



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Remoción de patógenos (Coliformes fecales, *Salmonella*)
en lodos de purga municipal mediante pretratamiento
térmico.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

PRESENTA

MARÍA ELENA VILLALBA PASTRANA



MÉXICO, D.F.

2012



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARÍA RAFAELA GUTIÉRREZ LARA

VOCAL: NÉSTOR NOÉ LÓPEZ CASTILLO

SECRETARIO: ADALBERTO NOYOLA ROBLES

1ER. SUPLENTE: ALFONSO DURÁN MORENO

2º SUPLENTE: BEATRIZ RUÍZ VILLAFAN

INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: ADALBERTO NOYOLA ROBLES

SUPERVISOR TÉCNICO: MARGARITA ELIZABETH CISNEROS ORTÍZ

SUSTENTANTE: MARÍA ELENA VILLALBA PASTRANA

DEDICATORIA

A mis amados padres por creer que este día llegaría

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a mi Facultad de Química por brindarme la oportunidad de aprender y forjarme como profesional.

Al Instituto de Ingeniería por permitir la realización de este trabajo de tesis en sus instalaciones.

Al Doctor Adalberto Noyola por permitirme incorporar al Grupo de Investigaciones de Procesos Anaerobios y por su apoyo e invaluable asesoría.

A la M. Margarita Cisneros, por su afecto, instrucción y continuo apoyo, le estaré permanentemente agradecida por iluminarme el camino.

A Daniel de los Cobos por su tiempo dedicado a esclarecer mis dudas, por su ayuda y sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A mis compañeros y amigos del Instituto de Ingeniería, en específico a Alexandra Cerón y Carolina Marini, por sus consejos y charlas amenas, haciendo de mi estadía una experiencia inolvidable.

A todas las personas que contribuyeron durante el desarrollo de este trabajo, por su tiempo y dedicación: Mauricio Magos, Ponciano Trinidad y Roberto Briones.

A los miembros del jurado, sobre todo a Rafaela Gutiérrez y a Néstor López, gracias por su tiempo y dedicación.

A todos y cada uno de mis queridos amigos, en especial a: Juan Carlos Jiménez, Carlos Melchor, Lida Martínez, Adriana Santiago, Alianny Alpizar, Rodolfo Cortés, María José Cervantes, Josele Rosas, Araceli Hernández, Antonio Vila, Rodrigo Gutiérrez, Mikiztli Arias y Miguel Ángel Ramírez; gracias por todos los pequeños y grandes momentos, por acompañarme durante esta travesía y por ayudarme a alcanzar esta meta.

A Lizeth García, Verónica Reyes y Giovanna Gutiérrez, por su completa complicidad e invaluable apoyo a través de ya muchos ayerés.

"Mucha gente entra y sale de nuestra vida a lo largo de los años. Pero solo los verdaderos amigos dejan huellas en el corazón."

Finalmente mi más honda gratitud a mis queridos padres, por enseñarme a luchar, por su gran corazón, pero sobre todo por enseñarme por medio de su ejemplo a ser responsable. Muchas gracias por todo lo que han hecho y siguen haciendo por mi; sacrificios continuos imposibles de retribuir.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
RESUMEN	1
Introducción	2
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	3
1.1 Justificación.....	3
1.2 Objetivos.	5
2. PROBLEMÁTICA DEL TRATAMIENTO DE LOS LODOS RESIDUALES EN MÉXICO	6
3. TRATAMIENTO DE LODOS RESIDUALES.....	11
3.1 Características	11
3.2 Proceso de tratamiento de lodos residuales	13
3.3 Digestión Anaerobia	17
3.4 Pretratamiento de lodos	21
3.5 Pretratamiento térmico	24
4. MICROORGANISMOS PATÓGENOS	29
4.1 Clasificación	29
4.2 Características de crecimiento y supervivencia	35
4.3 Presencia en los distintos tipos de lodo	37
4.4 Indicadores	40
4.5 Coliformes fecales	42
4.5.1 <i>Escherichia coli</i>	43

4.6 <i>Salmonella</i> spp.	46
4.7 Mutualismo y simbiosis	51
5. MODELOS MICROBIOLÓGICOS PREDICTIVOS	53
5.1 Microbiología predictiva.....	53
5.2 Curvas de respuesta a la dosis.....	54
5.3 Cinética de primer orden	56
5.4 Desviaciones	60
5.4.1 Modelo de distribución de Fermi	62
5.4.2 Modelo de distribución Weibull	64
5.5 Validación de modelos	71
6. METODOLOGÍA.....	73
6.1 Obtención de lodos.....	73
6.2 Descripción del dispositivo experimental	74
6.3 Procedimientos de inactivación	75
6.4 Técnicas microbiológicas	76
6.5 Curvas de inactivación	78
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
7.1 Caracterización de los lodos residuales.....	79
7.2 Curvas de inactivación	82
7.3 Cinéticas de inactivación	101
7.4 Curvas de penetración de calor	107
7.5 Curvas completas de inactivación para Coliformes fecales	108
7.6 Evolución del lodo pretratado en un digester anaerobio.....	111
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	112

8.1 Conclusiones.....	112
8.2 Recomendaciones.....	113
ANEXO A. SÓLIDOS TOTALES TOTALES, VOLÁTILES Y FIJOS.	114
ANEXO B DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES.....	115
ANEXO C DETERMINACIÓN DE <i>SALMONELLA SPP.</i>	116
ANEXO D NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)	118
ANEXO FOTOGRÁFICO	120
REFERENCIAS	122

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1	Límites máximos permisibles para patógenos y parásitos en lodos y biosólidos (NOM-004-SEMARNAT-2002).....	9
Tabla 2.2	Límites máximos permisibles para metales pesados en biosólidos (NOM-004- SEMARNAT-2002).....	9
Tabla 2.3	Aprovechamiento de biosólidos (NOM-004-SEMARNAT-2002)..	10
Tabla 3.1	Resultados de algunos trabajos recientemente publicados sobre los impactos de diferentes pretratamientos térmicos en lodos activados y digestión anaerobia.....	25
Tabla 3.2	Revisión bibliográfica de investigaciones que reportan remoción de parásitos y patógenos debido a tratamientos térmicos.	27
Tabla 4.1	Microorganismo patógenos que pueden ser encontrados en los lodos residuales (Carrington, 2001).	34
Tabla 4.2	Concentración típica de microorganismos en el lodo crudo (Carrington <i>et al.</i> , 2001).....	35
Tabla 4.3	Recopilación de algunas concentraciones de patógenos en distintas etapas del tratamiento de lodos residuales (Romdhana, <i>et al.</i> , 2009).	38
Tabla 4.4	Condiciones límites para el crecimiento de <i>Salmonella</i>	49
Tabla 6.1	Esquema de muestreo.....	76
Tabla 7.1	Composición de sólidos promedio de lodos residuales concentrados.	79
Tabla 7.2	Composición promedio de las mezclas de lodo empleadas en los pretratamientos térmicos.....	79
Tabla 7.3	Caracterización microbiológica de los lodos residuales empleados en los pretratamientos térmicos.	81
Tabla 7.4	Datos experimentales promedio del pretratamiento a 60 °C. ...	82
Tabla 7.5	Datos experimentales promedio del pretratamiento a 70 °C. ...	84
Tabla 7.6	Datos experimentales promedio del pretratamiento a 80 °C. ...	86
Tabla 7.7	Datos experimentales promedio del pretratamiento a 60 °C	93
Tabla 7.8	Datos experimentales promedio del pretratamiento a 70 °C....	95
Tabla 7.9	Compendio de coeficientes numéricos de las distintas cinéticas de inactivación	106

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** Diagrama del flujo de energía (DQO) en la digestión anaerobia de la materia orgánica particulada a metano (Gujer y Zehnder, 1983). 20
- Figura 5.1** Diferentes curvas de inactivación: A) con hombro (concavidad negativa), B) con cola (concavidad positiva), C) logarítmica lineal, D) sigmoidea (Peleg, 2000)..... 56
- Figura 5.2** Decaimiento logarítmico de una población microbiana al ser sometida a un agente letal..... 57
- Figura 5.3** Población microbiana en el tiempo para una temperatura T , una de las expresiones de la curva de inactivación o de supervivencia, ecuación (4.4). 58
- Figura 5.4** Relación gráfica entre la temperatura y el valor D 60
- Figura 5.5** A) Vista esquemática de la curva de respuesta a la dosis de un microorganismo descrito por la función de Fermi, B) la distribución de dosis letales a las cuales los individuos de la población sucumben, C) curva de respuesta a la dosis..... 63
- Figura 5.6** Gráfica que esquematiza las curvas de inactivación generadas a partir de tres distintos valores del factor de forma β y su influencia en el tiempo de confiabilidad (t_R), de acuerdo a la función de distribución de Weibull (Van Boekel, 2002). 68
- Figura 5.7** Vista esquemática de las distintas curvas de supervivencia microbiana. (A) Ecuación 4.19 con $\beta > 1$, (B) Ecuación 4.19 con $\beta < 1$ (C) Ecuación 4.29, (D) Ecuación 4.30. 70
- Figura 6.1** Termohidrolizador de lodos..... 75
- Figura 7.1** Curva de inactivación de coliformes fecales, a temperatura de 60 °C (Área sombreada zona de decaimiento exponencial). 83
- Figura 7.2** Curva de inactivación de coliformes fecales, a temperatura de 70 °C (Área sombreada zona de decaimiento exponencial). 85
- Figura 7.3** Curva de inactivación de coliformes fecales, a temperatura de 80 °C (Área sombreada final de zona de decaimiento exponencial). 87

Figura 7.4 Concentración de coliformes fecales en $t=0$ en los distintos pretratamientos (Área sombreada zona de decaimiento exponencial).	89
Figura 7.5 Curva de inactivación de <i>Salmonella</i> spp., a temperatura de 60 °C (Área sombreada zona de decaimiento exponencial). ...	94
Figura 7.6 Curva de inactivación de <i>Salmonella</i> spp., a temperatura de 70 °C	96
Figura 7.7 Ejemplo de ajuste del modelo de primer orden para la inactivación de coliformes fecales a temperatura de 70 °C. ..	102
Figura 7.8 Ejemplo de ajuste del modelo de distribución de Weibull para la inactivación de coliformes fecales a temperatura de 70 °C.	103
Figura 7.9 Cinética de inactivación de coliformes fecales, a temperatura de 60 °C.....	104
Figura 7.10 Cinética de inactivación de coliformes fecales, a temperatura de 70 °C.	104
Figura 7.11 Cinética de inactivación de coliformes fecales, a temperatura de 80 °C.	105
Figura 7.12 Cinética de inactivación de <i>Salmonella</i> spp., a temperatura de 60 °C.....	105
Figura 7.13 Cinética de inactivación de <i>Salmonella</i> spp., a temperatura de 70 °C.....	106
Figura 7.14 Curvas de penetración de calor para los distintos procesos térmicos aplicados.	108
Figura 7.15 Curva completa de inactivación para coliformes fecales a temperatura de 70 °C (Área sombreada zona no isotermica).	109
Figura 7.16 Curva completa de inactivación para coliformes fecales a temperatura de 80 °C (Área sombreada zona no isotermica).	109

RESUMEN

La digestión anaerobia mesofílica ha venido usándose en México para la estabilización de los lodos producidos durante el tratamiento de aguas residuales, debido a que presenta varias ventajas con respecto a otros métodos de tratamiento; sin embargo, con respecto a los parámetros microbiológicos establecidos en la NOM-004-SEMARNAT-2002, que regula la disposición y reúso de los lodos residuales, solo se consigue producir biosólidos clase C y para cumplir con los parámetros de las clases A y B, es necesario controlar la presencia de patógenos (Coliformes fecales y *Salmonella* spp.). Como solución, se ha propuesto aplicar un tratamiento térmico previo al proceso de digestión anaerobia mesofílica, con el que se pretende una mayor remoción de microorganismos patógenos y también disminuir los costos relacionados con el tratamiento de los lodos y más aún la obtención de biosólidos con características que faciliten su disposición final cumpliendo con la Normatividad vigente.

En el presente trabajo se realizó el seguimiento y se evaluó el efecto del pretratamiento térmico mediante la determinación de las cinéticas de inactivación de coliformes fecales y *Salmonella* spp. utilizando tres distintas temperaturas de exposición (60 °C, 70 °C y 80 °C). Además se empleó como herramienta la microbiología predictiva para ajustar modelos cinéticos a los pretratamientos térmicos estudiados.

Con respecto a los coliformes fecales, el pretratamiento térmico a 60 °C logró una inactivación promedio de 4.82 unidades logarítmicas, a 70°C se disminuyó 4.74 log, mientras que a 80°C de temperatura de exposición se obtuvo una reducción de 5.45 log de este indicador microbiológico. Para *Salmonella* spp., se tuvo una remoción de 6.3 log en el tratamiento térmico a 60 °C, una inactivación de 6.78 log con una hora de exposición a 70 °C y la inactivación total de este microorganismo al alcanzar los 80 °C de temperatura del proceso.

Las curvas de inactivación determinadas durante esta investigación se pueden relacionar con la presencia de varias subpoblaciones microbianas con distintas tolerancias al incremento de la temperatura, debido a que fue posible identificar principalmente dos regiones en éstas, la primera reflejando la inactivación de la mayor parte de la carga microbiana, mientras que por el contrario la segunda mostró letalidad casi imperceptible. Lo anterior funciona como evidencia experimental de que no todos los microorganismos de una población tienen la misma probabilidad de morir, implicando heterogeneidad entre las células de un mismo grupo de microorganismos.

Introducción

Actualmente el tratamiento de las aguas residuales es una problemática de suma importancia a nivel mundial, que implícitamente demanda la estabilización y disposición final de los lodos residuales generados por el tratamiento de los efluentes de desecho, conforme lo estipulado en las normatividades concernientes. A pesar de que nuestro país ya cuenta con la Norma Oficial NOM-004 SEMARNAT 2002 que regula el manejo y la disposición final de los lodos de desecho provenientes de plantas de tratamiento municipales, gran proporción de éstos son dispuestos en el ambiente sin ser estabilizados pese al alto contenido de patógenos, metales pesados y compuestos tóxicos, provocando un riesgo latente para la salud pública.

Con el propósito de incrementar la experiencia en los procesos de tratamiento de estos desechos, se debe fomentar el desarrollo de las tecnologías existentes para el tratamiento de los lodos y promover de esta manera su reutilización con fines agrícolas, solucionando así un problema de contaminación.

Se sabe que los pocos digestores anaerobios de lodos construidos en México operan principalmente a temperaturas de mesofilia, condiciones bajo las cuales los parásitos y patógenos no son reducidos lo suficiente para producir biosólidos clase A. Con el fin de asegurar la destrucción de patógenos, se ha propuesto el arreglo "Pretratamiento térmico y posterior digestión anaerobia mesofílica (37°C)" (Martínez, 2009).

El presente estudio se enfocó principalmente en lograr mayor eficiencia en términos de reducción de patógenos en la etapa previa a la digestión anaerobia mesofílica. Lo anterior se logró mediante la determinación de las cinéticas de inactivación de microorganismos patógenos (coliformes fecales y *Salmonella* spp.) a tres distintas temperaturas de exposición durante el pretratamiento térmico.

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Justificación

El tratamiento y la disposición adecuada de los lodos residuales continúa siendo una problemática de alto impacto en nuestra sociedad, debido a que en nuestro país aun no se cuenta con la experiencia suficiente en los procesos de tratamiento de estos desechos. Es alarmante que a pesar de que las autoridades mexicanas publicaron la Norma Oficial NOM-004 SEMARNAT 2002 que regula el manejo y la disposición final de los lodos de desecho provenientes de plantas de tratamiento municipales, gran proporción de éstos son dispuestos en el ambiente sin ser procesados pese al alto contenido de patógenos, metales pesados y compuestos tóxicos, provocando un riesgo latente para la salud pública.

Existen diversas tecnologías de tratamiento de los lodos residuales, sin embargo, en la normatividad mexicana vigente se destacan: la estabilización alcalina, la digestión aerobia y la digestión anaerobia. Esta última en su intervalo mesofílico (20-40 °C) es aplicada ampliamente en el país y se trata de un proceso que es capaz de producir lodos clase C según los lineamientos establecidos en la NOM-004-SEMARNAT-2002; no obstante, para cumplir con los parámetros de las clases A y B, es necesario controlar la presencia de patógenos (Coliformes fecales y *Salmonella* spp.). Se ha propuesto para dar solución a este requerimiento, operar la digestión anaerobia en intervalos termofílicos (50- 60°C) o bien aplicar un pretratamiento térmico, donde el rango de temperaturas debe mantenerse entre 60-100 °C para que pueda ser competitivo en cuanto a costos (Wang *et al.*, 1997). Los pretratamientos térmicos cuentan con el beneficio asociado de incrementar la hidrólisis del lodo, etapa identificada

como limitante durante el proceso de digestión anaerobia (Ferrer *et al.*, 2008; Mottet *et al.*, 2009).

En el trabajo de Martínez (2009) se aplicó un pretratamiento térmico (60 °C durante 1 hora) al lodo de desecho antes de ser sometido a digestión anaerobia mesofílica, con el propósito de remover desde un inicio la carga microbiana patógena y así lograr la producción de biosólidos clase A. Sin embargo, el estudio no arrojó los resultados esperados; ya que si bien los biosólidos cumplieron con todo lo estipulado en la normatividad mexicana vigente, incluidos los huevos de helmintos, en los parámetros microbiológicos (coliformes fecales y *Salmonella*), hubo un recrecimiento o una contaminación en la etapa de la digestión anaerobia mesofílica. Como consecuencia, surge la necesidad de dar continuidad a esta línea de investigación e identificar la causa de ese incremento.

Este trabajo continua la investigación descrita anteriormente y está encaminado a esclarecer lo acontecido durante el pretratamiento térmico en lo que concierne a los coliformes fecales y *Salmonella spp.*, pues entre más información se tenga sobre cómo se eliminan estos microorganismos, mayor entendimiento del proceso se tendrá. Se pretende incursionar en la microbiología predictiva comúnmente empleada en la industria de alimentos, para monitorear y evaluar el efecto del proceso térmico mediante la determinación de las cinéticas de inactivación de cada uno de estos microorganismos.

Conocer la rapidez a la que se inactivan los patógenos y cómo reaccionan ante distintas temperaturas de exposición permitirá identificar puntos críticos durante el proceso así como la construcción de modelos matemáticos que además de facilitar la interpolación entre puntos de datos y predecir respuestas para condiciones no estudiadas, hará posible

la posterior optimización del pretratamiento térmico y de esta forma proponer una tecnología competitiva desde el punto de vista económico.

1.2 Objetivos.

1.2.1 Objetivo general

Obtener la cinética de inactivación de microorganismos patógenos (coliformes fecales y *Salmonella* spp.) por medio de análisis microbiológico durante el pretratamiento térmico de lodos municipales a diferentes temperaturas de exposición (60, 70 y 80 °C).

1.2.2 Objetivo específico

Identificar las condiciones óptimas (tiempo y temperatura) del pretratamiento térmico que antecede a la digestión anaerobia mesofílica para la obtención de biosólidos Clase A de acuerdo con la Normatividad Mexicana vigente.

2. PROBLEMÁTICA DEL TRATAMIENTO DE LOS LODOS RESIDUALES EN MÉXICO

En México, como en muchos otros países; el saneamiento y tratamiento adecuado de las aguas residuales generadas por la actividad humana constituyen un problema ambiental ya que que contaminan de una manera irracional los ecosistemas en donde son vertidas. Actualmente en nuestro país se consumen $328.2\text{m}^3/\text{s}$ de agua potable, se generan $237.5\text{ m}^3/\text{s}$ de aguas residuales municipales de las cuales el 88% es captado por sistemas de drenaje. A su vez, se estima un caudal tratado de $88.12\text{ m}^3/\text{s}$, lo cual implica que tan sólo recibe tratamiento alrededor del 42.1% de las aguas residuales colectadas en los sistemas formales de alcantarillado municipales (CNA, 2011).

Hoy en día el tratamiento de las aguas residuales es una problemática que toda ciudad tiene que enfrentar. El diseño de este proceso va mas allá de considerar el aumento de volumen de las descargas debido al incremento de la población, también es necesario tomar en cuenta la mayor generación de residuos así como la disposición final que se les dará, tal es el caso del lodo generado durante el proceso de lodos activados o bien en la sedimentación primaria y secundaria.

La composición y cantidad de los lodos dependerá de las características de las aguas residuales crudas y del proceso de tratamiento que se le dé a dichas aguas. Por ejemplo, el proceso de lodos activados está asociado a la continua y excesiva generación de lodos, compuestos principalmente por biomasa microbiana (Prorot *et al.*, 2011), y pese a ello continua siendo el método más utilizado a nivel mundial en el tren de tratamiento de aguas residuales (Bonjoch y Blanch, 2009). Por consiguiente, la producción de lodos está incrementándose a escala global, mientras las rutas de

disposición se reducen conforme se establecen normatividades más estrictas. En nuestro país, y con respecto a la infraestructura existente para el tratamiento de las aguas, al cierre del año 2009 se reportaron 2029 plantas de tratamiento de aguas residuales en operación, de las cuales 546 corresponden al proceso de lodos activados y contribuyen con el 46.43% del caudal tratado ($40.92 \text{ m}^3/\text{s}$, ver figura 2.1) (CNA, 2010).

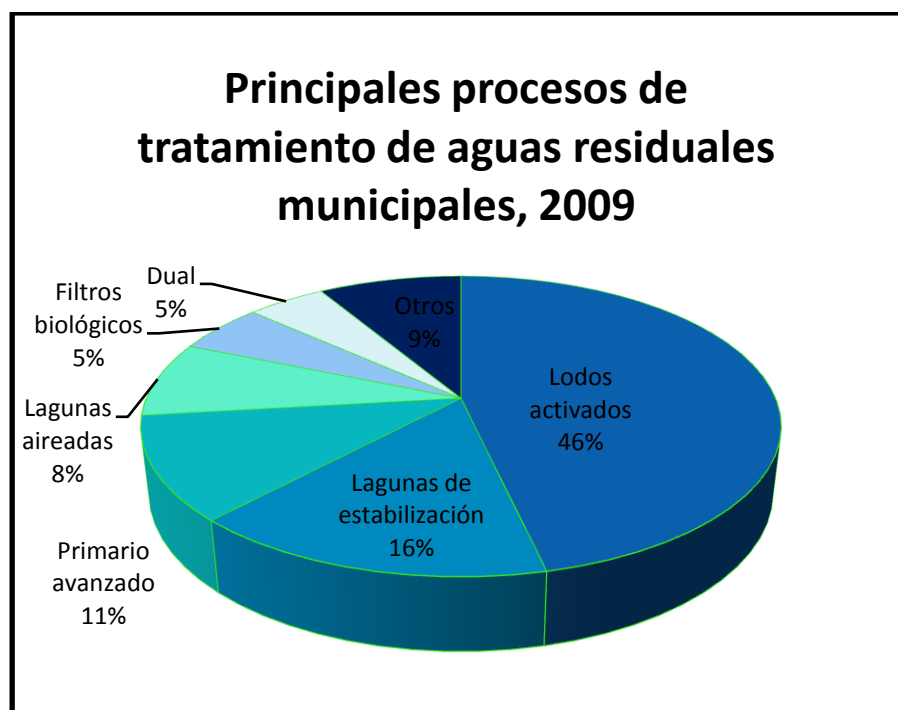


Figura 2.1 Distribución en México de los principales procesos de tratamiento de aguas residuales en función del caudal tratado (CNA, 2011)

El lodo producido en los procesos de tratamiento de aguas residuales está compuesto de la materia orgánica contenida en el agua residual cruda (lodo primario) y en los microorganismos en exceso que deben ser purgados (lodo secundarios). Este material es susceptible de descomposición, por lo que debe ser tratado adecuadamente. Una vez que ha sido sometido a procesos de estabilización se le denomina biosólido. Los lodos crudos son peligrosos debido a su alto contenido de

microorganismos, algunos de ellos patógenos, virus, hongos o parásitos (Mocé-Llivina *et al.*, 2003), además de contener en algunos casos, metales pesados (As, Cd, Hg, Pb, Se y Zn) y compuestos tóxicos.

En años anteriores, la mayor parte de los sistemas de tratamientos de aguas residuales instalados en México no trataban de la manera adecuada, ni contemplaban el manejo y disposición de lodos generados durante los procesos, por consiguiente, los mismos eran dispuestos al ambiente sin tratamiento, ya que su manejo se limitaba a la disposición en suelos, lagunas, rellenos sanitarios o su vertido a la red de alcantarillado, convirtiéndose en una problemática ambiental y en un riesgo para la salud pública.

Teniendo en cuenta lo anterior y tomando como referencia la regulación para biosólidos de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA por sus siglas en inglés), las autoridades mexicanas publicaron la Norma Oficial que regula el manejo y la disposición final de los lodos de desecho provenientes de plantas de tratamiento municipales, la NOM-004-SEMARNAT-2002. Lo anterior tuvo como finalidad provocar un aumento en el interés por los sistemas de tratamiento de lodos cuya eficiencia cumpliera con los requerimientos especificados así como promover la reutilización de los biosólidos. Sin embargo, actualmente se siguen incumpliendo estos requerimientos en varios sitios del país.

Dentro del documento oficial se establecen las especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes en lodos para su aprovechamiento y disposición final. Estos se muestran en las tablas 2.1, 2.2 y 2.3.

Tabla 2.1 Límites máximos permisibles para patógenos y parásitos en lodos y biosólidos (NOM-004-SEMARNAT-2002).

Clase	Indicador bacteriológico de contaminación	Patógenos	Parásitos
	Coliformes fecales NMP/g en base seca	<i>Salmonella</i> spp. NMP/g en base seca	Huevos de helmintos/g en base seca
A	<1000	<3	<1 (a)
B	<1000	<3	<10
C	<2000000	<300	<35

(a) Huevos de helmintos viables

Tabla 2.2 Límites máximos permisibles para metales pesados en biosólidos (NOM-004- SEMARNAT-2002).

Contaminante (determinados en forma total)	EXCELENTES mg/kg en base seca	BUENOS mg/kg en base seca
Arsénico	41	75
Cadmio	36	85
Cromo	1200	3000
Cobre	1500	4300
Plomo	300	840
Mercurio	17	57
Níquel	420	420
Zinc	2800	7500

Tabla 2.3 Aprovechamiento de biosólidos (NOM-004-SEMARNAT-2002).

Tipo	Clase	Aprovechamiento
EXCELENTE	A	* Usos urbanos con contacto público directo durante su aplicación. * Los establecidos para la clase B y C.
EXCELENTE O BUENO	B	* Usos urbanos sin contacto público directo durante su aplicación. * Los establecidos para la clase C.
EXCELENTE O BUENO	C	* Usos forestales. * Mejoramiento de suelos * Usos agrícolas.

Por lo tanto, es igual de importante la correcta selección del proceso de tratamiento del agua residual como el de los lodos residuales; debido a que éste último es un factor que influye notoriamente en el costo del m³ de agua tratada. Se estima que actualmente el manejo y la disposición de estos residuos asciende al 50% de los costos totales de tratamiento de purificación de efluentes residuales (Appels *et al.*, 2010).

3. TRATAMIENTO DE LODOS RESIDUALES

3.1 Características

El término "lodo residual" se aplica a todo subproducto generado durante el tratamiento de aguas residuales que no ha sido sometido a estabilización. Tomando en cuenta que, por lo general, los trenes de tratamiento están conformados por varias etapas, es posible contar con más de un tipo de lodo, cada uno con distintas características que están en función de las operaciones y procesos por los cuales fueron generados. La clasificación más general con la que se cuenta es derivada de los dos distintos tipos de procesos aplicables para el tratamiento de aguas residuales (Tchobanoglous *et al.*, 2003):

- I) Lodos generados en procesos fisicoquímicos.
 - a) Lodos de precipitación de las plantas de ablandamiento y del tratamiento de desechos industriales.
 - b) Lodos de hidróxido generados por la coagulación y sedimentación de las aguas y desechos industriales.
 - c) Lodos provenientes del tratamiento primario avanzado: sulfato de aluminio como coagulante.
- II) Lodos generados en procesos biológicos.
 - a) Lodos primarios: procedentes de la sedimentación primaria (partículas fácilmente sedimentables de naturaleza orgánica o inorgánica).
 - b) Lodos secundarios o biológicos: procedentes de la sedimentación secundaria, consisten fundamentalmente en biomasa en excedente, producto de la actividad biológica de los microorganismos que interviene en el proceso de tratamiento.
 - c) Lodos combinados: mezcla de lodos primarios y secundarios.

El lodo está compuesto en su mayoría por agua y de un bajo porcentaje de materia sólida. Los lodos activados contienen menos del 1% de materia sólida, el de los filtros percoladores de 0.5 % a 2% de sólidos, los lodos del tratamiento primario hasta del 5% y en los lodos biológicos combinados, las concentraciones de sólidos suspendidos pueden variar del 0.5% al 1.5% en base seca. La proporción de materia orgánica en los sólidos de los lodos está entre 70 y 80% (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

Se considera a los lodos como residuos peligrosos por su elevada concentración de microorganismos potencialmente patógenos a humanos y animales, además por las sustancias tóxicas que puedan contener. La alta carga microbiana es ocasionada por la presencia de microorganismos patógenos de los efluentes con materia fecal que se decanta en los sedimentadores primarios o se encuentran en la biomasa generada por el tratamiento biológico, ya que una gran cantidad de bacterias sobreviven mejor cuando están embebidas en una matriz, que cuando están en suspensión, por consiguiente su concentración en estos residuos supera a la del agua residual (Mocé-Llivina *et al.*, 2003).

Si estos residuos no se tratan adecuadamente, además de provocar un impacto ambiental adverso, representan una fuente de contaminación tanto para la superficie donde fueron vertidos como para el agua subterránea; debido a las infiltraciones de bacterias, que por sus dimensiones y su capacidad mínima de adsorción no logran ser retenidas por las partículas del suelo (Bonjoch y Blanch, 2009). Por otro lado, la materia orgánica y otros compuestos aportados al suelo por los lodos, pueden modificar la distribución y movilidad de metales pesados, lo que podría afectar principalmente la asimilabilidad de Cu y Zn, además de incrementar la biomasa microbiana del sistema o estimular el crecimiento de la microbiota autóctona por la incorporación de nuevas fuentes de carbono (Ros *et al.*, 2006)

Sin embargo, una vez tratados, los lodos aportan diversos beneficios a los suelos agrícolas, entre estas aportaciones se encuentran el alto porcentaje de humedad, la materia orgánica, el alto contenido de nutrimentos mayores, una concentración de micronutrientes adecuada, y una influencia positiva sobre la capacidad de intercambio catiónico en los terrenos de cultivo (Terreros-Mecalco *et al.*, 2009).

También se pueden emplear a los biosólidos como regeneradores de suelos contaminados, ya que las bacterias anaerobias juegan un papel importante en el ciclo del carbono, el nitrógeno y el azufre; además, sus diversos grupos poseen la habilidad de usar tipos diferentes de aceptores de electrones como el nitrato, el sulfato y carbonato durante la degradación de contaminantes orgánicos presentes en ecosistemas contaminados con hidrocarburos y en la biotransformación de metales pesados (Terreros-Mecalco *et al.*, 2009).

3.2 Proceso de tratamiento de lodos residuales

El diseño de un sistema de tratamiento para lodos de desecho busca reducir al mínimo el contenido de agua, materia orgánica, organismos patógenos, así como su potencial de atracción de vectores de enfermedades, para su disposición final o reúso.

Existen varios procesos convencionales que pueden integrar un tratamiento de lodos residuales (Tchobanoglous *et al.*, 2003), de los cuales se pueden destacar:

1. **Espesamiento.**

Este procedimiento se emplea para concentrar los sólidos de los lodos, favoreciendo etapas posteriores del tratamiento. Éste puede realizarse por gravedad, por flotación, por filtración o mediante centrifugación.

2. Estabilización/digestión.

La NOM-004-SEMARNAT-2002 define la estabilización como los procesos físicos químicos o biológicos a los que se someten los lodos para acondicionarlos para su aprovechamiento o disposición final y así evitar o reducir efectos contaminantes al medio ambiente.

Los métodos comúnmente empleados para estabilización, contemplan a:

- *La incineración.* Como ejemplo de procesos químicos de reducción de masa está restringida por su alto costo de inversión inicial y de operación.
- *La estabilización química.* Donde se añade cal para aumentar la temperatura y el pH a un valor de 12, lo que reduce el olor, destruye microorganismos causantes de enfermedades y facilita la deshidratación de los lodos, sin embargo, presenta la gran desventaja de aumentar el volumen y la masa de residuos.
- *Composteo.* Es un proceso en el que la materia orgánica sufre una degradación biológica de tipo aerobia en un medio con alto contenido de sólidos hasta alcanzar un producto final estable, libre de características desagradables. Presenta el inconveniente de incrementar la masa y el volumen por el material celulósico que se le debe incorporar.
- *La digestión aerobia.* Consiste en degradar la materia orgánica en presencia de oxígeno, lo cual requiere un largo periodo de aireación. En este proceso conforme se agota el sustrato, los microorganismos entran a una fase endógena, es decir empiezan a consumir su propio protoplasma para obtener la energía necesaria para las reacciones de mantenimiento celular. Puede llevarse a cabo en intervalos de temperatura mesofílico y termofílico. La digestión aerobia sin fuentes externas de calor se puede llevar a

cabo utilizando el calor desprendido durante la oxidación microbiana de la materia orgánica para el calentamiento del lodo. Presenta como ventajas, la reducción de los sólidos volátiles entre 40 y 50%, la generación de un producto final estable, libre de malos olores y que requiere una inversión inicial con costos relativamente bajos; sin embargo, los costos por energía asociados al suministro de oxígeno son muy elevados.

- *Digestión anaerobia*. Es un proceso de degradación que convierte materia orgánica en metano y dióxido de carbono en ausencia de oxígeno. Este proceso suele tener lugar en intervalos mesofílico (20-40 °C) y termofílico (50-60 °C) de temperatura. La vía anaerobia presenta las siguientes ventajas: se logra una reducción de la masa y volumen de lodo, además el biogás producido es un gas combustible que puede emplearse para la producción de energía eléctrica. Mientras que el inconveniente principal son los costos de inversión altos.

3. Acondicionamiento

Los lodos se acondicionan con la finalidad de mejorar sus características de deshidratación. Los métodos más empleados son el tratamiento térmico y la adición de reactivos químicos como el cloruro férrico, cal, alúmina y polímeros orgánicos.

4. Desinfección

Este proceso tiene como objetivo reducir la concentración de microorganismos patógenos, ya que los procesos de digestión aerobia y anaerobia (exceptuando los casos en que estas se realizan a intervalo termofílicos) no desinfectan el lodo. Los métodos considerados para la desinfección de los lodos líquidos son la pasteurización y el almacenamiento a largo plazo. En el primer caso, la temperatura se eleva hasta los 70 °C durante 30 minutos buscando la inactivación de bacterias patógenas y parásitos.

Mientras que en el almacenamiento a largo plazo el lodo digerido se almacena en lagunas excavadas durante 60 a 120 días a una temperatura de 20 y 4 °C respectivamente.

5. Deshidratación

Tiene como finalidad reducir el contenido de humedad de los lodos para facilitar el manejo y disminuir los costos de transporte, así como evitar la generación de malos olores, aumentar el poder calorífico antes de la incineración, o bien, reducir la producción de lixiviados en caso de que se desee disponer los lodos en relleno sanitario. Los procesos de deshidratación disponibles son los filtros de vacío, centrífugas, filtros prensa, filtros banda, lechos de secado y lagunas.

6. Secado térmico

Es una operación unitaria que involucra la reducción del contenido de agua por su vaporización al aire. Esta reducción se realiza mediante varios sistemas mecánicos tales como: secado instantáneo, secado por pulverización, secado rotativo y secado de pisos múltiples.

7. Reducción térmica

La reducción térmica del lodo incluye la conversión total o parcial de los sólidos orgánicos a productos finales oxidados, principalmente dióxido de carbono y agua. Generalmente se procesan lodos crudos deshidratados cuando las opciones de disposición final son limitadas. Esta reducción puede realizarse por incineración u oxidación por vía húmeda o por combustión completa o pirólisis.

3.3 Digestión Anaerobia

En los últimos años, los procesos anaerobios han incursionado en el tratamiento directo de efluentes residuales, sin embargo, su empleo para la estabilización de lodos producidos en la depuración aerobia de aguas residuales continua siendo el proceso más antiguo e importante así como el más aplicado a nivel mundial (EPA, 1995; Bonjoch y Blanch, 2009).

La digestión anaerobia como tratamiento de lodo antes de su disposición final ofrece varias ventajas sobre otros métodos de estabilización, como lo es la reducción y conversión de materia orgánica del orden del 25 al 45% de los sólidos totales a metano, dióxido de carbono y agua, mezcla mejor conocida bajo el nombre de biogás. Este es un gas combustible que puede usarse tanto para mantener la temperatura necesaria dentro de los digestores o bien utilizarse con el fin de producir energía eléctrica para satisfacer las distintos requerimientos de energía dentro de una planta de tratamiento, como puede ser la aireación en un sistema de lodos activados. Por consiguiente, el proceso se logra con bajas necesidades de insumos así como costos de operación y mantenimiento relativamente bajos; además pueden producirse biosólidos con características adecuadas para su reutilización como mejoradores de suelo, lo que facilita y abarata en gran medida su disposición final.

Este proceso puede llevarse a cabo tanto en intervalos mesofílicos (20-40 °C) como termofílicos (50-60 °C). En general, las condiciones mesofílicas son más utilizadas que la digestión termofílica, primordialmente por los menores requerimientos de energía, menor generación de lodos y la mayor estabilidad del proceso.

Se ha reportado en literatura que se obtiene mayor remoción de patógenos y parásitos cuando se aplica la digestión termofílica en lugar de la mesofílica y que es por consiguiente una técnica adecuada para la

producción de biosólidos de clase A (Rojas *et al.*, 2001). Existen además varios estudios sobre la digestión anaerobia en etapas, la cual se realiza con el propósito de asociar las ventajas individuales de la fase termofílica y de la fase mesofílica que reduce la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), y evita las desventajas de cada una de ellas (Rubio, 2004).

En el trabajo de Rubio (2004) se reporta que en la digestión anaerobia en dos fases termofílica/mesofílica, la primera etapa termofílica es la responsable de la destrucción de la mayor parte de coliformes fecales, *Salmonella* spp. y pérdida de viabilidad de huevos de helmintos, y que este arreglo cumple con los requerimientos para la producción de biosólidos de clase "A".

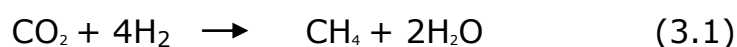
La materia orgánica en ausencia total de oxígeno molecular, nitratos y sulfatos, es convertida a metano y dióxido de carbono, por medio de una serie de procesos bioquímicos complejos a través de la combinación de la actividad de diferentes grupos de microorganismos, tanto anaerobios estrictos como facultativos.

La hidrólisis puede considerarse como la etapa limitante del proceso debido a que las bacterias son incapaces de alimentarse de material orgánico complejo, por lo que los biopolímeros (proteínas, carbohidratos y lípidos), son inicialmente hidrolizados por medio de enzimas extracelulares a compuestos más simples y asimilables por los microorganismos, como son azúcares, aminoácidos y ácidos grasos.

Posteriormente los azúcares y aminoácidos sirven de sustrato a organismos fermentadores, mientras que los ácidos grasos superiores son asimilados por oxidadores anaerobios. Los productos de estas reacciones son acetato, hidrógeno, biomasa y productos intermedios como el propionato y butirato. Estos últimos son degradados hasta acetato e hidrógeno por un grupo de bacterias llamadas OHPA (bacterias

acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno, por sus siglas en inglés), las cuales deben existir en relación sintrófica con las metanogénicas que utilizan hidrógeno. El acetato y el hidrógeno son finalmente los verdaderos sustratos de las bacterias metanogénicas, las cuales se dividen en dos grupos tróficos:

- Bacterias metanogénicas hidrogenofílicas, que utilizan el hidrógeno producido por las OHPA para reducir CO_2 en CH_4 .



- Bacterias metanogénicas acetoclásticas, que transforman el acetato en CH_4 . Esta transformación contribuye con el 70% de la producción total de metano en los digestores.



En resumen se pueden identificar seis procesos de conversión en la digestión anaerobia (*ver figura 3.1*):

1. Hidrólisis de biopolímeros (proteínas, carbohidratos y lípidos).
2. Fermentación de aminoácidos y lípidos.
3. Oxidación β -anaerobia de ácidos grasos de cadena larga y alcoholes.
4. Oxidación anaerobia de productos intermedios como ácidos volátiles (excepto acetato).
5. Conversión de acetato a metano.
6. Conversión de hidrógeno a metano.

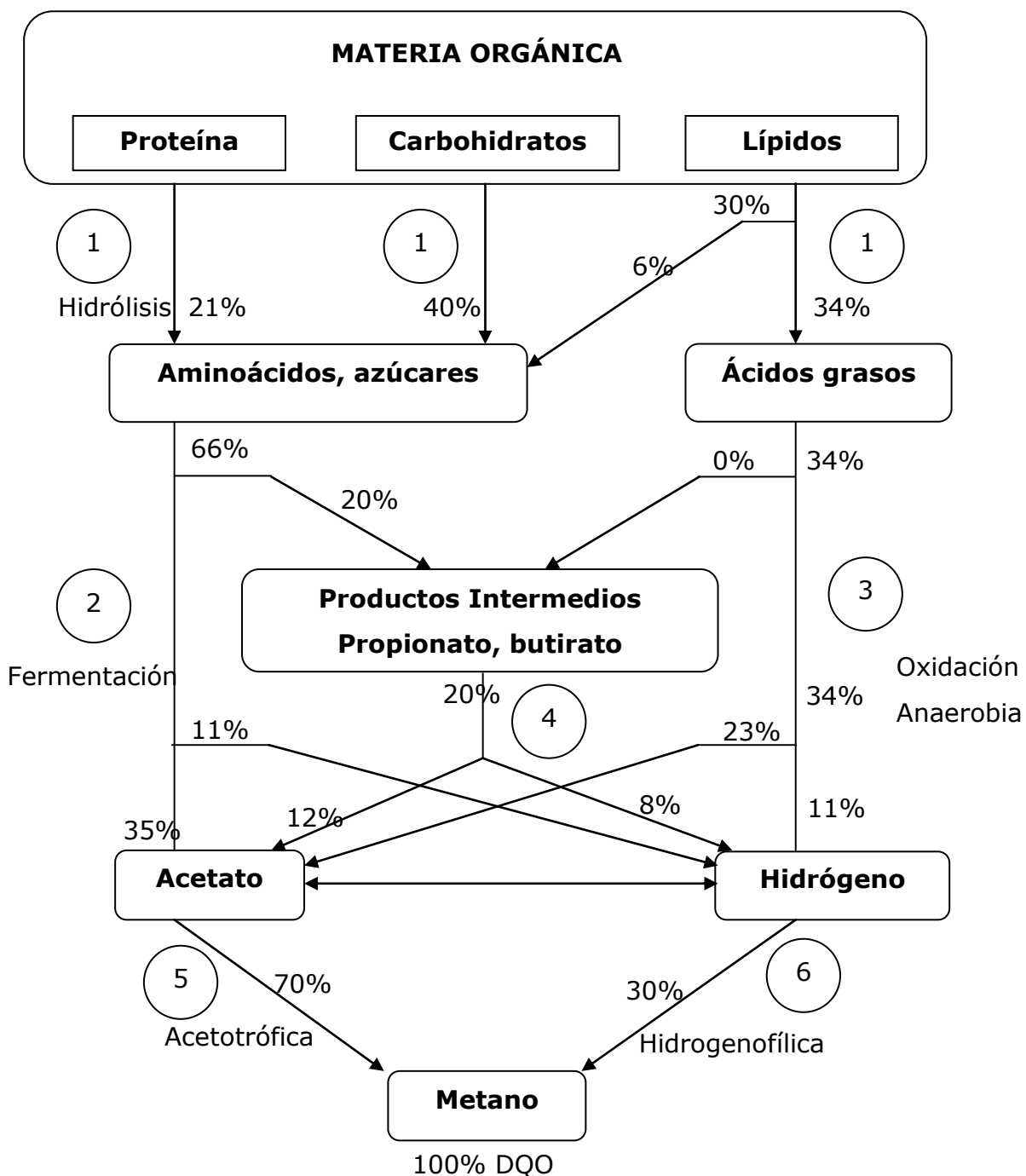


Figura 3.1 Diagrama del flujo de energía (DQO) en la digestión anaerobia de la materia orgánica particulada a metano (Gujer y Zehnder, 1983).

Al tratarse de un tratamiento biológico, resulta indispensable conocer los factores ambientales que influyen en los microorganismos involucrados para asegurar que presenten un buen crecimiento y por consiguiente una mayor eficiencia en la remoción de materia y en la producción de biogás. Entre los parámetros ambientales más importantes que inciden en la digestión anaerobia están, además de la ausencia de oxígeno, la temperatura, el pH, la alcalinidad y los nutrientes; el monitoreo de éstos es de gran utilidad para evitar fallas en el proceso, o dado el caso, tomar las medidas correctivas necesarias.

3.4 Pretratamiento de lodos

Se ha identificado a la hidrólisis como el paso limitante de la digestión anaerobia de compuestos no solubles (Ferrer *et al.*, 2008; Mottet *et al.*, 2009), es decir, si se incrementa la eficiencia de la misma se favorece consecuentemente el proceso de degradación anaerobia.

Después del tratamiento aerobio de las aguas residuales la mayor parte de la materia orgánica en lodos queda contenida en las células lo que reduce su disponibilidad para los microorganismos anaerobios, es por eso que es importante estudiar los diversos métodos de pretratamiento que permitan mejorar la solubilización o desintegración del lodo.

Los pretratamientos tienen como objetivo cambiar la estructura de los flóculos y mejorar la solubilidad de la materia orgánica contenida en los lodos (Ferrer *et al.*, 2008). De esta forma, los componentes disueltos pueden ser usados más fácil y rápidamente en los tratamientos biológicos posteriores o para la recuperación de componentes útiles como nitrógeno y fósforo. También tienen influencia en la reducción de patógenos así como en el mejoramiento de la deshidratación del lodo.

Existen varios trabajos, que han estudiado ampliamente estos procesos, entre ellos destaca el de Müller (2001), que reporta los siguientes métodos ya aplicados:

- Tratamientos térmicos.

Mientras los lípidos y carbohidratos en los lodos pueden ser fácilmente degradados, las proteínas están protegidas por la pared celular, la cual impide la hidrólisis enzimática. Por medio del incremento de la temperatura en un rango entre 60 a 80 °C se logra destruir las paredes celulares dejando expuestas las proteínas para la degradación biológica. Generalmente se aplica este tipo de tratamiento por medio de intercambiadores de calor o bien mediante la aplicación directa de vapor. Los problemas de olor asociados al proceso ha sido la principal causa que ha limitado su implementación a gran escala.

- Hidrólisis biológica con o sin adición de enzimas.

Otra forma de romper la pared celular es mediante el empleo de enzimas, que incluso logran la lisis en células Gram positivas, que se caracterizan por su resistente capa de recubrimiento. Por lo general, este proceso se recomienda acoplado a un método mecánico ya que así no se necesitan agregar enzimas sino que se pueden aprovechar las contenidas en el líquido intracelular para que éstas, mediante la autólisis, continúen con la degradación de los compuestos celulares.

- Tratamientos químicos.

Entre las distintas opciones de este tipo de tratamiento resalta, en especial, el empleo de ozono, debido a que no requiere adición de reactivos, solo energía eléctrica, y no incrementa la concentración de sales. Este método consiste en una oxidación parcial y una hidrólisis de la materia orgánica, consecuentemente la posterior oxidación

completa es favorecida ya que las moléculas grandes son fragmentadas generando compuestos más fácilmente degradables.

Otras variantes emplean ácidos o álcalis con el fin de que las células contenidas en el lodo puedan ser disueltas a temperatura ambiente. Pese los beneficios aportados por estas técnicas existen desventajas, por ejemplo, los problemas operacionales causados por la corrosión.

- Desintegración mecánica con ultrasonido, molinos y homogeneizadores.

Para la adecuada elección del método de desintegración se pueden comparar rendimientos entre sí mediante la energía específica, que se define como la energía mecánica que se aplica a cierta cantidad de lodo. En un estudio realizado se encontró que el empleo de molinos y centrífugas representan menor requerimiento energético que utilizando ultrasonido u homogeneizadores (Müller, 2000). Además del consumo energético se debe tomar en cuenta el desgaste de los equipos y el gasto en el mantenimiento de éstos, debido al daño ocasionado por las partículas fibrosas contenidas en el lodo.

- Congelamiento y derretimiento.

Se considera este método pese que en algunas regiones resultaría extremadamente costoso, existen otras donde sería económicamente factible implementarlo gracias a las condiciones climáticas apropiadas. Por medio de estos procesos se obtiene una forma más compacta de los lodos activados al modificar la estructura de los flóculos además de reducir el contenido de agua, lo cual brinda mejores características de deshidratación.

En todos los pretratamientos mencionados se logra un abatimiento de la carga microbiana, sin embargo es el proceso térmico el más eficaz a diferencia de los métodos de desintegración mecánica, donde la concentración de patógenos solo se reduce en 1 a 2 órdenes de magnitud.

3.5 Pretratamiento térmico

En lo que se refiere a tratamientos térmicos se han considerado dos rangos de temperatura: los procesos que se llevan a cabo por debajo de los 100 °C a presión atmosférica, y aquellos en los que la temperatura sobrepasa los 100 °C donde es necesario contar con un reactor presurizado (Prorot *et al.*, 2011). Aunque estos últimos reportan efectos más eficaces, resultan muy costosos y requieren mucho mantenimiento.

Wang y colaboradores en el año de 1997 estudiaron la efectividad de un pretratamiento térmico entre 60 y 120 °C, donde se llegó a la conclusión que el pretratamiento produce un aumento significativo de la producción de metano (30-52%). Además de no encontrar diferencias significativas entre las temperaturas de exposición a 60, 80 y 100 °C se demostró que el pretratamiento térmico a temperaturas moderadas promueve la hidrólisis y la destrucción de la materia orgánica contenida en los lodos así como que el rango de temperaturas debe mantenerse entre 60-100 °C para que pueda ser realizado a costos comparativamente más bajos.

Consecuentemente, Bougrier *et al.*, (2007) concluyen que el pretratamiento térmico mejora la eficiencia de la digestión anaerobia posterior y que el aumento en la producción de metano resultante (25% de aumento a 190 °C) es suficiente para cubrir la demanda de energía necesaria para precalentar el lodo.

De tal manera que si se toma en cuenta como factor prioritario el impacto en la producción de biogás, los tratamientos térmicos se pueden clasificar en dos grupos: procesos a temperaturas desde los 70 a los 121 °C donde se alcanza un incremento de producción de biogás del 20-30%, y los que se llevan a cabo a 160-180 °C que permiten un incremento de 40-100% de biocombustible obtenido por el proceso de digestión anaerobia (Bougrier *et al.*, 2008).

Tabla 3.1 Resultados de algunos trabajos recientemente publicados sobre los impactos de diferentes pretratamientos térmicos en lodos activados y digestión anaerobia.

Referencia	Tratamiento térmico	Resultados
Kim <i>et al.</i> , (2003)	121 °C, 30 minutos	Incremento del 30% en la reducción de sólidos volátiles (SV).
Valo <i>et al.</i> , (2004)	170 °C, 15 minutos	59% de incremento en la reducción de sólidos totales (ST), 92% de aumento en producción de biogás.
Ferrer <i>et al.</i> , (2008)	70 °C, 9-72 horas	Acoplado a digestión termofílica, efecto positivo en producción de gas. Mejor pretratamiento a 70 °C durante 9 horas, recomiendan estudiar tratamientos con menor tiempo de exposición.
Climent <i>et al.</i> , (2007)	70-134°C, 90 min-9 horas	Digestión termofílica subsecuente, incremento del 50% en producción de biogás a 70 °C (9 h). No hay efecto por tratamientos con temperaturas más altas.
Bougrier <i>et al.</i> , (2008)	135-190 °C	Incremento del 25% en la producción de metano con el tratamiento a 190 °C.
Jeong <i>et al.</i> , (2007)	120 °C, 30 min	Incremento del 25% en la producción de metano.
Phothilangka <i>et al.</i> , (2008)	Procesos de hidrólisis térmica-presurizada	Incremento del 80% en la producción de biogás.

Referencia	Tratamiento térmico	Resultados
Pérez-Elvira <i>et al.</i> , (2008)	170°C, 3 bar, 30 min	Incremento del 50% en la producción de metano.
Nges y Liu (2009)	25°, 50° y 70°C, 48 horas	Incremento del 11% en la producción de metano con el tratamiento a 50 °C.
Rubio y Noyola (2010)	Fase acidogénica a 55 °C, TRH de 2 a 3 días	Acoplada a fase metanogénica tanto termofílica como mesofílica se logró producción de biosólidos clase A.
Appels <i>et al.</i> , (2010)	70, 80, 90 °C, 15, 30 y 60 minutos para cada temperatura	Se logró en todos los casos solubilizar los compuestos orgánicos e inorgánicos, pero en caso de producción de biogás, el tratamiento más eficiente fue a 90 °C durante 60 min.

Como se puede observar en la Tabla 3.1, la mayoría de los estudios realizados se han enfocado en la remoción de la demanda química de oxígeno (DQO), reducción de masa de lodo, disminución en el tamaño de los flóculos y particularmente al incremento en la producción de biogás, entre éstos destacan: Barjenbruch y Kopplow, (2003); Valo *et al.*, (2004); Bougrier *et al.*, (2008); Ferrer *et al.*, (2008) y Appels *et al.*, (2010), todos concluyen que existen muchos beneficios asociados a la introducción de un pretratamiento térmico como paso previo a la digestión anaerobia. En contraste, son muy pocos los trabajos que han profundizado en la remoción de microorganismos patógenos o en los cambios en la actividad biológica que sufren las poblaciones bacterianas implicadas, de tal forma que se puede citar a: Martínez (2009); Lu *et al.* (2007); Maya *et al.* (2008), Lang y Smith (2008); Bonjoch y Blanch (2009); Rubio y Noyola

(2010) y Prorot *et al.* (2011). Los resultados más importantes de estos trabajos se presentan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Revisión bibliográfica de investigaciones que reportan remoción de parásitos y patógenos debido a tratamientos térmicos.

Referencia	Tratamiento térmico	Resultados
Noyola <i>et al.</i> , (2007)	60 a 70 °C 1 hora	100% inactivación de huevos de helminto.
Martínez (2009)	50,60 y 70 °C 30, 60 y 90 minutos.	No detección de <i>Salmonella spp.</i> desde 60°C y 1 hora, eliminación de coliformes fecales desde 70 °C 30 minutos, inactivación total de los huevos de helminto a partir de los 30 minutos a 70 °C.
Maya <i>et al.</i> , (2008)	26, 40, 50, 60, 70 y 80 °C; 3 horas de contacto.	Inactivaciones de huevos de helminto del 10, 16, 57, 82, 100 y 100% respectivamente.
Lang y Smith (2008)	55 °C por 120 minutos y 70 °C durante un minuto. **	Inactivación de <i>E.coli</i> y <i>Salmonella senftenberg</i> y <i>S.oranienburg</i> alrededor de los 20-60 minutos a 55 °C, Muerte instantánea de los microorganismo estudiados a 70 °C. Bacterias aisladas de lodo crudo presentan mayor resistencia en comparación a bacterias provenientes de cepas puras.

Referencia	Tratamiento térmico	Resultados
Bonjoch y Blanch (2009)**	60 °C por 90 minutos y 80 °C por 60 minutos.	Reducción en conteo de coliformes de 5 a 6 unidades log respectivamente, no llegan a eliminación total.
Prerot <i>et al.</i> , (2011)	50, 65, 80 y 95 °C durante 20 minutos	Estudian efectos del tratamiento térmico sobre las poblaciones microbianas, concluyen que se presenta la lisis celular a partir de los 50 °C y aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta los 95 °C.

**seguido de un baño de hielo hasta alcanzar los 0 °C.

Por lo tanto, un tratamiento térmico es conveniente para complementar el método de estabilización, aumentar la deshidratación del lodo, pero sobre todo, por la considerable reducción del número de microorganismos patógenos, beneficio sobresaliente que se podría aprovechar convenientemente si se acopla a un proceso convencional de digestión anaerobia mesofílica, como se propuso en el trabajo de Martínez, 2009, y así buscar la producción de biosólidos Clase "A" para cumplir con la normatividad mexicana vigente.

4. MICROORGANISMOS PATÓGENOS

El lodo proveniente de las plantas de tratamiento de aguas residuales es una fuente potencial de organismos infecciosos (*ver Tabla 4.1*), la diversidad y cantidad de microorganismos presentes en éste depende de varios factores, como el origen del agua residual, el tipo de tratamiento de la planta y otras condiciones ambientales. Por lo general, este desecho contiene bacterias entéricas patógenas, las cuales son excretadas con la materia fecal; el hombre es obviamente la fuente más común, pero dependiendo del entorno el agua residual puede contener también heces de mascotas o de animales de granja.

Los lodos residuales pueden variar en la calidad y cantidad de su fracción orgánica e inorgánica, estas variaciones suelen presentarse tanto en distintas ubicaciones geográficas, como en el mismo sitio pero en distinto tiempo; por consiguiente, la naturaleza y concentración de patógenos en éste dependerá de las condiciones generales de salud y el tamaño de la población servida. En una comunidad muy grande sólo una pequeña porción de ésta coincidirá de estar infectada al mismo tiempo, por lo tanto se detectarán niveles bajos de microbiota patógena, de forma contraria en una población con menor número de habitantes, las excreciones de esas pocas personas ya sea infectadas o no, representan la mayor parte de las aguas residuales y en tales circunstancias el lodo podría estar libre de microorganismos nocivos, o bien, tener altas concentraciones de los mismos (Carrington, 2001).

4.1 Clasificación

La contaminación fecal ha sido, y sigue siendo, el principal riesgo sanitario en los lodos, que supone la incorporación de microorganismos patógenos procedentes de enfermos y portadores, y la transmisión hídrica a la

población susceptible (*ver Tabla 4.2*). Por ello, el control sanitario de riesgos microbiológicos es tan importante y constituye una medida sanitaria básica para mantener un grado de salud adecuado en la población.

Los organismos perjudiciales presentes en los lodos residuales pueden ser clasificados en 4 amplias categorías:

- Virus.

Los virus llegan a los lodos a través de las heces presentes en las aguas residuales, producen enfermedades y han sido clasificados como los microorganismos más patógenos, para los humanos los más relevantes son los enterovirus (polio virus, echo, cossackie), rotavirus, reovirus, adenovirus, virus tipo Norwalk, Hepatitis A y E. Las enfermedades causadas por los enterovirus van de ligeras a severas o incluso mortales, se transmiten principalmente por vía fecal-oral y por las rutas respiratorias, son los responsables de una amplia variedad de enfermedades humanas incluyendo: meningitis, miocarditis, parálisis, infecciones respiratorias, algunos tipos de diabetes así como de ciertas infecciones en ojos y piel. Los reovirus y adenovirus pueden causar enfermedades respiratorias, gastroenteritis e infecciones en los ojos. Es cierto que la Hepatitis A y E presentan síntomas similares, pero el peligro de muerte es más alto con la hepatitis E que cuando se está infectado con el virus tipo A, además éste afecta entre el 15-25% de mujeres embarazadas (Romdhana *et al.*, 2009).

Es importante mencionar que los virus pueden sobrevivir en el agua durante periodos de tiempo relativamente elevados, aunque sin duda la supervivencia y la inactivación de los enterovirus es diferente en biosólidos debido a su agregación y adhesión a los sólidos (Sidhu y Toze, 2009).

- Bacterias

Este grupo comprende a la familia de las bacterias dañinas, ya que en las aguas residuales existe una amplia variedad de éstas. Una de las bacterias patógenas más comunes es el género de *Salmonella*, la especie más severa es *Salmonella typhi*, ésta produce una toxina que causa fiebre, náuseas, diarrea y puede ser fatal si no se trata adecuadamente. *Shigella*, un género menos común es encontrada en aguas contaminadas con desechos humanos, material vegetal, leche y productos lácteos; solo se han reconocido cuatro especies (*dysenteriae*, *flexneri*, *bodydii* y *sonnei*) la primera de éstas es causante de un tipo de gastroenteritis muy severa nombrada disentería bacilar, aunque en general todas son responsables de varias infecciones intestinales mejor conocidas como shigellosis.

Otras bacterias presentes en el lodo son: *Vibrio*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Leptospira*, *Yersinia*, *Escherichia coli* y *Campylobacter* (Sidhu y Toze, 2009). *Vibrio* consiste en por lo menos 28 especies, en donde *Vibrio cholerae* es conocida como la causante del cólera humano. Algunos clostridios producen serias enfermedades en humanos, el botulismo es producido por el *Clostridium botulinum*, el tetanos por *Clostridium tetani* y la gangrena gaseosa por *Clostridium perfringens*. La especie más representativa dentro del género de *Yersinia* es *Y. enterocolitica*, causante de síntomas como fiebre, diarrea, dolor abdominal intenso, vómito y dolor de cabeza, su incidencia es principalmente en niños y adultos mayores (Romdhana, et al., 2009). Dentro del género *Campylobacter* se conocen varias especies patógenas: *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, las dos primeras especies son de las principales causantes de la diarrea en humanos, mientras que la última es la mayor causa de esterilidad y abortos espontáneos en ganado vacuno y ovino.

- Parásitos

La familia de los parásitos incluye: protozoos, nemátodos y helmintos. Las especies más representativas de los protozoos son: *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, y *Cyclospora*. *Giardia lamblia* es un protozoo flagelado que se puede transmitir a los humanos a través de restos fecales, causa una gastroenteritis aguda denominada giardiasis; se caracteriza por la formación de quistes, que son estructuras de protección que permiten al parásito resistir condiciones de deshidratación y tratamientos químicos. Después de la ingestión los quistes germinan y se unen a las paredes de los intestinos causando los síntomas de la giardiasis: diarrea repentina, líquida y maloliente, calambres intestinales, flatulencia, náuseas, pérdida de peso y malestar. Los nemátodos más comunes son *Trichinella* y *Anisakis*, estos pueden invadir tejidos causando su inflamación y fibrosis. Los helmintos son detectados como huevos en los biosólidos y son capaces de producir larva e infectar a las personas, representan uno de los grupos de mayor resistencia a diversas condiciones ambientales, cuentan con una mayor tasa de sobrevivencia (años), comparada con la de otros patógenos como el caso de algunos virus y bacterias (meses) o incluso el de protozoos (semanas), una alta capacidad de ovoposición (huevos/día). A este respecto, por ejemplo, una hembra de *Ascaris lumbricoides* en estado adulto puede liberar hasta 27,000,000 de huevos durante los 10 a 24 meses de su vida, mientras que el representante de la clase platelminta, *Taenia solium* produce 700,000 en cada ovoposición, y una dosis mínima infectiva de 1 huevo (Maya *et al.*, 2008). Las enfermedades que producen son las helmintiasis, las cuales afectan del 25 al 33% de la población en los países en desarrollo, pero menos del 1.5% en los desarrollados.

- Hongos

La mayoría de los hongos son inocuos para los humanos, solamente unas 50 especies causan enfermedades y la incidencia total de infecciones fúngicas serias es baja, aunque ciertas infecciones fúngicas superficiales sean bastante comunes. Los géneros más comunes son *Actinomyces*, *Aspergillus* y *Candida*. Algunos hongos determinan reacciones inmunitarias que pueden resultar en reacciones alérgicas después de la exposición a los antígenos del hongo. Por ejemplo, *Aspergillus spp.* es un saprófito comúnmente encontrado en la naturaleza como un moho de la hojarasca, es un potente y muy común alérgeno, que causa asma y otras reacciones de hipersensibilidad. Las levaduras son hongos unicelulares, *Candida albicans* pertenece a este grupo, puede causar infecciones bucales, vaginales o de pulmones.

Generalmente los virus patógenos y las bacterias viven de 1 a 3 meses mientras los protozoos (quistes) y huevos de helminto pueden vivir hasta un año en agua residual y posiblemente mucho más en los lodos, (Sidhu y Toze, 2009).

Tabla 4.1 Microorganismo patógenos que pueden ser encontrados en los lodos residuales (Carrington, 2001).

<u>Bacteria</u>	<u>Protozoos</u>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Sarcocystis</i>
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Leptospira</i> spp.	<u>Helmintos</u>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Ancylostoma duodenale</i>
<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Ascaris lumbricoides</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Diphyllobothrium latum</i>
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Echinococcus granulosus</i>
<i>Shigella</i> spp.	<i>Taenia saginata</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Taenia solium</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Toxocara canis</i>
<i>Vibrio cholera</i>	<i>Toxocara cati</i>
<i>Yersinia enterolítica</i>	<i>Trichuris trichura</i>
<u>Virus</u>	<u>Hongos</u>
<i>Adenovirus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Aspergillus</i> spp.
<i>Calcivirus</i>	<i>Epidermophyton</i> spp.
<i>Coronavirus</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Coxsackievirus</i>	<i>Phialophora richardsii</i>
<i>Echovirus</i>	<i>Trichophton</i> spp.
<i>Hepatitis A-virus</i>	<u>Levaduras</u>
<i>Parvovirus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Ploiovirus</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>Reovirus</i>	<i>Candida krusi</i>
<i>Rotavirus</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Virus influenza</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Virus tipo Norwalk</i>	<i>Trichosporon</i>

Tabla 4.2 Concentración típica de microorganismos en el lodo crudo (Carrington *et al.*, 2001).

Microorganismo	Género	Concentración
Bacterias	<i>Escherichia coli</i>	$10^6/g$
	<i>Salmonella</i>	$10^2-10^3/g$
Virus	<i>Enterobacter</i>	$10^2-10^4/g$
Protozoos	<i>Giardia</i>	$10^2-10^3/g$
Helmintos	<i>Ascaris</i>	$10^2-10^3/g$
	<i>Toxocara</i>	$10-10^2/g$
	<i>Taenia</i>	$5/g$

4.2 Características de crecimiento y supervivencia

Todas las células contienen determinados tipos de componentes químicos complejos como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y polisacáridos los cuales están contenidos dentro de la membrana citoplasmática, a través de la cuál entran los nutrientes y otras sustancias vitales. Si se rompe la membrana celular, la integridad de la célula se destruye, produciéndose la muerte (lisis) y liberándose al medio los componentes que la integran.

Virus, bacterias, parásitos y hongos muestran resistencia a factores ambientales como a la temperatura, humedad, así como a agentes físicos y químicos. El parámetro conocido como potencial de hidrógeno (pH) ejerce una gran influencia sobre las reacciones bioquímicas de los organismos, la mayoría de las bacterias son estables en el intervalo $1.5 \leq \text{pH} \leq 8.5$; sin embargo, algunos géneros son más sensibles como *Salmonella* que se destruye si el pH está por debajo de 4.0. Muchos virus son resistentes a condiciones de extrema acidez, como Hepatitis A que es estable en el intervalo de $1 \leq \text{pH} \leq 3.75$. La mayoría de los hongos son ácido-tolerantes, a excepción de unos pocos que pueden crecer en

condiciones de pH neutras o alcalinas, como es el caso de *Aspergillus* (Romdhana *et al.*, 2009).

La temperatura es un parámetro que se encuentra íntimamente ligado a la eliminación de microorganismos patógenos y parásitos. Afecta directamente al equilibrio de la vida de los microorganismos incrementando o disminuyendo el ritmo de las reacciones bioquímicas y enzimáticas de los procesos celulares y por tanto su crecimiento. La resistencia de los microorganismos a la temperatura cambia de acuerdo a la actividad del agua en el lodo, la presencia de un soluto disminuye la actividad del agua y esto incrementa la resistencia al calentamiento de la microbiota.

Diferentes especies y sus subespecies muestran distintas sensibilidades a elevadas temperaturas y a sus tiempos de exposición: Hepatitis A y Norovirus mantienen su integridad y capacidad de infectar aún después de los 60 min de calentamiento a 60°C, es decir, no son inactivados por los tratamientos de pasteurización. Adenovirus es más sensible y es inactivado después de someterlo a calentamiento 10 minutos a 56°C. Para varias bacterias temperaturas de 44-48 °C están reportadas como el límite de crecimiento, en el caso de *Salmonella* se recomienda someterla 30 minutos a 50 °C para reducir su población, *Campylobacter* ya no es detectado después de ser expuesto 10 min a 70 °C, *Yerseniae* representa un grupo de menor resistencia ya que es destruido después de 1 a 3 min a 60 °C. El empleo de temperaturas menores permite la presencia de algunas bacterias e incluso el recrecimiento de otras que se creían eliminadas, como es el caso de *Vibrio* que puede tolerar 15 min a 80 °C. Con respecto a los parásitos estos pueden perder viabilidad en el lodo al someterlos a temperaturas moderadas (55 °C) por lo menos 10 minutos. Finalmente, la mayoría de los hongos pueden ser destruidos hasta los 88

°C durante 30-60 minutos, por ejemplo, *Aspergillus* es inactivado a 60 °C después de 60 minutos (Romdhana *et al.*, 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, los patógenos también son resistentes a varios agentes químicos, incluyendo ácidos y solventes alcalinos, tal es el caso de Hepatitis A que muestra resistencia a varias sustancias, entre ellas cloroformo, freón, ácido percloroacético o cloraminas mientras que los rotavirus son resistentes al éter, cloroformo y a los detergentes no iónicos como el desoxicolato.

4.3 Presencia en los distintos tipos de lodo

Por medio de la consulta de literatura científica se ha recopilado información sobre la concentración de algunos patógenos característicos de los lodos residuales, los datos son mostrados en la Tabla 4.3 y son derivados del análisis de lodo proveniente de distintas plantas de tratamiento y de diferentes puntos del proceso para brindar un panorama general de la diversidad y del comportamiento de los microorganismos según el tren de tratamiento. Los resultados fueron obtenidos por medio de distintos métodos de análisis de conteo de microorganismos: conteo microscópico directo, unidades formadoras de colonias (UFC) en medio sólido, y la técnica de número más probable (NMP) como determinación estadística.

Tabla 4.3 Recopilación de algunas concentraciones de patógenos en distintas etapas del tratamiento de lodos residuales (Romdhana, *et al.*, 2009).

Patógeno	Nombre de la especie	Tipo de lodo	Concentración	Referencia
Virus	<i>Enterovirus</i>	Crudo	4.8x10 ² - 2.1 x 10 ³ UFC/10g	Guzmán <i>et al.</i> , (2007)
			850-43x10 ³ UFC/l	Bosch <i>et al.</i> , (1986)
			1320 UFC/l	Williams y Hurts (1988)
		Digerido	1.1x10 ¹ -1x10 ² UFC/10g	Guzmán <i>et al.</i> , (2007)
	Composta	<8.3UFC/10g		
	<i>Rotavirus</i>	Primario	30-26 x 10 ⁴ UFC/l	Bosch <i>et al.</i> , (1986)
<i>Adenovirus</i>	Primario	5800-32500 UFC/l	Williams y Hurts (1988)	
Bacterias	<i>Coliformes</i>	Crudo	1.85x10 ⁶ NMP/gST	Martínez (2009)
			8.5log UFC/g	Bonjoch y Blanch (2009)
		Digerido	1.7x10 ⁵ NMP/gST	Martínez (2009)
			7.42 log UFC/g	Bonjoch y Blanch(2009)
	<i>Salmonella</i>	Crudo	8 x 10 ³ UFC/100ml	EPA (1979)
			10 ² - 10 ⁴ NMP/100 ml	Tchobanoglous <i>et al.</i> , (2003)
			3.45x10 ⁴ NMP/gST	Martínez (2009)
			10 ³ gen/ml	Wéry <i>et al.</i> , (2008)
		Digerido	< 3-62 UFC/100ml	EPA (1979)
			5.3 x 10 ³ NMP/gST	Martínez (2009)
Deshidratado	5x10 ⁴ gen/ml	Wéry <i>et al.</i> , (2008)		

	Nombre de la especie	Tipo de lodo	Concentración	Referencia
Bacterias	<i>Escherichia coli</i>	Crudo	357 275 -1 032 625 UFC/g	Sahlström <i>et al.</i> , (2004)
			10^7 - 10^8 gen/ml	Wéry <i>et al.</i> , (2008)
		Digerido	2- 8 435 UFC/g	Sahlström <i>et al.</i> , (2004)
		Deshidratado	4-6log NMP/g	Gantzer <i>et al.</i> , (2001)
			10^7 - 5×10^8 gen/ml	Wéry <i>et al.</i> , (2008)
		Alcalinizado	<1-2.9 logNMP/g	Gantzer <i>et al.</i> , (2001)
	<i>Clostridium</i>	Digerido	2×10^7 UFC/100mL	EPA (1979)
			60.667-106.571 UFC/g	Sahlström <i>et al.</i> , (2004)
		Centrifugado	37.667-438.450 UFC/g	
	Deshidratado	10^3 - 10^6 gen/ml	Wéry <i>et al.</i> , (2008)	
		<i>Mycobacterium</i>	Crudo	10^7 UFC/100mL
	Digerido		10^6 UFC/100mL	
	<i>Campylobacter jejuni</i>	Deshidratado	10^6 gen/ml	Wéry <i>et al.</i> , (2008)
Centrifugado		5-10 gen/ml		

4.4 Indicadores

El riesgo de contaminación, tanto a nivel humano como ambiental, hace necesario el control de la presencia de microorganismos en los residuos de los tratamientos de aguas negras. Determinar el tipo de microorganismos presentes y su concentración proporciona herramientas indispensables para conocer la calidad del agua y para la toma de decisiones en relación al control de vertidos, tratamientos y conservación de ecosistemas.

Existe un consenso general sobre la dificultad de determinar la presencia de todos los organismos patógenos en matrices tan complejas como lo son los lodos y los biosólidos. Dicha determinación implica varios días de análisis, costos elevados y laboratorios especializados. La cuantificación demanda mucho tiempo y se vuelve costosa cuando especies nocivas están presentes en pequeñas cantidades o bien son difíciles de aislar. Frente a estas dificultades y a la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable, se ha planteado la necesidad de trabajar con organismos indicadores.

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos (concentración y reacción frente a factores ambientales y barreras artificiales), pero son más rápidos, económicos y fáciles de identificar. Una vez que se ha evidenciado la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en la misma concentración y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección es similar a la del indicador. Por consiguiente resultan de gran utilidad para demostrar la eficacia de los procesos de desinfección.

Para que un microorganismo pueda ser considerado como parte de este grupo debe reunir las siguientes características:

- Estar presente siempre que exista contaminación fecal.
- Ser constituyente normal de la flora intestinal de individuos sanos.
- Estar presente de forma exclusiva en las heces de animales homeotérmicos.
- Presentarse en número elevado, facilitando su aislamiento e identificación.
- Incapaz de reproducirse afuera del huésped.
- Tener una estrecha relación con el resto de los microorganismos patógenos.
- Su tiempo de supervivencia debe ser igual o un poco superior al de las bacterias patógenas.
- Fácil detección y cuantificación, con poca probabilidad de ocasionar falsos positivos.
- No debe ser patógeno.

No existe ningún microorganismo que reúna todos los criterios de un indicador ideal y apenas pocos grupos satisfacen algunos de estos requisitos, por ejemplo: los coliformes fecales (CF), coliformes totales (CT) y estreptococos fecales (EF).

Los microorganismos indicadores contemplados por la Norma Oficial que regula el manejo y la disposición final de los lodos de desecho provenientes de plantas de tratamiento municipales (NOM-004-SEMARNAT-2002) son:

- Coliformes fecales
- *Salmonella* spp.

A continuación se profundizará en cada uno de estos grupos.

4.5 Coliformes fecales

El grupo coliforme abarca los géneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia*. Cuatro de estos géneros (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia*) se encuentran en grandes cantidades en el ambiente (fuentes de agua, vegetación y suelos) no están asociados necesariamente con la contaminación fecal y no plantean ni representan necesariamente un riesgo evidente para la salud. Se definen en bacteriología como bacterias en forma de varilla, no esporuladas, Gram negativas, aeróbicas facultativas que fermentan la lactosa con producción de gas cuando se incuban a 35 °C durante 48 horas (Madigan *et al.*, 2004).

El grupo de coliformes fecales es adecuado como indicador de contaminación bacteriana ya que estos:

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

Los coliformes fecales y *Escherichia coli* en particular, se han seleccionado como indicadores de contaminación fecal debido a su relación con el grupo tifoide-paratifoide y a su alta concentración en diferentes tipos de muestras (Auer y Niehaust, 1993). Son un subgrupo de los coliformes totales, se denominan termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas más elevadas y ser capaces de fermentar la lactosa a 44.5°C, se encuentran casi exclusivamente en las heces de animales de

sangre caliente, por lo que se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal que otras bacterias.

Uno de los aspectos negativos del uso de este grupo como indicador es que poseen la capacidad de reproducción fuera del intestino de los animales homeotérmicos siendo favorecida por la existencia de condiciones adecuadas de materia orgánica, pH, humedad, etc., (Madigan *et al.*, 1997).

Aproximadamente el 95% del grupo de los coliformes presentes en heces fecales, están formados por *E. coli* y ciertas especies de *Klebsiella*, seguido en menor grado por especies de *Enterobacter* y *Citrobacter*.

4.5.1 *Escherichia coli*

Las bacterias de la especie *Escherichia coli* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos cortos, Gram negativos, quimioheterótrofos, catalasa positiva, oxidasa negativa, anaerobios facultativos. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar. Produce ácido y gas a partir de la glucosa, lactosa, fructuosa, galactosa, maltosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y manitol. Puede fermentar o no, según los casos, la sacarosa, rafinosa, salicina, esculina, ducitol y glicerina. Es variable la fermentación de la sacarosa y la salicina. Raramente fermenta la pectina y el adonitol. Nunca fermenta la dextrina, almidón, glucógeno e inositol.

Las cepas de *E. coli* se pueden diferenciar una de otras teniendo en cuenta como base a sus antígenos somáticos **O**, flagelares **H** y capsulares **K**. Han sido identificados por lo menos un total de 173 antígenos **O**, 53 antígenos **H**, y 72 antígenos **K**. La mayoría de las cepas son comensales inofensivos; sin embargo, algunas son patógenas y provocan enfermedades tanto en animales como en humanos.

Algunos serotipos son más relevantes que otros, como por ejemplo *E.coli* O157:H7, que es conocido desde 1982 por ser una cepa nociva para los humanos, causante de importantes infecciones y además con mayor tolerancia a algunas condiciones de crecimiento (Smigic *et al.*, 2009).

Hábitat

La mayoría de las cepas pertenecientes a la especie *E.coli*, forman parte de la microflora normal del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, encontrándose habitualmente en las heces. *E. coli* representa el uno por ciento o menos de las bacterias presentes en el colon; sin embargo, la bacteria es la especie anaerobia facultativa más numerosa en el tracto gastrointestinal sano de los animales domésticos (Madigan *et al.*, 2004).

Características de crecimiento y supervivencia

Algunas cepas de *E. coli* patógeno son capaces de crecer a temperaturas tan bajas como 7 °C y tan altas como 46 °C (Van Derlinden *et al.*, 2011), siendo la escala de crecimiento óptimo 35-40 °C. Sin embargo, *E. coli* O157:H7 tiene un intervalo de crecimiento ligeramente más limitado, con una temperatura mínima de crecimiento de 8 °C, una máxima de aproximadamente 44-45 °C y una óptima de 37 °C. Distintos estudios de inactivación térmica han revelado que *E. coli* O157:H7 es más sensible al calor que las cepas típicas de *Salmonella* spp. Por esta razón, los tratamientos térmicos que son suficientes para destruir *Salmonella* también deberían provocar la muerte de *E. coli* O157:H7.

El efecto del pH sobre el crecimiento depende del tipo de ácido presente, es capaz de crecer a un pH de 4.5 ajustado con ácido clorhídrico, pero no en un medio cuyo pH ha sido ajustado con ácido láctico.

Se ha determinado que puede crecer en un 6% de cloruro de sodio y toleran mejor el cloruro sódico y nitrito sódico que las cepas típicas de *Salmonella* spp, es capaz de crecer aunque lentamente en un caldo que contenga 6.5% de cloruro de sodio pero no al 8.5%.

Patogenicidad

Algunas cepas de *E. coli* son patógenas y pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y enfermedad de los edemas) o extraintestinales (infecciones del tracto urinario, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis, e infecciones pulmonares y de heridas). *E. coli* provoca en seres humanos del orden de 630 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775,000 muertes al año, afectando fundamentalmente a la población infantil del tercer mundo. La dosis infectiva es muy baja, esto es, de menos de pocos cientos de células, el periodo de incubación varía con la cepa, pero como término medio, los síntomas suelen aparecer entre 8 y 72 horas.

Los *E. coli* patógenos se han englobado en diferentes grupos o categorías: *E. coli* enteropatógenos (ECEP), *E. coli* enterotoxigénicos (ECET), *E. coli* enteroinvasivos (ECEI), *E. coli* verotoxigénicos (ECVT) o enterohemorrágicos (ECEH), *E. coli* enteroagregativos (ECEA), *E. coli* con adherencia difusa (ECAD), *E. coli* uropatógenos y *E. coli* bacteriémicos o septicémicos. Las cepas de estos grupos presentan mecanismos de patogénesis específicos, serotipos distintos y producen infecciones y síndromes diferentes.

Aunque *Escherichia coli* es un microorganismo habitual del intestino humano y otros animales, las cepas que producen diarrea, exceptuando las enterohemorrágicas, son de origen humano. Las cepas citopatógenas penetran en el intestino e invaden las células epiteliales del colon donde se

multiplican y producen su muerte. Esto da lugar a la producción de ulceraciones cuya consecuencia es una diarrea sanguinolenta.

Dentro de los *Escherichia coli* enterovirulentos, las cepas enteroinvasivas, además de poseer las propiedades comunes de los otros tipos patógenos tienen por otra parte ciertas propiedades atípicas que se relacionan con *Shigella* (inmovilidad, similitud bioquímica, algunas cepas no producen gas de la glucosa ni de otros azúcares, su fermentación lenta de la lactosa). Los síntomas que ocasionan las cepas *E. coli* enteroinvasivas aparecen entre las 8 y 24 horas posteriores a su ingestión, se manifiestan con escalofríos, malestar, dolor de cabeza, fiebre, dolores abdominales y diarrea profusa sanguinolenta. La enfermedad dura días y aun semanas.

Las cepas de *E. coli* enterotoxigénicas son aquellas que elaboran una toxina termolábil y/o termoestable. La primera se inactiva a una temperatura de 60 °C aplicada durante 30 minutos, y la segunda resiste a más de 100 °C aplicados durante 30 minutos. El microorganismo actúa colonizando el epitelio del intestino delgado, donde elabora las toxinas. La toxina termolábil rompe la función celular del epitelio intestinal produciendo secreción de agua y electrolitos que vierten en la luz intestinal produciendo diarrea acuosa profusa, los síntomas se asemejan a los del cólera, e inician entre las 8 y las 44 horas que siguen a la ingestión del producto contaminado con el microorganismo.

4.6 *Salmonella* spp.

Salmonella y *Escherichia* están bastante próximos, ambos géneros tienen un 50% de homología en su ADN, sin embargo y en contraste con la mayoría de microorganismos del género *Escherichia*, los miembros del género *Salmonella* son usualmente patógenos, bien para humanos o para otros animales de sangre caliente (Madigan *et al.*, 2004).

Género bacteriano, perteneciente a la familia enterobacteriaceae. Son bacterias de forma bacilar, no formadores de esporas, habitualmente móviles mediante flagelos peritricos, aunque *S. pullorum*, *S. gallinarum* y algunas mutantes de otras serovariedades son inmóviles. Gram negativos, aerobios-anaerobios facultativos, fermentan la glucosa con producción de gas, no fermentan la lactosa, reducen nitratos a nitritos, suelen ser catalasa positivas y oxidasa negativos. Forman colonias típicas sobre medios de cultivo sólidos y poseen características bioquímicas y serológicas definidas.

La mayoría de las cepas, salvo *S. typhi*, son aerógenas, utilizan citrato como única fuente de carbono, descarboxilan la lisina, la arginina y la ornitina y producen sulfuro de hidrógeno. La reacción con rojo de metilo es positiva, la prueba de Voges-Proskauer es negativa y la prueba de Indol es negativa. La fenilalanina no es desaminada, la urea no es hidrolizada, la gelatina no es licuada rápidamente en los medios nutritivos y no son producidas ni DNAasa ni lipasa (Madigan *et al.*, 2004).

Salmonella se subdivide en siete especies que se diferencian entre sí mediante la hibridación DNA/DNA o por las propiedades bioquímicas:

- I. *S. entérica*
- II. *S. salamae*
- III. a) *S. arizonae*, b) *S. diarizonae*
- IV. *S. houtenae*
- V. *S. bongori*
- VI. *S. indica*

A su vez, cada especie se divide en serovariedades caracterizadas inmunológicamente sobre la base de tres antígenos superficiales, el antígeno **O** de pared celular (somático); el **H**, o flagelar y el **Vi** (capa

externa polisacárida) que se encuentra en las cepas causantes de la fiebre tifoidea (Madigan *et al.*, 2004).

Aunque la familia de *Salmonella* incluye más de 2300 serotipos, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* son las identificadas más comúnmente en casos de salmonelosis (Mukhopadhyay y Ramaswamy, 2011).

Hábitat

La mayoría de los representantes de la familia se encuentran en el tracto intestinal del hombre y de los animales, bien como patógenos, bien como comensales (Madigan *et al.*, 2004).

En el ambiente las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* spp., están presentes en los afluentes de los ríos contaminados y heces secas de los animales, en el lodo residual, con el consiguiente riesgo de diseminación. En grupos de animales destinados al consumo humano pueden permanecer viables durante varios meses y pueden ser diseminados por el polvo, originando una contaminación ambiental acumulativa.

Características de crecimiento y supervivencia

El género *Salmonella* está integrado por microorganismos resistentes que se adaptan fácilmente a las condiciones extremas del medio (Spector y Kenyon, 2011). En la Tabla 4.4 se presentan las condiciones de temperatura y pH típicas para este género.

Tabla 4.4 Condiciones límites para el crecimiento de *Salmonella*.

Condiciones	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura °C	5.2	35 - 43	46.2
pH	3.8	7 - 7.5	9.5

La evidencia más reciente indica que la exposición prolongada de cepas mesófilas a condiciones de estrés térmico se traduce en mutantes de *Salmonella typhimurium* capaces de crecer a 54°C; aunque aún no ha sido esclarecido el mecanismo de este fenómeno, los hallazgos preliminares indican que dos mutaciones independientes permiten a *S. typhimurium* crecer activamente a 48 °C y a 54°C.

La capacidad de adaptación fisiológica de *Salmonella* spp. se demuestra por su capacidad de multiplicarse por debajo de valores de pH de 3.8 y sobre valores de pH de 9.5 (Spector y Kenyon, 2011). Los efectos bacteristáticos o antibacterianos de los medios ácidos dependen del acidulante.

La exposición breve de *Salmonella typhimurium* a medios ligeramente ácidos de pH 5.5 a 6 seguida de la exposición de las células adaptadas al pH de valor ≤ 4.5 desencadena una compleja respuesta de ácido-tolerancia que potencia la supervivencia del microorganismo en medios sumamente ácidos (pH 3.0 a 4.0).

El estrés ácido también puede desencadenar resistencia bacteriana frente a otras condiciones ambientales adversas. El crecimiento de *S. typhimurium* a pH 5.8 originó una resistencia térmica aumentada a 50°C, una tolerancia aumentada al estrés osmótico elevado (2.5 M de NaCl) atribuida a la síntesis inducida de proteínas OmpC, una mayor hidrofobicidad de la superficie, y una resistencia aumentada al sistema

lactoperoxidasa bacteriano y a agentes activos de superficie como el cristal violeta (Leyer y Johnson, 1993).

Patogenicidad

Algunas serovariedades (por ejemplo: *S. typhi*, *S. paratyphi A.*, *S. paratyphi C.* y *S. sendai*) están adaptadas al hombre como hospedador y generalmente causan síndrome septicémico-tifoideo en los seres humanos. Las demás serovariedades, sin embargo, causan gastroenteritis en el hombre. La fiebre tifoidea es muy común en algunos países en desarrollo, mientras que es rara en los países desarrollados en los que la gastroenteritis causada por *Salmonella* se encuentra entre las causas principales de morbilidad por consumo de alimentos. Las serovariedades implicadas varían de acuerdo con la zona geográfica, pero frecuentemente incluyen a *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. agona*, *S. newport*, *S. infantis*, *S. panama*, *S. saint paul* y *S. welteveden*.

La enterotoxina causante de diarrea figura de modo predominante como un factor de virulencia de *Salmonella* debido a su capacidad para producir síntomas clínicos manifiestos en los casos humanos de salmonelosis.

En contraposición a varios patógenos bacterianos como *Yersinia*, *Shigella*, y cepas enteroinvasoras de *Escherichia coli*, que se multiplican dentro del citoplasma de las células hospedadoras, las *Salmonellas* están encerradas en vacuolas endocitóticas donde empieza la replicación bacteriana en un plazo de horas después de la interiorización.

La población susceptible está conformada por los bebés y los niños de corta edad, las personas ancianas, las personas desnutridas y las personas con resistencia debido a otras infecciones o a enfermedades crónicas, en general individuos con el sistema inmunológico débil. Investigaciones detalladas de brotes transmitidos por alimentos han indicado que la

ingestión de sólo unas cuantas células de *Salmonella* puede resultar infecciosa; datos científicos indican que de 1 a 10 células pueden constituir una dosis infectiva humana (Kapperud *et al.*, 1990).

4.7 Mutualismo y simbiosis

Los microorganismos que habitan en un ecosistema presentan varios tipos de asociaciones e interacciones entre las especies. A veces se asocian diferentes especies bacterianas, o bien bacterias y otra clase de organismos, como levaduras, mohos, algas, protozoos e incluso plantas, u hongos con plantas como en el caso de las micorrizas. En muchos casos, el crecimiento y la reproducción son más vigorosos en asociaciones favorables de dos tipos de organismos que en cultivos de una sola especie. Un claro ejemplo de sistemas microbiológicos mixtos son los lodos residuales. Si se pretende comprender y optimizar los procesos a los que se les somete, es de suma importancia profundizar en los distintos tipos de interacciones que pueden estar implicados; es por eso que este apartado resume algunas de ellas.

El mutualismo es la vida en común de dos o más organismos asociados en beneficio mutuo pero no implica necesariamente el contacto físico. Simbiosis es una asociación específica entre dos tipos de organismos que están en contacto físico. Generalmente, el de menor tamaño (simbionte) vive dentro o está adherido a la superficie del mayor (hospedador). La simbiosis no siempre implica mutualismo. El hospedador es siempre un organismo eucariótico y puede mantener al simbionte (eubacteria, actinomiceto, hongo o alga) intracelular o albergarlo en el interior de cavidades u órganos. Por otra parte, la sintrofia es la acción cooperante de dos microorganismos con metabolismos complementarios (un tipo de

mutualismo) alcanzando un efecto que no es logrado separadamente por ninguno de ellos.

Un organismo puede ser incapaz de crecer en presencia de cierto substrato, pero si coincide con un microorganismo capaz de degradarlo y producir moléculas útiles para el primero, se observa su crecimiento. Esta asociación recibe el nombre de comensalismo o vida en común de dos especies con beneficio para una de ellas y sin daño ni provecho para la otra, por ejemplo cuando los microbios colonizan la superficie externa de una planta obteniendo energía de la metabolización de exudados producidos por el hospedador. Otro ejemplo es la influencia favorable de un microbio facultativo sobre el desarrollo de uno anaerobio, el primero reduce la tensión de oxígeno y crea un ambiente adecuado para que prospere el segundo (Carrillo, 2003).

Las comunidades microbianas están caracterizadas por siete diferentes mecanismos biológicos:

- a) Provisión de nutrientes específicos por los diferentes miembros de la comunidad.
- b) Moderación de la inhibición del crecimiento.
- c) Interacciones que causan la alteración de los parámetros de crecimiento de las poblaciones individuales, produciendo un desempeño de la comunidad más eficiente y/o competitivo.
- d) Actividad metabólica combinada no expresada por las poblaciones individuales aisladas.
- e) Cometabolismo.
- f) Reacciones de transferencia de hidrógeno.
- g) Interacción entre varias especies dominantes.

5. MODELOS MICROBIOLÓGICOS PREDICTIVOS

5.1 Microbiología predictiva

El concepto de microbiología predictiva es empleado tradicionalmente en la industria alimentaria, definiéndose como el conocimiento detallado de las respuestas microbianas a las condiciones ambientales que permite una evaluación objetiva del efecto de las operaciones de procesado y almacenamiento en la seguridad de los alimentos. Este incluye la acumulación de conocimientos sobre el comportamiento microbiano en los productos y su derivación en modelos matemáticos.

La microbiología predictiva combina el conocimiento de las respuestas del crecimiento microbiano sobre un rango de condiciones, con el poder de la modulación matemática, para permitir predicciones del crecimiento o bien de la inactivación (Van Derlinden *et al.*, 2011). Esto es especialmente relevante si se generaliza su aplicación no sólo a alimentos, sino a todo tipo de productos que sufren el deterioro microbiano o en los cuales se desea controlar la incidencia de organismos patógenos. Es útil para monitorear la reducción de una población microbiana como para ayudar a entender el comportamiento de sistemas biológicos.

Una etapa importante en la cuantificación de los efectos de los factores ambientales es el desarrollo de modelos matemáticos para predecir el efecto de la combinación de dichos factores de crecimiento en los productos. Éstos también permiten la interpolación entre puntos de datos, y con esto es posible predecir respuestas para condiciones no estudiadas.

Los modelos predictivos son fundamentales en la estimación de la vida útil de los productos, valorar la eficacia de la higiene, identificar los puntos críticos en el proceso de producción y distribución, y pueden guiar acerca de cómo las variables del medio afectan al comportamiento del

microorganismo patógeno o alterante y así determinar la seguridad microbiológica del producto.

Los modelos microbiológicos predictivos pueden dividirse en modelos cinéticos y modelos de probabilidad. Los primeros calculan la vida microbiológica de los productos, es decir, el periodo del tiempo durante el cual el número de microorganismos en el producto es menor que un determinado valor. Los últimos determinan si el microorganismo puede crecer, e identifica las condiciones de almacenamiento con baja o nula probabilidad de crecimiento. Ambos modelos suelen estar estrechamente relacionados, porque la probabilidad de detección de crecimiento durante un periodo de tiempo específico depende de la multiplicación del microorganismo, así como de la fase de latencia y tiempo de generación, es decir, depende de los parámetros cinéticos.

5.2 Curvas de respuesta a la dosis

Una curva de respuesta a la dosis consiste en una gráfica que describe la relación entre el número o la fracción de microorganismos sobrevivientes y la dosis de un agente letal a la cual han sido expuestos. La dosis es expresada en unidades del factor a evaluar como el tiempo, partes por millón, intensidad de un campo eléctrico, etc. Las curvas de respuesta a la dosis tienen típicamente una forma sigmoidea, caracterizada por una región marginal de inhibición o letalidad casi imperceptible, seguida de una región claramente lineal, representando un decaimiento exponencial (López-Malo *et al.*, 2002).

Este comportamiento tradicionalmente ha sido separado en dos regiones, una con efecto marginal (o ningún efecto), a bajas intensidades de exposición del factor de preservación y una segunda región con un comportamiento lineal (después de una transformación logarítmica), que

es modelado por la cinética de primer orden. Un enfoque alternativo para modelar la respuesta a la dosis microbiana es el de considerarla continua para el rango entero del factor de preservación aplicado, sin cambios abruptos de la cinética de respuesta, pero con transición gradual a partir del efecto marginal (o no efecto) a intensidades relativamente bajas hasta efectos inhibitorios o letales en altas intensidades del factor de preservación.

La población microbiana decae como resultado de la exposición a agentes letales (por ejemplo, alta temperatura, dosis de irradiación, tratamientos con altas presiones), y pueden ser descritas por la función de Fermi, la distribución de Weibull, la cinética de primer orden, entre otros modelos (Peleg, 2003).

La adquisición de datos para aclarar las interacciones de múltiples variables asociadas con sistemas de alimentos ha estado en proceso durante varias décadas, particularmente para determinar cómo la actividad antimicrobiana es afectada por otros parámetros (López-Malo *et al.*, 2002).

El tratamiento matemático de la curva de respuesta a la dosis es muy similar a las de las curvas de supervivencia, pero el tiempo de exposición es sustituido por la dosis administrada. A altas dosis de un agente letal se puede causar la mortalidad casi instantánea de la población microbiana expuesta, por el contrario con dosis bajas podría tenerse un efecto retrasado. La diferencia desde el punto de vista de modelado, radica en que, en el primer caso (dosis altas), el tiempo no es el factor primario, pero en el segundo (dosis bajas) si lo es.

En inactivación térmica o no térmica de microorganismos, por lo general pueden encontrarse cuatro tipos comunes de curvas de supervivencia semi-logarítmicas (Figura 5.1): curvas lineales (inactivación de primer orden), curvas con hombro o periodo inicial lag (concavidad positiva), curvas con una cola (concavidad negativa) y curvas sigmoideas.

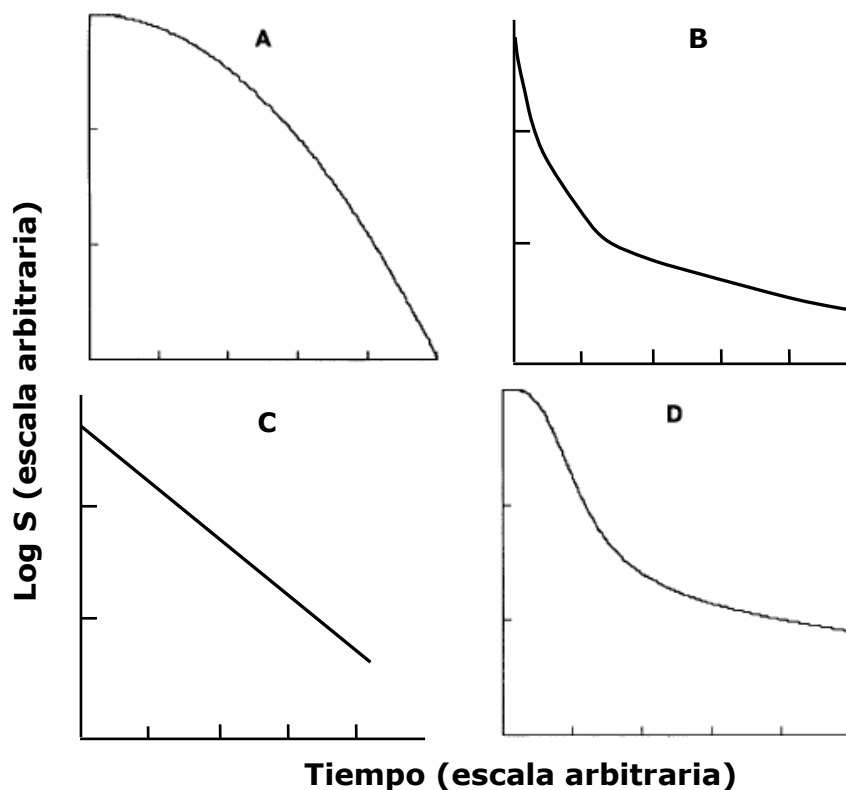


Figura 5.1 Diferentes curvas de inactivación: A) con hombro (concavidad negativa), B) con cola (concavidad positiva), C) logarítmica lineal, D) sigmoidea (Peleg, 2000)

5.3 Cinética de primer orden

Tradicionalmente, la inactivación microbiana ha sido considerada un proceso que sigue la cinética de primer orden, suponiendo que las células o esporas tienen idéntica resistencia a un agente letal y cada microorganismo tiene la misma probabilidad de morir.

Cuando una población bacteriana es sometida a un proceso de esterilización que le provoca la pérdida de la viabilidad, se observa una disminución logarítmica en el número de microorganismos sobrevivientes en función del tiempo de exposición al agente esterilizante (ver Figura 5.2). De tal forma que la velocidad de destrucción está dada por la ecuación propuesta por Chick (1908):

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad (5.1)$$

Donde N , es el número de microorganismos viables en una unidad de masa o volumen al tiempo t , N_0 es el número de microorganismos viables iniciales ($t = 0$), k una constante de velocidad de inactivación, que depende de la resistencia del microorganismo al proceso de esterilización y de su medio externo (temperatura, humedad y concentración del agente letal), (Peleg, 2003).

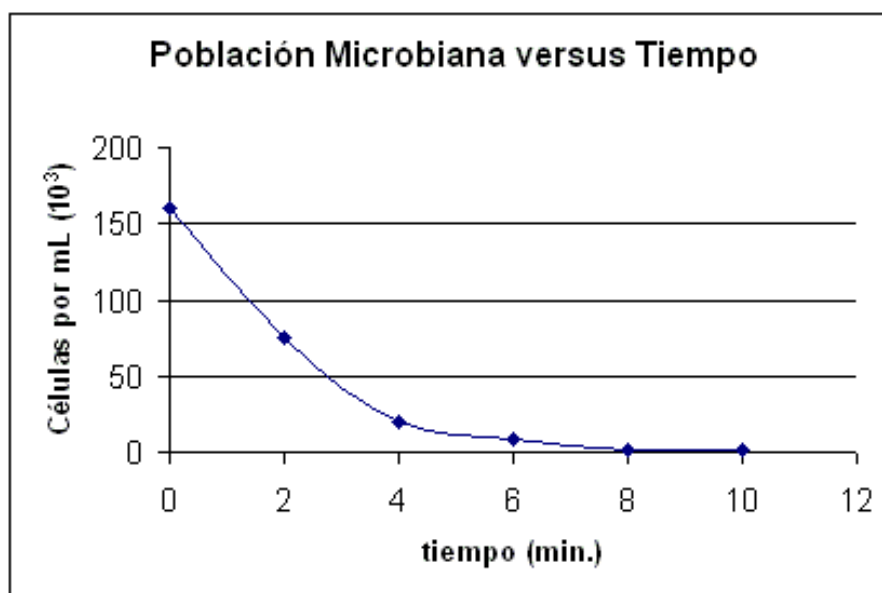


Figura 5.2 Decaimiento logarítmico de una población microbiana al ser sometida a un agente letal.

Integrando la expresión (5.1):

$$\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = -k \int_0^t dt \quad (5.2)$$

$$\ln N - \ln N_0 = -kt \quad (5.3)$$

(4.3) también puede expresarse como:

$$\log N - \log N_0 = -\frac{kt}{2.303} = \log \frac{N}{N_0} \quad (5.4)$$

La ecuación (5.4) es una ecuación de una línea recta si se denomina $y = \log N$:

$$y - y_0 = -mt \quad (5.5)$$

O bien:

$$y = -mt + y_0 \quad (5.6)$$

Donde: $y_0 = \log N_0$ y $m = pendiente = -\frac{k}{2.303}$

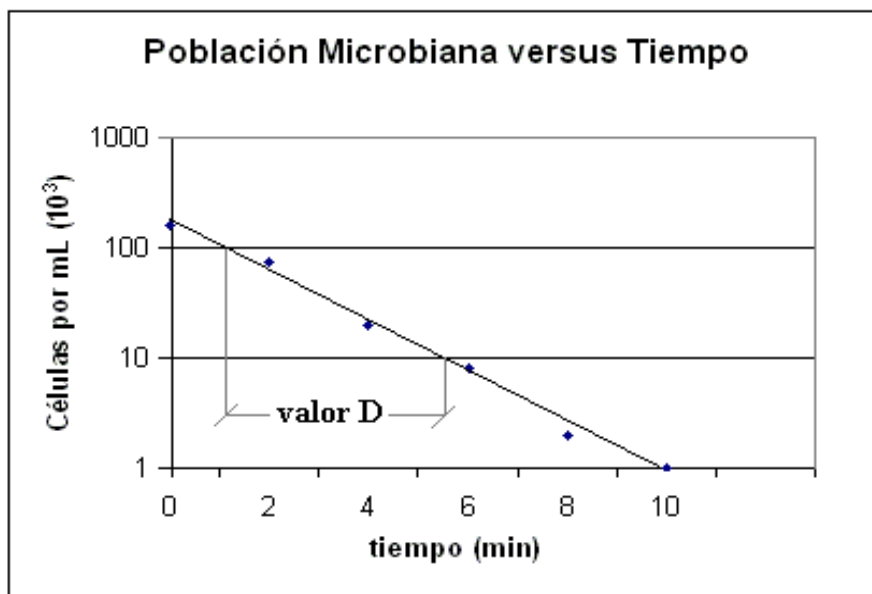


Figura 5.3 Población microbiana en el tiempo para una temperatura T , una de las expresiones de la curva de inactivación o de supervivencia, ecuación (4.4).

Si se llama **D** al tiempo (*min*) requerido para que la población original se reduzca a un décimo de la población inicial $\left(N = N_0/10\right)$, (ver figura 5.3)

entonces:

$$\log N - \log N_0 = -\frac{kt}{2.303} = -\frac{kD}{2.303} = \log \frac{N}{N_0} = \log \left(\frac{N_0/10}{N_0}\right) = \log(1/10) = -1 \quad (5.7)$$

$$-\frac{kD}{2.303} = -1 \rightarrow D = \frac{2.303}{k} \quad (5.8)$$

El valor **D** (min) se denomina “tiempo de reducción decimal”, y es el tiempo requerido para reducir la población microbiana un 90% o un orden de magnitud. De la ecuación (5.8) se obtiene que el valor **D** está inversamente relacionado con la constante **k**, entonces valores menores de **D** significan una mayor tasa de muerte o una muerte más rápida del microorganismo en estudio (Van Boekel, 2002).

La forma más familiar de la ecuación de inactivación de primer orden es:

$$\log S(t) = \log \frac{N}{N_0} = -\frac{t}{D} \quad (5.9)$$

El término N/N_0 se conoce como probabilidad de deterioro y debe tener un valor menor que 1. La curva semilogarítmica resultante de graficar $\log \frac{N}{N_0}$ contra el tiempo, es llamada frecuentemente curva de supervivencia.

La dependencia de la temperatura en el valor **D**, es expresada usando la constante de resistencia termal, mejor conocida como valor de **z** (ver Figura 5.4), es decir el aumento de la temperatura que disminuirá el tiempo de reducción decimal por un factor de 10. El valor **z** es un valor característico de cada microorganismo y puede ser relacionado con la energía de activación de la siguiente forma:

$$z = \frac{2.303RT^2}{E_a} \quad (5.10)$$

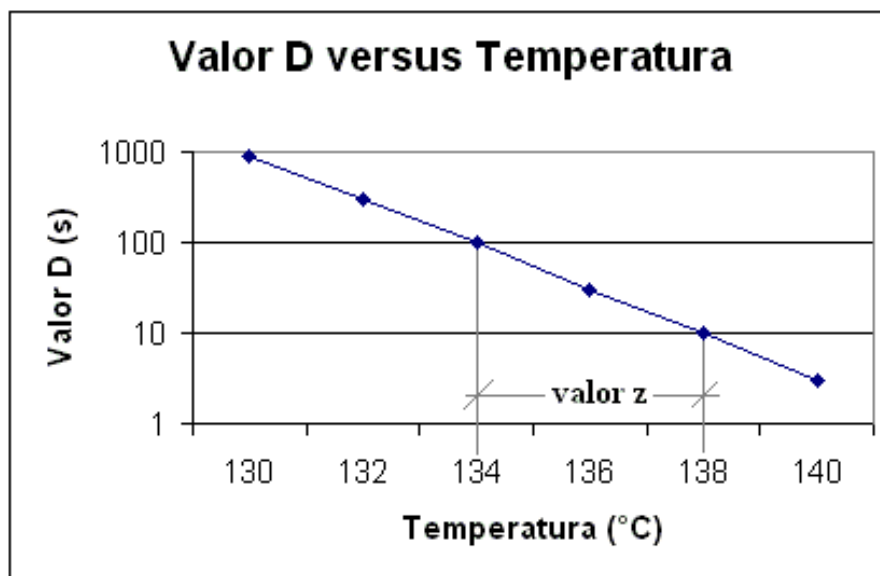


Figura 5.4 Relación gráfica entre la temperatura y el valor **D**

El concepto del valor **D** ha sido utilizado en procesos de conservación térmicos así como no térmicos. El objetivo de investigar la dependencia de la temperatura en inactivación térmica es para poder calcular el tratamiento necesario en combinaciones tiempo-temperatura en la pasteurización o esterilización generalmente de alimentos.

El concepto tradicional de $12D$, que significa la reducción de 12 ciclos logarítmicos del número inicial de microorganismos, es considerado suficiente para el procesamiento de los alimentos. El valor **D** se vuelve problemático cuando curvas de supervivencia semilogarítmicas experimentalmente determinadas son claramente no lineales.

5.4 Desviaciones

Actualmente existen diversos modelos matemáticos utilizados para evaluar los procesos de esterilización, dentro de los cuales el más utilizado por los investigadores es la cinética de primer orden. Como se mencionó en el

apartado anterior esta cinética se basa en que las curvas de supervivencia de células están regidas por una relación lineal entre el logaritmo decimal del número de microorganismos sobrevivientes y el tiempo de exposición al agente letal; sin embargo, existen curvas de supervivencia microbiana que no siguen esta tendencia lineal.

Debido a las desviaciones de la linealidad (concavidades) que pueden presentar las cinéticas de inactivación se puede ocasionar un sobreprocesamiento o subprocesamiento, ya que los parámetros de dichos procesos convencionalmente se aplican a partir de la cinética de primer orden (valores **D** y **z**). La explicación más común de la no linealidad es que la población microbiana estudiada está conformada a su vez por muchas subpoblaciones, cada una con su propia cinética de inactivación, incluso cuando la población es pura. Lo anterior implica que hay variación biológica, o en otras palabras, existe heterogeneidad entre las células de una población de un mismo microorganismo (Van Boekel, 2002).

Un punto de vista alternativo consiste en que la curva de supervivencia no debería ser tratada en el término cinético absoluto, sino como una forma acumulativa de una distribución temporal de eventos letales. Estos representan las diferentes resistencias de la población expuesta o tratada al espectro del agente letal. Según este punto de vista, las diferentes formas de las curvas de supervivencia son una manifestación de las propiedades de la distribución como pueden ser su mediana, moda, desviación estándar, sesgo, entre otros. Los cambios de forma que ocurren al ir cambiando las condiciones externas (la temperatura, la concentración de agentes antimicrobianos, el pH), son interpretados como cambios que se reflejan en los parámetros de la distribución (Peleg y Penschina, 2000). Ante esta problemática, varios autores (Whiting, 1995; Peleg y Penschina, 2000; Corradini y Peleg, 2009) han desarrollado otros modelos matemáticos que se acoplen mejor con las formas reales de las curvas de

supervivencia. A continuación se presentan algunos modelos cinéticos relativamente simples que permiten la cuantificación de los efectos de varios agentes letales para la inactivación microbiana.

5.4.1 Modelo de distribución de Fermi

Este modelo supone que la curva de respuesta a la dosis de un microorganismo individual, i , es una función escalón $S_i(X)$, donde X es la intensidad del agente letal en las unidades pertinentes y X_{ci} es el nivel en el cual un microorganismo es destruido (Peleg, 2003):

Si $X \leq X_{ci}$, entonces

$$S_i(X) = 1 \text{ o } \log S_i(X) = 0 \quad (5.11)$$

Y si $X > X_{ci}$, entonces

$$S_i(X) = 0 \text{ o } \log S_i(X) \rightarrow -\infty \quad (5.12)$$

Según esta definición, X_{ci} , es una medida de la resistencia o la sensibilidad del microorganismo al agente letal. A mayor X_{ci} , más tolerante es el microorganismo; a menor X_{ci} , más susceptible es el microorganismo. La curva de respuesta a la dosis de una población microbiana $S(X)$, compuesta de individuos con resistencias diferentes de X_{ci} , se expresa como:

$$S(X) = \sum S_i(X) \Delta\phi_i \quad (5.13)$$

Donde $\Delta\phi_i$ es la fracción de microorganismos, que sucumben a la misma dosis letal:

$$\sum(\Delta\phi_i) = 1 \quad (5.14)$$

Cuando la población microbiana es suficientemente grande y su espectro de resistencia es suficientemente denso, la ecuación (5.13) puede ser aproximada por una expresión basada en una distribución paramétrica, que describe el espectro de resistencia o sensibilidad del microorganismo, definido en términos de los niveles de dosis de los agentes que causan su mortalidad (*Fig.5.5*). La distribución de Fermi se puede expresar entonces como:

$$S(X) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{X - X_c}{k}\right)} \quad (5.15)$$

Donde k es una constante representando la extensión de la distribución y X_c es la moda y mediana para distribuciones normales sin sesgo. En la ecuación (5.15), cuando k es grande en relación con $X - X_c$, la distribución es angosta; por lo contrario cuando k es pequeña, la distribución es amplia. De tal forma, la distribución de Fermi es siempre simétrica.

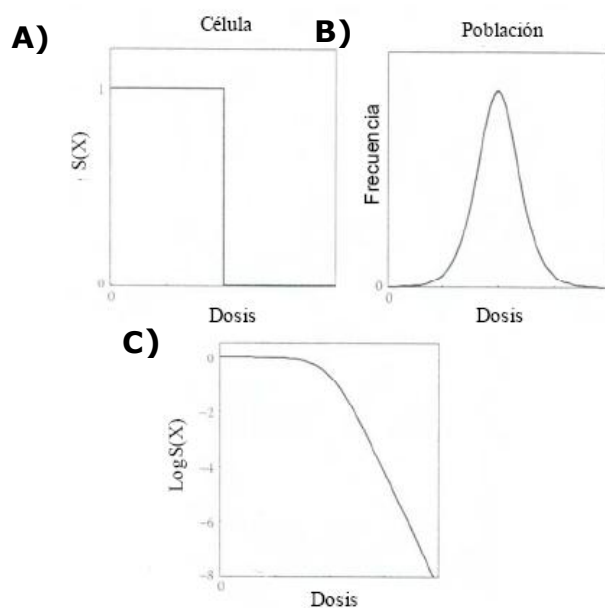


Figura 5.5 A) Vista esquemática de la curva de respuesta a la dosis de un microorganismo descrito por la función de Fermi, B) la distribución de dosis letales a las cuales los individuos de la población sucumben, C) curva de respuesta a la dosis.

La función de distribución de Fermi es continua, por lo tanto, ésta puede ser ajustada por medio de procedimientos de regresión estándar no lineales aún para las curvas de respuesta a la dosis con mucha pendiente. Sin embargo, debido a que la magnitud de k tiene poca importancia, especialmente cuando datos experimentales en y cerca de X_c no están disponibles, sería prudente fijar el valor de k por adelantado, dejando a X_c como único parámetro ajustable para ser determinado por la regresión. El uso particular de esta función es que sus constantes (X_c y k) pueden ser directamente relacionados con la forma de la curva de supervivencia, lo que hace posible la comparación entre microorganismos o la evaluación de la intensidad del factor que determina la supervivencia microbiana.

5.4.2 Modelo de distribución Weibull

La función de distribución de Weibull toma en consideración la variación biológica de una población de microorganismos y es usada para describir el espectro de las resistencias de dicha población a un agente letal en diferentes condiciones.

Las principales ventajas de este modelo son su simplicidad y su capacidad de modelar las curvas de supervivencia que son lineales y aquellas que contienen hombro o regiones con cola (ver Fig. 5.1, curvas A, B, y C). Con los parámetros apropiados, la función de Weibull puede explicar distribuciones claramente sesgadas y distribuciones casi absolutamente simétricas (Peleg y Pechina, 2000).

La función de distribución de probabilidad está dada por:

$$f(t) = \frac{\beta}{\alpha} \left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta-1} \exp\left(-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta}\right) \quad (5.16)$$

Con $t, \alpha, \beta > 0$, y con la función de distribución acumulativa:

$$F(t) = \exp\left(-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta\right) \quad (5.17)$$

En términos de una curva de supervivencia, la ecuación (4.17) puede expresarse:

$$S(t) = \frac{N}{N_0} = \exp\left(-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta\right) \quad (5.18)$$

O en su equivalente:

$$\log S(t) = -\frac{1}{2.303} \left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta \quad (5.19)$$

Donde, $S(X)$ es la fracción de microorganismos sobrevivientes; N_0 es el número inicial de células y N el número de células al tiempo t ; con α, β como los dos parámetros de la distribución; los cuales pueden ser obtenidos empleando una técnica de regresión no lineal; α como el factor de posición de la distribución y β como el factor de forma.

De acuerdo con el modelo (5.19), la gráfica $\log S(X)$ vs t presenta concavidad hacia abajo siempre que $\beta > 1$ y una concavidad hacia arriba siempre que $\beta < 1$; mientras que cuando $\beta = 1$ la curva de supervivencia es lineal y la distribución de Weibull se reduce a una distribución exponencial (Corradini *et al.*, 2009). Para este caso en particular, la función de distribución de probabilidad exponencial se reduce a:

$$f(t) = \frac{1}{\alpha} \exp\left(-\frac{t}{\alpha}\right) \quad (5.20)$$

Y su función de distribución acumulativa se reduce a una ecuación de cinética de primer orden:

$$\log S(t) = -\frac{1t}{2.303\alpha} \quad (5.21)$$

Desde el punto de vista de la inactivación térmica microbiana, los distintos valores del factor de forma (β) se pueden interpretar de la siguiente forma (ver Figura 5.6):

- Cuando $\beta > 1$ significa que las células remanentes son muy susceptibles al calor, o en otras palabras, indica que el daño acumulado en la primera fase del tratamiento impide que el resto de los microorganismos sobrevivan.
- Si $\beta < 1$ indica que las células remanentes tienen menos probabilidad de morir, es decir, éstas son más resistentes o quizás se han adaptado a las nuevas condiciones de estrés.
- Finalmente cuando $\beta = 1$ implica que la probabilidad de muerte de las células no depende del tiempo, o bien, que todas las células presentan la misma sensibilidad al agente letal sin importar cuánto dure el tratamiento. En general demuestra que no existe variación biológica dentro de la población microbiana.

Con el fin de obtener mayor cantidad de información de la distribución de Weibull, es posible calcular a partir de los valores de α y β otros parámetros de utilidad como lo son la media, moda y varianza.

La moda de la distribución, X_m , es:

$$X_m = \left(\frac{\beta-1}{\frac{\beta}{\alpha}} \right)^{\frac{1}{\beta}} \quad (5.22)$$

Su mediana es:

$$\bar{X} = \frac{\Gamma\left(\frac{\beta+1}{\beta}\right)}{\left(\frac{1}{\alpha}\right)^{\frac{1}{\beta}}} \quad (5.23)$$

Y su varianza es:

$$\sigma_x^2 = \frac{\Gamma\left(\frac{\beta+2}{\beta}\right) - \left[\Gamma\left(\frac{\beta+1}{\beta}\right)\right]^2}{\left(\frac{1}{\alpha}\right)^{\frac{2}{\beta}}} \quad (5.24)$$

El Coeficiente de sesgo (oblicuidad) está dado por:

$$v_1 = \frac{\mu_3}{\mu_2^{3/2}} \quad (5.25)$$

Donde $\mu_3 = \frac{\Gamma(1+2/\beta)}{(1/\alpha)^{3/2}}$, $\mu_2 = \frac{\Gamma(1+2/\beta)}{(1/\alpha)^{2/\beta}}$, y Γ es la función gamma.

La moda, X_m , representa el tiempo de tratamiento al cual la mayoría de la población muere o se inactiva. La mediana, \bar{X} , corresponde al tiempo de inactivación promedio. El coeficiente de sesgo v_1 , representa el sesgo de la distribución. Cuando $v_1 > 1$ indica que la curva es sesgada a la derecha, mientras que $v_1 < 1$ indica que está sesgada a la izquierda; y una distribución con un valor de $v_1 = 1$ indica que ésta es simétrica.

Cuando curvas de respuesta a la dosis son ajustadas con la ecuación (5.18) como modelo, se espera que la β adquiera valores del orden de 1.5 a 5. Por ejemplo, si $\beta > 1$, indica la existencia de un pico de frecuencia (moda) en algún sitio en medio del rango de la dosis aplicada; por consiguiente, el valor de $(1/\alpha)$ correspondiente podría tener un valor numérico muy pequeño. Tales valores, especialmente cuando se combina con una β de número no entero, el modelo es muy poco atractivo para ser presentado en su forma original. Sin embargo, la conversión de sus parámetros α y β en promedio, moda, varianza o la desviación estándar (5.22 a 5.25), facilitaría enormemente la comparación entre diferentes organismos. Esto también puede ser usado para cuantificar la influencia de condiciones de crecimiento u otros factores sobre el mismo organismo.

Aunque la distribución acumulativa exponencial expresada por la ecuación (5.21) tiene la misma forma que una cinética de primer orden (5.9), el significado de los parámetros **D** y α son distintos. **D** es el recíproco de la constante de inactivación de primer orden, mientras que α representa la media de la distribución de los tiempos que describe la muerte de la población microbiana y tiene una interpretación probabilística.

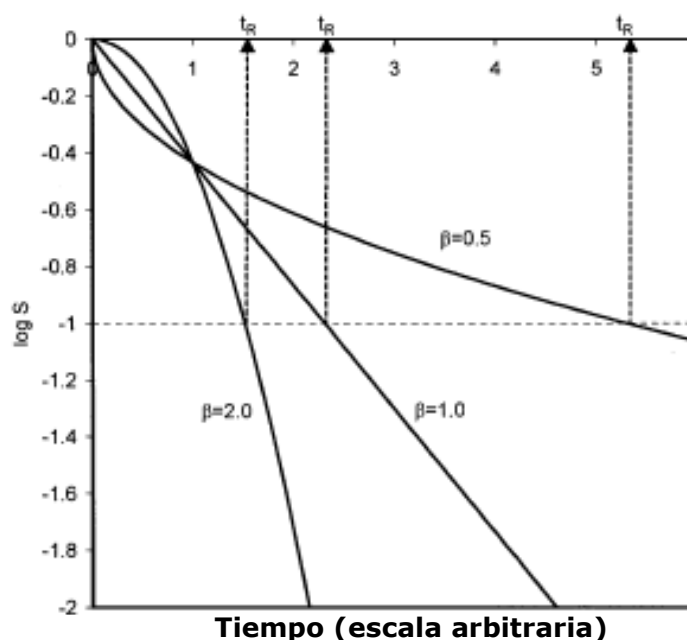


Figura 5.6 Gráfica que esquematiza las curvas de inactivación generadas a partir de tres distintos valores del factor de forma β y su influencia en el tiempo de confiabilidad (t_R), de acuerdo a la función de distribución de Weibull (Van Boekel, 2002).

El concepto de tiempo de confiabilidad (t_R), es el tiempo necesario para reducir el número de microorganismos en un factor de 10, el cual es equivalente al valor **D** comúnmente manejado en los procesos de esterilización, solo que para la distribución de Weibull se expresa de la siguiente manera:

$$t_R = \alpha(-\ln 0.1)^{\frac{1}{\beta}} = \alpha(2.303)^{\frac{1}{\beta}} \quad (5.26)$$

Estos tiempos están indicados con líneas punteadas en la *Figura 5.6* para varios valores de β , demostrando la dependencia existente entre t_R y β . Por consiguiente este parámetro puede desempeñar la misma función que el parámetro **D**, pese que no tengan totalmente el mismo significado (Van Boekel, 2002). De tal forma que al generalizar la ecuación (5.26):

$$t_R = \alpha(-\ln 10^{-d})^{\frac{1}{\beta}} \quad (5.27)$$

Donde **d** es el número de reducciones decimales, ejemplificando para el caso más común en los procesos de esterilización, $12D$:

$$t_R = \alpha(25.328)^{\frac{1}{\beta}} \quad (5.28)$$

No hay que alarmarse si los valores **D** tradicionales y reportados en literatura resultan muy diferentes de estos calculados a partir de la función (5.26), pues se ha demostrado que el modelo de Weibull puede ser más realista que la cinética de primer orden. Aunque por supuesto no hay que olvidar que son los propios datos experimentales los que indican cual modelo emplear.

Una de las pruebas clásicas para evaluar la aplicabilidad del modelo de Weibull consiste en una gráfica doble logarítmica de $\ln(-\ln S(X))$ en función de $\ln t$. Se establece que el modelo aplica adecuadamente, si se obtiene una línea recta.

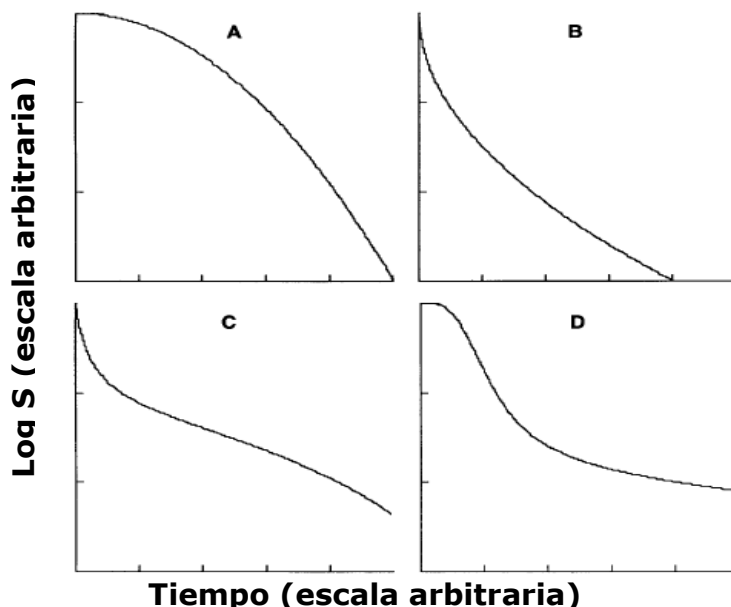


Figura 5.7 Vista esquemática de las distintas curvas de supervivencia microbiana. (A) Ecuación 4.19 con $\beta > 1$, (B) Ecuación 4.19 con $\beta < 1$ (C) Ecuación 4.29, (D) Ecuación 4.30.

En principio y en práctica, las curvas semi-logarítmicas de supervivencia microbiana no siempre tienen las formas modeladas por la ecuación (5.19) (Figura 5.7, tipo A y B), sino que también pueden presentar formas sigmoideas (Figura 5.7, tipo C y D) (Corradini *et al.*, 2010). Para describir matemáticamente el comportamiento del Log contra el tiempo en los casos de curvas sigmoideas, se requieren modelos empíricos más elaborados, Peleg *et al.*, (1999) proponen:

Para la curva tipo C:

$$\log S = -c_1 t^{n_1} - c_2 t^{n_2} \quad (5.29)$$

Y para el tipo D

$$\log S = \frac{-c_3 t^{n_3}}{(1+c_4 t^{n_4})}, n_3 > n_4 \quad (5.30)$$

Donde t es el tiempo de exposición y las c 's y n 's son constantes. En estos casos, la forma de las curvas varía en función de la intensidad del agente letal. Las curvas de inactivación son cóncavas hacia arriba y

relativamente planas cuando el organismo ha sido expuesto a un agente letal con baja intensidad; esto significa que los miembros más sensibles de la población fallecen dejando sobrevivientes con mayor resistencia. La curva se convierte en cóncava hacia abajo o escalonada cuando se incrementa la intensidad del agente letal, lo cual refleja la acumulación del daño y el incremento en la sensibilidad de los organismos sobrevivientes.

Existen muchos más modelos matemáticos que los presentados en este texto, todos buscan representar con mayor exactitud las curvas de supervivencia microbiana para obtener un mejor entendimiento de los procesos de esterilización y conservación de ciertos productos; sin embargo, muchas veces la gran cantidad de información disponible en vez de facilitar el estudio provoca gran confusión sobre cómo identificar el modelo adecuado. Como solución a lo anterior, primero se deben analizar los datos experimentales y buscar el que se le aproxime más, siempre teniendo en cuenta el tan conocido principio de parsimonia: cuanto más sencilla sea una explicación es mejor, que en este caso sería el modelo con menor número de parámetros o bien el más sencillo de manipular.

5.5 Validación de modelos

La microbiología predictiva está basada en la premisa de que las respuestas de las poblaciones de microorganismos a los factores ambientales son reproducibles, y que por caracterización de los factores dominantes de las respuestas de crecimiento, es posible, desde observaciones anteriores, predecir las respuestas de dichos microorganismos en otras condiciones ambientales similares.

Para determinar qué predicciones proporcionan una buena descripción del crecimiento en los productos, los modelos deben validarse y evaluarse en su habilidad predictiva. Cuando un modelo matemático se construye y

valida adecuadamente, permite, por ejemplo, la predicción del efecto de cambio de las condiciones de tratamiento sobre la evolución microbiana. La precisión de los modelos puede ser valorada gráficamente enfrentando los valores observados contra las correspondientes predicciones del modelo. Además, el error cuadrado del medio, los valores de R^2 , los factores de sesgo y de exactitud pueden utilizarse como indicación de la confianza de los modelos cuando son aplicados a los productos.

El *coeficiente de determinación múltiple* (R^2) es un criterio de valoración de la capacidad de explicación de los modelos de regresión, y representa el porcentaje de la varianza justificado por la variable independiente, mientras que el R^2 *ajustado* tiene en cuenta el tamaño del conjunto de datos, y su valor es ligeramente inferior al de su correspondiente R^2 . Si todas las observaciones están en la línea de regresión, el valor de R^2 es 1, y si no hay relación entre las variables dependiente e independiente, el valor de R^2 es 0. El coeficiente R^2 es una medida de la relación lineal entre dos variables. A medida que su valor es mayor, el ajuste de la curva a los datos es mejor, puesto que la variación explicada es mayor; así, el desajuste provocado por la sustitución de los valores observados por los predichos es menor.

El objetivo del enfoque de todos los modelos es obtener buena generalización de propiedades. Esto significa que un modelo debería funcionar bien cuando se confronte con nuevos datos, incluso en la región de interpolación del diseño experimental original. Esto está relacionado con la sobreestimación o subestimación: un modelo muy rígido tendrá un bajo R^2 ajustado, no obstante, quizás expone un comportamiento lógico, mientras que un modelo flexible tendrá un alto R^2 ajustado, pero puede fallar cuando es usado con datos recientes o incluso con los datos usados para desarrollar el modelo.

6. METODOLOGÍA

6.1 Obtención de lodos

Para el desarrollo de esta investigación fue necesaria la continua obtención de lodos residuales; éstos fueron recolectados durante cuatro meses dentro del periodo Diciembre (2010) - Marzo (2011) de la micro planta de tratamiento de aguas residuales ubicada en los edificios 12 y 18 del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Esta planta lleva operando desde 2007 y trata en promedio 2.3-3 m³/día y produce agua tratada para descarga de los sanitarios de esos edificios.

Con el fin de simular la corriente de lodos de purga de una planta de tratamiento convencional de aguas residuales municipales se colectaron lodos primarios y secundarios, los primeros se obtuvieron del tanque séptico y los secundarios se muestrearon en la sección aerobia del sedimentador secundario de la planta de proceso combinados, conocida como microplanta (Anaerobia-Anóxica-Aerobia). El lodo primario después de extraerlo fue tamizado para retirar las partículas de grandes dimensiones, empleando un tamiz de 0.5 cm. Para los lodos secundarios no se requirió el tamiz, dado que tenían una consistencia tersa y uniforme. Posteriormente se dejaron sedimentar aproximadamente 2 horas; el excedente de agua era retirado y los lodos se almacenaban en bidones para ser transportados al cuarto frío del laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería donde permanecieran a una temperatura de 4 °C. Al transcurrir aproximadamente 24 horas se revisaban los bidones y si era necesario se retiraba una vez más el sobrenadante, se homogeneizaban las muestras de cada tipo de lodo y se proseguía a la realización de los análisis de sólidos totales (STT), sólidos

totales volátiles (STV) y sólidos totales fijos (STF) (ver Anexo A) para conocer la composición de cada lodo y poder realizar la mezcla de 60% de lodo primario y 40% de lodo secundario (con base en peso), composición típica de la corriente de lodos de purga (Rubio, 2004). Una vez obtenida la mezcla se almacenaba una vez más en el cuarto frío según lo establecido en la NOM-004-SEMARNAT-2002 hasta su utilización, no excediendo una semana de almacenamiento.

6.2 Descripción del dispositivo experimental

El dispositivo donde se realizaba el pretratamiento térmico del lodo residual fue denominado "Termohidrolizador de lodos" (Martínez, 2009) (*ver figura 6.1*). Este equipo cuenta con un vaso de precipitados de 1000 mL de capacidad el cual tiene una rejilla a modo de tapa, donde se encuentra fijo un agitador tipo propela de 0.6W con velocidad variable, que tiene como propósito evitar los gradientes de temperatura y garantizar un mezclado homogéneo dentro del recipiente. El sistema de calentamiento está constituido por un aro de aluminio que posee en su interior una resistencia de 200W que por convección propicia el calentamiento de la mezcla de lodo. El dispositivo cuenta con una caja controladora, en cuyo interior se encuentra un circuito electrónico conectado a un termopar que mide la penetración del calor en el lodo y controla el sistema de calentamiento y agitación.

La temperatura y el tiempo deseados fueron programados mediante un teclado en la pantalla de la caja del controlador y en un cronómetro respectivamente, estos dos acoplados al circuito. Cuando la mezcla alcanzaba la temperatura deseada, automáticamente se activaba el cronómetro que inicia la cuenta del tiempo programado y una vez que éste transcurría se activaba una alarma que indicaba que el ciclo se había completado, desconectando a su vez el sistema y la resistencia para

detener el calentamiento. Cuando la temperatura sobrepasaba la temperatura programada (set point) se encendía un ventilador ubicado debajo del vaso de precipitados que ayuda al sistema a bajar la temperatura hasta alcanzar la estipulada y en ese momento éste se apagaba.



Figura 6.1 Termohidrolizador de lodos

6.3 Procedimientos de inactivación

En cuanto al diseño experimental para obtener las cinéticas de inactivación de los patógenos durante el pretratamiento térmico de lodos, se estipuló estudiar tres distintas temperaturas de exposición (60,70 y 80 °C). La duración de cada tratamiento se estableció en 60 minutos con base en lo reportado por Martínez (2009).

En todos los ensayos se colocó un volumen de 800 mL de mezcla de lodo en el termohidrolizador; el lodo fue introducido al aparato a una temperatura aproximada de 4 °C requiriendo de 20 a 35 minutos para alcanzar las temperaturas establecidas (60, 70 y 80 °C). Se prestó

especial cuidado en mantener el termopar inmerso y en el centro del lodo para que el perfil de temperatura fuera representativo del sistema.

Una vez alcanzada la temperatura estipulada se tomó la primera muestra, denominada T_0 , las muestras consecuentes fueron tomadas a intervalos de tiempo predeterminados, cada una de éstas consistió en 50mL de lodo. Inmediatamente, el recipiente que contenía la muestra fué colocada en un baño de agua para detener el proceso de inactivación térmica, bastó un descenso a temperatura ambiente para lograr esto sin alterar la viabilidad de los microorganismos remanentes en la muestra. El esquema de muestreo aplicado para cada pretratamiento se muestra en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1 Esquema de muestreo.

Temperatura de Exposición	Tiempos de muestreo (min)
60 °C	0,1,2,3,5,10,12,15,20,30,60
70 °C	0,0.5,1,1.5,2,3,5,10, 15,30,60
80 °C	0,1,2,3,5,10,15,60

En el transcurso de 1 hora después de finalizado el tratamiento térmico, todas las muestras colectadas fueron analizadas mediante las técnicas microbiológicas estipuladas en la NOM-004-SEMARNAT-2002. Una vez que se encontraban resultados bien definidos, se realizaron de 3 a 4 replicas para cada temperatura de exposición.

6.4 Técnicas microbiológicas

La Norma Mexicana que regula el manejo y la disposición final de los lodos de desecho provenientes de plantas de tratamiento municipales (NOM-004-SEMARNAT-2002) establece las técnicas de cuantificación de Coliformes y *Salmonella* spp. (Anexos B y C).

Se aplicó la prueba directa para la determinación de Coliformes, la cual consiste en la inoculación y posterior incubación a 44.5 °C en medio A-1 con campana de Durham (ver Anexo B), teniendo como prueba positiva la generación de gas como resultado de la fermentación de la lactosa, y como prueba negativa la ausencia de gas dentro de la campana de Durham.

Mientras que para determinar la presencia de *Salmonella* spp. se inoculó con cada muestra de lodo primero un medio de enriquecimiento y selectivo (Caldo de Tetrionato) por 22 horas a 37 °C y después en medio Selenito Cistina durante 24 horas a 41 °C (Anexo C), donde por medio de cambio de coloración a anaranjado intenso se obtuvo prueba positiva o en caso contrario prueba negativa. Algunos de los tubos positivos de Selenito Cistina se sembraron por estría en placa en medio de sulfito de bismuto, con el fin de corroborar que los microorganismos aislados se trataran de *Salmonella* spp.

El máximo de diluciones a emplear en ambos casos se fijó después de hacer los análisis microbiológicos al lodo crudo (10^{-7}), pues siempre se partía de esa concentración inicial de microorganismos hacia la completa inactivación de éstos, considerando el proceso térmico al que se sometía el lodo.

La cuantificación de cada uno de los microorganismos se llevó a cabo aplicando el método estadístico de Número más probable (NMP) en serie de tres tubos, por medio de la obtención del código de los tubos positivos y negativos, en Medio A-1 y Selenito Cistina respectivamente, verificando posteriormente el valor de NMP de tablas (Anexo D). El resultado se expresó en número de microorganismos por gramo de sólidos totales, este ajuste se realizó con base en el análisis de sólidos totales (STT) de cada muestra de lodo.

6.5 Curvas de inactivación

Con los datos obtenidos de los análisis microbiológicos de coliformes fecales y *Salmonella* spp. se graficó el logaritmo del número de microorganismos remanentes en el eje de las abscisas y el tiempo en el eje de las ordenadas, obteniendo de esta forma las curvas de supervivencia térmica, después se ajustaron tres distintos tipos de funciones: el modelo de cinética de primer orden, modelo de Weibull y un modelo empírico.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización de los lodos residuales

Las características que la literatura reporta indican STV entre 60 y 80% para el lodo primario y STV entre el 70 y 80% para el lodo secundario (Noyola, 1998). Como se puede observar en la tabla 7.1, la composición de los lodos (primarios y secundarios) entra perfectamente en el rango recomendado.

Tabla 7.1 Composición de sólidos promedio de lodos residuales concentrados.

Tipo lodo	STT g/l	STV g/l	STF g/l	% STF	%STV
Lodo primario	56.51 ± 16.05	41.65 ± 12.24	14.86 ± 3.81	26.3	73.7
Lodo secundario	24.13 ± 6.23	20.02 ± 5.26	4.10 ± 1.06	17.0	83.0

Tabla 7.2 Composición promedio de las mezclas de lodo empleadas en los pretratamientos térmicos.

Mezcla Lodo	STT mg/l	STV mg/l	STF mg/l	%STV	%STF
1	42862	40380	2482	94.21	5.79
2	40330	31296	9033	77.60	22.40
3	41493	31770	9723	76.57	23.43
4	41070	30626	10443	74.57	25.43
5	31103	24273	6830	78.04	21.96
6	30453	23503	6950	77.18	22.82

En la tabla 7.2 se detalla la composición en sólidos totales de las seis distintas mezclas de lodo, 60% lodo primario y 40% lodo secundario (con base en peso), que se prepararon a lo largo de la fase experimental para llevar a cabo los distintos pretratamientos térmicos.

Tomando en cuenta que el análisis de sólidos totales ofrece una aproximación de la cantidad de materia orgánica presente en la fracción sólida del lodo residual (STV), en la Tabla 7.2 se puede observar que en todas las mezclas obtenidas aproximadamente el 80% de la materia presente es susceptible a descomposición, factor que favorece al desarrollo de las comunidades microbianas presentes. La alta carga orgánica se asocia a la procedencia del lodo, debido a que la planta donde se realizaron los muestreos trata las descargas de sanitarios de dos edificios.

Se nota un decremento en la cantidad de sólidos totales en las dos últimas mezclas obtenidas, esto fue provocado por una modificación en el proceso de tamizado, en ambos casos se empleó un tamiz con menor tamaño de poro, con el propósito de mejorar la consistencia de lodo y favorecer los procesos posteriores. Sin embargo, es de resaltar que la proporción de materia orgánica presente en estas mezclas no sufrió alteración alguna (*ver tabla 7.2*), debido a que se retiraron principalmente fibras y semillas, que por su mayor tamaño obstruían el dispositivo de muestreo en el termohidrolizador o se acumulaban en el agitador del mismo, por consiguiente al retirar estas partículas del lodo, el pretratamiento resultó beneficiado.

Tabla 7.3 Caracterización microbiológica de los lodos residuales empleados en los pretratamientos térmicos.

	Coliformes fecales	<i>Salmonella</i> spp.
Mezcla Lodo	NMP/gST lodo	NMP/gST lodo
1	2.17E+06	No cuantificado
2	1.14E+07	No cuantificado
3	2.24E+06	1.07E+07
4	1.07E+06	3.74E+07
5	3.54E+07	1.48E+08
6	1.51E+06	1.51E+08
PROMEDIO	3.83E+06	5.46E+07

En la Tabla 7.3 se concentran los resultados de los análisis de cuantificación de coliformes fecales y *Salmonella* spp.; estos reflejan que en la mayoría de las mezclas de lodo se determinó similar carga microbiana. Respecto a los coliformes fecales, en cuatro de las seis mezclas procesadas se encontró 6 unidades logarítmicas (log) de estos microorganismos, mientras que en tres de cinco muestras analizadas se determinó una concentración de 7 log de *Salmonella* spp. Son estas concentraciones iniciales promedio las que se usan como referencia para las cinéticas de inactivación.

Dos de las mezclas no muestran reportado su conteo de *Salmonella* spp., debido a que se presentaron problemas en la técnica analítica y los resultados encontrados no fueron confiables, por lo cual se tomó la decisión de omitirlos.

Las concentraciones de los microorganismos indicadores de la Tabla 7.3 son mayores a las reportadas en el trabajo de Martínez (2009), (1.85×10^6 coliformes, 3.45×10^4 *Salmonella* spp.). Esta discrepancia está relacionada principalmente a las distintas procedencias del lodo, ya que en el presente trabajo se obtuvieron de una planta que trata casi en su totalidad un efluente procedente de sanitarios, mientras que en el trabajo previo se muestreó en la planta de tratamiento de aguas residuales de Cerro de la Estrella, la cual trata un efluente de tipo municipal, que posee distintas características con respecto a un efluente de sanitarios, debido a que los efluentes con mayor carga orgánica sufren dilución por la incorporación de otros efluentes con diferente composición que incluso pueden contener sustancias que afecten parcialmente el desarrollo de los microorganismos patógenos.

7.2 Curvas de inactivación

7.2.1 Coliformes fecales

Tabla 7.4 Datos experimentales promedio del pretratamiento a 60 °C.

t(min)	Log NMP/g ST
0	5.64 ± 0.11
1	5.03 ± 0.0
2	4.16 ± 0.35
3	3.11 ± 0.14
5	2.78 ± 0.0
10	2.78 ± 0.001
12	2.36 ± 0.001
15	2.03 ± 0.001
20	1.76 ± 0.001
60	1.76 ± 0.001

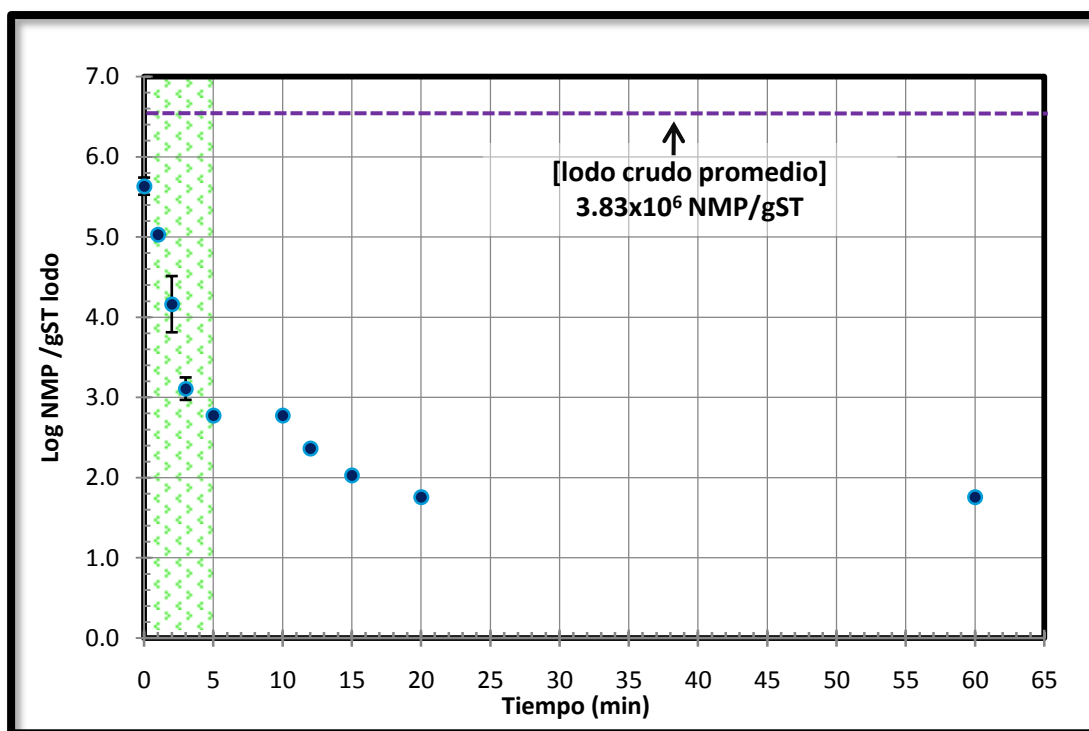


Figura 7.1 Curva de inactivación de coliformes fecales, a temperatura de 60 °C (Área sombreada zona de decaimiento exponencial).

A través del análisis de la curva de inactivación presentada en la figura 7.1 se pudo extraer información relevante sobre la reacción de los coliformes fecales ante una situación de estrés, en este caso una exposición durante 60 minutos a una temperatura de 60 °C. La concentración de microorganismos al tiempo cero de la curva isotérmica no dista mucho de la concentración promedio del lodo crudo, esto indica que nos encontramos ligeramente sobre el umbral de temperatura donde se muestran los primeros indicios de daño en las bacterias coliformes.

Durante los primeros 5 minutos se percibe con claridad una disminución exponencial en la concentración de microorganismos (ver área sombreada en figura 7.1), después se presenta una zona de decaimiento gradual que se comporta de forma asintótica después de los 20 minutos de tratamiento, con una carga remanente promedio de 1.75 log NMP/g ST. La

primera zona de la curva refleja que la mayor parte de la población de coliformes fecales es susceptible a esta temperatura de exposición, sin embargo, a medida que transcurre el tiempo el decaimiento es menos acelerado hasta que prácticamente es imperceptible la letalidad del proceso. Lo anterior demuestra que existen miembros de la población que son más resistentes y son capaces de crecer pese al tiempo de exposición y la temperatura de 60 °C, concordando con lo planteado por Van Boekel (2002), sobre que una población microbiana estudiada está conformada a su vez por muchas subpoblaciones, cada una con su propia cinética de inactivación.

Esta misma temperatura fue estudiada por Bonjoch y Blanch (2009), encontrando presencia de coliformes fecales aún después de 90 minutos de exposición, comportamiento que concuerda con lo aquí determinado.

Tabla 7.5 Datos experimentales promedio del pretratamiento a 70 °C.

t(min)	Log NMP/g ST
0	4.13 ± 0.67
0.5	3.85 ± 0.07
1	3.05 ± 0.28
1.5	2.44 ± 0.08
2	2.22 ± 0.13
3	1.93 ± 0.09
5	1.93 ± 0.09
10	1.93 ± 0.09
15	1.84 ± 0.07
30	1.84 ± 0.07
60	1.84 ± 0.07

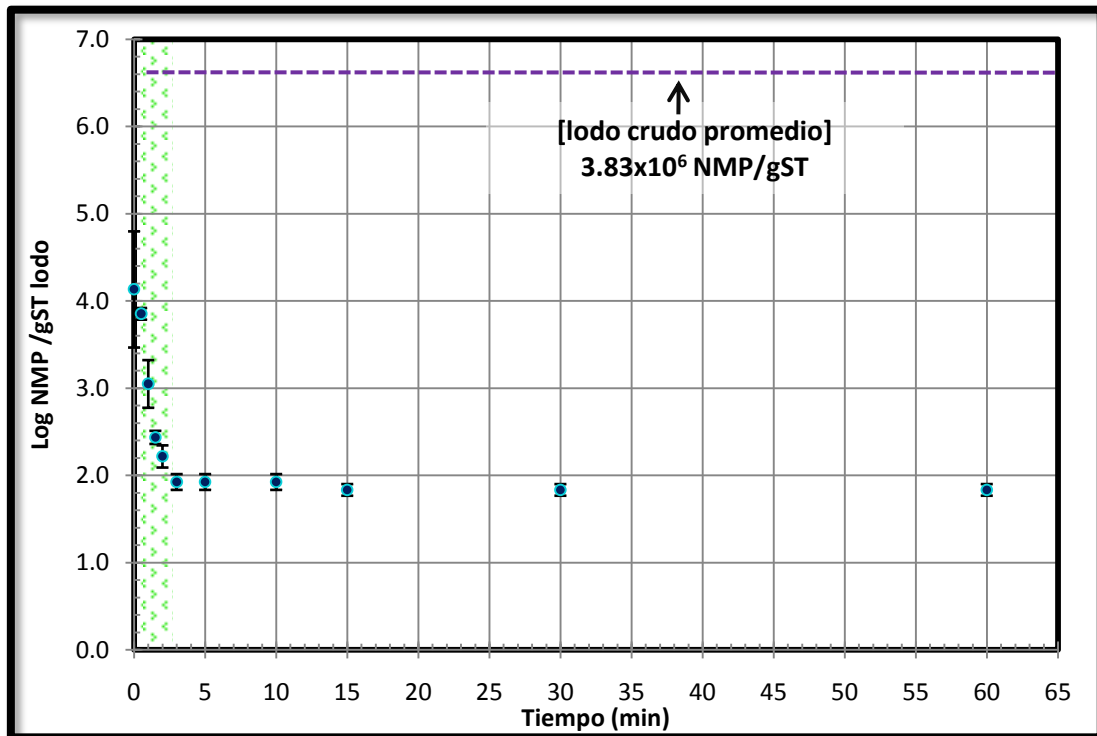


Figura 7.2 Curva de inactivación de coliformes fecales, a temperatura de 70 °C (Área sombreada zona de decaimiento exponencial).

La figura 7.2 muestra una tendencia similar a la curva procedente del pretratamiento a 60 °C (Figura 7.1), el mismo decaimiento exponencial, solo que en esta ocasión en un intervalo de tiempo ligeramente menor (3 minutos). A partir de ese instante se observa una zona marginal donde la concentración de coliformes fecales se mantiene prácticamente inalterable hasta completar los 60 minutos de exposición a la temperatura probada.

El comportamiento lineal reflejado durante los primeros minutos del tratamiento junto con la reducción en la concentración microbiana aproximada de 2 log durante la fase no-isotérmica del proceso, son reflejo del incremento en la intensidad del agente letal.

Con el propósito de llevar a cabo una comparación se puede mencionar que en el trabajo de Martínez (2009), donde se realizó un estudio

semejante a éste, en el pretratamiento térmico a 70 °C a partir de los 30 minutos ya no se detectó la presencia de coliformes fecales, sin embargo, al analizar la figura 7.2 se detecta una contradicción respecto a esos resultados pues aún en un lapso de una hora no se llega a la muerte absoluta, es cierto que se inactiva el 99.99% de la población inicial de coliformes fecales pero también es muy notorio que aunque en mínima proporción, siguen existiendo bacterias capaces de sobrevivir a 70 °C.

Tabla 7.6 Datos experimentales promedio del pretratamiento a 80 °C.

T(min)	Log NMP/g ST
0	2.48 ± 0.01
1	2.28 ± 0.35
2	2.28 ± 0.35
3	1.87 ± 0.01
5	1.87 ± 0.01
10	1.87 ± 0.01
15	1.74 ± 0.22
60	1.13 ± 0.19

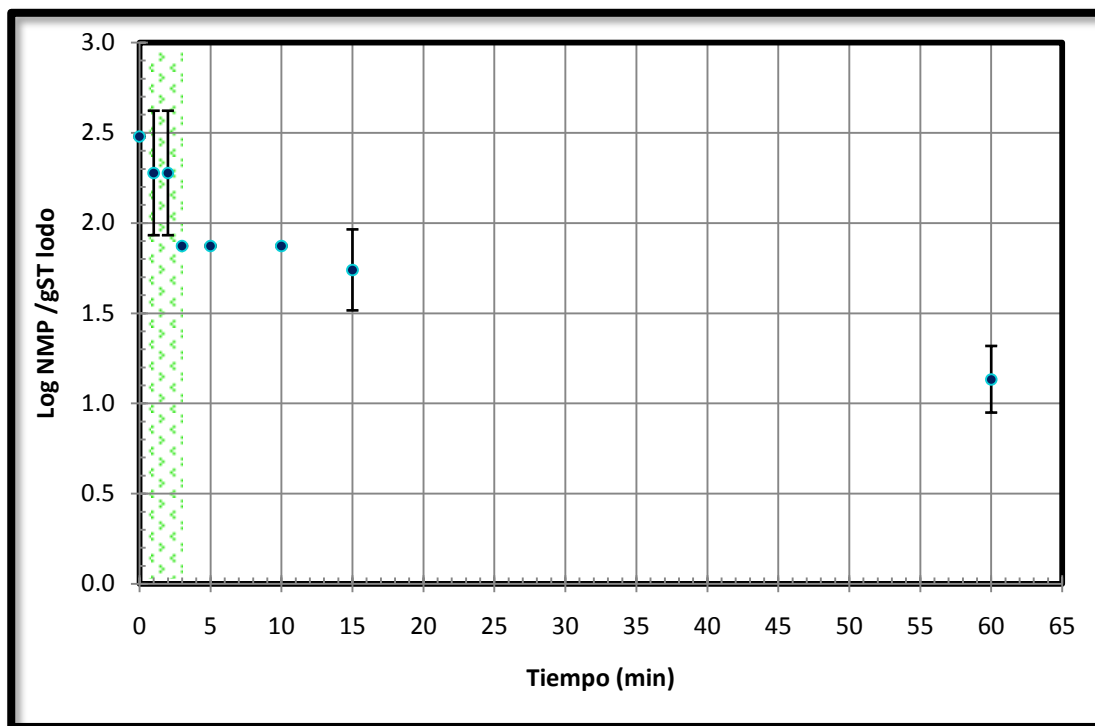


Figura 7.3 Curva de inactivación de coliformes fecales, a temperatura de 80 °C (Área sombreada final de zona de decaimiento exponencial).

Si se observa la figura 7.3 y se toma en cuenta que la concentración promedio de bacterias de coliformes fecales en el lodo crudo fue de 6.58 log NMP/gST, se puede deducir que la mayor remoción de microorganismos se llevó a cabo durante la fase no isotérmica, aproximadamente 4 log de reducción en la carga microbiana, de tal forma que lo que describe esta isoterma a 80 °C es el final de la curva de inactivación representativa para este lodo según lo previamente establecido por los ensayos a 60 y 70 °C.

En especial esta curva isotérmica muestra una forma sigmoide y los cambios en concentración de los microorganismos a través del tiempo son escalonados, no hay grandes cambios debido a que las bacterias sensibles al incremento de la temperatura ya han sido inactivadas y las remanentes presentan mucha resistencia, prueba de ello es la supervivencia de

algunas de ellas a pesar de estar sometidas durante una hora a una temperatura de 80 °C. Sin duda mediante este tratamiento térmico se alcanza la mayor remoción de coliformes fecales (5.45 log) con respecto a las otras dos temperaturas analizadas, pero tampoco se logró la eliminación total.

Bonjoch y Blanch (2009), en su trabajo de igual manera estudian la eliminación de los coliformes fecales a 80 °C y reportan que aún después de 60 minutos de exposición a esta temperatura no se alcanza la remoción total, por lo tanto hay evidencia de que lo acontecido en el presente trabajo se ha presentado también en otras investigaciones.

Análisis general de las curvas de inactivación de coliformes fecales

Todas las curvas presentadas en este apartado son isotérmicas, es decir se tomó la primer muestra una vez que se alcanzó la temperatura establecida para cada pretratamiento térmico (60 , 70 y 80 °C), de ahí la discrepancia en las cargas microbianas en el tiempo $t=0$. En la figura 7.4 se observa que al incrementar la temperatura de exposición disminuye la concentración de coliformes fecales al tiempo cero de cada isoterma $[t_0]_{60} > [t_0]_{70} > [t_0]_{80}$, lo cual como se comentó en cada una de las isotermas determina el grado de remoción alcanzada en la fase no isotérmica de cada proceso. Esta reducción en carga microbiana se justifica por el ascenso gradual de la temperatura que logra el equipo experimental en el seno del lodo que va inactivando las bacterias con mayor sensibilidad a este factor de crecimiento.

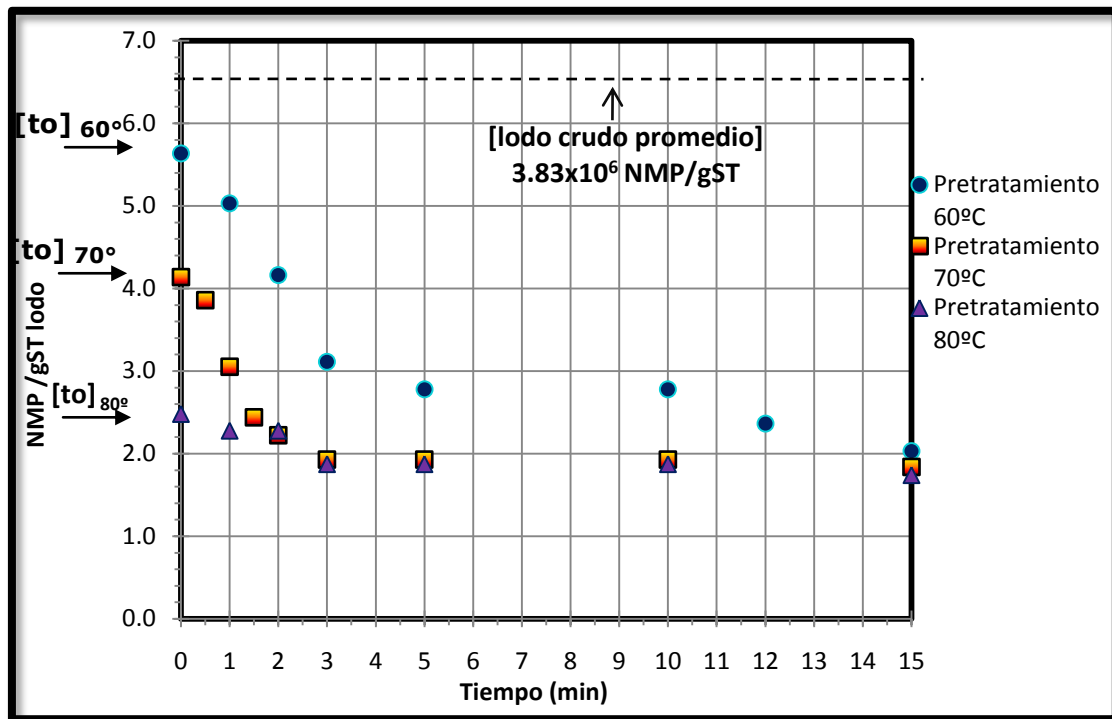


Figura 7.4 Concentración de coliformes fecales en $t=0$ en los distintos pretratamientos (Área sombreada zona de decaimiento exponencial).

Las tres curvas de inactivación generadas a partir de los resultados de los análisis microbiológicos establecidos en el Anexo B, presentan tendencias similares dado que presentan dos regiones principalmente: la primera de ellas donde se refleja la inactivación de la mayor parte de la población de coliformes fecales presentes en el lodo crudo (ver área sombreada en figuras 7.1, 7.2 y 7.3), la duración de ésta varía inversamente con respecto a la temperatura, es decir, disminuye el intervalo de tiempo en el que se presenta a medida que se incrementa la temperatura fijada para cada isoterma; la segunda es conocida como región marginal de inhibición, que es donde se observa conteos bacterianos con decrementos poco notables o bien prácticamente nulos, lo cual implica letalidad casi imperceptible (ver área sin sombreado en figuras 7.1, 7.2 y 7.3).

Para que un tratamiento térmico sea eficiente en la inactivación de patógenos y relativamente rápido, la temperatura de exposición debe rebasar la temperatura máxima de crecimiento de los microorganismos en cuestión (Carrington, 2001). Si se toma en cuenta que los coliformes fecales son capaces de fermentar lactosa a 44.5 °C y se considera que el 95% de este grupo está conformado generalmente por *Escherichia coli*, la cual tiene como temperatura máxima de crecimiento 46 °C (Madigan *et al.* 1997; Van Derlinden *et al.* 2011), se puede asumir que para estos microorganismos, la actividad biológica es alterada a partir de los 46 °C, o sea, los daños se van intensificando junto con el incremento de temperatura hasta que se presenta lisis celular o bien las bacterias quedan en un estado en el que son incapaces de crecer, sucesos representados por el término *inactivación microbiana*. Por consiguiente, al tener temperaturas de exposición superiores a los 60 °C y tomando en cuenta que se reporta que una exposición breve a 70 °C es suficiente para eliminar los patógenos de los lodos residuales (Carrington, 2001), se esperaba una inactivación total, suceso que no se presentó en ninguno de los pretratamientos pese que dentro de la región marginal de inhibición se determinaran conteos de coliformes fecales muy bajos.

En su investigación, Bonjoch y Blanch (2009) compararon la capacidad de distintos tratamientos para reducir la concentración de coliformes fecales en lodos residuales. Entre los tratamientos se encontraba la pasteurización a dos distintas temperaturas 60 °C (P60) y 80 °C (P80), el primer proceso con una duración de 90 minutos, mientras que el segundo se aplicó solo por 60 minutos. En el ensayo P60 se determinó una reducción de 5 log y para P80 se obtuvo 6 log de remoción, cabe mencionar que en ninguno de los casos se obtuvo inactivación total, resultado que concuerda con los obtenidos en este estudio.

En los trabajos de Van Boekel (2002) y Van Derlinden *et al.* (2011) se discute sobre una de las bases de la microbiología predictiva, la cual

asume a las poblaciones microbianas como sistemas homogéneos y que cada célula posee características similares de crecimiento e inactivación respecto a los demás miembros de la población. Van Derlinden *et al.* (2011) afirman que aún en una población idéntica genéticamente existe una pequeña fracción de organismos que reaccionan de forma distinta a cierto agente estresante externo, siendo capaz de sobrevivir y en casos extremos crecer. Por su parte, Van Boekel (2002), comenta la existencia de subpoblaciones microbianas con su propia cinética de inactivación incluso en poblaciones consideradas puras.

Con base en lo anterior, las características de las curvas de inactivación determinadas durante esta investigación, se pueden relacionar con la presencia de varias subpoblaciones microbianas con distintas tolerancias al incremento de la temperatura dentro del grupo de microorganismos denominado coliformes fecales. En la zona de decaimiento exponencial muere la subpoblación más sensible a la temperatura mientras que en la zona marginal se pueden identificar las bacterias con resistencia térmica incrementada.

Tal vez el factor más importante a tomar en cuenta es que en el caso particular de los lodos residuales, los microorganismos indicadores forman parte de la microbiota de los lodos residuales, un sistema microbiológico mixto, y está comprobado que en muchos casos, el crecimiento y la reproducción son más vigorosos en asociaciones favorables de dos o más tipos de organismos que en cultivos de una sola especie, debido a que los microorganismos que habitan en un ecosistema presentan varios tipos de asociaciones e interacciones entre las especies que los hacen comportarse de una forma distinta a lo esperado (Carrillo, 2003). Un claro ejemplo de esto es presentado en el trabajo de Lang y Smith (2008) donde estudiaron las cinéticas de inactivación de *Escherichia Coli* y *Salmonella* a distintas

temperaturas de exposición, comparando el comportamiento de las cepas puras con respecto a aquellas aisladas de lodo residual crudo. Una de sus conclusiones es que son las bacterias provenientes del lodo crudo las que presentan mayor resistencia al incremento de la temperatura.

Estas anomalías pueden ser asociadas a la propia naturaleza del producto a tratar, el lodo residual, un material donde se tiene una alta concentración de sólidos, que pueden de cierta forma proteger a los microorganismos, como mencionan Mocé-Llivina *et al.* (2003) ya que muchas bacterias sobreviven mejor asociadas a sólidos que cuando están suspendidas en agua. Qi *et al.* (2008) plantean que es posible que los coliformes fecales prefieran ambientes con alto contenido de sólidos debido a su mayor tolerancia a la baja actividad del agua (definida como la presión de vapor de la solución dividida por la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura), de tal forma que en el caso particular de los lodos residuales al incrementar los sólidos disminuye la presión de vapor de la solución y a su vez la actividad del agua, permitiendo que solo los microorganismos más tolerantes a ésta sobrevivan. También se puede considerar que la misma consistencia de los lodos dificulta la transferencia de energía, lo cual ocasiona la existencia de gradientes y es posible que las bacterias resistentes sean aquellas que cuentan con posiciones privilegiadas dentro de la matriz menos expuestas a la temperatura.

Peleg (2000) resalta que en todos los procesos asociados a mortalidad microbiana es inevitable tener cierto grado de supervivencia, también aborda el término de muerte absoluta ya que es más congruente pensar que se alcanzará este grado de eliminación cuando la curva de supervivencia del microorganismo sigue una cinética de primer orden o bien cuando la curva presenta concavidad negativa. Esto se explica dado que los microorganismos son afectados por una acumulación de eventos

letales que provocan que incluso los miembros más resistentes de la población finalmente mueran. Sin embargo se expone que aun no se cuenta con argumentos suficientes para negar que se alcance la muerte absoluta en casos donde las curvas presentan concavidad positiva y con una zona asintótica, pues bien este comportamiento puede ser atribuido a falta de intensidad del agente letal. Por resultar impráctico no se ha comprobado si después de un exceso de tiempo de exposición sucumben totalmente los microorganismos.

7.2.2 *Salmonella* spp.

Tabla 7.7 Datos experimentales promedio del pretratamiento a 60 °C

t(min)	Log NMP/g ST
0	5.13 ± 0.33
1	4.49 ± 0.09
2	3.92 ± 0.09
3	3.42 ± 0.49
5	2.54 ± 0.31
10	1.93 ± 0.09
15	1.93 ± 0.09
30	1.43 ± 0.62
60	1.43 ± 0.62

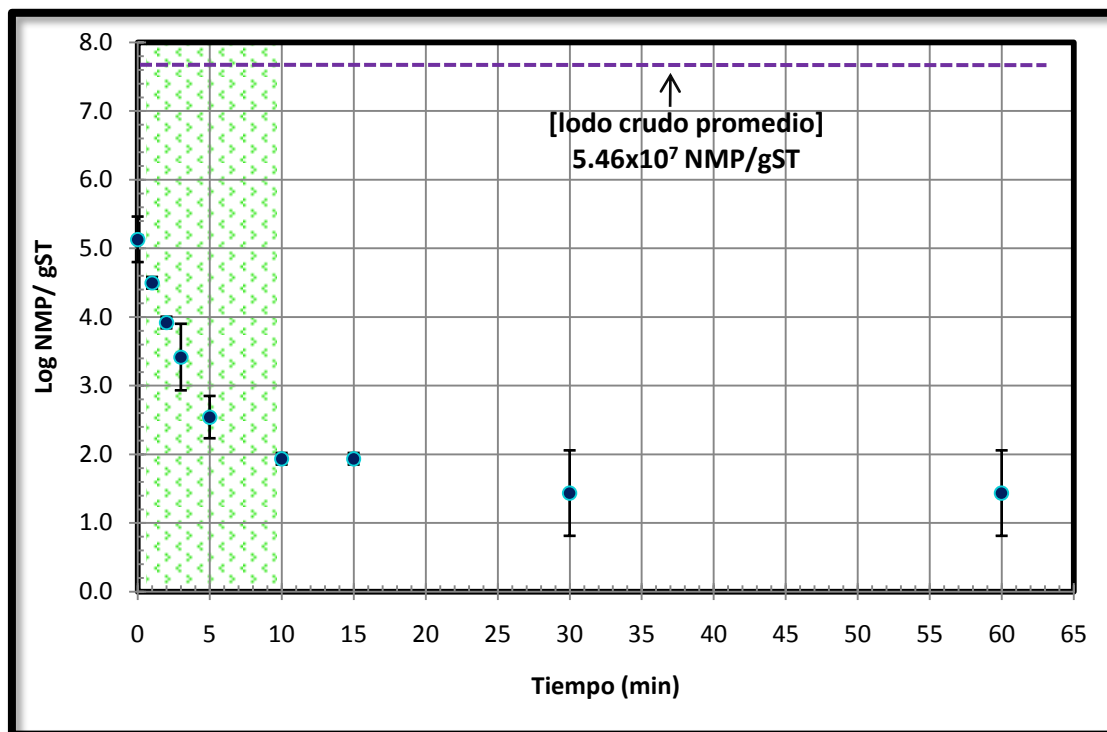


Figura 7.5 Curva de inactivación de *Salmonella* spp., a temperatura de 60 °C (Área sombreada zona de decaimiento exponencial).

Esta curva de supervivencia muestra una clara concavidad positiva pronunciada, pero es posible identificar también las dos regiones que se presentaron en la inactivación de coliformes fecales, la zona de decaimiento exponencial con un ajuste lineal casi perfecto durante los primeros 10 minutos del tratamiento térmico (*ver área sombreada figura 7.5*) y la segunda parte de la curva con comportamiento asintótico en los siguientes 50 minutos.

Por lo tanto existen miembros del género *Salmonella* spp. que mostraron capacidad de reproducirse aun después de ser sometidos una hora al tratamiento térmico de 60 °C.

A través del análisis detallado de la Figura 7.5 se puede extraer que casi la tercera parte de la remoción de *Salmonella* spp. se obtuvo durante la fase no isotérmica (2.6 log), dado que el lodo crudo contaba con un conteo de

7.73 Log NMP/gST, en la muestra a t=0 se determinó la presencia de 5.13 Log NMP/gST y en el proceso completo se logró 6.3 log de reducción en este indicador. Esto es congruente con lo reportado por Romdhana, *et al.* (2009), pues se menciona que al alcanzar los 50 °C se afecta la integridad de las bacterias y con 30 minutos de exposición a esa temperatura se disminuiría notablemente la población de *Salmonella* spp.

Tabla 7.8 Datos experimentales promedio del pretratamiento a 70 °C

t(min)	Log NMP/g ST
0	4.84 ± 0.07
1	1.84 ± 0.07
3	1.84 ± 0.07
5	1.84 ± 0.07
15	1.90 ± 0.05
30	0.95 ± 0.07
60	0.95 ± 0.07

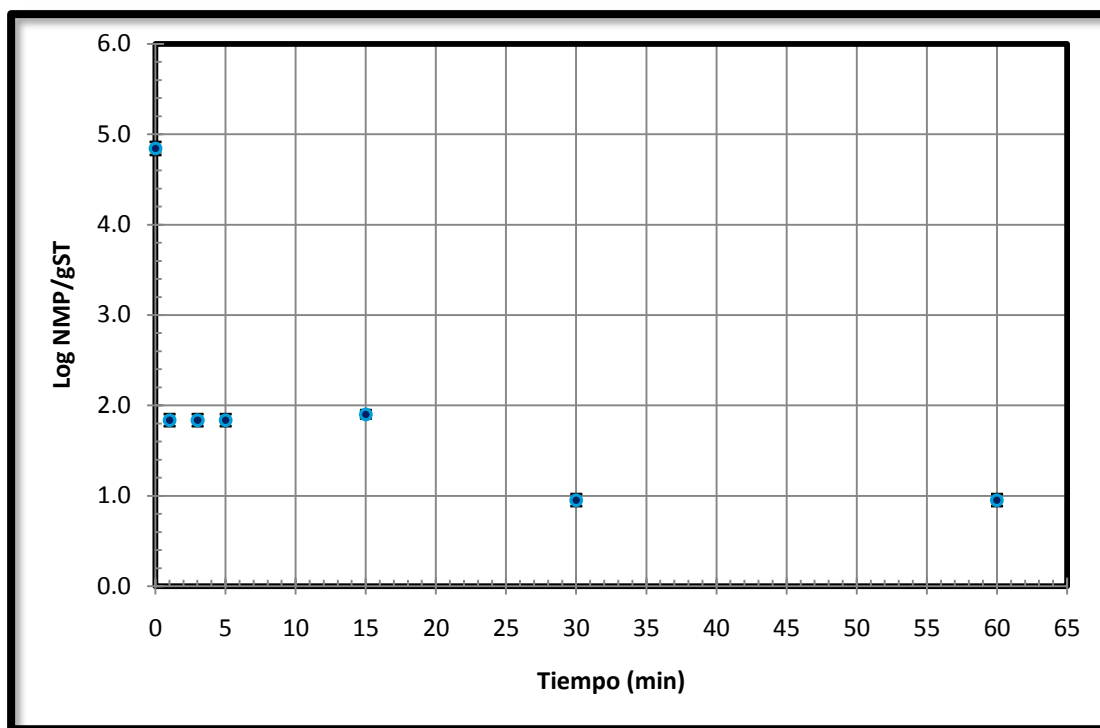


Figura 7.6 Curva de inactivación de *Salmonella* spp., a temperatura de 70 °C

La figura 7.6 muestra un decaimiento de *Salmonella* spp. de tipo escalonado, hay un cambio abrupto de concentración de microorganismos del punto inicial de la curva al primer minuto de tratamiento a 70 °C (una reducción de 3 Log), lo cual no precisamente revela la severidad del tratamiento a esta temperatura pero sí indica que es en la fase de ascenso de temperatura donde se lesionaron inexorablemente los microorganismos ocasionado esa súbita caída. La técnica microbiológica empleada (Anexo C), en general, no es lo suficiente sensible para captar el cambio en la población de *Salmonella* spp. en ese intervalo menor a 1 minuto; porque el método de detección de prueba positiva es mediante el vire del medio Selenito Cistina (tono ámbar) a color naranja intenso. Al tratarse de una evaluación visual no se identificó cambio notable entre las muestras analizadas en el mencionado intervalo. Después de esa importante disminución, la carga microbiana se mantiene constante durante los

siguientes 14 minutos para luego presentar un último decremento que de igual forma se mantiene hasta completar los 60 minutos de tiempo de exposición. Esta curva en especial no concuerda completamente con las tendencias mostradas con anterioridad, de ahí que se asocie esto a la falta de sensibilidad de la técnica empleada, aunque mantiene en común la supervivencia de algunos miembros de la población de *Salmonella* spp. Con respecto al proceso completo, se logra una reducción de 6.78 Log quedando muy próxima a la inactivación total de este indicador.

Análisis general de las curvas de inactivación de *Salmonella* spp.

En el caso de *Salmonella* spp. sí se llegó a determinar la inactivación total en el pretratamiento térmico a 80 °C, o mejor dicho el lodo se sometió al calentamiento acostumbrado solo que una vez que se alcanzó la temperatura de 80 °C ya no se encontró presencia de este microorganismo en ninguno de los tiempos consecuentes. Este resultado se corroboró por medio de otras 3 réplicas con intervalo de muestreo más amplio, llegando a la misma conclusión. Por lo tanto, el ascenso de temperatura a 80°C es suficiente para inactivar *Salmonella* spp. Si se analiza lo acontecido en los dos tratamientos previos (60 °C y 70 °C) se nota claramente la sensibilidad a la temperatura de este microorganismo indicador, pues desde el primer proceso es en la fase no isotérmica donde se logra una importante disminución, y es en el tratamiento a 70 °C donde se nota la mayor reducción desde el primer minuto de exposición. La literatura marca que este grupo de microorganismos presenta un intervalo amplio de crecimiento, que va desde los 2 °C hasta los 54 °C (Spector y Kenyon, 2011), por consiguiente también resulta inesperada esta tolerancia a 70 °C.

Es válido adjudicar este comportamiento de resistencia a los mismos factores argumentados para la supervivencia de los coliformes fecales,

dado que se trata de la misma muestra de lodo y tanto la naturaleza del medio como la existencia de interacción entre las diversas especies de microorganismos presentes interfieren de forma similar en el desarrollo del género *Salmonella* spp. (Bermúdez-Aguirre y Corradini, 2011).

Unas de las peculiaridades de este género es que está integrado por microorganismos resistentes que se adaptan fácilmente a las condiciones extremas del medio y que son capaces de permanecer en un estado de inactividad y retornar a estado activo una vez que se presentan las condiciones favorables para su crecimiento (Bermúdez-Aguirre y Corradini, 2011). Se han estudiado varias especies que lo conforman, identificando algunas con mayor capacidad que otras para generar resistencia a ciertos factores de crecimiento, como por ejemplo *Salmonella senftenberg* es la más termotolerante del género (Horan *et al.*, 2004) y su sola presencia junto con otras serovariedades incrementa considerablemente la termo resistencia general de *Salmonella* spp. (Silva y Gibbs, 2011).

Por otra parte, si se comparan los resultados aquí encontrados con los presentados en el trabajo de Martínez, (2009) resultan una vez más muy distintos entre sí, pues en esa investigación los tratamientos térmicos desde los 60 minutos a 60 °C se reporta como no detectable *Salmonella* spp., aunque se debe recordar que en los procesos de inactivación la cantidad de microorganismos inicial es una variable importante (Juneja *et al.*, 2001) y en el lodo empleado en el trabajo de Martínez, se tenía un conteo de este indicador de 4.54 log NMP/gST, que está casi 3 log por debajo de la carga microbiana determinada en esta investigación.

Son varios los estudios que concuerdan en que el principal factor que interviene en la inactivación térmica de las bacterias es el tipo de medio en el que se encuentran así como de su composición, pero es el estudio realizado por Juneja *et al.*, (2001) el cual enfatiza que es el alto contenido

en grasa lo que promueve la tolerancia a altas temperaturas de distintas cepas de *Salmonella* spp., llegan a esta conclusión con validez estadística por medio de la variación del nivel de grasa y variación de la temperatura (58-65 °C), generaron curvas de inactivación para cada una de las distintas cepas, encontrando curvas cóncavas con una zona lag inicial (hombro) misma que se extiende a medida que se incrementa el nivel de grasas en el medio (carne de ave de corral).

En el trabajo de Buzrul y Alpas (2007) se analizan las curvas de supervivencia de algunos de los microorganismos asociados a las enfermedades más comunes por contaminación de alimentos, entre estos se encuentran *Salmonella typhimurium* y *S. enteritidis*. En ese trabajo, ambas fueron sometidas a una temperatura de 60 °C, y pese a que se trataban de cepas puras y el medio en el que se encontraban dispersas era solución peptonada, presentaron curvas sigmoideas parecidas a la figura 7.5 de esta investigación. Además, sus resultados concuerdan con el hecho de que en el tiempo de estudio no presenta inactivación absoluta. Aunque en ese trabajo no se discute sobre este término, sí se declara que el comportamiento térmico será muy diferente cuando las bacterias se han adaptado a ciertas condiciones de estrés dependiendo del producto en el que se encuentren a cuando éstas han crecido en ambientes de laboratorio controlados.

Así como existen trabajos donde la inactivación de *Salmonella* spp. se ha ajustado al modelo tradicional de primer orden, hay muchos otros en los que se demuestra la no-linealidad en algunos alimentos y soluciones (Silva y Gibbs, 2011), tal fue el caso de los trabajos citados anteriormente.

La influencia del estado fisiológico del organismo en la generación de resistencia a ciertos agentes letales se analizó en la investigación realizada por Leyer y Johnson (1993); en ésta concluyen que la exposición breve de

Salmonella typhimurium a medios ligeramente ácidos desencadena una compleja respuesta de ácido-tolerancia que potencia la supervivencia del microorganismo en medios sumamente ácidos, amplía su termotolerancia y su resistencia a varias condiciones ambientales adversas. Se discute que la adaptación a la acidez altera el metabolismo de las células, induciendo simultáneamente la síntesis de varias proteínas que le permiten su supervivencia a temperaturas mayores de 50 °C a diferencia de aquellas bacterias no adaptadas. Lo discutido apoya que el entendimiento de los mecanismos de adaptación así como el conocimiento del estado fisiológico del microorganismo estudiado es crítico para la apropiada evaluación de su supervivencia.

Es en la recopilación literaria de Spector y Kenyon (2011) donde se concluye que *Salmonella* spp. y otras bacterias cuentan con mecanismos evolucionados de resistencia que han sido generados como respuesta a la exposición a niveles sub-letales de estrés, que permiten un incremento en su capacidad de supervivencia cuando éstas son expuestas a niveles más potentes del agente letal. Además, estas bacterias cuentan con mecanismos evolucionados inducidos por un tipo de estrés que les permite también resistir la severidad de otros tipos de estrés aparentemente sin relación alguna, apoyando lo argumentado por Leyer y Johnson (1993).

Finalmente, con base en todo lo mencionado en este apartado, se puede decir que son estas respuestas al estrés las que permiten al microorganismo anticipar y prepararse para soportar futuros ambientes desfavorables, incrementando su probabilidad de supervivencia. Muy probablemente los microorganismos inmersos en las muestras analizadas en este estudio contaban con esa evolución de sus mecanismos de respuesta y de ahí su termotolerancia incrementada.

7.3 Cinéticas de inactivación

Una vez que se analizaron las curvas de inactivación de los indicadores microbiológicos en lodos residuales establecidos por la normatividad mexicana vigente, se buscó un modelo matemático que resultara conveniente para representar el comportamiento de estos microorganismos ante los distintos incrementos de temperatura, con el fin de describir el proceso térmico, permitir la interpolación entre puntos de datos y predecir respuestas para condiciones no estudiadas.

Entre las distintas funciones matemáticas que se ajustaron a las curvas de inactivación térmicas generadas en el presente trabajo se encuentran las siguientes:

- Cinética de primer orden

$$\log S(t) = \log \frac{N}{N_0} = -\frac{t}{D} \quad (7.1)$$

- Modelo de distribución Weibull

$$\log S(t) = -\frac{1}{2.303} \left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta \quad (7.2)$$

- Modelo empírico curva tipo C (Peleg *et al.*, 1999)

$$\log S = -c_1 t^{n_1} - c_2 t^{n_2} \quad (7.3)$$

- Modelo empírico curva tipo C (Peleg *et al.*, 1999)

$$\log S = \frac{-c_3 t^{n_3}}{(1+c_4 t^{n_4})}, n_3 > n_4 \quad (7.4)$$

Con el apoyo del software Mathematica 7.0 se calcularon los valores del coeficiente de determinación múltiple R^2 , y por medio de éstos se determinó cual de los modelos describía mejor los datos experimentales.

El modelo cinético de primer orden solo se pudo ajustar a los primeros minutos de exposición de los tratamientos, es decir a las zonas lineales de cada curva. Es importante mencionar que pese a la predominancia de la no-linealidad en los procesos de inactivación, muchos autores continúan calculando los parámetros **D** y **z** para diversos microorganismos con tan sólo el número de datos que se ajusta a la zona lineal de la curva (Bermúdez-Aguirre y Corradini, 2011). Sin embargo; el grado de error que implican estos valores dependerá de las características de las curvas determinadas, de ahí que su cálculo quede a consideración del autor. En relación con lo aquí determinado (*ver figuras 7.1, 7.2, 7.3, 7.5 y 7.6*) la zona lineal al tratarse solo de una pequeña porción de la curva de supervivencia, no proporciona elementos de peso para calcular los parámetros asociados a esta función, pues dada la naturaleza de la curva encontrada si se emplearán éstos valores provocarían un considerable subprocesamiento del lodo residual (*ver figura 7.7*).

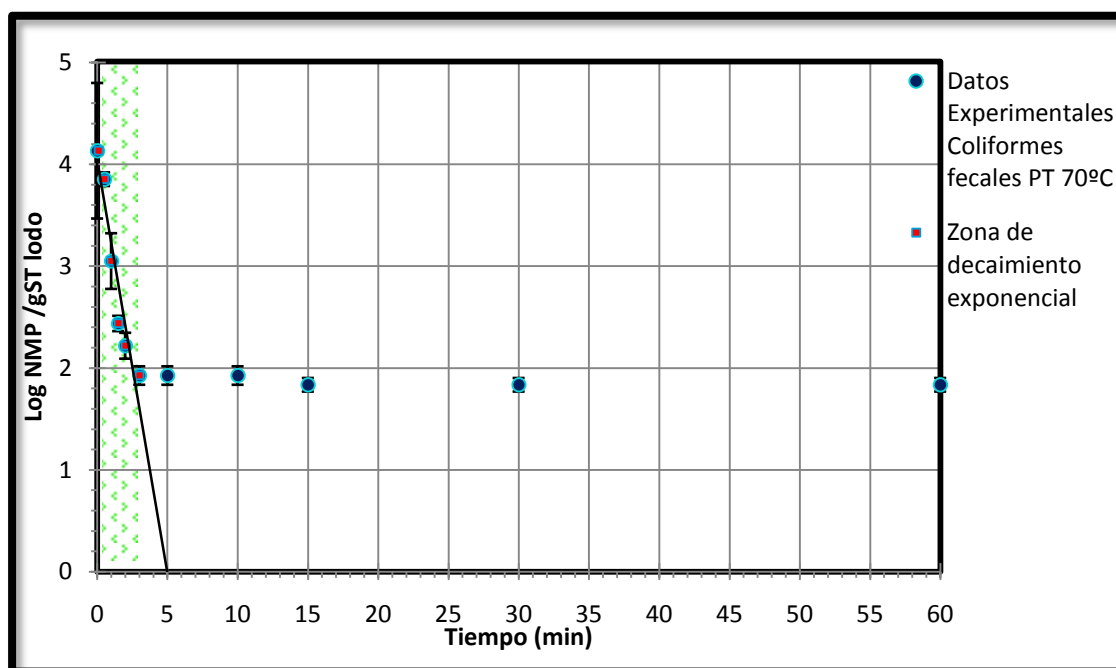


Figura 7.7 Ejemplo de ajuste del modelo de primer orden para la inactivación de coliformes fecales a temperatura de 70 °C.

Por otra parte, a pesar de que la función de Weibull resultó apropiada para modelar cinéticas de inactivación que contienen regiones con cola (cóncavas hacia arriba), no se logró un buen ajuste, debido a que el modelo matemático no describió adecuadamente la zona de decaimiento exponencial (Ver figura 7.8). Sin embargo, esta función representa más adecuadamente los datos experimentales en comparación con el ajuste del modelo de primer orden.

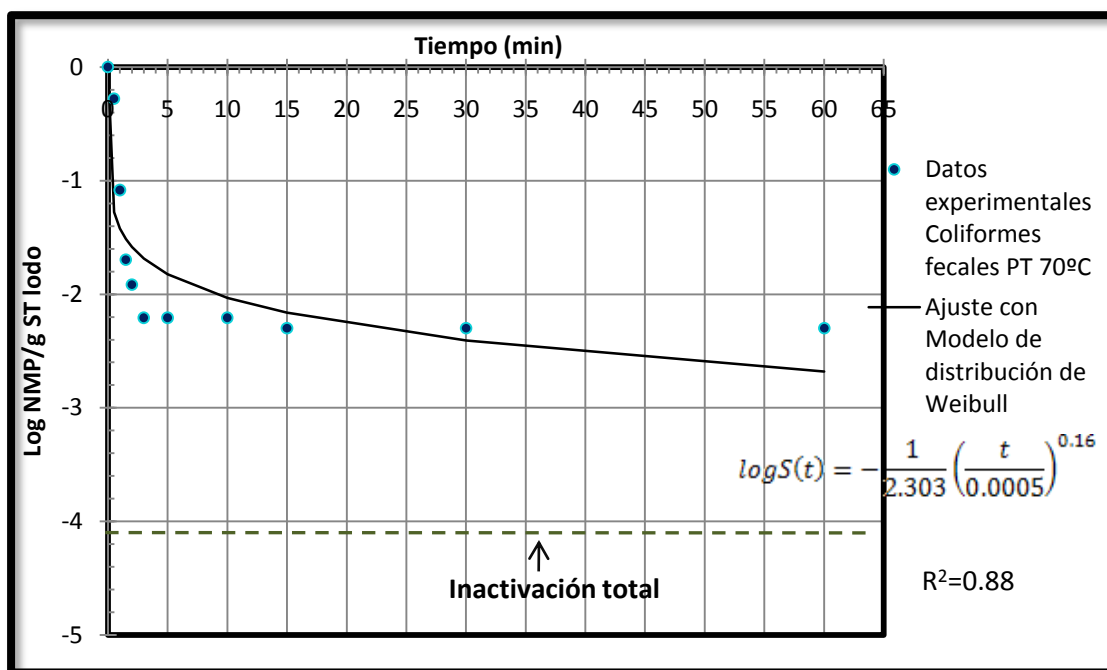


Figura 7.8 Ejemplo de ajuste del modelo de distribución de Weibull para la inactivación de coliformes fecales a temperatura de 70 °C.

Finalmente se requirió aplicar los modelos empíricos más elaborados, y aunque los dos modelos mencionados en las ecuaciones (7.3) y (7.4) son indicados para curvas sigmoideas, fue el segundo el más apropiado según sus coeficientes de determinación múltiple R². Los parámetros del modelo (7.4) se obtuvieron por medio de regresión no lineal por mínimos cuadrados y se muestran recopilados en la tabla 7.9. En la mayoría de las curvas se logró representar satisfactoriamente los resultados experimentales aquí generados. A continuación se presentan las curvas de inactivación junto con su modelo cinético particular.

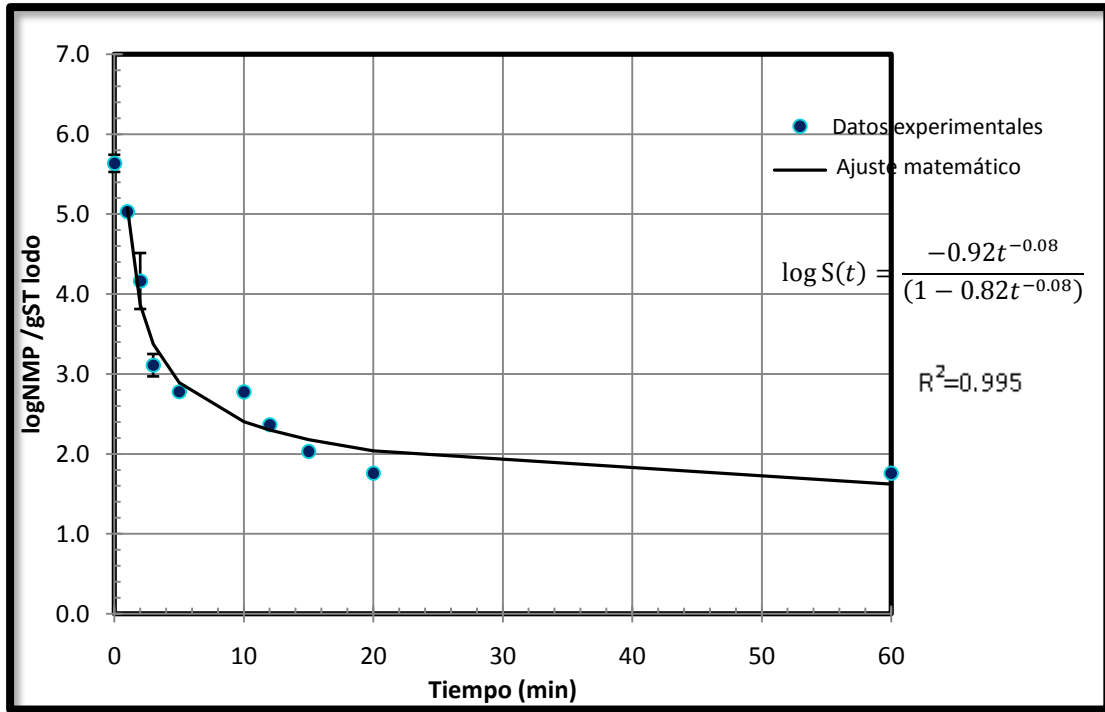


Figura 7.9 Cinética de inactivación de coliformes fecales, a temperatura de 60 °C.

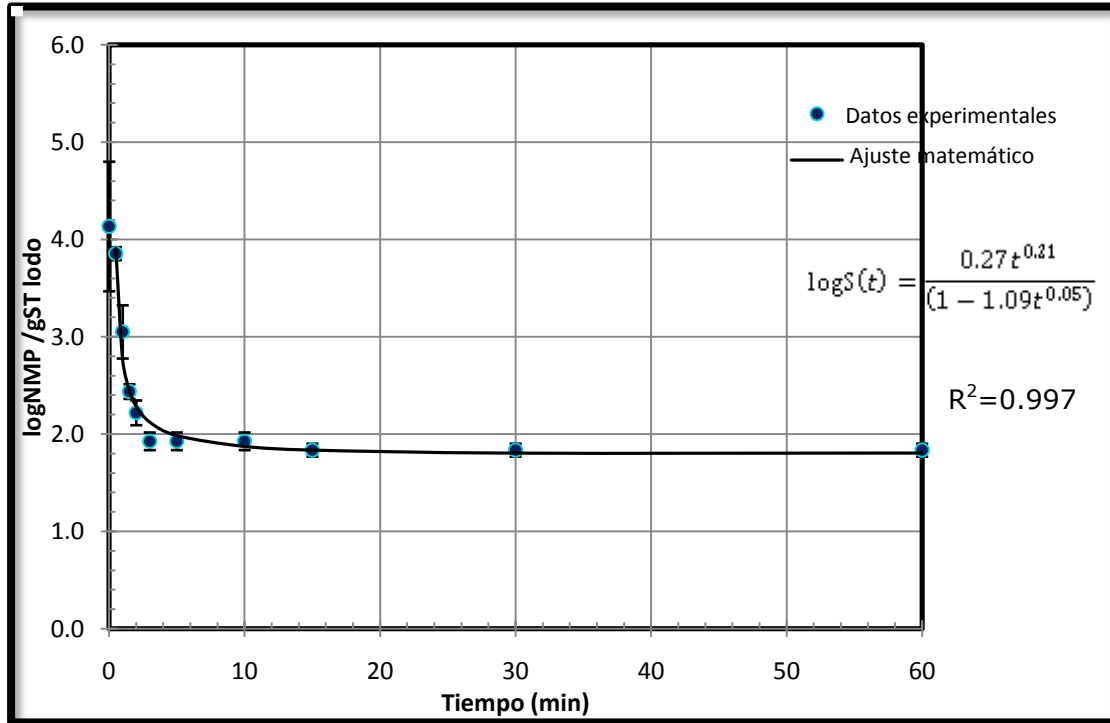


Figura 7.10 Cinética de inactivación de coliformes fecales, a temperatura de 70 °C.

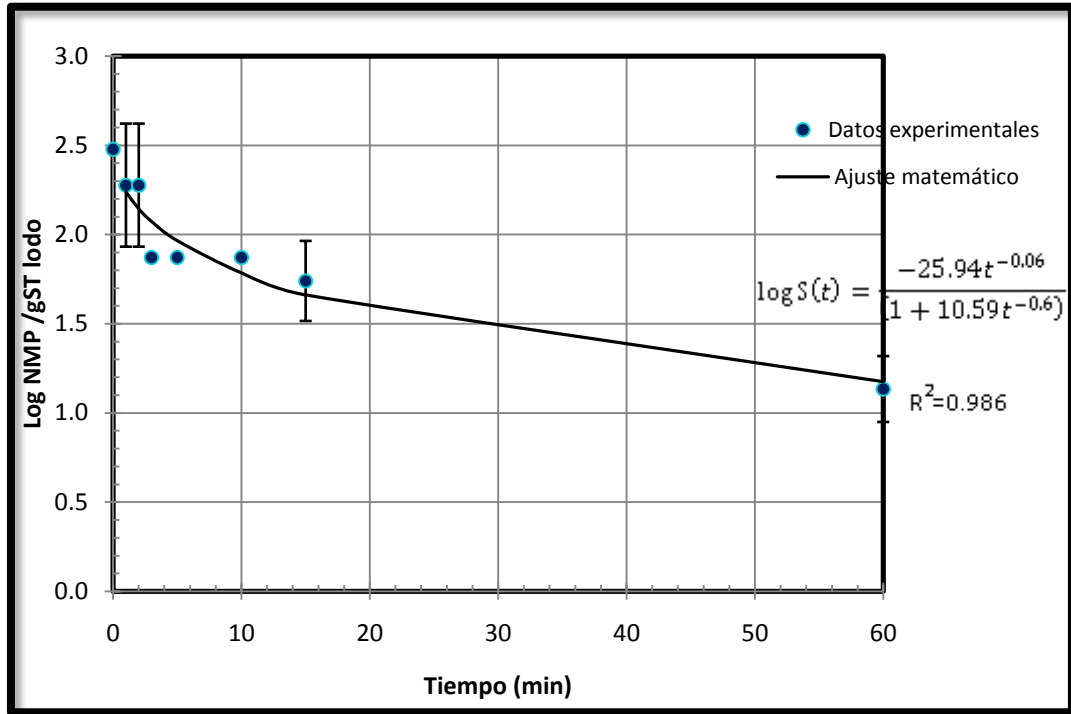


Figura 7.11 Cinética de inactivación de coliformes fecales, a temperatura de 80 °C.

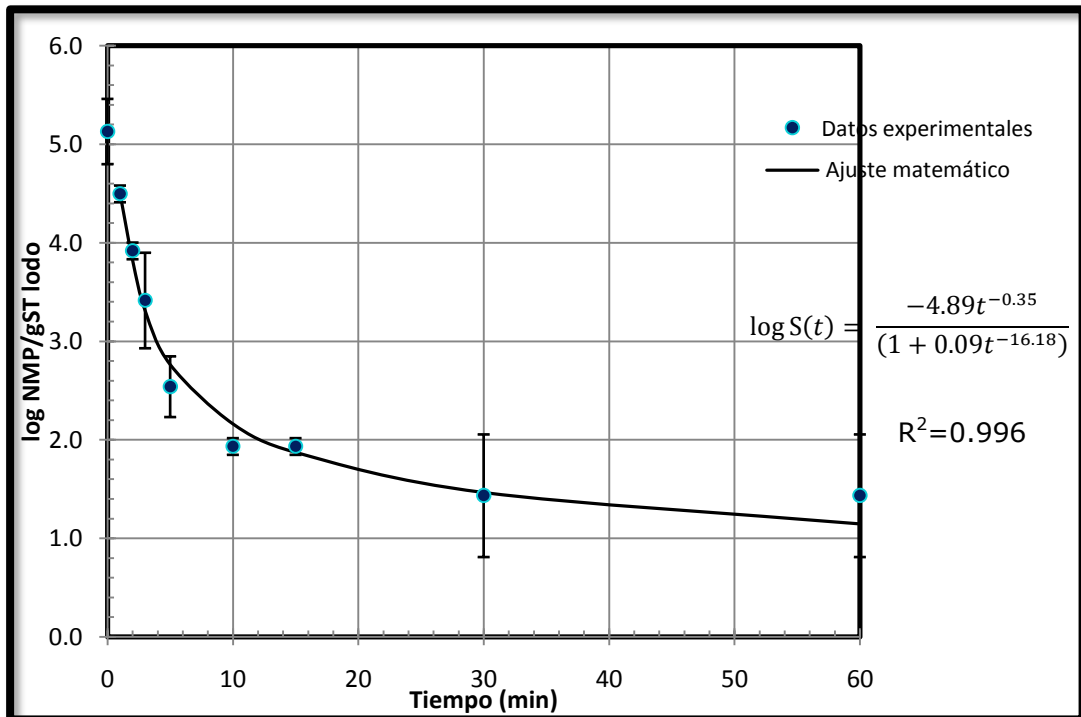


Figura 7.12 Cinética de inactivación de *Salmonella* spp., a temperatura de 60 °C.

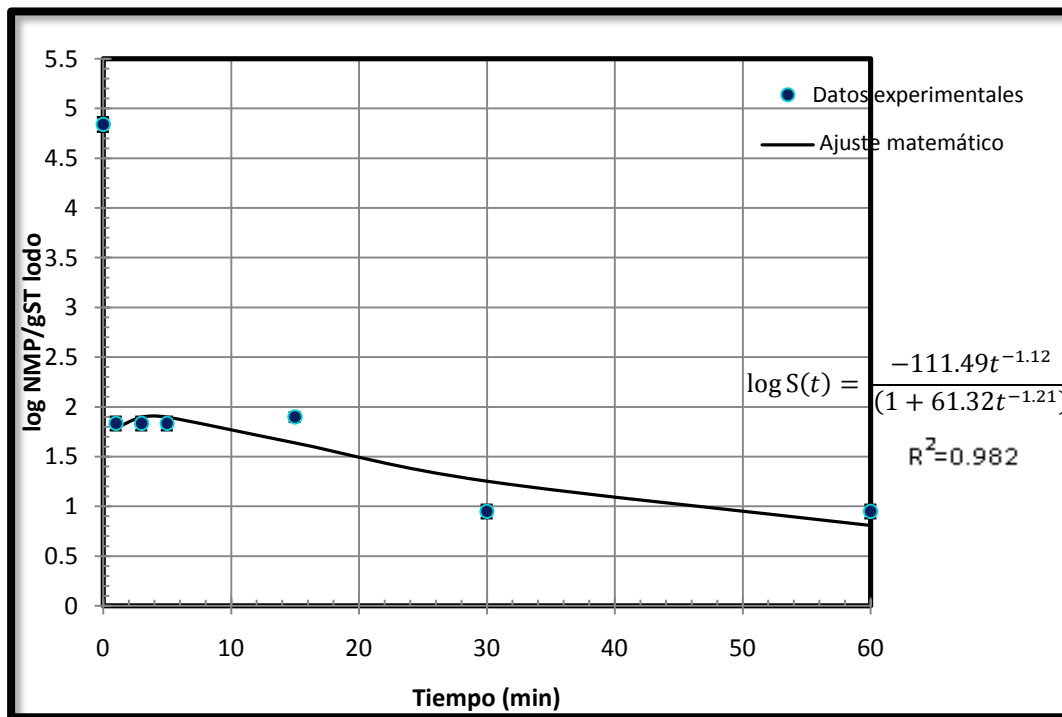


Figura 7.13 Cinética de inactivación de *Salmonella* spp., a temperatura de 70 °C.

Tabla 7.9 Compendio de coeficientes numéricos de las distintas cinéticas de inactivación

Microorganismo indicador	T°C	c ₃	c ₄	n ₃	n ₄	R ²
Coliformes fecales	60	0.92	-0.82	-0.08	-0.08	0.995
	70	-0.27	-1.09	0.21	0.05	0.997
	80	25.94	10.59	-0.06	-0.6	0.986
<i>Salmonella</i> spp.	60	4.89	0.09	-0.35	-16.18	0.996
	70	111.49	61.32	-1.12	-1.21	0.982

7.4 Curvas de penetración de calor

Un aspecto relevante en esta investigación fué que las inactivaciones térmicas de los microorganismos fueron realizadas en el "Termohidrolizador de lodos", dispositivo que funciona de forma similar a un equipo con éstos propósitos a nivel industrial, es decir, presenta una etapa inicial de calentamiento donde la temperatura aumenta desde la temperatura inicial del lodo hasta una temperatura previamente establecida para el pretratamiento (T_{PT}). Esta etapa es seguida de un segundo periodo durante el cual se mantiene constante la temperatura (T_{PT}) durante un intervalo de tiempo también previamente establecido (t_{PT}).

Con el fin de contribuir al entendimiento de las curvas de inactivación generadas, se midieron los perfiles de ascenso de temperatura en el lodo residual para los tres distintos procesos térmicos aplicados (figura 7.14). Estos perfiles también resultan de gran utilidad porque reflejan la penetración del calor a través del medio donde se encuentran suspendidas las bacterias objeto de estudio, siendo una herramienta indispensable para la construcción de un solo modelo matemático que relacione la inactivación de los microorganismos con la transferencia de energía en el medio, donde generalmente se busca que el proceso dure lo suficiente como para que en el punto más frío del producto se alcance la remoción deseada. Ejemplo de este tipo de modelación es el trabajo realizado por Chen *et al.*, 2011.

Además, mediante estas determinaciones es posible inferir el valor del CUT (por sus siglas en inglés, come up time), término empleado en los procesos de pasteurización, que representa el tiempo que se requiere en el producto para alcanzar la temperatura establecida del tratamiento térmico. Este depende de las propiedades de transferencia de calor del producto, de la tecnología y medio de calentamiento (Silva y Gibbs, 2011). Mediante la

observación de la Figura 7.14 el valor del CUT en estos tres pretratamientos varía de entre los 25-30 minutos.

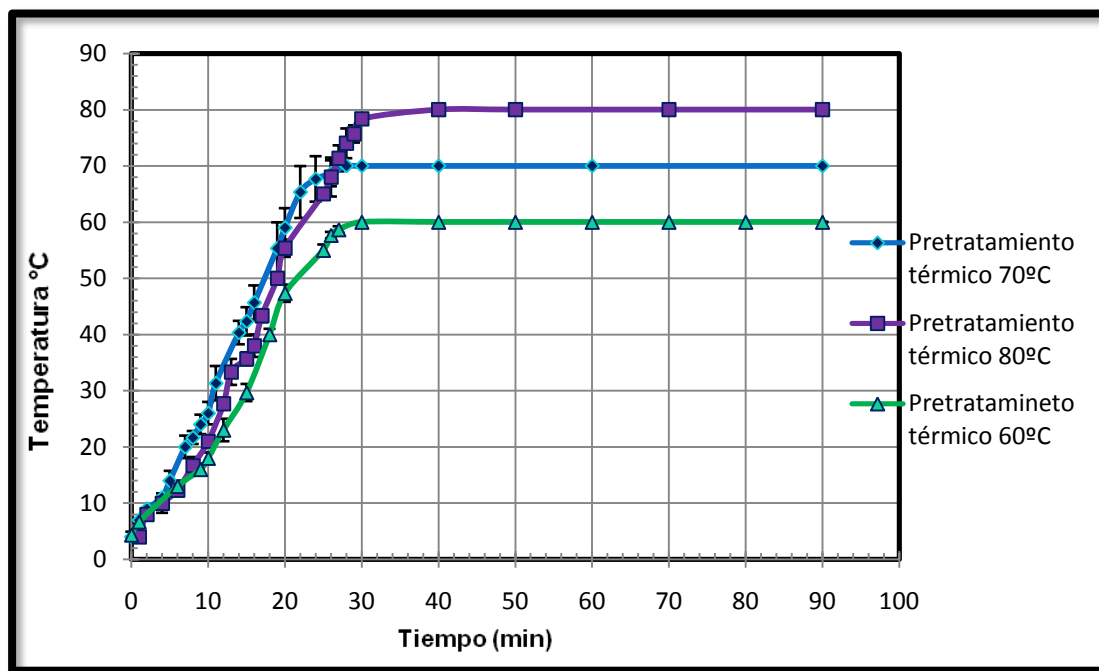


Figura 7.14 Curvas de penetración de calor para los distintos procesos térmicos aplicados.

7.5 Curvas completas de inactivación para Coliformes fecales

Con el fin de esclarecer un poco más el decaimiento de los microorganismos por la influencia de la temperatura, se realizaron muestreos durante la zona no isotérmica del proceso térmico así como en la fase donde la temperatura permanece constante, para obtener la curva de inactivación completa. Lo anterior se decidió aplicar para los casos en los que se encontró remoción significativa de microorganismos en la región de ascenso de la temperatura, tal es el caso del pretratamiento a 70 °C y principalmente a 80 °C. Estas pruebas se realizaron únicamente para coliformes fecales, ya que las pruebas analíticas para su determinación a lo largo de la experimentación mostraron ser lo suficientemente sensibles para su correcta cuantificación.

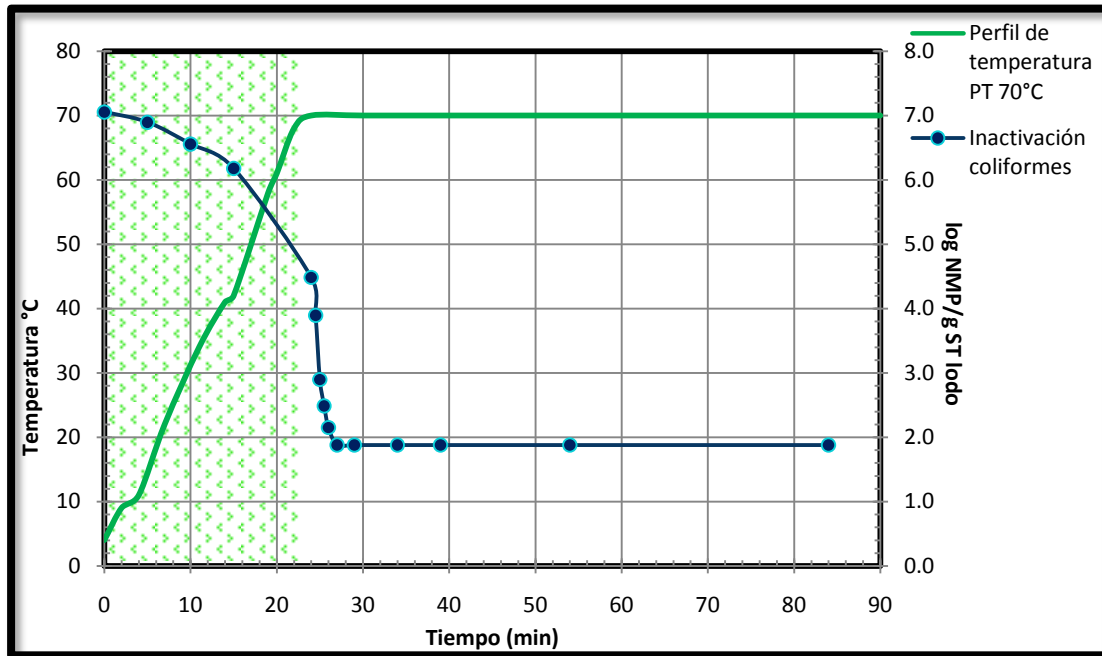


Figura 7.15 Curva completa de inactivación para coliformes fecales a temperatura de 70 °C (Área sombreada zona no isotermica).

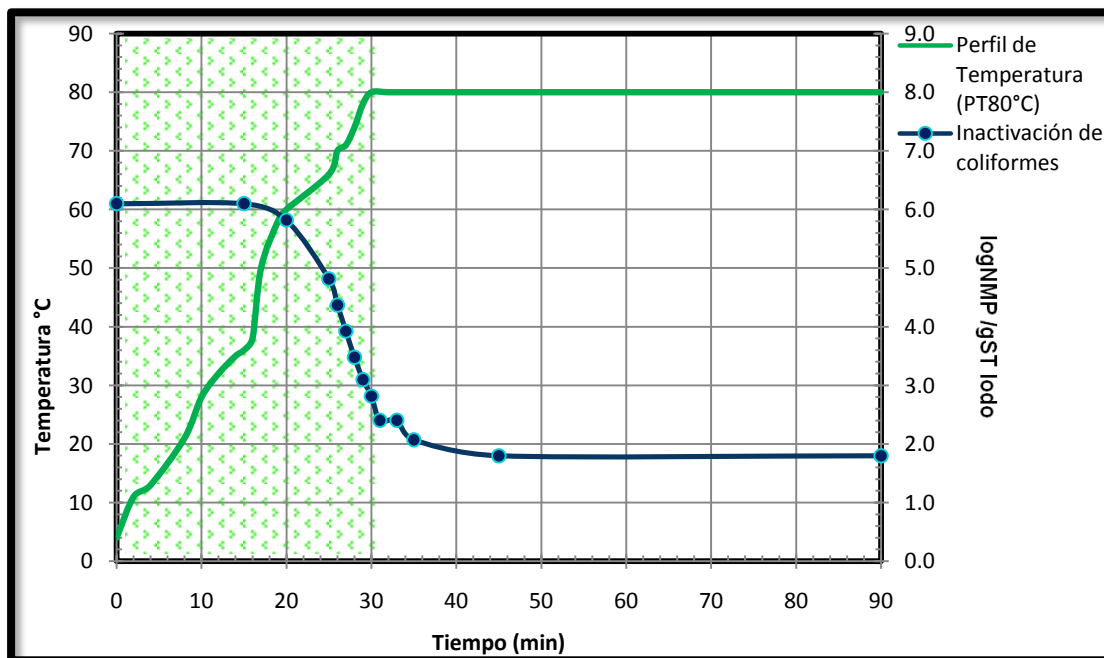


Figura 7.16 Curva completa de inactivación para coliformes fecales a temperatura de 80 °C (Área sombreada zona no isotermica).

Estas curvas de supervivencia reflejan la existencia de tres zonas, aspecto que no se logró distinguir en las gráficas generadas con solo el monitoreo de la zona isotérmica. La primera región es la que comúnmente se conoce como "hombro" o "periodo inicial lag" y es donde se observa que las células comienzan a sentir el efecto y declinan poco a poco, estadísticamente indica la acumulación del efecto letal que posteriormente desencadena el decaimiento acelerado de la población más susceptible (López-Malo *et al.*, 2002); finalmente, son las subpoblaciones más resistentes las que continúan presentes en el lodo sucumbiendo de una forma casi imperceptible.

Como se esperaba, la inactivación de los coliformes fecales no es acelerada desde el inicio, sino después de alcanzar la temperatura aproximada de 50 °C (*ver figuras 7.15 y 7.16*), lo cual es totalmente congruente, en primer lugar porque sobrepasa los 46 °C, temperatura marcada por la literatura como límite máximo de crecimiento para este tipo de microorganismos (Madigan *et. al.* 1997; Van Derlinden *et. al.* 2011); y en segunda instancia, por lo manifestado en el trabajo de Prorot *et al.* (2011), donde llegan a la conclusión que a partir de los 50 °C es cuando se presentan los procesos de solubilización y destrucción de flóculos. Estos autores, por medio del estudio de la integridad de las membranas, también concluyen que a partir de esta temperatura se presenta mayor evidencia de lisis celular.

En conjunto, todo lo discutido en este apartado refuta el hecho de que todas las células tienen idéntica resistencia a la temperatura y que cada microorganismo tiene la misma probabilidad de morir, por consiguiente implica que hay variación biológica, o en otras palabras, existe heterogeneidad entre las células de una población de un mismo tipo de microorganismo (Van Boekel, 2002).

7.6 Evolución del lodo pretratado en un digestor anaerobio.

Este estudio tuvo como finalidad identificar las condiciones de operación del pretratamiento térmico que permitieran la mayor eficiencia en remoción de patógenos en el lodo residual, para ser sometido posteriormente a un proceso de digestión anaerobia mesofílica y así buscar la producción de biosólidos clase A, según lo estipulado en la normatividad mexicana vigente.

Con respecto a los resultados determinados en esta investigación, la mayor inactivación de microorganismos patógenos se obtuvo a una temperatura de 80 °C y 1 hora de exposición; sin embargo, se decidió evaluar también las condiciones de operación de 70 °C y 1 hora de pretratamiento.

En un estudio paralelo al presente trabajo, se monitorearon los parámetros microbiológicos durante la etapa de la digestión anaerobia mesofílica, encontrando en ambos casos recrecimiento dentro de los digestores tanto de coliformes fecales como de *Salmonella* spp. Al parecer, la exposición a estas dos distintas temperaturas resultó insuficiente para inactivar completamente los microorganismos patógenos, permitiendo que los organismos sobrevivientes se reprodujeran al estar inmersos en un medio con condiciones favorables para su crecimiento. Lo anterior concuerda con lo reportado por Martínez (2009), descartando de esta manera la hipótesis sobre una posible contaminación durante el proceso de digestión y reafirmando la necesidad de continuar desarrollando el tren de tratamiento de los lodos residuales.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

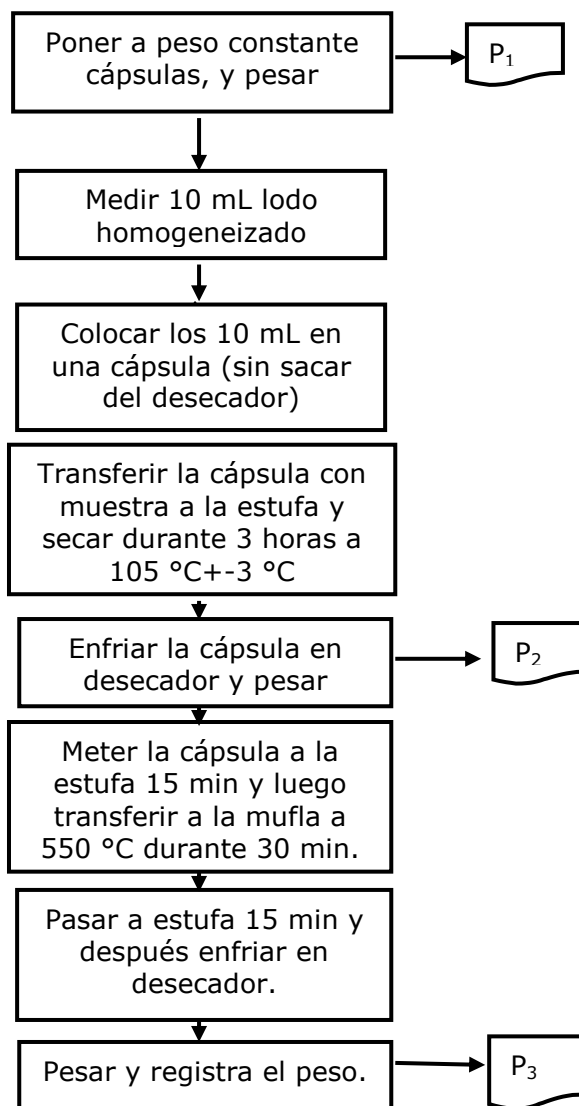
8.1 Conclusiones

1. Se lograron obtener las cinéticas de inactivación para coliformes fecales a las tres diferentes temperaturas de exposición (60 °C, 70 °C y 80 °C). Para *Salmonella* spp. solo se determinaron las cinéticas a 60 °C y 70 °C, debido a que a 80 °C se logró la eliminación total de este indicador microbiológico.
2. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportados en la literatura, debido a que a partir de una temperatura de 50 °C se afecta la integridad de las bacterias estudiadas. Como consecuencia se presentó una importante remoción en la carga microbiana durante la fase no isotérmica de todos los pretratamientos térmicos estudiados.
3. El pretratamiento a 60 °C logró una inactivación promedio de 4.82 log en la población de coliformes fecales, y de 6.3 log para *Salmonella* spp.
4. En el caso del pretratamiento térmico a 70 °C se disminuyó en 4.74 log de coliformes fecales y 6.78 log de *Salmonella* spp., este último cercano a la inactivación total.
5. A 80 °C se logró la reducción de 5.45 log de coliformes fecales, no alcanzando la inactivación total, mientras que si se obtuvo para *Salmonella* spp. desde que se alcanzó la temperatura del tratamiento. Por consiguiente, si se desea la máxima remoción de patógenos del lodo residual, éste es el pretratamiento térmico más adecuado con respecto a los estudiados en este trabajo.
6. En todas las cinéticas de inactivación generadas, ya sea para coliformes fecales como para *Salmonella* spp., se identificó una pequeña proporción de microorganismos que presentaron resistencia térmica incrementada, lo que posiblemente les permitió sobrevivir pese a las distintas condiciones de tiempo y temperatura de exposición analizadas.

8.2 Recomendaciones

1. Realizar una comparación entre los métodos microbiológicos empleados en este trabajo (estipulados por la NOM-004-SEMARNAT-2002) con respecto a otros métodos de cuantificación de los microorganismos (coliformes fecales y *Salmonella* spp.).
2. Se debe profundizar en el estudio de la fase no isotérmica del proceso, y su efecto de inactivación sobre los microorganismos, lo cual podría representar otra opción viable de tratamiento térmico.
3. Desarrollar la modelación matemática que relacione la inactivación de los microorganismos con la transferencia de energía en el lodo residual.
4. Es necesario evaluar el daño ocasionado por el tratamiento térmico a los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia mesofílica y dar seguimiento al posible recrecimiento de coliformes fecales y *Salmonella* spp. durante esta etapa posterior.

ANEXO A. SÓLIDOS TOTALES TOTALES, VOLÁTILES Y FIJOS.



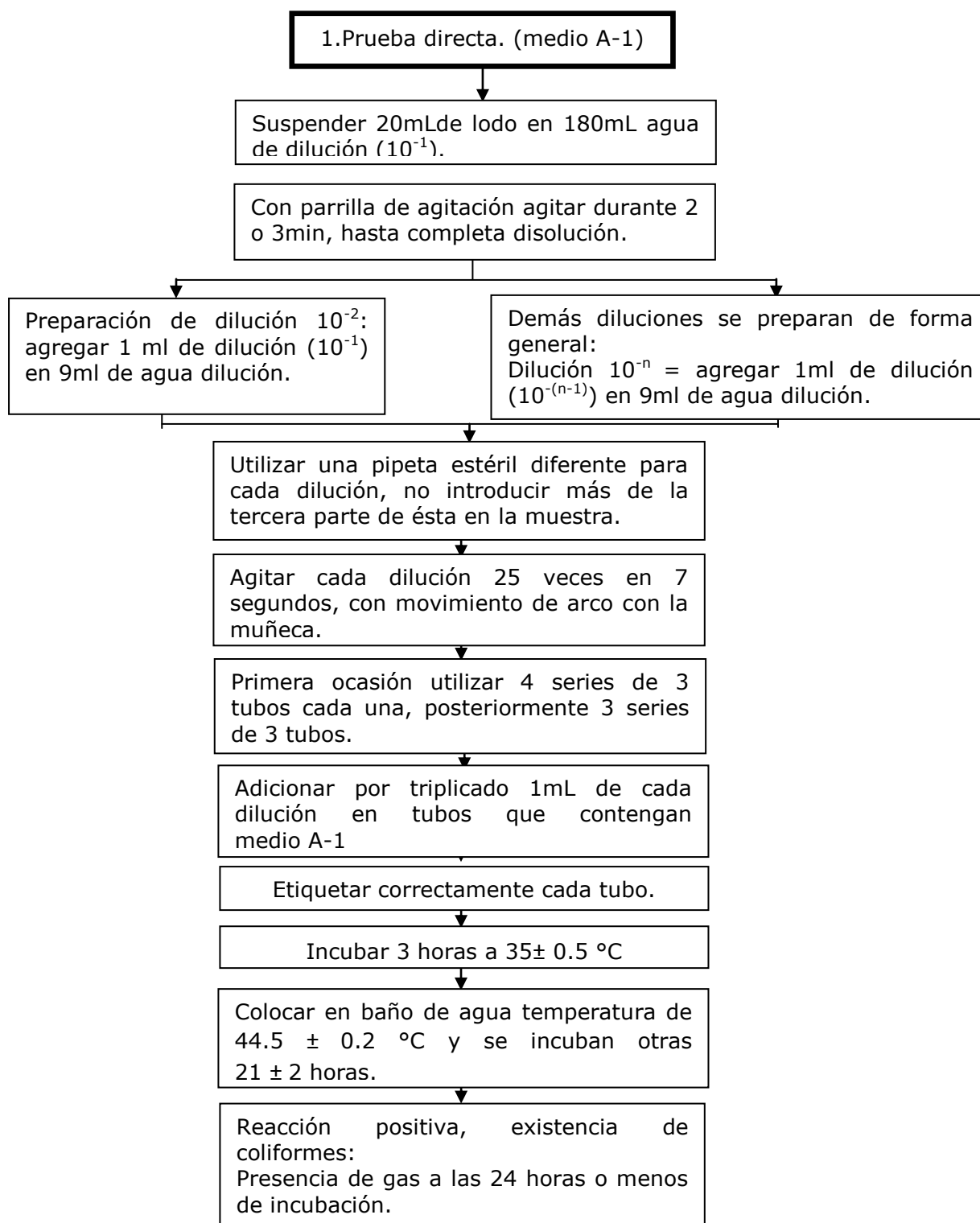
Donde:

$$STT \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{P_2(g) - P_1(g)}{vol. muestra (mL)} * \frac{1000mg}{1g} * \frac{1000mL}{1L}$$

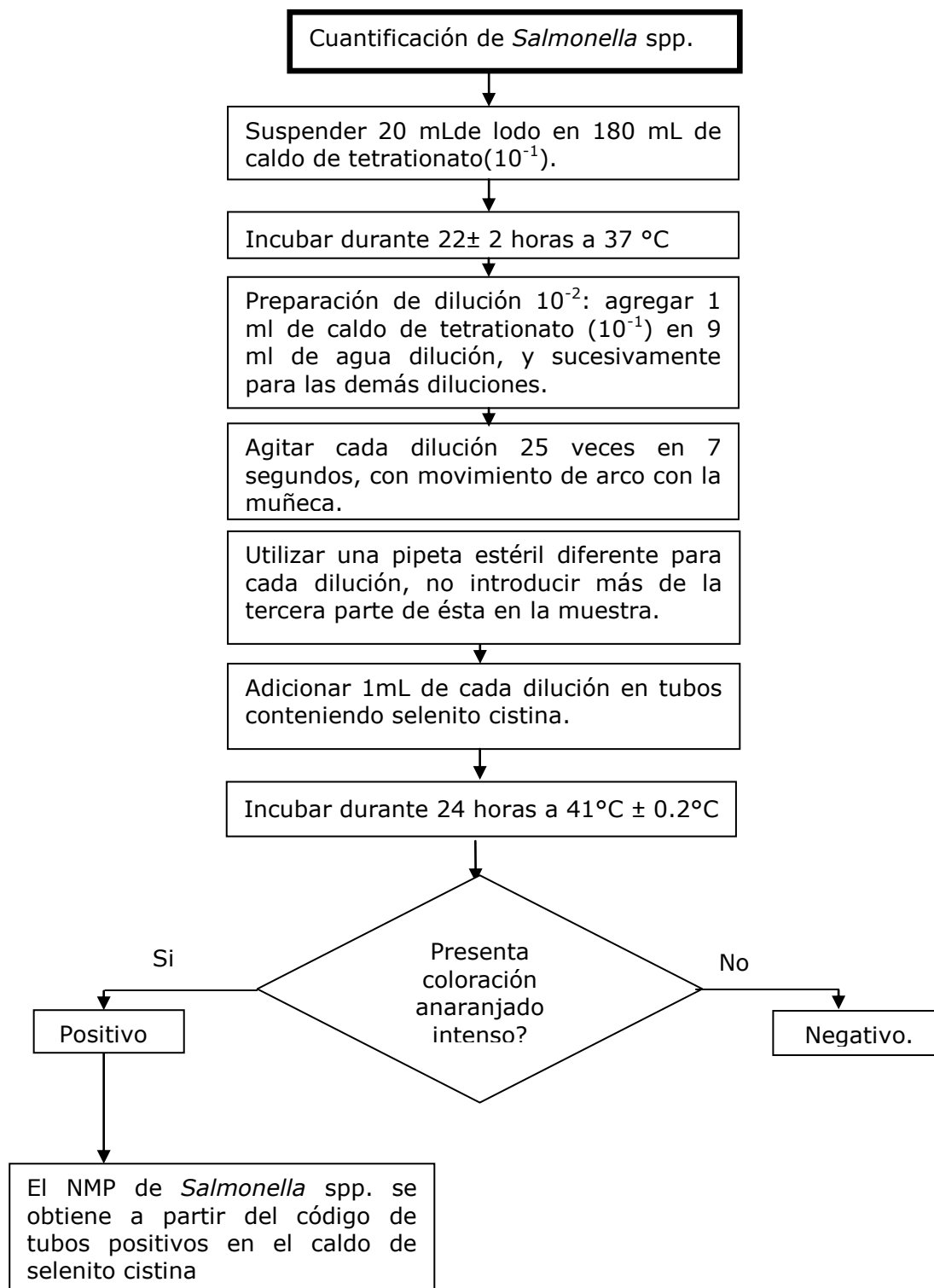
$$STV \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{P_2(g) - P_3(g)}{vol. muestra (mL)} * \frac{1000mg}{1g} * \frac{1000mL}{1L}$$

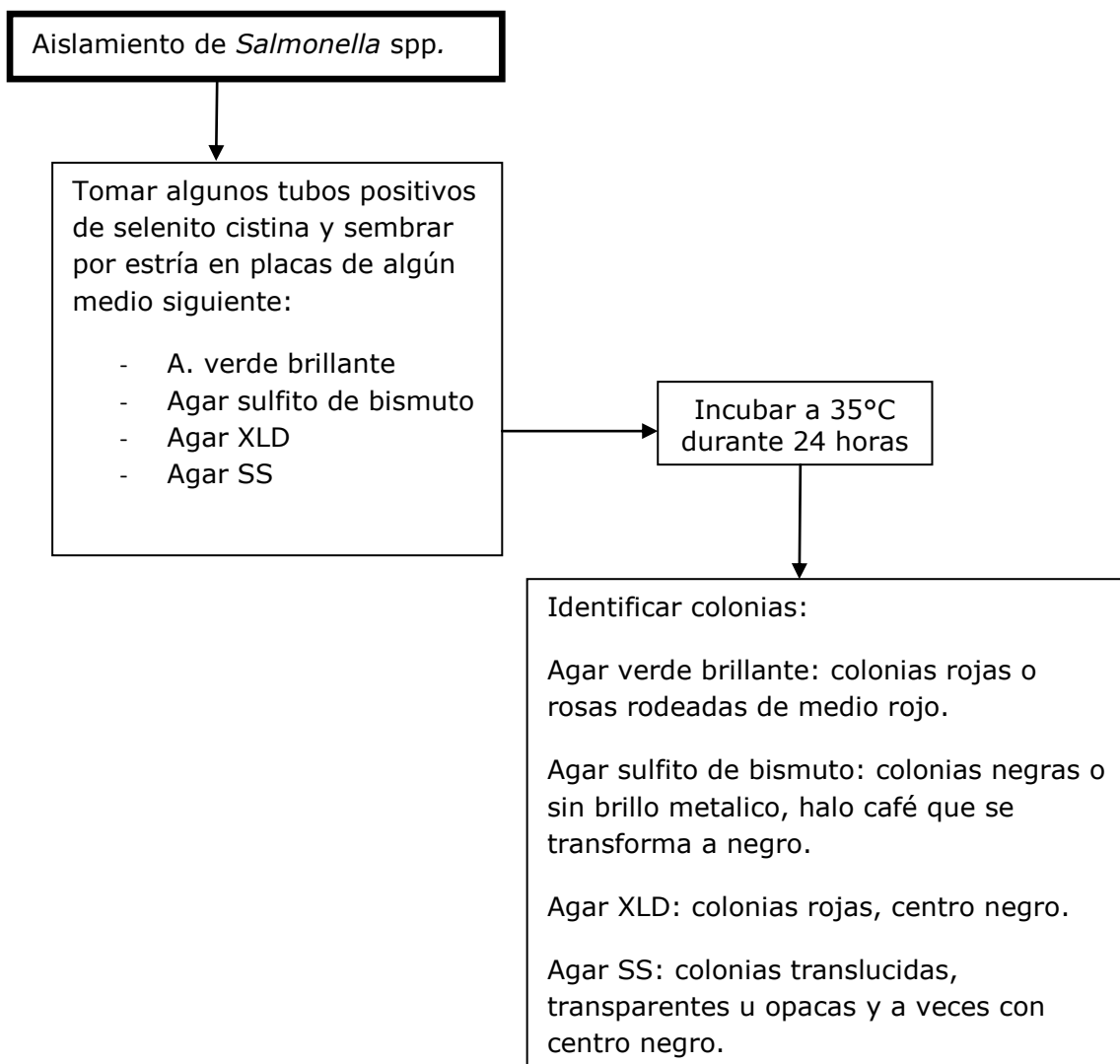
$$STF \left(\frac{mg}{L} \right) = mg STT - mg STV$$

ANEXO B DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES

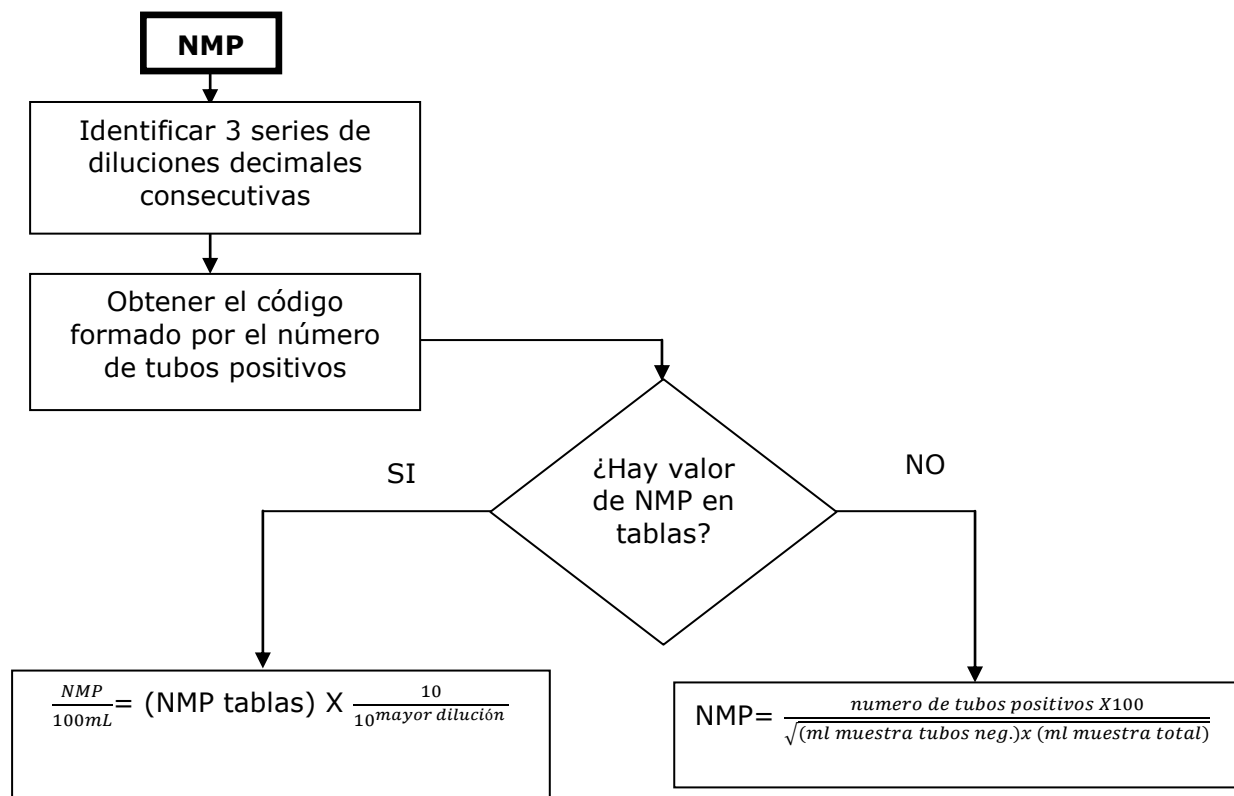


Fuente: NOM-004-SEMARNAT-2002

ANEXO C DETERMINACIÓN DE *SALMONELLA SPP.*



Fuente: NOM-004-SEMARNAT-2002

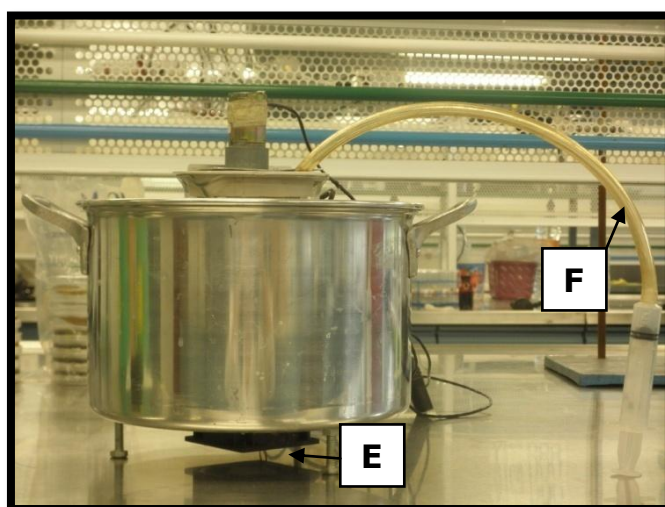
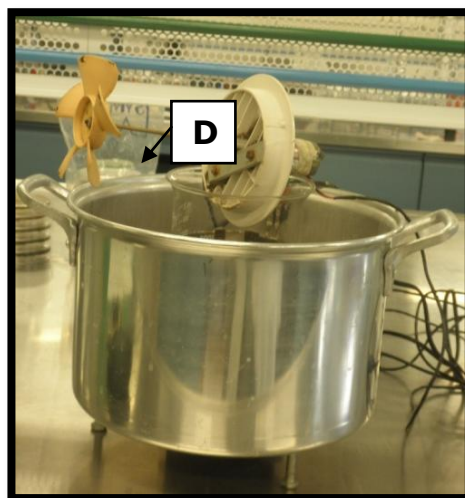
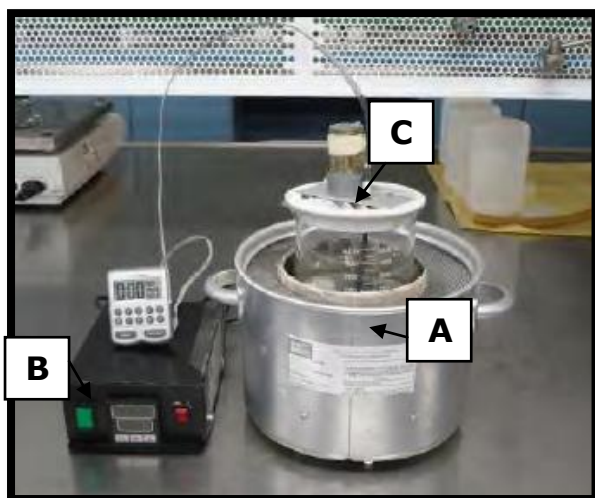
ANEXO D NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

Fuente: Standard Methods for the Examination of Water y Wastewater.
9221 p. 9-75

NÚMERO MÁS PROBABLE por 100 mL, USANDO TRES TUBOS

Tubos positivos No. (100 mL)				Tubos positivos No.				Tubos positivos No.				Tubos positivos No.			
0	0	0	-3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	> 2400

Fuente: APHA, AWWA, WPCF, 1992; NMX-AA-042/1987

ANEXO FOTOGRÁFICO

“Termohidrolizador de lodos” A) sistema de calentamiento (resistencia de 200W) B) caja controladora C) termopar D) agitador tipo propela (0.6W) E) ventilador F) Dispositivo de muestreo.



Punto de muestreo de lodo primario (Tanque séptico). Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de los Edificios 12 y 18 del Instituto de Ingeniería (UNAM).



Punto de muestreo de lodo secundario (sección aerobia del sedimentador secundario de la planta de proceso combinados, conocida como microplanta Anaerobia-Anóxica-Aerobia). Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de los Edificios 12 y 18 del Instituto de Ingeniería (UNAM).

REFERENCIAS

Appels L., Degrevè J., Van der Bruggen B., Van Impe J., Dewil R. (2010). Influence of low temperature thermal pre-treatment on sludge solubilisation, heavy metal release and anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, Vol.101, p. 5743-5748.

Auer M. T., Niehaust S. L. (1993). Modeling fecal coliform bacteria- I. Field and laboratory determination of loss kinetics. *Water Research*, Vol. 27, No 4, p. 693-701.

Barjenbruch M., Kopplow. (2003). Enzymatic, mechanical and thermal pretreatment of surplus sludge. *Advances in Environmental Research*, Vol.7, p.715-720.

Bermúdez- Aguirre D., Corradini M. G. (2011). Inactivation kinetics of *Salmonella* spp. under thermal and emerging treatments: A review. *Food Research International* doi: 10.1016/j.foodres.2011.05.040.

Bonjoch X., Blanch A. R. (2009). Resistance of faecal coliforms and enterococci populations in sludge and biosolids to different hygienisation treatments. *Microbial Ecology*, Vol. 57, p. 478-483.

Bosch A., Lucena F., Jofre J. (1986). Fate of human enteric viruses (Rotaviruses and enteroviruses) in sewage after primary sedimentation. *Water Science & Technology*, Vol. 18, No. 10, p. 47 52.

Bougrier C., Delegenès J.P., Carrère H. (2007). Impacts of thermal pre-treatments on the semi-continuous anaerobic digestion of waste activated sludge. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 34, p. 20-27.

Bougrier C., Delegenès J.P., Carrère H. (2008). Effects of thermal treatments on five different waste activated sludge samples solubilisation,

physical properties and anaerobic digestion. *Chemical Engineering Journal*, Vol 139, p. 236-244.

Buzrul S., Alpas H. (2007). Modeling inactivation kinetics of food borne pathogens at a constant temperature. *LWT*, Vol. 40, p. 632-637.

Carrillo L. (2003). *Microbiología Agrícola*. Primera Edición, Universidad Nacional de Salta (UNSA). Capítulo 4, p. 11-16.

Carrington E. G. (2001). Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction-final report. Study contract No B-4-3040/2001/322179/MAR/A2 for the European Commission Directorate - General Environment, September 2001.

Chen G., Campanella O.H & Peleg M. (2011). Calculation of the total lethality of conductive heat in cylindrical cans sterilization using linear and nonlinear survival kinetic models. *Food Research International*. Doi:10.1016/j.foodres.2011.02.049.

Chick H. (1908). An investigation of the laws of disinfection. *Journal of Hygiene*, Cambridge University Press, Vol. 8, No.1, p. 92-158.

Climent M., Ferrer I., Baeza Ma., Artola A., Vázquez F., Font X. (2007). Effects of thermal and mechanical pretreatments of secondary sludge on biogas production under thermophilic conditions. *Chemical Engineering Journal*, Vol. 133, p. 335.342.

CONAGUA (2010). Inventario nacional de plantas municipales de potabilización y de tratamiento de aguas residuales en operación, México, 2010.

CONAGUA (2011). Estadísticas del agua en México, edición.

Corradini Ma. G., Normand M. D., Peleg M. (2010). Stochastic and Deterministic Model of Microbial Heat Inactivation. *Journal of Food Science*, Vol. 75, No.2, p.59-70.

Corradini Ma. G., Peleg M. (2009). Dynamic Model of Heat Inactivation Kinetics for Bacterial Adaptation. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 75, No. 8, p.2590-2597.

Ferrer I., Ponsá S., Vázquez F., Font X. (2008). Increasing biogas production by thermal (70°C) sludge pre-treatment prior to thermophilic anaerobic digestion. *Biochemical Engineering Journal*, Vol 42, p. 186-192.

Gantzer C., Gaspard P., Galvez L., Huyard A., Dumouthier N., Schwartzbrod J. (2001). Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge. *Water Research*, Vol.35, No.6, p. 3763–3770.

Gujer W. & Zehnder J. B. (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, Vol. 5, p. 127-167.

Guzmán C., Jofre, J., Montemayor M., Lucena F. (2007). Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 103, No.6, p. 2420–2429.

Horan N.J., Fletcher L., Betmal S. M., Wilks S. A., Keevil C. W. (2004). Die- off of enteric bacterial pathogens during mesophilic anaerobic digestion. *Water Research*, Vol. 38, p. 1113-1120.

Jeong T.-Y., Cha G.-C., Choi, S.S. Jeon C. (2007). Evaluation of methane production by the thermal pretreatment of waste activated sludge in an anaerobic digester. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, Vol. 13, p. 856–863.

Juneja V.K., Eblen B.S., Marks H. M. (2001). Modeling non-linear survival curves to calculate thermal inactivation of *Salmonella* in poultry of different fat levels. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 70, p. 37-51.

Kapperud G., Gustavsen S., Hellesnes I., Hansen A.H., Lassen J., Hirn J., Jahkola M., Montenegro M. A., Helmuth R. (1990). Outbreak of *Salmonella typhimurium* Infection traced to contaminated chocolate and cause by strain lacking the 60-Megadalton Virulence Plasmid. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.28, p. 2597-2601.

Kim J., Park C., Kim T., Lee M., Kim S., Kim S.W., Lee J. (2003). Effects of various pre-treatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.95, p. 271-275.

Lang N.L., Smith S.R. (2008). Time and temperature inactivation kinetics of enteric bacteria relevant to sewage treatment processes for agricultural use. *Water Research*, Vol.42, p.2229-2241.

Leyer G. y Johnson E. (1993). Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.59, No. 6, p.1842-1847.

López-Malo A., Alzamora S. M., Palou E. (2002). *Aspergillus flavus* dose-response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 73, p. 213-218.

Lu J., Gavala H., Skiadas I., Mladenovska Z., Ahring B. (2008). Improving anaerobic sludge digestion by implementation of a hyper-thermophilic prehydrolysis step. *Journal of Environmental Management*, Vol. 88, p. 881-889

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (1997). Brock. Biology of microorganisms. 8th edition. Prentice Hall, Madrid, p. 350-366.

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2004). Brock. Biología de los microorganismos. Décima edición. Editorial Pearson Educación, S. A. (2006), Madrid. p. 377-379, 927-937, 951-956.

Martínez E. (2009). Pretratamiento térmico y digestión anaerobia mesofílica de lodos residuales para la producción de biosólidos clase "A". Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 28, 33-35.

Maya C., Lucario S., Galván M., Gayosso T., Naranjo R., Jiménez B. (2008). Estudio del mecanismo de inactivación de diferentes géneros de huevos de helmintos de importancia médica. Memorias del XXXI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Santiago de Chile, Chile del 12 al 15 de octubre de 2008. CD.

Mocé-Llivina L., Muniesa M., Pimenta-Vale H., Lucena F., Jofre J. (2003). Thermal treatment of sludge and sewage. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, No 3, p. 1452-1456.

Mottet A., Steyer J. P., Déléris S., Vedrenne F., Chauzy J., Carrère H. (2009). Kinetics of thermophilic batch anaerobic digestion of thermal hydrolysed wasted activated sludge. Biochemical Engineering Journal, Vol. 46, p. 169-175.

Mukhopadhyay S., Ramaswamy R. (2011). Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: a review. Food Research International, doi: 10.1016/j.foodres.2011.05.016.

Müller, J.A. (2000). Pretreatment processes for the recycling and reuse of sewage sludge. *Water Science and Technology*, Vol. 42, No. 9, p. 167-174.

Müller, J.A. (2001). Prospects and problems of sludge pre-treatment processes. *Water Science and Technology*, Vol. 44, No.10, p. 121-128.

Nges I.A., Liu J. (2009). Effects of anaerobic pre-treatment on the degradation of dewatered-sludge. *Renewable Energy*, Vol. 34, p.1795-1800.

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002. Protección ambiental - Lodos y Biosólidos - especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final.

Noyola A. (1998). Digestión anaerobia de lodos. Memorias del curso "Digestión anaerobia de lodos y aguas residuales" Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales, A. C. México.

Noyola A., Garbossa L. H., Braga M.C., Andreoli C., Fernandes C (2007). Digestão e higienização de lodos de estação de tratamento de esgotos a través de um processo de duas fases não convencionais. Memorias del XXIV Congreso Brasileño de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (ABES) Belo Horizonte, Brasil, del 2 al 7 de septiembre de 2007. *CD*.

Peleg M. (2003). Microbial Survival Curves: Interpretation, Mathematical Modeling, and Utilization. *Comments on Theoretical Biology*, Vol 8, p. 357-387.

Peleg M. (1999). On calculating sterility in thermal and non-thermal preservation methods. *Food Research International*, Vol. 32, p.271-278.

Peleg M. (2000). Microbial survival curves-the reality of flat "shoulders" and absolute thermal death times. *Food Research International*, Vol.33, p.531-538.

Peleg M., and C. M. Penchina. (2000). Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, Vol. 40, No 2, p. 159-172.

Pérez-Elvira S. I., Fernández-Polanco F., Fernández-Polanco M., Rodríguez P., Rouge P. (2008). Hydrothermal multivariable approach. Full-scale feasibility study. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol.11, No.14.

Phothilangka P., Schoen M.A., Huber M., Luchetta P., Winkler T., Wett, B.(2008). Prediction of thermal hydrolysis pretreatment on anaerobic digestion of waste activated sludge. *Water Science & Technology*, Vol. 58, p. 1467–1473.

Prorot A., Laurent J., Dagot C., Leprat P. (2011). Sludge disintegration during heat treatment at low temperature: a better understanding of involved mechanisms with a multiparametric approach. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 54, p. 178-184.

Qi Y.,Dentel S. K.,Herson D. S. (2008). Effect of total solids on fecal coliform regrowth in anaerobically digested biosolids. *Water Research*, Vol. 42, p. 3817-3825.

Rojas M., Cabirol N., Ortega S., Ortiz L., Noyola A. (2001). Removal of fecal indicator organisms and parasites (fecal coliforms and helminth eggs) from municipal biologic sludge by anaerobic mesophilic and thermophilic digestion. *Water Science and Technology*, Vol. 44, p. 97-101.

Romdhana M. H., Lecomte D., Ladevie B., Sablayrolles C. (2009). Monitoring of pathogenic microorganisms contamination during heat drying process of sewage sludge. *Process Safety and Environmental Protection*, Vol. 87, p. 377-386.

Ros M., Pascual J.A., García C., Hernández M. T., Insam H. (2006). Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 38, p. 3443-3452.

Rubio L. A. (2004). Producción de biosólidos de clase "A" mediante digestión anaerobia en dos fases a partir de lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 4, 36, 77.

Rubio L. A. y Noyola A. (2010). Two-phase (acidogenic-methanogenic) anaerobic thermophilic / mesophilic digestion system for producing Class A biosolids from municipal sludge. *Bioresource Technology*, Vol. 101, p. 576-585.

Sahlström L, Aspan A., Bagge E., Danielsson-Tham M. L., Albiñ Ann (2004). Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Research*, Vol. 38, p.1989–1994.

Sidhu J. P.S., Toze S. (2009). Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environmental International*, Vol. 35, p.187-201.

Silva F. V. M., Gibbs P. A. (2011). Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods. *Food Research International*, doi: 10.1016/j.foodres.2011.06.018.

Smigic N., Rajkovic A., Antal E., Medic H., Lipnicka B., Uyttendaele M., Devlieghere F. (2009). Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 with lactic acid, neutralized electrolyzed oxidizing water and chlorine dioxide followed by growth under sub-optimal conditions of temperature, pH and modified atmosphere. *Food Microbiology*, Vol. 26, p. 629-637.

Spector M.P., Kenyon W. J. (2011). Resistance and survival strategies of *Salmonella* enteric to environmental stresses. *Food Research International*, doi: 10:1016/j.foodres.2011.06.056.

Tchobanoglous G., Burton F. L., Stensel H.D., Metcalf & Eddy (2003). Wastewater Engineering Treatment and Reuse. Cuarta edición. Editorial McGraw-Hill, New York. p. 1451 – 1454, 1500, 1505-1509, 1529-1531, 1533-1534, 1546-1547, 1554-1555, 1558, 1579-1580, 1586.

Terreros-Mecalco J., Olmos-Dichara A., Noyola-Robles A., Ramírez-Vives F., Monroy-Hermosillo O. (2009). Digestión Anaerobia de lodo primario y secundario en dos reactores UASB en serie. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 8, No. 2, p.153-161.

United States Environmental Protection Agency (EPA) (1995). Process Design Manual. Land Application of Sewage Sludge and Domestic Septage. EPA/625/R-95/001 Washington, DC.

Valo A., Carrère H., Delgenès J. P. (2004). Thermal, chemical and thermo-chemical pre-treatment of waste activated sludge for anaerobic digestion. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol 79, p. 1197-1203.

Van Boekel M. A.J.S. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 74, p. 139-159.

Van Derlinden E., Boons K., Van Impe J.F. (2011). *Escherichia coli* population heterogeneity: Subpopulation dynamics at super-optimal temperatures. *Food Microbiology*, Vol. 28, p. 667-677.

Wang Q., Noguchi C., Hara Y., Sharon C., Kakimoto K., Kato Y. (1997). Studies on anaerobic digestion mechanism: Influence of pretreatment temperature on biodegradation of waste activated sludge. *Environmental Technology*, Vol. 18, p. 999-1008.

Wéry N., Lhoutellier C., Ducray F., Delgenèse J.F., Godon J.J. (2008). Behavior of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Research*, Vol. 42, p. 53-62.

Whiting R. C.(1995). Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 35, No 6, p. 467-494.

Williams F.P., Hurst C.J. (1988). Detection of environmental viruses in sludge: enhancement of enterovirus plaque assay filters with 5-iodo-2-deoxyuridine and comparison to adenovirus and coliphages titers. *Water Research*, Vol. 7, p. 847- 851.