



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Viabilidad de microorganismos indicadores en biosólidos obtenidos por digestión anaerobia de lodos de plantas de tratamiento de drenaje municipal

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Aarón Flores Ramírez

TUTOR PRINCIPAL

Adalberto Noyola Robles

[Instituto de Ingeniería](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Yolanda López Vidal

[Facultad de Medicina](#)

Maricarmen Quirasco Baruch

[Facultad de Química](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX. Abril, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



El Jurado de Examen estuvo constituido por los siguientes académicos:

PRESIDENTE	Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González Sarabia
VOCAL	Dra. Marisa Mazari Hiriart
VOCAL	Dr. Alfredo Martínez Jiménez
VOCAL	Dr. Rodolfo García Contreras
SECRETARIA	Dra. Herminia Loza Tavera

Se extiende un muy especial agradecimiento a todos y cada uno de los miembros del jurado, así como del comité tutor, por la dedicación, el tiempo y la retroalimentación brindados durante el desarrollo y evaluación de esta prueba escrita. A todos ellos se dedica también esta investigación, pues es el producto de una labor conjunta y por demás enriquecedora.



El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM, que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015 No. de Certificado CMX C SGC 209 2020, válido en el período del 12 de noviembre de 2020 al 11 de noviembre de 2023.

Esta investigación fue desarrollada gracias al apoyo de la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación (SECTEI) del Gobierno de la Ciudad de México (proyecto 265/2019).

Se reconoce el apoyo de la beca de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por otorgarme la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos y por abrirme las puertas para continuar con mi formación profesional.

Al Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería por todas las facilidades brindadas para la realización de este trabajo dentro de sus instalaciones.

Al Doctor Adalberto Noyola por abrirme las puertas al Grupo de Investigación en Procesos Anaerobios, por el tiempo y el esfuerzo que dedico para poder concebir, desarrollar y concluir este trabajo. Con su ejemplo, hoy no solo soy un mejor profesionista sino una mejor persona. ¡Gracias por todo, Doc!

A la Maestra Margarita Cisneros por todo el apoyo brindado durante este tiempo, por sus consejos y las charlas amenas. Su dedicación y la excelencia de su trabajo son para mí un ejemplo a seguir.

Al Doctor Daniel de los Cobos, a Ponciano Trinidad y a Roberto Briones por el apoyo invaluable brindado durante el desarrollo de este trabajo.

A todos y a cada uno de los compañeros del Grupo de Investigación en Procesos Anaerobios con los que tuve el enorme placer de coincidir. Muy especialmente quiero agradecer a Andrea Rodríguez, Zully Ramos, Jesús Ortega y Yovany Cuetero por su completa complicidad e invaluable apoyo a lo largo de esta travesía.

A Jaime, mi padre, por ser mi soporte, mi roca. Tu me has enseñado la valía del trabajo duro y has inculcado en mí la pasión por adquirir nuevos conocimientos. Todos logros de mi vida, los grandes y los pequeños, los habidos y por haber, no serían posibles sin ti.

A Laura, mi madre, por ser la luz que me guía, mi mejor amiga. Tu me has enseñado a mantener firme mis convicciones y mis valores cuando las circunstancias son adversas. Has hecho y dejado de hacer tanto por mí que este logro, como cualquier otro, es tan tuyo como mío.

A Mariana, mi querida hermana, por ser mi persona, quien me entiende mejor que nadie. La alegría que me brindas y la determinación que tienes para lograr lo que te propones son el motor de mis días.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
INTRODUCCIÓN	III
1 MARCO TEÓRICO	1
1.1 Problemática de la gestión integral del lodo	1
1.2 Clasificación del lodo y procesos para su tratamiento	9
1.3 Digestión anaerobia	14
1.4 Desinfección de lodos.....	22
1.5 Métodos para la determinación de la calidad microbiológica del lodo	28
2 JUSTIFICACIÓN	39
3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	40
3.1 Hipótesis	40
3.2 Objetivo general.....	40
3.3 Objetivos específicos	40
4 METODOLOGÍA	41
4.1 Diseño experimental	41
4.2 Obtención y acondicionamiento de lodo primario	42
4.3 Descripción de los digestores anaerobios	43
4.4 Inoculación, alimentación y condiciones de operación de los digestores.....	44
4.5 Tratamiento térmico del lodo primario.....	46
4.6 Tratamiento alcalino del digestato mesofílico.....	47
4.7 Técnicas para los análisis fisicoquímicos	47
4.8 Técnicas para los análisis microbiológicos.....	48

4.9	Técnicas para los análisis de Biología Molecular	51
4.9.1	Tratamiento de las muestras con Propidio Monoazida (PMA)	51
4.9.2	Extracción del ADN y PCR en tiempo real	53
4.9.3	Secuenciación de un fragmento del gen <i>16S rRNA</i>	55
4.10	Análisis estadístico	56
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
5.1	Caracterización fisicoquímica del influente de los digestores	57
5.2	Monitoreo de la operación de los digestores	60
5.3	Comunidades bacterianas asociadas a los digestores.....	67
5.4	Calidad bacteriológica de acuerdo con la normativa mexicana	72
5.4.1	Proceso DAM+TA	73
5.4.2	Proceso DAT.....	77
5.4.3	Proceso PT+DAT.....	80
5.4.4	Comparativa entre procesos.....	85
5.4.5	Presencia de falsos positivos de <i>Salmonella</i> spp.	86
5.5	Efecto del PMA para la determinación de células viables.....	89
5.5.1	Determinación de <i>Salmonella</i> spp.	89
5.5.2	Determinación de <i>E. coli</i>	91
5.5.3	Limitaciones del PMA en matrices complejas.....	101
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	105
6.1	Conclusiones	105
6.2	Recomendaciones	106
	REFERENCIAS.....	108
	ANEXO I. CÁLCULOS.....	118
	ANEXO II. RESULTADOS EXPERIMENTALES	125
	ANEXO III. EVIDENCIA FOTOGRÁFICA.....	137

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.1. COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS EN LODOS ESTABLECIDOS EN DIFERENTES REGULACIONES PARA LA DISPOSICIÓN Y APROVECHAMIENTO DE DICHO RESIDUO	4
TABLA 1.2. CLASIFICACIÓN DE LODOS Y BIOSÓLIDOS (CLASE A, B O C) SEGÚN LA CONCENTRACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS E INDICADORES DE ACUERDO CON DIFERENTES REGULACIONES	5
TABLA 1.3. RUTAS DE APROVECHAMIENTO DE LOS BIOSÓLIDOS DE ACUERDO CON LA NOM-004-SEMARNAT 2002.	6
TABLA 1.4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE INVESTIGACIONES SOBRE DIGESTIÓN ANAEROBIA Y DESINFECCIÓN DE LODOS.....	23
TABLA 1.5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE INVESTIGACIONES QUE HAN EMPLEADO EL PMA PARA LA DETERMINACIÓN DE CÉLULAS VIABLES EN MUESTRAS AMBIENTALES.	33
TABLA 4.1. CONDICIONES DE OPERACIÓN DE DIGESTORES EMPLEADOS EN CADA PROCESO.....	45
TABLA 4.2. CARACTERÍSTICAS DEL SET DE PRIMERS Y SONDAS EMPLEADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> Y <i>SALMONELLA ENTÉRICA</i>	54
TABLA 5.1 PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS DEL LODO PRIMARIO (LP) Y DEL LODO PRETRATADO TÉRMICAMENTE (PT).....	58
TABLA 5.2. RESULTADOS PROMEDIO DE LOS DISTINTOS PARÁMETROS DE INTERÉS MONITOREADOS DURANTE EL PERIODO DE OPERACIÓN ESTABLE DEL DIGESTOR CORRESPONDIENTE A CADA PROCESO.	61
TABLA 5.3. ESTIMADORES DE BIODIVERSIDAD A A NIVEL TAXONÓMICO DE GÉNERO.....	67
TABLA 5.4. CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE COLIFORMES FECALES Y <i>SALMONELLA</i> SPP. EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DAM+TA.....	74
TABLA 5.5. CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE COLIFORMES FECALES Y <i>SALMONELLA</i> SPP. EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DAT.	77
TABLA 5.6. CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE COLIFORMES FECALES Y <i>SALMONELLA</i> SPP. EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO PT+DAT.	80

TABLA 5.7. FRECUENCIA DE AISLAMIENTO EN MEDIOS SELECTIVOS E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN LAS MUESTRAS PRESUNTAMENTE POSITIVAS DE LAS DIFERENTES ETAPAS DE CADA PROCESO.	88
TABLA 5.8. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL PMA Y DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES DE <i>E. COLI</i> PARA CADA MUESTRA.	91
TABLA 5.9. CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE <i>E. COLI</i> EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DAM+TA.	94
TABLA 5.10. CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE <i>E. COLI</i> EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DAT.	97
TABLA 5.11. CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE <i>E. COLI</i> EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO PT+DAT.	99

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. ESQUEMA GENERAL DE LA PRODUCCIÓN Y TRATAMIENTO LODO EN UNA PTAR QUE EMPLEA EL SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS.....	9
FIGURA 1.2. GEOMETRÍA TÍPICA DE DIGESTORES DE LODOS.....	16
FIGURA 1.3. ESQUEMA DE LAS ETAPAS DEL PROCESO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA Y SUS RESPECTIVAS REACCIONES METABÓLICAS.....	18
FIGURA 1.4. DIAGRAMA GENERAL DEL PROCESO DE TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS CON Y SIN REACTIVO DE VIABILIDAD (PMA) PARA LA AMPLIFICACIÓN SELECTIVA DEL ADN DE CÉLULAS VIABLES.....	32
FIGURA 4.1. DIAGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	41
FIGURA 4.2. DIAGRAMA DE LOS DIGESTORES ANAEROBIOS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
FIGURA 4.3. DIAGRAMA DEL DISPOSITIVO PARA EL TRATAMIENTO TÉRMICO (TERMO-HIDROLIZADOR).	46
FIGURA 4.4. DIAGRAMA DEL PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES, <i>E. COLI</i> Y <i>SALMONELLA</i> SPP.	49
FIGURA 4.5. FOTOGRAFÍA DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS TUBOS POSITIVOS Y NEGATIVOS EMPLEADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE <i>E. COLI</i> Y <i>SALMONELLA</i>	50
FIGURA 4.6. DIAGRAMA DEL TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS CON PROPIDIO MONOAZIDA (PMA). ..	52
FIGURA 5.1 VALORES DE PH (A) Y DE RELACIÓN DE ALCALINIDADES (B) REPORTADOS DURANTE TODO EL PERIODO DE OPERACIÓN DEL DIGESTOR CORRESPONDIENTE A CADA PROCESO.	62
FIGURA 5.2. VALORES DE CONCENTRACIÓN DE AGV'S (A), DE REMOCIÓN DE SÓLIDOS VOLÁTILES (B) Y DE PRODUCCIÓN DE BIOGÁS (C) PARA LOS DIGESTORES DEL PROCESO DAM (MORADO), DAT (VERDE) Y PT+DAT (AMARILLO) DURANTE EL PERIODO DE OPERACIÓN ESTABLE	64
FIGURA 5.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) A NIVEL TAXONÓMICO DE ORDEN (A) Y ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS OTU'S MÁS ABUNDANTES NIVEL TAXONÓMICO DE ORDEN (B). .	69
FIGURA 5.4. BOX PLOT QUE MUESTRA LA CONCENTRACIÓN (LOG_{10} NMP/GST) DE COLIFORMES FECALES (ROJO) Y <i>SALMONELLA</i> SPP. (AZUL) EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DAM+TA	74

FIGURA 5.5. BOX PLOT QUE MUESTRA LA CONCENTRACIÓN (LOG ₁₀ NMP/GST) DE COLIFORMES FECALES (ROJO) Y <i>SALMONELLA</i> SPP. (AZUL) EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DAT... 78	78
FIGURA 5.6. BOX PLOT QUE MUESTRA LA CONCENTRACIÓN (LOG ₁₀ NMP/GST) DE COLIFORMES FECALES (ROJO) Y <i>SALMONELLA</i> SPP. (AZUL) EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO PT+DAT. 81	81
FIGURA 5.7 VALORES DE CT DE LAS MUESTRAS (N=5), SIN TRATAR (MORADO) Y TRATADAS CON PMA (AMARILLO), LP (A), DAT (B), DAT ALMACENADA (C), DAM (D), TA (E), DAM+TA ALMACENADA (F), PT (G), PT+DAT (H) Y PT+DAT ALMACENADA (I). ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	
FIGURA 5.8. BOX PLOT QUE MUESTRA LA CONCENTRACIÓN (LOG ₁₀) DE <i>E.COLI</i> REPORTADA COMO UFC/ML PARA LA TÉCNICA DE QPCR (ROJO) Y PMA-QPCR (VERDE), Y COMO NMP/GST PARA LA TÉCNICA NMP(AZUL) EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DAM+TA..... 95	95
FIGURA 5.9. BOX PLOT QUE MUESTRA LA CONCENTRACIÓN (LOG ₁₀) DE <i>E.COLI</i> REPORTADA COMO UFC/ML PARA LA TÉCNICA DE QPCR (ROJO) Y PMA-QPCR (VERDE), Y COMO NMP/GST PARA LA TÉCNICA NMP(AZUL) EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DAT. 98	98
FIGURA 5.10. BOX PLOT QUE MUESTRA LA CONCENTRACIÓN (LOG ₁₀) DE <i>E.COLI</i> REPORTADA COMO UFC/ML PARA LA TÉCNICA DE QPCR (ROJO) Y PMA-QPCR (VERDE), Y COMO NMP/GST PARA LA TÉCNICA NMP(AZUL) EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO PT+DAT..... 100	100

RESUMEN

En el proceso de digestión anaerobia del lodo derivado del tratamiento de las aguas residuales se producen biosólidos susceptibles de ser aprovechados, principalmente, en la agricultura. Para lograr esto se requiere que en el tratamiento del lodo se reduzca la concentración de bacterias cultivables de acuerdo con lo establecido en la normativa mexicana (NOM-004-SEMARNAT 2002). Sin embargo, para asegurar el adecuado aprovechamiento de los biosólidos, es necesario determinar también las concentraciones de bacterias viables pero no cultivables pues el recrecimiento de estos microorganismos representa un riesgo para el medio ambiente y la salud humana.

En el presente trabajo se operaron tres sistemas de digestión anaerobia para el tratamiento de lodo primario con el propósito de evaluar la concentración de coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Salmonella* en los biosólidos resultantes. Para dichos microorganismos se determinó la concentración de células viables mediante la técnica de qPCR, al realizar el tratamiento de las muestras con Propidio de Monoazida (PMA) previo al proceso de extracción de ADN, y de células cultivables, al emplear las técnica de cultivo establecida en la NOM-004. En el primer sistema (PT+DAT) se empleó un pretratamiento térmico (80°C durante 60 min) del lodo primario seguido de una etapa de digestión anaerobia termofílica. El segundo sistema (DAT) consistió exclusivamente en la digestión anaerobia del lodo primario bajo condiciones termofílicas. El último sistema (DAM+TA) constó de dos etapas, la digestión anaerobia mesofílica del lodo primario seguido del tratamiento alcalino con óxido de calcio (30% m/m).

En los tres sistema se produjeron biosólidos Clase A, cumpliendo con los criterios más estrictos de acuerdo con los parámetros bacteriológicos establecidos en la normativa mexicana. Sin embargo, siguiendo la metodología establecida en la NOM-004, se presentaron resultados falsos positivos durante la cuantificación de *Salmonella* en más del 50% de cada una de las muestras evaluadas, por lo que el empleo de dicho método es analizado en este trabajo. Por otro lado, a pesar de que estadísticamente se reportó un efecto significativo del PMA, la diferencia de Ct en entre células totales y viables para las muestras fue menor 1, lo que sugiere una sobreestimación de la cantidad de células viables en las diferentes muestras. Pese a esto, la cuantificación de células viables de *E. coli* permitió identificar que el sistema PT+DAT fue el que logró la mayor reducción de bacterias viables, aunque estos resultados deben ser tomados con ciertas reservas debido a que, por diferentes factores, el efecto del PMA se vio disminuido.

ABSTRACT

The anaerobic digestion of sewage sludge produced biosolids that can be used mainly in agriculture. To achieve this, sludge treatment must reduce the concentration of culturable bacteria in accordance with Mexican regulations (NOM-004-SEMARNAT 2002). However, to ensure the proper use of biosolids, it is also necessary to determine the concentrations of viable but non-culturable bacteria, since the regrowth of these microorganisms represents a risk to the environment and human health.

In the present work, three anaerobic digestion of primary sludge systems were operated to evaluate the concentration of fecal coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* in the resulting biosolids. For these microorganisms, the concentration of viable cells was determined using the qPCR technique, by treating the samples with Propidium Monoazide (PMA) prior to the DNA extraction process, and culturable cells were determined by using the culture technique established in NOM-004. The first system (PT+DAT) employed a thermal pretreatment (80°C for 60 min) of the primary sludge followed by a thermophilic anaerobic digestion step. The second system (DAT) consisted exclusively of anaerobic digestion of the primary sludge under thermophilic conditions. The last system (DAM+TA) consisted of two stages: mesophilic anaerobic digestion of primary sludge followed by alkaline treatment with calcium oxide (30% m/m).

Class A biosolids were produced in the three systems, complying with the strictest criteria according to the bacteriological parameters established in the Mexican regulations. However, following the methodology established in NOM-004, false-positive results were presented during the quantification of *Salmonella* in more than 50% of each of the samples evaluated, so the use of this method is analyzed in this work. On the other hand, although a statistically significant effect of PMA was reported, the difference in Ct between total and viable cells for the samples was less than 1, suggesting an overestimation of the number of viable cells in the different samples. Despite this, the quantification of viable *E. coli* cells identified the PT+DAT system as the one that achieved the greatest reduction of viable bacteria, although these results should be taken with certain reservations because, due to different factors, the effect of PMA was diminished.

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural, indispensable para la vida tal como la conocemos ya que, tomando un enfoque antropocéntrico, las poblaciones urbanas y rurales, así como las actividades productivas y de servicios se basan en su disponibilidad tanto en cantidad como en calidad. Desafortunadamente, es la cantidad de agua que demanda la población global, la forma de consumo y la frecuencia con la que se emplea, lo que ha llevado a convertir al agua en un recurso natural no renovable (Gleick *et al.*, 2004), particularmente en ciertas regiones del planeta. Sin duda, esta situación merece atención prioritaria, ya que es solo la punta de un iceberg que representa los problemas que enfrenta la sociedad con respecto a la gestión del agua y la seguridad hídrica. De estos problemas, uno de los más graves está relacionado con la recolección, tratamiento y disposición de las aguas residuales que, según la Ley de Aguas Nacionales de México, se definen como “aquellas aguas de composición variada provenientes de las descargas de uso público urbano, doméstico, industrial, comercial, de servicios, agrícola, pecuario, de las plantas de tratamiento y, en general, de cualquier uso; así como la mezcla de ellas”.

Por su composición, las aguas residuales constituyen un factor determinante en la contaminación de las fuentes de agua superficial (mares, ríos, lagos) y subterránea (acuíferos), así como del suelo y el subsuelo. Debido a esto, las plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) tienen por objetivo principal reducir los contaminantes del agua residual empleando una gama de operaciones (físicas) y procesos (químico y biológicos) unitarios que, en conjunto, dan lugar a un determinado sistema de tratamiento que permite la disposición adecuada o el eventual aprovechamiento del agua tratada. A este respecto, en el Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales en Operación (CONAGUA, 2018), se registró que en México existen 2540 PTAR, las cuales tratan el 64% de las aguas residuales municipales colectadas, mientras que el resto, más las aguas residuales no colectadas, se vierten crudas en los cuerpos receptores.

En México se emplean diversos procesos para el tratamiento de las aguas residuales (CONAGUA, 2018). De acuerdo con el número de plantas instaladas, los procesos que destacan son lagunas de estabilización, lodos activados y reactores

anaerobios de flujo ascendente, sistemas empleados por 774 (30.47%), 725 (28.54%) y 133 (5.24%) PTAR, respectivamente. De acuerdo con el caudal tratado, los procesos que destacan son lodos activados, dual (combinación de dos procesos) y lagunas de estabilización con 70239, 27402 y 13738 litros de agua residual tratada por segundo, respectivamente.

Todos estos sistemas de tratamiento representan un beneficio tanto para la sociedad como para el medio ambiente. Sin embargo, independientemente del tipo de sistema que se emplee, el tratamiento de las aguas residuales genera, en mayor o menor medida, residuos sólidos denominados lodos, ya que, por la ley de la conservación de la materia, al remover de alguna forma los compuestos contaminantes del agua residual éstos solo se transforman o se transfieren (Noyola *et al.*, 2013). De esta manera, una cierta parte de los componentes de las aguas residuales, como los nutrientes y los diversos tipos de contaminantes, se encuentran en el lodo incluso en una concentración mayor debido a que el volumen del lodo es menor al volumen de las aguas residuales.

En general, es común encontrar que los mayores problemas que enfrentan los operadores de las PTAR se relacionan con la gestión integral del lodo. Una forma para superar esta situación es considerar, dentro del marco de la economía circular, a las PTAR como instalaciones para la recuperación de recursos. En particular, el lodo tiene un claro potencial para producir energía y para reciclar diversos nutrientes (ej. nitrógeno y fósforo). En este sentido, de la gama de tecnologías que se pueden emplear para el tratamiento del lodo, la digestión anaerobia es ampliamente reconocida debido a que es una tecnología consolidada, con la capacidad para generar energía a través del aprovechamiento del biogás que se genera como subproducto derivado del proceso y que, además, permite producir lodos estabilizados (biosólidos), los cuales son susceptibles de ser aprovechados para uso forestal, agrícola, urbano o como mejoradores de suelo.

En México, el aprovechamiento de los biosólidos está regulado por la Norma Oficial NOM-004-SEMARNAT 2002 (SEMARNAT, 2003), que regula, entre otros aspectos, la calidad microbiológica de los biosólidos. Al respecto, diversos estudios han confirmado que la digestión anaerobia, bajo condiciones mesofílicas, no logra cumplir con los

parámetros microbiológicos más estrictos para el aprovechamiento de los biosólidos (Smith *et al.*, 2005; Bonjoch *et al.*, 2009; Rubio-Loza & Noyola, 2010; Forster-Carneiro *et al.*, 2010; Flemming *et al.*, 2017). Aunado a esta situación, se encuentra la problemática relacionada con la confiabilidad de los métodos empleados para la determinación de la calidad microbiológica de los biosólidos. En efecto, diversos estudios (Qi *et al.*, 2018; De los Cobos-Vasconcelos *et al.*, 2015; Pascual-Benito *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2007; Iranpour *et al.*, 2005) han demostrado que los métodos dependientes de cultivo, como aquellos empleados por la normativa mexicana, pueden proporcionar una subestimación de los microorganismos patógenos viables cuando se aplican horas después de producir biosólidos por medio de digestión anaerobia. Debido a esto, recientemente se ha implementado el uso de métodos independientes de cultivo, particularmente la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aunado al pretratamiento de las muestras con el reactivo propidio monoazida (PMA), para la determinación de células viables después del tratamiento del lodo (Ni *et al.*, 2020; Ruike *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2014; Van Frankenhuyzen *et al.*, 2013; Taskin *et al.*, 2011). La aplicación de esta técnica permite identificar a los microorganismos que se encuentren en un estado viable pero no cultivable, pues se sabe que, cuando las condiciones se vuelven favorables o permisibles, como cuando los biosólidos son almacenados o aplicados en el suelo, los microorganismos en dicho estado pueden reactivarse y crecer, afectando al medio ambiente y a la salud de las personas potencialmente expuestas a los biosólidos que fueron liberados por supuestamente cumplir con los parámetros establecidos en la NOM-004.

Bajo este contexto, en el presente trabajo se planteó como objetivo principal evaluar la capacidad de tres procesos de digestión anaerobia de lodo primario para reducir la cantidad de microorganismos patógenos (*Salmonella*) e indicadores de contaminación (coliformes fecales y *E. coli*), tanto viables como cultivables, empleando técnicas dependientes de cultivo (número más probable, NMP) e independientes de cultivo (secuenciación del gen 16S rRNA, PCR y PMA-qPCR), con la finalidad de asegurar la calidad microbiológica de los biosólidos producidos.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Problemática de la gestión integral del lodo

Los sistemas de tratamiento de agua residuales generan, inevitablemente, residuos sólidos denominados lodos, los cuales, por diferentes factores, son uno de los mayores problemas que enfrentan todas las PTAR a nivel mundial. Por sus características, el manejo, disposición y/o aprovechamiento inadecuado de los lodos representa un grave riesgo, no solo para el medio ambiente, sino también para la salud de las personas expuestas, directa o indirectamente, a este residuo. Sin embargo, los continuos avances en el entendimiento sobre la composición del lodo y el desarrollo de tecnologías para su tratamiento están permitiendo cambiar el paradigma asociado a este residuo al resaltar los beneficios que se pueden obtener de su gestión integral.

De acuerdo con la NOM-004-SEMARNAT 2002, que en México regula la disposición adecuada del lodo o su eventual aprovechamiento, los lodos son definidos como sólidos con un contenido variable de humedad, provenientes del desazolve de los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, de las plantas potabilizadoras y de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), que no han sido sometidos a procesos de estabilización. Aquellos lodos que si han sido sometidos a algún proceso de estabilización se denominan biosólidos y sólo estos son susceptibles de ser aprovechados. Por otro lado, aunque en la literatura más especializada se pueden encontrar diversas maneras de definir al lodo, en general, este residuo es considerado como una matriz compleja integrada por: i) agua, ii) nutrientes (fósforo y nitrógeno), iii) compuestos orgánicos no tóxicos, iv) compuestos inorgánicos no tóxicos (ej. potasio, aluminio, hierro, calcio, etc.), v) compuestos potencialmente tóxicos, ya sea orgánicos o inorgánicos (ej. zinc, níquel, mercurio, cromo, arsénico) y, vi) contaminantes biológicos (Oladejo *et al.*, 2019).

En particular, la presencia en los lodos de contaminantes orgánicos emergentes es un problema de especial preocupación debido a la enorme diversidad de estos contaminantes, que se estiman en aproximadamente 100,000 compuestos (Clarke & Smith, 2011). La lista de contaminantes orgánicos incluye, entre otros: sustancias

químicas perfluoradas, alcanos policlorados, naftalenos policlorados, organotinas, éteres difenílicos polibromados, triclosán, triclocarbán, benzotiazoles, almizcles sintéticos, bisfenol A, compuestos de amonio cuaternario, ésteres de ácido ftalato y polidimetilsiloxanos (Fijalkowski *et al.*, 2017; Rorat *et al.*, 2019). Además, otro problema asociado con los compuestos orgánicos emergentes es que, durante el tratamiento de las aguas residuales y del lodo, dichos contaminantes pueden formar compuestos intermediarios que suelen ser más tóxicos que los compuestos iniciales (Fijalkowski *et al.*, 2017).

Debido al peligro asociado a la presencia de los contaminantes orgánicos en los lodos, algunos países como Holanda, Alemania y Suiza han considerado a algunos contaminantes orgánicos dentro de sus normativas relacionadas a la disposición de lodos (Semblante *et al.*, 2015; Bauer *et al.*, 2020). Sin embargo, Reino Unido, Estados Unidos, Canadá, Brasil e inclusive la Unión Europea, en una investigación encabezada por la Comisión Europea (Langenkamp *et al.*, 2001), sostienen que no existe justificación técnica para establecer algún tipo de regulación al respecto ya que se considera que las concentraciones típicas de los contaminantes orgánicos no son peligrosas para el suelo, la salud humana o para el medio ambiente (Mininni *et al.*, 2015; Bauer *et al.*, 2020; Amorim *et al.*, 2021).

Además de los compuestos orgánicos, existe cierta preocupación sobre la acumulación de nanopartículas de plata, dióxido de titanio y óxido de zinc, pero, particularmente, hay una creciente preocupación sobre la presencia en los lodos de residuos contaminantes de productos farmacéuticos y de cuidado personal, dentro de los que destacan: antibióticos, analgésicos/antiinflamatorios, antihistamínicos, hormonas, antisépticos, antihipertensivos, hipnóticos, antiarrítmicos, antineoplásicos, reguladores lipídicos, filtros UV, medicamentos psiquiátricos, anticoagulantes, antiprotozoarios, medios de contraste, surfactantes no iónicos, antidiabéticos, beta-agonistas, receptor antagonistas, antieméticos, beta-bloqueadores, estimulantes, antifúngicos y diuréticos (Fijalkowski *et al.*, 2017).

Pese al riesgo que ejercen los contaminantes emergentes antes mencionados, es la presencia de agentes biológicos lo que genera mayor preocupación para el potencial

aprovechamiento de los lodos. Si bien en su mayoría los microorganismos presentes en los lodos corresponden a bacterias saprófitas que no representan un riesgo para la salud, el lodo también contiene agentes biológicos que pueden ser nocivos, bien sea por que algunos son patógenos o por que pueden causar un disturbio en el ecosistema. A este respecto, se han identificado en el lodo 243 bacterias potencialmente patógenas para los humanos (Huang *et al.*, 2018), y también se han llegado a identificar hongos fitopatógenos como *Mocur circinelloides* y *Geotrichum citriaurantia* (Rorat *et al.*, 2019). Por otro lado, Shlindwein *et al.* (2010) identificaron que, en algunas PTAR en Brasil, los virus más comunes son Adenovirus, Rotavirus, Poliovirus, y el virus de la Hepatitis A. Sobre la misma línea, Bibbly & Pecca (2013) encontraron que los virus de ADN como los Adenovirus, el virus del Herpes, el virus del Papiloma y el Bocavirus estuvieron presentes en 90% de las muestras de lodo analizadas, mientras que los virus de ARN como el Coronavirus, el Kassevirus y el Rotavirus estuvieron presentes en el 80% de las muestras.

Además de los muy diversos contaminantes que se pueden encontrar en el lodo, y que justifican la necesidad de una adecuada gestión integral de dicho residuo (Zhang *et al.*, 2017; Collivignarelli *et al.*, 2019), otro factor de particular importancia es el aumento en la producción de este residuo, el cual ha alcanzado volúmenes extraordinarios a nivel mundial. Por ejemplo, se estima que la producción anual de lodo de los 27 miembros de la Unión Europea y de China es de 10-13 y de 20-30 millones de toneladas en base seca, respectivamente (Zhang *et al.*, 2017; Collivignarelli *et al.*, 2019; Oladejo *et al.*, 2019; Gherghel *et al.*, 2019; Rorat *et al.*, 2019; Bauer *et al.*, 2020). Así mismo, Seiple *et al.* (2017) estiman que la producción anual de lodos en Estados Unidos es de 13.84 millones de toneladas en base seca. En México, a pesar de que no existe una fuente oficial en la que se estime la producción anual de lodos, se considera que la producción de este residuo ha ido en aumento debido al incremento en el caudal de agua residual municipal tratada, el cual pasó de 129 m³/s en 2016 a 137 m³/s en 2018 (CONAGUA, 2016; CONAGUA, 2018).

Aunado al volumen de producción se encuentran asociados los problemas económicos, ya que la gestión integral del lodo puede llegar a representar hasta el 50% de los costos de operación de las PTAR (Gherghel *et al.*, 2019; Amorim *et al.*, 2021).

Debido a esto, diversas investigaciones se han enfocado hacia el desarrollo de tecnologías en la línea de tratamiento de agua y de lodo con la finalidad de reducir el volumen de producción de este residuo (Wang *et al.*, 2017). Sin embargo, pese a que dichas tecnologías han sido ampliamente investigadas, su aplicación en las PTAR sigue siendo limitada ya que la mayoría de las investigaciones solo se han realizado a escala piloto o a escala laboratorio, o bien, porque requieren una inversión considerable.

Tabla 1.1. Comparación de la concentración de metales pesados en lodos establecidos en diferentes regulaciones para la disposición y aprovechamiento de dicho residuo (Referencias DOF, NOM-004 SEMARNAT 2002; CONAMA No. 498/20 Brasil, 2020; *Rule 503* USEPA,1994; Directiva 86/278 ECC, 1986)

Contaminantes (mg/kg en base seca)	NOM-004-SEMARNAT-2002 (México)		Resolución CONAMA No. 489/20 (Brasil)	<i>Rule 503</i> (Estados Unidos)	Directiva 86/278 (Europa)
	Clasificación:	Clasificación:			
	Excelentes	Buenos			
Arsénico	41	75	41	75	NE ^a
Cadmio	39	85	39	85	3
Cromo	1200	3000	1000	NE	135
Cobre	1500	4300	1500	4300	400
Plomo	300	840	300	840	300
Mercurio	17	57	17	57	1
Níquel	420	420	420	420	75
Zinc	2800	7500	2800	7500	300
Bario	NE	NE	1300	NE	NE
Selenio	NE	NE	36	100	NE
Molibdeno	NE	NE	50	75	NE

^a NE= no especificado

Tabla 1.2. Clasificación de lodos y biosólidos (Clase A, B o C) según la concentración de microorganismos patógenos e indicadores de acuerdo con diferentes regulaciones (Referencias DOF, NOM-004 SEMARNAT 2002; CONAMA No. 498/20 Brasil, 2020; *Rule 503* USEPA,1994; Directiva 86/278 ECC, 1986)

Contaminantes	NOM-004-SEMARNAT-2002 (México)			Resolución CONAMA No. 489/20 (Brasil)		<i>Rule 503</i> (Estados Unidos)		Directiva 86/278 (Europa)	
	Clase A	Clase B	Clase C	Clase A	Clase B	Clase A	Clase B	Clase A	Clase B
Coliformes fecales (NMP/gST)	<10 ³	<10 ³	<20 ⁶	NE ^a	NE	NE	NE	NE	NE
<i>Salmonella</i> spp. (NMP/gST)	<3	<3	<300	ND ^b	NE	<3	NE	ND	NE
Huevos de helminto (HH /gST)	<1 ^c	<10	<35	<0.25 ^c	<10	<0.25 ^c	NE	ND	NE
<i>E. coli</i> (NMP/gST)	NE	NE	NE	<10 ³	<10 ⁶	<10 ³	<20 ⁶	<10 ³	<10 ⁵
Enterovirus	NE	NE	NE	< 0.25	NE	< 0.25	NE	NE	NE

^a NE= no especificado

^b ND= no detectable

^c Huevos de helminto viables

Así pues, los altos costos de operación debido al uso de recursos y energía para la gestión integral del lodo propicia, como una práctica común, el vertimiento de dicho residuo sin tratamiento previo (ver apartado 1.2) en los cuerpos de receptores de agua, como sucede en China, dónde se estima que aproximadamente el 85% del lodo producido en ese país se dispone de una manera inadecuada (Oladejo *et al.*, 2019; Rorat *et al.*, 2019). En respuesta a esta situación, que involucra un perjuicio para el medio ambiente, el vertimiento del lodo en los cuerpos de agua se ha prohibido en diversos

países, mediante la implementación de normas relacionadas con la adecuada disposición del lodo y al aprovechamiento de los biosólidos. En este sentido, la mayoría de las normas vigentes, como la NOM-004-SEMARNAT 2002 en México (DOF, NOM-004 SEMARNAT 2002), la *Rule 503* (USEPA,1994) en Estados Unidos, la Directiva 86/278 (ECC, 1986) en la Unión Europea y la Resolución CONAMA No. 498/20 (Brasil, 2020) en Brasil, contemplan diferentes parámetros como la atracción de vectores (ej. roedores, moscas, etc.) capaces de transportar agentes infecciosos, la cantidad de metales pesados (Tabla 1.1) y el contenido de microorganismos patógenos (Tabla 1.2).

En el caso particular de la normativa mexicana, los lodos y biosólidos pueden ser clasificados como EXCELENTES o BUENOS, de acuerdo con el cumplimiento de los parámetros establecidos para metales pesados, y como clase A, B o C, de acuerdo con el cumplimiento de los parámetros establecidos para microorganismos patógenos, indicadores de contaminación y parásitos. Con base en estos dos tipos de clasificación, la NOM-004-SEMARNAT-2002 especifica las rutas de aprovechamiento que pueden seguir los biosólidos (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Rutas de aprovechamiento de los biosólidos de acuerdo con la NOM-004-SEMARNAT 2002.

TIPO	CLASE	APROVECHAMIENTO
Excelente	A	<ul style="list-style-type: none"> • Usos urbanos con contacto público directo durante su aplicación • Los establecidos para clase B y C
Excelente o Bueno	B	<ul style="list-style-type: none"> • Usos urbanos sin contacto público directo durante su aplicación • Los establecidos para clase C
Excelente o Bueno	C	<ul style="list-style-type: none"> • Usos forestales • Mejoramiento de suelos • Usos agrícolas

Además de la implementación de las normativas relacionadas con la gestión integral del lodo, los avances en el entendimiento sobre la composición y las características de dicho residuo están ayudando a cambiar la perspectiva que se tiene

sobre los lodos, considerándolos más como un recurso que como un deshecho, ya que se sabe que del tratamiento del lodo se puede obtener biogás (electricidad), nutrientes (especialmente nitrógeno y fósforo), biocombustibles (hidrógeno, gas sintético, biodiesel), materiales para la construcción, bioplásticos, bioadsorbentes, bioplaguicidas, biofertilizantes, enzimas y ácidos orgánicos de cadena corta (Tyagi & Lo, 2013; Gherghel *et al.*, 2019; Callivignarelli *et al.*, 2019). Sin embargo, debido a que la mayor parte de las tecnologías enfocadas a la recuperación de los recursos antes mencionados aún están en desarrollo, y se encuentran lejos de ser implementadas a gran escala, las rutas más frecuentes para el aprovechamiento o la disposición del lodo son: generación de energía eléctrica y térmica a partir del biogás, uso en agricultura, remediación de tierras contaminadas y/o erosionadas, aplicaciones forestales, vertimiento en rellenos sanitarios, reducción mediante procesos térmicos, y uso en la industria de la construcción (Christodoulou *et al.*, 2016; Gherghel *et al.*, 2019).

De entre las rutas antes mencionadas, la disposición del lodo crudo en los rellenos sanitarios y su vertimiento en los océanos representan las opciones más perjudiciales al medio ambiente (Sharma *et al.*, 2017). Por el contrario, el aprovechamiento de los biosólidos en la agricultura es, hoy en día, la estrategia más viable y recomendada, no solo porque este método ayuda a reducir los costos asociados con la disposición del lodo (Amorim *et al.*, 2021) sino que, además, se han reportado diferentes ventajas del aprovechamiento de los biosólidos en la agricultura. Entre los puntos fuertes de esta forma de disposición final, se ha reportado que los biosólidos mejoran la estructura del suelo al disminuir su densidad aparente, incrementando su porosidad, aumentando la retención de la humedad y mejorando la conductividad eléctrica, favoreciendo así la recuperación de nutrientes orgánicos e inorgánicos y aumentando el rendimiento de los cultivos (Fijalkowski *et al.*, 2017; Gherghel *et al.*, 2019; Callivignarelli *et al.*, 2019a; Callivignarelli *et al.*, 2019b; Amorim *et al.*, 2021). Sin embargo, es importante mencionar que se requiere considerar la correlación entre las características de los biosólidos, el tipo de suelo, las condiciones climáticas y los atributos del cultivo para observar dichos beneficios, por lo que previo a su aplicación es necesario desarrollar estudios enfocados al sistema de agricultura y a las condiciones climáticas para lograr establecer un

adecuado régimen de aplicación de acuerdo con las características de los biosólidos en cuestión (Breda *et al.*, 2020).

Pese a los beneficios antes mencionados, a nivel global, el aprovechamiento de los biosólidos en la agricultura es un tema que depende de diversos factores como los parámetros y límites máximos permisibles que establece cada regulación, la aceptación por parte de los agricultores y la disponibilidad de tierra para que los biosólidos puedan ser aprovechados (Mininni *et al.*, 2015; Christodoulou *et al.*, 2016; Callivignarelli *et al.*, 2019a; Bauer *et al.*, 2020; Breda *et al.*, 2020). En particular existen países como Japón, Holanda, Suiza y Alemania que han optado por la reducción térmica de los biosólidos más que por su aprovechamiento en la agricultura, lo cual contrasta con las prácticas de países como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, España, Francia e Italia, países que optan por el aprovechamiento de los biosólidos en la agricultura. De hecho, a pesar de que en la Unión Europea existe un debate abierto sobre las rutas de aprovechamiento de los biosólidos, en 2019 la Unión Europea destinó el 50% de los biosólidos producidos a la agricultura, mientras que el 28% fue incinerado, el 18% fue dispuesto en rellenos sanitarios y el 4% restante se destinó a otros usos (Breda *et al.*, 2020).

A pesar de que ciertas tecnologías para el tratamiento y disposición del lodo han ido ganando terreno, particularmente aquellas enfocadas a la reducción térmica de este residuo, los riesgos asociados con el aprovechamiento de los biosólidos en la agricultura son la principal razón de que ésta no sea una práctica recurrente. Dichos riesgos, aunque inherentes a la composición de los lodos y biosólidos debido a la presencia de elementos potencialmente dañinos al medio ambiente y a la salud humana, no son necesariamente una limitante para la obtención de diversos beneficios a través del tratamiento de estos residuos. En este sentido, los sistemas para el tratamiento del lodo, y especialmente la digestión anaerobia, juegan un papel crucial para minimizar los riesgos asociados con el aprovechamiento de los biosólidos en la agricultura, particularmente con respecto al contenido de contaminantes biológicos, pero también para la producción de energía.

1.2 Clasificación del lodo y procesos para su tratamiento

Como se ha mencionado anteriormente, el lodo es un subproducto derivado del tratamiento de las aguas residuales que, después de ser estabilizado y acondicionado, puede ser aprovechado en distintas actividades (Figura 1.1). También se ha mencionado que el lodo es considerado como una matriz compleja, compuesta principalmente por agua y, en menor medida, por materia sólida conformada por una gran variedad de componentes orgánicos, inorgánicos y biológicos, algunos de los cuales pueden ser tóxicos y otros representar un área de oportunidad para la obtención de recursos y energía. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las propiedades físicas, químicas y biológicas del lodo varían dependiendo de: i) el tipo proceso que se emplea en el sistema de tratamiento de aguas residuales (ej. fisicoquímico o biológico), ii) la etapa dentro del sistema de tratamiento en el que son generados (ej. tratamiento primario o secundario), iii) las características del agua residual, que pueden variar dependiendo de su origen (ej. industrial o municipal) o el periodo del año (ej. temporada de lluvias o secas, en el caso de aguas residuales municipales) y, iv) el tipo de tratamiento y estabilización que reciba el lodo para la generación de biosólidos.

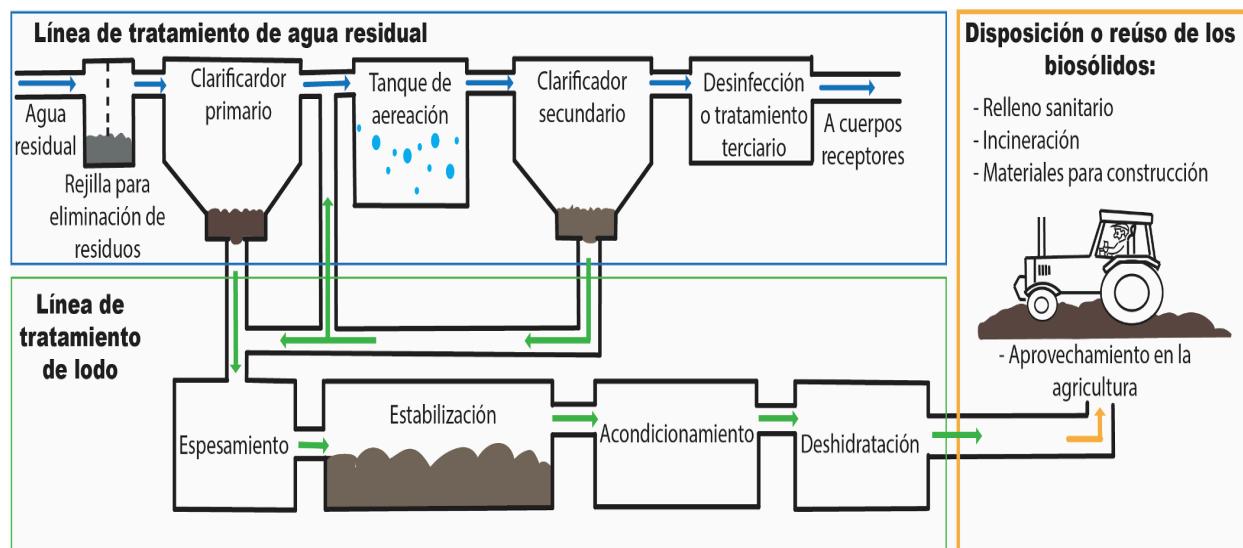


Figura 1.1. Esquema general de la producción y tratamiento lodo en una PTAR que emplea el sistema de lodos activados. (Modificado de Arthurson, 2008 y Collivignarelli *et al.*, 2019)

Así pues, con lo descrito anteriormente, el lodo puede ser clasificado de la siguiente manera:

- **Lodos generados en procesos fisicoquímicos:** provienen, principalmente, del tratamiento de las aguas industriales, del tratamiento terciario de aguas municipales o incluso del tratamiento primario avanzado, en dónde se emplean agentes químicos, como sales de aluminio o sales de hierro, para mejorar la retención de sólidos suspendidos en el proceso de coagulación-sedimentación, por lo que estos lodos son considerados básicamente como una matriz inorgánica.

- **Lodo primario:** es producido durante el tratamiento primario de las aguas residuales municipales. Este tipo de lodo posee partículas fácilmente sedimentables de naturaleza orgánica e inorgánica, tiene una coloración oscura-grisácea, es altamente putrescible, produce olores desagradables y es potencialmente peligroso debido a la abundante presencia de microorganismos patógenos.

- **Lodo secundario:** es producido durante el tratamiento secundario (biológico) de las aguas residuales municipales. Este tipo de lodo está constituido fundamentalmente de biomasa. No contiene la misma carga de patógenos que el lodo primario y, si el tratamiento secundario es bien operado, el lodo secundario tiene un color café oscuro y no produce olores desagradables, aunque suele volverse séptico con facilidad.

- **Lodo combinado:** mezcla de lodo primario y secundario.

- **Lodos estabilizados:** son denominados como biosólidos, término que fue introducido por primera vez en 1991 en Estados Unidos para favorecer su aceptación entre la población y los agricultores. Son considerados como aquellos lodos que han sido sometidos a procesos físicos, químicos y/o biológicos de estabilización donde se evita su descomposición y en algunos casos, se reduce la cantidad de materia orgánica putrescible, esto con el propósito de facilitar su aprovechamiento o su disposición final y así evitar o disminuir sus efectos contaminantes al medio ambiente.

Cabe resaltar que las características físicas (ej. calidad de la sedimentación, contenido de agua, reología, valor calorífico), químicas (ej. pH, alcalinidad, nutrientes, contaminantes) y biológicas (ej. atracción de vectores, calidad microbiológica), así como

el contenido de sólidos (ej. totales, volátiles y fijos), difiere entre los tipos de lodo. Y será en función de ello y del tipo de disposición final o aprovechamiento, que se podrá seleccionar la tecnología más apropiada para el subsecuente tratamiento del lodo.

Con el propósito de reducir el volumen de lodo para facilitar su manejo y eventual aprovechamiento, un típico tren de procesamiento de lodo, que emplea diferentes operaciones y procesos unitarios, integra: el tratamiento preliminar, el espesamiento, la estabilización, el acondicionamiento, la deshidratación, el almacenamiento, el transporte y la disposición final (Kacprzaka *et al.*, 2017). A continuación, se describen las cuatro principales etapas del sistema de tratamiento del lodo:

I. Espesamiento: su principal propósito es la reducción del volumen de lodo mediante el uso de la fuerza de gravedad (natural o inducida en una centrífuga) para la separación del agua y los sólidos debido a la sedimentación de estos últimos. Con este proceso se puede incrementar la concentración de sólidos del lodo de 0.5 a 4%, lo cual disminuye su volumen hasta ocho veces. Así mismo, puede aplicarse la flotación, particularmente en el caso de lodos secundarios.

II. Estabilización: esta etapa tiene por objetivo degradar o evitar la descomposición de la materia orgánica presente en la matriz, para lo cual se puede emplear una gama importante de tratamientos. Los tipos de estabilización más adoptados son:

II.a Incineración: es un proceso de oxidación exotérmica que produce dióxido de carbono (CO_2), agua, cenizas y una cierta cantidad de energía susceptible de ser aprovechada. Este proceso es capaz de reducir hasta un 70-80% la masa seca de lodo, por lo que es la solución que facilita mayormente la disposición final del lodo, además de que el subproducto se puede disponer en rellenos sanitario o ser utilizado para la producción de material de construcción. Sin embargo, presenta la desventaja de requerir un alto costo de inversión inicial y de operación.

II.b Alcalina: de acuerdo con la NOM-004-SEMARNAT 2002, es el proceso mediante el cual se añade suficiente cal viva (óxido de calcio, CaO), cal hidratada (hidróxido de calcio, $\text{Ca}(\text{OH})_2$), o equivalentes a la masa de lodo para elevar el pH por lo menos hasta 12, medido a 25 °C, durante 2 horas y, sin añadir más materia alcalina, mantener un pH de al menos 11,5 durante otras 22 horas. Este proceso, que requiere

una baja inversión inicial, permite reducir la producción de olores ofensivos, logra la higienización del lodo al eliminar microorganismos patógenos y facilita la deshidratación posterior del lodo. La principal desventaja que presenta es que la masa de lodo se incrementa y, por ende, eleva los costos de manejo y disposición, además del costo del reactivo.

II.c Composteo: en este proceso los componentes orgánicos del lodo son degradados biológicamente bajo condiciones controladas y mayormente aerobias, por lo general con cierta proporción de material vegetal que aporta carbono (celulosa), para que el material resultante pueda ser manejado, almacenado y utilizado sin el riesgo de ejercer efectos adversos a la salud humana o al medio ambiente. La mayor ventaja de este proceso radica en que el producto final puede ser aprovechado como mejorador de suelo o fertilizante orgánico. Sin embargo, su desventaja es que este proceso aumenta el volumen de lodo y también puede producir olores ofensivos si no se opera en condiciones adecuadas.

II.d Digestión aerobia: proceso biológico en el cual los microorganismos aerobios y facultativos, presentes en tanques agitados, usan el oxígeno suministrado para degradar el sustrato proveniente de la lisis celular del lodo secundario, mediante metabolismo endógeno. La estabilización aerobia puede llevarse a cabo bajo condiciones mesofílicas, termofílicas, criofílicas e, incluso, utilizando oxígeno puro. Los productos finales de la estabilización aerobia son CO_2 , agua y materiales no degradables (algunos polisacáridos, hemicelulosa y celulosa). Este proceso logra la reducción entre un 40-50% de sólidos volátiles (materia orgánica), generando un producto estable libre de olores desagradables. Sin embargo, pese a que los costos de inversión inicial son relativamente bajos, los costos de operación son muy elevados debido a la cantidad de energía requerida para el suministro de oxígeno.

II.e Digestión anaerobia (DA): es un proceso bioquímico multietapas que se desarrolla dentro de tanques cerrados (digestores) en ausencia de oxígeno y en el cual, a través de la degradación de la materia orgánica, se produce biogás, compuesto por CO_2 y, principalmente, metano (CH_4) en una proporción común de 30% y 70% respectivamente. El biogás, al ser un gas combustible, puede emplearse para la

producción de energía eléctrica y satisfacer hasta el 50% de los requerimientos energéticos de la PTAR (Raheem *et al.*, 2018). En este proceso se alcanza un grado de estabilización entre el 40-70% de la materia orgánica (Zhang *et al.*, 2017; Raheem *et al.*, 2018; Oladejo *et al.*, 2019), y se producen biosólidos susceptibles de ser aprovechados. Esta es la tecnología, empleada por las grandes plantas de tratamiento a nivel mundial, tiene la desventaja de requerir un tiempo de retención prolongado en los digestores (25 días en digestores mesofílicos que trabajan a 35 °C), lo cual depende del intervalo de temperatura de operación.

III. Acondicionamiento: tiene como propósito preparar a los lodos para facilitar el proceso de deshidratación. Los productos de uso más frecuente para este proceso son los productos químicos inorgánicos, como la cal o el cloruro férrico y los productos químicos orgánicos, como polímeros. Los primeros aumentan significativamente la captura de sólidos suspendidos y la generación de lodo mientras que los segundos, al favorecer la pérdida de agua y producir un agregado más seco, ayudan en controlar la masa del lodo, por lo que el acondicionamiento con polímeros es el más utilizado en la actualidad (CONAGUA, 2019).

IV. Deshidratación: este proceso tiene como propósito la reducción del volumen de lodo mediante la remoción del exceso de agua. Sin embargo, a diferencia del proceso de espesamiento, que alcanza menores grados de sequedad, para la deshidratación del lodo se emplean procesos mecánicos como la centrifugación, filtros prensa o de banda y lechos de secado. Este proceso logra reducir el contenido de humedad del lodo para facilitar su manejo y, consecuentemente, reducir los costos de transporte.

En los últimos años han surgido innovaciones tecnológicas como alternativas para el tratamiento y la gestión integral del lodo. Entre dichas tecnologías, descritas a detalle por Raheem *et al.* (2018), destacan la Pirólisis, el cual es un proceso de conversión térmica (350-900°C) de lodos el cual se lleva a cabo en un ambiente limitado en oxígeno con la subsecuente generación de gases no totalmente oxidados. Para separar el líquido o el aceite resultante, es necesario condensar los vapores mediante el enfriamiento, dejando un producto sólido llamado biocarbón. La cantidad y la calidad de los productos líquidos, gaseosos y del carbón dependen de las condiciones del proceso, incluyendo la

temperatura de funcionamiento, el tiempo de reacción y la presión, así como las características del lodo. Otra tecnología emergente que destaca es la Gasificación, ya que este proceso, bajo la oxidación parcial a elevadas temperaturas (700-1000 °C), convierte al lodo deshidratado en un gas combustible, conocido como gas de síntesis, compuesto principalmente de hidrógenos molecular (H_2), monóxido de carbono (CO), CO_2 y CH_4 . El mecanismo de gasificación incluye cuatro etapas: i) secado, ii) pirólisis o volatilización, iii) combustión y, iv) gasificación o reducción del carbón. Finalmente, vale la pena mencionar a las Células de Combustión Microbianas ya que esta tecnología bioelectroquímica permite reducir la producción de lodos secundarios al convertir, de manera directa, la materia orgánica en electricidad bajo condiciones ambientales de temperatura y presión a un pH neutro. En este proceso, las bacterias degradan la materia orgánica produciendo electrones que se dirigen al ánodo y fluyen hacia el cátodo conectado a través de una sustancia conductora que comprende una resistencia. En el cátodo, el aceptor final (ej. oxígeno) consume los electrones para completar la reacción electroquímica.

Cabe mencionar que, las tecnologías descritas anteriormente, aunque prometedoras, requieren mayor investigación, sobre todo a gran escala, ya que las ventajas más importantes, como la reducción de subproductos contaminantes o la viabilidad económica, solo han sido demostradas a escala piloto o a escala laboratorio.

1.3 Digestión anaerobia

La digestión anaerobia (DA) puede ser definida, de forma muy general, como un proceso biotecnológico que se lleva a cabo en ambientes ausentes de oxígeno y del cual se puede obtener, a través de la degradación de la materia orgánica, dos principales productos: el biogás y un efluente estabilizado. El primero es un gas combustible susceptible de ser aprovechado para la recuperación de energía debido a que posee un alto contenido de CH_4 , y el segundo, el efluente estabilizado (denominados biosólidos cuando proviene del tratamiento de lodos), representa una fuente de recuperación de recursos, principalmente nutrientes como nitrógeno y fósforo.

Como tecnología, la DA emergió a principios del siglo XX y, de forma categórica, ha probado ser un método adecuado para la producción de energía renovable y para el tratamiento eficiente de diversos residuos orgánicos. Debido a esto, la DA es ampliamente utilizada alrededor del mundo para tratar una considerable gama de residuos orgánicos, tanto líquidos (ej. aguas residuales) como sólidos (ej. lodos, la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos, estiércol de animales, residuos agrícolas). Sin embargo, son dos las regiones que destacan con respecto al uso de esta tecnología. Por un lado, Europa es la región líder en la innovación tecnológica de la DA y, por otro lado, Asia es la región con la mayor cantidad de sistemas anaerobios instalados, aunque primordialmente corresponden a sistemas a pequeña escala que se ubican en comunidades rurales (Vasco-Correa *et al.*, 2018). Por su parte, Estados Unidos y Canadá cuentan, respectivamente, con 2 500 y 100 plantas de DA para el tratamiento de diferentes tipos de residuos (Vasco-Correa *et al.*, 2018). En México, solo nueve de las veintisiete PTAR con capacidad potencial para generar energía eléctrica a partir del tratamiento de lodos mediante DA aprovechan el biogás para dicho propósito (López-Hernández *et al.*, 2017; Morales-Mantilla *et al.*, 2017).

Los sistemas diseñados en aplicaciones de ingeniería para llevar a cabo los procesos de DA pueden ser muy diversos, y dependen del tipo de residuo que se desee tratar y las características de este. Para el tratamiento de lodos generados durante el tratamiento del agua residual, los sistemas se conocen comúnmente como digestores de lodos, los cuales se clasifican en dos grupos: digestores de baja tasa y de alta tasa. Los primeros se utilizan preferentemente para estabilizar residuos con una elevada concentración de material particulado, y los segundos se usan normalmente en las PTAR (López-Hernández *et al.*, 2017). Otra diferencia importante es que los digestores de baja tasa no emplean calentamiento ni la mezcla del lodo contenido dentro del tanque mientras que los digestores de alta tasa si, lo cual mejora sustancialmente el desempeño del proceso debido a que la temperatura favorece la actividad de los microorganismos y la mezcla la interacción de dichos microorganismos con la materia orgánica para su degradación.

Además de la mezcla y el calentamiento, la forma y configuración de los digestores de lodos también afecta el rendimiento del proceso de DA pues dichos parámetros

influyen directamente en la eficiencia del mezclado ya que, dependiendo de la geometría del digester, se puede propiciar, en mayor o menor medida, la generación de zonas muertas y la acumulación de sólidos en las paredes del digester. En este sentido, de las tres geometrías típicas de los digestores de lodos (Figura 1.2), el tipo de construcción de forma ovoide presenta ventajas en cuanto al mezclado, la retención del calor y la captación del biogás. Sin embargo, los digestores en forma cilíndrica americana con pendiente en el fondo y los digestores de diseño alemán convencional son más comunes por tener un costo de construcción menor. Otras consideraciones de diseño de los digestores incluyen, además de la forma y configuración, el tipo de cubierta, la pendiente del fondo, la configuración del domo de gas, la alimentación del lodo, los sistemas de mezclado y de extracción de lodo, así como el sellado y revestimiento del digester, consideraciones que afectan el mantenimiento y la vida útil del mismo (López-Hernández *et al.*, 2017; CONAGUA, 2019).

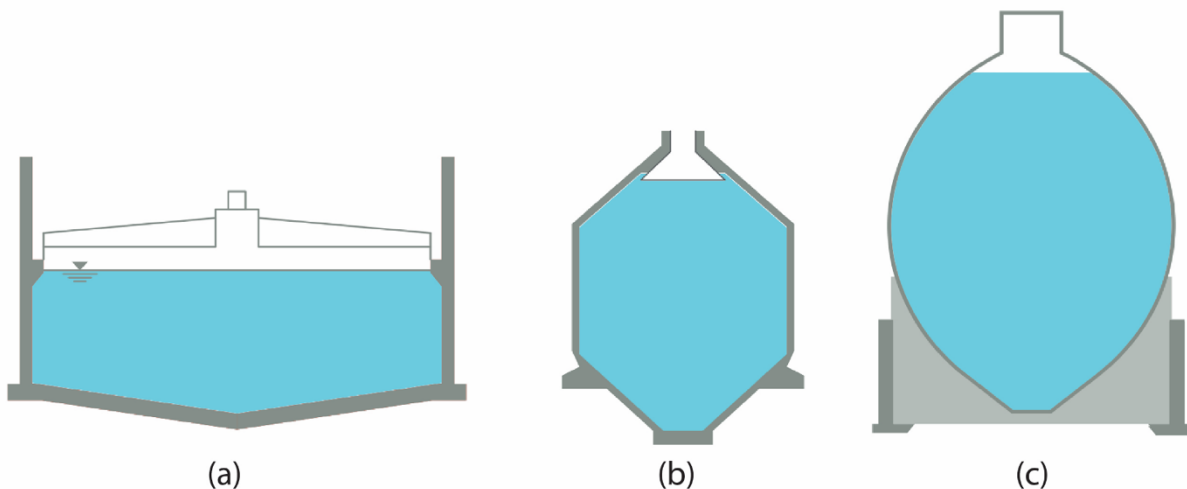


Figura 1.2. Geometría típica de digestores de lodos. (a) Cilíndrica americana con pendiente en el fondo, (b) diseño alemán convencional y, (c) forma ovoide. (Modificado de Metcalf & Eddy, 2013).

La DA tienen por eje una serie de reacciones metabólicas, subsecuentes e interdependientes, como se muestra en la Figura 1.3, mediadas por la interacción de una diversa gama de microorganismos comensales y simbióticos (Saha *et al.*, 2020). La etapa hidrolítica del proceso de DA es considerada como el principal paso limitante ya

que, la hidrólisis de materia orgánica particulada presenta bajas tasas de reacción, lo que determina la disponibilidad de sustratos para las etapas posteriores. Durante esta etapa, los polímeros orgánicos (ej. polisacáridos, lípidos y proteínas) son hidrolizados para generar monómeros u oligómeros solubles e insolubles, por medio de la actividad de microorganismos como *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Fusobacterium*, *Hydrogenoanaerobacterium*, *Paraclostridium*, *Anaerosalibacter*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Micrococcus* y *Lachnoclostridium*, que secretan enzimas hidrolíticas del tipo celulasa, xilanasas, amilasa, proteasa y lipasa (Karthikeyan *et al.*, 2016; Saha *et al.*, 2019). La siguiente etapa, denominada acidogénesis, está mediada por microorganismos fermentativos como *Clostridium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Hydrogenoanaerobacterium*, *Paraclostridium*, *Prevotella*, *Eubacterium* y *Lachnoclostridium*, los cuales utilizan azúcares, glicerol y amino ácidos como sustratos para producir, vía hidrogenación o deshidrogenación, ácidos orgánicos de cadena corta, denominados comúnmente como ácidos grasos volátiles (AGV's), así como alcoholes (ej. metanol y etanol), H₂ y CO₂ (Karthikeyan *et al.*, 2016; Kleinsteuber *et al.*, 2018; Saha *et al.*, 2019). Posteriormente, los ácidos orgánicos son metabolizados durante la etapa de acetogénesis, vía β -oxidación, a acetato y H₂ por bacterias reductoras de protones pertenecientes a las familias *Clostridiaceae*, *Syntrophomonadaceae*, *Syntrophaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Bacteroidacea* (Saha *et al.*, 2020). Finalmente, el acetato, los alcoholes, H₂ y CO₂ son transformados a CH₄ tanto por las arqueas metanogénicas acetoclásticas (*Methanosaeta*, *Methaosarcina*, *Methanothrix*) que oxidan el acetato, como por las arqueas hidrogenotróficas y metilotróficas (*Methanobacterium*, *Methanomicrobium*, *Methanococcus*, *Methanobrevibacter*, *Methanomassili*, *Methanospirillum*) que reducen los alcoholes y el CO₂ mediante la captación de electrones y H₂ (Castellano-Hinojosa *et al.*, 2018; Kleinsteuber *et al.*, 2018; Saha *et al.*, 2020).

Con lo descrito anteriormente, es claro que el entendimiento sobre la comunidad de microorganismos y las intrincadas relaciones simbióticas y sintróficas que se desarrollan entre los miembros de dicha comunidad durante proceso de DA ha avanzado sustancialmente en relación con lo que se sabía sobre estos temas hace solo un par de décadas. Un ejemplo de esto es que hoy en día se sabe que la estrecha asociación

sintrófica (recuadro rosa en la Figura 1.3) que mantienen las bacterias acidogénicas y acetogénicas exoelectrogénicas (éstas últimas siendo las que generan y transfieren electrones, hidrógeno y/o formato fuera de las células a aceptores de electrones metálicos insolubles) con las arqueas metanogénicas acetoclásticas e hidrogenotróficas facilita la oxidación de la materia orgánica y la reducción del CO₂ a CH₄ (Saha *et al.*, 2019; Saha *et al.*, 2020). Sin embargo, a pesar de que el creciente uso de diversas técnicas independientes de cultivo, particularmente las meta-ómicas, ha permitido adquirir un entendimiento más profundo y de utilidad sobre la dinámica del proceso de DA, a la fecha sigue habiendo cierta incertidumbre sobre la función y asociación de los microorganismos clave en este proceso, principalmente debido a: i) la complejidad de las comunidades microbianas responsable de la DA, ii) la gran cantidad de microorganismos aún no caracterizados, iii) las funciones altamente especializadas debido a los procesos termodinámicos, iv) el poco uso, aunque creciente, de los métodos basados en el análisis de ADN y, v) a la fluctuación de ciertos miembros de la comunidad debido a la continua entrada de microorganismos presentes en el sustrato (Carballa *et al.*, 2015).

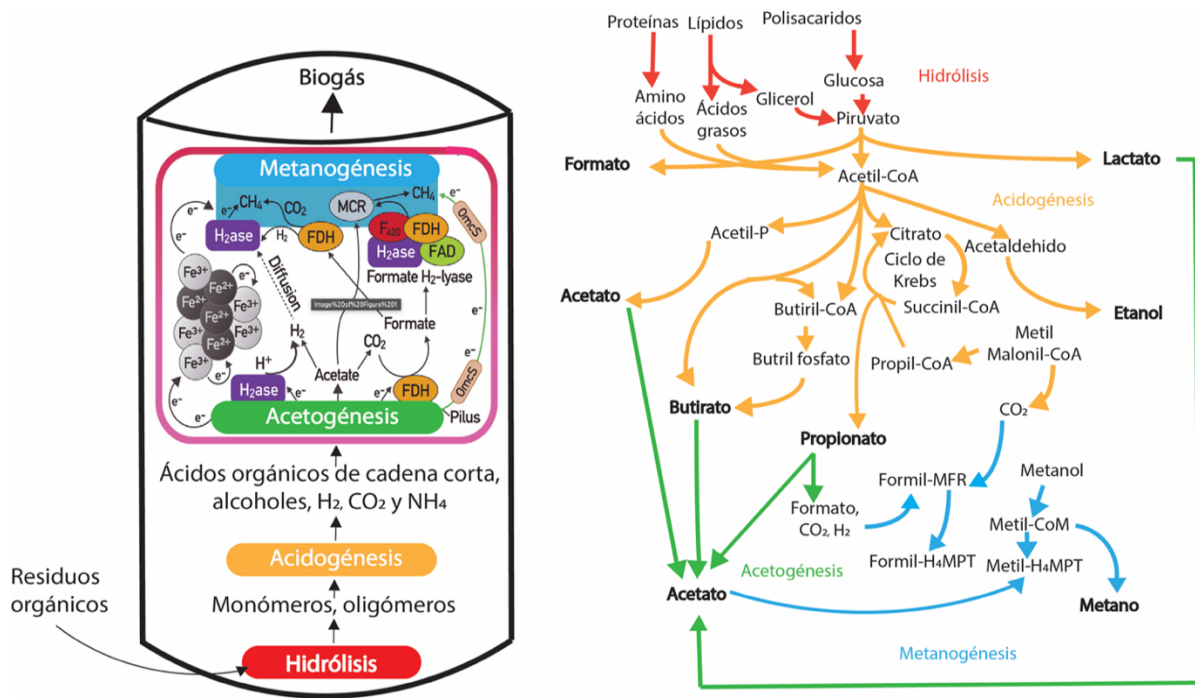


Figura 1.3. Esquema de las etapas del proceso de digestión anaerobia y sus respectivas reacciones metabólicas (Modificado de Saha *et al.*, 2020)

Aunque, el entendimiento de la composición y las interacciones de la comunidad microbiana es deseable para lograr la estabilidad y el buen funcionamiento de los sistemas anaerobios, a la fecha, la estrategia práctica para el manejo de dichos sistemas está enfocada en los denominados parámetros de operación, los cuales se pueden definir como aquellos factores fisicoquímicos que repercuten y reflejan el funcionamiento de los procesos anaerobios y la dinámica de la comunidad microbiana. Por ello, su monitoreo y control resultan indispensables para mantener condiciones de operación adecuadas (Amani *et al.*, 2010). Entre los parámetros de operación que se monitorean en un proceso anaerobio destacan:

- **Temperatura:** este factor es de alta relevancia pues se toma como base para clasificar a los sistemas anaerobios ya que afecta directamente a otros parámetros como la tasa de reacción, la composición de la comunidad microbiana, la viscosidad, la tensión superficial, la transferencia de masa, así como a las constantes de equilibrio químico, produciendo desplazamientos en los valores de alcalinidad y pH, entre otros. La temperatura de operación más empleada es bajo condiciones mesofílicas (30-40°C) y termofílicas (50-60°C). Por un lado, la DA termofílica tiene una mayor capacidad de hidrólisis y de producción de biogás, debido a una mayor actividad metabólica del consorcio microbiano, y también logra una mayor inactivación de microorganismos patógenos, lo cual favorece la producción de biosólidos de mayor calidad. Por otro lado, la DA mesofílica logra la producción de biosólidos con una menor concentración de AGV's, por lo que estos biosólidos producen menos olores ofensivos, y el sobrenadante de los biosólidos contiene una menor cantidad de sólidos disueltos, por lo que su recirculación a la línea de tratamiento de agua es más factible. Además, la DA mesofílica es un proceso más estable y con menores requerimientos energéticos que la DA termofílica.

- **pH:** La digestión anaerobia puede llevarse a cabo dentro de un intervalo de pH comprendido entre 6.2 y 7.8, siendo el óptimo entre 7.0 y 7.2. Fuera del intervalo señalado como óptimo, el proceso puede continuar, aunque con menor eficiencia, hasta un pH de 6.2 en donde las bacterias metanogénicas se ven afectadas severamente (Noyola, 1998), e incluso a niveles de pH alcalinos, donde se ven afectadas principalmente las bacterias metanogénicas acetoclásticas (Malina & Pohland, 1992).

- **Alcalinidad:** durante el proceso de DA se llevan a cabo distintos equilibrios ácido-base, pero el factor más importante para fines de amortiguamiento del pH es la alcalinidad debida a los bicarbonatos ($\text{CO}_3^{=}/\text{HCO}_3^{-}$) cuyo valor oscila, bajo condiciones de operación estable en digestores de lodos, entre 1000-5000 mg CaCO_3/L . Por otro lado, la alcalinidad debida a los AGV's se emplea como una forma indirecta para determinar la concentración de estos, los cuales se deben de mantener en el nivel más bajo posible. En este sentido, un criterio que se utiliza para monitorear si la cantidad de materia orgánica suministrada al sistema (carga orgánica) es adecuada para mantener el proceso bajo condiciones estables es la relación de alcalinidades, o relación alfa, la cual se obtiene al dividir la alcalinidad debida a los bicarbonatos entre la alcalinidad total. La primera se calcula mediante un procedimiento de titulación de una muestra de lodo, midiendo el consumo de ácido (H_2SO_4) valorado hasta un pH de 5.75 y la segunda, midiendo el volumen total del mismo ácido hasta un pH de 4.3 (Jenkins *et al.*, 1983). En terminos prácticos, el valor de la relación de alcalinidades debe mantenerse cercano a 0.5 para mantener una operación estable. Valores por debajo indican una acumulación de AGV's, debido normalmente a una sobrecarga orgánica; valores por encima refieren a un sistema estable y que eventualmente podría recibir mayores cargas.

- **Nutrientes:** los procesos biológicos que se llevan a cabo durante la DA requieren de ciertos nutrientes inorgánicos como el nitrógeno, fósforo y azufre, aunque también se requiere la presencia de elementos traza como el níquel, cobalto, fierro y molibdeno. La importancia de estos elementos inorgánicos radica no solo en que, bajo ciertas concentraciones, pueden aumentar la eficiencia del proceso, sino que la falta de estos afecta la conversión de AGV's debido que estos nutrientes están involucrados en las actividades enzimáticas de las diferentes etapas de la DA (White & Stuckey, 2000). Una relación DQO:nitrógeno:fósforo:azufre adecuada para digestores de lodos se encuentra entre 800-1000:5:1:0.2.

- **Inhibidores:** en el proceso de DA se ha identificado que la toxicidad de diversos compuestos, los cuales afectan en mayor medida a las arqueas metanogénicas, se relaciona con el pH del medio y la constante de disociación del compuesto en cuestión. De entre los inhibidores más estudiados destaca el amoníaco, el ácido sulfhídrico y los AGV's, donde su forma tóxica es la no ionizada debido a que así pueden atravesar la

pared celular con facilidad y, una vez dentro, recuperar su forma ionizada propiciando un cambio de pH en el interior de la célula (Noyola, 1998).

- **Biogás:** bajo condiciones óptimas de operación, el biogás producido en los sistemas anaerobios contiene entre 65-70% de CH₄, 30-35% de CO₂ y trazas de otros gases como nitrógeno, hidrógeno, ácido sulfhídrico y siloxanos, siendo estos dos últimos particularmente dañinos para las instalaciones de recuperación del biogás. Los valores típicos de producción de biogás en los sistemas de digestión anaerobia de lodos son de 0.5-0.75 m³ CH₄/kg SV_{alimentado} o de 0.75-1.12 m³ CH₄/kg SV_{eliminado} (Noyola, 1998).

La estabilidad y el buen desempeño del proceso de DA, que se logran mediante el adecuado monitoreo de los parámetros de operación, permiten obtener los beneficios derivados de esta tecnología, dentro de los que se puede destacar: i) la reducción de la masa y volumen de lodo, lo que disminuye los costos asociados a su manejo y disposición, ii) la producción de energía mediante el aprovechamiento del biogás, lo que permite satisfacer las necesidades energéticas del mismo proceso e incluso abastecer parcialmente las necesidades energéticas de la PTAR, y iii) la recuperación de recursos (nutrientes) mediante el aprovechamiento de los biosólidos en la agricultura. Además, otras ventajas de la DA es que, por un lado, a diferencia de los sistemas de reducción térmica, es ideal para tratar influentes que contienen una gran cantidad de agua (ej. lodo) ya que este proceso se lleva a cabo en ambientes acuosos y, por otro lado, en comparación con los residuos que no son tratados, la DA reduce la producción de olores desagradables y la emisión de gases de efecto invernadero.

Sin embargo, pese a ser una tecnología consolidada, se siguen realizando investigaciones con la finalidad de mejorar el desempeño del proceso de DA al atender algunas de las áreas de oportunidad más importantes, entre las que destacan: i) los largos periodos de retención hidráulica, ii) el incremento de conversión de los sólidos volátiles en biogás, iii) las características inadecuadas del sobrenadante, que tiene que dirigirse hacia la línea de tratamiento de agua y que representa una carga adicional al sistema, iv) la incertidumbre sobre la función y asociación de los organismos clave en este proceso, cuyo entendimiento llevaría a mantener la estabilidad y robustez del

proceso, y v) el aseguramiento de la calidad microbiológica, que es el principal parámetro a considerar para el aprovechamiento de los biosólidos.

1.4 Desinfección de lodos

Los digestores anaerobios para el tratamiento de lodos pueden estar asociados a etapas previas o posteriores destinadas a mejorar el rendimiento del proceso, la reducción de sólidos volátiles, la destrucción de patógenos y/o a la reducción de la formación de espuma (CONAGUA, 2016). Las etapas adicionales al proceso de DA involucran tratamientos de tipo: i) químico, que emplea el uso de reactivos ácidos, alcalinos u oxidantes para que, mediante el ajuste del pH, se favorezca la hidrólisis de la materia orgánica, ii) mecánicos, específicamente el tratamiento de ultrasonido, que utilizan la vibración producida por una serie de sondas para solubilizar la materia orgánica y, iii) térmicos, los cuales se pueden subdividir en hidrólisis térmica y en pasteurización, dónde los primeros emplean temperaturas mayores a 100°C, frecuentemente en condiciones de presión superior a la atmosférica, y los segundos utilizan temperaturas menores (Oladejo *et al.*, 2019; CONAGUA, 2016). En el mercado internacional actual, las marcas registradas que aplican a gran escala algunos de estos tratamientos son: Cambi (térmico), MicroSludge™ (fisicoquímico), CROWNs (mecánico), Alpha-Bioterm (pasteurización), BioPasteur (pasteurización) y Eco-Therm (pasteurización) (CONAGUA, 2016; Tyagi *et al.*, 2013).

Por otro lado, a nivel de investigación, Liu *et al.* (2019) resalta que la búsqueda en diversas bases de datos empleando las palabras “DA” y “pretratamiento” mostraron un incremento, en relación con la búsqueda exclusiva usando la palabra “DA”, de 1.67% en 1990 a 24.58% en 2018. Sin embargo, a diferencia de la considerable cantidad de trabajos enfocados al estudio de pretratamientos para incrementar la producción de biogás, la búsqueda con las palabras “DA” e “higienización o sanitización” evidenció la escasa investigación en materia del aseguramiento de la calidad microbiológica de los biosólidos producidos mediante DA, arrojando menos de cinco artículos por año entre 1990-2003 y de cinco a veinte artículos por año entre 2004-2018. En la Tabla 1.4 se presenta los puntos más importantes de algunos estudios publicados en los últimos años.

Tabla 1.4. Revisión bibliográfica de investigaciones sobre digestión anaerobia y desinfección de lodos

Objetivo del trabajo	Condiciones de tratamiento	Resultados	Referencias
<p>Evaluar la combinación de tratamientos con cal y calor para lograr la destrucción de coliformes fecales con tres temperaturas durante una hora</p>	<p>Mezcla de biosólidos (500g peso húmedo) con 5%, 10%, 15%, 20% y 25% de hidróxido de calcio.</p> <p>Las mezclas (5%, 10% y 15%) fueron incubadas a temperatura ambiente, 40 °C, 50 °C y 60 °C durante 1h.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sin tratamiento térmico fue necesario la adición de 25% de cal para lograr la reducción de 2 unidades logarítmicas de coliformes fecales. - Cinco condiciones lograr una reducción >2 unidades logarítmicas de coliformes fecales: incubación a 50 °C con 10% y 15% de hidróxido de calcio, y la incubación a 60 °C con 5%, 10% y 15% de hidróxido de calcio. 	<p>Chaudhary <i>et al.</i>, 2021</p>
<p>Investigar si la inoculación de los biosólidos tratados térmicamente con agua residual impedía el crecimiento de <i>E. coli</i> tras su recontaminación</p>	<p>DA termofílica (55 °C)</p> <p>Tratamiento térmico (165 °C) más DA mesofílica (40 °C)</p> <p>DA mesofílica (38 °C) más tratamiento térmico (165 °C)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - El tratamiento térmico y la DA mesofílica mostró una menor recolonización de <i>E.coli</i> que el proceso de DA termofílica. - El proceso DA mesofílica y el tratamiento térmico mostraron favorecer la recolonización de <i>E.coli</i> - El post tratamiento térmico logró una reducción en el conteo de células viables (NMP) de <i>E.coli</i> pero no logró la destrucción del gen <i>uidA</i> 	<p>Svennevik <i>et al.</i>, 2020</p>
<p>Investigar la supervivencia de bacterias patógenas y de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en dos plantas de biogás a escala real operadas a temperatura mesofílica en Hokkaido, Japón.</p>	<p>DA mesofílica y DA mesofílica seguida de un tratamiento térmico (70 °C) durante 1h</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La DA mesofílica redujo a niveles indetectables la concentración de <i>E.coli</i>, <i>Enterococcus</i>, <i>Salmonella</i> y <i>Pseudomonas</i>. - La remoción efectiva de los patógenos sugiere que los sistemas a gran escala pueden mostrar mejores eficiencias de inactivación que sistemas a escala laboratorio - <i>Campilobacter</i> mostró ser resistente al proceso de DA y al tratamiento de esterilización probablemente debido a que a su capacidad para formar esporas. 	<p>Qi <i>et al.</i>, 2019</p>
<p>Investigar la eficacia del tiempo de tratamiento térmico y de la mezcla en la inactivación de coliformes fecales, <i>Salmonella</i> spp. y <i>Streptococcus</i></p>	<p>Tratamiento térmico a 70 °C durante 20, 40, 60, 80.100 y 120 min.</p> <p>Dichos tratamientos se evaluaron sin mezcla y con mezcla a 133, 191 y 238 s⁻¹</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Para la condición del tratamiento térmico sin mezcla fue necesario emplear 100min para la reducción de coliformes y <i>Streptococcus</i>, y 80min para <i>Salmonella</i>. - Los tratamientos térmicos que si emplearon mezcla (a cualquier velocidad) lograron la reducción de hasta 2 unidades logarítmicas de los microorganismos en 60min y la completa inactivación hasta los 80min. 	<p>Yin <i>et al.</i>, 2018</p>

Tabla 1.4. Continuación

Objetivo del trabajo	Condiciones de tratamiento	Resultados	Referencias
<p>Investigar la aparición y las concentraciones de indicadores fecales específicos y patógenos entéricos en los biosólidos de aguas residuales municipales digeridos anaeróbicamente, con la intención de examinar las correlaciones entre los patógenos y los indicadores</p>	<p>DA mesofílica (35°C)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Después de la etapa de digestión se reportó una reducción de entre 0.30-2.67 unidades logarítmicas de <i>E. coli</i> y de entre 0.26-3.0 unidades logarítmicas de <i>Salmonella</i> - Se observó el recrecimiento de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> en biosólidos después de se almacenados 2-3 días a 30°C. 	<p>Flemming <i>et al.</i>, 2017</p>
<p>Investigar el efecto del pretratamiento térmico (70 °C) en la inactivación de patógenos y la relación entre el tiempo de inactividad y la concentración de sólidos de los lodos.</p>	<p>Pretratamiento térmico (70°C) seguido de DA mesofílica</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Para la completa inactivación de coliformes fecales a una concentración de 1% de ST se requirieron 60 min, pero para una concentración de 12% de ST se requirieron 100min de tratamiento (70°C). - Para la completa inactivación de <i>Salmonella</i> a una concentración de 1% de ST se requirieron 60 min, pero para una concentración de 12% de ST se requirieron 80min de tratamiento. 	<p>Yin <i>et al.</i>, 2016</p>
<p>Evaluar una etapa de pretratamiento térmico a baja temperatura para la inactivación de patógenos en los lodos antes de entrar en el digester anaeróbico</p>	<p>Tratamiento térmico (50, 60, 70, 80 °C) a diferentes tiempos de contacto (30, 60 y 90 min) seguido de un enfriamiento a temperatura ambiente, con baño de hielo y con baño de hielo más NaCl.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - El tratamiento térmico durante 60 min a cualquier temperatura, seguido de un enfriamiento gradual a temperatura ambiente permitió la reactivación y recrecimiento de coliformes fecales y <i>Salmonella</i>. - El tratamiento térmico durante 60 min a 70 y 80 °C, seguido de un enfriamiento rápido con baño de hielo y NaCl evitó la reactivación y recrecimiento de coliformes fecales y <i>Salmonella</i> después de 48h. 	<p>De los Cobos <i>et al.</i>, 2015</p>

Tabla 1.4. Continuación

Objetivo del trabajo	Condiciones de tratamiento	Resultados	Referencias
<p>Probar, la eficacia del amoníaco a baja concentración más la digestión anaerobia psicrófila, mesófila y termófila para lograr la desinfección de lodos</p>	<p>DA psicrófila (20°C) más tratamiento químico con amonio 2 g/kg (pH= 8.53), 3.3 g/kg (pH= 9.12) y 5.3 g/kg (pH= 9.48),</p> <p>DA mesófila (35°C)</p> <p>DA termófila (55°C)</p>	<p>-Después de 13 días, el tratamiento de DA mesófila y termófila reportaron concentraciones menores a 3.2 log₁₀ de coliformes fecales y <i>Salmonella</i> spp. no fue detectada.</p> <p>-Después de 60 días, todos los tratamientos de DA psicrófila con amonio reportaron una concentración menor a 3.2 log₁₀NMP/gST y menor a 1.5 log₁₀ NMP/gST de coliformes fecales y <i>Salmonella</i> spp., respectivamente.</p>	<p>Scaglia <i>et al.</i>, 2014</p>
<p>Monitorear el recrecimiento y/o la recuperación de las células lesionadas de la <i>E. coli</i> desde un estado viable no cultivable tras la higienización de los lodos</p>	<p>DA mesófila (35°C)</p> <p>DA termófila seguida de un tratamiento térmico (55 y 80 °C) durante 2, 3 y 4h.</p>	<p>- Después del tratamiento térmico a 55 °C se observó un recrecimiento de <i>E. coli</i> a las pocas horas del almacenamiento de los biosólidos.</p> <p>- El tratamiento térmico a 80 °C logró la completa inactivación de <i>E. coli</i>. Después de 4h de almacenamiento, no se observó un recrecimiento.</p>	<p>Pascual-Benito <i>et al.</i>, 2014</p>
<p>Comparar el efecto de los pretratamientos con ultrasonido y térmico a baja temperatura y alcalino sobre la reología, la higienización y el potencial de metano de lodos secundarios</p>	<p>Tratamiento térmico (80 °C) durante 20 min de tiempo efectivo</p> <p>Tratamiento alcalino con 157g NaOH/kgST (pH >12 durante 24h)</p> <p>Tratamiento con ultrasonido a 5000, 11000 y 27000 kJ/kg ST</p>	<p>-La concentración de <i>E. coli</i> en el lodo secundario fue de 6 log₁₀ UFC/gST y el tratamiento térmico logró una reducción de 4 unidades logarítmicas.</p> <p>-El tratamiento alcalino logró una reducción de 2.57 unidades logarítmicas de <i>E. coli</i> pasando de 6 log₁₀ UFC/gST a 3.2 log₁₀ UFC/gST.</p> <p>-El tratamiento con ultrasonido no disminuyó la concentración de <i>E. coli</i>.</p>	<p>Ruiz-Hernando <i>et al.</i>, 2014</p>
<p>Determinar el tiempo mínimo de exposición (2, 2.5, 6 o 24 horas) a los tratamientos de digestión anaerobia a 60, 55 o 35 °C, así como mediante la pasteurización a 70 °C durante 60 min para lograr la higienización de la mezcla lodos primarios y secundarios</p>	<p>DA a 60, 55 o 35 °C y pasteurización a 70 °C</p>	<p>- Se confirmó la presencia de <i>Salmonella</i> en el lodo de alimentación y después de la DA mesófila. Sin embargo, para las otras condiciones de DA y para el pretratamiento térmico <i>Salmonella</i> no fue detectada.</p> <p>- <i>E. coli</i> se encontró en una concentración de aprox. 7 log₁₀ UFC/g ST en el lodo de alimentación, después de DA mesófila la concentración fue de 5 log₁₀ UFC/g ST, y después de DA termófila y de la pasteurización en una concentración 2.36 log₁₀ UFC/g ST.</p>	<p>Kjerstadius <i>et al.</i>, 2013</p>

Tabla 1.4. Continuación

Objetivo del trabajo	Condiciones de tratamiento	Resultados	Referencias
<p>Investigar el contenido de <i>E. coli</i>, <i>Salmonella</i> sp. y <i>Shigella</i> sp. en un digester mesofílico de flujo continuo a diferentes tiempos de retención mediante los métodos de número más probable y qPCR</p>	<p>DA mesofílica con tiempos de retención de 11, 16 y 25 días</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La concentración promedio de <i>E. coli</i> en el lodo de alimentación fue de 6.75, 6.51, 6.63 log NMP/gST a un TRH de 11, 16 y 25d. Después de 36 días de operación de los digestores se reportaron concentraciones de <i>E. coli</i> de 4.82, 3.53, 3.62 log NMP/gST a un TRH de 11, 16 y 25d, respectivamente. - La concentración promedio de <i>Salmonella</i> en el lodo de alimentación fue de 6.26, 5.58, 6.55 log NMP/gST a un TRH de 11, 16 y 25d. Después de 36d de operación se reportó una concentración de <i>Salmonella</i> de 4.33, 2.62 y 2.83 log NMP/gST. - A diferencia de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i>, no se observó una reducción significativa en la concentración de <i>Shigella</i>. 	<p>Chen <i>et al.</i>, 2013</p>
<p>Evaluar el impacto de la DA mesofílica y termofílica, utilizando el mismo tipo de reactor y los mismos lodos crudos, en el rendimiento del proceso y la higienización de los lodos.</p>	<p>DA mesofílica a 20 días de tiempo de retención y DA termofílica a 15 días de tiempo de retención. Postratamiento térmico a 60 °C durante 5, 10, 30 y 60 min, y a 80 °C durante 2, 5 y 10 min</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La DA mesofílica logró una reducción de 2.2 log₁₀ de <i>E. coli</i> y la DA termofílica logró una reducción de 4.2 log₁₀. - Después de 2 min, el post tratamiento térmico a 80°C logro la completa inactivación de <i>E. coli</i>. 	<p>Astals <i>et al.</i>, 2012</p>
<p>Investigar los mecanismos de producción de olores de los biosólidos y el rebrote de indicadores patógenos, y observar los factores que contribuyen a la estimulación del recrecimiento microbiano en los biosólidos</p>	<p>DA mesofílica, DA mesofílica con pretratamiento térmico (66 °C durante 2h) y DA termofílica</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Se reportó el recrecimiento de coliformes fecales en biosólidos sin deshidratar producidos mediante DA mesofílica después de su almacenamiento durante 24h. - Los biosólidos deshidratados mediante centrifugación, reportaron un incremento en la concentración de <i>E. coli</i> mientras que esto no ocurrió con los biosólidos deshidratados mediante filtro prensa. 	<p>Chen <i>et al.</i>, 2011</p>

De la revisión bibliográfica realizada sobre el tema de desinfección de lodos hay ciertos temas que vale la pena resaltar. Por un lado, para referirse a los fenómenos asociados al proceso de desinfección, en la literatura se emplean diversos términos, los cuales se definen a continuación:

- **Desinfección:** Inactivación de los microorganismos, evitando así su desarrollo.

- **Inactivación:** Pérdida de viabilidad de un agente biológico (Magos, 2013). Para referirse a este fenómeno, en la bibliografía se suelen emplear indistintamente otros términos como remoción, destrucción, eliminación o decaimiento.

- **Viabilidad:** Capacidad de un agente biológico para crecer y desarrollarse, tanto en un hospedero como en medios de cultivo estándar bajo condiciones controladas de laboratorio (Magos, 2013).

- **Supervivencia:** Conservación de la viabilidad de un microorganismo a través del tiempo (Magos, 2013).

- **Crecimiento:** Incremento cuantificable de una población microbiana a través del tiempo (Zaleski et al., 2005).

- **Recrecimiento:** Crecimiento que sucede, después de un periodo de tiempo, y posterior a una etapa de decremento en la cantidad de microorganismos (Zaleski et al., 2005).

- **Reactivación:** Incremento en el número de microorganismos en un tiempo menor al tiempo de duplicación característico (Gattie & Lewis, 2004).

Por otro lado, es de llamar la atención que, a pesar de que las normas internacionales vigentes en materia de lodos y biosólidos contemplan la calidad microbiológica como parámetro crucial para su aprovechamiento, solo algunas entidades regulatorias, como la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos y de Suecia, proponen procesos capaces de lograr la desinfección de lodos. Para dicho propósito, sugieren implementar, de forma adicional al proceso de DA mesofílica, el pretratamiento térmico (pasteurización) a 70°C durante 60 min o, en su defecto, utilizar exclusivamente la DA termofílica (Kjerstadius *et al.*, 2013).

Por último, otro tema que resalta de la revisión bibliográfica realizada es que diversos estudios han sugerido que los indicadores de contaminación microbiológica convencionales (*E. coli*, coliformes fecales y *Salmonella*), establecidos en la mayoría de las normativas vigentes, no responden a los mismos mecanismos de inactivación que los virus o inclusive que otras bacterias potencialmente patógenas (Zhao & Liu, 2019; Kjerstadius *et al.*, 2013; Sidhu & Toze, 2009), lo cual resulta particularmente riesgoso para el aprovechamiento seguro de los biosólidos. A este respecto, diversos son los factores que pueden explicar la supervivencia de ciertos microorganismos, como la efectividad del tratamiento para la desinfección de lodos, la capacidad del microorganismo en cuestión para formar esporas o, inclusive, la capacidad del microorganismo para entrar a un estado viable no cultivable (VBCN, del término en inglés Viable But Non Culturable). Debido a su complejidad, este es un tema que requiere mayores estudios para lograr un adecuado entendimiento del problema y así reducir el riesgo a la salud pública derivado del aprovechamiento de los biosólidos.

1.5 Métodos para la determinación de la calidad microbiológica del lodo

Los métodos dependientes de cultivo (MDC), que son aquellos basados en el crecimiento de los microorganismos en sustratos definidos y bajo condiciones ambientales controladas, se desarrollaron hacia finales del siglo XIX con el propósito de estudiar a los microorganismos. Su desarrollo ha sido tal que los MDC se emplean de forma convencional para diferentes propósitos, no solo porque se cuenta con una amplia gama de medios de cultivo (ej. enriquecimiento, selectivos, diferenciales), sino también porque se han empleado tan intensamente que, a la fecha, se cuenta con protocolos estandarizados para su uso. Debido a esto, los MDC son empleados por las normas vigentes, tanto a nivel nacional como internacional, como la principal opción para determinar la calidad microbiológica de lodos y biosólidos.

De entre los MDC, las técnicas más empleadas para dicho propósito son: i) conteo en placa (ej. dispersión en placa, vaciado en placa, filtración de membrana) y, ii) número más probable (NMP). De acuerdo con López *et al.* (2019), la técnica del NMP, a pesar de su practicidad para analizar muestras ambientales, requiere un mayor tiempo de

análisis e involucra un mayor riesgo de contaminación de la muestra que las técnicas de conteo en placa. Sin embargo, estas últimas son más precisas y sensibles que la técnica del NMP, aunque también conllevan una serie de desventajas inherentes a la técnica en cuestión. Por ejemplo, para la técnica de vaciado en placa, la temperatura de preparación del medio (55°C) puede dañar algunas células o, para la técnica de filtración de membrana, cuando la concentración de microorganismos es baja y la muestra de lodo se manipula sin ninguna dilución, la cantidad de sólidos que se acumulan en el filtro pueden originar interferencias en el contacto entre los microorganismos y el medio de cultivo.

De manera general, se considera que los MDC son tediosos (ej. preparación de medios y/o materiales), requieren tiempos prolongados de análisis, pueden introducir sesgos y no son aptos para el crecimiento de algunos microorganismos (Van Frankenhuyzen *et al.*, 2011). En particular, este último punto, referente a nuestra incapacidad de estudiar a una importante cantidad de microorganismos debido a que no contamos con los medios de cultivo adecuados para dicho propósito, ha podido ser subsanado debido al desarrollo y creciente uso de los métodos independientes de cultivo (MIC), que son aquellos basados en el análisis del ácido ribonucleico (ARN) o del ácido desoxirribonucleico (ADN). Sin embargo, no hay que perder de vista que, aunque se estima que el 99% de los microorganismos en el planeta no pueden ser estudiados mediante los MDC, la realidad es mucho más compleja ya que la incapacidad de poder cultivar a ciertos microorganismos depende no solo de las limitaciones de los MDC sino también de las características y condiciones del microorganismo en cuestión (Emerson *et al.*, 2017).

En este sentido, la evidencia muestra que la incapacidad de poder cultivar a cierto microorganismo no implica, necesariamente, que éste no se encuentre presente y viable. De hecho, a la fecha se han identificado cuatro estados de supervivencia donde las bacterias pierden la capacidad de crecer en medios de cultivo (Pinto *et al.*, 2015). De entre estos estados de supervivencia el más relevante con respecto al aseguramiento de la calidad microbiológica de lodos y biosólidos es el estado VBNC. Este estado, descrito originalmente por Xu *et al.* (1982), a pesar de no ser reconocido por algunos autores (Kim *et al.*, 2018), se ha convertido en el foco de atención de diversas investigaciones debido

a dos razones principales: i) ha sido identificado como un mecanismo de supervivencia en 68 especies bacterianas de diferentes ascendencias filogenéticas (Pinto *et al.*, 2013; Oliver, 2010), y ii) la inducción al estado VBNC se debe a la exposición de las bacterias a condiciones de estrés (ej. temperatura, pH ácidos o alcalinos, poca disponibilidad de nutrientes, etc.) y, sin embargo, cuando las condiciones se vuelven favorables o permisibles, las bacterias pueden reactivarse y recrecer, representando así un riesgo para el aseguramiento de la calidad microbiológica de lodos y biosólidos (Dong *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2014; Oliver, 2010).

Debido a los estados de supervivencia, como el estado VBNC, se ha vuelto evidente que definir la viabilidad de las bacterias de acuerdo exclusivamente con su capacidad para crecer en medios de cultivo puede ser impreciso y riesgoso. Por ello, se ha propuesto (Emerston *et al.*, 2017; Nocker & Camper, 2008) que los protocolos enfocados a la determinación de células viables se enfoquen, no solo en determinar la capacidad de los microorganismos para crecer en medios de cultivo, sino también en el análisis de otros criterios como la existencia de membranas íntegras y funcionales, la actividad metabólica, y el poseer los elementos necesarios para auto replicar su ADN y poder transcribirlo a ARN. De dichos criterios, la determinación de integridad de la membrana se ha convertido en el criterio más utilizado para evaluar la viabilidad de las células debido no solo a su practicidad sino también a su fiabilidad ya que, como las membranas celulares mantienen los procesos físicos, químicos y biológicos necesarios para la vida, se considera que si las células presentan un daño en sus membranas es muy seguro que éstas están, o eventualmente se encontrarán, inviables.

De entre los MIC, la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) ha surgido como una alternativa para superar los inconvenientes relacionados con los MDC debido a que la PCR es una técnica rápida, sensible y específica. Sin embargo, su principal desventaja es que esta técnica amplifica el ADN tanto de las células vivas como el de las células no viables por lo que, para superar este inconveniente, se han implementados variaciones de esta técnica, como la PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR), la cual es una técnica que usa el ARN mensajero, molécula producida para la expresión de algún gen, con la finalidad de determinar la presencia de células vivas. Sin embargo, esta técnica tiene como desventaja que el ARN

mensajero es una molécula que se degrada fácilmente y que, además, su presencia depende de si el gen del cual deriva al ARN mensajero está siendo expresado por las células (Emerson *et al.*, 2017; Barbau-Piednoir *et al.*, 2014).

Otra variante de la técnica de PCR, basada en la amplificación del ADN para la detección preferente de células vivas, se denomina PCR de viabilidad (v-PCR), la cual es una técnica que emplea el pretratamiento de las muestras con ciertos reactivos como la monoazida de etidio (EMA) (Nogva *et al.*, 2003), la monoazida de propidio (PMA) (Nocker *et al.*, 2006) y, más recientemente, los compuestos de platino (Soejima & Iwatsuki, 2016) y de paladio (Soejima *et al.*, 2016). Dichas moléculas fueron concebidas con la finalidad de que, no permear las membranas celulares íntegras, solo podrán intercalarse exclusivamente con el ADN de células no viables, por lo que la técnica de v-PCR utiliza la integridad de la membrana como criterio de viabilidad.

Los protocolos relacionados con la determinación de células viables mediante la técnica de v-PCR, empleando el EMA o el PMA, se llevan a cabo en cuatro pasos (Figura 1.4). Primero, en un cuarto en penumbra, se mezcla la muestra con el reactivo en una concentración óptima y una vez que el reactivo entra en contacto con la matriz se procede a un periodo de incubación en el cual se busca que el reactivo se distribuya de manera homogénea en la muestra. El siguiente paso consiste en la fotoactivación del grupo azida de la molécula del EMA o del PMA, convirtiéndolo en un radical nitreno con la capacidad de unirse covalentemente con el ADN. Para la etapa de fotoactivación se emplean lámparas de halógeno (500-750 W) o lámparas LED de luz azul, siendo estas últimas las más adecuadas pues evitan el sobrecalentamiento de la muestra y permiten una óptima fotoactivación de los reactivos debido a que la emisión de luz de estas lámparas es de 465 nm, muy cercana al espectro de absorción máximo del PMA (464 nm) y del EMA (456nm). Posteriormente se continúa con el tercer y cuarto paso, la extracción del ADN y su amplificación por PCR, respectivamente. Durante estas dos últimas etapas se considera que el ADN que interactuó con el EMA o el PMA durante el paso de fotoactivación se vuelve incapaz de amplificarse mediante la PCR o bien que se pierde durante el proceso de extracción, ya sea porque se vuelve insoluble o porque se fragmenta (Soejima *et al.*, 2007).

De acuerdo con Fittipaldi *et al.* (2011), el tratamiento con EMA y PMA durante la técnica de v-PCR tiene tres posibles escenarios. El primer escenario es el ideal, donde el PMA se unió a todo el ADN extracelular y de las células no viables, permitiendo la exclusiva detección del ADN de las células viables. El segundo escenario es aquel donde se presentan falsos-negativos debido a que el EMA o el PMA permearon la membrana de las células viables y/o se unió al ADN de aquellas células con un daño reversible en sus membranas. Y, el último escenario es aquel dónde se presentan falsos-positivos debido a que el EMA o el PMA fueron incapaces de unirse a todo el ADN de las células no viables, ya sea por la presencia de inhibidores ambientales, una gran cantidad de células muertas o por una fotoactivación ineficiente debido a la complejidad de la matriz.

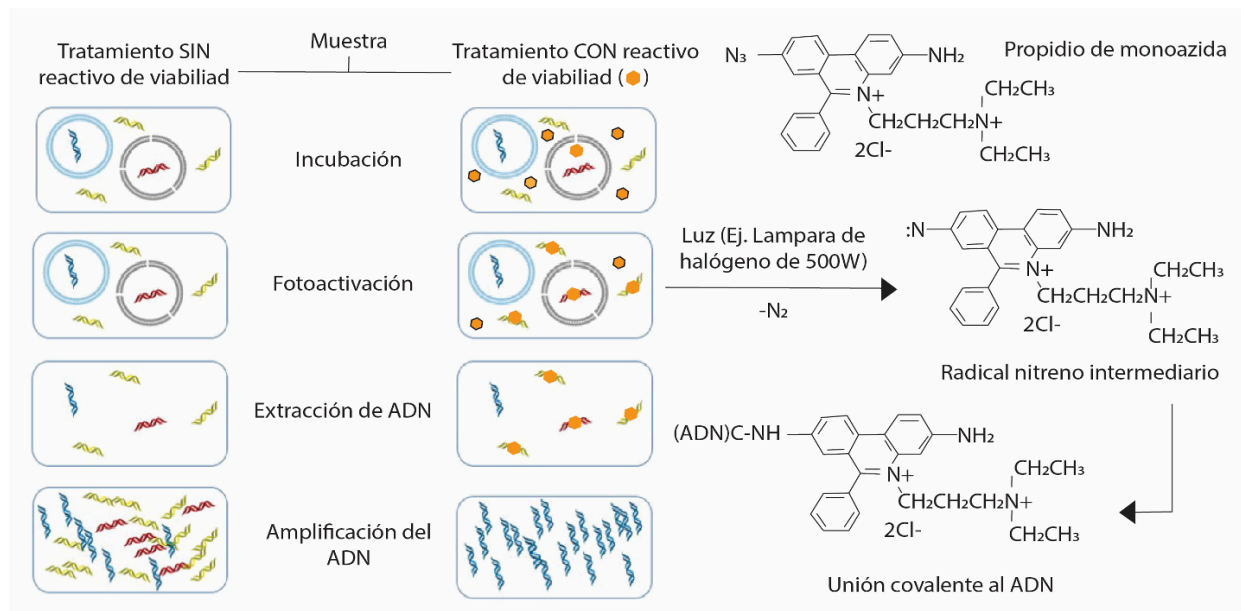


Figura 1.4. Diagrama general del proceso de tratamiento de las muestras con y sin reactivo de viabilidad (PMA) para la amplificación selectiva del ADN de células viables. (Modificado de Emerson *et al.*, 2017; Van Frankenhuyzen *et al.*, 2011).

Con el paso de los años, diversos estudios han permitido obtener conclusiones relevantes en cuanto a las ventajas y desventajas del uso del PMA en los ensayos de viabilidad. En la Tabla 1.5 se presentan diversos trabajos en los que se ha empleado la técnica PMA-qPCR para diferenciar células viables de no viables en distintos tipos de muestras ambientales.

Tabla 1.5. Revisión bibliográfica de investigaciones que han empleado el PMA para la determinación de células viables en muestras ambientales.

Objetivo del trabajo	Condiciones de tratamiento	Resultados	Referencias
<p>Determinar la concentración de bacterias viables y totales de cinco patógenos oportunistas comúnmente asociados al estado VBNC en muestras de dos plantas de tratamiento de agua potable</p>	<p>Matriz: Agua para consumo (ríos) Concentración PMA: 100µM Incubación: 5 min Foto activación: 4 min Fuente de luz: halógeno (650 W) a 20cm de la muestra Otras: ninguna</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La diferencia entre células totales y viables fue menor a 1 unidad logarítmica - En algunos casos, la concentración de células viables fue mayor a la de células totales debido a que la concentración de algunos microorganismos fue muy baja y la sensibilidad de la técnica de qPCR es limitada en ciertos rangos 	<p>Gou <i>et al.</i>, 2021</p>
<p>Investigar las comunidades microbianas viables en digestores mesofílicos de lodos anaerobios a escala real utilizando un enfoque basado en la integridad de la membrana</p>	<p>Matriz: Biosólidos Concentración PMA: 100µM Incubación: 5 min Foto activación: 15 min Fuente de luz: PMA-Lite™ LED Otras: ninguna</p>	<ul style="list-style-type: none"> - En promedio, para todas las muestras, la reducción del número de copias del gen 16S rRNA después del tratamiento con PMA fue del 19.1%. - En dos muestras no se observó el efecto del PMA 	<p>Ni <i>et al.</i>, 2020</p>
<p>Desarrollar un método optimizado de PMA-qPCR para la detección y cuantificación de <i>E. coli</i> O157:H7 viable en suelos agrícolas</p>	<p>Matriz: suelo Concentración PMA: 50µM Incubación: 10 min Foto activación: 15min Fuente de luz: halógeno (650 W) a 20cm de la muestra Otras: turbiedad de la muestra a 28 NTU. Separación de células no viables por centrifugación mediante gradiente de densidad con solución de Percoll</p>	<ul style="list-style-type: none"> - En muestras con una mezcla de 10² células vivas y 10⁷ células muertas, se encontró que, cuando se utilizó el PMA directamente, sin el pretratamiento de la muestra (gradiente de densidad), la capacidad para discriminar las células vivas de las muertas fue muy pobre. Sin embargo, el pretratamiento mostró resultados muy similares a los reportados en el control positivo. 	<p>Fu <i>et al.</i>, 2020</p>

Tabla 1.5. Continuación.

Objetivo del trabajo	Condiciones de tratamiento	Resultados	Referencias
<p>Desarrollar un ensayo de PMA-qPCR para la detección específica y sensible de <i>E. coli</i> O157:H7 viable en el agua de riego utilizando el gen específico <i>flhC</i>.</p>	<p>Matriz: Agua de riego Concentración PMA: 5 µM Incubación: 5 min Foto activación: 5 min Fuente de luz: halógeno (500 W) a 20cm de la muestra Otras: ninguna</p>	<ul style="list-style-type: none"> - El límite de detección en las muestras inoculadas fue de 1.8×10^2 UFC/ml -El tratamiento con PMA logró identificar de manera adecuada la cantidad de células viables incluso bajo la presencia de 10^4 UFC/ml de células no viables. 	<p>Guoyan <i>et al.</i>, 2019</p>
<p>Emplear y aplicar la técnica de PMA-qPCR dirigida al gen <i>ycjM</i> para estimar sólo las células de <i>E. coli</i> viables y no "naturalizadas" en las aguas ambientales.</p>	<p>Matriz: Agua ambiental (ríos y lagos) Concentración PMA: 5, 10 y 20µM Incubación: 5 min Foto activación: 5 min Fuente de luz: halógeno (650 W) a 15cm de la muestra Otras: ninguna</p>	<ul style="list-style-type: none"> - No se observó una diferencia significativa entre los valore de células viables y células cultivables - Se reportó que, a mayor cantidad de células viables, menor es el efecto de las células muertas sobre la señal que detecta el equipo de qPCR - El rango de detección de <i>E. coli</i> fue de 10^2-10^6 UFC/ml 	<p>Yuan <i>et al.</i>, 2018</p>
<p>Evaluar la persistencia de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> y su capacidad para entrar en el estado VBNC durante el almacenamiento de estiércol de cerdo crudo y de estiércol tratado biológicamente</p>	<p>Matriz: estiércol y efluente de laguna Concentración PMA: 55 y 20 µM Incubación: 5 y 20 min Foto activación: 55 y 30 min Fuente de luz: halógeno (650 W) a 20cm de la muestra Otras:</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La diferencia entre células totales y viables, en ambas matrices, fue menor de 1 unidad logarítmica - En ambas matrices se observó la disminución simultánea de células totales y viables sugiere que el ADN de las bacterias muertas se degradó rápidamente o se unió a la matriz, impidiendo así su amplificación 	<p>Desneux <i>et al.</i>, 2016</p>

Tabla 1.5. Continuación.

Objetivo del trabajo	Condiciones de tratamiento	Resultados	Referencias
<p>Utilizar la técnica de PMA- qPCR para determinar la proporción real de <i>E. coli</i> viable en los lodos y comprender el comportamiento de los patógenos en el proceso de digestión anaerobia</p>	<p>Matriz: Residuos de comida, ganado y biosólidos Concentración PMA: 100 µM Incubación: 5 min Foto activación: 5 min Fuente de luz: halógeno (500 W) a 13cm de la muestra Otras: Dos tratamientos con PMA a una concentración de 50 µM. Concentración de sólidos en la muestra menor a 2 gST/L.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La diferencia entre células totales y viables fue menor de 2 unidades logarítmicas - En la optimización del método, la cuantificación de células viables se vio más afectada por la cantidad de células no viables cuando la concentración de células viables era de 5.1×10^4 células viables/ml que cuando fue de 3.1×10^6 células viables/ml 	<p>Ruike <i>et al.</i>, 2016</p>
<p>Utilizar la técnica de PMA- qPCR para monitorear la cantidad de bacterias viables en diferentes matrices propias de las PTAR.</p>	<p>Matriz: Agua residual y lodos Concentración PMA: 100µM Incubación: 5 min Foto activación: 4 min Fuente de luz: halógeno (650 W) a 20cm de la muestra Otras: Sin dilución de las muestras</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La diferencia entre células totales y viables fue de mayor a 2 unidades logarítmicas en muestras inoculadas y menor a 1 en muestras sin inocular - Se observó que las muestras ambientales disminuyeron la actividad del PMA debido a que el control con PBS mostró los mejores resultados para inhibir la amplificación de células no viables. 	<p>Li <i>et al.</i>, 2014</p>
<p>Diseñar, optimizar y aplicar un método de PMA-qPCR en biosólidos para amplificar selectivamente el ADN de las células viables de <i>E.coli</i></p>	<p>Matriz: Lodos y biosólidos Concentración PMA: 200 µM Incubación: 5 min Foto activación: 20 min Fuente de luz: halógeno (500 W) a 15cm de la muestra Otras: Dilución (1:10) de la muestra. Modificaciones al protocolo de extracción de ADN con el kit PowerSoil</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La diferencia entre células totales y viables fue de 1-2 unidades logarítmicas - Las muestras que no fueron diluidas obtuvieron los mismos valores de amplificación que las muestras que no recibieron tratamiento con PMA. 	<p>Van Frankenhuyzen <i>et al.</i>, 2013</p>

Tabla 1.5. Continuación.

Objetivo del trabajo	Condiciones de tratamiento	Resultados	Referencias
<p>Desarrollar un método para determinar el número total de <i>E. coli</i> viable en las plantas de tratamiento de aguas residuales</p>	<p>Matriz: Agua residual Concentración PMA: 50µM Incubación: 5 min Foto activación: 5 min Fuente de luz: halógeno (500 W) a 10cm de la muestra Otras: Dilución (1:10) de la muestra</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La diferencia entre células totales y viables fue menor a 1 unidad logarítmica - El efluente tratado con cloro mostró la prevalencia de células totales y viables 	<p>Yokomachi & Yaguchi, 2012</p>
<p>Evaluar la de un método de PCR modificado (PMA-PCR) para excluir el ADN extracelular y el ADN de las células muertas en los biosólidos</p>	<p>Matriz: Lodos Concentración PMA: 100µM Incubación: 10 min Foto activación: 5min Fuente de luz: halógeno (600 W) a 15-20cm de la muestra Otras: Modificaciones al protocolo de extracción de ADN con el kit PowerSoi</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La diferencia entre células totales y viables fue de 4 unidades logarítmicas en cultivo y menor a 2 unidades logarítmicas en lodos. - Se observó que concentraciones menores a 2 gST/L no interfieren con la actividad del PMA. Se sugiere que el tamaño del amplicon es un factor que puede afectar la sensibilidad del límite de detección durante la qPCR en la determinación de células viables 	<p>Taskin <i>et al.</i>, 2011</p>
<p>Comparar la determinación de <i>enterococcus</i> y bacterias indicadoras de contaminación fecal realizadas por la técnica de PMA-qPCR y qPCR en el análisis de células vivas y muertas presentes tanto en medios de cultivo como en aguas residuales.</p>	<p>Matriz: Agua residual Concentración PMA: 100-300µM Incubación: 5 min Foto activación: 2-5 min Fuente de luz: halógeno (650 W) a 20 cm de la muestra Otras: ninguna</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La diferencia entre células totales y viables fue de 3-4 unidades logarítmicas en cultivo y menor a 2 unidades logarítmicas en agua residual - La eficiencia del PMA se pudo haber visto afectada por la alta cantidad de sólidos suspendidos en las muestras de agua - En las muestras de agua residual después de la etapa de desinfección con cloro se observó una prevalencia de células viables, superior a la cantidad de células cultivables. 	<p>Varma <i>et al.</i>, 2009</p>

Con respecto al uso de la técnica v-PCR en matrices poco complejas las conclusiones obtenidas para el uso de los diversos reactivos son diversas. En el caso particular del EMA se ha identificado que, a pesar de requerir menor concentración del reactivo para observar el efecto deseado, con cierta frecuencia se producen falsos negativos debido a que el EMA es capaz de atravesar las membranas intactas de ciertas bacterias como *E. coli* O157:H7, *Streptococcus sobrinus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, y *Mycobacterium avium* (Nocker *et al.*, 2006). Además, también se ha reportado que el EMA ejerce un efecto citotóxico sobre algunas especies bacterianas, lo que implica que el reactivo en si es capaz de volver inviables a las células (Emerson *et al.*, 2017). Por otro lado, las investigaciones con respecto a los compuestos de paladio y de platino señalan que dichos compuestos logran diferenciar, de manera adecuada, entre células viables y no viables pero que, además, poseen la ventaja de no requerir de una etapa de fotoactivación, por lo que su aplicación en matrices complejas como los lodos resultaba particularmente prometedora. Sin embargo, en la literatura reciente no se han encontrado trabajos que utilicen algunos de estos compuestos en matrices complejas y los resultados del trabajo de maestría de Ortega-Cuenca (tesis en redacción), que anteceden a esta tesis, mostraron una nula capacidad de los compuestos de paladio para la determinación de células viables en la matriz de lodos. Por su parte, el PMA se ha consolidado como el reactivo más utilizado en ensayos de viabilidad a pesar de poseer sus propias limitaciones ya que, por ejemplo, se sabe que el PMA posee mayor dificultad para permear aquellas membranas dañadas, lo que puede originar falsos positivos.

Por otro lado, de la revisión bibliográfica presentada en la Tabla 1.5 se evidencia que la determinación de la viabilidad en matrices complejas, empleando como criterio la integridad de la membrana, no es un tema sencillo y requiere un balance entre la practicidad que involucra llevar a cabo un ensayo y la apropiada interpretación de los resultados. Pese a que pocos son los trabajos que han evaluado el efecto del PMA en lodos y biosólidos producidos mediante DA, las investigaciones relacionadas al uso de la técnica de PMA-PCR en esas y otras matrices ambientales ha permitido identificar que los factores que pueden afectar la eficiencia del PMA son: i) la concentración del reactivo, ii) la composición de la comunidad microbiana, iii) el tiempo y la temperatura de

incubación, iv) la turbiedad de la muestra, v) su contenido de sales u otros compuestos inhibidores del PMA y, vi) una alta concentración de células muertas (Fu *et al.*, 2020; Barbau-Piednoir *et al.*, 2014; Van Frankenhuyzen *et al.*, 2012). Sin embargo, también se han identificado los factores que pueden mejorar la eficiencia del PMA, entre los que destacan: i) la amplificación de secuencias de gran tamaño, ii) realizar la incubación a altas temperaturas, iii) prolongar el tiempo de incubación e incrementar la concentración del reactivo, iv) realizar la incubación junto a sustancias como sales biliares, DMSO o EDTA y, v) realizar a la misma muestra múltiples tratamientos consecutivos con PMA (Condy *et al.*, 2019; Fittipaldi *et al.*, 2012).

Por último, vale la pena señalar que a pesar de que el uso del PMA es fácil de implementar, ya que ha sido acoplado a una importante gama de procedimientos (ej. PCR, microarreglos, gradiente de desnaturalización en gel de electroforesis, en análisis de secuenciación y en la construcción de metagenomas), a la fecha no existe un método estandarizado para emplear esta técnica, lo que dificulta la interpretación y la reproducibilidad de los ensayos realizados, particularmente en matrices complejas, como los lodos y biosólidos.

2 JUSTIFICACIÓN

Diversas investigaciones (Qi *et al.*, 2018; Pascual-Benito *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2007; Iranpour *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005), incluidas las que anteceden directamente a este trabajo dentro del Grupo de Investigación en Procesos Anaerobios (GIPA) del Instituto de Ingeniería (II) de la UNAM (De los Cobos-Vasconcelos *et al.*, 2015; Villalba, 2012; Rubio-Loza & Noyola, 2010; Martínez-Arce, 2009), han señalado que pretratamientos térmicos moderados (70 a 80°C) y la digestión anaerobia mesofílica, siendo el método de estabilización de lodos más utilizado, no producen biosólidos que cumplan con los parámetros más estrictos en materia de calidad microbiológica. Además, los métodos dependiente de cultivo, como aquellos empleados en la normativa mexicana, pueden subestimar la cantidad de microorganismos patógenos. Lo anterior se debe a que las condiciones de estrés a las que son sometidos los microorganismos durante el pretratamiento y la digestión anaerobia mesofílica pueden inducir en éstos la incapacidad de crecer en medios de cultivo pero permanecer viables y poder reactivarse y recrecer tiempo después cuando las condiciones se vuelan favorables o permisibles.

Por tales motivos, la principal contribución de este trabajo radica en implementar y evaluar tres procesos de estabilización anaerobia de lodo primario enfocados a mejorar la calidad microbiológica de los biosólidos. El primer proceso, denominado PT+DAT, empleó un pretratamiento térmico (PT) a 80°C durante 60 min del lodo primario seguido de una etapa de digestión anaerobia termofílica (DAT). El segundo proceso, denominado DAT, consistió exclusivamente en la digestión anaerobia termofílica del lodo primario. El último proceso, denominado DAM+TA, constó de dos etapas, la digestión anaerobia mesofílica (DAM) del lodo primario seguido del tratamiento alcalino (TA) con óxido de calcio (30% m/m). Un segundo aporte se basa en la implementación de la técnica PMA-qPCR en paralelo a los métodos dependientes de cultivo establecidos en la normativa mexicana para identificar la cantidad de bacterias viables con la finalidad de asegurar la calidad microbiológica y, por lo tanto, el adecuado aprovechamiento de los biosólidos producidos.

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La asociación de dos condiciones de estrés aplicadas de manera consecutiva (DAM+TA o PT+DAT) logrará la reducción tanto de células viables como de células cultivables de coliformes fecales, *E. coli* y *Salmonella* spp., evitando la transición de dichos microorganismos al estado VBNC

3.2 Objetivo general

Evaluar la capacidad de tres procesos de estabilización anaerobia de lodo primario (DAM+TA, DAT, PT+DAT) para reducir el conteo de coliformes fecales, *E. coli* y *Salmonella* spp. empleando métodos dependientes e independientes de cultivo (tubos múltiples y PMA-qPCR, respectivamente) con el propósito de asegurar la calidad microbiológica de los biosólidos resultantes.

3.3 Objetivos específicos

Evaluar la capacidad que tiene la técnica de PMA-qPCR para determinar la cantidad de células viables de *Salmonella* spp. y *E. coli* en muestras de lodos y biosólidos.

Identificar si se presenta la reactivación y el recrecimiento de *Salmonella* spp. y *E. coli* después de un periodo de almacenamiento de los biosólidos producidos.

Determinar la composición de la comunidad microbiana presente en el lodo primario y en el efluente de los digestores del proceso DAM+TA y DAT.

Comparar la estabilidad y eficiencia de los tres procesos de estabilización anaerobia de lodo primario.

4 METODOLOGÍA

4.1 Diseño experimental

El presente trabajo tuvo por eje la puesta en marcha y la operación de tres procesos de estabilización anaerobia de lodo primario con la finalidad de evaluar la calidad microbiológica a través de las diferentes etapas de cada proceso empleando la técnica de PMA-qPCR y las técnicas de cultivo establecidas en la NOM-004-SEMARNAT 2002. El diagrama del diseño experimental se muestra en la Figura 4.1.

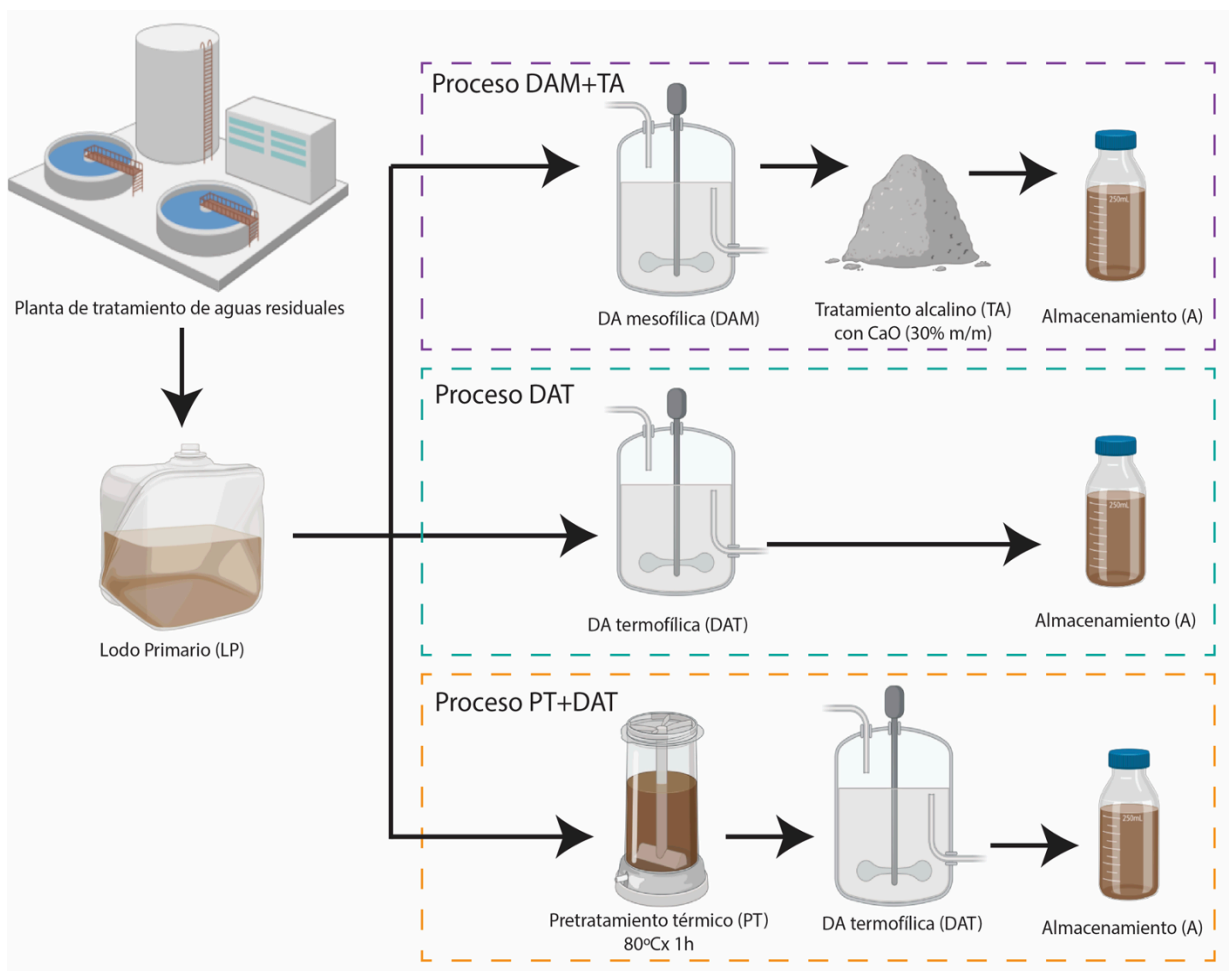


Figura 4.1. Diagrama del diseño experimental para el tratamiento de lodo primario mediante la implementación de tres diferentes procesos cuyo eje fue la digestión anaerobia (DA)

El proceso denominado DAM+TA constó de dos etapas: la DA mesófila (DAM) del lodo primario con el subsecuente tratamiento alcalino (TA) con óxido de calcio del lodo digerido. El proceso denominado DAT consistió únicamente en la DA termofílica (DAT) del lodo primario y, el proceso denominado PT+DAT constó de dos etapas: un pre-tratamiento térmico moderado (80°C durante 60 min) del lodo primario seguido de la DAT del lodo tratado térmicamente. Para la adecuada operación de los digestores se monitorearon diversos parámetros fisicoquímicos y, para los análisis microbiológicos y de Biología Molecular, se tomaron muestras a la entrada y a la salida de cada etapa de cada proceso, así como a los biosólidos producidos en la última etapa de cada proceso, tanto a la salida como después de su almacenamiento durante 72 horas.

4.2 Obtención y acondicionamiento de lodo primario

El lodo primario (LP) que se utilizó para el desarrollo de esta investigación se obtuvo, de manera periódica, de la PTAR municipal Cerro de la Estrella (Iztapalapa, CDMX), la cual emplea el proceso de lodos activados y que cuenta con una capacidad instalada de 3 000 L/s, con un caudal tratado 2 188 L/s. Cada lote de LP fue recolectado en el punto de desfogue de los sedimentadores primarios de la planta de tratamiento. Antes de colocarse en un bidón de 20 L, el LP fue tamizado con ayuda de una malla para cernir y, una vez envasado, el lodo fue transportado al Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA) de la UNAM (Edificio 5, Instituto de Ingeniería). En las instalaciones del Instituto, el LP fue tamizado nuevamente y, ya en el bidón, se dejó sedimentar durante 24 horas dentro del cuarto frío del LIA (4°C±1). Posteriormente, el sobrenadante se retiró del bidón por medio de una manguera en función de sifón, para así lograr el espesamiento del LP. Al finalizar esta operación, el LP espesado se almacenó en el cuarto frío y se utilizó diariamente para la alimentación de los digestores de los diferentes procesos (DAT, PT+DAT y DAM+TA) empleados en este trabajo.

4.3 Descripción de los digestores anaerobios

Para cada proceso de estabilización de LP empleado en este estudio se operó un digestor anaerobio de conformación oval, hecho de fibra de vidrio, con capacidad de 9 litros y con un volumen útil de 5 litros (Figura 4.2). El mezclado mecánico de los digestores se realizó por medio de un agitador de acero inoxidable tipo propela, acoplado a un tubo de alineación y sello hidráulico, accionado por medio de un motor ubicado sobre la cubierta de los digestores (1/12 HP, operado a 60 rpm). Además, cada digestor contó con una línea de recirculación de lodo, constituida por una manguera de plástico de 2/3" conectada a una bomba peristáltica marca Masterflex con una potencia de 1/10 HP y con un controlador independiente de 6-600 rpm, que también contribuyó al mezclado del digestor y que, a su vez, se empleó para la alimentación y purga del digestor.

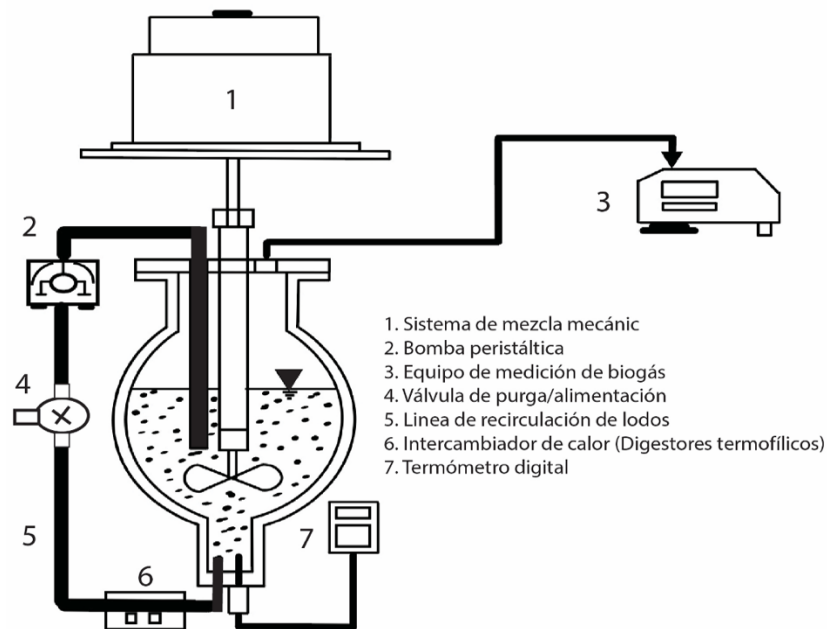


Figura 4.2. Diagrama de los digestores anaerobios empleados para el tratamiento de lodo primario durante el trabajo experimental.

Para cumplir con los requerimientos caloríficos, los tres digestores se operaron dentro de un cuarto a temperatura controlada ($35^{\circ}\text{C} \pm 2$). La temperatura del cuarto fue suficiente para la operación del digester mesofílico correspondiente al proceso DAM-TA pero, para la operación de los digestores termofílicos del proceso DAT y PT-DAT, se acopló a la línea de recirculación un intercambiador de calor que permitió alcanzar y mantener la temperatura de trabajo ($55^{\circ}\text{C} \pm 1$), la cual se monitoreó mediante un termómetro digital colocado en la parte inferior de cada digester. Cabe mencionar que, para evitar la pérdida excesiva de calor, los digestores termofílicos fueron forrados con una tela de fibra de asbesto. La producción del biogás se determinó mediante el equipo μFlow (Bioprocess control, USA).

4.4 Inoculación, alimentación y condiciones de operación de los digestores

El lodo inóculo para el digester mesofílico (proceso DAM+TA) se obtuvo de los digestores de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de la industria cervecera. El lodo inóculo termofílico, utilizado en los digestores del proceso DAT y PT+DAT, se obtuvo de los digestores de la PTAR municipal San Pedro Mártir, Querétaro. El arranque de los digestores utilizados en los diferentes procesos se dió de manera desfasada, es decir, primero se arrancó el digester del proceso PT+TAD, luego el digester del proceso MAD+TA y por último el digester del proceso TAD. Se arrancaron los tres digestores con el objetivo de llegar a condiciones de operación (Tabla 4.1), similares a aquellas empleadas previamente en investigaciones realizadas dentro de este grupo de trabajo (Rubio-Loza & Noyola, 2010), regidas por la carga orgánica a la que trabaja cada digester y el tiempo de retención hidráulico (TRH).

Para la alimentación de los digestores, proceso que se realizó diariamente (de lunes a sábado), se tomó el volumen de LP en refrigeración y se dejaba alcanzar la temperatura ambiente antes de ingresarlo al digester para el caso de los procesos DAM+TA y DAT, o bien, antes de aplicar el pretratamiento térmico para el caso del proceso PT+DAT. Antes de proceder a la alimentación de los digestores, la línea de biogás se desconectó del equipo de medición de biogás y conectó a una bolsa tedlar llena de biogás, con la finalidad de que al retirar el volumen de lodo dentro del digester (equivalente al volumen

de lodo de alimentación) el vacío fuera compensado con biogás y así evitar la entrada de aire al digestor. El retirar el mismo volumen de lodo que se alimentaba se cada digestor se mantenía operando a un volumen constante. El LP (para el proceso DAM+TA y DAT) o el LP pretratado térmicamente (para el proceso PT+DAT) se suministró al digestor correspondiente a través de la línea de alimentación/recirculación, manteniendo el flujo de circulación del lodo (saliendo por la parte superior y entrando por la parte inferior), cerrando la llave de paso superior y abriendo la llave de alimentación, a la cual se le acopló un embudo para facilitar el vertimiento del lodo, tomando las precauciones necesarias para evitar la entrada de aire al digestor.

El periodo de operación de los digestores, caracterizado para cada proceso y el cual no incluyó el correspondiente periodo de arranque, se dió cuando estos estaban siendo operados a las condiciones antes mencionadas y cuando el valor de la relación de alcalinidades (α) fue mayor a 0.4. De esta manera, para el proceso PT+DAT el periodo total de operación fue 322 días, y el periodo de operación estable fue de 297 días. Para el proceso DAM-TA el periodo total de operación fue de 222 días y el periodo de operación estable fue de 186 días y, para el proceso DAT el periodo total de operación, así como el periodo de operación estable fue de 172 días.

Tabla 4.1. Condiciones de operación de digestores empleados en cada proceso.

Parámetro	DAM+TA	DAT	PT+DAT
Temperatura (°C)	35	55	55
TRH (d)	14	10	10
Carga orgánica (gSV/L*d)	2.8	3.5	3.5

4.5 Tratamiento térmico del lodo primario

En el proceso PT+DAT, el tratamiento térmico (PT) moderado consistió en el calentamiento del lodo primario a 80°C durante 60 min, para lo cual se utilizó un dispositivo denominado “Termohidrolizador” (Figura 4.3). El sistema consistió, de manera general, en un reactor de lotes con agitación continua acoplado a un sistema de calentamiento y ventilación conectados a un controlador electrónico digital con un termopar y un temporizador. El reactor es un vaso de precipitado de 1 L, la homogenización se realizó por un agitador de plástico tipo propela accionado por un motor sobre la tapa del reactor, y el sistema de calentamiento estuvo constituido por una resistencia de 200 W dentro de un aro de aluminio que rodea el reactor.

La operación del termohidrolizador se dió como se describe a continuación: al encender el sistema, se iniciaba de manera automática e ininterrumpida el funcionamiento del sistema de agitación y el termopar registraba la temperatura del lodo que, al ser menor que la temperatura programada, activaba el sistema de calentamiento. Cuando el termopar registraba que se había alcanzado la temperatura programada (80°C) se accionaba el temporizador por el tiempo programado para el tratamiento (60 min), al tiempo que, de manera automática, el sistema de calentamiento se activaba o desactivaba para mantener la temperatura deseada, apoyado además por un ventilador. El termohidrolizador era capaz de mantener la temperatura constante con una tolerancia de $\pm 3^{\circ}\text{C}$.



Figura 4.3. Diagrama del dispositivo para el tratamiento térmico (termo-hidrolizador).

4.6 Tratamiento alcalino del digestato mesofílico

Para el tratamiento alcalino (TA) con óxido de calcio (CaO) en el proceso DAM+TA se procedió de acuerdo con las consideraciones establecidas en el Anexo I de la NOM-004-SEMARNAT 2002.

Así pues, se procedió primero a determinar las condiciones de centrifugación adecuadas para obtener una masa de digestato mesofílico con un porcentaje de humedad del 20%. Para obtener dicho porcentaje de humedad se realizaron diversas corridas de centrifugación, variando la velocidad y el tiempo. De esta forma se determinó que, para alcanzar la concentración de lodos del 20%, se requería centrifugar un volumen de 100 mL de digestato mesofílico a 2500 x g durante 5 min en la centrífuga refrigerada Avanti J-26S XPI (Beckman Coulter). Posteriormente, se procedió a determinar la cantidad de CaO que se debía emplear para que el digestato mesofílico tuviera un pH igual o mayor a 12 durante las 2 primeras horas y, mantener un pH igual o mayor a 11.5 durante otras 22 horas, esto último sin añadir más materia alcalina, en apego a lo señalado en la NOM-004. Los ensayos realizados permitieron determinar que se debía emplear un 30% de CaO en relación a la masa de digestato mesofílico con un 20% de humedad. De tal manera que, para cada tratamiento realizado se empleaba la siguiente fórmula:

$$\text{CaO (g)} = \text{Pellet de digestato (g)} * \% \text{ de humedad (0.2)} * \% \text{ de CaO (0.3)}$$

En la práctica, el pellet que se obtuvo después de cada centrifugación era transferido a un envase de plástico estéril donde, posterior a determinar el peso del pellet, se procedió a realizar la mezcla de la masa del digestato mesofílico con el CaO. El pH se determinó mediante tiras reactivas a las 2 horas y a las 24 horas siguientes para confirmar que se cumpliera con lo establecido en la NOM-004-SEMARNAT 2002.

4.7 Técnicas para los análisis fisicoquímicos

Los sólidos totales, volátiles y fijos, así como la alcalinidad y el pH se determinaron de acuerdo con lo establecido en los Métodos Estándar (APHA, 2017). La medición de pH se realizó con un potenciómetro (Beckman Instruments modelo PHI

50) y la relación de alcalinidades se determinó midiendo la alcalinidad parcial (pH final de 5.75) y la alcalinidad total (pH final de 4.30). Así mismo, la Demanda Química de Oxígeno (DQO) soluble se determinó de acuerdo con los Métodos Estándar utilizando filtros de nitrocelulosa de 0.45 μm . La composición del biogás se determinó mediante cromatografía de gases (FISHER) con detector de conductividad térmica (columna Porapak Q, con helio como gas acarreador). La determinación de ácidos grasos volátiles se realizó por cromatografía de gases de ionización de flama (SRI-FID modelo 8610) con una columna de sílica (Alltech AT-1000; Deerfield,IL).

4.8 Técnicas para los análisis microbiológicos

Para los análisis microbiológicos se recolectaron 100 mL de cada tipo de muestra (LP, DAM, TA, DAM+TA almacenado, DAT, DAT almacenado, PT, PT+DAT y PT+DAT almacenado) en frascos de polipropileno estériles. En el caso particular del digestato mesofílico tratado con CaO (muestra TA), el pellet que se encontraba dentro del frasco de polipropileno estéril era resuspendido en 100 mL de PBS 1X.

Para la determinación de la remoción de los microorganismos de interés, las muestras fueron procesadas el mismo día en que se realizó la toma de muestras y, para el caso de la determinación del recrecimiento, solo las muestras correspondientes a la última etapa de cada proceso (DAM-TA almacenado, DAT almacenado y PT+DAT almacenado) fueron analizadas 72 horas después de haber sido almacenadas en los frasco de plástico que se mantuvieron cerrados y a temperatura ambiente.

La determinación de coliformes fecales y *Salmonella* spp. se llevó a cabo mediante lo establecido en la NOM-004-SEMARNAT 2002, la cual indica el uso de la técnica de tubos múltiples en serie de tres para la estimación de la densidad bacteriana por medio de cálculos de probabilidad (número más probable, NMP). La determinación de *Escherchia coli* se realizó de acuerdo a lo establecido en los Métodos Estándar (APHA, 2017; Apartado 9221).

En el caso de la determinación de coliformes fecales se empleó la prueba directa del medio A-1, un método de un solo paso que no requiere confirmación y que considera

como positivos aquellos tubos que contienen gas dentro de la campana de Durham debido a la fermentación de la lactosa. Para la determinación de *E. coli* se empleó la técnica de tubos múltiples utilizando el medio EC-MUG (Sigma, Darmstadt) dónde, de acuerdo con el manual del medio utilizado, se consideraron como positivos a aquellos tubos que presentaran turbiedad y, específicamente, fluorescencia al ser irradiados con luz UV. Cabe resaltar que, para la determinación de *E. coli*, se utilizó la misma serie de tubos que se empleó para la determinación de coliformes fecales, pues la serie de tubos de la prueba para coliformes fecales sirvió para a la inoculación de la serie de tubos con medio EC-MUG para la determinación de *E. coli*.

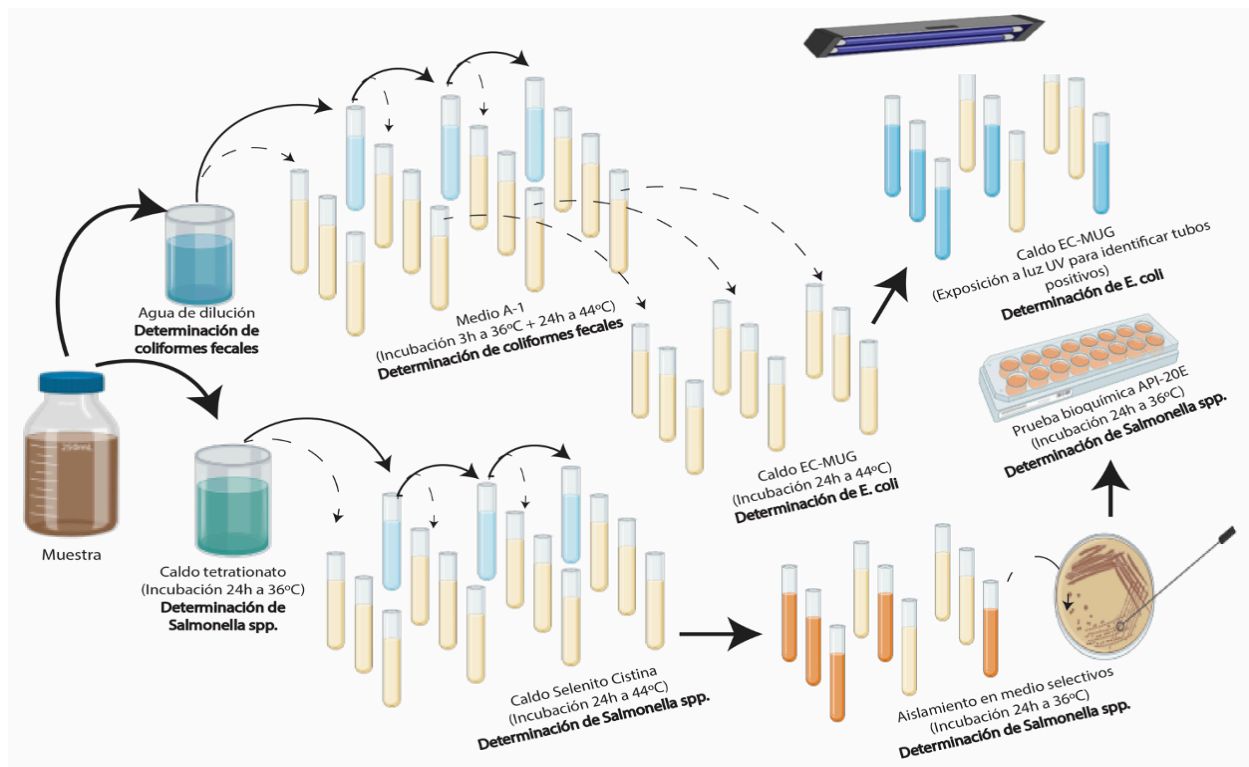


Figura 4.4. Diagrama del procesamiento de muestras para la determinación de coliformes fecales, *E. coli* y *Salmonella* spp.

Para la determinación de *Salmonella* spp. se empleó la técnica de tubos múltiples utilizando un método de tres pasos. El primer paso constó de un enriquecimiento de la muestra empleando Caldo Tetrionato (Bioxon, Ciudad de México), con el fin de reconstituir la vitalidad de las células dañadas e impedir el desarrollo de bacterias

coliformes asociadas. El segundo paso constó de la inoculación de la serie de tubos que contenían Caldo Selenito-Cistina (Bioxon, Ciudad de México), el cual es un medio selectivo que al virar hacia un color “naranja intenso” (Figura 4.5) permite determinar la presencia de *Salmonella* spp.

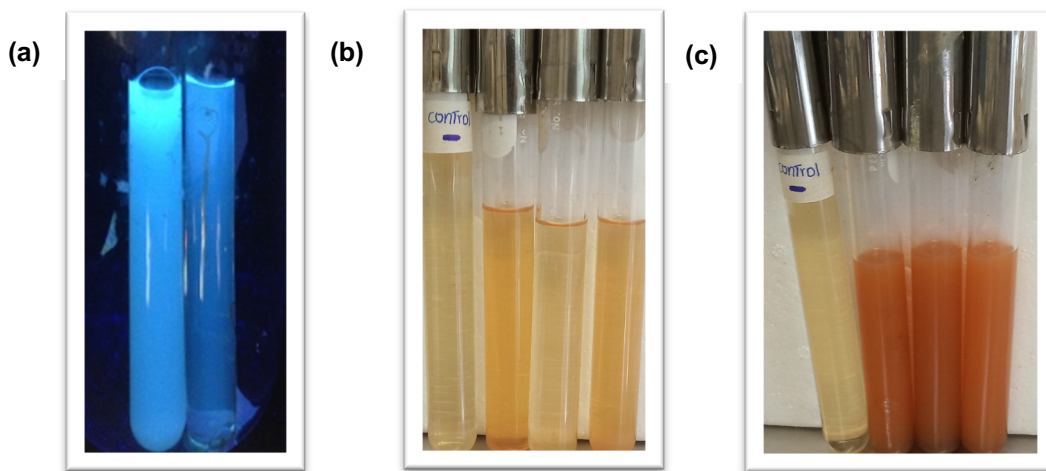


Figura 4.5. Fotografía de las características de los tubos positivos y negativos empleados para la determinación de *E. coli* y *Salmonella*. En la imagen (a) se observa la fluorescencia del caldo EC-MUG bajo la presencia de *E. coli* (tubo de la izquierda) en contraste con un medio que no presenta fluorescencia (tubo de la derecha) debido a la ausencia de *E. coli*. En la imagen (b) se muestra, de izquierda a derecha, el control negativo y los tres diferentes tubos con un tono similar al control negativo, por lo que tubos con un rango similar de tonos fueron considerados como negativos. En la imagen (c) se muestran, de izquierda a derecha, el control negativo y los siguientes tubos representan el tono de color “naranja intenso” que se tomó como positivo para la determinación de *Salmonella*.

Por último, el tercer paso, confirmatorio, consistió en el aislamiento e identificación bioquímica de *Salmonella* spp. el cual, de acuerdo con la NOM-004 SEMARNAT 2002 “no es un paso indispensable para la cuantificación pero si es necesario como control de que las bacterias fueron correctamente identificadas”. A este respecto, aquellos tubos positivos con la dilución mayor fueron utilizados para el aislamiento por estría en cajas Petri con agar xilosa lisina desoxicolato y el Agar Sulfito de Bismuto. Cuando se observaba crecimiento en los medios de cultivos sólidos antes mencionados se realizaba la identificación macroscópica y microscópica de la colonias, mediante una tinción Gram

y se procedía a la identificación bioquímica de las colonias, de acuerdo con el protocolo establecido en el manual de la prueba API-20E.

4.9 Técnicas para los análisis de Biología Molecular

4.9.1 Tratamiento de las muestras con Propidio Monoazida (PMA)

Para la determinación de células totales y viables de *E. coli* y *Salmonella* spp. por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) las muestras fueron procesadas de acuerdo con lo recomendado por Ortega Cuenca (tesis de Maestría en redacción), como se describe a continuación y se ilustra en la Figura 4.6.

Acondicionamiento previo al tratamiento con PMA:

I. Se transfirieron 20 mL de cada muestra desde el frasco de plástico estéril dónde se obtuvieron de un tubo de fondo cónico estéril de 50 mL, con la finalidad de lograr una mejor homogenización por Vortex previo a su procesamiento. Cabe destacar que no se realizó la dilución de las muestras.

II. Con la finalidad de determinar la cantidad de células totales y viables, cada muestra era dividida en dos tubos de fondo cónico de 2 mL empleando el volumen necesario de muestra (determinado en función de la apariencia de la muestra de cada ensayo) para que, después de centrifugar durante 4 minutos a una velocidad de 10 500 x g, se obtuviera en cada tubo de fondo cónico un pellet de aproximadamente 0.2 gramos. El sobrenadante era descartado.

Tratamiento con PMA:

III. Para la determinación de células totales, un tubo de cada muestra fue resuspendido en 500 μ L de una solución de PBS 1X. Por otro lado, en un cuarto en penumbra, el pellet del tubo en duplicado de cada muestra fue empleado para la determinación de células viables, iniciando con su resuspensión en un volumen de 500 μ L de una solución de PMA a una concentración de 200 μ M.

IV. Durante el periodo de incubación, las muestras se mantuvieron en agitación durante 10 minutos, mediante el uso de un vórtex al nivel de homogenización más bajo, con la finalidad de que el PMA se distribuyera uniformemente en la muestra.

V. Posteriormente, las muestras fueron fijadas horizontalmente con cinta adhesiva a un rectángulo de papel aluminio el cual se ajustó como “tapa” a un recipiente con hielo, de tal manera que las muestras estaban en contacto indirecto con el hielo en su parte inferior. Acto seguido se procedió a la etapa de fotoactivación del PMA durante 5 minutos, mediante el uso de una lámpara de halógeno de 500 W, ubicada a una distancia de 30 cm de las muestras; durante ese tiempo, las muestras se homogenizaban (5 segundos cada 30 segundos) mediante la agitación manualmente del recipiente con hielo.

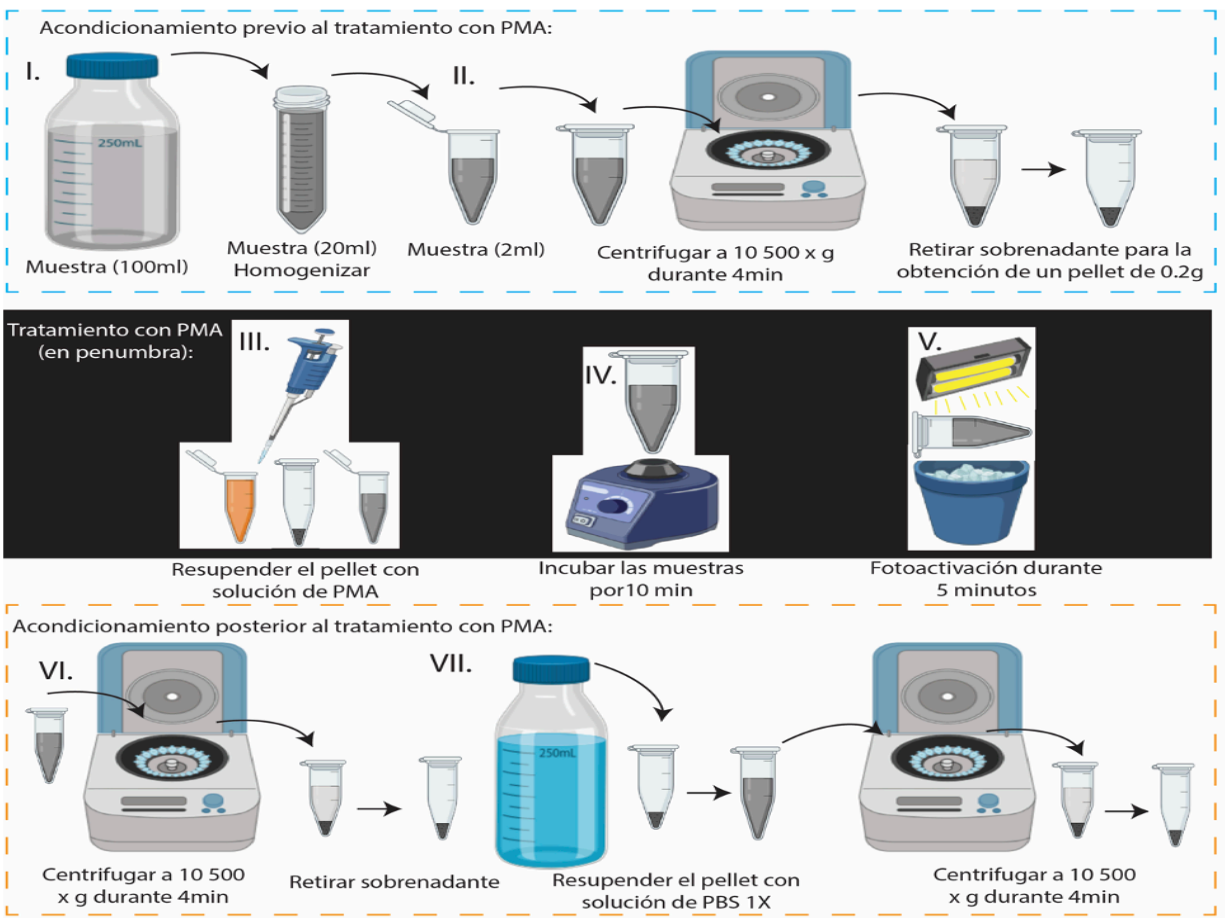


Figura 4.6. Diagrama del tratamiento de las muestras con Propidio Monoazida (PMA).

VI. Finalizado el tratamiento, las muestras fueron centrifugadas durante 4 min a 10 500 x g. Se retiró el sobrenadante, y el pellet resultante fue resuspendido en un volumen de 500 μ L de PBS 1X.

VII. Antes de proceder a realizar la extracción de ADN ambos tubos, con 2 g de muestra resuspendidos en 500 μ L de PBS 1X se centrifugaron 4 min a 10 500 x g.

4.9.2 Extracción del ADN y PCR en tiempo real

La extracción del ADN genómico de todas las muestras para la determinación de células totales y viables se realizó de acuerdo con lo establecido en el protocolo del kit DNeasy PowerSoil (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA). La determinación de la cantidad y calidad del ADN obtenido fue realizada con un equipo Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific) y la integridad del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa.

Para la determinación de *E. coli* se seleccionó como diana al gen *uidA*, el cual es un gen de copia única que codifica para la enzima β -D-glucoronidasa (Ruike *et al.*, 2016). Por otro lado, para la determinación de *Salmonella* se seleccionó como diana al gen *hilA* el cual es un regulador transcripcional del tipo OmpR/ToxR que tiene un papel central en la red de regulación de la expresión de los genes de invasión (Boddicker *et al.*, 2003). Las características más importantes del set de primers y sondas empleadas en este trabajo se muestran en la Tabla 4.2.

Tanto para la determinación de *E. coli* como de *Salmonella* se empleó la técnica TaqMan. El volumen final de cada reacción fue de 20 μ L de los cuales 10 μ L correspondían a la MasterMix (1X), 0.6 μ L a cada primer (0.3 μ M), 0.6 μ L de la sonda (0.18 μ M), 5 μ L de ADN y, la diferencia de volumen (3.2 μ L), correspondía a agua MilliQ estéril. Para los ensayos de qPCR se utilizó el equipo CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR system (Bio-Rad). Las condiciones de reacción, tanto para la determinación de *E. coli* como de *Salmonella* fueron las siguientes: 95°C durante 10 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, y 60°C durante 1 min para la etapa de alineación.

Tabla 4.2. Características del set de primers fowar (F) y reverse (R), así como las sondas (P) empleadas para la determinación de *Escherichia coli* y *Salmonella* entérica

Bacteria (Gen diana)	Amplicon (pb)	Posición	Secuencia (5' → 3')	Referencia
<i>Escherichia coli</i> (<i>uidA</i>)	84	784F	GTGTGARARCRACCCGCTTCGC	Frahm & Obst, 2003
		866R	AGAACGGTTTGTGGTTAATCAGGA	
		807P	(HEX → BHQ1) TCGGCATCCGGTCAGTGGCAGT	
<i>Salmonella</i> entérica (<i>hilA</i>)	192	352F	CAACCTACGACTCATACA	Liu <i>et al.</i> , 2019
		543R	GCGTAATTGATCCATGAG	
		524P	(FAM → BHQ1) TCAAGAATATCCTTAACACTGCGGC	

Para la construcción de la curva estándar de calibración, necesaria para la cuantificación de *E. coli* y *Salmonella* en las muestras, se trabajó con una cepa de cada tipo de bacteria (*E. coli* ATCC 25922 y *Salmonella enteritidis*) las cuales fueron proporcionadas por la Dra. Yolanda López Vidal (Facultad de Medicina, UNAM). Primeramente se procedió a la incubación de cada tipo de bacteria en medio infusión cerebro-corazón durante 24 horas y se realizó la extracción de ADN de la suspensión bacteriana de acuerdo con lo establecido en el protocolo del kit de extracción de ADN Wizard HMW (Promega Corporation, Madison, WI). Del cultivo bacteriano también se realizó la cuenta en placa de colonias en agar nutritivo para la determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) presentes en la suspensión bacteriana con la finalidad de relacionar la cantidad de ADN obtenido con un valor de UFC/mL de cada tipo de bacteria.

Se realizaron tres ensayos de qPCR para la determinación de *E. coli* y dos ensayos para la determinación de *Salmonella enteritidis*. Cada ensayo consistió en el montaje de una placa de 96 pozos con duplicados de muestras (LP, DAM, TA, DAM+TA almacenada, DAT, DAT almacenada, PT, PT+DAT y PT+DAT almacenada) tratadas y sin tratar con PMA más la curva estándar empleada para cuantificar la concentración de los

microorganismos de interés. Para la curva estándar se tomó 1 mL de un cultivo bacteriano (*E. coli* o *Salmonella enteritidis*) de 16 horas y se realizó la extracción del ADN de acuerdo a lo establecido en el protocolo del kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison). En paralelo, se realizaron seis diluciones decimales del cultivo en solución salina fisiológica y, una vez se alcanzó la dilución deseada, se sembró 100 μ L en agar nutritivo. Los medios fueron incubados a 37 °C durante 24 horas y la concentración de los microorganismos, expresada como UFC/mL, se relacionó con la cantidad de ADN obtenida de la extracción.

Todas las curvas estándar realizadas tuvieron valores de eficiencia (E) entre 90-110%, con R^2 mayores a 0.98 y pendientes (Slope) iguales a -3.5, datos que fueron obtenidos por el software CFX Maestro (Bio-Rad). Mayor detalle a este respecto se presenta en el Anexo II.

4.9.3 Secuenciación de un fragmento del gen 16S rRNA

Para el análisis de la diversidad microbiana de las muestras LP, DAM y DAT se obtuvo el ADN genómico de dichas muestras, como se mencionó anteriormente (apartado 4.9.2), el cual se envió a servicios externos MacroGen Inc., en Corea del Sur, donde se realizó la síntesis de amplicones utilizando los primers 341F y 805R (Klindworth *et al.*, 2013) y, posteriormente, la secuenciación de alto rendimiento del gen 16S rRNA (high throughput sequencing of 16S rRNA) usando la plataforma Illumina MiSeq (Illumina).

Yovany Cuetero-Martínez (tesis de Doctorado en desarrollo dentro del grupo de investigación) realizó los análisis bioinformáticos como se describe a continuación: con el software bioinformático Mothur v.1.34.4 (Kozich *et al.*, 2013), se ensamblaron las lecturas forward y reverse (300 pb) generando “contigs” de 435 a 466 pb; sin bases ambiguas y sin secuencias homopoliméricas mayores a 8 pb. Posteriormente, se compararon las secuencias utilizando como referencia la base de datos SILVA 132 (Quast *et al.*, 2013) con la que se obtuvo su asignación taxonómica con un nivel de similitud mayor al 90%. Las secuencias fueron clasificadas en filotipos de las categorías taxonómicas de Género, Familia, Orden, Clase, Filo y Dominio. Con el software antes

mencionado se realizaron análisis de biodiversidad en la categoría taxonómica de Género que consistieron en curvas de rarefacción, análisis de cobertura y en los estimadores de biodiversidad Chao1 y Shannon-Wiener, normalizando el número de secuencias a la muestra con menor número (DTT, 70 484 secuencias).

De forma complementaria, con el software bioinformático STAMP 2.1.3 (Parks *et al.*, 2014) se crearon perfiles de composición y estructura de las comunidades procariotas y heatmaps de los mismos. Los perfiles creados fueron exportados para análisis de componentes principales (PCA) (Ondov *et al.*, 2011).

4.10 Análisis estadístico

Para determinar el efecto del PMA se empleó la prueba t de Student pareada para comparar la diferencia en la concentración de células determinada mediante la técnica qPCR y PMA-qPCR para cada tipo de muestra (LP, DAM, TA, DAM+TA almacenada, DAT, DAT almacenada, PT, PT+DAT y PT+DAT almacenada). Para determinar si hubo una diferencia entre los diferentes procesos con respecto a los parámetro de remoción de sólidos volátiles, producción de biogás y concentración de células viables se empleó el modelo del análisis de varianza de un solo factor. Mayor detalle se presenta en el Anexo I.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el software Rstudio (R version 3.6.1 (2019-07-05) -- "Action of the Toes" Copyright (C) 2019. The R Foundation for Statistical Computing. Platform: x86_64-apple-darwin15.6.0 (64-bit).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización fisicoquímica del influente de los digestores

El influente de los digestores de los procesos DAM+TA y DAT fue el lodo primario (LP) que se obtuvo de la PTAR Cerro de la Estrella. Para el digestor del proceso PT+DAT, el influente correspondiente fue el mismo lodo primario empleado para los otros procesos excepto que el lodo primario fue pretratado térmicamente (PT) a 80°C durante 1 hora antes de alimentar al digestor del proceso PT+DAT. La caracterización de los parámetros fisicoquímicos del LP y del lodo PT se muestran en la Tabla 5.1. De manera general, y a pesar de que el uso exclusivo del lodo primario no es común en el estudio de los pretratamientos térmicos, los valores reportados con respecto a la caracterización fisicoquímica del LP y del lodo PT corresponden con los reportados previamente por otros trabajos que han empleado la combinación de lodo primario y lodo secundario (Ferrer *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2013; Vergine *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2018) y, particularmente, con aquellos resultados obtenidos previamente en este grupo de trabajo (Martínez, 2009; Rubio-Loza & Noyola, 2010).

El valor de pH reportado, tanto para el LP (6.03) como para el lodo PT (6.07), es relativamente ácido y se encuentra dentro del intervalo aceptable para este tipo de matriz, el cual puede abarcar valores de pH de entre 5.0 a 8.0 (Tyagi *et al.*, 2013) y lo cual se debe a la acumulación de ácidos orgánicos de cadena corta, como el ácido acético, el ácido propiónico y ácido butírico, los cuales se encontraron, respectivamente, en concentraciones promedio de 668, 581 y 108 mg/L en el LP, y en concentraciones promedio de 853, 675 y 135 mg/L en el lodo PT. Tanto para el LP como para el lodo PT, la sumatoria de dichos ácidos orgánicos de cadena corta, mejor conocidos como ácidos grasos volátiles (AGV's), se mantuvo dentro del rango característico (200-2000 mg/L) y la acumulación de dichos compuestos se debe a la actividad hidrolítica que ya inicia en el lodo primario pero que, debido a la falta de condiciones adecuadas para el desarrollo de la actividad metanogénica, aún no pueden ser consumidos.

Tabla 5.1 Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del lodo primario (LP) y del lodo pretratado térmicamente (PT).

Parámetro	Lodo primario (LP)	Lodo pretratado térmicamente (PT)
pH ^a	6.03 ± 0.61	6.07 ± 0.56
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L) ^a	2450 ± 235	2875 ± 867
Sólidos totales (g/L) ^b	68.0 ± 17.5	73.7 ± 18.3
Sólidos volátiles (g/L) ^b	35.1 ± 5.7	38.6 ± 7.1
Sólidos fijos (g/L) ^b	32.9 ± 13.1	35.1 ± 13.3
Fracción volátil (%SV/ST)	53.0 ± 8	54 ± 7
AGV's totales (mg/L)	1528	1974
Ácido acético (mg/L) ^a	668 ± 318	853 ± 540
Ácido propiónico (mg/L) ^a	581 ± 248	675 ± 339
Ácido i-butírico (mg/L) ^a	86 ± 37	98 ± 71
Ácido butírico (mg/L) ^a	108 ± 69	135 ± 102
Ácido i-valérico (mg/L) ^a	122 ± 50	148 ± 67
Ácido valérico (mg/L) ^a	54 ± 35	71 ± 48
DQO soluble (mg/L) ^a	2066 ± 817	2883 ± 668
DQO debida a AGV's (mg/L)	1495	1919
DQO debida a AGV's (%)	72	67
DQO debida a otros compuestos solubilizados (mg/L)	571	956
DQO debida a otros compuestos solubilizados (%)	28	33

^a n= 20 para ambos tipos de muestras.

^b n= 51 para ambos tipos de muestras.

Con respecto a la determinación de sólidos, los resultados obtenidos mostraron que la fracción de sólidos volátiles, que corresponden a la cantidad de materia orgánica presente en el lodo (potencial sustrato metanogénico), estuvo por debajo del promedio, tanto en LP como en el lodo PT, ya que en la literatura se reporta que, por lo general la fracción volátil representa entre el 60 y el 80% del lodo primario (Noyola, 1998). Estos resultados se pueden explicar debido a que la cantidad de sólidos fijos, que corresponden a la cantidad de materia inorgánica, se encontraron en una alta concentración, con valores promedio de 35.1 y 38.6 g Sólidos Fijos/L para el LP y el lodo PT, respectivamente. Dichos resultados podrían indicar que el desarenador de la PTAR Cerro de la Estrella funciona en forma deficiente y, aunque los valores de sólidos que se presentan en este trabajo concuerdan con aquellos reportados por Martínez (2009) y Rubio-Loza & Noyola (2010), vale la pena mencionar que la cantidad de sólidos fijos presente en el influente también se pudo haber visto afectada debido a que un importante número de lotes de lodo primario fueron obtenidos durante la temporada de lluvias, en la cual se considera que aumenta el arrastre en el drenaje de materia inorgánica por el agua pluvial que entra al sistema y a la PTAR.

Cabe resaltar que en este trabajo se observó un ligero aumento en la cantidad de sólidos presentes el lodo PT con respecto al LP, lo cual se debe a que el pretratamiento térmico logra la evaporación de agua, concentrando así la cantidad de sólidos. Este efecto ha sido reportado previamente por Martínez (2009), al emplear una mezcla de lodo primario y lodo secundario, quien observó que a un mayor tiempo y temperatura de tratamiento se presentaba una mayor concentración de sólidos. A su vez, Bougrier *et al.* (2006), quienes trabajaron con lodo secundario, observaron que el pretratamiento térmico del lodo a 130°C lograba una concentración de sólidos totales de hasta el 12%.

En este trabajo, el efecto del pretratamiento térmico también se hizo evidente con el incremento en la cantidad de DQO soluble presente en el lodo PT (2 883 mgDQO_{soluble}/L) con respecto al LP (2 066 mgDQO_{soluble}/L). Este incremento concuerda con lo esperado pues se sabe que los tratamientos térmicos tienen la capacidad de solubilizar la materia orgánica presente en el lodo, mostrando una relación lineal entre la temperatura y la DQO soluble (Li *et al.*, 1992). Como se muestra en la Tabla 5.1, una consecuencia del pretratamiento térmico fue que la concentración de DQO soluble

debida a los AGV's (1 919 mg/L) en el lodo PT se incrementó en un 28% con respecto al LP (1 495 mg/L). El incremento también se registró en la DQO soluble debida a otros compuestos orgánicos, al pasar de 571 mg/L en el LP, a 956 mg/L en el lodo PT, lo que representa un 67%, y un incremento global de la DQO soluble de 40% en el lodo pretratado. A pesar de que en este estudio no se analizó a profundidad el origen de la DQO soluble debida a otros compuestos orgánicos, otros estudios (Martínez, 2009; Bougrier *et al.*, 2008) señalan que los pretratamientos térmicos aumentan en mayor grado la liberación de carbohidratos que de proteínas. Esto se explica debido a la localización de dichas macromoléculas, ya que los carbohidratos se encuentran principalmente formando parte de los exopolímeros del lodo mientras que las proteínas se encuentran dentro de las células. Sin embargo, Martínez (2009) también señala que el tratamiento térmico puede favorecer la solubilización de otros compuestos desconocidos y distintos a los AGV's, las proteínas y los carbohidratos, lo cual resulta de interés para posteriores investigaciones ya que el mayor entendimiento sobre la proporción y composición de dichos compuestos puede ayudar a entender mejor la influencia del pretratamiento térmico sobre la producción de metano durante el proceso de DA.

5.2 Monitoreo de la operación de los digestores

Durante todo el periodo de operación de los digestores (DAM= 222 días, DAT= 172 días y PT+DAT= 322 días) se monitorearon una serie de parámetros fisicoquímicos con el propósito de determinar la estabilidad y el desempeño de cada proceso. Los valores de cada parámetro se muestran en la Tabla 5.2, la cual incluye solo aquellos valores reportados durante el periodo de operación estable, es decir, cuando el valor de relación de alcalinidades fue mayor a 0.4 (DAM= 197 días, DAT= 172 días y PT+DAT= 297 días).

Como se muestra en la Tabla 5.2, los tres digestores tuvieron valores promedio de pH cercano o superiores al rango considerado como óptimo (6.8-7.4) para la DA de lodos y, como se puede notar en la Figura 5.1a, durante el periodo de operación de cada digestor hubo fluctuaciones limitadas con respecto al valor de pH. La razón de que el pH se mantenga tan estable es la elevada alcalinidad de los sistemas, la cual fue, en

promedio, de 4 717, 4 162 y 4 434 mg CaCO₃/L para el digestor del proceso DAM, DAT y PT+DAT, respectivamente.

Tabla 5.2. Resultados promedio de los distintos parámetros de interés monitoreados durante el periodo de operación estable del digestor correspondiente a cada proceso.

Parámetro	DAM	DAT	PT-DAT
Periodo de operación estable (d)	197	172	297
pH ^a	7.41 ± 0.17	7.61 ± 0.12	7.55 ± 0.12
Alcalinidad (mg CaCO ₃ / L) ^a	4717 ± 772	4162 ± 462	4434 ± 939
Relación de alcalinidades ^a	0.58 ± 0.08	0.67 ± 0.05	0.60 ± 0.08
Biogás TPN (L / d) ^{a,b}	2.70 ± 1.0	5.27 ± 1.38	5.04 ± 1.63
CH ₄ (%) ^a	73 ± 4	74 ± 2	74 ± 3
Producción de metano (m ³ TPN / kg SV _{eliminado})	0.50	0.65	0.61
Remoción de Sólidos Volátiles, RSV (%) ^c	31 ± 12	33 ± 9	30 ± 11
AGV's totales (mg/L) ^c	1876 ± 1152	820 ± 366	805 ± 315
Ácido acético (mg/L) ^c	1912 ± 907	258 ± 170	245 ± 112
Ácido propiónico (mg/L) ^c	435 ± 240	239 ± 134	262 ± 110
Ácido i-butírico (mg/L) ^c	139 ± 123	195 ± 66	175 ± 75
Ácido butírico (mg/L) ^c	89 ± 163	27 ± 22	47 ± 70
Ácido i-valérico (mg/L) ^c	300 ± 150	83 ± 89	58 ± 68
Ácido valérico (mg/L) ^c	35 ± 27	18 ± 17	19 ± 22
DQO soluble (mg/L) ^c	2883 ± 668	2311 ± 495	2255 ± 599
DQO debida a AGV's (mg/L)	3587	1075	1048
DQOs de AGV's/ DQO soluble (%)	124	47	46

^a El número de muestras (n) analizadas para dichos parámetros fueron equivalentes al periodo de operación de cada digestor (PT+DAT, n= 297; DAM, n= 186; DAT, n= 172).

^b TPN= temperatura y presión normal (0 °C, 1 atm)

^c Dicho parámetros fueron analizados semanalmente (PT+DAT, n= 51; DAM, n= 28; DAT, n= 28).

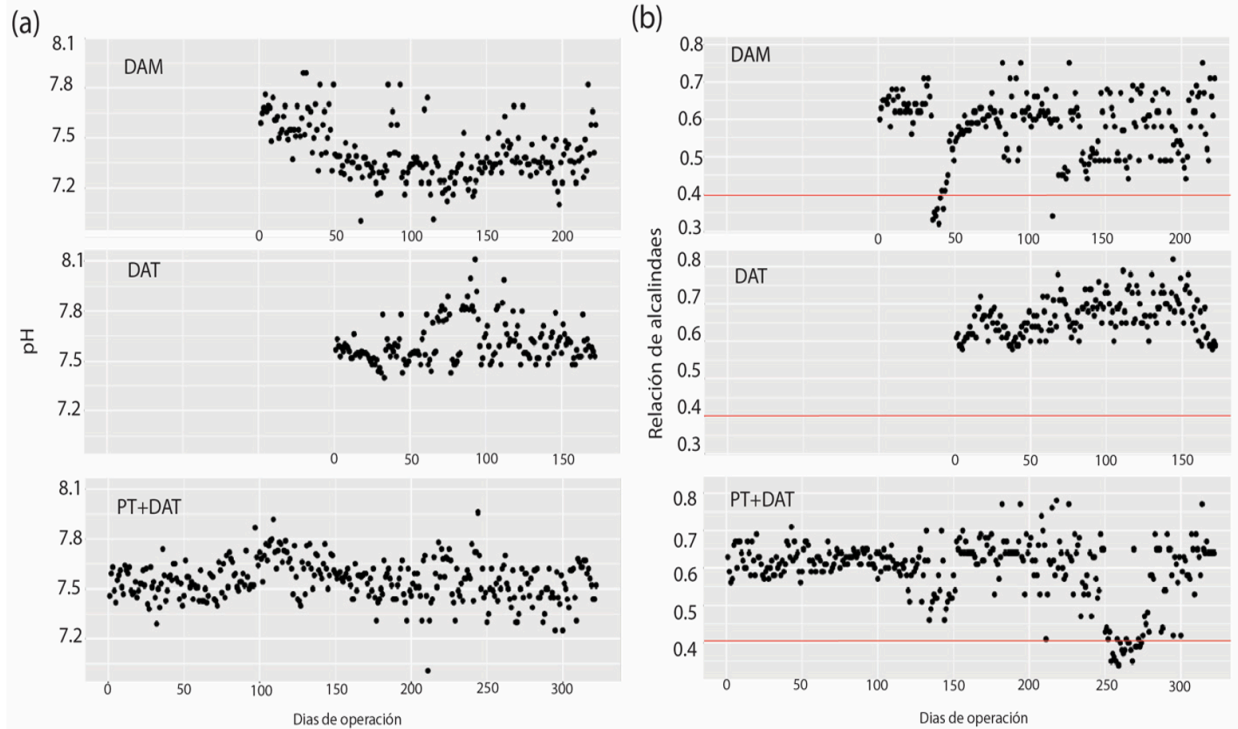


Figura 5.1 Valores de pH (a) y de relación de alcalinidades (b) reportados durante todo el periodo de operación del digestor correspondiente a cada proceso. La línea roja indica el valor mínimo de relación de alcalinidades establecido como criterio para considerar que el proceso se encontraba dentro del periodo de operación estable.

Sin embargo, en la Figura 5.1b se puede observar que el valor de la relación de alcalinidades presentó mayores fluctuaciones, llegando a valores por debajo del valor considerado como límite adecuado (0.4), originando periodos de operación inestables, tanto para el digestor del proceso DAM en los días de operación 36-45, como para el digestor del proceso PT+DAT, entre los días de operación 250-275. A este respecto cabe resaltar que el digestor del proceso DAT siempre mantuvo valores de relación de alcalinidades superiores a 0.55.

Estos periodos de inestabilidad, caracterizados precisamente por valores de la relación de alcalinidades menores a 0.4, se debieron a fallas mecánicas en la línea de recirculación de los digestores que propiciaron la entrada de aire al reactor afectando severamente la actividad de las arqueas metanogénicas. Al no ser metabolizados, los AGV's se acumularon llegando a alcanzar concentraciones superiores a los 3 000 mg/L, provocando la caída del valor de la relación de alcalinidades, pero no así del valor de pH.

Esta situación reafirma la importancia de monitorear el valor de la relación de alcalinidades durante la operación de los digestores, en prioridad sobre el pH, pues el cambio en el valor de la relación de alcalinidades evidenció de forma temprana un desbalance en el proceso, lo que permitió tomar acciones para evitar la acidificación de los digestores y la consecuente caída del pH, ya que si dicho parámetro hubiera reportado valores inferiores a 6.2, la recuperación de la actividad microbológica y el alcanzar la carga de operación hubiera tomado varios días, incluso semanas, siguiendo un esquema de incremento de carga paulatino.

Cabe mencionar que, el digester del proceso DAM mostró valores de relación de alcalinidades menos constantes a lo largo del tiempo, (Figura 5.1b), lo cual se corresponde con la mayor concentración promedio de AGV's (Figura 5.2a) y, particularmente, con las elevadas concentraciones de ácido acético (1912 mg/L) y ácido propiónico (435 mg/L) las cuales, a pesar de ser superiores a lo esperado, se encontraron dentro del rango de valores reportados por otros trabajos, siendo este rango de 70-700 mg/L para ácido acético y de 100-1400 mg/L para ácido propiónico (Martínez, 2009; Rubio-Loza & Noyola, 2010; Astals *et al.*, 2012). La razón por la cual las concentraciones de AGV's del digester DAM fueron mayores a las reportadas para los digestores del proceso DAT y PT+DAT pudo ser debido a una operación inadecuada del sistema, como se ha mostrado en la Figura 5.1b, resultado de condiciones de sobre carga en el régimen de alimentación o al tiempo de retención. Por otro lado, las concentraciones de AGV's para los digestores del proceso DAT y PT+DAT estuvieron dentro del rango reportado por otros trabajos (Rubio-Loza & Noyola, 2010; Astals *et al.*, 2012).

En la Figura 5.2b se observa que la reducción de sólidos volátiles (RSV) fue fluctuante, con valores promedio de 31, 33 y 30% para el digester del proceso DAM, DAT y PT+DAT, respectivamente. Adicionalmente, el análisis estadístico (ANOVA de una vía) no mostró una diferencia significativa ($p= 0.5109$) entre los tratamientos. Sin embargo, cabe señalar que el porcentaje promedio de RSV de cada tratamiento estuvo por debajo del porcentaje mínimo de RSV establecido en la normativa mexicana para evitar la atracción de vectores (38%), lo cual se debe al bajo porcentaje de la fracción volátil en el lodo de alimentación, y la consecuente limitación a su potencial degradación (Rubio-Loza & Noyola, 2010; Chen *et al.*, 2012).

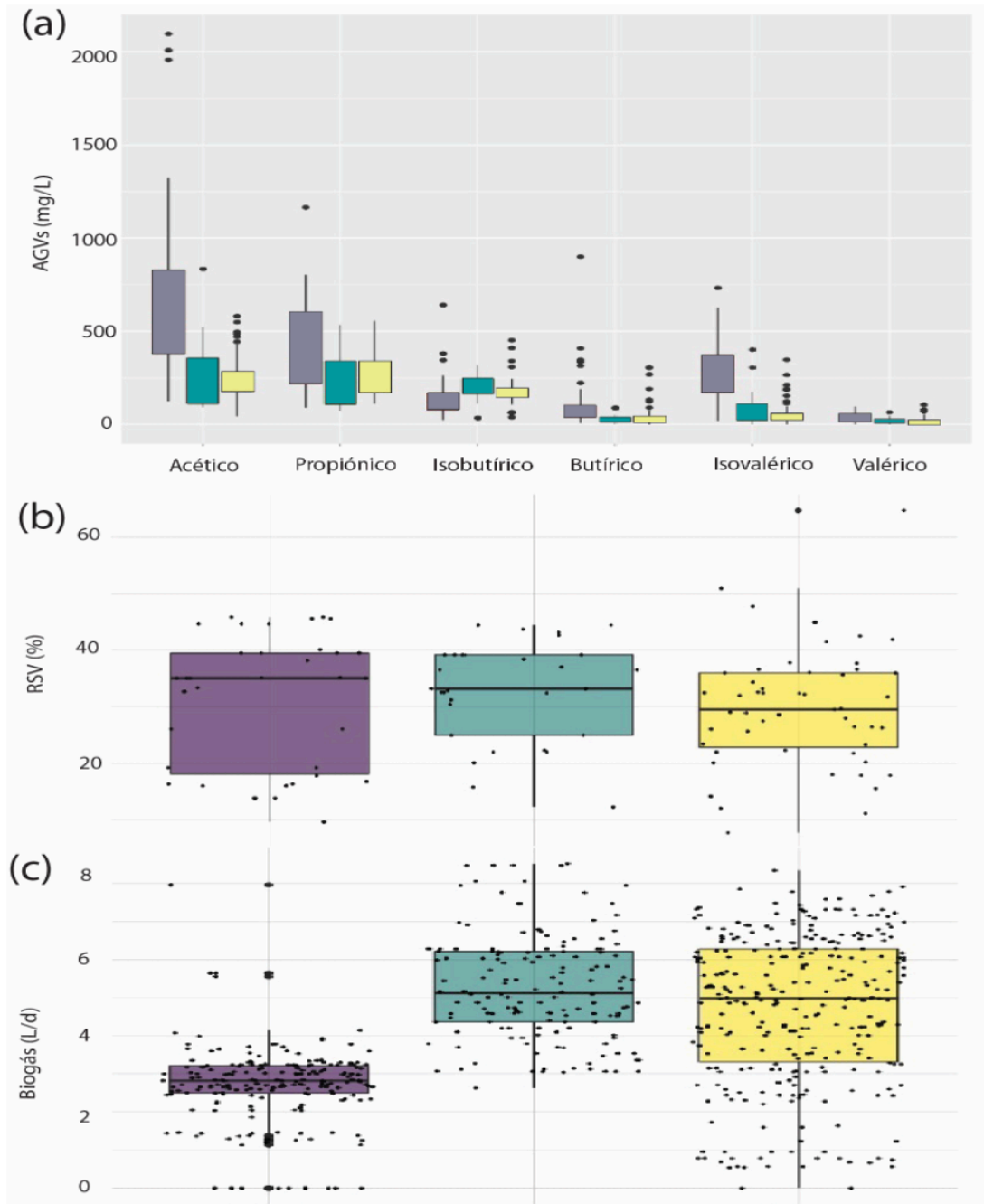


Figura 5.2. Valores de concentración de AGV's (a), de remoción de sólidos volátiles (b) y de producción de biogás (c) para los digestores del proceso DAM (morado), DAT (verde) y PT+DAT (amarillo) durante el periodo de operación estable de dichos digestores.

Un parámetro particularmente importante para evaluar el desempeño de los digestores es la producción de biogás. Los valores promedio de este parámetro fueron de 5.27, 5.04 y 2.70 L biogás/día para los digestores del proceso DAT, PT+DAT y DAM,

respectivamente. De acuerdo con el análisis estadístico, se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la producción de biogás de los digestores de los procesos DAT y PT+DAT con respecto al digestor del proceso DAM. Tal resultado refleja una de las ventajas relacionadas a los procesos de DAT, que es, precisamente, la mayor producción de biogás, lo cual se encuentra relacionado a una mayor actividad metabólica por parte de la comunidad microbiana. Sin embargo, de manera inesperada, también se encontró una diferencia significativa ($p=0.0010$) entre los procesos DAT y PT+DAT, debido a que, como se muestra en la Figura 5.2c, un 25% de los datos de producción de biogás reportados para el proceso PT+DAT estuvieron por debajo del valor mínimo de producción de biogás del proceso DAT, lo cual sugiere que el PT no favoreció la producción de biogás. Sin embargo, a pesar de la diferencia en el volumen de biogás producido diariamente, el porcentaje promedio de metano (Tabla 5.2) presente en el biogás fue muy similar para todos los digestores (73-74%). Además, cabe resaltar que, como se ve en la Figura 5.2c, a diferencia del proceso DAT y PT+DAT, el proceso DAM mostró menor dispersión en sus valores puntuales de producción de biogás.

Aunque la producción de biogás refleja, en cierta medida, el desempeño de los digestores, para hacer una adecuada comparación es necesario considerar que los digestores del proceso DAT y PT+DAT no fueron operados a la misma carga orgánica y TRH que el digestor del proceso DAM, por lo que una forma más apropiada de comparar su operación es mediante la producción específica de metano a temperatura y presión normal (TPN) expresado como $\text{m}^3 \text{CH}_4 \text{ TPN} / \text{kg SV}_{\text{eliminado}}$. Al respecto, los valores promedio obtenidos fueron de 0.65, 0.61 y 0.50 $\text{m}^3 \text{CH}_4 \text{ TPN} / \text{kg SV}_{\text{eliminado}}$ para los digestores del proceso DAT, PT+DAT y DAM, respectivamente. Estos valores se encontraron por debajo del intervalo de valores típicos (0.75-1.12 $\text{m}^3 \text{CH}_4 / \text{kg SV}_{\text{eliminado}}$) para digestores de lodos (Noyola, 1998) y, particularmente, la producción específica de metano del digestor del proceso DAM estuvo por debajo de las concentraciones de entre 0.50-1.23 $\text{m}^3 \text{CH}_4 / \text{kg SV}_{\text{eliminado}}$ reportadas por Martínez (2009) y Rubio-Loza & Noyola (2010), quienes operaron sistemas de DAM con pretratamiento térmico y con pretratamiento mediante un digestor acidogénico termofílico, respectivamente. Esta discrepancia se puede atribuir a las diferentes condiciones de operación (carga orgánica,

sustrato), al efecto de los pretratamientos, así como a la fracción volátil del influente de los digestores que fue considerablemente baja.

Por otro lado, en este trabajo también se hizo evidente que el pretratamiento térmico moderado, pese a haber aumentado la cantidad de DQO soluble en el lodo PT, no favoreció la producción de metano. Esto concuerda con lo reportado por otros trabajos ya que, aunque se considera que existe una relación directamente proporcional entre el aumento de la DQO soluble propiciado por las condiciones del pretratamiento y la producción de metano, se ha encontrado que el incremento de dicho parámetro no siempre se relaciona con el aumento en la producción de metano durante la etapa subsecuente de DA (Nazari *et al.*, 2017, Ruiz-Hernando *et al.*, 2014). Tal hecho se debe a que el lodo pretratado, y los compuestos orgánicos solubilizados diferentes a los AGV's (DQO soluble debida a otros compuestos), pueden mostrar una baja biodegradabilidad.

En concordancia con los resultados antes mencionados, Nazari *et al.* (2017) observaron que el pretratamiento a 80°C durante 5 horas, a un pH igual a 10, aumentó la DQO soluble de diferentes tipos de lodos y, sin embargo, esto no se relacionó con el aumento en la producción de metano debido, probablemente, a la formación de compuestos inhibidores como el amonio o el aumento en la concentración de iones catiónicos. Por su parte, Ruiz-Hernando *et al.* (2014), quienes probaron una serie de pretratamientos sobre lodo secundario, también reportaron que el pretratamiento térmico (80°C durante 30 min) no favoreció la producción de metano, lo cual se explica, según los autores, debido a que las condiciones de tratamiento no lograron dañar las membranas celulares y, por ende, no fue posible liberar (solubilizar) el contenido intracelular que puede resultar más provechoso para los procesos metabólicos que se llevan a cabo durante la DA. Así mismo, en su trabajo de revisión, Liu *et al.* (2019) señalan que existen resultados dispares con respecto al efecto de los pretratamientos térmicos moderados (<100°C) sobre diversos residuos orgánicos, particularmente para el caso del lodo ya que, aunque algunos trabajos reportan el aumento en la producción de biogás de entre el 0 y 50%, otros trabajos han reportado tanto efectos negativos (-33%) como extremadamente positivos (+400%).

5.3 Comunidades bacterianas asociadas a los digestores

Con objeto de lograr un mejor entendimiento sobre los procesos de DA, se analizó la comunidad bacteriana con base en la secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen *16S rRNA* bacteriano de LP y de los lodos digeridos por DAM y DAT (Cuetero-Martínez, tesis de Doctorado en desarrollo). El análisis de dichas muestras consideró tanto la determinación de células totales (sin tratamiento con PMA) como de células viables (tratadas con PMA).

Con base en las coberturas calculadas (Tabla 5.3) se considera que los resultados de secuenciación fueron suficiente para detectar el 99.9% de los géneros bacterianos presentes en todas las muestras y, por ende, en los niveles superiores (Familia, Orden, Clase y Filo). Pese a esto, es importante mencionar que, al realizar la asignación taxonómica, muchas de las bacterias más abundantes no se pudieron clasificar, particularmente, en las categorías de género y familia.

Tabla 5.3. Estimadores de biodiversidad α a nivel taxonómico de género.

Parámetro	LP		DAM		DAT	
	Totales ^a	Viables ^b	Totales	Viables	Totales	Viables
Número de secuencias	73586	78960	83657	74097	70484	70960
Cobertura (%)*	99.87	99.86	99.89	99.88	99.87	99.86
Chao1 (Riqueza)*	543 ± 9	559 ± 16	403 ± 17	422 ± 13	515 ± 0	524 ± 4
Shannon-Wiener (Equidad)*	4.00	3.98	2.55	2.45	3.65	3.72

^a Totales: muestras sin tratar con PMA

^b Viables: muestras tratadas con PMA

* Para calcular la cobertura, Chao1 y Shannon-Wiener, el número de secuencias se normalizó al de la muestra con menor abundancia, en este caso a 70 484 (DTT).

Por otro lado, en los resultados obtenidos con respecto al estimador de riqueza Chao1 (Tabla 5.3), el cual es un parámetro que indica el número de géneros bacterianos distintos en cada muestra, se reportó que los valores promedio para dicho parámetro (Chao1) se encontraron en un rango entre 403-543 para células totales (muestras sin tratar con PMA) y entre 422-559 para células viables (muestras tratadas con PMA). Estos son valores semejantes a los reportados por Ni *et al.* (2020), quienes en su investigación sobre la composición microbiana de doce distintos digestores mesofílicos reportaron valores del estimador Chao1 en un rango entre 120 a 594 para ambos tipos de muestra (tratadas y sin tratar con PMA). De la Tabla 5.3 destaca que, en todas las muestras, se determinó una mayor riqueza bacteriana en las muestras tratadas con PMA (viables) que en las muestras que no fueron tratadas con PMA (totales), lo cual sugiere que el tratamiento con PMA, para el análisis de estas muestras puntuales, no ejerció el efecto deseado. Aparentemente, el protocolo de tratamiento de las muestras con PMA requiere adecuaciones para obtener resultados esperados, similares a otros estudios (Ni *et al.*, 2020; Luo & Angelidaki, 2014) donde se observó una mayor riqueza estimada de células totales que de células viables.

Por otro lado, también se observó que la comunidad bacteriana del digestor del proceso DAM tuvo una menor riqueza que en la comunidad bacteriana del LP, resultados que concuerdan con lo reportado en otros trabajos (Ni *et al.*, 2020). Sin embargo, la comunidad bacteriana del digestor del proceso DAT tuvo valores de Chao1 muy similares al LP, lo cual fue inesperado ya que se consideraba que las condiciones termofílicas, más que las mesofílicas, ejercerían una presión selectiva sobre la comunidad microbiana disminuyendo la riqueza bacteriana (Guo *et al.*, 2014). Dicha similitud entre las comunidades microbianas de las muestras LP y DAT se visualiza mediante el análisis de componentes principales (Figura 5.3a) donde se observa, debido a la dirección de los vectores, que ambas muestras contienen una mayor abundancia de ciertos órdenes bacterianos, entre los que destacan *Actynomicetales*, *Clostridiales*, *Rhizobiales* y *Bacterias* sin clasificar. También se observa que las muestras DAM difieren de las muestras LP y DAT, mostrando una mayor abundancia de *Thermotogales* y *Bacteroidetes* sin clasificar, aunque comparte con las muestras DAT una abundancia relativa similar de los órdenes bacterianos *Synergistales* y *Bacteroidales*.

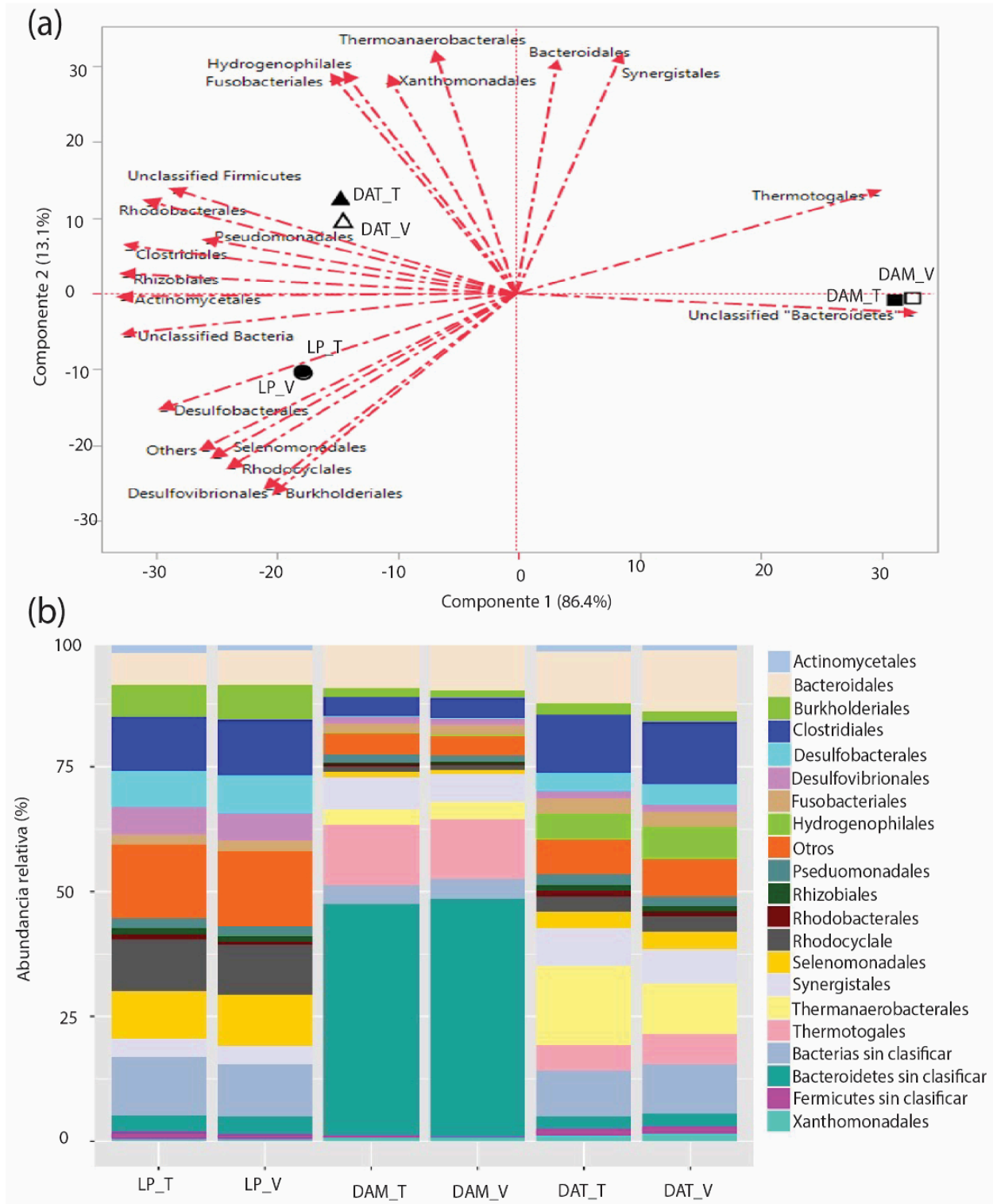


Figura 5.3. Análisis de componentes principales (PCA) a nivel taxonómico de Orden (a) y abundancia relativa de los OTU's más abundantes nivel taxonómico de Orden (b). DAT_T (▲), DAT_V(△), DAM_T (■), DAM_V (□), LP_T (●) y LP_V (○).

Por otro lado, de acuerdo con los valores del índice Shannon-Wiener, el cual es un parámetro que hace referencia al grado en que las especies están representadas en la muestra (riqueza y abundancia relativa), la diversidad de la comunidad bacteriana fue mayor en las muestras LP (4.0 y 3.98 para células totales y viables, respectivamente) y DAT (3.65 y 3.72 para células totales y viables, respectivamente) que en la muestra DAM (2.55 y 2.45 para células totales y viables, respectivamente). Estos resultados se ven representados en la Figura 5.3b ya que se observa que en la muestra DAM, a diferencia de las muestras LP y DAT, hay una menor diversidad en los órdenes bacterianos y una predominancia del orden *Bacteroidetes* sin clasificar, cuya abundancia relativa fue del 47%. En la muestra DAM los órdenes bacterianos con mayor abundancia relativa, después de *Bacteroidetes sin clasificar*, fueron *Thermotogales*, *Bacteroidales* y *Synergistales*, con 12, 9 y 6% de abundancia relativa, respectivamente.

En la muestra LP, tanto para el análisis de células totales como de viables, la comunidad bacteriana estuvo compuesta principalmente por *Bacterias* sin clasificar (11%), *Clostridiales* (11%), *Rhodocyclales* (10%), *Selenomonadales* (10%), *Desulfobacterales* (7%) y *Burkholderiales* (6%). Por otro lado, para el caso de DAT, los órdenes bacterianos con mayor abundancia relativa fueron *Clostridiales* (12%), *Bacteroidales* (11%), *Bacterias* sin clasificar (9%), *Synergistales* (7%) e *Hidrogenophilales* (5%). Cabe mencionar que, a diferencia de los demás órdenes bacterianos, en la muestra DAT, las bacterias termofílicas anaerobias estrictas del orden *Thermoanaerobacterales*, que usan principalmente azúcares y otras sustancias orgánicas como sustrato, se encontraron en una mayor abundancia relativa en las muestras que no fueron tratadas con PMA (16%) que en las que si fueron tratadas con PMA (10%), es decir, la cantidad de bacterias viables del orden *Thermoanaerobacterales* fue menor a la cantidad de bacterias totales de dicho orden, lo cual era uno de los fenómenos que se esperaba observar pues se consideraba que los análisis de secuenciación convencionales (sin tratamiento con PMA) pueden sobreestimar la cantidad de bacterias viables de las comunidades microbianas.

Por otro lado, aunque la diferencia en la composición de la comunidad bacteriana de las muestras DAM y DAT era esperada, los grupos bacterianos que marcaron dicha diferencia no concuerdan totalmente con lo reportado por Guo *et al.* (2014) quienes, al

evaluar la comunidad microbiana de digestores anaerobios bajo condiciones termofílicas y mesofílicas que trataban residuos de comida, encontraron que las bacterias del filo *Thermotogae* y *Bacteroidetes* fueron las dominantes bajo condiciones termofílicas y mesofílicas, respectivamente. Sin embargo, en su estudio también reporta que el filo *Thermotogae* llegó a presentar una abundancia relativa del 20% en los digestores mesofílicos y las bacterias del filo *Bacteroidetes*, en uno solo de los digestores termofílicos, se presentaron en una abundancia relativa del 10%. Dichos resultados se asemejan con los resultados de este trabajo dónde, en la muestra DAM, predominaron las bacterias del orden *Bacteroidetes* y *Thermotogales*, estas últimas siendo bacterias fermentadoras termofílicas o hipertermofílicas, aunque pocos son los trabajos que reportan su presencia en ambientes mesofílicos (Camilla *et al.*, 2010).

Otros órdenes bacterianos predominantes en la muestra DAT, y que no figuraron en la muestra DAM, fueron los *Clostridiales*, *Desulfobacterales* e *Hidrogenophilales*. El primer y el segundo orden corresponden a bacterias hidrolíticas, predominantemente termofílicas, capaces de degradar proteínas, carbohidratos y lípidos (Lou *et al.*, 2014; Castellano-Hinojosa *et al.*, 2018). Por su parte, *Hidrogenophilales* es capaz de utilizar el hidrógeno molecular y los compuestos orgánicos como fuente de electrones para su desarrollo. Pese a la diferencia en las comunidades microbianas entre las muestras DAT y DAM, vale la pena resaltar que las bacterias del orden *Synergistales*, capaces de oxidar el acetato (Carballa *et al.*, 2015), duplicaron su abundancia relativa en los digestores anaerobios pasando de una abundancia relativa del 3% en la muestra LP a una abundancia relativa del 6% en ambas muestras (DAM y DAT), resultado que concuerda con lo esperado para el proceso de DA.

Finalmente, cabe señalar que, como parte de los resultados del análisis de secuenciación del gen 16S, se encontró que las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, pertenecientes al orden *Enterobacterales* (ubicados dentro del grupo Otros en la Figura 5.3b), se encontraron en una abundancia relativa de 0.3%, 0.06% y 0.06% en las muestras LP, DAT y DAM, respectivamente. De la familia *Enterobacteriaceae*, los géneros predominantes en todas las muestras fueron *Enterobacter*, *Escherichia* y *Shigella*, pero no así las bacterias del género *Salmonella*, las que de hecho no fueron identificadas en ninguna muestra. Este resultado sienta las

bases para que la normativa mexicana eventualmente considere a otros patógenos de interés sanitario que pueden llegar a encontrarse en mayor proporción que aquellos establecidos en la NOM-004 SEMARNAT 2002 (como es el caso de *Shigella* o *Enterobacter* para el caso de este trabajo en particular) y, debido a esto, ser más útiles para el monitoreo de la calidad microbiológica de los lodos y biosólidos.

5.4 Calidad bacteriológica de acuerdo con la normativa mexicana

La calidad bacteriológica fue evaluada en cada etapa de los diferentes procesos de estabilización anaerobia de LP planteados en este trabajo (DAM+TA, DAT y PT+DAT) de acuerdo con la NOM-004-SEMARNAT 2002.

Para el LP se reportó una concentración promedio de coliformes fecales y de *Salmonella* spp. de 4.7 y 5.5 log₁₀ NMP/gST, respectivamente. Estos resultados son difíciles de contrastar debido a que, en general, los trabajos enfocados a evaluar la calidad bacteriológica del lodo emplean una mezcla de lodo primario y lodo secundario, lo cual es una práctica común en las PTAR. Sin embargo, para el presente estudio, se optó por trabajar exclusivamente con LP debido a que se considera que esta matriz contiene una mayor carga de microorganismos patógenos que el lodo secundario.

A pesar de haber descartado varias muestras debido a la presencia de falsos positivos en la etapa de cuantificación (ver apartado 5.4.5), la concentración promedio de *Salmonella* spp. en el LP resultó ser, efectivamente, mayor a la concentración promedio de *Salmonella* spp. (4.5 log₁₀ NMP/gST) reportada por Martínez (2009), quien utilizó una mezcla de lodo primario y lodo secundario proveniente de la misma PTAR que las muestras de LP utilizadas en este trabajo. En otros trabajos se reportan diferentes concentraciones de coliformes fecales (5-8 unidades logarítmicas) y *Salmonella* (<0.1-6 unidades logarítmicas) en lodos provenientes de PTAR municipal (Bonjoch *et al.*, 2009; Martínez, 2009; Riau *et al.*, 2010; Foster-Carneiro *et al.*, 2010; Rubio-Loza & Noyola, 2010; Chen *et al.*, 2012; Astals *et al.*, 2012; Kjerstadius *et al.*, 2013; Ruiz-Hernando *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2016; Flemming *et al.*, 2017). Cabe señalar que, de manera inesperada, se observó una mayor concentración de *Salmonella* spp. que de coliformes fecales en el LP, lo cual es una circunstancia que se asocia más a estudios que trabajan

con influentes sanitarios (Villalba, 2012; Magos, 2013; De los Cobos *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2018), pero no así con influentes de drenaje municipal.

5.4.1 Proceso DAM+TA

Los resultados relacionados a la concentración de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en las distintas etapas del proceso DAM+TA se muestran en la Tabla 5.4 y en la Figura 5.4. Después de la etapa DAM se reportó una concentración promedio de 2.7 y 4.2 log₁₀ NMP/gST de coliformes fecales y *Salmonella* spp., respectivamente. Después de la etapa TA, se reportó una concentración promedio de coliformes fecales de 0.3 log₁₀ NMP/gST y *Salmonella* no fue detectada. Durante la etapa de almacenamiento no se detectó la presencia de coliformes fecales y *Salmonella*.

Los resultados relacionados a la capacidad de reducción después de la etapa DAM de coliformes fecales (2 unidades logarítmicas) y *Salmonella* (1.3 unidades logarítmicas) reportados en este trabajo (Tabla 5.4) se encuentran por debajo de lo reportado en otros estudios ya que, por ejemplo, Chen *et al.* (2012), quienes trabajaron con un sistema de DA mesofílica a un TRH de 16 días, reportaron una reducción de 3.7 y 3 unidades logarítmicas de *Salmonella* y *E. coli*, respectivamente. Por su parte, Riau *et al.* (2010), quienes operaron un digester mesofílico por lotes a un TRH de 15 días, reportaron una reducción de 3 unidades logarítmicas de coliformes fecales pues la concentración de dichos microorganismos pasó de 8 log₁₀ NMP/gST en el lodo de alimentación a 5 log₁₀ NMP/gST en el efluente de digester. Los resultados del presente trabajo se asemejan más a los reportados por Flemmig *et al.* (2017) quienes evaluaron la calidad microbiológica de los lodos tratados mediante DA mesofílica de seis diferentes PTAR. En sus resultados, las concentraciones de coliformes fecales en el influente estuvieron en un rango entre 6.28-7.94 log₁₀ NMP/gST, y después de la etapa de DA mesofílica, reportaron una concentración de entre 4.60-6.11 log₁₀ NMP/gST, lo que equivale a una reducción de entre 0.59-2.33 unidades logarítmicas. Para el caso de *Salmonella*, las concentraciones en el influente estuvieron en un rango entre <0.1-3.53 log₁₀ NMP/gST, y después de la etapa de DA mesofílica, reportaron una concentración de entre 0.53-1.58 log₁₀ NMP/gST, equivalentes a una reducción de entre 0.26-3.0 unidades logarítmicas.

Tabla 5.4. Concentración promedio de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en las etapas de lodo primario (LP), digestión anaerobia mesofílica (DAM), tratamiento alcalino (TA) y almacenamiento (A) del proceso DAM+TA.

Parámetro microbiológico	Log ₁₀ NMP/gST				R1 ^b	R2 ^c	(R1+R2) ^d	In ^e
	LP	DAM	TA	A ^a				
Coliformes fecales ^f	4.7 ± 0.6	2.7 ± 1.0	0.3 ± 0.3	ND ^g	2	2.4	4.4	-0.3
<i>Salmonella</i> spp. ^f	5.5 ± 0.8	4.2 ± 0.6	ND	ND	1.3	4.2	5.5	0

^a A= etapa de almacenamiento

^b R1, reducción después de la etapa DAM en unidades log = (LP-DAM)

^c R2, reducción después de la etapa TA en unidades log = (DAM-TA)

^d R1+R2, reducción después de los dos tratamientos en unidades log = (LP-DAM) + (DAM-TA)

^e In, incremento después del almacenamiento en unidades log = (A-TA)

^f n=10

^g ND= No detectable

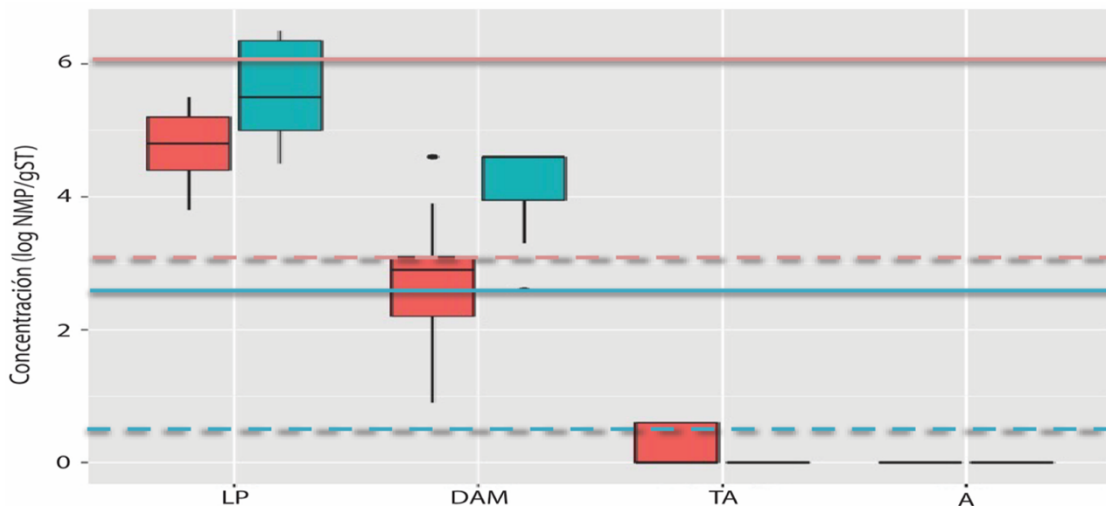


Figura 5.4. Box plot que muestra la concentración (log₁₀ NMP/gST) de coliformes fecales (rojo) y *Salmonella* spp. (azul) en las distintas etapas del proceso DAM+TA. El total de muestras analizadas para cada parámetro bacteriológico fue de n=10. Las líneas rojas y azules indican el límite máximo permisible de coliformes fecales y *Salmonella* spp., respectivamente. Las líneas sólidas indican corresponden al límite para biosólidos clase C y las líneas punteadas corresponden a los biosólidos clase A y B.

Como se muestra en la Figura 5.4, en la etapa DAM el 75% de los resultados de coliformes fecales indican que se produjeron biosólidos Clase A (la clase más estricta) de acuerdo con la normativa mexicana. Sin embargo, a pesar de que se reportó una ligera reducción de *Salmonella* durante dicha etapa, la concentración de este microorganismo rebasa los límites permitidos para los biosólidos clase C, lo que impide su aprovechamiento y hace evidente la necesidad de incluir una etapa de tratamiento adicional. Esta circunstancia concuerda con lo esperado ya que, a pesar de que en algunos trabajos se han demostrado que el proceso de DAM a gran escala puede lograr mayores eficiencias de inactivación de patógenos que sistemas a escala laboratorio (Qi *et al.*, 2018), de manera general, la DA mesofílica es considerada como un método de estabilización y no como un método de desinfección de lodos. Al respecto, la EPA (1994) considera a la DA mesofílica a 15 días de TRH como un proceso que puede reducir significativamente la cantidad de patógenos, pero solo es recomendado para la producción de biosólidos Clase B, cuyo aprovechamiento es restringido.

La capacidad limitada de la DA mesofílica para reducir la concentración de microorganismos patógenos e indicadores se ha asociado a que la temperatura de operación del proceso no representa una condición de estrés para los microorganismos patógenos, por lo que la reducción de éstos durante la DA mesofílica se adjudica a otras condiciones del proceso como el tipo de mezclado, las limitaciones del sustrato y la competencia entre microorganismos (Smith *et al.*, 2005). Para el caso particular de la DA mesofílica, además de la temperatura, Jiang *et al.* (2020) han señalado que el TRH tampoco es un factor que afecte significativamente la inactivación de microorganismos, pero si otros factores como el tipo de patógeno, las condiciones de operación (batch vs. continuo) y la concentración de productos intermediarios.

En este trabajo, después de la etapa DAM, se empleó una etapa de tratamiento alcalino (TA), la cual logró la producción de biosólidos Clase A pues, después de la etapa TA, se reportó una concentración promedio de coliformes fecales de $0.3 \log_{10}$ NMP/gST y *Salmonella* no fue detectada. Sin embargo, a este respecto, es importante hacer una aclaración ya que en los lodos finales producidos en la etapa TA, pese a que todas las muestras analizadas presentaron tubos positivos en la serie del NMP con respecto a *Salmonella* spp., estos fueron descartados como falsos positivos (ver apartado 5.4.5),

debido a que no se observó el crecimiento de bacterias en los agares selectivos sulfito bismuto y XLD, recomendados por la NOM-004-SEMARNAT 2002 como parte del proceso de control de calidad para el aislamiento y la identificación de *Salmonella*. De esta manera, el TA logró una reducción en el conteo de coliformes fecales y *Salmonella* spp. de 2.4 y 4.2 unidades logarítmicas, respectivamente. Finalmente, en la etapa de almacenamiento del proceso DAM+TA los microorganismos coliformes fecales no fueron detectados, mientras que *Salmonella* spp. continuó sin ser detectable, confirmando que el TA es adecuado para mantener la calidad microbiológica de los biosólidos.

El tratamiento alcalino del lodo es una práctica relativamente común que se ha empleado por varios años. Diversos trabajos han demostrado su capacidad de desinfección; por ejemplo, Bean *et al.* (2007) reportaron una reducción de 6 y 4 unidades logarítmicas de *E. coli* y *Salmonella*, respectivamente, en muestras de lodos sin tratamiento previo al emplear hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) en una concentración de 80g $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{kg}$ de lodo u 8%. Cabe resaltar que, adicionalmente, dicho tratamiento resultó ser sumamente efectivo para la inactivación de adenovirus, rotavirus, del bacteriófago MS-2 y del protozoario *Giardia lamblia*, aunque *Cryptosporidium parvum* así como *Ascaris lumbricoides* no fueron afectados significativamente. Por su parte, Ruíz-Hernando *et al.* (2014), reportaron una capacidad de reducción de 2.57 unidades logarítmicas de *E. coli* al emplear hidróxido de sodio (NaOH), en una concentración de 157gNaOH/gST o 15.7%, como pretratamiento de lodo secundario. Por su parte, pensando en contrarrestar las desventajas relacionadas al uso del tratamiento alcalino, como son el aumento en la masa de lodo, Chaudhary *et al.* (2021) probaron la combinación del tratamiento alcalino con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, a dosis de 5%, 10%, 15% y 20% (masa/masa), con el posterior tratamiento térmico a 60°C durante 1 hora, logrando así una reducción mayor a 2 unidades logarítmicas de coliformes fecales en biosólidos producidos mediante DA mesofílica. Con la combinación de las mismas dosis de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con el tratamiento térmico a menor temperatura (50 y 40°C) reportaron una reducción de coliformes fecales menor a 2 unidades logarítmicas, lo cual sugiere que, bajo dichas condiciones, el tratamiento térmico tuvo una mayor influencia sobre la reducción de los microorganismos que el tratamiento alcalino.

5.4.2 Proceso DAT

Los resultados relacionados a la concentración de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en las distintas etapas del proceso DAT se muestran en la Tabla 5.5 y en la Figura 5.5. La elevada capacidad de reducción de coliformes fecales (3.7 unidades logarítmicas) y *Salmonella* spp. (5.5 unidades logarítmicas) concuerda con lo esperado ya que, aunque Scaglia *et al.* (2014) mencionan que en su estudio no encontraron una diferencia significativa en cuanto a la capacidad de desinfección entre el proceso DAM y el proceso DAT, de manera general, la DAT es considerada como un proceso que logra una mayor reducción (4-5 unidades logarítmicas) de la concentración de los parámetros bacteriológicos que la DAM (Jiang *et al.*, 2020). Esta característica se explica debido al efecto de la temperatura, primordialmente, aunque también se considera que la cinética de inactivación de las bacterias entéricas bajo condiciones termofílicas (55°C) está controlada por la resistencia térmica intrínseca de cada microorganismo y el estrés inducido por las condiciones de la matriz (Smith *et al.*, 2005).

Tabla 5.5. Concentración promedio de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en las etapas lodo primario (LP), digestión anaerobia termofílica (DAT), y almacenamiento (A) del proceso DAT.

Parámetro microbiológico	Log ₁₀ NMP/gST			R1 ^b	In ^c
	LP	DAT	A ^a		
Coliformes fecales ^d	4.7 ± 0.6	1.0 ± 0.5	1.3 ± 0.9	3.7	0.3
<i>Salmonella</i> spp. ^d	5.5 ± 0.8	ND ^e	ND	5.5	0

^a A= etapa de almacenamiento

^b Reducción después de la etapa DAT en unidades log = (LP-DAT)

^c Incremento después del almacenamiento en unidades log = (A-DAT)

^d n=10

^e ND= No detectable

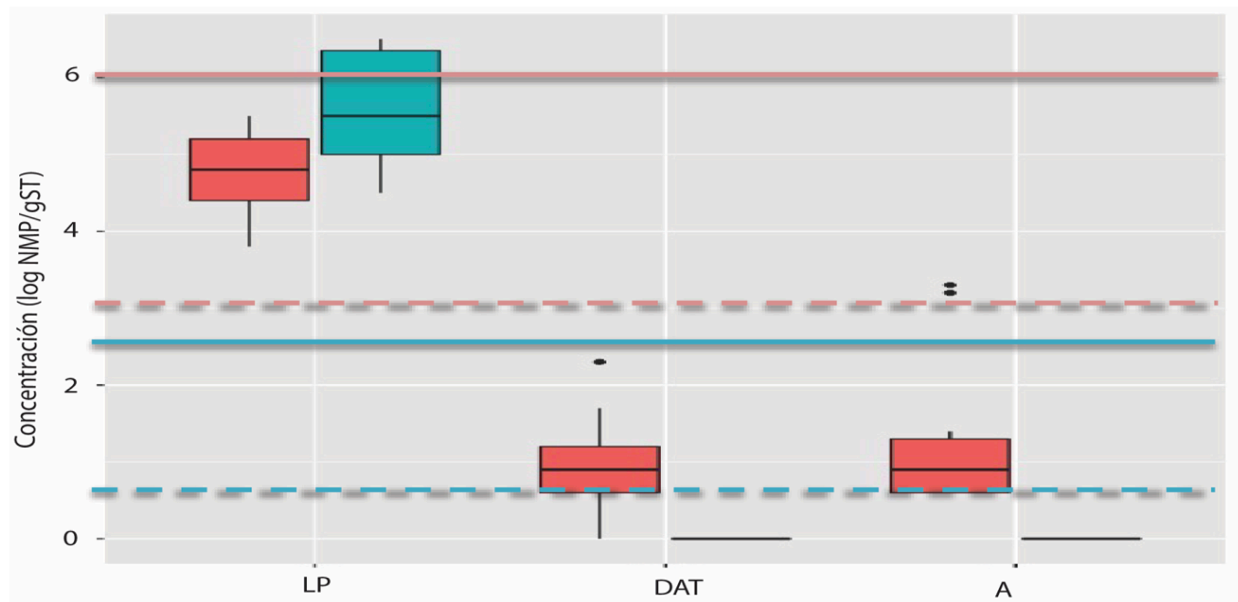


Figura 5.5. Box plot que muestra la concentración (\log_{10} NMP/gST) de coliformes fecales (rojo) y *Salmonella* spp. (azul) en las distintas etapas del proceso DAT. El total de muestras analizadas para cada parámetro bacteriológico fue de $n=10$. Las líneas rojas y azules indican el límite máximo permisible de coliformes fecales y *Salmonella* spp., respectivamente. Las líneas sólidas indican corresponden al límite para biosólidos clase C y las líneas punteadas corresponden a los biosólidos clase A y B.

A pesar de que a la salida del digestor del proceso DAT se produjeron biosólidos Clase A, después de la etapa de almacenamiento durante 72 horas se reportó un incremento de 0.3 unidades logarítmicas en la concentración promedio de coliformes fecales, lo cual, sin embargo, no modificó la clasificación de los biosólidos producidos en este proceso. Dicho recrecimiento, aunque mínimo, representa un cuestionamiento a la confianza que se le puede dar a los biosólidos producidos por este proceso, sobre todo considerado el corto periodo de almacenamiento. El recrecimiento reportado se puede atribuir, según algunos autores (Iranpour, 2005; Iranpour & Cox, 2006; Higgins *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; de los Cobos *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2020), a la incompleta inactivación durante el proceso de DAT, al efecto limitado de esa temperatura (55°C), a la contaminación posterior de los biosólidos, o al efecto del proceso de deshidratación por centrifugación. Sin embargo, para las condiciones dadas en el presente trabajo, la contaminación de los biosólidos es poco probable ya que éstos fueron almacenados en frascos cerrados y estériles. Por ello,

aunque el limitado incremento de coliformes fecales (0.3 unidades logarítmicas) puede ser consecuencia de la variación de los datos debido a la técnica de cuantificación utilizada (NMP), se considera que la reactivación o el recrecimiento de los microorganismos son las causas probables ya que han sido reportadas en otros trabajos. En este sentido, Fane *et al.* (2020) indican que los principales factores relacionados al recrecimiento de *E. coli* en los biosólidos son la deshidratación mecánica, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes. Por su parte, Chen *et al.* (2011) mencionan que el oxígeno puede ser considerado como un factor que favorece el fenómeno de recrecimiento de coliformes fecales y otros patógenos ya que dichos microorganismos, al ser facultativos, pueden encontrar en la exposición al oxígeno condiciones para desarrollarse debido a que la población de anaerobios estrictos decae bajo dicha circunstancia. Sin embargo, con los ensayos realizados, los mencionados autores demostraron que, más que la exposición al oxígeno es la disposición de nutrientes el factor clave para el recrecimiento de los microorganismos en los biosólidos.

Para el caso particular de este trabajo, el hecho de no haber observado un mayor incremento en la concentración de coliformes fecales se puede explicar debido a que se logró una inactivación efectiva de los microorganismos o a que no se favorecieron las condiciones necesarias (nutrientes y temperatura) para la recuperación de los microorganismos durante el almacenamiento en condiciones anaerobias. Además, los biosólidos del proceso DAT no fueron deshidratados mecánicamente y se almacenaron a temperatura ambiente, por lo que no se favoreció el incremento en la disponibilidad de nutrientes y la temperatura no fue la óptima para la reactivación de los microorganismos. Esto último está en concordancia con lo reportado por Pinto *et al.* (2011), quienes observaron que *E. coli* en estado VBNC mostraba mejor capacidad de reactivación a 37°C que a 25°C. Con lo antes mencionado, sería interesante analizar los biosólidos almacenado a tiempos más largos para determinar si el recrecimiento llega a ser tan grande que el lodo cambie de clase o si se mantiene a niveles aceptables.

5.4.3 Proceso PT+DAT

Con respecto al proceso PT+DAT (Tabla 5.6 y Figura 5.6), se observó que después de la etapa PT la concentración promedio de coliformes fecales cayó hasta un valor de 0.5 log₁₀ NMP/gST y la presencia de *Salmonella* fue descartada después de confirmar resultados falsos positivos en la etapa de cuantificación (ver apartado 5.4.5).

De esta manera, el PT mostró por sí solo una reducción de 4.3 unidades logarítmicas de coliformes fecales y una reducción de 5.5 unidades logarítmicas de *Salmonella* spp. Estos resultados concuerdan con los de otros trabajos que han empleado pretatamientos térmicos bajo condiciones similares. Por ejemplo, Kjerstadius *et al.* (2013) reportaron que el tratamiento térmico a 70°C durante 1 hora logró reducir el conteo de *E. coli* de 7 log₁₀ UFC/g ST a menos de 3 log₁₀ UFC/g ST y, por otra parte, *Salmonella* fue detectada en el influente, pero no así en el lodo tratado. Por su parte, Villalba (2012) reportó una reducción de cuatro unidades logarítmicas de coliformes fecales bajo las mismas condiciones de tratamiento empleadas en este trabajo (80°C durante 1 hora) y, para el caso de *Salmonella* spp., encontró que el intervalo de tiempo (menor a 20 min) en el cual el lodo tratado alcanzaba los 80°C era suficiente para la inactivación de dicho microorganismo. De manera similar, Martínez (2009) reportó que, incluso en el tratamiento térmico de la mezcla de lodo primario y lodo secundario a 70°C durante 30 minutos, no se detectaron coliformes fecales ni *Salmonella*, además de que el 100% de los huevos de helminto fueron inactivados. Esta elevada capacidad de desinfección mostrada por el tratamiento térmico moderado se debe, en gran medida, al efecto de la temperatura, aunque Yin *et al.* (2018) han reportado que el mezclado del lodo durante el tratamiento térmico (condición también empleada durante esta investigación) es un factor que tiene un efecto significativo en la remoción de los microorganismos ya que en su estudio encontraron que, para lograr la completa inactivación de coliformes fecales, *Streptococcus* y *Salmonella* empleando el tratamiento térmico del lodo a 70°C, bajo condiciones sin mezcla se requirieron de por lo menos 80 minutos de tratamiento y bajo condiciones con mezcla se requirieron de 60 minutos.

Tabla 5.6. Concentración promedio de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en las etapas de lodo primario (LP), pretratamiento térmico (PT), digestión anaerobia termofílica (DAT), y almacenamiento (A) del proceso PT+DAT

Parámetro microbiológico	Log ₁₀ NMP/gST				R1 ^b	R2 ^c	(R1+R2) ^d	In ^e
	LP	PT	DAT	A ^a				
Coliformes fecales ^f	4.7 ± 0.6	0.5 ± 0.2	2.1 ± 1.1	1.9 ± 1.0	4.2	-1.6	2.6	-0.2
<i>Salmonella</i> spp. ^f	5.5 ± 0.8	ND ^g	ND	ND	5.5	0	5.5	0

^a A= etapa de almacenamiento

^b Reducción después de la etapa PT en unidades log = (LP-PT)

^c Reducción después de la etapa DAT en unidades log = (PT-DAT)

^d Reducción después de los dos tratamientos en unidades log = (LP-PT) + (PT-DAT)

^e Incremento después del almacenamiento en unidades log = (A-DAT)

^f n=10

^g ND= No detectable

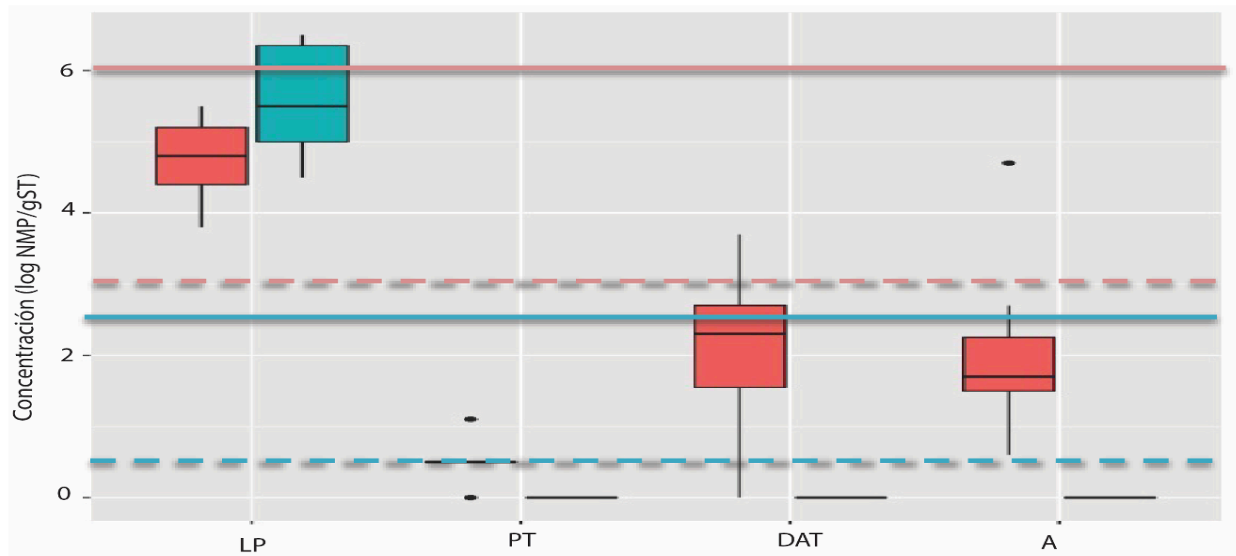


Figura 5.6. Box plot que muestra la concentración (log₁₀ NMP/gST) de coliformes fecales (rojo) y *Salmonella* spp. (azul) en las distintas etapas del proceso PT+DAT. El total de muestras analizadas para cada parámetro bacteriológico fue de n=10. Las líneas rojas y azules indican el límite máximo permisible de coliformes fecales y *Salmonella* spp., respectivamente. Las líneas sólidas indican corresponden al límite para biosólidos clase C y las líneas punteadas corresponden a los biosólidos clase A y B.

Posterior al PT, en la etapa DAT del proceso PT+DAT, se observó un recrecimiento de 1.6 unidades logarítmicas de coliformes fecales, correspondiente a una concentración promedio de $2.1 \log_{10}$ NMP/gST. Por otro lado, pese que en la serie de NMP para la cuantificación de *Salmonella* spp. se observaron algunos tubos presuntamente positivos, estos fueron descartados debido a la confirmación de resultados falsos positivos durante la etapa de cuantificación (ver apartado 5.4.5). Sin embargo, vale la pena adelantar que, en la etapa de confirmación, se identificó la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* mediante la prueba API 20E, por lo que la presencia de resultados falsos-positivos durante la etapa de cuantificación se discutirá a profundidad más adelante. Finalmente, en la etapa de almacenamiento del proceso PT+DAT, se observó un ligero decremento en el conteo de coliformes fecales, con una concentración promedio de $1.9 \log_{10}$ NMP/gST. Para el caso de *Salmonella* spp., dicho microorganismo no fue detectado aunque, de los tubos positivos durante la etapa de cuantificación se identificó que el crecimiento bacteriano estuvo asociado exclusivamente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Con estos resultados se puede afirmar que el proceso PT+DAT logró producir biosólidos Clase A conforme a lo establecido en los parámetros bacteriológicos en la normativa mexicana. Sin embargo, el fenómeno de recrecimiento de coliformes fecales durante la DAT sugiere que las condiciones del PT empleadas en este estudio no lograron la completa inactivación de los microorganismos, lo cual se respalda por los resultados de otros estudios que han observado el mismo fenómeno de recrecimiento. Por un lado, el trabajo de De los Cobos-Vasconcelos *et al.* (2015) reportó que el tratamiento térmico durante 1h a 60, 70 y 80 °C, seguido de un enfriamiento gradual a temperatura ambiente, permitió la reactivación y el recrecimiento, tanto de coliformes fecales como de *Salmonella* spp., dentro de las primeras 24 horas en condiciones anaerobias mesofílicas. De manera similar, Martínez (2009) observó el recrecimiento de coliformes fecales y *Salmonella* ya que, en la etapa de pretratamiento térmico (60°C durante 1 hora) de lodo reportó una concentración de $1.4 \log_{10}$ NMP/gST de coliformes fecales y la ausencia de *Salmonella* spp., pero después de la etapa de DA mesofílica, reportó una concentración de $5.3 \log_{10}$ NMP/gST de coliformes fecales y $3.7 \log_{10}$

NMP/gST de *Salmonella* spp., por lo que dichos resultados evidenciaron el recrecimiento de los microorganismos en cuestión. Magos (2013) también reportó el fenómeno de recrecimiento de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en los tres digestores mesofílicos evaluados en su trabajo, uno de los cuales fue alimentado con un lodo primario tratado térmicamente a 80°C durante 1 hora y donde en el día cero del periodo operación reportó una concentración de 1 log₁₀ NMP/gST de coliformes fecales y de 3 log₁₀ NMP/gST de *Salmonella*, pero en el primer día de operación del digestor anaerobio observó una concentración de 5 log₁₀ y 7 log₁₀ NMP/gST de dichos microorganismos, respectivamente.

Este fenómeno de recrecimiento reportado en los mencionados estudios se puede deber a que, después del tratamiento térmico moderado, siguió una etapa de DA mesofílica la cual, como se ha mencionado, más que representar una condición de estrés pudo haber presentado condiciones favorables (temperatura y disponibilidad de sustrato) que permitieron el recrecimiento de los microorganismos sobrevivientes. Al respecto, los resultados de Magos (2013) sobre las cinéticas de inactivación/recrecimiento de coliformes fecales y *Salmonella* en lodos pretratados a 80°C durante 1 hora y almacenados hasta 36 horas a 35°C, confirmaron el fenómeno de recrecimiento de ambos microorganismos, pasando de concentraciones <2 log₁₀ NMP/gST hasta concentraciones de 9 log₁₀ NMP/gST. Lo anterior sugiere que el pretratamiento térmico a 80°C durante 1 hora, por sí solo, es ineficiente para inactivar permanentemente a las enterobacterias en estudio; más aún, puede favorecer su paso al estado VBNC. Debido a esto, en el presente trabajo se optó por emplear una etapa de DAT posterior al tratamiento térmico del lodo ya que, de acuerdo con la hipótesis, al emplear dos condiciones de estrés de manera consecutiva, se lograría la inactivación efectiva tanto de coliformes fecales como de *Salmonella*.

En este sentido, a pesar de que la calidad de los biosólidos producidos por el proceso PT+DAT seguía cumpliendo con los parámetros más estrictos (Clase A), el fenómeno de recrecimiento fue confirmado, aunque exclusivamente para el caso de coliformes fecales. Aún así, la concentración promedio alcanzada durante el fenómeno de recrecimiento (2.1 log₁₀ NMP/gST) fue mucho menor a la reportada en trabajos como los de Martínez (2009) y Magos (2013), que llegaron a reportar concentraciones de

coliformes fecales de hasta $5 \log_{10}$ y $9 \log_{10}$ NMP/gST, respectivamente, lo cual demuestra que, aunque el tratamiento PT+DAT no logró la completa inactivación de coliformes fecales, ciertamente impidió un recrecimiento excesivo de dichos microorganismos, ayudando así a mantener la calidad microbiológica (Clase A) de los biosólidos producidos.

Por otro lado, el fenómeno de recrecimiento de coliformes fecales después del tratamiento térmico (80°C durante 1 hora) demuestra que no logró su completa inactivación. Una posible explicación puede basarse en la concentración de sólidos totales (68 g/L o 6.8%) presentes en el LP, si se consideran los resultados de Yin *et al.* (2016), quienes reportaron que, para la completa inactivación de los microorganismos, existe una relación lineal entre el tiempo del tratamiento térmico y la concentración de sólidos. Los autores lograron la inactivación de coliformes fecales y *Salmonella* con 60 minutos de tratamiento térmico (70°C) cuando trabajaron a una concentración de 1% de sólidos totales; sin embargo, para una concentración de 12% de sólidos totales, se requirieron 100 minutos de tratamiento. Esto se explica, según Yin *et al.* (2016), porque en los tratamientos térmicos moderados la concentración de sólidos totales en el lodo tiene un efecto significativo en la inactivación de los patógenos ya que el lodo, al ser un fluido no Newtoniano, puede mostrar variaciones en su viscosidad aparente, afectando así la transferencia de energía en la matriz y su correcto mezclado.

Otra posible explicación al recrecimiento observado en la etapa DAT del proceso PT+DAT puede ser que, durante el PT, las bacterias del grupo de coliformes fecales fueron inducidas a un estado VBNC debido a las condiciones de estrés por el efecto de la temperatura (80°C). Sin embargo, al pasar a las condiciones ambientales de la etapa DAT, la temperatura de operación del digester (55°C) resultó ser más permisible para su desarrollo por lo que, los coliformes fecales sobrevivientes al PT pudieron encontrar una mayor disponibilidad de sustrato a un TRH de 10 días, los cuales son factores abióticos condicionantes por los cuales los microorganismos pueden desarrollarse o perecer (Bonjoch *et al.*, 2009). Sin embargo, en contraste con los resultados de este trabajo, Rubio-Loza & Noyola (2010) no observaron dicho recrecimiento, empleando dos sistemas conformados cada uno por dos etapas (digester termofílico acidogénico seguido de digester metanogénico mesofílico y digester termofílico acidogénico seguido

de digester metanogénico termofílico) para el tratamiento de una mezcla de lodo primario y secundario. En dicho trabajo, el digester termofílico acidogénico operado a 55°C reportó una concentración menor a 3 log₁₀ NMP/gST de coliformes fecales y la ausencia de *Salmonella*, condiciones que se mantuvieron en los biosólidos producidos en la etapa subsecuente de DA, tanto del digester metanogénico mesofílico como del digester metanogénico termofílico, lo cual podría sugerir que el pretratamiento térmico/biológico (digester termofílico acidogénico con 3 días de TRH) es más eficiente que el PT de 1 hora exclusivamente, a pesar de trabajar a temperaturas mayores a los 55°C debido a la combinación de factores como la temperatura, el TRH y la competencia entre microorganismos.

5.4.4 Comparativa entre procesos

Recapitulando, los tres procesos evaluados en este trabajo (DAM+TA, DAT y PT+DAT), al final de cada proceso y después del periodo de almacenamiento (72 horas) se lograron producir biosólidos Clase A, de acuerdo con los parámetros bacteriológicos establecidos en la normativa mexicana por lo que, en principio, y de acuerdo con las condiciones empleadas en este estudio, todos los procesos evaluados cumplen con el propósito inicial. Sin embargo, algunas consideraciones deben ser señaladas. El proceso DAM+TA enfrenta, adicional a los problemas económicos relacionados con el coste de los reactivos y su transporte, la desventaja de requerir neutralizar las condiciones alcalinas de los biosólidos previo a su aprovechamiento agrícola, ya que se ha reportado que el elevado pH favorece la migración de los metales pesados hacia el suelo y los cultivos (Brown *et al.*, 1997), así como disminuye el valor fertilizante debido a la pérdida de carbón orgánico y nitrógeno (Silva-Leal *et al.*, 2013). Un atenuante a este inconveniente sería su aplicación en suelos ácidos lo cual, sin embargo, limita el aprovechamiento de este tipo de biosólidos.

Por su parte, los procesos DAT y PT+DAT, se presentan como preferibles ya que además de producir biosólidos Clase A, de acuerdo con los resultados presentados logran una mayor producción de metano en comparación con el digester DAM. Además, Svennevik *et al.* (2020) reportaron que los biosólidos producidos mediante DA termofílica

y mediante DA mesofílica con un pretratamiento térmico (160°C) mostraron, después de tres días, concentraciones menores a $3 \log_{10}$ NMP/gST de *E. coli* después de haber sido recontaminados con esa bacteria, indicando que estos procesos muestran cierta robustez para mantener la calidad microbiológica de los biosólidos producidos. Sin embargo, aunque algunos autores mencionan que es mejor emplear el tratamiento térmico después del proceso de DA, ya que de esta manera se favorece la reducción en la concentración de bacteriófagos y *E. coli* (Astals *et al.*, 2012; Ruíz-Hernando *et al.*, 2012), el postratamiento térmico puede acarrear algunos inconvenientes, como la liberación de materia orgánica capaz de generar problemas posteriores en el manejo de los lodos debido a la producción de olores ofensivos. Además, en el trabajo de Svennevik *et al.* (2020) se encontró que el postratamiento térmico favoreció la recolonización de *E. coli* en los biosólidos recontaminados debido a la falta de un consorcio microbiano que ejerciera una competencia por el sustrato disponible por lo que, para contrarrestar los efectos adversos del postratamiento térmico, es necesario mezclar los biosólidos con composta.

5.4.5 Presencia de falsos positivos de *Salmonella* spp.

Además del fenómeno de recrecimiento observado durante esta etapa del trabajo experimental, otro fenómeno que requiere una mención especial es la aparición de falsos-positivos durante el proceso de identificación de *Salmonella* (Tabla 5.7). Como se ha mencionado anteriormente, durante el proceso de cuantificación de *Salmonella* se observó en las muestras analizadas la presencia de tubos positivos en la serie del NMP, considerados así por el vire a color naranja intenso de acuerdo con lo especificado en la normativa mexicana (ver apartado 4.7). Sin embargo, una gran parte de estos tubos presuntamente positivos tuvieron que ser descartados debido a que, como marca la NOM-004-SEMARNAT-2002, en el paso de confirmación de los resultados obtenidos en la serie del NMP, la frecuencia de aislamiento (número de muestras que presentaron crecimiento bacteriano en los medios de cultivo selectivos tras su inoculación con los tubos presuntamente positivos en la serie del NMP, en relación con el número total de muestras) fue considerablemente baja en las muestras analizadas para las distintas

etapas de cada proceso, excepto para las muestras de LP y DAM en las cuales siempre se observó crecimiento. La frecuencia de aislamiento fue menor al 40% en las muestras DAT y después de su almacenamiento (A), en ambos arreglos PT+DAT y DAT. La frecuencia fue nula para la muestra PT, y para las muestras TA y A del proceso DAM+TA. Adicionalmente, como se muestra en la Tabla 5.7, la presencia de *Salmonella* fue descartada definitivamente pues, con base en la prueba API-20E, recomendada como prueba confirmatoria por la NOM-004-SEMARNAT 2002, se demostró que el crecimiento correspondía a otros microorganismos, como *Pseudomonas aeruginosa* para el caso del proceso DAT y PT+DAT, *Proteus mirabilis* y *Enterobacter cloacae* para el 40% de las muestras del LP, y *Klebsiella pneumoniae* para el caso del 20% de las muestras DAM del proceso DAM+TA. Estos resultados se relacionan en cierta manera con los reportados previamente en el apartado 5.3 ya que el análisis de la composición microbiana de una muestra puntual del LP, DAM y DAT, mostró la ausencia de *Salmonella* y la presencia de otras bacterias entéricas de interés sanitario.

Los resultados presentados en la Tabla 5.7, muestran que el crecimiento observado en los medios selectivos (agar XLD y agar sulfito bismuto) empleados en la etapa de aislamiento (frecuencia de aislamiento) fue considerablemente bajo para la mayoría de las muestras. Además, en la Tabla 5.7 se observa que la identificación bioquímica de las bacterias que llegaron a crecer en los medios selectivos (frecuencia de identificación) permitieron descartar la presencia de *Salmonella* en la mayoría de los casos. Estos resultados resaltan, por un lado, la importancia crucial de la etapa de confirmación durante la determinación de *Salmonella*, por lo que se considera que la NOM-004 debería ser más clara al considerarla como una etapa indispensable para el adecuado reporte de resultados y para el reúso adecuado de sólidos tratados que no impliquen un riesgo para la salud ambiental y humana. Por otro lado, los resultados presentados en la Tabla 5.7 también resalta las desventajas de los métodos dependientes de cultivo para la determinación de *Salmonella* ya que, para encontrar resultados precisos y confiables, es esencial llevar a cabo, además de la etapa de pre-enriquecimiento y cuantificación, la etapa de confirmación (que incluye el proceso de aislamiento e identificación bioquímica) lo cual, para el caso de la metodología sugerida en la NOM-004 SEMARNAT 2002, llega a tardar, como mínimo, cinco días, además de incrementar su costo.

Tabla 5.7. Frecuencia de aislamiento en medios selectivos e identificación bioquímica de *Salmonella* spp. en las muestras presuntamente positivas de las diferentes etapas de cada proceso.

Parámetro	LP	Proceso DAM+TA			Proceso DAT		Proceso PT+DAT		
		DAM	TA	A	DAT	A	PT	DAT	A
Frecuencia de aislamiento en medios selectivos ^a (%)	100	100	0	0	20	40	0	40	20
Frecuencia de identificación mediante prueba API-20E ^b (%)	60	80	ND ^c	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^a Valores con respecto al número de muestras analizadas (n=10)

^b Valores con respecto al número de muestras donde si se observó el aislamiento de bacterias en los medio selectivos

^c ND = no detectable

Una posible alternativa a esta situación podría ser el emplear otra técnica de cuantificación, como la técnica de filtración a través de membrana ya que, como señala en su estudio López *et al.* (2019), esta técnica es más sensible y específica que la técnica del NMP. Además, es importante considerar que, en la técnica del NMP, el uso de medios de enriquecimiento inicial y enriquecimiento selectivo posterior que señala la normativa mexicana puede dar lugar a la sobre estimación del número de células viables ya que permiten la recuperación de células dañadas o estresadas que, en la muestra original, sería poco probable que subsistieran (Sidhu & Toze, 2009; Van Frankenhuyzen *et al.*, 2011).

Por último, pero no menos importante, los resultados reportados en la Tabla 5.7 dejan de manifiesto, como lo han confirmado otros estudios (Wéry *et al.*, 2008; Bonjoch *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012; Kjerstadius *et al.*, 2013; Flemming *et al.*, 2017; Qi *et al.*, 2019), que en los biosólidos es posible encontrar otros patógenos de importancia sanitaria como *Shigella*, *Yersinia*, *Clostridium perfringens*, *Campilobacter jejuni* y *Enterococcus*, los cuales pudieran llegar a representar un problema de salud ya que no están contemplados en la normativa mundial ni en particular en la mexicana. Su

prevalecía se explica debido a que dichos microorganismos siguen diferentes cinéticas de inactivación en comparación con los microorganismos convencionalmente monitoreados en las normas (coliformes fecales, *E. coli* y *Salmonella* spp.).

5.5 Efecto del PMA para la determinación de células viables

El criterio de la presencia o ausencia de crecimiento de los microorganismos patógenos e indicadores en medios de cultivo específicos es convencionalmente empleado para determinar la calidad microbiológica de los biosólidos. Sin embargo, aunque este es un enfoque válido, en la práctica dicho criterio plantea un panorama incompleto pues, como se ha mencionado previamente, la incapacidad de un microorganismo para crecer en un determinado medio de cultivo, no es un indicador determinante de que el microorganismo en cuestión no se encuentre presente y viable. Es por esto que, en el presente trabajo, además de las técnicas convencionales que emplean medios de cultivo, se aplicó la técnica del PMA-qPCR, con la que se determina la viabilidad bacteriana al asociar dicho parámetro con la integridad de su membrana. Con este criterio, se evaluó la capacidad de los diferentes procesos de producción de biosólidos, tanto para lograr la inactivación efectiva de *E. coli* y *Salmonella*, así como para inducir a dichos microorganismos al estado VBNC. Para ello se empleó la técnica qPCR, sola y asociada con un pretratamiento con PMA, y la técnica convencional del NMP, ya que con estas técnicas se puede determinar la concentración de las células totales (qPCR), de las células viables (PMA-qPCR) y de las células cultivables (NMP).

5.5.1 Determinación de *Salmonella* spp.

No fue posible realizar la cuantificación de *Salmonella* empleando las técnicas de qPCR y PMA-qPCR debido a que, en todas las muestras analizadas correspondientes a las diferentes etapas de los procesos estudiados, la reacción de PCR no produjo señal de amplificación del gen *hilA* (Ver Anexo II), lo que sugiere la ausencia de dicho microorganismo en las muestras analizadas. Estos resultados se corresponden con los reportados previamente en el apartado 5.4.5 ya que, como se muestra en la Tabla 5.7, la presencia de *Salmonella* fue descartada, mediante pruebas bioquímicas, en todas las muestras excepto dos de ellas, LP y DAM, muestras para las cuales se reportó una

concentración promedio de *Salmonella* de 5.5 y 4.2 log₁₀ NMP/gST, respectivamente. Esta discrepancia entre los métodos independientes de cultivo (qPCR y PMA-qPCR) y el método dependiente de cultivo (NMP), con confirmación por prueba bioquímica para la cuantificación de *Salmonella* spp., se puede explicar debido a que la presencia de esas bacterias en las muestras LP y DAM estuvo por debajo del límite de detección de las técnicas moleculares (1x10² UFC/ml), valor que se determinó empíricamente mediante la construcción de la curva estándar (Ver Anexo II).

En este sentido, otros trabajos similares han reportado valores de límite de detección para la técnica de qPCR de 1x10³-1x10⁴ copias/g muestra (Maynaud *et al.*, 2016) y 10⁴ copias/mL (Ruike *et al.*, 2016). Además, en concordancia con los resultados para la cuantificación de *Salmonella* por qPCR reportados en este trabajo, al determinar la cantidad de *Salmonella* y otros patógenos en diferentes matrices propias del tratamiento de aguas residuales, Wéry *et al.* (2008) también reportaron que la concentración de *Salmonella* determinada mediante qPCR se encontró por debajo del límite de detección (120 copias del gen/mL). Por otro lado, los trabajos relacionados a la detección de *Salmonella* en matrices complejas mediante la técnica de PCR (Wagner *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2013) han realizado la inoculación de la muestra con cultivo puro, con la finalidad de facilitar la detección del microorganismo por lo que, para futuras investigaciones dentro del grupo de trabajo, valdría la pena considerar este enfoque (inoculación de la muestra) con la finalidad de lograr cuantificar la concentración de *Salmonella* mediante qPCR y así determinar el efecto de los tratamientos evaluados.

Otro factor que pudo influir para que se pudiera lograr la cuantificación de *Salmonella* al emplear los métodos de cultivo, pero no así con la técnica de qPCR, es que, en apego al procedimiento de la norma, previo al paso de cuantificación de *Salmonella* mediante la técnica del NMP, se empleó un paso de enriquecimiento de la muestra con el propósito de facilitar la detección del patógeno que se suele encontrar en bajas densidades. Vale la pena señalar que, este paso de enriquecimiento, aunque facilita la detección de *Salmonella*, ha sido señalado por algunos autores (Sidhu & Toze, 2009; Van Frankenhuyzen *et al.*, 2011) como una etapa que puede originar una sobreestimación de la concentración del microorganismo en cuestión debido a que también favorece la recuperación de células dañadas o estresadas.

5.5.2 Determinación de *E. coli*

Al contrario de lo que ocurrió con *Salmonella*, la cuantificación de *E. coli* en las muestras evaluadas fue posible empleando las técnicas de qPCR, PMA-qPCR y NMP, lo cual permitió, como se muestra en la Tabla 5.8, determinar la concentración de células totales, viables y cultivables en cada etapa de los diferentes procesos, así como identificar si el tratamiento de las muestras con PMA ejerció o no el efecto deseado. Para esto se comparó, mediante la prueba t pareada, los valores de Ct de las muestras (n=5) tratadas y sin tratar con PMA (Figura 5.7), correspondientes a cada etapa de los diferentes procesos. Además, de acuerdo con lo establecido en el manual de Información del Producto PMA (Biotum, USA), se determinaron los valores de ΔCt y del porcentaje de células viables presentes en cada muestra (Tabla 5.8).

Tabla 5.8. Determinación del efecto del PMA y del porcentaje de células viables de *E. coli* para cada muestra.

Parámetro	LP	Proceso DAM+TA			Proceso DAM+TA		Proceso PT+DAT		
		DAM	TA	A	DAT	A	PT	DAT	A
Ct sin PMA	25.70 (± 0.68)	26.80 (± 0.59)	28.31 (± 0.52)	27.15 (± 0.67)	28.50 (± 0.43)	29.10 (± 0.66)	26.11 (± 1.12)	33.23 (± 0.87)	32.24 (± 2.48)
Ct con PMA	26.55 (± 0.64)	27.59 (± 0.66)	30.08 (± 3.52)	27.76 (± 0.57)	29.28 (± 0.74)	29.69 (± 0.42)	26.72 (± 1.11)	33.79 (± 0.84)	33.36 (± 2.10)
p-value^a	0.0035	0.025	0.3011	0.1732	0.0075	0.0332	0.0011	0.0321	0.056
ΔCt^b	0.86	0.79	1.77	0.61	0.78	0.60	0.61	0.56	1.11
Viabilidad^c (%)	55	58	29	66	58	66	66	68	46

^a Valor de p de acuerdo con el análisis estadístico prueba t pareada con un valor de significancia de $p < 0.05$

^b $\Delta Ct = Ct_{(muestra\ sin\ tratar\ con\ PMA)} - Ct_{(muestra\ tratada\ con\ PMA)}$

^c Para el cálculo del porcentaje de células viables en cada muestra se emplearon las siguientes formulas:

-Grado de reducción del PMA= $2^{-\Delta Ct}$

-Porcentaje de viabilidad= $100 / \text{Grado de reducción del PMA}$

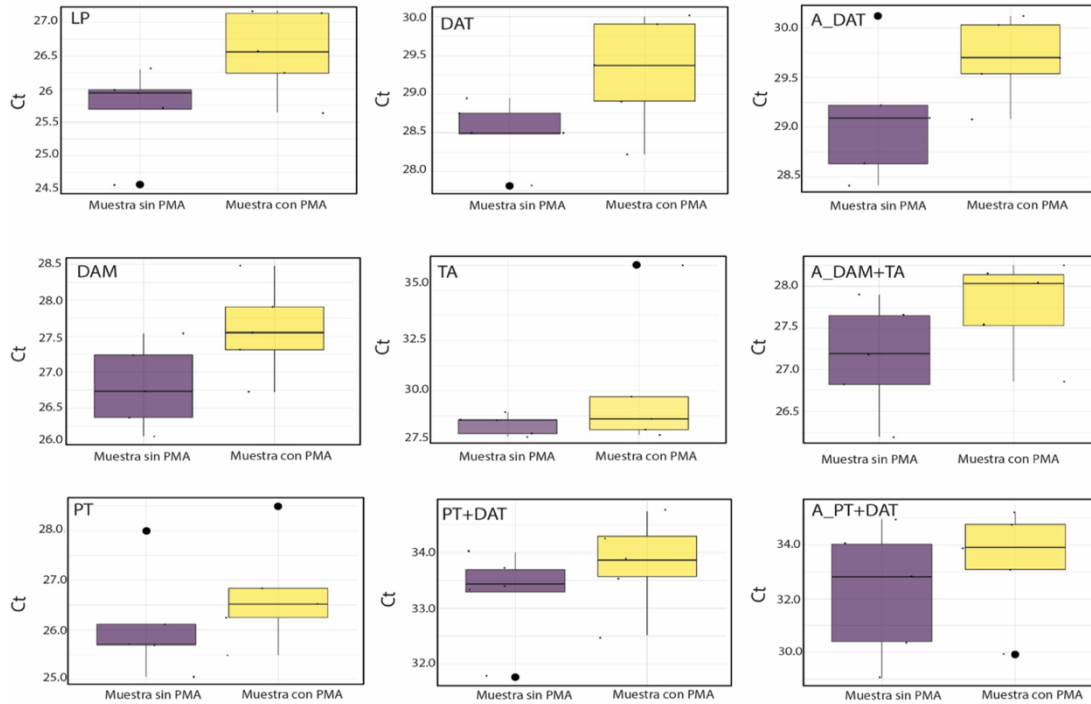


Figura 5.7. Distribución de los valores puntuales de Ct de las muestras (n=5), sin tratar (morado) y tratadas con PMA (amarillo).

Los resultados presentados en la Tabla 5.8 muestran que, conforme a lo esperado, los valores promedio de Ct fueron mayores en las muestras tratadas con PMA que en las muestras que no recibieron el tratamiento, lo cual significa que la cantidad de células viables fue menor a la cantidad de células totales. Sin embargo, los valores de ΔCt que representan la diferencia de Ct entre las muestras tratadas y sin tratar con PMA (ΔCt), estuvieron por debajo de lo esperado, reportando valores menores a 1 en la mayoría de los casos. Pese a esto, el análisis estadístico (prueba t pareada) confirmó que existió un efecto significativo ($p < 0.05$) del PMA en todas las muestras excepto en las muestras TA, A del proceso DAM+TA y A del proceso PT+DAT.

Adicionalmente, en todas las muestras se reportó un porcentaje de viabilidad mayor al 50%, excepto para la muestra TA, en la cual se reportó un 29% de viabilidad y en la muestra A correspondiente al proceso PT+DAT, con 46%. Cabe señalar que el valor del porcentaje de viabilidad tanto para la muestra TA (29%) como para la muestra PT (66%) resultaron inesperadamente altos, ya que se esperaba un porcentaje de viabilidad

cercano a cero considerando la agresividad de los tratamientos, lo cual sugiere que, o los tratamientos (TA y PT) no son efectivos para reducir la cantidad de células viables, es decir, que logran inducir en el *E. coli* al estado VBNC o, más probablemente, que estos resultados están sobreestimando la cantidad de células viables debido a que el tratamiento con PMA no permitió observar el efecto deseado. A pesar de que el análisis estadístico indica que, en la mayoría de las muestras, el PMA ejerció un efecto significativo para la identificación de células viables, los resultados presentados en esta investigación, donde el valor de ΔCt para todas las muestras fue menor a 1, concuerdan con lo comentado por Condy *et al.* (2019) quienes, en su trabajo de revisión, mencionan que la completa remoción del ADN proveniente de células no viables sigue siendo un reto sin superar para los tratamientos con PMA, particularmente cuando se trabaja con muestras complejas (ambientales, alimentos, etc).

Por otro lado, el ΔCt tan pequeño (menor a 1) de las muestras obtenidas a la salida de los digestores de cada proceso (DAM, DAT y PT+DAT) podría explicarse debido a que el ADN procedente de células no viables fue degradado rápidamente por la alta actividad metabólica microbiana dentro de los digestores (Mayaud *et al.*, 2014; Lebuhn *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2011). En el caso de la muestra PT, el bajo valor de ΔCt hace evidente la necesidad de adecuar el protocolo de tratamiento para mejorar el efecto del PMA debido a la evidente sobreestimación de células viables. Esta afirmación se basa en que los tratamientos térmicos son especialmente efectivos contra las bacterias Gram negativas pues favorecen la permeabilidad de las membranas celulares, así como la desnaturalización de las proteínas de las membranas y del citoesqueleto (Jiang *et al.*, 2020). En este sentido, otros estudios en los que trabajaron con células en cultivo han probado la efectividad del tratamiento térmico (80°C) para dañar las membranas de celulares ya que, entre muestras tratadas y sin tratar con PMA en una matriz “limpia”, se reportó un valor de ΔCt de 8 (Nocker *et al.*, 2007). Caso similar es el de la muestra TA, en la cual también se considera factible una sobreestimación de células viables debido a la alta capacidad de desinfección de los TA, pues es bien sabido que el pH alcalino (mayor a 11) propicia la saponificación de los lípidos de las membranas celulares, provocando su hidrólisis y, por ende, la liberación del material intracelular (Ruíz-Hernando *et al.*, 2014).

Por otro lado, gracias a la implementación de una curva estándar (ver Anexo II), se logró la cuantificación de células totales, viables y cultivables de *E. coli* en las muestras correspondientes a las diferentes etapas de cada proceso.

Para el LP se reportó una concentración promedio de 6.1 y 5.8 log₁₀ UFC/mL de células totales (qPCR) y de células viables (PMA-qPCR) respectivamente, así como una concentración promedio de 4.7 log₁₀ NMP/gST de células cultivables (NMP). Estos resultados se asemejan a los reportados por Ruike *et al.*, (2016) quienes reportaron concentraciones de *E. coli* entre 5-7 unidades logarítmicas para muestras de lodo primario determinadas mediante qPCR, PMA-qPCR y NMP, donde la diferencia entre células totales y células viables, así como de células viables y células cultivables, no fue mayor a 1 unidad logarítmica. En contraste con los resultados reportados en este trabajo, Li *et al.*, (2014) reportaron, para muestras de lodo primario, concentraciones de *E.coli* viable más bajas, de 4.2 log₁₀ copias/mL de muestra.

Tabla 5.9. Concentración promedio de *E. coli* en las distintas etapas del proceso DAM+TA.

Técnica	<i>E. coli</i> Log ₁₀				R1 ^b	R2 ^c	(R1+R2) ^d	In ^e
	LP ^a	DAM ^a	TA ^a	A ^a				
qPCR ^f	6.1 ± 0.4	5.8 ± 0.2	5.3 ± 0.4	5.7 ± 0.3	0.3	0.5	0.8	0.4
PMA-qPCR ^f	5.8 ± 0.4	5.5 ± 0.2	4.8 ± 0.1	5.5 ± 0.3	0.3	0.7	1.0	0.7
NMP ^g	4.7 ± 0.5	2.6 ± 1.2	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	2.1	2.5	4.6	-0.1

^a n=5

^b Reducción después de la etapa DAM en unidades log = (LP-DAM)

^c Reducción después de la etapa TA en unidades log = (DAM-TA)

^d Reducción después de los dos tratamientos en unidades log = (LP-DAM) + (DAM-TA)

^e Incremento después del almacenamiento en unidades log = (A-TA)

^f Concentración expresada como el logaritmo de unidades formadoras de colonias/ml (Log UFC/ml)

^g Concentración expresada como el logaritmo de número más probable/ g sólidos totales (Log NMP/gST)

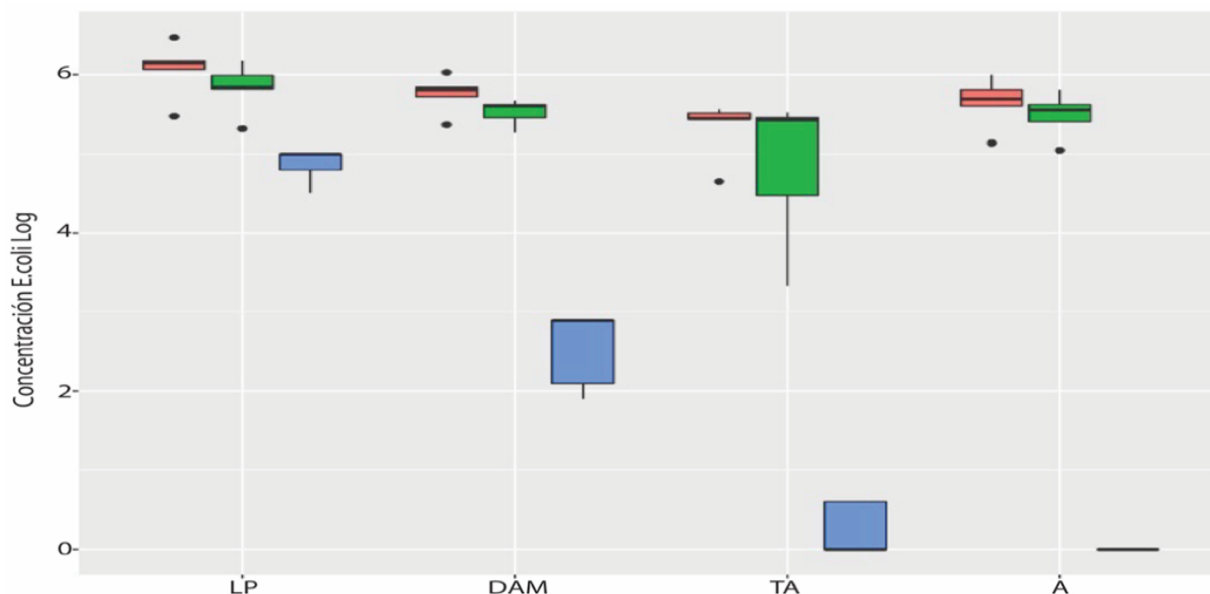


Figura 5.8. Box plot que muestra la concentración (\log_{10}) de *E. coli* reportada como UFC/mL para la técnica de qPCR (rojo) y PMA-qPCR (verde), y como NMP/gST para la técnica NMP (azul) en las distintas etapas del proceso DAM+TA. El total de muestras analizadas para cada parámetro bacteriológico fue de $n=5$.

Con respecto al proceso DAM+TA, las concentraciones de *E. coli* a través de las distintas etapas de dicho proceso se pueden observar en la Tabla 5.9 y en la Figura 5.8. En la etapa DAM se reportó una concentración promedio de 5.8 y 5.5 \log_{10} UFC/mL de células totales y de células viables, respectivamente, y una concentración promedio de 2.6 \log_{10} NMP/gST de células cultivables. Posteriormente, en la etapa TA, se reportó una concentración promedio de 5.3 y 4.8 \log_{10} UFC/mL de células totales y de células viables, y una concentración promedio de 0.1 \log_{10} NMP/gST de células cultivables. Finalmente, en la etapa de almacenamiento (A), la concentración promedio de células totales y de células viables fue, respectivamente, de 5.7 y 5.5 \log_{10} UFC/mL, y la concentración de células cultivables fue de 0.0 \log_{10} NMP/gST.

En relación a la capacidad de inactivación de las distintas etapas del proceso DAM+TA, con base en las concentraciones antes mencionadas, se encontró que hubo una reducción de 0.3 unidades logarítmicas de células totales y viables, así como a una reducción, de 2.1 unidades logarítmicas de células cultivables, después de la etapa DAM. Dichos resultados se contraponen en cierta medida con lo reportado por Ruike *et al.*

(2016) quienes reportaron una mayor reducción de células totales (1.12-1.96 log₁₀) y de células viables (0.13-1.98 log₁₀) de *E. coli* en sistemas de tratamiento de residuo de ganado y de comida procesada mediante DAM. Sin embargo, la reducción de células cultivables de *E. coli* (1.32-2.21 log₁₀) reportadas por dichos autores se asemejan a las reportadas en este trabajo. Debido a esto, la diferencia entre los valores de reducción de células viables reportadas por Ruike *et al.* (2016) y los reportados en este trabajo se explican, no tanto por el efecto del proceso de DAM, sino por las diferentes condiciones de tratamiento de las muestras con PMA, ya que dichos autores utilizaron dos periodos de fotoactivación y, además, diluyeron sus muestras hasta una concentración menor a 2 gST/L.

En particular, los resultados obtenidos después de la etapa TA no son los esperados en cuanto a la viabilidad de las células de *E. coli*, considerando las condiciones extremas que se aplican en este tratamiento. En este sentido, en ese tratamiento se registró tan solo una reducción de 0.7 unidades logarítmicas de células viables, mientras que la reducción fue de 2.5 unidades logarítmicas para las células cultivables. En la etapa de almacenamiento (A) del proceso DAM+TA, se reportó un incremento de 0.7 unidades logarítmicas en la concentración de células viables, y la concentración de células cultivables cayó 0.1 unidades logarítmicas. El proceso DAM+TA mostró una reducción significativa de la concentración de células cultivables a través de las distintas etapas del proceso y, sin embargo, estadísticamente (ANOVA de una vía) no se observó una diferencia significativa ($p=0.0568$) en la concentración de células viables correspondientes a las muestras de las distintas etapas del proceso. Es claro que este resultado no significa que el proceso DAM+TA es incapaz de reducir la concentración de células viables de *E. coli*. Por el contrario, corrobora las limitaciones de la reacción del PMA en matrices complejas, como se ha mencionado anteriormente. En este caso se sobre estimó la concentración de células viables, debido a múltiples factores, como la turbiedad de la muestra, a que se aplicó un solo periodo de fotoactivación y, particularmente, a la alta concentración de células no viables que fueron inactivadas mediante el daño a las membranas celulares provocado por el TA (Ruíz-Hernando *et al.*, 2014).

Los resultados relacionados a la capacidad de inactivación de *E. coli* del proceso DAT (Tabla 5.10 y Figura 5.9) mostraron que las concentraciones promedio de células totales y de células viables en el lodo tratado fue de 5.3 y 5.1 log₁₀ UFC/mL, mientras que la concentración promedio de células cultivables fue de 1.0 log₁₀ NMP/gST. Por otro lado, en los resultados obtenidos durante la etapa de almacenamiento en el proceso DAT, se reportaron concentraciones promedio de células totales y de células viables de 5.1 y 4.9 log₁₀ UFC/mL, respectivamente, mientras que la concentración promedio de células cultivables fue de 0.8 log₁₀ NMP/gST.

Los resultados mencionados corresponden a una reducción, con respecto a lodo LP, de 0.8, 0.7 y 3.7 unidades logarítmicas de células totales, viables y cultivables después de la etapa DAT, respectivamente. En la etapa de almacenamiento, se reportó una reducción adicional de 0.2 unidades logarítmicas en los tres estados. El análisis estadístico (ANOVA de una vía) mostró una diferencia significativa en la concentración de células viables (p=0.0009), así como en la concentración de células cultivables, de las muestras DAT (p=0.0038) y A (p=0.0013) con respecto a la muestra LP.

Tabla 5.10. Concentración promedio de *E. coli* en las distintas etapas del proceso DAT.

Técnica	<i>E. coli</i> Log ₁₀			R1 ^b	In ^c
	LP ^a	DAT ^a	A ^a		
qPCR ^d	6.1 ± 0.4	5.3 ± 0.3	5.1 ± 0.3	0.8	-0.2
PMA-qPCR ^d	5.8 ± 0.4	5.1 ± 0.3	4.9 ± 0.3	0.7	-0.2
NMP ^e	4.7 ± 0.5	1.0 ± 0.7	0.8 ± 1.0	3.7	-0.2

^a n=5

^b Reducción después de la etapa DAT en unidades log = (LP-DAT)

^c Incremento después del almacenamiento en unidades log = (A-DAT)

^d Concentración expresada como el logaritmo de unidades formadoras de colonias/ml (Log UFC/ml)

^e Concentración expresada como el logaritmo de número más probable/ g sólidos totales (Log NMP/gST)

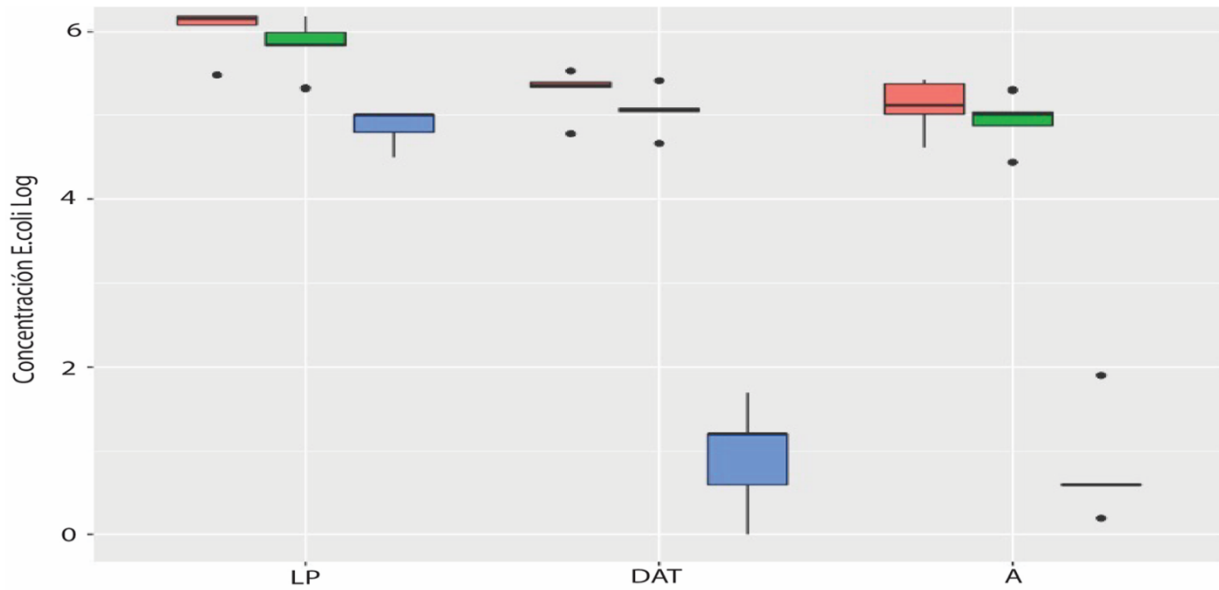


Figura 5.9. Box plot que muestra la concentración (log10) de *E. coli* reportada como UFC/mL para la técnica de qPCR (rojo) y PMA-qPCR (verde), y como NMP/gST para la técnica NMP (azul) en las distintas etapas del proceso DAT. El total de muestras analizadas para cada parámetro bacteriológico fue de n=5.

Estos resultados muestran que el proceso de DAT, en comparación con el proceso DAM, logró una mayor capacidad de reducción de células totales, viables y cultivables, *E. coli*. A pesar de que en el proceso DAT la concentración de células totales y viables de *E. coli* son muy similares, estos resultados concuerdan con los publicados por Ruike *et al.* (2016) quienes reportaron concentraciones de células totales y de células viables de *E. coli* muy próximas entre sí (igual o menor a 1 unidad logarítmica), lo cual se puede explicar, sin descartar las limitaciones del PMA, a la alta actividad metabólica de los microorganismos presentes durante el proceso de DA, que degradaron el ADN extracelular (Mayaud *et al.*, 2014; Lebuhn *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2011).

Además, otro aspecto a resaltar es que, en los resultados del presente estudio no se observó un incremento en la concentración de células viables ni cultivables de *E. coli* después de un periodo de almacenamiento, lo cual sugiere que, a pesar de que el tratamiento DAT puede inducir un estado VBNC, las condiciones de almacenamiento empleadas en esta investigación no favorecieron el recrecimiento de *E. coli*.

Para el proceso PT+DAT (Tabla 5.11 y Figura 5.10), en la etapa PT se reportaron concentraciones promedio de células totales y de células viables de *E. coli* de 6.0 y 5.8 log₁₀ UFC/mL, mientras que la concentración promedio de células cultivables fue de solo 0.2 log₁₀ NMP/gST. En la etapa DAT se reportaron concentraciones promedio de células totales y viables menores, de 3.9 y 3.8 log₁₀ UFC/mL, mientras que la concentración promedio de células cultivables se incrementó a 1.9 log₁₀ NMP/gST. En la etapa de almacenamiento del proceso PT+DAT, la concentración promedio de células totales y de células viables fue de 4.2 y 3.9 log₁₀ UFC/mL, mientras que la concentración promedio de células cultivables fue de 1.8 log₁₀ NMP/gST.

Tabla 5.11. Concentración promedio de *E. coli* en las distintas etapas del proceso PT+DAT.

Técnica	<i>E. coli</i> Log ₁₀				R1 ^b	R2 ^c	(R1+R2) ^d	ln ^e
	LP ^a	PT ^a	DAT ^a	A ^a				
qPCR ^f	6.1 ± 0.4	6.0 ± 0.4	3.9 ± 0.3	4.2 ± 0.8	0.1	2.1	2.2	0.3
PMA-qPCR ^f	5.8 ± 0.4	5.8 ± 0.3	3.8 ± 0.4	3.9 ± 0.8	0.0	2.0	2.0	0.1
NMP ^g	4.7 ± 0.5	0.2 ± 0.2	1.9 ± 1.2	1.8 ± 1.0	4.5	-1.7	2.8	-0.1

^a n=5

^b Reducción después de la etapa PT en unidades log = (LP-PT)

^c Reducción después de la etapa DAT en unidades log = PT-DAT)

^d Reducción después de los dos tratamientos en unidades log = (LP-PT) + (PT-DAT)

^e Incremento después del almacenamiento en unidades log = (A-DAT)

^f Concentración expresada como el logaritmo de unidades formadoras de colonias/ml (Log UFC/ml)

^g Concentración expresada como el logaritmo de número más probable/ g sólidos totales (Log NMP/gST)

Las concentraciones reportadas en la Tabla 5.11 indican una reducción, después de la etapa PT, muy limitada, de 0.1, 0.0 y 4.5 unidades logarítmicas de células totales, viables y cultivables, respectivamente. Por otro lado, después de la etapa DAT, se

observó un mayor efecto, al lograrse una reducción de 2.1 y 2.0 unidades logarítmicas de células totales y viables, respectivamente, mientras que la concentración de células cultivables reportó un incremento de 1.7 unidades logarítmicas. Finalmente, después de la etapa de almacenamiento, se observó un incremento de 0.3 y 0.1 unidades logarítmicas de células totales y viables, pero un decremento de 0.1 unidades logarítmicas en la concentración de células cultivables.

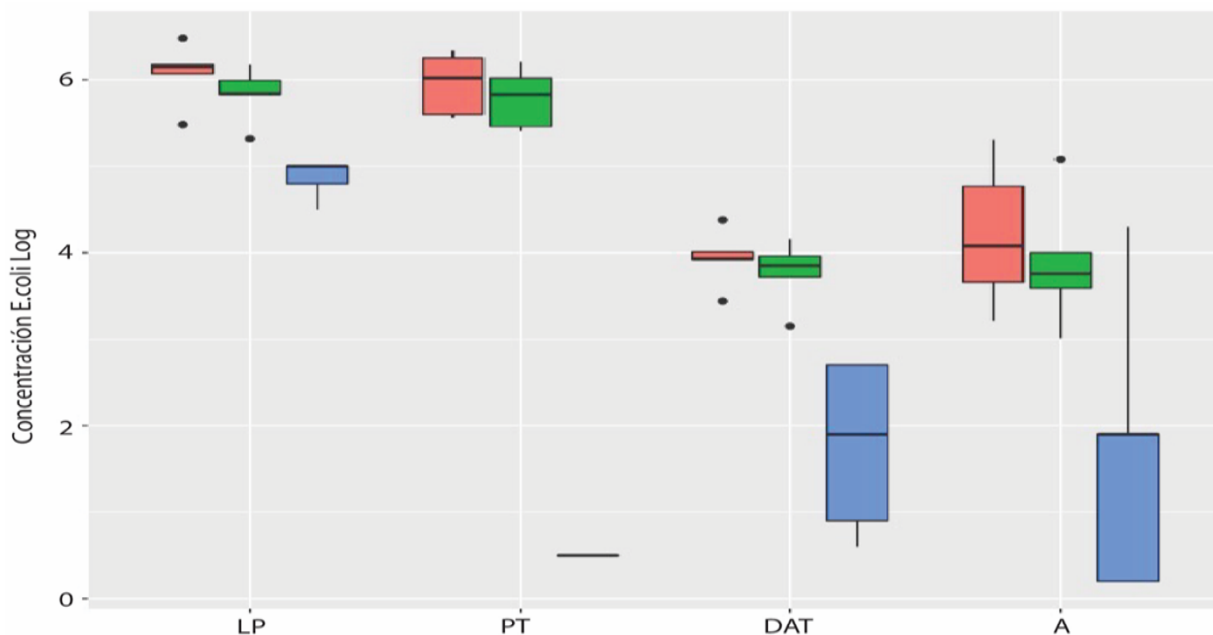


Figura 5.10. Box plot que muestra la concentración (log10) de *E. coli* reportada como UFC/ml para la técnica de qPCR (rojo) y PMA-qPCR (verde), y como NMP/gST para la técnica NMP (azul) en las distintas etapas del proceso PT+DAT. El total de muestras analizadas para cada parámetro bacteriológico fue de n=5.

La reducción de células cultivables resultó ser, en relación a la muestra LP, estadísticamente significativa en todas las etapas del proceso PT+DAT. Sin embargo, la reducción de células viables solo fue estadísticamente significativa para las etapas DAT ($p=0.00003$) y de almacenamiento ($p=0.00005$), pero no así en la etapa PT ($p=0.9987$), lo cual resultó inesperado pues se sabe que los tratamientos térmicos tienen una alta capacidad de desinfección debido a que favorecen la permeabilidad de las membranas celulares (Jiang *et al.*, 2020). Si bien se considera que los tratamientos térmicos pueden

inducir a una cierta proporción de todas las bacterias presentes en una muestra dada al estado VBNC (Pienaar *et al.*, 2016), ciertamente en la muestra PT se esperaba un conteo de células viables claramente inferior al de células viables de la muestra LP, como si se observa en la muestra DAT vs. la LP. Estos resultados confirman que existen limitaciones por superar al emplear la técnica de PMA en muestras con matrices complejas.

Al respecto y debido a que la sobreestimación de células viables en la muestra PT es muy posible, no se tiene una idea clara sobre la concentración real de dichas células. Sin embargo, en la siguiente etapa el tratamiento, en la etapa PT+DAT, se determinó un incremento ($1.9 \log_{10}$ NMP/gST) en la concentración de células cultivables en relación con la etapa previa (PT) de $0.2 \log_{10}$ NMP/gST. Este aumento sugiere que el recrecimiento observado en la etapa DAT se debe a que, en la etapa previa (PT), si hubo una inducción al estado VBNC del cual la células de *E. coli* pudieron salir (reactivarse y recrecer) debido a que las condiciones en el digestor termofílico fueron más permisibles considerando la disponibilidad de sustrato y el TRH del digestor.

Otro resultado muy importante observado en el proceso PT+DAT se relaciona con la reducción de células viables ya que, a pesar de que se considera que el efecto del PMA se vio afectado por diferentes factores (ver apartado 5.5.3), es en la etapa DAT de este proceso dónde se reportó la mayor reducción de células totales y viables, lo cual está en concordancia con lo planteado en la hipótesis de este trabajo ya que se consdieró que dos condicione de estrés aplicadas de manera consecutiva lograrían la mayor reducción de células viables

5.5.3 Limitaciones del PMA en matrices complejas

Los resultados reportados en el apartado 5.5.2 indican que, en la mayoría de las muestras analizadas, si se observó un efecto significativo del PMA, sin embargo, como se mencionó anteriormente, dicho efecto fue mucho menor al esperado. De acuerdo con lo reportado por otros autores, diversos son los factores que afectan la eficiencia del PMA y que pueden explicar los resultados reportados en este trabajo, en el sentido que, a pesar de haber sido su efecto estadísticamente significativo, no mostró los resultados esperados. El factor más relevante asociado a muestras ambientales que disminuyen el efecto del PMA es la misma matriz (Bae & Wuertz, 2009), pues la turbiedad de la muestra

o la concentración de sólidos impide la completa fotoactivación del reactivo, interfiriendo de este modo con la capacidad del método de PMA-qPCR para cuantificar específicamente células viables (Verma *et al.*, 2009). En este sentido, Li *et al.* (2014), trabajando con una suspensión de células muertas en PBS como control, confirmaron que las muestras ambientales evaluadas (agua residual y lodos) disminuyeron la actividad del PMA. Por su parte, Ruike *et al.* (2016) reportaron que, en muestras de lodos con una concentración de sólidos totales mayor a 3 g/L, el tratamiento con PMA no logró inhibir la amplificación del ADN de las células muertas. Resultados similares con respecto al efecto de la concentración de sólidos fueron reportados por Taskin *et al.* (2011), quienes demostraron que, en muestras de biosólidos, concentraciones menores a 2 gST/L no interfieren con la actividad del PMA. En este trabajo, a pesar de que estudios preliminares (Ortega-Cuenca, tesis de Maestría en preparación) sugerían que concentraciones de sólidos mayores a 2 gST/L disminuían el efecto del PMA, se optó por no diluir la muestra de lodos y trabajar a una concentración de sólidos ente mayores a 2 gST/L debido a que, al tratarse de una muestra problema donde la concentración de *Salmonella* era particularmente baja en algunas muestras, se consideró que dicha dilución podría interferir con el proceso de cuantificación. Si bien algunas investigaciones (Ruike *et al.*, 2016; Desneux *et al.*, 2016; Van Frankenhuyzen *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Taskin *et al.*, 2011) han trabajado con concentraciones de sólidos más bajas a las empleadas en este estudio, al analizar los resultados de cada trabajo se observa que la diferencia entre la cantidad de células totales y células viables se encuentra en un intervalo entre 0-2 unidades logarítmicas por lo que, para este trabajo, se hace evidente que la concentración de sólidos no pudo haber sido el único factor que disminuyó el efecto del PMA.

Otro de los factores que pueden afectar significativamente el efecto del PMA, y que podría explicar los resultados de este trabajo de no haber reportado una diferencia significativa entre células viables y no viables en las muestras TA y PT, es la relación que existía entre la cantidad de células viables y no viables presentes en la matriz. Al respecto, diversos estudios han reportado que entre mayor sea la proporción de células no viables, menor es la capacidad del PMA para suprimir su señal. Por ejemplo, al determinar el efecto de las células no viables sobre la cuantificación de las células

viabiles, Ruike *et al.* (2016) observaron que cuando se trabajó con una elevada concentración de células viabiles (3.1×10^6 células/mL) la cuantificación no se vio afectada hasta que se alcanzó una relación 1:1000 de células viabiles:células no viabiles. Por otro lado, cuando se trabajó a bajas concentraciones de células viabiles (5.1×10^4 cell/mL) observó la interferencia de las células muertas en la cuantificación de las células viabiles cuando la relación era 1:100 (células viabiles:células no viabiles). De forma similar, al comparar la capacidad para determinar la concentración de células viabiles en muestras de suelos inoculados con una mezcla de 10^2 células viabiles y 10^7 células no viabiles, Fu *et al.* (2020) concluyeron que el PMA no ejerció un efecto significativo para la determinación precisa de células viabiles debido a la elevada proporción de células no viabiles. Para superar lo anterior, en ese mismo trabajo, Fu *et al.* (2020) utilizaron un tratamiento “optimizado” con PMA que incluía, entre otros pasos, realizar una centrifugación con gradiente de densidad empleando el reactivo Percoll para reducir la proporción de células no viabiles. Dicho tratamiento, pionero en los protocolos que emplean PMA, permitió obtener concentraciones de células viabiles similares a las reportadas en el control positivos (células de *E. coli* inoculadas en agua), por lo que, para futuras investigaciones en este grupo de trabajo, podría ser conveniente el implementar dicho protocolo en muestras de lodos.

Otro factor bien reconocido está relacionado con el efecto de tamaño del amplicon (Taskin *et al.*, 2011; Contreras *et al.*, 2011; Barbau-Piednoir *et al.*, 2014) ya que se ha identificado que amplicones de menor tamaño (menores a 150 pares de bases) aumentan la sobreestimación de la cantidad de células viabiles, lo cual se explica debido a que el PMA guarda una relación estequiométrica con las bases púricas y pirimídicas del ADN, de una molécula de PMA por 4-5 pares de bases de ADN (Fittipaldi *et al.*, 2012). De esa manera, para que se inhiba la amplificación del ADN en una región específica, como por ejemplo la región que se pretende amplificar mediante PCR (amplicon diana), dicha región debe estar ocupada por el PMA. Sin embargo, como el PMA muestra una unión aleatoria al ADN, es decir, el PMA no se une a una región específica del ADN (Wilson *et al.*, 2004; Contreras *et al.*, 2011), mientras más grande sea el amplicon diana, más probable es que alguna región de ese amplicon este ocupado por el PMA. Adicionalmente, los resultados reportados por Contreras *et al.* (2011) sugieren que el

efecto del tamaño del amplicon también dependen de la intensidad del estrés a la que fueron sometidas las células ya que, en dicho estudio, se encontró que, a altas temperaturas (60-80°C), el ΔC_t para la determinación de *Vibrio anguillarum* y *Flavobacterium psychrophilum* al emplear amplicones cortos (menores a 329 pb) fue de 3.8 y 6.2 ciclos, respectivamente. Sin embargo, al emplear amplicones grandes (>618 pb) el ΔC_t fue de 13.3 y 17.6 ciclos para *Vibrio anguillarum* y *Flavobacterium*, respectivamente.

Otros factores que afectan la eficiencia del PMA están asociados a las condiciones de tratamiento ya que algunos autores han implementado, a la misma muestra, dos tratamientos consecutivos con PMA (después de la etapa de fotoactivación del primer tratamiento se procede a una nueva etapa de incubación de la muestra con PMA durante el segundo tratamiento), lo cual a sido sugerido como una forma de aumentar el rendimiento del método (Condy *et al.*, 2019). En este sentido, para la determinación de *Listeria monocytogenes* (Pan *et al.*, 2007) y *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (Kralik *et al.*, 2010), se ha reportado un incremento de 1 a 3 unidades en el ΔC_t cuando se han empleado dos tratamientos consecutivos de PMA.

Adicionalmente, también se ha reportado que el periodo de incubación de la muestra con PMA, así como la temperatura durante dicho periodo, afectan la eficiencia del PMA. En este sentido se ha reportado que, debido a que el PMA es muy selectivo, se dificulta que el reactivo permee la membrana de células con un daño moderado, por lo que un incremento en la temperatura durante el periodo de incubación favorece la permeabilidad de las membranas con un daño moderado, favoreciendo así el efecto del PMA (Emerson *et al.*, 2017; Fittipaldi *et al.*, 2012).

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

I. El porcentaje de reducción de sólidos volátiles (%RSV) de los tres procesos (DAM+TA, DAT y PT+DAT) no cumplió con el valor mínimo (38%) establecido en la NOM-004 SEMARNAT 2002 para evitar la atracción de vectores, por lo que, a pesar de que los resultados se asemejan a los de otros trabajos, se hace evidente que el alto contenido de sólidos fijos en el lodo de alimentación afecta el desempeño de los sistemas de digestión anaerobia.

II. La producción específica de metano presentó valores por debajo del intervalo señalado en la literatura para digestores de lodos. Además, el pretratamiento térmico, a pesar de haber aumentado la concentración de la Demanda Química de Oxígeno soluble (DQO_{soluble}), no favoreció la producción de metano ya que en el proceso PT+DAT se reportó una producción específica de metano (0.61 m³ N-CH₄/kg SV_{eliminado}) menor a la del proceso DAT (0.65 m³ CH₄/kg SV_{eliminado}).

III. La comunidad bacteriana del digester del proceso DAM fue significativamente diferente a la comunidad microbiana de la muestra LP y del digester del proceso DAT debido a que mostró una menor riqueza (Chao1) y diversidad (Índice Shannon-Wiener). En este sentido, los órdenes bacterianos más abundantes en la muestra DAM fueron *Bacteroidetes* sin clasificar y *Thermotogales*. En la muestra DAT, los órdenes bacterianos más abundantes fueron *Clostridiales* y *Bacteroidales*, y en la muestra LP *Bacterias* sin clasificar y *Clostridiales*.

IV. En los tres procesos evaluados en este trabajo (DAM+TA, DAT y PT+DAT), al final de cada proceso y después del periodo de almacenamiento (72 h) se lograron producir biosólidos Clase A de acuerdo con los parámetros bacteriológicos establecidos en la normativa mexicana (coliformes fecales y *Salmonella* spp.). Sin embargo, dos aspectos deben ser resaltadas para ser abordadas a profundidad en trabajos posteriores. Por un lado, la recurrente identificación de falsos-positivos en la serie de tubos del NMP durante la determinación de *Salmonella* y, por otro lado, el recrecimiento de coliformes

fecales durante la etapa de digestión en el proceso PT+DAT, lo que sugiere que el PT (80 °C durante 1h) no es eficaz para la completa inactivación de dichos microorganismos.

V. A pesar de que estadísticamente se reportó un efecto significativo del PMA, el valor de ΔCt para las muestras fue, generalmente, menor 1. Estos resultados, particularmente los de las muestras PT y TA, evidencian la necesidad de realizar adecuaciones al protocolo de determinación de viabilidad celular aplicando PMA, pues mediante el procedimiento empleado en este trabajo, se sobreestima la presencia de células viables en los lodos sometidos a esos tratamientos.

VI. Con la técnica de qPCR y PMA-qPCR no se logró determinar la presencia de *Salmonella* debido, aparentemente, a que la concentración de dicho microorganismo en las muestras se encontraba por debajo del límite de detección de la técnica. Por el contrario, si se pudo realizar la determinación de *E. coli* empleando las técnicas antes mencionadas. Fue en el proceso PT+DAT que se logró una mayor reducción de células totales (qPCR), viables (PMA-qPCR) y cultivable de *E. coli*.

VII. A pesar de que los resultados de los distintos procesos, particularmente los del arreglo DAM+TA, deben ser tomados con reservas debido al limitado efecto del PMA, es posible decir que se cumplió la hipótesis de este trabajo ya que la asociación de dos condiciones de estrés logró reducir en mayor medida la concentración de células totales, viables y cultivables. Sin embargo, con los resultados aquí reportados, vale la pena señalar que es muy factible que el pretratamiento térmico induzca el estado viable pero no cultivable (VBNC) en células de *E. coli*.

6.2 Recomendaciones

I. Debido a que el porcentaje de reducción de sólidos volátiles se puede deber a la elevada fracción de sólido fijos en el lodo de alimentación se recomienda realizar una prueba de digestión adicional de los biosólidos digeridos anaeróticamente (Opción 2, Anexo I de la NOM-004 SEMARNAT 2002) para demostrar que los procesos de digestión anaerobia empleados logran, de manera adecuada, la reducción de atracción de vectores.

II. De acuerdo con los inconvenientes presentados en este trabajo relacionadas a la presencia de falsos-positivos durante la determinación de *Salmonella* siguiendo la metodología establecida en la normativa, y retomando las recomendaciones ya pronunciadas dentro de este mismo grupo de trabajo (Magos, 2013), se recomienda emplear técnicas alternas a la del NMP, como la técnica de filtración a través de membrana o conteo en placa, para reducir la presencia de falsos positivos durante la cuantificación de *Salmonella*.

III. Es necesario realizar adecuaciones al protocolo de tratamiento con PMA empleado en este estudio para la determinación confiable de células viables en muestras de lodos. Particularmente se recomienda: i) diluir las muestras para trabajar con concentraciones menores a 4 gST/L, ii) evaluar el efecto de la dilución sobre la determinación del microorganismo diana en muestras problema y no en muestras inoculadas, ya que éstas últimas introducen un sesgo que impide generar un entendimiento más práctico sobre el efecto de dilución y, iii) probar el pretratamiento de las muestras empleando por Fu *et al.* (2020), el cual utiliza un gradiente de densidad para favorecer la remoción de células no viables y así evitar que este factor disminuya el efecto del PMA.

IV. Avanzar en la adopción de métodos de biología molecular en el sector de saneamiento ya que con ello se podrá lograr la determinación de microorganismos potencialmente patógenos que no han sido considerados por la NOM-004

REFERENCIAS

- Amani, T., Nosrati, M., Sreekrishnan, T. R. 2010. Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects – a review. *Environmental Reviews* 18, 255-278
- Amorim Junior, S. S., Hwa Mazucato, V. S., Machado, B. S., Oliveira Guilherme, D., da Costa, R. B., Magalhães Filho, F. J. 2021. Agronomic potential of biosolids for a sustainable sanitation management in Brazil: Nutrient recycling, pathogens and micropollutants. *Journal of Cleaner Production* 289, 125708.
- Arthunson, A. 2008. Proper Sanitization of Sewage Sludge: A Critical Issue for a Sustainable Society. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (17), 5267-5275
- APHA (American Public Health Association) (2017). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23th Edition. USA.
- Astals, S., Venegas, C., Peces, M., Jofre, J., Lucena, F., Mata-Alvarez, J. 2012. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Research* 46 (19), 6218-6227
- Barbau-Piednoir E., Mahillon J., Pillyser J., Coucke W., Roosens H. N., Botteldoorn N., 2014. Evaluation of viability-qPCR detection system on viable and dead *Salmonella* serovar Enteritidis. *Journal of Microbiological Methods* 103, 131-137
- Bae, S., Wuertz, S., 2009. Discrimination of viable and dead fecal bac- teroidales bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology*. 75, 2940–2944.
- Bauer, T., Burgman, L. E., Andreas, L., Lagerkvist, A., 2020. Effects of the different implementation of legislation relating to sewage sludge disposal in the EU. *Detrius* 10, 92-99
- Bean, C. L., Hansen, J. J., Margolin, A. B., Balkin, H., Batzer, G., Widmer, G. 2007. Class B Alkaline Stabilization to Achieve Pathogen Inactivation. *International Journal of Environmental Research*. Public Health 4(1), 53-60
- Bibby, K., Peccia, J. 2013. Identification of viral pathogen diversity in sewage sludge by metagenome analysis. *Environmental Science and Technology*. 47 (4), 1945e1951.
- Brasil, 2020. Ministry of the Environment. Resolution No. 498, August 19. Defines criteria and procedures for the production and application of biosolids in soils and makes other provisions. National Environment Council - CONAMA. <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>.
- Breda, C. C., Soares, M. B., Rimoldi Tavanti, R. F., Gomes Viana, D., da Silva Freddi, O., Piedade, A. R., Mahl, D., Traballi, R. C., Guerrini, I. A., 2020. Successive sewage sludge fertilization: Recycling for sustainable agricultura. *Waste Management* 109, 38-50
- Brown, S., Chaney, R., Angle, J.S., 1997. Subsurface liming and metal movement in soils amended with lime-stabilized biosolids. *Journal of Environmental Quality* 26 (3), 724–732.
- Boddicker, J. D. , Knosp, B. M., Jones, B. D. 2003. Transcription of the *Salmonella* Invasion Gene Activator, *hilA*, Requires HilD Activation in the Absence of Negative Regulators. *Journal of Bacteriology* 185 (4), 525-533

- Bonjoch, X., Blanch, A.R. 2009. Resistance of Faecal Coliforms and Enterococci Populations in Sludge and Biosolids to Different Hygienisation Treatments. *Microbial Ecology* 57, 478–483
- Bougier, C., Delgenés, J.P., Carrère, H. 2008. Impact of thermal pre-treatments on the semi-continuous anaerobic digestion of waste activated sludge. *Biochemical Engineering Journal* 34, 20-27
- Bougier, C., Albasi, C., Delgenés, J.P., Carrère, H. 2006. Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilization and anaerobic biodegradability. *Chemical Engineering and Processing* 45, 711-718
- Callivignarelli, M. C., Canato, M., Abba, A., Miino, M. C. 2019. Biosolids: What are the different types of reuses? *Journal of Cleaner Production* 238, 117844
- Callivignarelli, M. C., Abba, A., Frattarola, A., Miino, M. C., Padovani, S., Katsoyiannis, I., Torretta V., 2019. Legislation for the reuse of biosolids on agricultural land in Europe: Overview. *Sustainability*. 11, 6015
- Carballa M., Regueiro L., Lema J. M., 2015. Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Current Opinion in Biotechnology* 33:103-111
- Castellano-Hinojosa A., Armato C., Pozo C., González-Martínez A., González-López J., 2018. New concepts in anaerobic digestion process: recent advances and biological aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:5065–5076
- Chaudhary, Y. K., Gough, H. L. 2021. Identifying ranges of combined lime and heat treatments to achieve biosolids stabilization fecal coliform targets. *Journal of Environmental Management* 282, 111900
- Chen, Y.-C., Higgins, M. J., Beightol, S. M., Murthy, S. N., Toffey, W. E. 2011. Anaerobically digested biosolids odor generation and pathogen indicator regrowth after dewatering. *Water Research* 45, 2616-2626
- Chen, Y., Fu, B., Wang, Y., Jiang, Q., Liu, H. 2012. Reactor performance and bacterial pathogen removal in response to sludge retention time in a mesophilic anaerobic digester treating sewage sludge. *Bioresource Technology* 106, 20-26
- Christodoulou, A., Stamatelatou, K. 2016. Overview of legislation on sewage sludge management in developed countries worldwide. *Water Science and Technology* 73 (3), 453-462
- Clarke, B.O., Smith, S.R., 2011. Review of “emerging” organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International*. 37, 226–247.
- Comisión Nacional del Agua (Conagua). 2016. Estadística del Agua en México, 2016. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). México.
- Comisión Nacional del Agua (Conagua). 2018. Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales en Operación, diciembre 2018. México: SEMARNAT.
- Comisión Nacional del Agua (Conagua). 2019. Manual de agua potable, alcantarillado y Saneamiento, Operación y Mantenimiento de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales: Libro 50 Tratamiento y Disposición de Lodos. México: SEMARNAT
- Condy F., Dinh-Thanh M., Agusti G., 2019. Key Factors for Removing Bias in Viability PCR-based methods: A Review. *Current Microbiology*, 77(4), 682-687

- Contreras P. J., Urrutia H., Sossa K., Nocker A., 2011. Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *Journal of Microbiological Methods* 87, 89-95.
- De los Cobos-Vasconcelos, D., Villalba-Pastrana, M.E., Noyola, A., 2015. Effective pathogen removal by low temperature thermal pre-treatment and anaerobic digestion for Class A biosolids production from sewage sludge. *Journal Water Sanitization and Hygiene for Development* 5 (1), 56-63
- Desneux, J., Biscuit, A., Picard, S., Pourcher, A.M. 2016. Fate of Viable but Non-culturable *Listeria monocytogenes* in Pig Manure Microcosms. *Frontiers in Microbiology* 7:245.
- Dong, K., Pan, H., Yang, D., et al. 2020. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 19, 149– 183.
- European Economic Community (EEC), 1986. EUR-Lex Council Directive 86/278/EEC of 12 June 1986 on the Protection of the Environment, and in Particular of the Soil, when Sewage Sludge is Used in Agriculture. *Official Journal of the European Communities* 1986, 181, 6–12.
- Emerson, J. B., Adams, R. I., Betancourt Román, C. M., Brooks, B., Coil, D. A., Dahlhausen, K., Ganz, H. H., Hartmann, E. M., Hsu, Ti., Justice, N. B., Paulino-Lima, I. G., Luongo, J. C., Lympelopoulou, D. S., Gomez-Silvan, C., Rothschild-Mancinelli, B., Balk, M., Huttenhower, C., Nocker, A., Vaishampayan, P., Rothschild, L. J. 2017. Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. *Microbiome* 5:86
- Fane, S., Nocker, A., Vale, P., Rivas Casado, M., Cartmell, E., Harris, J., Bajón Fernández, Y., Tyrrel, S. (2021). Characterization and control of the biosolids storage environment: Implications for *E. coli* dynamics. *Science of the Total Environment* 752, 141705
- Fane, S., Vale, P., Bajón-Fernández, Y., Cartmell, E., Nocker, A., Harris, J., Tyrrel, S. 2020. Influence of Innate Sludge Factors and Ambient Environmental Parameters in Biosolids Storage on Indicator Bacteria Survival: A Review. *Waste Biomass Valor* 11, 6105–6114
- 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* 42, 186-192.
- Fittipaldi, M., Nocker, A., Codony, F. 2012. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of Microbiological Methods* 91, 276-289
- Fittipaldi, M., Codony, F., Adrados, B., Camper, A. K., Morató, J. 2011. Viable Real-Time PCR in Environmental Samples: Can All Data Be Interpreted Directly? *Microbial Ecology* 61: 7-12
- Fijalkowski, K., Rorat, A., Grobelak, A., Kacprzak J. M., 2017. The presence of contaminations in sewage sludge - The current situation. *Journal of Environmental Management*. 203, 1126-1136
- Flemming, C. A., Simhon, A., Odumeru, J. A. 2017. Pathogen Characterization of Fresh and Stored Mesophilic Anaerobically Digested Sludge. *Water Environment Research* 89 (11), 231- 242
- Frahm, E. & Obst, U. 2003. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of Microbiological Methods* 52 (1), 123–131.

- Forster-Carneiro, T., Riau, V., Pérez, M. 2010. Mesophilic anaerobic digestion of sewage sludge to obtain class B biosolids: Microbiological methods development. *Biomass and Bioenergy*. 34 (12), 1805-1812
- Fu Y., Ye Z., Jia Y., Fan J., Hashmi MZ. and Shen C., 2020. An Optimized Method to Assess Viable Escherichia coli O157:H7 in Agricultural Soil Using Combined Propidium Monoazide Staining and Quantitative PCR. *Frontiers Microbiology*. 11:1809.
- Gattie, D., Lewis, D.L. 2004. A high-level disinfection standard for land-applied sewage sludges (biosolids). *Environmental Health Perspectives* 112 (2), 126-131
- Gherghel, A., Teodosiu, C., De Gisi, S. 2019. A review on wastewater sludge valorisation and its challenges in the context of circular economy. *Journal of Cleaner Production*. 228, 244-263
- Gleick, P.H., N. L. Cain, D. Haasz, Ch. Henges-Jeck, C. Hunt, M. Kiparsky, M. Moench, M. Palaniappan, V. Srinivasan, G. H. Wolff. 2004. The World's Water. The Biennial Report on Freshwater Resources. Island Press, Washington: 362 p.
- Guo, X., Wang, C., Sun, F., Zhu, Z., Wu, W. 2014. A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings. *Bioresource Technology* 152, 420-428
- Guo, J., Peng, Y., Ni, B.J., Han., X., Fan, L., Yuan, Z. 2015. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. *Microbial Cell Factories* 14, 33
- Guo, L., Wan, K., Zhu, J., Ye, Ch. Chabi, K., Yu, X. 2021. Detection and distribution of vbnc/viable pathogenic bacteria in full-scale drinking water treatment plants. *Journal of Hazardous Materials* 406, 124335
- Higgins, M. J., Chena, Y.-C., Murthyb, S. N., Hendricksonc, D., Farreld, J., Schafer, P. 2007. Reactivation and growth of non-culturable indicator bacteria in anaerobically digested biosolids after centrifuge dewatering. *Water Research* 41, 665-673
- Huang, K., Mao, Y., Zhao, F., Zhang, X.-X., Ju, F., Ye, L., Wang, Y., Li, B., Ren, H., Zhang, T., 2018. Free-living bacteria and potential bacterial pathogens in sewage treatment plants. *Applied Microbiological Biotechnology*. 102, 2455–2464.
- Iranpour, R., Palacios, R., Cox, H.H.J., Abkian, V. 2005. Solving fecal coliform growth/reactivation in biosolids during full-scale post-digestion processes. *Water Science and Technology*. 52 (1-2), 283-288
- Iranpour, R., Cox, H.H.J. 2006. Recurrence of fecal coliforms and Salmonella species in biosolids following thermophilic anaerobic digestion. *Water Environment Research*. 78 (9), 105-112
- Jenkins, S.R., Morgan, J.M. & Sawyer, C.L. 1983. Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *Journal of Water Pollution*. Vol 55. pp. 448-453.
- Jiang Q., Fu B., Chen Y., Wang Y., Liu H., 2013. Quantification of viable but nonculturable bacterial pathogens in anaerobic digested sludge. *Applied Microbiological Biotechnology* 97: 6043-6050
- Jiang, Y., Xie, S.H., Dennehy, C., Lawlor, P.G., Hu, Z.H., Wu, G.X., Zhan, X.M., Gardiner, G.E. 2020. Inactivation of pathogens in anaerobic digestion systems for converting biowastes to bioenergy: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 120, 109654.

- Kacprzaka, M., Neczaja, E., Fijałkowska, K., Grobelaka, A., Grossera, A., Worwaga, M., Rorata, A., Brattebob, H., Almåsc, A., Singhc, B. R., 2017. Sewage sludge disposal strategies for sustainable development. *Environmental Research* 156, 39–46
- Karthikeyan, O.P. *et al.* 2016. Hydrolysis–acidogenesis of food waste in solid–liquid-separating continuous stirred tank reactor (SLS-CSTR) for volatile organic acid production. *Bioresource Technology*. 200, 366–373
- Kjerstadius H, la Cour Jansen J, De Vrieze J, Haghghatafshar S, Davidsson A. 2013. Hygienization of sludge through anaerobic digestion at 35, 55 and 60 °C. *Water Sciences Technology* 68(10):2234-9h
- Kim, J.S., Chowdhury, N., Yamasaki, R., Wood, T.K. 2018. Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state. *Environmental Microbiology* 20(6):2038–2048.
- Klein, M., Brown, L., Ashbolt, N. J., Stuetz, R. M., and Roser, D. J. (2011). Inactivation of indicators and pathogens in cattle feedlot manures and compost as determined by molecular and culture assays. *FEMS Microbiological Ecology*. 77, 200–210.
- Kleinstauber, S. 2018. Metagenomics of methanogenic communities in anaerobic digesters. In *Biogenesis of Hydrocarbons, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Stams, A.J.M. and Sousa, D., eds), pp. 1–23, Springer.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 41, e1–e1.
- Kralik, P., Nocker, A., Pavlik, I. 2010. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. *International Journal Food Microbiology* 141(1): S80–S86.
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., Schloss, P.D., 2013. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq 79, 5112–5120.
- Pinto, D., Santos, M. A., Chambel, L. 2013. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Critical Reviews Microbiology* 41 (1):61-76
- Qi, G., Pan, Z., Yamamoto, Y. 2018. The survival of pathogenic bacteria and plant growth promoting bacteria during mesophilic anaerobic digestion in full-scale biogas plants. *Animal Science Journal*. 90, 297–303
- Qi, Y., Dentel, S. K., Herson, D. S. 2007. Increases in fecal coliform bacteria resulting from centrifugal dewatering of digested biosolids. *Water Research* 41, 571-580
- Qi, Y., Dentela, S. K., Herson, D. S. 2008. Effect of total solids on fecal coliform regrowth in anaerobically digested biosolids. *Water Research* 43, 3817-3825
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Peplies, J., Yarza, P., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 41, 590–596.
- Ley de Aguas Nacionales (LAN), Diario Oficial de la Federación. 1 de diciembre, 1992.
- Langenkamp, H., Part, P., Erhardt, W., & Prüeß, A. 2001. Organic Contaminants in Sewage Sludge for Agricultural Use. Retrieved from https://ec.europa.eu/environment/archives/waste/sludge/pdf/organics_in_sludge.pdf

- Lebuhn, M., Effenberger, M., Garcés, G., Gronauer, A., and Wilderer, P. A. 2005. Hygienization by anaerobic digestion: comparison between evaluation by cultivation and quantitative real-time PCR. *Water Science Technology*. 52, 93–99.
- Li D., Tong T., Zeng S., Lin Y., Wu S., He M., 2014. Quantification of viable bacteria in wastewater treatment plants by using propidium monoazide combined with quantitative PCR (PMA-qPCR). *Journal of Environmental Sciences* 26, 299-306
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., Faucher, S. P. 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* 5, 258
- Li, Y.Y., Noike, T. 1992. Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by thermal pretreatment. *Water Science Technology* 26, 857-866
- Liu, Y., Cao, Y., Wang, T., Dong, Q., Li, J., Niu, C. 2019. Detection of 12 Common Food-Borne Bacterial Pathogens by TaqMan Real-Time PCR Using a Single Set of Reaction Conditions. *Frontiers in Microbiology*. 10:222.
- Liu X., Lendormi T., Lanoiselle J-L. 2019. Overview of hygienization pretreatment for pasteurization and methane potential enhancement of biowaste: Challenges, state of the art and alternative technologies. *Journal of Cleaner Production* 236, 117525
- López, A., Bager, B., Goñi, P., Rubio, E., Gómez, J., Mosteo, R., Ormad, M.P. 2019. Assessment of the methodologies used in microbiological control of sewage sludge. *Waste Management* 96, 168-174
- López Hernandez, J. E., Higareda Ramírez, B. L., Gomes Cabral, C. B., Morgan-Sagastume, J. M. 2017. Guía técnica para el manejo y aprovechamiento de biogás en plantas de tratamiento de aguas residuales. Primera edición. GIZ México, SENER, SEMARNAT, CONAGUA y ANEAS. México
- Luo, G., Angelidaki, I. 2014. Analysis of bacterial communities and bacterial pathogens in a biogas plant by the combination of ethidium monoazide, PCR and Ion Torrent sequencing. *Water Research* 60, 156-163
- Malina, J.F. & Pohland, F.G. 1992. Design of anaerobic processes for the treatment of industrial and municipal wastes. Technomic Publishing Co. USA 214 pp.
- Martínez Arce, E. B. 2009. Pretratamiento térmico y digestión anaerobia de lodos residuales para la producción de biosólidos clase A. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Magos Navarro, M. S. 2013. Dinámica microbiana del pre-tratamiento térmico / digestión anaerobia para la producción de biosólidos clase A. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Metcalf & Eddy. 2013. Wastewater Engineering-Treatment and Resource Recovery. McGraw-Hill Companies. New York, USA. 5th ed.
- Mininni, G., Blanch, A. R., Lucena, F., Berselli, S., 2015. EU policy on sewage sludge utilization and perspectives on new approaches of sludge management. *Environmental Science Pollution Res* 22, 7361-7374
- Morales Mantilla, G., Sandoval Yoval, L., Ramírez Camperos, E. M., Gasca Álvarez, S., Navarro Franco, J., Hernández Cruz, N., García Rojas, J. L., Esquivel Sotelo, A., Calderón Mólgora, C. G. 2017. Energía limpia del agua sucia: aprovechamiento de lodos residuales. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México

- Nazari, L., Yuan, Z., Santoro, D., Sarathy, S., Ho, D., Batstone, D., Xu, C., Ray, M.B., 2017. Low-temperature thermal pre-treatment of municipal wastewater sludge: process optimization and effects on solubilization and anaerobic degradation. *Water Research*. 113, 111e123
- Ni, J., Hatori, S., Wang, Y. *et al.* 2020 Uncovering Viable Microbiome in Anaerobic Sludge Digesters by Propidium Monoazide (PMA)-PCR. *Microbial Ecology* **79**, 925–932
- Nocker A. & Camper A. K., 2008. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiological Letters* 291, 137-142.
- Nocker A., Sossa K. E., Camper A. K., 2007. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods* 70, 252- 260.
- Nocker A., Cheung Ch-Y., Camper A. K., 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods* 67, 310-320
- Nogva, H.K., Dromtorp, S.M., Nissen, H., Rudi, K., 2003. Ethidium monoazide for DNA- based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques* 810, 812–813.
- 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., Morgan-Sagastume, J., Güereca, P. L. 2013. Selección de Tecnologías para el Tratamiento de Aguas Residuales Municipales: guía de apoyo para ciudades pequeñas y medianas. Primera Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México
- Oladejo, J., Shi, K., Luo, X., Yang, G., Wu, T. 2019. A Review of Sludge-to-Energy Recovery Methods. *Energies* 12,60
- Oliver, J. D. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 415–425.
- Ondov, B.D., Bergman, N.H., Phillippy, A.M., 2011. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* 12, 385.
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Beiko, R.G., 2014. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* 30, 3123–3124.
- Pan, Y., Breidt, F. Jr. 2007. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Applied Environmental Microbiology* 73(24):8028–8031
- Pascual-Benito, M., García-Aljaro, C., Casanovas-Massana, S., Blanch, A.R, Lucena, F. 2014. Effect of hygienization treatment on the recovery and/or regrowth of microbial indicators in sewage sludge. *Journal of Applied Microbiology* 118, 412-418
- Pienaar, J.A., Singh, A., Barnard, T.G. 2016, The viable but non- culturable state in pathogenic *Escherichia coli*: A general review. *African Journal of Laboratory Medicine*. 5(1), a368
- Pinto D., Santos A. M., Chambel L. 2015. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 41:1, 61-76.
- Raheem A., Sikarwar V., He J., Dastyar W., Dionysiou D., Wang W., Zhao M., 2018. Opportunities and challenges in sustainable treatment and resource reuse of sewage sludge: A review. *Chemical Engineering Journal* 337, 616-641

- Riau V., De la Rubia M.A., Perez M. 2010. Temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) of sewage sludge A semi- continuous study. *Bioresource Technology* 101, 2706-2712
- Rorat, A., Courtois, P., Vandebulcke, F., Lemiere, S., 2019. Sanitary and environmental aspects of sewage sludge management. En: Industrial and Municipal Sludge. Vara Prasad M. N., de Campos Favas P. J., Vithanage A., Venkata Mohan S. (Eds), Butterworth-Heinemann, 155-180
- Rubio Loza, L.A., Noyola, A., 2010. Two-phase (acidogenic.methanogenic) anaerobic thermophilic/mesophilic digestion system for producing Class A biosolids from municipal sludge. *Bioresource Technology* 101, 576-585
- Ruik, W., Higashimori, A., Yaguchi, J., Li, Y. 2016 Use of real-time PCR with propidium monoazide for enumeration of viable *Escherichia coli* in anaerobic digestion. *Water Science Technology* 74, 1243-1254
- Ruiz-Hernando, M., Martín-Díaz, J., Labanda, J., Mata-Alvarez, J., Llorens, J., Lucena, F., Astals, S. 2014. Effect of ultrasound, low-temperature thermal and alkali pre-treatments on waste activated sludge rheology, hygienization and methane potential, *Water Research* 61, 119-129
- Saha, S., Basak, B., Hwang, J-H., Salama, E-S., Chatterjee, P. K., Jeon, B-H. 2020. Microbial Symbiosis: A Network towards Biomethanation. *Trends in Microbiology* 28 (12), 968-984
- Saha, S., Jeon, B.H., Kurade, M.B., Govindwar, S.P., Chatterjee, P.K., Oh, S.E., Roh, H.S., Lee, S.S. 2019. Interspecies microbial nexus facilitated methanation of polysaccharidic wastes. *Bioresource Technology* 289:121638.
- Scaglia, B., D'Imporzano, G., Garuti, G., Negri, M., Adani, F. 2014. Sanitation ability of anaerobic digestion performed at different temperature on sewage sludge. *Science of Total Environment* 466–467, 888-897
- Schlindwein, A.D., Rigotto, C., Simones, C.M.O., Barardi, C.R.M., 2010. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. *Water Science Technology*. 61, 537-544
- Seiple, T. E., Coleman, A. M., Skaggs, R. L. 2017. Municipal wastewater sludge as a sustainable bioresource in the United States. *Journal of Environmental Management* 197, 673-680
- NOM-004-SEMARNAT-2002. 2003. Norma Oficial Mexicana: Protección ambiental - Lodos y biosólidos - Límites máximos permisibles de contaminantes en el aprovechamiento y disposición final. Diario Oficial de la Federación, 18 de febrero de 2002, pp. 18-61.
- Sharma, B., Sarkar, A., Singh, P., Singh, R. P. 2017. Agricultural utilization of biosolids: A review on potential effects on soil and plant grown. *Waste Management* 64, 117-132
- Sidhu, J.P.S., Toze, S. G. 2009. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environment International* 35, 187-201
- Silva-Leal, J., Bedoya-Rios, D., Torres-Lozada, P., 2013a. Effect of thermal drying and alkaline treatment in the microbiological and chemical characteristics of biosolids from domestic wastewater treatment plants. *Química Nova* 36 (2), 207–214.
- Silva-Leal, J., Torres-Lozada, P., Cardoza, Y.J., 2013b. Thermal drying and alkaline treatment of biosolids: effects on nitrogen mineralization. *Clean* 41 (3), 298–303.
- Smith, S.R., Lang, N.L., Cheung, K.H.M., Spanoudaki, K. 2005. Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. *Waste Management* 25, 417-425

- Soejima, T., Iwatsuki, K. 2016. Innovative use of palladium compounds to selectively detect live *Enterobacteriaceae* in milk by PCR. *Applied Environmental Microbiology* 82:6930–6941.
- Soejima T., Minani, J-I., Xiao, J-Z., Abe, F. 2016. Innovative use of platinum compounds to selectively detect live microorganisms by polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 113 (2), 301-310
- Soejima, T., Iida, K., Qin, T., Tani, H., Seki, M., Takade, A., *et al.*, 2007. Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria. *Microbiology and Immunology* 51, 763–775.
- Svennevik, O.K., Jonassen, K.R., Svensson, K. *et al.* 2020. Protecting Thermally Hydrolyzed Biosolids from Pathogenic Bacterial Growth by Addition of Compost. *Waste Biomass Valor.*
- Taskin B., Gozen A. G., Duran M., 2011. Selective Quantification of Viable *Escherichia coli* Bacteria in Biosolids by Quantitative PCR with Propidium Monoazide Modification. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (13), 4329-4335
- Tyagi, V. K., Lo, S.-L. 2013. Sludge: A waste or renewable source for energy and resources recovery? *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 25, 708-728
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1994. Preparing Sewage Sludge for Land Application or Surface Disposal: a Guide for Preparers of Sewage Sludge on the Monitoring, Recordkeeping, and Reporting Requirements of the Federal Standards for the Use and Disposal of Sewage Sludge, 40 CFR Part 503. Environmental protection agency e USEPA, Washington. EPA/831B-93-002.
- Van Frankenhuyzen J.K., Trevors J. T., Flemming C. A., Lee H., Habash M. B., 2013. Optimization, validation, and application of a real-time PCR protocol for quantification of viable bacterial cells in municipal sewage sludge and biosolids using reporter genes and *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 40:1251–1261
- Van Frankenhuyzen J. K., Trevors J. T., Lee H., Flemming C. A., Habash M. B., 2011. Molecular pathogen detection in biosolids with a focus on quantitative PCR using propidium monoazide for viable cell enumeration. *Journal of Microbiological Methods* 87, 263-272
- Varma, M., Field, R., Stinson, M., Rukovets, B., Wymer, L., Haugland, R., 2009. Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium monoazide-resistant fecal indicator bacteria in wastewater. *Water Research* 43(19), 4790–4801.
- Vasco-Correa J., Khanal S., Manandhar A., Shah A., 2018. Anaerobic digestion for bioenergy production: Global status, environmental and techno-economic implications, and government policies. *Bioresour Technol* 247: 1015-1026.
- Vergine, P., Záborská, J., Canziani, R., 2014. Low temperature microwave and conventional heating pre-treatments to improve sludge anaerobic biodegradability. *Water Science Technology* 69, 518-524.
- Villalba, M., 2012. Remoción de patógenos (coliformes fecales y *Salmonella* spp.) en lodos de purga municipal mediante pretratamiento térmico. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Wagner A. O., Malin C., Knapp B. A., Illmer P., 2008. Removal of free extracellular DNA from environmental samples by ethidium monoazide and propidium monoazide. *Applied Environmental Microbiology* 74 (8), 2537-2539

- Wang, Q., Wei, W., Gong, Y., Yu, Q., Li, Q., Sun, J., Yuan, Z. 2017. Technologies for reducing sludge production in wastewater treatment plants: state of the art. *Science of Total Environment* 587-588, 510-521.
- White, C.J. & Stuckey, D.C. (2000). The influence of metal ion addition on the anaerobic treatment of high strength soluble wastewater. *Environmental Technology*. Vol 21. pp 1283-1292
- Wilson, W.D., Jones, R.L., Zon, G., Banville, D.L., Marzilli, L.G., 2004. Specificity in DNA interactions: an NMR investigation of the interaction of propidium with oligodeoxyribonucleotides containing normal and G·T base pairs. *Biopolymers* 25, 1997–2015.
- Xu HS, Roberts N, Singleton FL, *et al.* (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology* 8:313–23.
- Yan, Y., Chen, H., Xu, W., He, Q., Zhou, Q., 2013. Enhancement of biochemical methane potential from excess sludge with low organic content by mild thermal pretreatment. *Biochemical Engineering J.* 70, 127-134
- Yin, F., Dong, H., Shang, B., Zhang, W. 2018. Effect of Time and Mixing in Thermal Pretreatment on Fecal Indicator Bacteria Inactivation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 15(6):1225
- Yin, F., Li, Z., Wang, D., Ohlsen, T., Dong, H. 2016. Performance of thermal pretreatment and mesophilic fermentation system on pathogen inactivation and biogas production of faecal sludge: Initial laboratory results. *Biosystems Engineering* 151, 171-177
- Yuan Y., Zheng G., Lin M., Mustapha A., 2018. Detection of viable *Escherichia coli* in environmental water using combined propidium monoazide staining and quantitative PCR. *Water Research* 145, 398-407
- Zalexki, K.J., Josephson, K.L, Gerba, C.P., Pepper, I.L. 2005. Survival, Growth and Regrowth of Enteric Indicator and Pathogenic Bacteria in Biosolids, Compost, Soil and Land Applied Biosolids. *Journal of Residuals Science and Technology* 2 (1), 49-63
- Zhang, Q., Hu, J., Lee, D.-J., Chang, Y., Lee, Y.-J. 2017. Sludge treatment: Current research trends. *Bioresource Technology* 243, 1159-1172
- Zhao, Q., Liu, Y. 2019., Is anaerobic digestion a reliable barrier for deactivation of pathogens in biosludge? *Science of Total Environment* 668, 893-902

ANEXO I. CÁLCULOS

CÁLCULO ESTADÍSTICO PARA DETERMINAR DIFERENCIAS ENTRE LOS DIFERENTES PROCESO

El modelo utilizado consistió en un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor; el número de tratamientos (3) se corresponde con el número de procesos evaluados (DAM+TA, DAT y PT+DAT) y los factores a los parámetros medidos (porcentaje de remoción de sólidos, producción de biogás y concentración de células viables)

Expresando el modelo en su forma estadística tenemos:

$$y_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, \dots, 1$
 $j = 1, 2, \dots, n$

i es el nivel del factor o tratamiento; j es la medición tomada

y_{ij} es la observación ij -ésima

μ_i es la media del nivel del factor o tratamiento i -ésimo

ε_{ij} es un componente del error aleatorio

Para el modelo, las hipótesis que se prueban son:

$$H_0 : \tau_1 = \tau_2 = \dots \tau_a = 0$$

$$H_1 : \tau_i \neq 0 \text{ para al menos una } i$$

Cuando se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) se aplicó la prueba Tukey de comparación múltiple.

Se introdujeron los valores al programa estadístico Rstudio y se obtuvieron los siguientes resultados

Biogás_Analysis of Variance Table

Response: datos_biogás\$y

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
datos_biogás\$trat	2	720.42	360.21	145.24	< 2.2e-16 ***
Residuals	664	1646.81	2.48		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

	diff	lwr	upr	p adj
DAT-DAM_TA	2.5697423	2.1767075	2.9627772	0.0000000
PT_DAT-MAD_TA	2.0147499	1.6808706	2.3486292	0.0000000
PT_DAT-DAT	-0.5549925	-0.9189198	-0.1910652	0.0010638

Remoción de sólidos volátiles_Analysis of Variance Table

Response: datos_RSV\$y

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
datos_RSV\$Trat	2	151.4	75.723	0.6757	0.5109
Residuals	111	12439.6	112.069		

Concentración de células viables Proceso DAM+TA_Analysis of Variance Table

Response: DAMTA_V\$Concentración

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
DAMTA_V\$Grupo	3	2.5950	0.86499	3.0903	0.05687 .
Residuals	16	4.4785	0.27991		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Concentración de células viables Proceso DAT_Analysis of Variance Table

Response: DAT_V\$Concentración

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
DAT_V\$Grupo	2	2.3924	1.19621	13.206	0.0009296 ***
Residuals	12	1.0870	0.09058		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

	diff	lwr	upr	p adj
DAT-A	0.118	-0.38982	0.62582	0.8121786
LP-A	0.900	0.39218	1.40782	0.0013146
LP-DAT	0.782	0.27418	1.28982	0.0038295

Concentración de células viables Proceso PT+DAT_Analysis of Variance Table

Response: ptDAT_V\$Concentración

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
ptDAT_V\$Grupo	3	19.6631	6.5544	27.719	1.42e-06 ***
Residuals	16	3.7834	0.2365		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

	diff	lwr	upr	p adj
DAT-A	-0.120	-0.9998927	0.7598927	0.9791280
LP-A	1.944	1.0641073	2.8238927	0.0000547
PT-A	1.898	1.0181073	2.7778927	0.0000720
LP-DAT	2.064	1.1841073	2.9438927	0.0000271
PT-DAT	2.018	1.1381073	2.8978927	0.0000354
PT-LP	-0.046	-0.9258927	0.8338927	0.9987553

CÁLCULO ESTADÍSTICO PARA DETERMINAR EL EFECTO DEL PMA

El modelo estadístico consistió en una prueba *t* pareada dónde, para cada tipo de muestra (LP, DAM, TA, DAM+TA almacenada, DAT, DAT almacenada, PT, PT+DAT y PT+DAT almacenada), se comparó la diferencia en la concentración de células determinada mediante la técnica qPCR y PMA-qPCR.

Expresando el modelo en su forma estadística tenemos:

$$y_{ij} = \mu_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad \begin{array}{l} i = 1, 2 \\ j = 1, 2, \dots, 5 \end{array}$$

- i es el nivel del factor o técnica; j es la medición de la concentración
- y_{ij} es la observación de la concentración de células para la técnica i en el ejemplar de prueba j
- μ_i es la verdadera concentración promedio de células de la técnica i -ésima
- β_j es un efecto sobre la concentración de células debido al ejemplar de prueba j -ésimo
- ε_{ij} es el error experimental aleatorio con media cero y varianza σ^2_i . Es decir, σ^2_1 es la varianza de las concentraciones determinadas con la técnica qPCR y σ^2_2 es la varianza de las concentraciones determinadas con la técnica PMA-qPCR.

Con este modelo pueden hacerse inferencias acerca de la diferencia en la concentración promedio de células de las técnicas $\mu_1 - \mu_2$ haciendo inferencias sobre acerca de la media de las diferencias μ_d

Para el modelo, las hipótesis que se prueban son:

$$H_0 : \mu_d = 0$$

$$H_1 : \mu_1 \neq 0$$

Se introdujeron los valores al programa estadístico Rstudio y se obtuvieron los siguientes resultados:

LP_Paired t-test

data: PMA_LP and PCR_LP
t = 6.1531, df = 4, **p-value = 0.003539**
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
0.4708477 1.2451523
sample estimates:
mean of the differences 0.858

DAM_Paired t-test

data: PMA_DAM and PCR_DAM
t = 3.4925, df = 4, **p-value = 0.02507**
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
0.1632019 1.4287981
sample estimates:
mean of the differences 0.796

TA_Paired t-test

data: PMA_TA and PCR_TA
t = 1.1863, df = 4, **p-value = 0.3011**
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-2.364487 5.892487
sample estimates:
mean of the differences 1.764

DAM+TA almacenado_Paired t-test

data: PMA_DAMa and PCR_DAMa
t = 1.6553, df = 4, **p-value = 0.1732**
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.4131869 1.6331869
sample estimates:
mean of the differences 0.61

DAT_Paired t-test

data: PMA_DAT and PCR_DAT
t = 4.9899, df = 4, **p-value = 0.007544**
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
0.3477711 1.2202289
sample estimates:
mean of the differences 0.78

DAT almacenado_Paired t-test

data: PMA_DATA and PCR_DATA
t = 3.1899, df = 4, **p-value = 0.03322**
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
0.07776256 1.12223744
sample estimates:
mean of the differences 0.6

PT_Paired t-test

data: PMA_PT and PCR_PT
t = 8.388, df = 4, **p-value = 0.001105**
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
0.4067508 0.8092492
sample estimates:
mean of the differences 0.608

PT+DAT_Paired t-test

data: PMA_ptDAT and PCR_ptDAT
t = 3.2251, df = 4, **p-value = 0.03212**
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
0.07790486 1.04209514
sample estimates:
mean of the differences 0.56

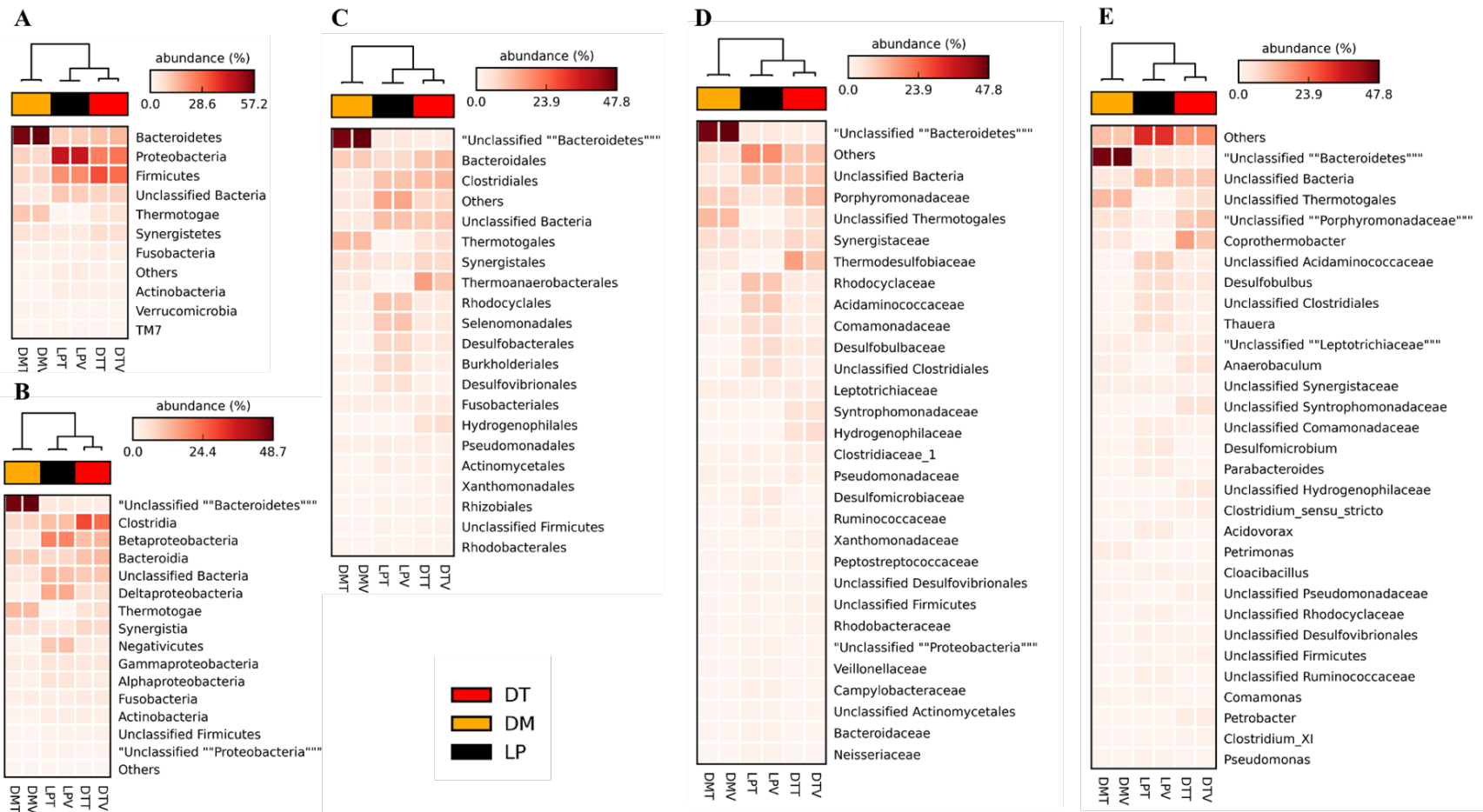
PT+DAT almacenado_Paired t-test

data: PMA_ptDATA and PCR_ptDATA
t = 2.6665, df = 4, **p-value = 0.05601**
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.04602106 2.27802106
sample estimates:
mean of the differences 1.116

SÓLIDOS Y DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO

Fecha	LP				PT				PT+DAT				DAM				DAT			
	gST/L	gSV/L	gSF/L	mgDQO/L	gST/L	gSV/L	gSF/L	mgDQO/L	gST/L	gSV/L	gSF/L	mgDQO/L	gST/L	gSV/L	gSF/L	mgDQO/L	gST/L	gSV/L	gSF/L	mgDQO/L
22-abr-24	55	33	22		60	36	24		38	17	21									
27-abr-29	40	24	16		46	27	18		28	14	14									
06-May-19	50	30	20		54	33	21		51	23	28									
13-May-19	49	29	20		47	27	20		33	17	16									
20-May-19					46	27	18		28	14	14									
27-May-19	49	31	18		52	31	21		48	25	23									
03-Jun-19	52	31	21		65	39	26		51	24	26									
10-Jun-19	56	34	23		85	51	34		44	22	22									
11-Jun-19	53	31	22																	
17-Jun-19	48	28	20		52	31	21		40	21	20									
24-Jun-19	59	32	27		63	34	29		44	20	23									
01-Jul-19	67	37	31		74	40	34		51	25	26									
08-Jul-19	51	27	23		55	30	25		46	23	23									
15-Jul-19	58	31	27		64	35	29		49	22	27									
22-Jul-19	63	34	29		76	41	35		48	23	25									
29-Jul-19	55	30	26		60	32	28		40	18	22									
05-Aug-19	60	32	28		67	37	31		54	16	38									
14-Aug-19	59	32	27		66	36	30		44	22	22		142	61	81					
21-Aug-19	28	15	13		21	13	8		40	20	20									
28-Aug-19	70	38	33		77	41	36		43	20	23		69	28	41					
05-Sep-19	64	34	30		69	37	32		43	21	22									
12-Sep-19	69	37	32		75	40	35		52	24	29		78	35	43					
19-Sep-19	71	38	33		83	42	41		52	24	28									
26-Sep-19	65	35	30		72	39	33		67	24	42		69	25	44					
03-Oct-19	63	33	29		71	38	33		58	23	35									
09-Oct-19	69	33	35		77	38	39		52	24	28		64	25	40					
16-Oct-19	71	34	37		80	38	42		55	25	30		33	18	15		66	24	42	
23-Oct-19	68	32	36		75	36	39		73	30	42		63	21	42					38
30-Oct-19	71	33	38		81	38	43		65	26	40		38	15	24		64	25	40	
06-Nov-19	76	35	41		86	40	46		59	23	36		78	35	43		64	20	44	
13-Nov-19	83	38	45		92	43	49		67	27	40		41	15	26		52	19	33	
20-Nov-19	80	37	43		93	43	50		58	24	34		69	28	41		56	22	34	
27-Nov-19	94	43	51		113	52	60		71	25	46		40	21	18		74	28	46	
03-Dec-19	82	37	45	1960	93	43	50	4545	72	29	43	2395	60	17	43	2268	51	19	33	2202
09-Dec-19	107	45	62	1120	113	47	65	4375	81	29	52	2130	28	15	13	4038	71	23	48	2137
15-Dec-19	95	39	55	1980	108	46	62	3775	72	29	43	2275					27	15	13	2025
21-Dec-19	102	45	56	1430	84	40	45	3040	70	25	45	2415	33	18	15	3404	64	20	44	1845
27-Dec-19	99	44	55	1570	92	42	50	3950	71	25	47	2050	69	28	41	2650	119	43	76	1748
04-Jan-20	68	32	36	1520	66	34	32	3847	52	23	29	1585	60	17	43	2268	51	19	33	2202
10-Jan-20	83	39	44	1461	84	39	44	3295	56	22	34	1417	69	28	41	2653	37	20	17	3036
16-Jan-20	61	40	21	2868	69	45	24	5116	47	27	20	1779	42	22	21	4036	40	21	20	3020
23-Jan-20	94	40	54	1318	109	45	64	4608	78	23	55	2591	42	22	21	4036	45	25	20	1749
29-Jan-20	69	30	40	1566	61	29	32	2971	72	25	47	1356	69	36	33	3730	74	28	46	2701
04-Feb-20	92	38	54	1388	99	41	58	4237	81	31	50	2285	60	17	43	2268	80	28	51	2174
10-Feb-20													49	27	22	2058	29	15	14	2657
17-Feb-20													40	21	18	2911	64	20	44	1845
24-Feb-20													49	27	22	2058	27	15	13	2025
01-Mar-20	55	37	18	4110	61	41	20	5191	38	22	16	4002	48	27	21	2409	23	12	11	3437
07-Mar-20	57	38	20	2885	64	42	22	4907	53	31	22	2684	42	22	21	4036	36	19	17	2298
13-Mar-20	102	45	56	1427	84	40	45	2989	70	25	45	2432	49	27	22	2058	45	25	20	1749
19-Mar-20	99	44	55	1572	92	42	50	3941	71	25	47	2085	64	25	40	2651	45	25	20	1749
26-Mar-20	62	41	21	2748	71	46	24	5180	32	18	14	2403	51	28	22	2636	23	12	11	3437
02-Apr-20	60	40	21	3107	81	54	27	5193	29	16	13	2015	40	21	18	2911	37	21	16	2295
09-Apr-20	58	38	20	2951	62	40	23	5451	25	14	11	3018	49	27	22	2058	33	18	15	2242
16-Apr-20	59	39	20	2269	70	46	24	5341	34	19	15	1938	40	21	18	2911	45	25	20	1749

SECUENCIACIÓN GEN 16S rRNA



Heatmaps de abundancia relativa de las OTUs más dominantes en las categorías taxonómicas de Filo (A), Clase (B), Orden (C), Familia (D) y Género (E). En la parte superior de los heatmaps se grafican dendrogramas UPMGA en los que se observa que las similitudes entre las comunidades microbian

MICROBIOLÓGICOS

Coliformes fecales (log10 NMP / gST)									
Fecha	PS	DAM+TA			DAT		PT+DAT		
		DAM	TA	A	DAT	A	PT+DAT	DAT	A
19-Oct-19	5.5	2.9	0.6	0.0	0.6	0.6	0.5	2.7	2.6
22-Oct-19	5.5	2.4	0.0	0.0	1.2	0.6	0.5	2.7	2.7
31-Oct-19	4.5	2.3	0.0	0.0	0.6	0.6	0.5	2.7	2.6
09-Nov-19	5.5	1.6	0.0	0.0	0.6	1.2	0.5	1.9	1.5
14-Nov-19	4.5	3.3	0.0	0.0	0.6	1.2	1.1	3.7	1.4
19-Nov-19	4.2	3.9	0.6	0.0	0.9	0.6	0.5	3.7	1.7
17-Dic-19	4.3	3.9	0.6	0.0	2.3	3.3	0.5	1.2	1.7
11-Feb-20	3.8	0.9	0.0	0.0	1.2	3.2	0.5	0.6	1.6
03-Mar-20	3.8	1.2	0.0	0.0	0.6	1.4	0.5	-0.2	1.6
17-Mar-20	5.4	4.6	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	1.9	1.5
23-Mar-20	4.5	2.9	0.0	0.0	0.9	1.1	0.5	2.3	4.7
30-Mar-20	4.8	2.9	0.6	0.0	0.6	0.9	0.5	1.9	1.9
06-Abr-20	5.0	2.9	0.6	0.0	1.2	0.6	0.5	2.7	0.6
15-Abr-20	5.0	2.9	0.6	0.0	1.2	0.6	0.5	2.7	0.6
17-Abr-20	5.0	2.1	0.0	0.0	1.7	1.9	0.5	0.9	1.9

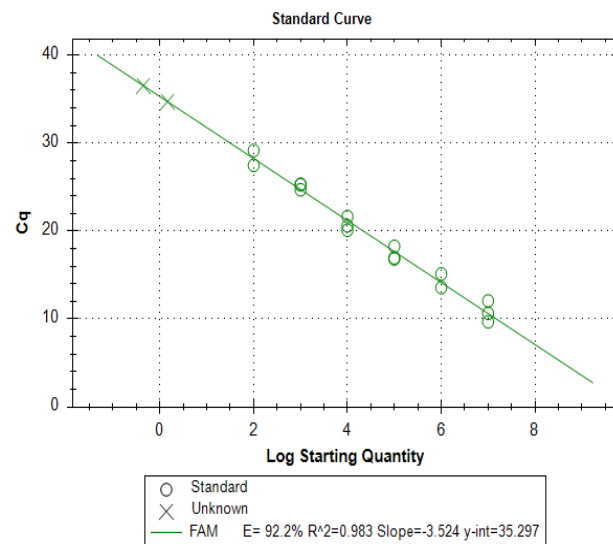
Salmonella spp. (log10 NMP / gST)									
Fecha	PS	DAM+TA			DAT		PT+DAT		
		DAM	TA	A	DAT	A	PT+DAT	DAT	A
19-Oct-19	5.5	3.6	0.0	0.6	0.6	2.0	0.5	2.7	3.6
22-Oct-19	5.5	2.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	3.7
31-Oct-19	4.5	3.6	0.6	0.6	1.3	0.6	0.5	0.6	3.6
09-Nov-19	6.5	4.6	0.0	0.0	0.6	0.6	0.7	0.9	0.6
14-Nov-19	6.2	4.3	0.6	0.0	2.7	0.6	0.5	0.6	0.6
19-Nov-19	5.5	4.6	0.6	0.6	1.7	0.6	0.5	0.6	0.6
17-Dic-19	4.5	4.6	0.6	0.9	1.7	4.7	0.5	0.6	1.7
11-Feb-20	4.5	4.6	0.6	0.8	3.7	4.6	0.5	0.6	1.6
03-Mar-20	6.5	4.3	0.9	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	2.7
17-Mar-20	5.5	4.6	0.6	0	0.6	0.6	0.5	0.9	2.6
23-Mar-20	5.2	4.6	0.6	0.6	0.6	1.6	0.5	0.6	4.7
30-Mar-20	6.5	4.6	0.6	0.6	0.6	1.6	0.5	1.2	3.3
06-Abr-20	6.5	3.3	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	1.6	0.6
15-Abr-20	4.8	4.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	0.6
17-Abr-20	5.5	4.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	0.6

E. coli (log10 NMP / gST)									
Fecha	PS	DAM+TA			DAT		PT+DAT		
		DAM	TA	A	DAT	A	PT+DAT	DAT	A
23-Mar-20	4.5	1.9	0.0	0.0	0.0	0.6	0.5	0.6	4.3
30-Mar-20	4.8	2.9	0.0	0.0	0.6	0.2	0.5	1.9	1.9
06-Abr-20	5.0	2.9	0.6	0.0	1.2	0.6	0.5	2.7	0.2
15-Abr-20	5.0	2.9	0.6	0.0	1.2	0.6	0.5	2.7	0.2
17-Abr-20	5.0	2.1	0.0	0.0	1.7	1.9	0.5	0.9	1.9

PCR CUANTITATIVA

Determinación de *Salmonella* (1ª corrida):

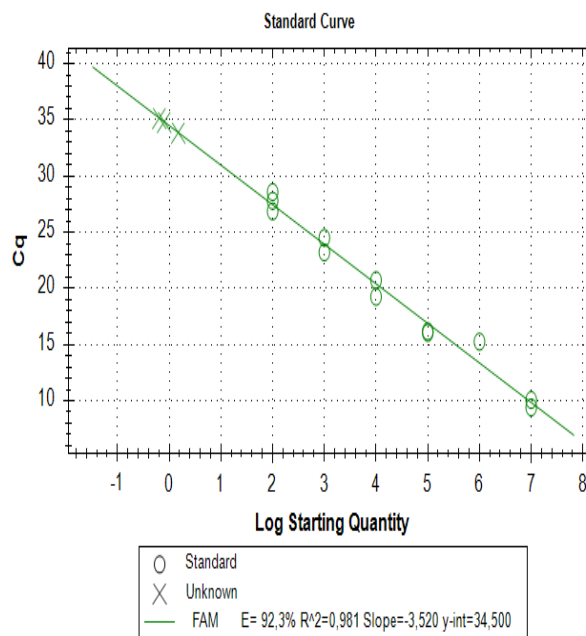
Muestra	Cq	Concentración (UFC/ml)
NTC	36.54	
NTC	34.72	
NTC	N/A	
STD stock	12.06	1.00E+07
STD stock	9.69	1.00E+07
STD stock	10.65	1.00E+07
STD -1	15.13	1.00E+06
STD -1	13.58	1.00E+06
STD -2	18.26	1.00E+05
STD -2	16.96	1.00E+05
STD -2	16.84	1.00E+05
STD -3	21.66	1.00E+04
STD -3	20.10	1.00E+04
STD -3	20.61	1.00E+04
STD -4	25.33	1.00E+03
STD -4	24.70	1.00E+03
STD -4	25.26	1.00E+03
STD -5	27.48	1.00E+02
STD -5	29.16	1.00E+02
STD -6	N/A	1.00E+01
STD -6	N/A	1.00E+01
STD -6	N/A	1.00E+01



Muestra	Cq	Muestra	Cq	Muestra	Cq	Muestra	Cq
LP 07	N/A	LT 07 PMA	N/A	DT 07	7.13	DT-A 07 PMA	39.09
LP 07	21.39	LT 07 PMA	6.12	DT 07	9.77	DT-A 07 PMA	32.43
LP 23	N/A	LT 23 PMA	14.20	DT 23	8.00	CaO-A 07	37.12
LP 23	N/A	LT 23 PMA	5.64	DT 23	13.56	CaO-A 07	13.75
LP 07 PMA	14.18	CaO 07	N/A	DT 07 PMA	26.34	CaO-A 23	N/A
LP 07 PMA	N/A	CaO 07	N/A	DT 07 PMA	N/A	CaO-A 23	6.12
LP 23 PMA	9.27	CaO 23	23.14	DT 23 PMA	N/A	CaO-A 07 PMA	10.26
LP 23 PMA	10.06	CaO 23	9.31	DT 23 PMA	N/A	CaO-A 07 PMA	39.62
DM 07	21.97	CAO 07 PMA	N/A	LT 07	N/A	CaO-A 23 PMA	N/A
DM 07	N/A	CAO 07 PMA	32.95	LT 07	10.02	CaO-A 23 PMA	N/A
DM 23	5.18	CaO 23 PMA	16.10	LT 23	10.93	DT-A 23 PMA	10.81
DM 23	6.29	CaO 23 PMA	N/A	LT 23	17.25	DT-A 23 PMA	N/A
DM 07 PMA	N/A	DTT-A 07	N/A	DTT 07 PMA	N/A	DT-A 07	35.45
DM 07 PMA	11.30	DTT-A 07	13.45	DTT 07 PMA	7.73	DT-A 07	9.72
DM 23 PMA	9.47	DTT-A 23	N/A	DTT 23 PMA	N/A	DT-A 23	11.03
DM 23 PMA	6.59	DTT-A 23	2.75	DTT 23 PMA	15.85	DT-A 23	N/A
DTT 07	12.07	DTT-A 07 PMA	37.16	DTT 23	N/A	DTT-A 23 PMA	39.62
DTT 07	13.01	DTT-A 07 PMA	39.97	DTT 23	30.46	DTT-A 23 PMA	N/A

Determinación de *Salmonella* (2ª corrida):

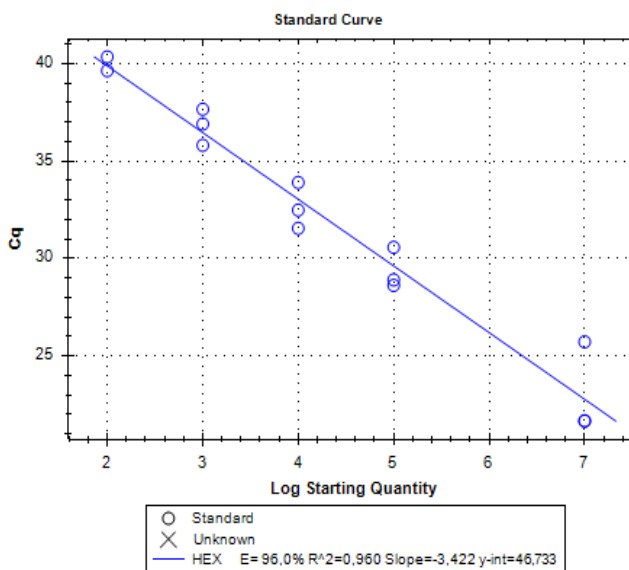
Muestra	Cq	Concentración (UFC/ml)
NTC	34.84	
NTC	33.88	
NTC	35.17	
STD stock	10.08	1.00E+07
STD stock	9.43	1.00E+07
STD -1	15.27	1.00E+06
STD -2	16.19	1.00E+05
STD -2	16.06	1.00E+05
STD -3	20.74	1.00E+04
STD -3	19.26	1.00E+04
STD -4	23.22	1.00E+03
STD -4	24.50	1.00E+03
STD -5	28.58	1.00E+02
STD -5	26.86	1.00E+02
STD -5	27.81	1.00E+02
STD -6	N/A	1.00E+01
STD -6	N/A	1.00E+01
STD -6	N/A	1.00E+01



Muestra	Cq	Muestra	Cq	Muestra	Cq	Muestra	Cq
LP 17	N/A	DT 17	11.59	DTT 15	38.43	CaO 15	N/A
LP 17	20.45	DT 17	N/A	DTT 15	38.69	CaO 15	N/A
LP 15	N/A	DT 15	N/A	DTT 17 PMA	N/A	CaO 17 PMA	N/A
LP 15	19.30	DT 15	N/A	DTT 17 PMA	20.79	CaO 17 PMA	N/A
LP 17 PMA	N/A	DT 17 PMA	38.50	DTT 15 PMA	16.72	CaO 15 PMA	N/A
LP 17 PMA	N/A	DT 17 PMA	39.71	DTT 15 PMA	N/A	CaO 15 PMA	10.25
LP 15 PMA	N/A	DT 15 PMA	N/A	DTT-A 17	N/A	DT-A17 PMA	11.76
LP 15 PMA	22.87	DT 15 PMA	N/A	DTT-A 17	N/A	DT-A17 PMA	11.94
DM 17	N/A	LT 17	35.84	DTT-A 15	9.25	DT-A 15 PMA	39.40
DM 17	N/A	LT 17	34.67	DTT-A 15	12.51	DT-A 15 PMA	36.24
DM 15	12.99	LT 15	N/A	DTT-A 17 PMA	N/A	CaO-A 17	N/A
DM 15	N/A	LT 15	N/A	DTT-A 17 PMA	27.87	CaO-A 17	N/A
DM 17 PMA	18.65	LT 17 PMA	N/A	DTT-A 15 PMA	39.02	CaO-A 15	20.28
DM 17 PMA	17.93	LT 17 PMA	36.82	DTT-A 15 PMA	36.89	CaO-A 15	16.91
DM 15 PMA	N/A	LT 15 PMA	22.63	DT-A 17	14.74	CaO-A 17 PMA	20.53
DM 15 PMA	19.80	LT 15 PMA	N/A	DT-A 17	N/A	CaO-A 17 PMA	27.36
DTT 17	38.97	CaO 17	18.98	DT-A 15	35.22	CaO 15 PMA	17.15
DTT 17	N/A	CaO 17	6.96	DT-A 15	37.66	CaO 15 PMA	16.83

Determinación de *E. coli* (1ª corrida):

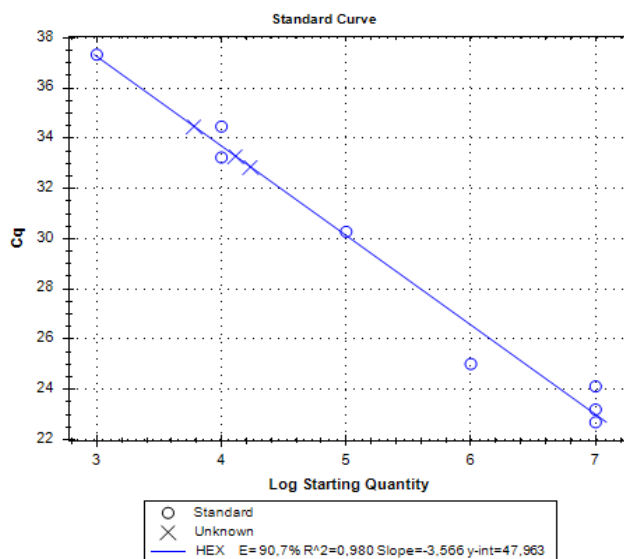
Muestra	Cq	Concentración (UFC/ml)
NTC	30.41	
NTC	N/A	
NTC	N/A	
Std-01	25.73	1.00E+07
Std-01	21.66	1.00E+07
Std-01	21.68	1.00E+07
Std-03	30.58	1.00E+05
Std-03	28.63	1.00E+05
Std-03	28.91	1.00E+05
Std-04	33.91	1.00E+04
Std-04	31.55	1.00E+04
Std-04	32.49	1.00E+04
Std-05	37.67	1.00E+03
Std-05	35.81	1.00E+03
Std-05	36.91	1.00E+03
Std-06	40.35	1.00E+02
Std-06	39.64	1.00E+02
Std-07	N/A	1.00E+01
Std-07	N/A	1.00E+01



Muestra	Cq	Muestra	Cq	Muestra	Cq	Muestra	Cq
LP 01	24.41	LP 01 PMA	26.01	DTT-A 01	32.76	DTT-A 01 PMA	30.32
LP 01	24.69	LP 01 PMA	25.28	DTT-A 01	33.42	DTT-A 01 PMA	30.48
LP 17	25.87	LP 17 PMA	26.45	DTT-A 17	34.15	DTT-A 17 PMA	33.19
LP 17	25.54	LP 17 PMA	26.03	DTT-A 17	33.64	DTT-A 17 PMA	32.43
DM 01	26.80	DM 01 PMA	27.38	DT-A 01	27.96	DT-A 01 PMA	29.33
DM 01	26.67	DM 01 PMA	27.24	DT-A 01	28.86	DT-A 01 PMA	29.74
DM 17	26.03	DM 17 PMA	27.59	DT-A 17	28.92	DT-A 17 PMA	29.38
DM 17	26.19	DM 17 PMA	27.51	DT-A 17	28.06	DT-A 17 PMA	29.06
DTT 01	31.70	DTT 01 PMA	32.77	CaO-A 01	27.91	CaO-A 01 PMA	26.25
DTT 01	31.80	DTT 01 PMA	32.25	CaO-A 01	28.58	CaO-A 01 PMA	26.15
DTT 17	34.10	DTT 17 PMA	33.63	CaO-A 17	26.63	CaO-A 17 PMA	27.11
DTT 17	32.79	DTT 17 PMA	33.50	CaO-A 17	27.01	CaO-A 17 PMA	26.60
DT 01	27.94	DT 01 PMA	28.36	LT 17	26.02	LT 17 PMA	26.38
DT 01	27.68	DT 01 PMA	28.08	LT 17	26.23	LT 17 PMA	27.31
DT 17	30.11	DT 17 PMA	29.58	CaO 01	27.41	CaO 01PMA	27.89
DT 17	29.94	DT 17 PMA	29.16	CaO 01	27.98	CaO 01PMA	27.72
LT 01	25.02	LT 01 PMA	25.49	CaO 17	27.94	CaO 17 PMA	28.31
LT 01	25.09	LT 01 PMA	25.48	CaO 17	27.77	CaO 17 PMA	27.80

Determinación de *E. coli* (2ª corrida):

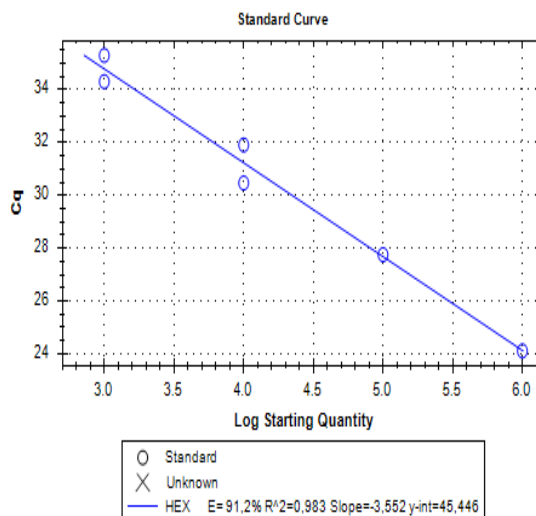
Muestra	Cq	Concentración (UFC/ml)
Control Neg	34.48	
Control Neg	33.29	
Control Neg	32.86	
NTC	39.97	
NTC	40.74	
NTC	N/A	
STD stock	23.20	1.00E+07
STD stock	22.69	1.00E+07
STD stock	24.12	1.00E+07
STD -1	25.01	1.00E+06
STD -2	30.28	1.00E+05
STD -3	33.24	1.00E+04
STD -3	34.47	1.00E+04
STD -4	37.34	1.00E+03
STD -4	N/A	1.00E+03
STD -5	N/A	1.00E+02
STD -5	N/A	1.00E+02
STD -5	N/A	1.00E+02



Muestra	Cq	Muestra	Cq	Muestra	Cq	Muestra	Cq
LP 07	27.24	LP 07 PMA	26.32	LT 23	25.67	LT 23 PMA	26.37
LP 07	27.04	LP 07 PMA	26.28	LT 23	25.71	LT 23 PMA	26.66
LP 23	26.18	LP 23 PMA	27.16	CaO 07	36.93	CaO 07 PMA	28.67
LP 23	25.69	LP 23 PMA	27.20	CaO 07	35.55	CaO 07 PMA	28.44
DM 07	28.60	DM 07 PMA	27.50	CaO 23	28.65	CaO 23 PMA	28.69
DM 07	28.36	DM 07 PMA	26.99	CaO 23	28.39	CaO 23 PMA	28.49
DM 23	27.52	DM 23 PMA	28.12	DTT-A 07	34.59	DTT-A07 PMA	34.94
DM 23	27.56	DM 23 PMA	27.69	DTT-A 07	35.31	DTT-A07 PMA	35.40
DTT07	34.37	DTT 07 PMA	33.66	DTT-A 23	30.25	DTT-A 23 PMA	29.04
DTT07	35.11	DTT 07 PMA	34.35	DTT-A 23	29.53	DTT-A 23 PMA	29.02
DTT 23	34.08	DTT 23 PMA	34.04	DT-A 07	29.85	DT-A 07 PMA	29.98
DTT 23	33.64	DTT 23 PMA	33.34	DT-A 07	30.39	DT-A 07 PMA	30.25
DT 07	30.04	DT 07 PMA	28.95	DT-A 23	29.03	DT-A 23 PMA	28.62
DT 07	29.95	DT 07 PMA	N/A	DT-A 23	29.13	DT-A 23 PMA	28.64
DT 23	29.02	DT 23 PMA	29.85	CaO-A 07	27.61	CAO-A 07 PMA	27.64
DT 23	28.49	DT 23 PMA	29.96	CaO-A 07	28.45	CAO-A 07 PMA	28.16
LT 07	28.61	LT 07 PMA	28.00	CaO-A 23	27.99	CAO-A 23 PMA	27.76
LT 07	28.39	LT 07 PMA	27.99	CaO-A 23	28.28	CAO-A 23 PMA	27.53

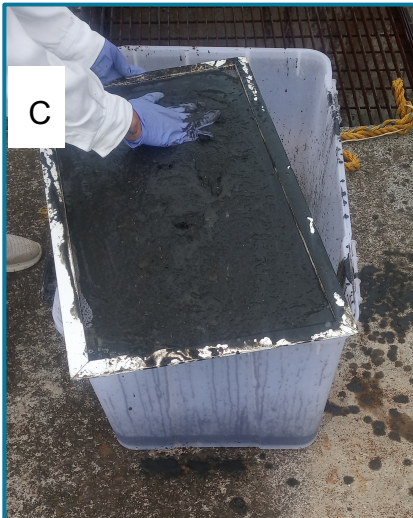
Determinación de *E. coli* (3ª corrida):

Muestra	Cq	Concentración (UFC/ml)
NTC	N/A	
NTC	N/A	
NTC	N/A	
Std -2	24.12	1.00E+06
Std -3	27.76	1.00E+05
Std -4	30.48	1.00E+04
Std -4	31.91	1.00E+04
Std -5	35.30	1.00E+03
Std -5	34.31	1.00E+03
Std -7	N/A	1.00E+01
Std -7	N/A	1.00E+01



Muestra	Cq	Muestra	Cq	Muestra	Cq	Muestra	Cq
LP 17	24.84	LP 17 PMA	26.57	LT 15	25.62	LT 15 PMA	25.98
LP 17	25.21	LP 17 PMA	25.97	LT 15	25.77	LT 15 PMA	26.52
LP 15	26.17	LP 15 PMA	26.54	CAO 17	27.32	CAO 17 PMA	27.10
LP 15	25.80	LP 15 PMA	26.57	CAO 17	27.98	CAO 17 PMA	27.51
DM 17	26.07	DM 17 PMA	27.46	CAO 15	30.34	CAO 15 PMA	29.13
DM 17	26.05	DM 17 PMA	27.04	CAO 15	29.07	CAO 15 PMA	28.74
DM 15	26.61	DM 15 PMA	26.28	DTT A 17	33.12	DTT A 17 PMA	33.31
DM 15	26.84	DM 15 PMA	26.47	DTT A 17	34.04	DTT A 17 PMA	33.59
DTT 17	32.46	DTT 17 PMA	33.81	DTT A 15	34.85	DTT A 15 PMA	34.12
DTT 17	32.73	DTT 17 PMA	33.86	DTT A 15	34.64	DTT A 15 PMA	33.95
DTT 15	33.70	DTT 15 PMA	33.94	DT A 17	29.22	DT A 17 PMA	29.71
DTT 15	32.88	DTT 15 PMA	34.65	DT A 17	30.19	DT A 17 PMA	29.69
DT 17	28.21	DT 17 PMA	29.28	DT A 15	28.92	DT A 15 PMA	30.01
DT 17	28.00	DT 17 PMA	29.51	DT A 15	29.27	DT A 15 PMA	29.39
DT 15	28.84	DT 15 PMA	29.03	CAO A 17	26.74	CAO 17 PMA	28.88
DT 15	28.14	DT 15 PMA	28.79	CAO A 17	27.52	CAO 17 PMA	29.32
L 17	25.52	LT 17 PMA	26.45	CAO A 15	27.11	CAO A 15 PMA	27.69
L 17	25.51	LT 17 PMA	26.45	CAO A 15	27.27	CAO A 15 PMA	27.38

ANEXO III. EVIDENCIA FOTOGRÁFICA



Punto de muestreo de lodo primario (A y B) en Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Cerro de la Estrella”. Tamizaje y embalaje de lodo primario (C y D).



Termohidrolizador de lodos (E) y digestores anaerobios (F) en operación dentro del cuarto a temperatura controlada en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA) del Instituto de Ingeniería de la UNAM.