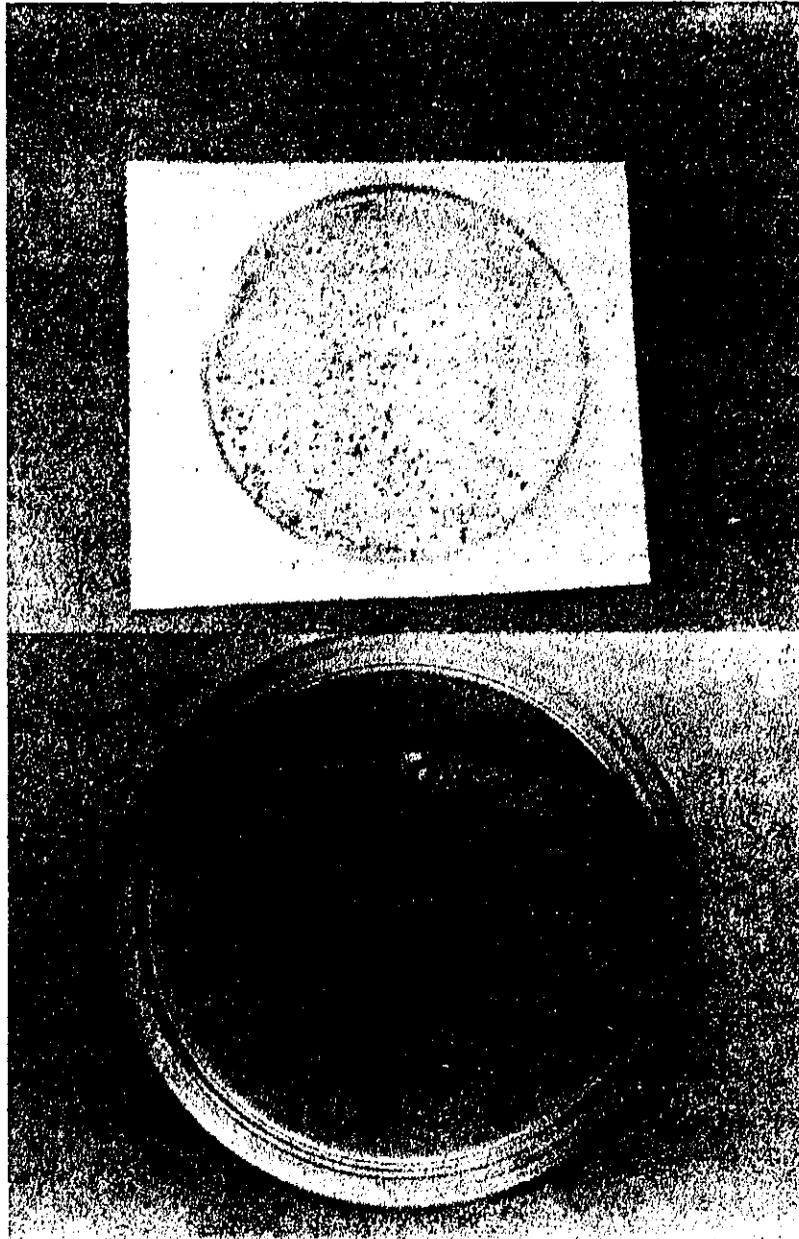


Figura 42. Comparación entre las células de *C. albicans* a 55 °C y bajo condiciones normales de temperatura

**Tabla 47. Resultados del segundo experimento con *C. albicans* a 65 °C**

	UFC/100mL					
	Sin diluir	10 <sup>(-2)</sup>	10 <sup>(-4)</sup>	Sin diluir	10 <sup>(-2)</sup>	10 <sup>(-4)</sup>
	Repetición					
Mezclado	0	0	0	0	0	0
1"	0	0		0	0	
2"	0	0		0	0	
3"	0	0		0	0	
4"	0	0		0	0	
5"	0			0		
6"	0			0		
7"	0			0		
8"	0			0		
9"	0			0		
10"	0			0		

Las cinéticas de inactivación tanto de coliformes fecales como de *E. coli* y *C. albicans* resultaron lineales y los microorganismos estudiados murieron más rápido a 65°C que a 55 °C, lo cual era de esperarse; incluso no pudo obtenerse cinética de decaimiento de *Candida albicans* a 65 °C y ni siquiera fue posible obtener su concentración en el tiempo cero de la cinética. Sin embargo, la obtención de las constantes de inactivación es muy importante, ya que puede servir como parámetro de diseño.

En la tabla 48 se presenta una comparación con otros estudios realizados, tanto aerobios como anaerobios, con respecto a la desinfección de lodos residuales.

**Tabla 48 Comparación de los procesos manejados en este experimento con respecto a otros estudios**

Parámetro	Proceso a 55 °C	Proceso a 65 °C	1 (55 °C) *(1)	2 (55 °C) *(2)
TRH (d)	20	20	10 días	28 días
Modo de alimentación	Semicontinuo semanal	Semicontinuo semanal	Semicontinuo diario	Semicontinuo diario
Tipo	Anaerobio	Anaerobio	Anaerobio	Aerobio
pH	7.40 – 7.60	7.70 – 7.90	7.54	7.2
Coliformes fecales	0 NMP/gST	0 NMP/gST	Abajo de límites detectables	47 NMP/mL

\*1 (Aitken y Mullenix, 1992)

\*2 (Carrington et al, 1991)

Por otro lado, como se manifestó en un principio, la U.S. EPA no considera a la digestión anaerobia termofílica como un proceso que reduzca significativamente los patógenos, pero el argumento que da, no va en el sentido de la no reducción de patógenos, sino en el sentido de que es inestable como proceso. Muchos autores han demostrado que la digestión anaerobia termofílica es estable y este trabajo aporta resultados que confirman

lo anterior, de hecho, basándose en la relación tiempo:temperatura dada por la EPA (tabla 4, relación D, capítulo 1) los resultados obtenidos en este experimento cumplen con lo requerido en esa opción para considerar a un método de estabilización que utiliza altas temperaturas como productor de un lodo clase A (tabla 49).

**Tabla 49. Comparación de la relación tiempo:temperatura entre los experimentos realizados y lo propuesto por la U.S. EPA para considerar un lodo como clase A.**

Relación tiempo:temperatura	Digestor a 55 °C	Digestor a 65 °C
$D = 50070000/10^{0.1400t}$ (teórico)	24 horas	1 hora
Experimental	8 horas	1 hora

- Los datos experimentales son el tiempo en que se inactivaron los coliformes fecales

## CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones trabajadas en los experimentos, el tiempo de retención hidráulica de 10 días resultó muy corto para lograr la completa digestión del lodo residual.
- La relación alcalinidad intermedia : alcalinidad parcial fue un mejor parámetro de control para la estabilidad del proceso que los valores recomendados de alcalinidad total.
- El digester operado a 55 °C logró porcentajes de remoción de 48.55 a 51.97 para SSV y de 42.4 a 59.7 para DQO, pH final entre 7.4 y 7.6, relación AI : AP de 0.25 a 0.33, concentración final de AGV de 24.8 mg/L y producción promedio de biogás de 23.71 L/d. Mientras que el digester a 65 °C tuvo porcentajes de 43.3 a 55.7 para SSV, 37 a 44.5 para DQO, pH final entre 7,7 y 7.9, relación AI : AP de 0.23 a 0.37, concentración final de AGV de 29.89 mg/L y producción promedio de biogás.  
Ambos digestores lograron un buen desempeño en la estabilización del lodo residual, pero, el reactor operado a 55 °C tuvo mejores eficiencias y logró estabilizar más rápido a los lodos.
- Ambos procesos lograron la completa inactivación del grupo coliforme y de *Candida albicans*, teniendo tiempos de inactivación de ocho horas a 55 °C y una hora a 65 °C para el grupo coliforme y de menos de una hora a 55 °C para la levadura.
- *Candida albicans* no resultó ser una buena alternativa como microorganismo indicador de calidad microbiológica comparada con el grupo coliforme, cuando se trata de inactivación térmica en condiciones de anaerobiosis. Por lo que los coliformes seguirán siendo la mejor opción como microorganismos indicadores.
- La digestión anaerobia termofílica tanto a 55 como a 65 °C demostró ser un proceso estable bajo las condiciones trabajadas, logrando un lodo digerido que puede considerarse como de clase A.

## RECOMENDACIONES

- Realizar evaluaciones de las cinéticas de inactivación con un mayor número de temperaturas para obtener una energía de desactivación que permita obtener tiempos de inactivación microbiana para lodos residuales a cualquier temperatura dentro del rango termofílico.
- Establecer ecuaciones multivariantes en donde se contemple no sólo la temperatura, sino también otros aspectos como el contenido de sólidos y el tipo de lodo.
- Establecer intervalos para los criterios de diseño y definir parámetros de control en la digestión anaerobia termofílica. Por supuesto que sería más conveniente obtenerlos para las modalidades de alimentación más comunes como son en continuo y en semicontinuo diario.
- Realizar estudios a nivel piloto con respecto al comportamiento de materiales a estas temperaturas y con las características propias del proceso anaerobio, con el fin de determinar parámetros como corrosión, deformaciones, presiones, mezclado y en general el efecto sobre la resistencia de los materiales trabajados.
- Realizar investigaciones a nivel piloto para determinar y acotar criterios de escalamiento.
- Evaluar el uso de las constantes de inactivación microbiana como criterios de diseño, sobre todo pensando en sistemas anaerobios de dos fases: una acidogénica termofílica, en donde los tiempos de inactivación podrían corresponder con los tiempos de retención necesarios para esta fase y una segunda fase metanogénica mesofílica para completar la digestión. De esta manera se cumpliría con el objetivo de la desinfección y el gasto de energía sería menor que si se trabajara el proceso completo de manera termofílica. Utilizar las constantes de inactivación microbiana como criterio de diseño para el proceso completo no sería muy útil, puesto que los tiempos de digestión estarían muy sobrados con respecto a los de inactivación.
- La digestión anaerobia debe ser estudiada y tomada en cuenta como un proceso que puede emplearse con mucha más frecuencia en un país como el nuestro, que es cálido en promedio y tiene problemas importantes de salud pública relacionados con el agua.

## REFERENCIAS

1. Aiba S., Humphrey A., y Millis N. (1973). **Biochemical Engineering**. Segunda edición. Academic Press. New York, U.S.A. p.p. 239 – 255.
2. Aitken, M., y Mullenix R (1992). **Another look at thermophilic anaerobic digestion of wastewater sludge**. *Water Environ. Res.* 64, 7, 915 - 919.
3. Cheremisinoff, P. (1994). **Sludge management and disposal**. Prentice Hall. U.S.A. p.p. 27 – 29.
4. Colin F. (1983) **Characterization of the physical state of sludge**. COST 68 Symposium, Brighton, England.
5. Donnelly, M; Escalante, J; Rinehart, K; y Wolfe, S. (1985). **Methenyl – tetrahydromethanopterin cyclohydrolase in cell extracts of *Methanobacterium***. *Arch. Biochem. Biophys.* 242, 430 – 439.
6. Farrel, J; Erlap, A; Rickabaugh, J; Freedman, D; y Hayes, S. (1988). **Influence of feeding procedure on microbial reductions and performance of anaerobic digestion**. *J. Water Pollut. Control Fed.* 60, 635 – 644.
7. Fischer, E. (1982). **How long do dermatophytes survive in the water of indoor pools?** *Dermatologica*, 165, 4, 352 – 354.
8. Fisher, A.J., y Greene, R.A. (1945). **Plant scale tests on thermophilic digestion**. *Sewage works J.*, 17, 718 – 725.
9. Garber, W.F. (1982). **Operating experience with thermophilic anaerobic digestion**. *J. Water Pollut. Control Fed.* 54, 8, 1170 - 1175.
10. Garber, W.F; Ohara G; Colbaugh J, y Raksit S. (1975). **Thermophilic digestion at the Hyperion treatment plant**. *J. Water Pollut. Control Fed.* 47, 5, 950 – 961.
11. Gunsalus, R; y Wolfe, R. (1977). **Stimulation of CO<sub>2</sub> reduction to methane by methylcoenzyme M in extracts of *Methanobacterium***. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76. 790 – 795.
12. Hashimoto, A. (1982). **Methane from cattle waste. Effects of temperature, hydraulic retention time and influent substrate concentration in kinetic parameter (K)**. *Biotechnol. Bioengn*, 24, 2039 – 2052.
13. Hashimoto, A; Varel, V; y Chen, R. (1981). **Ultimate methane yield from beef cattle manure: effect of temperature, ratio constituents, antibiotics and manure age**. *Agric. Wastes.* 3, 241 – 256.
14. Hashimoto, A. (1983). **Conversion of straw manure mixtures of methane at mesophilic and thermophilic temperatures**. *Biotechnol. Bioengn*, 25, 185 – 200.
15. Hatrzell, P; Zvilius, G; Escalante, J; y Donnelly, M. (1985). **Coenzyme F<sub>420</sub> dependence of the methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase of *Methanobacterium thermoautotrophicum***. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133, 884 – 890.
16. IMTA. **Memorias del curso teórico-práctico para el tratamiento de lodos residuales**. Coordinación de tratamiento y calidad del agua. Subcoordinación de tratamiento de aguas residuales. 18 al 22 de mayo de 1998. Jiutepec, Morelos., México.

17. IMTA (1993). **Tratamiento anaerobio de aguas residuales**. Jiutepec, Morelos, México
18. Institution of Water Engineers and Scientists (IWES) (1983). **Water practice manuals**. Capítulo 3. U.S.A. p.p. 25 – 46.
19. International Health Foundation (a) (1999). **The Chronic Candidiasis Syndrome**. (<http://members.aol.com/docdarren/med/candida.html>).
20. International Health Foundation (b) (1999). **Symptoms of vaginal yeast infections** (<http://www.msu.edu/user/eisthen/yeast/symptom.html>).
21. Joklik, W; Willet, H; y Amos, B. (1983). **Microbiología**. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. p.p. 1225 – 1301.
22. Jones, W; Nagle, D; y Whitman, W. (1987). **Methanogens and the diversity of archaeobacteria**. Microbiological reviews. 51, 1, 135 – 177.
23. Kenealy, W; y Zeikus, J; (1982). **One carbon metabolism in methanogens: evidence for synthesis of a two carbon cellular intermediate and unification of catabolism and anabolism in *Methanosarcina barkeri***. Journal of bacteriology, 151, 2, 932 – 941.
24. Koga, Y., Masateru, N., Hiroyukim M; y Masayo A. M. (1993). **Ether polar lipids of methanogenic bacteria: structures, comparative aspects and biosyntheses**. Microbiological Reviews. 57, 1, 164 – 182.
25. Koster, I; y Lettinga, G. (1984). **The influence of ammonia nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge**. Agric. Wastes. 9, 205 – 216.
26. Lee, K. (1989). **Destruction of enteric bacteria and viruses during two – phase digestion**. J. Water. Pollut. Control Fed. 61, 1421 – 1432.
27. Leigh, J; Rinehart, K; y Wolfe, R. (1985). **Methanofuran (carbon dioxide reduction factor) a formyl carrier in methane production from carbon dioxide in *Methanobacterium***. Biochemistry. 24, 995 – 999.
28. Lema J., Méndez R., Iza J., García P. y Fernandez-Polanco F. (1991). **Chemical reactor engineering concepts in design and operation of anaerobic treatment processes**. Wat. Sci. Tech. 24, 8, 79 – 88.
29. Lehninger, A. (1991). **Bioquímica**. Editorial Iberoamericana. México, D.F.
30. Lue – Hing, C., Zenz, R., y Kuchenrither. (1992). **Municipal sewage sludge management: processing, utilization and disposal**. Ed. Technomic. Lancaster, U.S.A.
31. Madigan, M; y Marrs B. (1997). **Extremófilos**. Investigación y ciencia. 60 – 66.
32. Mah, A; Ward, M; Baresi, L; y Glass, T. (1977). **Biogenesis of methane**. Ann. Rev. Microbiol. 33, 309 – 341.
33. McCarty, P. (1964). **Anaerobic waste treatment fundamentals III**. Publ. Wks. 95, 91 – 94.
34. McCarty, P; y McKinney, R. (1961). **Salt toxicity in anaerobic digestion**. J. Water Pollut. Control Fed. 33, 399 – 415.

35. Mendenhall, W. (1987). **Introducción a la probabilidad y la estadística**. Quinta edición. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V. México, D.F. p.p. 341 - 381.
36. Metcalf & Eddy, Inc. (1996). **Ingeniería de las aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización**. Vol II. McGraw-Hill, Nueva York, 1996. p.p. 865 – 1037.
37. Organización Mundial de la Salud (OMS) (1990). **Directrices para el uso sin riesgos de aguas residuales y excretas en agricultura y acuicultura (medidas de protección de la salud pública)**. p.p. 1- 23
38. Osaka University Medical School (1996). **O-157 Infection in a fury**.  
(<http://www.med.osaka-u.ac.jp/doc/0157-alt/pediat/2inf.html>)
39. Pelczar, M; Reid, R; y Chan, E. (1988). **Microbiología**. Segunda edición. McGraw – Hill. México, D.F. p.p. 681 – 703.
40. Pfeffer, J. (1974). **Temperature effects on anaerobic fermentation of domestic refuse**. Biotechnol. Bioengng. 16, 771 – 787.
41. Pohland, F; y Bloodgood, D. (1963). **Laboratory studies on mesophilic and thermophilic anaerobic sludge digestion**. J. Water Pollut. Control Fed. 35, 1, 11 – 42.
42. Rimkus, R., Ryan J., y Cook E. (1982) **Full scale thermophilic digestion at the west-southwest sewage treatment works , Chicago, Illinois**. J. Water Pollut. Control Fed. 54, 11, 1447 - 1457.
43. Ripley, L., Boyle, W., y Converse J. (1986). **Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high strength wastes**. J. Water Pollut. Control Fed. 58, 5, 406 – 411.
44. Rogers, T; y Balish, E. (1980). **Immunity to *Candida albicans***. Microbiological Reviews. 44, 4, 660 – 682.
45. Rowe, D. (1971). **Anaerobic sludge digestion. Mesophilic and thermophilic**. Wat. & Sew. Works. 118, 3, 74 – 81.
46. Smart, J., y Bokyo, B.I.(1977). **Full scale studies on the thermophilic anaerobic digestion process**. Environ. Can. Res. Rep. No. 59, Ottawa, Ont., Can.
47. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. (1995) 19<sup>TH</sup> edition. APHA, AWWA, WEF. Washington, D.C.
48. Sundaram, T. (1986). **Thermophiles: General, molecular and applied microbiology**. App. Microbiol. Biotechnol. 37, 130 – 135.
49. Thauer, R; Möller, D; y Spormann, A. (1989). **Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria**. Ann. Rev. Microbiol. 43, 43 – 67.
50. Thauer, R; y Morris, J. (1984). **Metabolism of chemotrophic anaerobes: old views and new aspects**. Symposium of society of genetics and microbiology. 36, 123 – 168.
51. U.S. EPA (1979). **Process Design Manual for Sludge Treatment and Disposal**. Washington, D.C.
52. U.S. EPA (1992). **Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge (including domestic septage Under 40 CFR part 503**. EPA/625/R-92/013. Washington, D.C.

53. U.S. EPA (1994a). **A Plain English Guide to the EPA. Part 503 Biosolids rule.** Washington, D.C.
54. U.S. EPA (1994b). **Biosolids Recycling: Beneficial Technology for a Better Environment** Washington, D.C.
55. U.S. EPA (1994c). **Land Application of Sewage Sludge: A Guide for Land Appliers on the Requirements of the Federal Standards for the use of Disposal of Sewage Sludge Under 40 CFR part 503.** Washington, D.C.
56. Varel, V; Hashimoto, A; y Chen, J. (1980). **Effect of temperature and retention time on methane production from cattle waste.** *App. Envir. Microbiol.* 40, 217 – 222.
57. Vesilind, p., Hartman, G., y Skene, E. (1986) **Sludge management & disposal for the practicing engineer.** De Lewis Publisher, Inc. U.S.A.
58. Watanabe, H; Kitamura, T; Ochi, S; y Ozaki, M. (1997). **Inactivation of pathogenic bacteria under mesophilic and thermophilic conditions.** *Wat. Sci. Tech.* 36, 6, 25 – 32.
59. Water Environmental Federation (WEF) y American Society of Civil Engineers (ASCE) (1992). **Design of municipal wastewater treatment plants.** Vol. II. U.S.A.
60. Wiegand, J. (1990). *FEMS microbiology reviews.* 75, 155 – 170.
61. Winkler, M. (1994). **Tratamiento biológico de aguas de desecho.** Editorial Limusa. México, D.F.
62. Winter, J; y Zellner, G. (1990). *FEMS microbiology reviews.* 75, 139 – 154.
63. Yanko, W.A. (1987). **Ocurrence of pathogens in distribution and marketing municipal sludges.** Report No.: EPA/600/187/014. Springfield, VA. National Technical Information Service.
64. Zeikus, J; y Wolfe, R; (1972). *J. Bacteriology.* 109, 707 – 713.
65. Zeeman, G; Wiegand, W; Koster – Treffer, M; y Lettinga, G. (1985). **The influence of the total ammonia concentration on the thermophilic digestion of cow manure.** *Agric. Wastes,* 14, 19 – 35.
66. Zinder, S. (1988). **Proceedings of 5<sup>th</sup> international symposium on anaerobic digestion.** Bologna, Italia.
67. Zinder, S; Cardwell, C; Lee, A; y Koch, M. (1984a). **Methanogenesis in a thermophilic (58 °C) anaerobic digester: *Methanotrix sp.* as an important acetoclastic methanogen.** *Applied and environmental microbiology,* 47, 4, 796 – 807.
68. Zinder, S; Cardwell, C; y Lee, A. (1984b). **Effects of temperature on methanogenesis in a thermophilic (58 °C) anaerobic digester.** *Applied and environmental microbiology,* 47, 4, 808 – 813.

## **ANEXO 1**

**Técnicas empleadas para determinar los parámetros  
físicoquímicos utilizados**

## DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO(Standard Methods, 1995)

**Método:** Determinación colorimétrica con digestión utilizando un digestor y espectrofotómetro HACH

**Fundamento:** En medio ácido y a alta temperatura en presencia de dicromato de potasio y con un catalizador, se lleva a cabo la oxidación de la materia orgánica e inorgánica oxidable, de manera que el ion dicromato se reduce al ion crómico. Al finalizar la reacción, se mide la intensidad de color que es proporcional a la concentración de la muestra.

**Interferencias:** Las altas concentraciones de cloruros pueden ser eliminadas por la adición a la muestra de sulfato mercúrico.

**Material y equipo:** Matraces aforados de 100 mL, pipetas de 5 mL, Piceta, Frascos ámbar de 500 o 1000 mL, Digestor para DQO HACH, Espectrofotómetro HACH, viales y adaptador HACH y papel seda.

**Preservación y almacenamiento:** La muestra cuando no se lee inmediatamente, se debe almacenar en recipientes de plástico o vidrio limpios, acidificándola hasta un pH de 2 y refrigerándola (4 °C). Esto en un lapso recomendado de 7 días y máximo de 28.

### Procedimiento

#### 1. Realización de la curva patrón

- Preparar 10 estándares con una solución patrón de biftalato de potasio, entre un rango de 0 (blanco) a 500 mg DQO/L con intervalos de 50 mg DQO/L.
- Preparar las muestras patrón bajo el mismo procedimiento de digestión de las muestras experimentales (mencionado adelante).
- Graficar absorbancia vs mg DQO/L para obtener la curva patrón o de calibración y su correspondiente ecuación ajustada.
- La solución patrón así como las muestras experimentales deben analizarse por duplicado.

#### 2. Preparación y digestión de las muestras experimentales a analizar

- Precalentar el digestor de DQO a 150 °C como lo indica el manual de operación del equipo.
- Tomar 1 mL de muestra (de un total de 200 mL) y aforar a 100 mL con agua destilada. Esta dilución se hizo particularmente para el lodo que se estaba manejando porque se encontró que era la más adecuada, pero no significa que siempre se tenga que diluir en esa proporción; la dilución dependerá de que nuestra muestra no se salga del intervalo de concentración manejado en la curva patrón.
- Agitar bien la muestra para asegurar una distribución uniforme de sólidos suspendidos y mejorar así la precisión y reproducibilidad de los resultados.
- Transferir 2.5 mL de la muestra homogeneizada dentro de un vial HACH, adicionar 1.5 mL de la solución de digestión y finalmente dejar correr cuidadosamente (puesto que se calienta mucho) 3.5 mL del reactivo de ácido sulfúrico por la pared del vial.
- Limpiar cualquier derrame que exista en el vial y meterlo a digerir en el reactor HACH por dos horas a 150 °C.
- Dejar enfriar el vial y leer la absorbancia de la muestra a 600 nm en el espectrofotómetro HACH

- Obtenida la absorbancia, se calcula la concentración a partir de la ecuación de la recta de la curva patrón. No hay que olvidar multiplicar por el factor de dilución al final.
- Tampoco hay que olvidar que siempre debe ponerse un blanco por corrida.

### 3. Preparación de reactivos

- Solución de digestión: Adicionar a 500 ml de agua destilada 10.216 g de dicromato de potasio previamente secado a 103 °C durante dos horas, 167 mL de ácido sulfúrico concentrado y 33.3 g de sulfato mercúrico. Disolver, enfriar a temperatura ambiente y diluir a 1000 mL.
- Reactivo de ácido sulfúrico (Catalizador): Adicionar 5.5 g de sulfato de plata en 543.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Dejar reposar durante una semana, agitando esporádicamente para disolver el sulfato de plata.
- Solución patrón de bifalato de potasio: Secar el bifalato de potasio a 120 °C hasta peso constante. Disolver 425 mg en agua destilada y diluir a 1000 mL. Esta solución tiene una DQO teórica de 500 mg/L. Esta solución se puede mantener estable hasta por tres meses, siempre y cuando no presente crecimiento biológico visible. Para preparar las diluciones se emplea la formula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

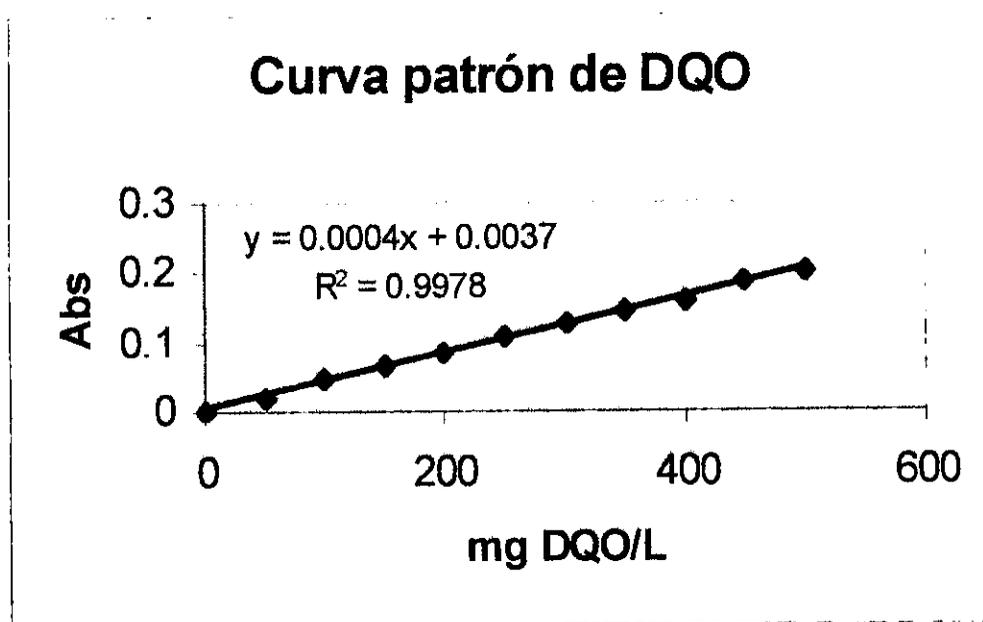
Por ejemplo, si se quiere preparar una solución de 450 mg/L aforada a 100 mL a partir de la solución original de 500 mg/L, se deben meter estos datos a la formula anterior y obtendremos el volumen de la solución de 500 mg/L que se debe aforar a 100mL

$$500 * V_1 = 450 * 100 \text{ despejando } V_1$$

$$V_1 = (450 * 100) / 500$$

$V_1 = 90$  mL, esto quiere decir que de la solución de 500 mg/l deben tomarse 90 mL y aforarse a 100 mL para conseguir una solución con una concentración de 450 mg/L.

Las curvas patrón que se obtienen son del siguiente tipo (en este caso fue la primera obtenida para los análisis):



#### 4. *Uso del espectrofotómetro HACH*

- Conecte y encienda el espectrofotómetro HACH. Presione las teclas 0 y luego READ/ENTER.
- Girar la perilla de longitud de onda hasta que la pantalla muestre 600 nm. Presione READ/ENTER y la pantalla mostrará: Abs.
- Coloque el adaptador de viales para DQO e introdúzcalo por el lado de la marca hacia el espectrofotómetro.
- Seque y limpie el blanco con papel seda y colóquelo dentro del adaptador con el logotipo HACH al frente del instrumento y coloque la cubierta sobre el adaptador.
- Presione la tecla ZERO. La pantalla mostrará: WAIT. Luego aparecerá: 0 Abs. Lo que indicará que el equipo está calibrado.
- Colocar las muestras en el adaptador como se hizo con el blanco, solo que ahora sin teclear ZERO, presionar la tecla READ/ENTER, entonces la pantalla mostrará WAIT. Después aparecerá el valor de absorbancia correspondiente a nuestra muestra.

#### *Precauciones*

- La mezcla de dicromato de potasio y ácido sulfúrico es sensible a la luz ultravioleta. Para evitar el deterioro de la solución durante el almacenamiento, la solución debe guardarse en frascos ámbar y protegidos de todas las fuentes de luz y en refrigeración si es posible. La pequeña cantidad de luz que llega a los frascos durante el período de preparación de las muestras no afectará los resultados del análisis.
- Muchas muestras que contienen materiales orgánicos fácilmente oxidables se digieren completamente en menos de dos horas. Para utilizar un periodo de digestión reducido, lea colorimétricamente los viales de la muestra a intervalos de 15 minutos y cuando la lectura permanezca sin cambio, puede considerarse completamente digerida.
- Si se obtiene un color verde puro en la muestra, todo el dicromato se ha reducido al estado crómico. Será necesario repetir la digestión con una muestra diluida, además se deben repetir aquellas determinaciones que se acerquen a los límites de concentración de la curva patrón.
- Los derrames deben limpiarse de inmediato y, en caso de contacto con la piel, lave la zona afectada con abundante agua. El derrame del reactivo afectará la precisión del análisis y es peligroso para la piel y otros materiales. No se debe correr el análisis de DQO con viales que han tenido reactivos derramados.

### **SÓLIDOS TOTALES(Standard Methods, 1995)**

*Método:* Gravimétrico

*Fundamento:* El método se basa en la evaporación y calcinación de la muestra con cuyos residuos se calcula el contenido de sólidos.

*Interferencias:* Provocarán resultados no reproducibles la presencia de partículas grandes, material flotante, precipitados y muestras no homogéneas y la presencia de partículas de grasa en la superficie.

*Material y equipo:* Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g, cápsulas de porcelana de 200 mL, Probetas de 50 mL, parrilla de calentamiento, mufla eléctrica (550 ± 25 °C), estufa (103 – 105 °C), desecador con deshidratante adecuado (silica gel), bomba de vacío matraz Kitasato con accesorios y pinzas para crisol.

*Preservación y almacenamiento:* Almacene la muestra en frascos de plástico o vidrio en refrigeración (4 °C) durante un lapso de 2 a 7 días (máximo).

### *Procedimiento*

- Transferir una porción de la muestra (30 – 40 mL) a una cápsula de porcelana puesta previamente a peso constante por calentamiento a 550 °C (G). Poner la muestra en una estufa a 103 – 105 °C durante 24 horas. Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y determinar su peso (G1).
- La concentración de sólidos totales en g/L se calcula mediante la siguiente formula:

$$ST = ((G1 - G)/V_{\text{muestra}}) * 1000$$

### *Precauciones*

- Nunca tomar con las manos las cápsulas, siempre usar pinzas.
- Muchas veces en el análisis de lodos residuales la presencia de materia orgánica en exceso, hace necesario incrementar los tiempos de ignición.

## **SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES Y VOLÁTILES(Standard Methods, 1995)**

### *Método: Gravimétrico*

*Fundamento:* El método se basa en la evaporación y calcinación de la muestra con cuyos residuos se calcula el contenido de sólidos.

*Interferencias:* Provocarán resultados no reproducibles la presencia de partículas grandes, material flotante, precipitados y muestras no homogéneas y la presencia de partículas de grasa en la superficie.

*Material y equipo:* Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g, crisoles Goosh, Probetas de 50 mL, parrilla de calentamiento, mufla eléctrica (550 ± 25 °C), estufa (103 – 105 °C), desecador con deshidratante adecuado (silica gel), bomba de vacío, matraz Kitasato con accesorios pinzas para crisol.

*Preservación y almacenamiento:* Almacene la muestra en frascos de plástico o vidrio en refrigeración (4 °C) durante un lapso de 2 a 7 días (máximo).

### *Procedimiento:*

- Colocar un filtro de fibra de vidrio GF/C marca Whatman con la cara rugosa hacia arriba sobre un crisol Goosh. Poner el crisol en un matraz Kitazato y lavar con agua destilada aplicando vacío.
- Poner el crisol Goosh (sin muestra) a peso constante calentándolo a 550 °C (G2).
- Tomar una porción de la muestra (15 – 20 mL) y colocarla en el crisol. Después aplicar vacío y lavar 3 veces con agua destilada (≈ 10 mL), dejando que el agua drene en cada lavado.
- Se lleva el crisol a la estufa a 103 – 105 °C durante una o dos horas. Luego sacarlo y enfriarlo en desecador hasta temperatura ambiente y determinar su peso (G3).
- Introducir el crisol en la mufla a 550 °C durante 30 minutos. Sacar el crisol y ponerlo a enfriar en desecador hasta temperatura ambiente. Después determinar su peso (G4).
- La concentración de SST y SSV en g/L se calcula utilizando la siguiente formula:

$$SST = ((G3 - G2)/V_{\text{muestra}}) * 1000$$

$$SSV = ((G3 - G4)/V_{\text{muestra}}) * 1000$$

*Precauciones:* Las mismas que para ST.

## ALCALINIDAD TOTAL Y RELACIÓN ALCALINIDAD INTERMEDIA: ALCALINIDAD PARCIAL (Standard Methods, 1995 y Ripley et al 1986)

**Método:** Titulación potenciométrica a valores de pH de 5.75 y 4.3. Este método se prefiere en lugar del volumétrico cuando se trata de muestras coloridas o turbias.

**Fundamento:** El método se basa en la titulación con ácido (sulfúrico de preferencia) de una solución o suspensión acuosa (en este caso el lodo). Los mililitros gastados de ácido para llegar al valor de pH que queremos pueden transformarse en valores de alcalinidad. Si el pH alcanzado es de 5.75 la alcalinidad (parcial) obtenida es debida a los bicarbonatos, pero si es de 4.3 (total) es debida tanto a los ácidos carboxílicos volátiles como a los bicarbonatos.

**Interferencias:** Jabones, materiales oleosos, sólidos suspendidos, precipitados u otros

**Material y equipo:** Centrífuga y tubos de centrifuga, matraces aforados de 100 mL, pipetas graduadas de 5 mL, bureta de 50 mL, pinzas para bureta, potenciómetro, soluciones buffer de pH 4 y 7, vaso de precipitados de 500 mL, piceta y agitador magnético.

**Preservación y almacenamiento:** Las muestras no analizadas inmediatamente se deben preservar en frascos de plástico o vidrio, refrigerarse (4 °C) y no almacenarse más de 24 horas.

**Procedimiento:**

- Homogeneizar el lodo y tomar 50 mL de muestra. Centrifugar o sedimentar en una probeta.
- Tomar 10 mL del sobrenadante y aforar a 100 mL con agua destilada.
- Titular la muestra a pH de 5.75 y 4.3 con una solución de ácido sulfúrico 0.02 N. La muestra debe permanecer en agitación durante todo el análisis.
- Calcular las alcalinidades con la siguiente fórmula:

$$\text{ALK [mg CaCO}_3\text{ / L]} = [V_1 * N * 50 * 1000] / V_2$$

$$\text{ALK intermedia} = \text{ALK 4.3} - \text{ALK 5.75}$$

$$\text{Relación ALK intermedia: ALK parcial} = (\text{ALK 4.3} - \text{ALK 5.75}) / \text{ALK 5.75}$$

Donde:

$V_1$  = volumen de muestra = 10 mL

$V_2$  = volumen utilizado de ácido sulfúrico 0.02 N [= ] mL

N = normalidad del ácido [= ] eq / L

50 = peso equivalente del CaCO<sub>3</sub> [= ] g / eq

1000 = factor de conversión de gramos a miligramos

**Preparación y valoración de la solución de ácido sulfúrico 0.02 N**

- Disolver 3 mL de ácido sulfúrico concentrado en agua destilada y aforar a 1 L. Tomar 200 mL de la solución y aforar a 1 L.

**Preparación del standard primario (Carbonato de sodio 0.05 N)**

- Poner a secar 5 gramos de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 250 °C durante cuatro horas.
- Pesar 2.5 ± 0.2 g y aforar a 1 L

**Valoración**

- Titular el carbonato de sodio con el ácido hasta alcanzar un pH de 4.5
- Utilizar la siguiente fórmula para calcular la normalidad del ácido:

$$N_{\text{ácido}} = (A * B) / (53 * C)$$

Donde:

$N_{\text{ácido}}$  = Normalidad del ácido sulfúrico

A = g/L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

B = volumen de muestra de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  [ = ] mL

C = volumen de ácido utilizado [ = ] mL

53 = peso equivalente del  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

### ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES(Standard Methods, 1995)

*Método:* Volumétrico (titulación)

*Fundamento:* Los ácidos volátiles orgánicos se separan de la muestra por destilación, debido a una destilación conjunta con el agua separada del lodo, los ácidos se cuantifican con una titulación ácido – base usando como titulante hidróxido de sodio. El método de destilación es empírico y da una recuperación incompleta y algo variable comprendida entre un 90 a 98 %.

*Interferencias:* El  $\text{H}_2\text{S}$  y el  $\text{CO}_2$ , que pueden ser eliminados desechando los primeros 15 mL del destilado. Los ácidos minerales fuertes, los ácidos débiles y las sales hidrolizables como los sulfatos de hierro y aluminio pueden incrementar la acidez determinada.

*Material y equipo:* centrífuga de 4 plazas, equipo de destilación convencional, barra magnética, agitación magnética, matraces de destilación de 500 mL, condensadores, probetas de 25, 100 y 250 mL, matraz Erlenmeyer de 250 mL, pipeta volumétrica clase A de 250 mL y matraz aforado clase A de 100 mL. Agua calidad tipo IV,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1:1) e hidróxido de sodio estándar 0.1 N.

*Preservación y almacenamiento:* El lodo a analizar se debe conservar preferentemente en frascos de plástico o de vidrio borosilicato y el análisis debe practicarse en un máximo de 24 horas. De no ser así, la muestra se conservará a 4 °C durante 7 días máximo.

*Procedimiento:*

- Determinar el factor "f" de corrección para el aparato a utilizar, diluyendo 10, 30 y 60 mL de solución madre de ácido acético hasta 250 mL con agua destilada. Colocar en un matraz de destilación de 500 mL, agregar 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , perlas de ebullición y destilar. El factor "f" está dado por:

$$f = a/b$$

Donde:

a = mg/L de ácido volátil como ácido acético, recuperado en el destilado.

b = mg/L de ácido volátil como ácido acético de la solución patrón empleada

$$a = (V \cdot N \cdot 60,000) / 250 \text{ mL}$$

Donde:

V = mL de NaOH empleados

N = Normalidad del NaOH

$$b = (V)(M)/250 \text{ mL}$$

Donde:

V = mL de la solución madre de ácido acético

M = mg/L de la solución madre de ácido acético.

- Centrifugar 200 mL de muestra durante 5 minutos a 2500 rpm.
- Recoger los sobrenadantes y mezclarlos. Colocar 100 mL del sobrenadante en un matraz de destilación de 500 mL.

- Añadir 100 mL de agua destilada, perlas de ebullición y 5 mL de la solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mezclar de forma que el ácido no se quede en el fondo del matraz.
- Destilar a una velocidad de 5 mL/minuto.
- Desechar los primeros 15 mL y recoger exactamente 150 mL de destilado en una probeta de 250 mL. transferir a un matraz Erlenmeyer de 250 mL y titular con NaOH 0.1N, utilizando potenciómetro o indicador de fenolftaleína. Los puntos finales de estos dos métodos, un pH de 8.3 y la primera coloración rosa que persista en un corto tiempo, respectivamente.
- La concentración se calcula de la siguiente manera:

$$\text{mg/L ácido volátil como ácido acético} = (V \cdot N \cdot 6000) / m \cdot f$$

Donde:

N = normalidad del NaOH

V = mL de NaOH empleados

m = mL de muestra

*Preparación del NaOH 0.1N*

- Pesarse, lo más rápido posible, 4.3g de NaOH y disolverlos en agua destilada y hervida. Aforar a un litro y guardar la solución en un frasco tapado.
- Disolver 0.408 g de estándar primario de biftalato de potasio en 100 mL de agua.
- Tomar 20 mL de la solución de NaOH, agregar unas gotas de fenolftaleína y titular hasta la aparición de un ligero y constante tono rosado.
- La normalidad del NaOH se calcula de la siguiente manera:

$$N = W / (V \cdot 0.204)$$

Donde:

W = gramos de biftalato pesados.

V = mL de NaOH utilizados

0.204 = equivalente del biftalato

*Preparación de la solución madre de ácido acético*

- Diluir 1.9 mL de ácido acético concentrado hasta 1000 mL con agua desionizada.
- Estandarizar 100 mL contra una solución NaOH 0.1 N hasta un pH de 8.3 o agregar 2 gotas de sal de fenolftaleína y agregar NaOH 0.1N hasta obtener la primera coloración rosa que persista un corto tiempo.
- Calcular los mg/L de ácido acético de la siguiente manera:

$$\text{mg/L de ácido acético} = (N \cdot V \cdot 60000) / V_1$$

Donde:

N = normalidad del NaOH

V = mL de NaOH empleados

V<sub>1</sub> = alicuota de ácido acético

## pH

*Método:* Potenciométrico

*Fundamento:* El método se basa en medir la diferencia de potencial entre dos electrodos que se sumergen en la muestra problema. La diferencia de potencial de estos electrodos, medida en voltios o milivoltios, es una función lineal del pH de la muestra. La escala del

potenciómetro está diseñada de manera que sea posible leer el voltaje directamente en términos de pH.

*Material y equipo:* Potenciómetro y soluciones buffer de pH 4 y 7.

*Preservación y almacenamiento:* No aplica, la muestra debe analizarse inmediatamente.

*Procedimiento:*

- Calibrar el electrodo a pH 4 y 7 y ajustar a la temperatura de la muestra.
- Homogeneizar la muestra e introducir el electrodo en la misma. Después leer el valor de pH.

## PRODUCCIÓN DE BIOGÁS

*Método:* Desplazamiento de una solución de rojo de metilo saturada con cloruro de sodio.

*Fundamento:* El biogás al escapar del reactor desplaza a la solución saturada, puesto que no puede en ningún grado disolverse en ella. Por lo tanto, el volumen de solución desplazada representa al volumen de biogás producido.

*Material y equipo:* Septos, botella de plástico o vidrio, equipos de venoclisis o mangueras con agujas y una probeta o matraz graduado.

*Reactivos:*

1. *Solución de rojo de metilo saturada con cloruro de sodio*

- Disolver 0.05 gramos de rojo de metilo en un litro de agua destilada y saturar con cloruro de sodio.

*Procedimiento:*

- Instalar una manguera para permitir la salida de la solución de rojo de metilo a algún matraz o probeta en donde se pueda cuantificar el líquido que se está desplazando.
- Instalar el equipo de venoclisis para que el gas salga del reactor y entre a la solución de rojo de metilo (FIG 11)
- Cuantificar cuanto líquido se desplaza en determinado tiempo.

*Precauciones:*

- Debe de cerrarse la llave del equipo de venoclisis una vez que el líquido se ha desplazado para evitar la más mínima entrada de aire.

## **ANEXO 2**

**Técnicas empleadas para determinar la concentración  
de los microorganismos evaluados**

## COLIFORMES TOTALES Y *E. COLI*

**Método:** Detección simultánea de coliformes totales y *E. coli* por sustrato cromogénico específico o colilert

**Fundamento:** Dos nutrientes indicadores, o-nitrofenil - $\beta$ -d-galactopiranosido (ONPG) y 4-metil-umbeliferilo- $\beta$ -d-glucurónido (MUG), son los nutrientes principales en colilert y pueden ser metabolizadas por la enzima coliforme  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucuronidas de *E. coli* respectivamente. A medida que los coliformes utilizan la  $\beta$ -galactosidasa para metabolizar ONPG este se torna amarillo debido a la conversión del o - nitrofenil a o - nitrofenol. Por otro lado, la  $\beta$ -glucuronidasa es utilizada por *E. coli* para metabolizar MUG y producir fluorescencia debido a la conversión del 4 - metil - umbeliferilo a 4 - metil - umbeliferona.

Esta técnica tiene la ventaja de que los microorganismos no objetivos, al no contener las enzimas no pueden causar interferencias como es el caso de *Klebsiella pneumoniae* con respecto a *E. coli*. Además, detecta desde un coliforme o *E. coli* viable por muestra de 100 mL y presenta ahorros de tiempo considerables.

**Material y equipo:** Sellador Quanta - Tray, Incubadora a  $35 \pm 0.5$  °C, Autoclave, botellas de vidrio (lecheras), pipetas estériles graduadas de 1, 5 y 10 mL, guantes de asbesto, bolsas estériles sin tiosulfato, piceta, cápsulas de colilert con dosis para usarse en 100 mL de muestra, Matraces Erlenmeyer de 1 o 2 L, Placas Quanta - Tray 2000, Mechero Bunsen o Fischer y Lámpara de fluorescencia UV de 6 W.

**Preservación y almacenamiento:** Poner las muestras en bolsas estériles y en hielo para analizarlas máximo en 30 - 40 minutos. De preferencia analizar inmediatamente.

**Procedimiento:**

- Realizar las diluciones propuestas en los puntos 5.6.1 y 5.6.2 en agua de dilución. Las diluciones se hicieron de tal manera que cubrieran un volumen de 100 mL que es el mínimo para el llenado de las placas Quanta - Tray. El hacer diluciones como ya se mencionó, depende de la muestra que se este trabajando, de hecho, si se trata de agua potable se usan 100 mL de muestra y no se necesita el agua de dilución.
- Poner una cápsula de reactivo colilert por muestra.
- Vaciar las muestras en las placas Quanta - Tray de manera que la botella donde se encuentra la muestra no toque las placas. Antes de meter las placas al sellador debe de quitárseles las burbujas de aire mediante golpes leves.
- Meter las placas al sellador. Es importante marcar las placas para saber de que muestra se trata.
- Incubar durante 24 horas a  $35 \pm 0.5$  °C
- Sacar de la incubadora y contar las celdas grandes y pequeñas que hayan dado positivo tanto para coliformes totales (amarillo) como para *E. coli* (fluorescentes). Las celdas para *E. coli* se leen utilizando la lámpara UV de preferencia en un lugar oscuro.
- Una vez contadas las celdas, se pasan a NMP/100 mL utilizando el índice Quanta - Tray /2000.
- Para obtener el valor en NMP / gST se utiliza la siguiente formula:

$$\text{NMP / gST} = ((\text{NMP}/100 \text{ mL}) / (\text{g ST} / \text{L})) * 1000$$

- Se utilizó como control negativo lodo crudo esterilizado y como control positivo lodo crudo.

*Preparación del agua de dilución (Buffer de fosfatos):*

Fórmula

Solución Stock A ..... 1. 25 mL

Solución Stock B.....5. 00 mL

Agua destilada ..... Aforar a 1000 mL

Esta solución debe almacenarse a temperatura ambiente no más de una semana.

1. *Solución Stock A*

- Disolver 34 g de fosfato monopotásico en 500 mL de agua destilada, ajustar el pH a  $7.2 \pm 0.5$  con hidróxido de sodio 1 N y aforar a 1000 mL.
- Colocar la solución en un frasco de vidrio con tapón de rosca (de preferencia) y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- Almacenar en refrigeración (4 °C). La solución es estable durante meses siempre y cuando no se le note turbiedad.

2. *Solución Stock B*

- Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio en 500 mL de agua destilada y aforar a 1000 mL.
- Colocar la solución en un frasco de vidrio con tapón de rosca y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- Almacenar en refrigeración (4 °C). La solución es estable durante meses siempre y cuando no se le note turbiedad.

**Se anexa índice Quanty-Tray**

**C. *albicans***

*Método:* Inoculación superficial en agar selectivo para Candida.

*Fundamento:* El agar como lo dice el nombre de la técnica, solo permite crecer a la levadura en cuestión.

*Material y equipo:* Incubadora a  $37 \pm 0.5$  °C, Autoclave, pipetas estériles graduadas de 1, 5 y 10 mL, guantes de asbesto, bolsas estériles sin tiosulfato, piceta, Mechero Bunsen o Fischer, tubos de ensaye, agar selectivo para Candida, cajas petri y asas de inoculación.

*Preservación y almacenamiento:* Poner las muestras en bolsas estériles y en hielo para analizarlas máximo en 30 – 40 minutos. De preferencia analizar inmediatamente.

*Procedimiento:*

- Preparar el agar selectivo para Candida (no es autoclaveable) y dejarlo enfriar en cajas petri hasta que solidifique.

- Preparar las muestras considerando las diluciones establecidas en el punto 5.6.1
- Inocular sobre el agar 0.5 mL de la muestra. No se puso 1 mL de muestra porque se escurría cuando la caja se invertía para ponerla en la incubadora. Una vez inoculada la muestra hay que homogeneizarla sobre el agar mediante movimientos en forma de triángulo o de ocho.
- Incubar a  $37 \pm 0.5$  °C durante 24 horas.
- Contar las colonias y calcular las UFC/100 mL con la siguiente formula:

$$\text{UFC} / 100 \text{ mL} = (\text{CC} / 0.5) * 100$$

Donde:

CC = colonias contadas

Y para obtener las UFC / gST se utilizar la siguiente ecuación:

$$\text{UFC} / \text{g ST} = ((\text{UFC}/100 \text{ mL}) / (\text{g ST} / \text{L})) * 1000$$

- Se utilizó como control negativo un cultivo (crecido a 37 °C por 24 horas) esterilizado y como control positivo el mismo cultivo pero sin esterilizar.