



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DINÁMICA MICROBIANA**

**DEL PRE-TRATAMIENTO TÉRMICO / DIGESTIÓN ANAEROBIA**

**PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOSÓLIDOS CLASE A**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

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

**SERGIO MAURICIO MAGOS NAVARRO**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DR. ADALBERTO NOYOLA ROBLES**

**(INSTITUTO DE INGENIERÍA – UNAM)**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**DR. ADALBERTO NOYOLA ROBLES (INSTITUTO DE INGENIERÍA – UNAM)**

**DRA. MARISA MAZARI HIRIART (INSTITUTO DE ECOLOGÍA – UNAM)**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE (FACULTAD DE QUÍMICA – UNAM)**

**MÉXICO, D. F.**

**ABRIL, 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



Esta investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental en el Edificio 5 del Instituto de Ingeniería de la UNAM, mediante el apoyo del Proyecto Interno 7003 (II-UNAM) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

El Jurado de Examen estuvo constituido por los siguientes académicos:

<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Amelia Farrés González-Saravia
<b>VOCAL</b>	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
<b>VOCAL</b>	Dr. Francisco Ruiz Terán
<b>VOCAL</b>	Dra. María Amanda Gálvez Mariscal
<b>SECRETARIO</b>	Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

Se extiende un muy especial agradecimiento a todos y cada uno de los miembros del jurado por la dedicación, el tiempo y la retroalimentación brindados durante la 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.

## DEDICATORIAS

A Dios Padre Omnipotente, Señor de los Ejércitos, quien apoya en mí su mano y me enseña a crear mi mundo en sabiduría y alegría. A ti Padre de Todo, por darme la vida, cuidarme en las horas de peligro, mantenerme a salvo durante la realización de esta y otras investigaciones, mostrarme las palabras adecuadas para expresarme y por darme el control durante las horas de tribulación.

A David, mi hermano querido, quien se convierte cada día en un maestro de distintas disciplinas. Te admiro como hombre y como ser humano. Todo lo que me enseñas transforma mi percepción de la vida y me hace reconstituir, volverme a ensamblar con creencias legítimas. La transformación que hiciste en ti y me has compartido, continúa tornándome en un hombre libre y auténtico, que vive en la virtud de saber quién es.

A Sergio, mi padre, a quien tengo la fortuna de tener muy cerca como consejero de guerra y amigo. Es un gusto que estés conmigo para celebrar esta nueva graduación, que va mucho más allá de las ciencias que el hombre entiende. Tu enseñanza es diaria, en cada cosa que dices y tu forma de actuar sigo aprendiendo de ti. He comprendido que ese proceso seguirá por toda la vida.

A María del Carmen, mi madre, que sabe muy bien la forma de elevar mi energía vital, hacerme sentir valioso y procurarme alegrías ilimitadas al tenerte cerca y poderte escuchar o hablar contigo de todo en este mundo.

## AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo fue posible mediante el apoyo de entrañables profesores, amigos y colegas que colaboraron activa y comprometidamente con un servidor. Cada uno de ellos aportó conocimientos y trabajo que merecen ser descritos individualmente a continuación:

A mis tutoras **Dra. Carmen Wachter** y **Dra. Marisa Mazari**: porque sus cuestionamientos siempre me condujeron a encontrar soluciones, compartieron conmigo conocimientos y recomendaciones de vital importancia para diseñar los protocolos experimentales y re-platear los objetivos de cada etapa. De marcada importancia fue la motivación y exigencia que cada una supo brindarme.

**Ponciano Trinidad**: un excelente amigo quien además fue el soporte técnico principal en todo lo relacionado con instrumentación (mantenimiento de motores y sistemas de bombeo, controladores electrónicos de digestores y termohidrolizador, diseño y fabricación de agitadores). Tus enseñanzas son muy apreciadas tanto por mí como por aquellos a quienes pude transmitir las. Fue fantástico aprender la operación del torno.

**Niltze Hernández**: por el gran valor que tiene para mí haberme escuchado en los momentos duros y permitirme enseñarle, muy especialmente porque su tiempo y trabajo fueron para mí toda una ayuda sacando adelante gran parte del “trabajo pesado”, comprendido por los muestreos, preparación de los lodos, preparación de medios de cultivo y lavado de kilos y kilos de vidriería y material diverso.

**Ruth Martín**: por doce años de amistad y enseñanzas... Elevó mi autoestima y supo decirme las palabras exactas cuando fue preciso. Fue ella quien evaluó los diversos protocolos experimentales que diseñé, sugiriendo adecuaciones de enorme utilidad y ayudándome a generar preguntas donde sólo había respuestas.

**Alejandro Camacho**: amigo que a través de años de facultad me enseñó diversas tácticas en microbiología, siendo en este caso quien evaluó junto conmigo los medios de cultivo utilizados durante la investigación y proporcionó las valiosas cepas de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* para los análisis por métodos moleculares.

**Daniel de los Cobos**: por la capacitación para realizar los experimentos de biología molecular y las distintas revisiones del documento de tesis.

A los profesores que integraron mi Jurado de Examen, porque gracias a su trabajo detallado de evaluación me abrieron los ojos y aportaron las recomendaciones que hacen de este documento lo

que siempre quise expresar. Gracias a todos y cada uno de ustedes por entenderme y entrar en sintonía: **Dra. Amelia Farrés, Dr. Francisco Ruiz Terán, Dra. Amanda Gálvez, Dr. Víctor M. Luna Pabello** y muy especialmente a la **Dra. Maricarmen Quirasco** por la estructuración y análisis de la Etapa Experimental 3.

**Ing. Rodolfo Peters Lammel:** quien como titular de la coordinación de instrumentación me concedió amablemente el acceso total al laboratorio de electrónica y los talleres y servicios del Instituto de Ingeniería e incluso participó directamente en la fabricación del diseño que elaboré para los sistemas de agitación de cada digestor anaerobio.

**Albar Cabeza de Vaca:** por presentarme la horrible belleza de la PTAR municipal de Cerro de la Estrella y contactarme con el personal a cargo, además de valiosos consejos e historias terroríficas que fueron las mejores advertencias de seguridad para efectuar muestreos y manejo de los lodos.

**Balmore Hernández:** quien me enseñara con todo detalle a ensamblar los sistemas de digestión anaerobia en el laboratorio (armado de digestores, colocación de mangueras, operación de bombas y todo lo relacionado con la medición de biogás), además de darme información muy útil para conducirme durante la investigación.

Grupo de Investigación en Procesos Anaerobios (**GIPA**): por las facilidades para el trabajo experimental, muy especialmente a **Margarita Cisneros** y **Roberto Briones**. Así como a mis amigos y colegas, con quienes discutí extensamente los puntos que integran esta investigación, aportaron valiosas recomendaciones e inclusive trabajo: **Tania Gómez, Carolina Marini, Miguel Herrera, Alexandra Cerón, Rodolfo Cortés, Elena Villalba, Monica Salazar** y los entrañables **Janet Jiménez y Yans Guardia**, así como a mis más recientes amigas **Andrea Díaz y Adriana Isaak**.

**CONACyT:** que fue la institución que aportó una parte de los recursos con los que solventé los gastos de operación durante los cuatro semestres de maestría.

**Leticia García:** Nuestra querida “llave maestra” del Posgrado en Ciencias Bioquímicas. Porque tus consejos y recomendaciones se han acompañado siempre de eficiencia absoluta y un trato de amigos. Con gran cariño te agradezco todas tus atenciones.

**A mis Padres y mi Hermano David:** por la paciencia, el entendimiento y la motivación. Fue imprescindible su ayuda, principalmente cuando aparecían los grandes problemas y la pérdida de las ilusiones. De forma especial, agradezco enormemente todos los recursos económicos y tecnológicos que me brindaron para terminar con el proceso de obtención del grado durante los casi cuatro años que duró este pasaje esotérico.

Personal del Instituto de Ingeniería: quienes me acompañaron durante las noches de trabajo y fines de semana, cuidando de mí y haciéndome más llevadera la carga. Muy especialmente a **Doña Marina** y Andrés, así como al personal de vigilancia de la Torre de Ingeniería que cuidó mi motocicleta y amenizó las madrugadas: Leobardo, David y Gisela.

Y hacia el final, en términos cronológicos, habiendo terminado las fases experimentales y habiendo cumplido con los compromisos que contraí con el Instituto de Ingeniería, aparecieron mis Nuevos Maestros durante los quince intensos meses del proceso de construcción de este documento de tesis:

Ustedes se han vuelto una guía para todo en mi nueva vida. Las enseñanzas de cada uno me han hecho crecer en un poco más de un año lo que a la mayoría le llevaría media vida (o quizás toda ella). Citándolos a continuación, **Shaun “T” Thompson, Tony Horton, Fernando Malkún Rojas, José Luis Parise, Henry Lincoln, Enrique de Vicente, Fresia Castro, Marisol González-Sterling y Nubia Quiroga**. Y cito también a quienes sembraron en mí la curiosidad y despertaron mi conciencia en Paleoastronáutica, Exobiología, Gnosis y Ariosofía: **Erich Von Däniken, Giorgio Tsoukalos, Philip Coppens (QEPD), David Childress, Robert Bauval, Christopher Dunn y David Wilcock**. Y los dos más recientes -los Pablos- diametralmente opuestos y absolutamente geniales, **Lic. Juan Pablo García Olvera y Lic. Pablo Santa Cruz de la Vega**.

# ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	15
RESUMEN	16
1. INTRODUCCIÓN	17
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 LA NORMATIVIDAD MEXICANA EN MATERIA DE LODOS RESIDUALES	19
2.2 LA DIGESTIÓN ANAEROBIA COMO MÉTODO DE ESTABILIZACIÓN DE LODOS RESIDUALES	21
2.2.1 BIOQUÍMICA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA	22
2.2.2 DIVERSAS ALTERNATIVAS DE DIGESTIÓN ANAEROBIA	23
2.2.3 ARRANQUE DE DIGESTORES ANAEROBIOS	25
2.2.4 OPERACIÓN DE DIGESORES ANAEROBIOS	26
2.2.5 VARIABLES QUE INFLUYEN EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA	28
2.3 PRE-TRATAMIENTO DE LODOS	29
2.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PRE-TRATAMIENTOS TÉRMICOS	33
2.3.2 PRE-TRAMIENTOS TÉRMICOS MODERADOS	36
2.4 DESINFECCIÓN DE LODOS	36
2.4.1 DESINFECCIÓN DE LODOS: LA TERMINOLOGÍA	38
2.4.2 CÓMO SE DESARROLLAN LOS PROCESOS DE DESINFECCIÓN	39
2.4.2.1 CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN MICROBIANA	40
2.4.2.2 LAS ECUACIONES PROPUESTAS POR LA US EPA	41
2.4.2.3 EL DIAGRAMA DE STRAUCH	41
2.4.3 DESINFECCIÓN TÉRMICA: CONSIDERACIONES ADICIONALES	42
2.4.4 LOS FENÓMENOS DE SUPERVIVENCIA MICROBIANA	44
2.4.5 REACTIVACIÓN Y RECRECIMIENTO MICROBIANOS: LA TERMINOLOGÍA	45
2.4.6 IMPORTANCIA DE ASEGURAR LA DESINFECCIÓN DE LOS LODOS	47
2.4.7 PRODUCCIÓN DE OLORES NOCIVOS	49
2.5 MONITOREO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LODOS Y BIOSÓLIDOS	50
2.5.1 CALIDAD MICROBIOLÓGICA: LA TERMINOLOGÍA	52
2.5.2 CONSIDERACIONES ACERCA DE LAS ENTEROBACTERIAS EN ESTUDIO	54
2.5.3 MÉTODOS DE CULTIVO ESTÁNDAR (MCE)	54
2.5.4 MÉTODOS MOLECULARES (MM)	56



2.5.5	COMPARACIÓN ENTRE LOS MCE Y MM	57
2.5.6	CUANTIFICACIÓN CELULAR: EL ADN TOTAL	58
2.5.7	DIFERENCIACIÓN ENTRE CÉLULAS VIABLES E INVIABLES: PMA	59
2.6	PRE-TRATAMIENTO TÉRMICO Y ENFRIAMIENTO DEL LODO	61
2.6.1	RAPIDEZ DE ENFRIAMIENTO	62
2.7	DESARROLLO DEL SISTEMA PT/DAM (PRE-TRATAMIENTO TÉRMICO / DIGESTIÓN ANAEROBIA MESÓFILA)	63
2.8	ESTRUCTURACIÓN DE LA FASE EXPERIMENTAL	65
3.	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
4.	METODOLOGÍA	68
4.1	ETAPA DE EXPERIMENTACIÓN 1 - DAM: ARRANQUE Y OPERACIÓN DE DIGESTORES D-I, D-II Y D-III	
4.1.1	OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LODOS DE PURGA	68
4.1.2	PRE-TRATAMIENTO DE LODOS CRUDOS (PT)	69
4.1.3	PREPARACIÓN DE LOS TRES DIFERENTES INÓCULOS	70
4.1.4	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS – METODOS DE CULTIVO ESTÁNDAR	70
4.1.5	OPERACIÓN DE DIGESTORES D-II, D-III Y D-III	73
4.2	ETAPA DE EXPERIMENTACIÓN 2 - CINÉTICAS DE REACTIVACIÓN/RECRECIMIENTO POR MÉTODOS DE CULTIVO ESTÁNDAR	74
4.2.1	LODOS DE PURGA	74
4.2.2	PRE-TRATAMIENTO DE LODOS CRUDOS	74
4.2.3	RAPIDEZ DE ENFRIAMIENTO	74
4.2.4	LOTES E INCUBACIÓN	74
4.2.5	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	75
4.3	ETAPA DE EXPERIMENTACIÓN 3 – CINÉTICAS DE REACTIVACIÓN/RECRECIMIENTO ANALIZADAS POR MÉTODOS MOLECULARES	75
4.3.1	LODOS DE PURGA	76
4.3.2	PRE-TRATAMIENTO DE LODOS CRUDOS	76
4.3.3	RAPIDEZ DE ENFRIAMIENTO	76
4.3.4	LOTES E INCUBACIÓN	76
4.3.5	ELECCIÓN DE LAS CINÉTICAS	76
4.3.6	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS CON MONOAZIDA DE PROPIDIO (PMA)	77
4.3.7	EXTRACCIÓN DE ADN	77
4.3.8	AMPLIFICACIÓN DEL ADN POR PCR DE TIEMPO FINAL	77
4.3.9	ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	78

<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>80</b>
<b>5.1 ETAPA DE EXPERIMENTACIÓN 1 – DAM</b>	<b>80</b>
<b>5.1.1 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DE LOS DIGESTORES</b>	<b>80</b>
<b>5.1.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE LOS DIGESTORES</b>	<b>82</b>
<b>5.1.3 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE RETENCIÓN DEL LODO (TRS) Y EL MEZCLADO SOBRE LOS MICROORGANISMOS</b>	<b>86</b>
<b>5.1.4 INFLUENCIA DEL INÓCULO</b>	<b>87</b>
<b>5.1.5 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE PRE-TRATAMIENTO</b>	<b>87</b>
<b>5.1.6 ACERCA DE EMPLEAR MÉTODOS DE CULTIVO ESTÁNDAR</b>	<b>89</b>
<b>5.2 ETAPA DE EXPERIMENTACIÓN 2 – CRR POR MÉTODOS DE CULTIVO ESTÁNDAR</b>	<b>89</b>
<b>5.2.1 PRE-TRATAMIENTOS E INACTIVACIÓN</b>	<b>89</b>
<b>5.2.2 LA RAPIDEZ DE ENFRIAMIENTO Y EL RECRECIMIENTO</b>	<b>91</b>
<b>5.2.3 IMPACTO DEL ENFRIAMIENTO ACELERADO Y LA TEMPERATURA FINAL</b>	<b>93</b>
<b>5.2.4 LAS CONCENTRACIONES CONSTANTES EN EL NMP</b>	<b>95</b>
<b>5.2.5 LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp.</b>	<b>95</b>
<b>5.2.6 ¿SON LOS COLIFORMES FECALES UN INDICADOR ADECUADO?</b>	<b>96</b>
<b>5.2.7 LA INACTIVACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. Y COLIFORMES FECALES EN OTRAS INVESTIGACIONES</b>	<b>97</b>
<b>5.3 ETAPA DE EXPERIMENTACIÓN 3 – CRR POR MÉTODOS MOLECULARES</b>	<b>98</b>
<b>5.3.1 TRATAMIENTOS CON MONOAZIDA DE PROPIDIO (PMA)</b>	<b>98</b>
<b>5.3.2 VISUALIZACIÓN DE BANDAS EN GELES DE AGAROSA</b>	<b>98</b>
<b>5.3.3 RESULTADOS DE ACUERDO CON CADA CINÉTICA</b>	<b>99</b>
<b>5.3.3.1 CINÉTICA 80 °C/60 min/ACELERADO</b>	<b>99</b>
<b>5.3.3.2 CINÉTICA 80 °C/60 min/PAULATINO</b>	<b>101</b>
<b>5.3.3.3 CINÉTICA 70 °C/60 min/ACELERADO</b>	<b>103</b>
<b>5.3.3.4 CINÉTICA 70 °C/60 min/PAULATINO</b>	<b>105</b>
<b>5.3.4 PERSISTENCIA DE COLIFORMES FECALES y <i>Salmonella</i> spp.</b>	<b>106</b>
<b>5.3.5 EFECTO DE LOS PRE-TRATAMIENTOS</b>	<b>106</b>
<b>5.3.6 EFECTOS DEL CALOR SOBRE LA ESTRUCTURA CELULAR BACTERIANA</b>	<b>107</b>
<b>5.3.7 EFECTO DEL ENFRIAMIENTO SOBRE LA ESTRUCTURA CELULAR BACTERIANA</b>	<b>108</b>
<b>5.3.8 EL ESTADO “VIALE PERO NO-CULTIVABLE” (VPNC)</b>	<b>108</b>
<b>5.3.9 DAÑOS EN LA ESTRUCTURA CELULAR BACTERIANA</b>	<b>109</b>
<b>5.3.10 CONSIDERACIONES FINALES</b>	<b>109</b>
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>111</b>

<b>6.1 CONCLUSIONES</b>	
<b>6.1.1</b> CON BASE EN LOS ESTUDIOS POR MCE	<b>111</b>
<b>6.1.2</b> CON BASE EN LOS ESTUDISO POR MM	<b>111</b>
<b>6.2 RECOMENDACIONES</b>	<b>112</b>
ANEXO I. ANÁLISIS DE LA NOM-004-SEMARNAT-2002 CON UN ENFOQUE MICROBIOLÓGICO	<b>114</b>
<b>A.1.1</b> LOS MICROORGANISMOS CONTEMPLADOS EN LA NOM-004-SEMARNAT-2002	<b>115</b>
<b>A.1.2</b> CUÁLES PODRÍAN SER MEJORES INDICADORES Y PATÓGENOS QUE LOS CONTEMPLADOS EN LA NOM-004-SEMARNAT-2002	<b>116</b>
<b>A.1.3</b> ¿CÓMO SE ELIGE UN INDICADOR?	<b>120</b>
<b>A.1.4</b> PROPUESTAS DE OTROS INVESTIGADORES SOBRE NUEVOS PATÓGENOS	<b>122</b>
<b>A.1.5</b> TIEMPO DE PERMANENCIA EN EL PUNTO DE APLICACIÓN	<b>124</b>
<b>A.1.6</b> CONSIDERACIONES AL RESPECTO DE LOS PATÓGENOS	<b>125</b>
ANEXO II. METODOLOGÍAS DE ARRANQUE	<b>126</b>
<b>A.2.1</b> DIGESTOR D-II (INÓCULO CONVENCIONAL)	<b>126</b>
<b>A.2.2</b> DIGESTORES D-I Y D-III (INÓCULO NO-CONVENCIONAL)	<b>128</b>
ANEXO III. TÉCNICAS ALTERNAS PARA CUANTIFICACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp.	<b>130</b>
<b>A.3.1</b> CHEN <i>et al.</i> (2012)	<b>130</b>
<b>A.3.2</b> ZÁBRANSKÁ <i>et al.</i> (2003)	<b>130</b>
ANEXO IV. REFERENCIAS SOBRE LA APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES EN ANÁLISIS DE LODOS, BIOSÓLIDOS, COMPOSTAS Y SUELOS	<b>131</b>
ANEXO V. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DAM: TABLAS COMPLEMENTARIAS	<b>133</b>
ANEXO VI. TABLA PARA CALCULAR EL NMP	<b>138</b>
REFERENCIAS	<b>139</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Concentraciones promedio de microorganismos y virus comúnmente encontrados en lodos crudos (Carrington, 2001)	<b>19</b>
<b>Tabla 2.2.</b> Límites máximos permisibles para patógenos y parásitos en lodos y biosólidos NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003)	<b>20</b>
<b>Tabla 2.3.</b> Límites máximos permisibles para metales pesados en biosólidos NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003)	<b>21</b>
<b>Tabla 2.4.</b> Aprovechamiento de biosólidos NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003)	<b>21</b>
<b>Tabla 2.5.</b> Efectos de pre-tratamientos térmicos de temperatura moderada sobre los lodos estabilizados por digestión anaerobia. (Carrère <i>et al.</i> , 2010)	<b>30</b>
<b>Tabla 2.6.</b> Efectos de pre-tratamientos térmicos de alta temperatura sobre los lodos estabilizados por digestión anaerobia (Carrère <i>et al.</i> , 2010)	<b>31</b>
<b>Tabla 2.7.</b> Efectos de pre-tratamientos químicos oxidantes sobre los lodos estabilizados por digestión anaerobia (Carrère <i>et al.</i> , 2010)	<b>34</b>
<b>Tabla 2.8.</b> Efectos de pre-tratamientos termo-químicos sobre los lodos estabilizados por digestión anaerobia (Carrère <i>et al.</i> , 2010)	<b>35</b>
<b>Tabla 2.9.</b> Patógenos de origen fecal encontrados comúnmente en lodos residuales. (Carrington, 2001)	<b>37</b>
<b>Tabla 2.10.</b> Algunos microorganismos y las condiciones necesarias para inactivarlos térmicamente (con base en Tchobanoglous <i>et al.</i> , 1994)	<b>38</b>
<b>Tabla 2.11.</b> Compendio de tratamientos de desinfección para lodos residuales (Carrington, 2001)	<b>43</b>
<b>Tabla 2.12.</b> Niveles de Desinfección requeridos para inactivar patógenos en lodos residuales (Gattie y Lewis, 2004)	<b>45</b>
<b>Tabla 2.13.</b> Tiempos de supervivencia de agentes patógenos en suelos y vegetación (Smith, 2008)	<b>47</b>
<b>Tabla 2.14.</b> Factores que influyen en la supervivencia de patógenos en biosólidos aplicados en suelos (Carrington, 2001)	<b>48</b>
<b>Tabla 2.15.</b> Factores que influyen en el decaimiento de patógenos en puntos de aplicación (Smith S.R. 2008)	<b>49</b>
<b>Tabla 2.16.</b> Especificaciones para la calidad biológica de biosólidos según la normatividad de distintos países (con base en Torres <i>et al.</i> , 2009)	<b>51</b>
<b>Tabla 2.17.</b> Técnicas de Extracción de ADN en muestras de biosólidos y aguas residuales, informadas en distintas investigaciones (Von Frankenhuyzen <i>et al.</i> , 2011)	<b>58</b>
<b>Tabla 2.18.</b> Niveles de inactivación () de algunas bacterias y virus durante el tratamiento de lodos residuales mostrados en órdenes logarítmicos (Smith, 2008)	<b>65</b>
<b>Tabla 4.1.</b> Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos analizados: metodologías y frecuencia de muestreo	<b>72</b>
<b>Tabla 4.2.</b> Condiciones evaluadas e intervalos de muestreo mediante las Cinéticas de Reactivación/Recrecimiento Microbianas	<b>75</b>
<b>Tabla 4.3.</b> Cinéticas de reactivación/ recrecimiento microbianas analizadas cualitativamente por métodos moleculares para diferenciar células viables de células inviables mediante el uso de la <i>monoazida de propidio</i> (PMA) y amplificación del ADN por PCR de tiempo final.	<b>76</b>
<b>Tabla 4.4.</b> Cebadores específicos para coliformes fecales y <i>Salmonella</i> spp. para amplificación del ADN por PCR	<b>78</b>
<b>Tabla 5.1.</b> Concentración de coliformes fecales y <i>Salmonella</i> spp. en los tres inóculos estudiados	<b>82</b>
<b>Tabla 5.2.</b> Concentración de coliformes fecales y <i>Salmonella</i> spp. en el D-I a través del período de operación	<b>82</b>

<b>Tabla 5.3.</b> Concentración de coliformes fecales y <i>Salmonella</i> spp. en el D-II a través del período de operación	<b>83</b>
<b>Tabla 5.4.</b> Concentración de coliformes fecales y <i>Salmonella</i> spp. en el D-III a través del período de operación	<b>83</b>
<b>Tabla 5.5.</b> Análisis Microbiológicos de algunas muestras de lodos crudos durante la operación de los digestores	<b>86</b>
<b>Tabla 5.6.</b> Análisis Microbiológicos de algunas muestras de lodos pre-tratados a 70° C/60 min, con enfriamiento paulatino, durante la operación de los digestores	<b>88</b>
<b>Tabla 5.7.</b> Análisis Microbiológicos de algunas muestras de lodos pre-tratados a 80° C/60 min, con enfriamiento paulatino, durante la operación de los digestores	<b>88</b>
<b>Tabla 5.8.</b> Concentración de coliformes fecales y <i>Salmonella</i> spp antes y después del pre-tratamiento térmico de 70 °C durante 60 min	<b>90</b>
<b>Tabla 5.9.</b> Concentración de coliformes fecales y <i>Salmonella</i> spp antes y después del pre-tratamiento térmico de 80 °C durante 60 min	<b>90</b>
<b>Tabla 5.10.</b> Cinética de Reactivación/Recrecimiento 80 °C/60 min/enfriamiento acelerado: Ordenamiento en geles de agarosa de las muestras tratadas con-PMA y sin-PMA, amplificadas por PCR Múltiplex y Uniplex	<b>100</b>
<b>Tabla 5.11.</b> Cinética de Reactivación/Recrecimiento 80 °C/60 min/enfriamiento paulatino: Ordenamiento en geles de agarosa de las muestras tratadas con-PMA y sin-PMA, amplificadas por PCR Múltiplex y Uniplex	<b>102</b>
<b>Tabla 5.12.</b> Cinética de Reactivación/Recrecimiento 70 °C/60 min/enfriamiento acelerado: Ordenamiento en geles de agarosa de las muestras tratadas con-PMA y sin-PMA, amplificadas por PCR Múltiplex y Uniplex	<b>104</b>
<b>Tabla 5.13.</b> Cinética de Reactivación/Recrecimiento 70 °C/60 min/enfriamiento paulatino: Ordenamiento en geles de agarosa de las muestras tratadas con-PMA y sin-PMA, amplificadas por PCR Múltiplex y Uniplex	<b>105</b>
<b>Tabla A-1.</b> Los patógenos de origen fecal hallados comúnmente en lodos y las enfermedades o síntomas que producen en el ser humano. Fuentes principales: Carrington (2001), Moeller-Ferat (2001), Jenkins <i>et al.</i> (2007), Tomasini (2007), Arthurson (2008) y Smith (2008)	<b>117</b>
<b>Tabla A-2.</b> Valores de pH, alcalinidades y relación $\alpha$ durante la operación del digestor D-I	<b>133</b>
<b>Tabla A-3.</b> Valores de pH, alcalinidades y relación $\alpha$ durante la operación del digestor D-II	<b>134</b>
<b>Tabla A-4.</b> Valores de pH, alcalinidades y relación $\alpha$ durante la operación del digestor D-III	<b>135</b>
<b>Tabla A-5.</b> Valores de Sólidos Totales (ST), Sólidos Totales Volátiles (STV) y Sólidos Totales Fijos (STF) en el D-I	<b>136</b>
<b>Tabla A-6.</b> Valores de Sólidos Totales (ST), Sólidos Totales Volátiles (STV) y Sólidos Totales Fijos (STF) en el D-III	<b>136</b>
<b>Tabla A-7.</b> Valores de Sólidos Totales (ST), Sólidos Totales Volátiles (STV) y Sólidos Totales Fijos (STF) en el D-II	<b>137</b>
<b>Tabla A-8</b> Número Más Probable para series de tres tubos con 0.1, 0.01 y 0.001 g de inóculo cada uno (NMP/g) del <i>Bacteriological Analytical Manual</i> (BAM) de la <i>Food and Drugs Administration</i> (FDA), EE.UU.	<b>138</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Diagrama del flujo del carbono desde polímeros orgánicos hacia metano durante la producción de biogás (con base en Pind et al., 2003).	<b>24</b>
<b>Figura 2.2.</b> Esquema de un tren de tratamiento estándar que emplea lodos activados y los puntos en donde son aplicados los distintos tipos de pre-tratamiento y co-tratamiento.	<b>32</b>
<b>Figura 2.3.</b> Requerimientos de temperatura-tiempo para producir lodo <i>virtualmente libre de patógenos</i> (Strauch 1991)	<b>42</b>
<b>Figura 2.4.</b> Estructura molecular de la Monoazida de Etidio (EMA) y la Monoazida de Propidio (PMA)	<b>59</b>
<b>Figura 2.5.</b> Mecanismo de reacción entre la monoazida de propidio y el ADN empleado fotólisis, propuesto por Nocker et al. (2006)	<b>60</b>
<b>Figura 4.1.</b> Esquema del dispositivo termohidrolizador de lodos.	<b>69</b>
<b>Figura 4.2.</b> Ilustración de un digestor anaerobio e hidrolizador de lodos (Con base en Rubio-Loza y Noyola, 2010)	<b>73</b>
<b>Figura 4.3.</b> Marcador de peso molecular (GR), GeneRuler® (100-5000pb).	<b>79</b>
<b>Figura 5.1.</b> Monitoreo del Valor $\alpha$ en los tres digestores anaerobios mesófilos (D-I, D-II y D-III)	<b>81</b>
<b>Figura 5.2.</b> Monitoreo del valor de pH en los tres digestores anaerobios mesófilos (D-I, D-II y D-III)	<b>81</b>
<b>Figura 5.3.</b> Concentración de coliformes fecales (CF) y <i>Salmonella</i> spp. (S) en el digestor D-I a través del período de operación.	<b>84</b>
<b>Figura 5.4.</b> Concentración de coliformes fecales (CF) y <i>Salmonella</i> spp. (S) en el digestor D-II a través del período de operación.	<b>84</b>
<b>Figura 5.5.</b> Concentración de coliformes fecales (CF) y <i>Salmonella</i> spp. (S) en el digestor D-III a través del período de operación.	<b>84</b>
<b>Figura 5.6.</b> Descenso de la temperatura en función del tiempo (rapidez de enfriamiento) en lotes de lodos pre-tratados a 80 °C/ 60 minutos, seguido de enfriamiento paulatino, enfriamiento rápido o enfriamiento acelerado.	<b>91</b>
<b>Figuras 5.7-A y 5.7-B.</b> Concentración de coliformes fecales (A) y <i>Salmonella</i> spp. (B) en función del tiempo de incubación a $35 \pm 1$ °C, en lodos tratados térmicamente a 70 °C y 80 °C, y enfriados mediante corriente de aire (paulatino) y baño de hielo (rápido) hasta 25 °C.	<b>92</b>

**Figuras 5.8-A y 5.8-B.** Concentración de coliformes fecales (A) y *Salmonella* spp. (B) en función del tiempo de incubación a  $35 \pm 1$  °C, en lodos tratados térmicamente a 70 °C y 80 °C, y enfriamiento acelerado hasta tres diferentes temperaturas (20 °C, 10 °C y 0 °C). **94**

**Figura 5.9.** Presencia de bandas características de coliformes fecales (carriles 7 a 12) y *Salmonella* spp. (carriles 1 a 6) en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™ **99**

**Figuras 5.10-A y 5.10-B.** Cinética de reactivación/recrecimiento microbiana con condiciones de pre-tratamiento de 80 °C/60 min/enfriamiento acelerado e incubación a  $35 \pm 1$  °C/72 h. Presencia de bandas características (carriles 1 a 36) de coliformes fecales (A) y *Salmonella* spp. (B) en geles de agarosa al 1% teñido con GelRed™ **100**

**Figuras 5.11-A y 5.11-B.** Cinética de reactivación/recrecimiento microbiana con condiciones de pre-tratamiento de 80 °C/60 min/enfriamiento paulatino e incubación a  $35 \pm 1$  °C/144 h. Presencia de bandas características (carriles 1 a 24) de coliformes fecales (A) y *Salmonella* spp. (B) en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed™ **102**

**Figuras 5.12-A y 5.12-B.** Cinética de reactivación/recrecimiento microbiana con condiciones de pre-tratamiento de 70 °C/60 min/enfriamiento acelerado e incubación a  $35 \pm 1$  °C/72 h. Presencia de bandas características (carriles 1 a 18) de coliformes fecales (A) y *Salmonella* spp. (B) en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed™ **104**

**Figuras 5.13-A y 5.13-B.** Cinética de reactivación/recrecimiento microbiana con condiciones de pre-tratamiento de 70 °C/60 min/enfriamiento paulatino e incubación a  $35 \pm 1$  °C/72 h. Presencia de bandas características (carriles 1 a 18) de coliformes fecales (A) y *Salmonella* spp. (B) en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed™ **105**

## ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math></b>	Relación de alcalinidades/Valor Alfa
<b>AGVs</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>CRR</b>	Cinéticas de reactivación/recrecimiento microbianas
<b>DAM</b>	Digestión Anaerobia Mesófila
<b>D-I</b>	Digestor anaerobio mesófilo uno
<b>D-II</b>	Digestor anaerobio mesófilo dos
<b>D-III</b>	Digestor anaerobio mesófilo tres
<b>DQO</b>	Demanda Química de Oxígeno
<b>DQOs</b>	Demanda Química de Oxígeno (soluble)
<b>GIPA</b>	Grupo de Investigación de Procesos Anaerobios, Instituto de Ingeniería-UNAM
<b>GR</b>	Control de peso molecular GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., USA)
<b>LC</b>	Lodo crudo (mezcla de lodo primario y secundario)
<b>LD</b>	Lodo digerido
<b>LP</b>	Lodo primario
<b>LS</b>	Lodo secundario
<b>MCE</b>	Métodos de cultivo estándar
<b>MM</b>	Métodos moleculares
<b>PMA</b>	Monoazida de Propidio
<b>PT</b>	Lodo Pre-tratado ó Pre-tratamiento (en función del contexto)
<b>PTAR</b>	Planta de Tratamiento de Aguas Residuales
<b>ST</b>	Sólidos totales
<b>STF</b>	Sólidos totales fijos
<b>STV</b>	Sólidos totales volátiles
<b>TRS</b>	Tiempo de retención del lodo
<b>UASB</b>	Reactor de Flujo Ascendente de Lecho de lodos
<b>US EPA</b>	Agencia para la Protección del Ambiente de los Estados Unidos de Norteamérica
<b>VPNC</b>	Células microbianas en estado Viable pero no Cultivable



## RESUMEN

Se aplicó en laboratorio un tratamiento de estabilización de lodos de purga (lodos residuales) para obtener biosólidos de Clase A, mediante pre-tratamiento térmico moderado y digestión anaerobia mesófila (arreglo PT/DAM). El trabajo evaluó dos temperaturas de pre-tratamiento (70 °C y 80 °C), con un tiempo de contacto de 60 minutos y tres distintos métodos de enfriamiento (paulatino, rápido y acelerado). Con base en las condiciones estudiadas se encontró que el tratamiento térmico no bastó para la inactivación eficaz de los coliformes fecales y *Salmonella* spp. hasta los límites máximos permitidos por la normatividad mexicana vigente para biosólidos de clase A. Para lograrlo, se requirió de choque térmico para que la temperatura del lodo caliente descendiera rápidamente (de 80 °C a 20 °C en 18 minutos) y de este modo las bacterias en estudio permanecieron inactivas -sin lugar a reactivación o recrecimiento en al menos 72 horas- cuando se mantienen estos lodos a 35 °C ± 1 °C, imitando las condiciones de la digestión anaerobia mesófila.

Para llevar a efecto los análisis microbiológicos, se utilizaron los medios de cultivo estándar (MCE) señalados en la NOM-004-SEMARNAT 2002, que pese a ser los métodos oficiales, presentaron dificultades para detectar a *Salmonella* spp., además de las desventajas intrínsecas de cuantificar bacterias mediante la técnica de número más probable (NMP).

Como pruebas adicionales, se recurrió a los métodos moleculares (MM) para confirmar la presencia de células viables de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en las muestras, para lo cual se adaptó un protocolo de extracción y purificación de ADN, con el fin de discriminar entre células vivas (viables) y células muertas (inviabiles), evitando con ello el inconveniente característico de extraer ADN total.

Con la información microbiológica obtenida por MCE y MM, se llegó a la conclusión de que los coliformes fecales y *Salmonella* spp. sobrevivieron a todos los pre-tratamientos térmicos estudiados, pero su presencia, concentración y estado celular (viable o inviable) no pueden ser conocidos por MCE, pues se incurre tanto en subestimación como en sobreestimación.

Tomando como base lo encontrado durante la experimentación y la literatura, se analizó y discutió la NOM-004-SEMARNAT-2002 con un enfoque crítico, proponiendo otros agentes biológicos de importancia clínica para el contexto mexicano y recomendando reformas a los métodos analíticos.

# 1. INTRODUCCIÓN

El interés por diseñar un proceso de estabilización de lodos eficiente radica en que la normatividad mexicana exige el tratamiento de las aguas residuales municipales y de los lodos resultantes, ya que en una población en crecimiento continuo, la cantidad de agua para tratar aumenta en proporción, dando lugar a una producción cada vez mayor de lodos residuales ricos en materia orgánica putrescible y que contienen agentes biológicos patógenos, convirtiéndolos en foco de infección y un peligro para los seres vivos y el medio ambiente.

En México, la disposición final de los lodos está legislada por la NOM-004-SEMARNAT-2002, que estipula lo referente al tratamiento que debe aplicarse a los lodos para que dejen de ser un peligro para la salud de humanos, animales y medio ambiente, y se conviertan en productos denominados biosólidos, de manejo controlado y seguro.

Las características de los biosólidos son distintas y dan lugar a las clases A (excelente, usos urbanos *con contacto* público directo), B (excelente/bueno, usos urbanos *sin contacto* público directo) y C (excelente/bueno, usos forestales). De forma sucinta, puede decirse que el proceso de estabilización consiste en la transformación de lodos de purga contaminantes en biosólidos aprovechables.

Se conocen distintos métodos de estabilización, pero se pueden clasificar en biológicos, físicos y químicos. Los distintos países aplican unos u otros en función de su geografía, clima, cantidad de lodos, instalaciones y recursos económicos destinados a estos procesos. En el diseño y puesta en marcha de los trenes de tratamiento, se busca siempre abatir los costos de operación para lograr costos de tratamiento lo más reducidos posible.

El proceso diseñado en esta investigación consiste en una etapa de desinfección acoplada a una de estabilización, siendo la primera un pre-tratamiento térmico (PT) moderado (70 °C u 80 °C, durante 60 min) y la segunda la digestión anaerobia mesófila (DAM). La DAM es un proceso biológico generador neto de energía en forma de metano, lo cual le confiere ventajas por sobre otros tratamientos. Pero debido a que comúnmente opera en un rango de temperaturas comprendido entre los 20 °C y 40 °C, es poco eficiente para inactivar agentes biológicos patógenos, de modo que la inactivación previa es un procedimiento necesario para evitar la desinfección de los lodos ya tratados, que puede ser complicada.

Se ha informado de casos (Higgins *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2007 y 2008; Chen *et al.*, 2012) en los que distintos géneros microbianos son inactivados mediante procesos de desinfección, pero transcurrido un tiempo (que puede ser muy variable) se presenta la reactivación de los microorganismos.

Reactivación es el incremento de la concentración de un género bacteriano entre la desinfección y la operación unitaria siguiente (secado y transporte, principalmente), en un período menor al tiempo de duplicación del género en cuestión. Recrecimiento es el desarrollo y multiplicación de las células viables sobrevivientes a un tratamiento de desinfección para un género microbiano.

Este trabajo se enfoca en dilucidar los fenómenos de reactivación/recrecimiento de los coliformes fecales y de *Salmonella* spp. observados en digestores anaerobios mesófilos alimentados con lodos pre-tratados térmicamente (60 °C/ 60 min), en el contexto experimental de un proyecto previo de estabilización de lodos municipales desarrollado por el Grupo de Investigación en Procesos Anaerobios (GIPA) del Instituto de Ingeniería de la UNAM.

La literatura (Arthurson *et al.*, 2008; Carrère *et al.*, 2010; Carrington, 2001; Smith, 2008; US EPA, 2003) señala que los tratamientos térmicos de 55 °C por 240 minutos, o bien 70 °C por 30 minutos garantizarían la obtención de un “lodo virtualmente libre de patógenos”. Sin embargo, se ha encontrado que algunas células microbianas sobreviven al estrés térmico adoptando el estado “viable, pero no cultivable” (VPNC), condición que les impide crecer en medios de cultivo estándar en tanto no se restablezcan las condiciones óptimas para su desarrollo. La supervivencia de células bacterianas VPNC en lodos, puede ser la causa de la reactivación durante la DAM.

Para la detección de células VPNC se requieren métodos moleculares (MM), que implican el uso de la PCR (en sus distintas variantes), en vez de MCE, que dan lugar a sobreestimación o subestimación de las células bacterianas en estudio.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 LA NORMATIVIDAD MEXICANA EN MATERIA DE LODOS RESIDUALES

En toda ciudad, el tratamiento de las aguas residuales se hace necesario para no provocar daños al ambiente y para recuperar el agua que será asignada a otros usos. Para seleccionar y diseñar un proceso, se debe considerar también el manejo adecuado de los residuos sólidos generados durante el tratamiento. Tal es el caso de los lodos residuales (lodos de purga) en Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR).

El lodo residual producido a lo largo del tren de tratamiento, está compuesto por materia orgánica e inorgánica suspendida en el agua residual cruda (lodo primario) y por biomasa producida en los reactores de lodos activados durante el tratamiento secundario (lodo secundario). No obstante, en algunas PTARs se produce lodo fisicoquímico -mediante el tratamiento primario avanzado- cuando se adicionan reactivos como coagulantes. Debido a su naturaleza mayoritariamente orgánica, el lodo residual es susceptible a putrefacción por la actividad microbiana.

Los *lodos de purga* son peligrosos debido a la alta concentración de patógenos y compuestos provenientes de la enorme cantidad de desechos biológico-infecciosos -incluida la materia fecal- que se envían al drenaje mediante las diversas actividades humanas. Entre los agentes biológicos asociados a estos lodos se puede mencionar: bacterias, helmintos, protozoarios, hongos y virus (Neyens y Baeyens, 2003; Cliement *et al.*, 2007; Smith, 2008). Ejemplos sencillos se muestran en la Tabla 2.1. Además, en algunos casos y por las razones anteriormente expuestas, los lodos pueden contener metales pesados y sustancias tóxicas para el ser humano y la vida en general (Appels *et al.*, 2010; y Carrére *et al.*, 2010).

**Tabla 2.1. Concentraciones promedio de microorganismos y virus comúnmente encontrados en lodos crudos (Carrington, 2001)**

<b>Bacterias</b>	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i>	$10^6 \text{ g}^{-1}$ $10^2 \text{ g}^{-1} - 10^3 \text{ g}^{-1}$
<b>Virus</b>	Entéricos	$10^2 \text{ g}^{-1} - 10^4 \text{ g}^{-1}$
<b>Protozoarios</b>	<i>Giardia</i>	$10^2 \text{ g}^{-1} - 10^3 \text{ g}^{-1}$
<b>Helmintos</b>	<i>Ascaris</i> <i>Toxocara</i> <i>Taenia</i>	$10^2 \text{ g}^{-1} - 10^3 \text{ g}^{-1}$ $10 \text{ g}^{-1} - 10^2 \text{ g}^{-1}$ $5 \text{ g}^{-1}$

La legislación mexicana actual en materia de lodos residuales exige la estabilización, que se define como “los procesos físicos, químicos o biológicos a los que se someten los lodos para acondicionarlos para su aprovechamiento y disposición final para evitar o reducir sus efectos contaminantes al medio ambiente” (DOF, 2003). Esto se consigue a través de la inactivación de microorganismos patógenos, reducción de olores desagradables, disminución de la masa y el consiguiente abatimiento del potencial de putrefacción. Dichos productos estables se denominan *biosólidos* y se clasifican en México de acuerdo con los parámetros estipulados en la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003).

Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones y los límites máximos permisibles de contaminantes (biológicos y químicos) en lodos y biosólidos provenientes del desazolve de los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, de las plantas potabilizadoras y de las plantas de tratamiento de aguas residuales, con el fin de posibilitar su aprovechamiento o disposición final y proteger al medio ambiente y la salud humana (DOF, 2003). Es de observancia obligatoria para todas las personas físicas y morales que generen lodos y biosólidos provenientes del desazolve de los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, de las plantas potabilizadoras y de las PTARs.

Las especificaciones que deben cumplir los biosólidos de acuerdo con su clasificación (A, B o C), corresponden con las denominaciones de Excelente (A), Excelente-Bueno (B) y Bueno (C), y se relacionan con el nivel de estabilización alcanzado. Cada clase se relaciona con un rango de aplicaciones del producto final, que implica –en dos de las clases- restricciones de contacto humano o animal con estas sustancias en el medio ambiente. La información se muestra en las Tablas 2.2-2.4.

**Tabla 2.2. Límites máximos permisibles para patógenos y parásitos en lodos y biosólidos NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003)**

CLASE	INDICADOR BACTERIOLÓGICO DE CONTAMINACIÓN	PATÓGENOS	PARÁSITOS
	Coliformes fecales NMP/g en base seca	<i>Salmonella</i> spp. NMP/g en base seca	Huevos de helmintos/g en base seca
<b>A</b>	Menor de 1000	Menor de 3	Menor de 1(viables)
<b>B</b>	Menor de 1000	Menor de 3	Menor de 10
<b>C</b>	Menor de 2,000,000	Menor de 300	Menor de 35

De acuerdo con dichas especificaciones, resulta evidente que las exigencias sanitarias son mayores para los biosólidos de clase A que para las clases B y C. La clase A carece de restricciones de uso, lo cual significa que el manejo es seguro para los operadores, el medio ambiente y los seres vivos que entren en contacto con estos biosólidos. Por esta razón, se tiene mayor interés en estudiar aquellos procesos de estabilización y desinfección que puedan alcanzar la Clase A.

Tabla 2.3. Límites máximos permisibles para metales pesados en biosólidos NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003)

Contaminante (determinados en forma total)	EXCELENTES (mg/kg en base seca)	BUENOS (mg/kg en base seca)
Arsénico	41	75
Cadmio	39	85
Cromo	1200	3000
Cobre	1500	4300
Plomo	300	840
Mercurio	17	57
Níquel	420	420
Zinc	2800	7500

Tabla 2.4. Aprovechamiento de biosólidos NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003)

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

## 2.2 LA DIGESTIÓN ANAEROBIA COMO MÉTODO DE ESTABILIZACIÓN DE LODOS RESIDUALES

Entre los métodos de estabilización clasificados como biológicos y químicos se encuentran:

- Digestión anaerobia
- Digestión aerobia
- Compostaje
- Estabilización alcalina

En lo concerniente a este proyecto se estudia la digestión anaerobia (DA), que consiste en la transformación bioquímica de la materia orgánica en metano, dióxido de carbono y agua, en ausencia de oxígeno.

De acuerdo con Noyola (1998), comparado con otros procesos de estabilización, la digestión anaerobia presenta las siguientes ventajas:

- 1) Reducción de la masa y el volumen de la porción orgánica del lodo mediante su conversión a  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , implicando menores costos en su transporte y disposición final. Esta reducción se encuentra entre el 25 y el 45% de los sólidos totales (ST).
- 2) El biogás producido ( $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ , mayoritariamente) es un gas combustible que convierte a la digestión anaerobia en un proceso productor neto de energía (45 - 65 % de metano).
- 3) Por su estabilidad y características fisicoquímicas, los lodos digeridos pueden ser aprovechados como mejoradores de suelos (fertilizantes naturales).

La principal ventaja de la Digestión Anaerobia es, por sobre todo, que se trata de un proceso generador de energía (Appels *et al.*, 2010). Tanto así, que la energía obtenida mediante la combustión del biogás puede utilizarse para suministrar los requerimientos de calor de los digestores anaerobios, y el exceso de biogás puede emplearse para la producción de la energía eléctrica que se suministra a la PTAR mediante cogeneración. Inclusive, el biogás puede proveer hasta el 60% de la energía eléctrica que impulsa los aireadores del sistema de lodos activados (Noyola, 1998).

### 2.2.1 BIOQUÍMICA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

Para comprender los mecanismos de conversión de los lodos de purga en biogás, debe saberse que la materia orgánica en condiciones anaerobias es convertida en metano y dióxido de carbono por la sinergia de cinco diferentes grupos de microorganismos, tanto facultativos como anaerobios estrictos.

En general, los microorganismos son incapaces de alimentarse de material orgánico en su forma compleja, por lo que los polímeros (polisacáridos, proteínas y lípidos) son inicialmente hidrolizados por enzimas microbianas extracelulares hasta monómeros (compuestos más simples) conocidos como macronutrientes (monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos).

Los macronutrientes, a su vez, son utilizados por microorganismos fermentadores (consumen monosacáridos y aminoácidos) y por microorganismos oxidantes anaerobios (consumen ácidos grasos). Los productos metabólicos son: acetato ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ), hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) e intermediarios como el propionato ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ ) y butirato ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COO}^-$ ), mismos que son oxidados hasta acetato e hidrógeno por un grupo de bacterias conocidas como OHPA (siglas en inglés de: *bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno*), las cuales deben existir en relación sintrófica con las arqueas productoras de metano que consumen hidrógeno (Rubio-Loza, 2004).

El acetato y el hidrógeno son finalmente los verdaderos sustratos de las arqueas metanogénicas, que se dividen en dos grupos tróficos:

- Arqueas metanogénicas hidrogenofílicas, que utilizan el hidrógeno producido para reducir el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en metano (CH<sub>4</sub>)



- Arqueas metanogénicas acetoclásticas, que transforman el acetato (CH<sub>3</sub> COO<sup>-</sup>) en metano. (Esta transformación contribuye con el 70% de la producción de metano en los digestores)



Recapitulando, son seis los procesos metabólicos de conversión identificados en la digestión anaerobia:

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

La Figura 2.1 –con base en Pind *et al.*, 2003- muestra el diagrama de flujo del carbono en la digestión anaerobia, partiendo de polímeros orgánicos y finalizando en metano y dióxido de carbono.

## 2.2.2 DIVERSAS ALTERNATIVAS DE DIGESTIÓN ANAEROBIA

El proceso de digestión anaerobia puede llevarse a cabo en intervalos psicrófilos (5 °C – 20 °C) mesófilos (20 °C – 40 °C) o termófilos (50 °C – 60 °C); por lo general el más común es el mesófilo, porque ofrece mayor estabilidad del proceso en términos de producción de biogás, pH y relación de alcalinidades (Gavala *et al.*, 2003; Appels *et al.*, 2010; Uma-Rani *et al.*, 2012). Es importante señalar que se han puesto en práctica técnicas de digestión anaerobia avanzada (Coelho *et al.*, 2011) y sistemas híbridos (Viau y Peccia, 2009), entre las que se puede mencionar:

- Digestión anaerobia mediante separación de procesos (fermentación/metanogénesis)
- Digestión anaerobia en fases térmicas, TPAD (termofilia/mesofilia; mesofilia/termofilia)
- Digestión anaerobia auto-térmica, ATAD



- Pre-tratamientos (térmico/químico/termo-químico/mecánico) / Digestión anaerobia (mesófila/termófila)
- Digestión anaerobia + compostaje
- Digestión anaerobia + extrusión térmica (*pelletización* mediante calor)

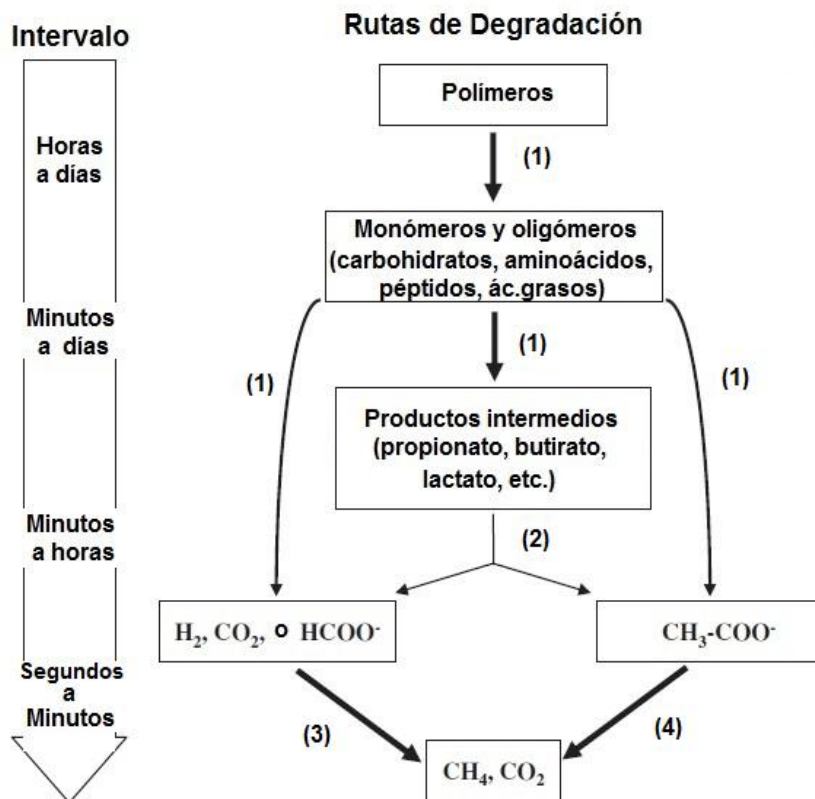


Figura 2.1. Diagrama del flujo del carbono desde polímeros orgánicos hacia metano durante la producción de biogás. (1) Anaerobios fermentativos; (2) Acetogénicas sintróficas; (3) Metanogénicas hidrogenofílicas; (4) Metanogénicas acetoclásticas (con base en Pind *et al.*, 2003).

Los tratamientos que tienen como base el incremento de la temperatura de operación (mayor a 50 °C) se encuentran íntimamente ligados a la inactivación de patógenos, situación que favorece –de acuerdo con la literatura especializada- la obtención de biosólidos de mejor calidad que los obtenidos mediante tratamientos mesófilos exclusivamente (Rojas *et al.*, 2001).

De acuerdo con autores como Aitken *et al.* (2005) o Sidhu y Toze, (2009), el tratamiento térmico es reportado como la mejor opción para inactivar huevos de helmintos en lodos. Además, varios investigadores han recomendado la aplicación de un tratamiento térmico previo a la digestión anaerobia (pre-tratamiento) con el objeto de eliminar la presencia de patógenos en fases posteriores del tren de tratamiento de lodos (Carrington, 2001; Aitken *et al.*, 2005; Lang *et al.* 2007; Smith, 2008).

### 2.2.3 ARRANQUE DE DIGESTORES ANAEROBIOS

Los microorganismos responsables de la digestión anaerobia son nativos de los lodos residuales, pues se asocian con el tracto digestivo de muchas especies, pero también se encuentran difundidos en diversos ecosistemas conviviendo en ambientes favorables para su crecimiento, tales como: fondos de lagunas, estanques y zonas pantanosas, por citar algunos ejemplos.

Cuando se proyecta la operación de un reactor biológico, es mucho más conveniente añadir un cultivo iniciador de la actividad microbiana y alimentarlo con el sustrato de interés; de otro modo, en un reactor que contuviera únicamente el sustrato sin cultivo previo, el desarrollo microbiano tardaría demasiado en presentar actividad (en el intervalo de meses). Al cultivo iniciador se le denomina inóculo y al proceso de añadirlo se le denomina inoculación.

Entre más tiempo tarde un reactor biológico en presentar actividad, el proceso será más costoso e ineficiente. Al período entre la inoculación y los primeros indicios de actividad biológica se le denomina arranque. En el caso de los digestores anaerobios, la actividad a la que se hace mención se denomina actividad metanogénica.

El arranque de reactores biológicos es una actividad delicada y sumamente importante para lograr resultados exitosos. Durante esta fase, la biomasa se reproduce y adapta, por lo que es un período inestable y de transición. Debido a las bajas tasas de generación de los microorganismos anaerobios, el arranque de este tipo de reactores es lento, así que es indispensable apoyarse en un inóculo adecuado.

Un inóculo adecuado es aquel que presenta alta actividad metanogénica, porque acelera la producción de biogás enriquecido en metano. Entre los inóculos sugeridos por Noyola (1994) para reactores anaerobios se puede mencionar: lodo anaerobio digerido, lodo activado de purga adaptado a condiciones anaerobias, estiércol de vaca digerido anaerobiamente, sedimento de lagunas y lodo de fosa séptica. La selección del inóculo dependerá de criterios de diseño asociados tanto con el proceso como con la disponibilidad del inóculo en cantidad suficiente y dentro del presupuesto.

Como es natural, además de la comunidad microbiana encargada de la digestión anaerobia, el inóculo puede contener agentes patógenos; sin embargo, la cantidad y concentración de patógenos dependerá del origen de dicho inóculo.

## 2.2.4 OPERACIÓN DE DIGESTORES ANAEROBIOS

Los digestores tienen una capacidad volumétrica que se denomina volumen útil, que es menor al volumen total. También cuentan con una capacidad de procesamiento de lodos, que está determinada por la actividad biológica del sistema, esto es: a medida que la comunidad anaerobia se desarrolla, demanda mayor cantidad de nutrimentos, mismos que están contenidos en el lodo, tales como material celular, polímeros intra y extracelulares, compuestos orgánicos de menor tamaño, minerales, etc.

Como resultado del consumo de nutrimentos, según se describió bioquímicamente, se producen ácidos grasos volátiles (AGVs), iones bicarbonato mediante la descarboxilación del acetato y finalmente metano y bióxido de carbono (componentes mayoritarios del biogás).

Los ácidos orgánicos producidos reaccionan con los iones bicarbonato presentes en el medio, de forma que el pH no disminuye bruscamente. La cualidad del medio de oponerse a los cambios bruscos de pH se denomina “*capacidad de amortiguamiento*”. Debido a que los AGVs se encuentran disociados a valores de pH característicos de la digestión anaerobia (6.2 a 7.8), contribuyen a la alcalinización del medio.

Para fines de amortiguamiento del pH, la alcalinidad útil es la debida a los bicarbonatos. Conocer la alcalinidad debida a los AGVs es una forma indirecta de medir su concentración, la cual se debe mantener lo más baja posible (Noyola, 1994). En 1983, Jenkins *et al.*, propusieron un método simple para determinar ambos tipos de alcalinidad. La primera -alcalinidad parcial- se calcula con el consumo de ácido hasta un pH de 5.75 (valor de pKa del par ácido carbónico/bicarbonato) y la segunda -alcalinidad total- a partir del pH original hasta pH de 4.3 (valor de pKa del par ácido acético/acetato). De acuerdo con la técnica APHA, el valor se expresa como miligramos de carbonato de calcio por litro.

Puede establecerse una correlación entre la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) y iones bicarbonato, y a su vez una relación directa entre estos compuestos y la actividad metanogénica del digestor. Dicha relación estima el nivel de consumo y conversión de nutrimentos.

Integrando la información, se puede interpretar entonces que el aumento en las concentraciones de AGVs corresponde con los procesos de fermentación y acidogénesis, en tanto que el aumento de bicarbonatos corresponde con la conversión de AGVs y por ende con el aumento en la producción de metano.

De este modo, monitorear la concentración de AGVs y bicarbonatos es una medida del estado metabólico de la comunidad microbiana, que hace posible determinar si están consumiendo el

sustrato (lodo) que se les suministra o es demasiado. Con ello se puede establecer un procedimiento de alimentación, particularmente durante el arranque o aclimatación de la biomasa, para evitar sobrecargar el sistema o por el contrario, no alimentarlo al ritmo que podría recibir.

La totalidad de nutrientes disponibles, o carga orgánica volumétrica, está determinada por la concentración orgánica del lodo (sólidos totales volátiles, STV) y el tiempo que la comunidad microbiana permanezca en contacto con este sustrato dentro del digestor, o bien, por la masa del lodo alimentado por unidad de tiempo y el volumen del digestor.

El tiempo es una variable de suma importancia que obedece a una lógica simple: mientras más tiempo pase el lodo dentro del digestor en agitación adecuada, mayor oportunidad de que sea consumido y convertido en biogás.

Cuando la digestión anaerobia se opera en régimen de lotes, los nutrientes disminuyen con respecto al tiempo y no hay oportunidad de suministrar más lodo; si se opera en régimen continuo o semi-continuo, la alimentación es frecuente y se renuevan los nutrientes, así como se renueva la comunidad microbiana. Cada régimen presenta ventajas y desventajas características.

La operación de un digestor consistirá entonces en establecer relaciones entre la carga orgánica y la temperatura de operación, el tipo de sustrato de alimentación y las características del inóculo.

Durante la fase experimental de la presente investigación, se empleó la relación de alcalinidades o valor  $\alpha$  (cociente de alcalinidad parcial entre alcalinidad total) como medida del desempeño de los digestores anaerobios. Como criterio conservador, se considera que si el valor  $\alpha \geq 0.4$ , el digestor es capaz de procesar la carga orgánica suministrada, pero si la relación  $\alpha < 0.4$  sucede lo contrario, pues el digestor acumula AGVs que no son convertidos en metano. En términos bioquímicos significa que la rapidez de hidrólisis y acidogénesis supera a la metanogénesis. El pH es otra variable que se verá influida por la producción de estos y otros compuestos, por lo que debe medirse para tener una visión más integral del proceso.

Si el valor  $\alpha \geq 0.6$ , puede tomarse la decisión de aumentar la carga al digestor, pero deberán tenerse en cuenta las otras dos variables: pH y volumen de biogás. El pH normalmente se sitúa entre 6.5 y 7.5 como signo de una operación estable de un reactor metanogénico mesófilo.

En esta investigación el valor  $\alpha$ , el pH y la producción y composición de biogás fueron los parámetros elegidos para el seguimiento y monitoreo.

## 2.2.5 VARIABLES QUE INFLUYEN EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

Los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia requieren de factores específicos (ausencia de oxígeno, temperatura, pH, alcalinidad y nutrientes) que favorecen su desarrollo y con ello vuelven más eficiente el proceso de transformación de materia orgánica en biogás. El conocimiento y control de estos factores ayuda a evitar fallas durante el proceso y en caso de ser necesario, hace posible tomar medidas correctivas.

1. Temperatura.- el metabolismo está influenciado directamente por esta variable; como se ha mencionado, la DA puede desarrollarse a intervalos psicrófilos (5 °C – 20 °C) mesófilos (20 °C – 40 °C) y termófilos (50 °C – 60 °C). Las altas temperaturas reducen la tensión superficial de la fase acuosa del lodo, aumentan las tasas de difusión y la solubilidad de compuestos no gaseosos, permitiendo mejores interacciones microorganismo-sustrato, que se traducirán en mayor rapidez de reacción, mayor capacidad hidrolítica y además, la disminución de la solubilidad del oxígeno. La temperatura afecta a las constantes de equilibrio químico, produciendo desplazamientos en los valores de alcalinidad y pH, precipitación o re-disolución de compuestos inorgánicos y cambios en la composición del biogás (Martínez-Arce, 2009).

Los cambios de temperatura afectan a toda la comunidad microbiana, pero de manera más drástica a los organismos metanogénicos (Malina y Pohland, 1992).

2. 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 de este rango, la digestión puede continuar aunque en forma ineficiente hasta un pH de 6.2, en donde las arqueas metanogénicas son afectadas severamente (Noyola, 1998) y a valores de pH alcalinos se afecta principalmente a las metanogénicas acetoclásticas (Malina y Pohland, 1992).
3. Compuestos tóxicos: la presencia de ciertos compuestos puede inhibir tanto a los metanogénicos como al resto de la comunidad. La toxicidad de un gran número de compuestos se relaciona con el pH; por ejemplo, el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), el ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) y los AGVs, son tóxicos en la forma no ionizada, porque pueden difundir a través de la pared celular y disociarse en el citoplasma, produciendo cambios de pH (Martínez-Arce, 2009).
4.  $\text{NH}_3$ : El amoníaco puede inhibir la metanogénesis a concentraciones entre 200-300 mg/l de nitrógeno amoniacal no disociado ( $\text{NH}_3$ ) y pH neutro que corresponde a valores de ion amonio del orden de 5000 mg/l. A pH alcalino, el amoníaco predomina y concentraciones de 1500-3000 mg/l de  $\text{NH}_4^+$  pueden resultar inhibitorias (Noyola, 1998 b).

5.  $H_2S$ : Otro compuesto es el ácido sulfhídrico -producto de la reducción de iones sulfato- pues además de que la reacción compite por el hidrógeno en la reducción del  $CO_2$  a metano, inhibe la metanogénesis si se encuentra en concentraciones superiores a 100-150 mg/l a pH neutros, lo que corresponde aproximadamente a 250 mg/l de sulfuro. Además de la competencia, puede precipitar micronutrientes como el hierro, cobalto y níquel, imposibilitando su consumo (Martínez-Arce, 2009).
6. AGVs: Como ya se adelantó, los AGVs pueden acumularse por efecto de alimentar lodo residual a una tasa mayor de la que es posible metabolizar los AGVs producidos durante la acidogénesis (sobre-carga del digestor) y consecuentemente llevar a la inhibición de la metanogénesis puesto que se disminuye la capacidad amortiguadora del sistema. Los AGVs en un digestor no deben sobrepasar los 300 mg/l (Noyola, 1998).
7. Alcalinidad.- El metabolismo acidogénico es más activo que el metanogénico, por lo que se corre el riesgo de acidificar el reactor si incrementa la carga orgánica de alimentación y se vence la capacidad amortiguadora del sistema. La manera de prevenirlo es monitorear diariamente la relación de alcalinidades (valor  $\alpha$ ) como se describió anteriormente. Durante la estabilidad, la alcalinidad intermedia (diferencia aritmética entre alcalinidad total y alcalinidad parcial) oscila entre 1000 y 5000 mg  $CaCO_3$ /litro (Malina y Pohland, 1992).
8. Nutrientes.- Para el funcionamiento adecuado de un digestor, la relación de los macronutrientes (nitrógeno, fósforo y azufre) debe mantenerse en proporción DQO:N:P:S de 400:5:1:0.2 (DQO, demanda química de oxígeno, que se interpreta como “toda la materia susceptible de ser químicamente oxidada”). El azufre actúa como un nutriente a concentraciones menores a 100 mg/l, de lo contrario puede ser un inhibidor de la digestión anaerobia. Entre los micronutrientes metálicos se consideran al hierro, níquel, cobalto y molibdeno (Noyola, 1998).

### 2.3 PRE-TRATAMIENTO DE LODOS

En términos metabólicos, durante la digestión anaerobia, la *etapa* hidrolítica es considerada como el paso limitante (Prabhakar *et al.*, 1997; Müller, 2001; Kim *et al.*, 2003; Bougrier *et al.*, 2008; Donoso-Bravo, *et al.*, 2010), por lo que mejorar la eficiencia de hidrólisis cobra mucha importancia.

Los pre-tratamientos son especialmente aplicados a lodos activados de purga (lodos secundarios), porque en éstos la mayor parte de la materia orgánica queda contenida en las células microbianas, con lo cual se reduce la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos anaerobios.

Investigadores en todo el mundo tales como Wang *et al.* (1997); Müller (2001); Barjenbruch *et al.* (2003); Gavala *et al.* (2003); Kim *et al.* (2003); Neyens y Baeyens, (2003); Xuan (2004); Bougrier *et al.* (2006); Carrère *et al.* (2010) y Donoso *et al.* (2011) -entre muchos otros- han estudiado el efecto de diversos pre-tratamientos, informando tanto las ventajas como las desventajas de los mismos y -como en la investigación de Ziemba y Peccia (2011)- efectuando un análisis de costos operativos. Estos pre-tratamientos pueden ser: a) térmicos, b) químicos, c) termoquímicos o d) mecánicos.

En las Tablas 2.5 A 2.8 (con base en Carrère *et al.*, 2010) se presenta una recopilación de los impactos de diferentes pre-tratamientos térmicos, químicos y termoquímicos sobre procesos de estabilización de lodos por digestión anaerobia, informados por diversos autores.

Los pre-tratamientos tienen por objetivo cambiar la estructura de los flocúlos, que son los agregados microbianos característicos del lodo activado, cuya cohesión se debe a sustancias poliméricas extracelulares, *SPE* o *EPS* por sus siglas en inglés (Dhar *et al.*, 2012). Contribuyen mediante lisis celular a mejorar la solubilidad de la materia orgánica contenida en los lodos. Así los componentes disueltos pueden metabolizarse en los tratamientos biológicos posteriores, además de volverse útiles para la recuperación de elementos como nitrógeno y fósforo.

**Tabla 2.5. Efectos de pre-tratamientos térmicos de temperatura moderada sobre los lodos estabilizados por digestión anaerobia (Carrère *et al.*, 2010)**

Sustrato	Condiciones de Tratamiento	Condiciones de Digestión anaerobia	Resultados	Referencias
Lodo activado	Microaerofilia, 60-70 °C, 1 día	Lote, 10 días, 37 °C	Incremento en la producción de biogás de 200 <sup>a</sup> a 300 mLg <sup>-1</sup> SV	Hasegawa <i>et al.</i> , 2000
Lodo activado	Microaerofilia, 65 °C, 1 día	CSTR, TRH: 21 y 42 días, 35 °C	Incremento en la remoción de DQO (+30%), sin incremento en la producción de metano (CH <sub>4</sub> )	Dumas <i>et al.</i> , 2010
Lodo activado	70 °C, 7 días	Lote, 37 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 8.3 <sup>a</sup> a 10.45 mmol g <sup>-1</sup> SV (+26%)	Gavala <i>et al.</i> , 2003
Lodo activado	70 °C, 7 días	Lote, 55 °C	Producción de CH <sub>4</sub> de 10.9 mmol g <sup>-1</sup> SV (sin influencia)	Gavala <i>et al.</i> , 2003
Lodo primario	70 °C, 4 días	Lote, 37 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 21.2 <sup>a</sup> a 24.7 mmol g <sup>-1</sup> SV (+16%)	Gavala <i>et al.</i> , 2003
Lodo primario	70 °C, 7 días	Lote, 55 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 13.7 <sup>a</sup> a 25.5 mmol g <sup>-1</sup> SV (+86%)	Gavala <i>et al.</i> , 2003
Lodo activado	70 °C, 2 días	CSRT, TRH: 13 días (15 días sin pretratamiento) 55 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 40 <sup>a</sup> a 55 mL d <sup>-1</sup> SV (+28%)	Skiadas <i>et al.</i> , 2005
Lodo primario	70 °C, 2 días	CSRT, TRH: 13 días (15 días sin pretratamiento) 55 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 146 <sup>a</sup> a 162 mL d <sup>-1</sup> SV (+11%)	Skiadas <i>et al.</i> , 2005
Lodo activado	70 °C, 9 h	Lote, 55 °C	Incremento en la producción de biogás +58%	Clement <i>et al.</i> , 2007
Lodo mezclado	70°C; 9, 24, 48 h	CSRT, TRH: 10 días, 55 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 0.15 <sup>a</sup> a 0.18 mL g <sup>-1</sup> SV (+20%) Incremento en la producción de energía (+60-100%)	Ferrer <i>et al.</i> , 2008 Ferrer <i>et al.</i> , 2009
Lodo primario	70 °C, 2 días	CSRT, TRH: 13 días (15 días sin pretratamiento) 55 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 13.6 <sup>a</sup> a 20.1 mmol g <sup>-1</sup> SV (+48%)	Lu <i>et al.</i> , 2008
Lodo primario	50-65 °C, 2 días	CSRT, TRH: 13-14 días, 35 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> (+25%) comparado con el pretratamiento de 35 °C	Ge <i>et al.</i> , 2010

CSRT: reactor continuamente mezclado; TRH: tiempo de residencia hidráulica; SV: sólidos volátiles; CH<sub>4</sub>: metano; X<sup>a</sup>: digestión anaerobia sin pretratamiento.

Si se combinan los pre-tratamientos con la digestión anaerobia, de forma simultánea a la reducción de la cantidad inicial del lodo, se incrementa la producción de metano (Uma-Rani *et al.*, 2012).

**Tabla 2.6. Efectos de pre-tratamientos térmicos de alta temperatura sobre los lodos estabilizados por digestión anaerobia (Carrère *et al.*, 2010)**

Sustrato	Condiciones de Tratamiento	Condiciones de Digestión anaerobia	Resultados	Referencias
Lodo activado	175 °C, 30 min	CSRT, TRH: 15 días, 35 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 115 <sup>a</sup> a 186 mLg <sup>-1</sup> DQO (+62%)	Haug <i>et al.</i> , 1978
Lodo primario	175 °C, 30 min	CSRT, TRH: 15 días, 35 °C	Producción de CH <sub>4</sub> de 252 mLg <sup>-1</sup> DQO (sin influencia)	Haug <i>et al.</i> , 1978
Lodo mezclado	175 °C, 30 min	CSRT, TRH: 15 días, 35 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 205 <sup>a</sup> a 234 mLg <sup>-1</sup> DQO (+14%)	Haug <i>et al.</i> , 1978
Lodo activado	175 °C, 60 min	Lote, 25 días, 35 °C	Incremento en la conversión de DQO en CH <sub>4</sub> de 48% a 68% (+42%)	Stuckey y Mc Carty, 1978
Lodo activado	175 °C, 60 min	CSTR, TRH: 5 días, 35 °C	Incremento en la producción de biogás de 108 <sup>a</sup> a 216 mLg <sup>-1</sup> DQO (+100%)	Li <i>et al.</i> , 1992
Lodo activado (industrial)	180 °C, 60 min	Lote, 8 días, 37 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> (+90%)	Tanaka <i>et al.</i> , 1997
Lodo mezclado	165-180 °C, 30-60 min	PTAR 90, 000 Eq Pob. TRH: 17 días	Incremento en la producción de electricidad (+20%)	Kepp <i>et al.</i> , 2000
Lodo activado	160 °C	PTAR 45, 000 Eq Pob. CSTR, TRH: 15 días	Incremento en la producción de biogás (+60%)	Fjordside <i>et al.</i> , 2001
Lodo mezclado	121 °C, 60 min	CSTR, TRH: 20 días, 36 °C	Incremento en la producción de biogás de 350 <sup>a</sup> a 420 mLg <sup>-1</sup> SV solubles (+20%)	Barjenbruch <i>et al.</i> , 2003
Lodo activado	121 °C, 30 min	Lote, 7 días, 37 °C	Incremento en la producción de biogás de 3657 <sup>a</sup> a 4843 Lm <sup>-3</sup> lodo (+32%)	Kim <i>et al.</i> , 2003
Lodo mezclado digerido	170 °C, 60 s, 0.8 MPa	Lote, 20 días	Incremento en la producción de biogás (+49%)	Dohanyos <i>et al.</i> , 2004
Lodo activado	170 °C, 60 min	Lote, 24 días, 35 °C	Incremento en la producción de biogás (+45%)	Valo <i>et al.</i> , 2004
Lodo activado	170 °C, 60 min	CSTR, TRH: 20 días, 35 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 88 <sup>a</sup> a 142 mLg <sup>-1</sup> DQO (+61%)	Valo <i>et al.</i> , 2004
Lodo activado	175 °C, 40 min	Reactor de película, TRH: 2.9 días, 37 °C	65% de reducción de ST	Graja <i>et al.</i> , 2005
Lodo activado	170 °C, 30 min	Lote, 24 días, 35 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 221 <sup>a</sup> a 333 mLg <sup>-1</sup> DQO (+76%)	Bougrier <i>et al.</i> , 2006-a
Lodo activado	170 °C, 30 min	CSTR, TRH: 20 días, 35 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 145 <sup>a</sup> a 256 mLg <sup>-1</sup> SV (+51%)	Bougrier <i>et al.</i> , 2006-b
Lodo mezclado	140 °C, 1 min, 0.6 MPa	PTAR 100,000 Eq Pob. Digestión en dos fases, 55-53 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 507 <sup>a</sup> a 599 Lkg <sup>-1</sup> SV (+18%)	Zabranská <i>et al.</i> , 2006
Lodo activado (aeración extendida)	160 °C, 30 min	PTAR 62, 000 Eq Pob. TRH: 15 días, 35 °C	Incremento en la remoción de ST de 25% <sup>a</sup> a 45%	Chauzy <i>et al.</i> , 2007
Lodo activado	170 °C, 30 min, 7 bar	Lote	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> (+50%)	Fernández <i>et al.</i> , 2008
Lodo activado	170 °C, 30 min, 7 bar	Continuo, TRH: 12 días	Incremento en la producción de biogás (+40-50%) Incremento en la producción de electricidad (+40%)	Fernández <i>et al.</i> , 2008
Lodo activado (refinería)	200 °C, 30 min, 20 MPa	Dos Fases: Reactor UASB, 3.8 días, 35 °C post-tratamiento; lote, 33 días sin pre-tratamiento.	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 2419 <sup>a</sup> a 3775 mL kg <sup>-1</sup> lodo activado (+15%)	Yang <i>et al.</i> , 2010
Lodo activado	Microondas, 175 °C	Lote, 18 días, 33 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> (+31%)	Eskisioglu <i>et al.</i> , 2009
Lodo primario	Microondas, 35-90 °C	Lote, 18 días, 33 °C	Incremento en las tasas de degradación, pero sin incremento en la producción de metano	Zheng <i>et al.</i> , 2009

CSRT: reactor continuamente mezclado; TRH: tiempo de residencia hidráulica; DQO: demanda química de oxígeno; ST: sólidos totales; SST: sólidos suspendidos totales; SSV: sólidos suspendidos volátiles; SV: sólidos volátiles; CH<sub>4</sub>: metano; X<sup>a</sup>: digestión anaerobia sin pretratamiento.

Los tratamientos térmicos (Tablas 2.5 y 2.6) se pueden aplicar a la mezcla de lodos primarios y secundarios, o por separado, pero el mayor efecto hidrolítico se observa siempre en los lodos secundarios –efecto medido como aumento en la DQO soluble y como mayor producción de biogás o



aumento en la proporción de metano en el biogás- comparado con el efecto del mismo tratamiento sobre lodos primarios o mezclados (Gavala *et al.*, 2003).

El término *co-tratamiento* (térmico, mecánico, químico, etc.), se introdujo para denominar a los tratamientos que anteceden alguna etapa dentro del tren de tratamiento de las aguas residuales y que repercuten en mejorar la eficiencia de ese punto de la operación particularmente (Carrère *et al.*, 2010), por ejemplo: en las líneas de recirculación de los reactores de lodos activados o en la recirculación de los digestores. De modo que, en lo sucesivo se abordará el término *pre-tratamiento* refiriéndose exclusivamente a la etapa que precede a la digestión anaerobia.

En la Figura 2.2 se muestran gráficamente los puntos donde es posible implementar un pre-tratamiento o un co-tratamiento en una PTAR.

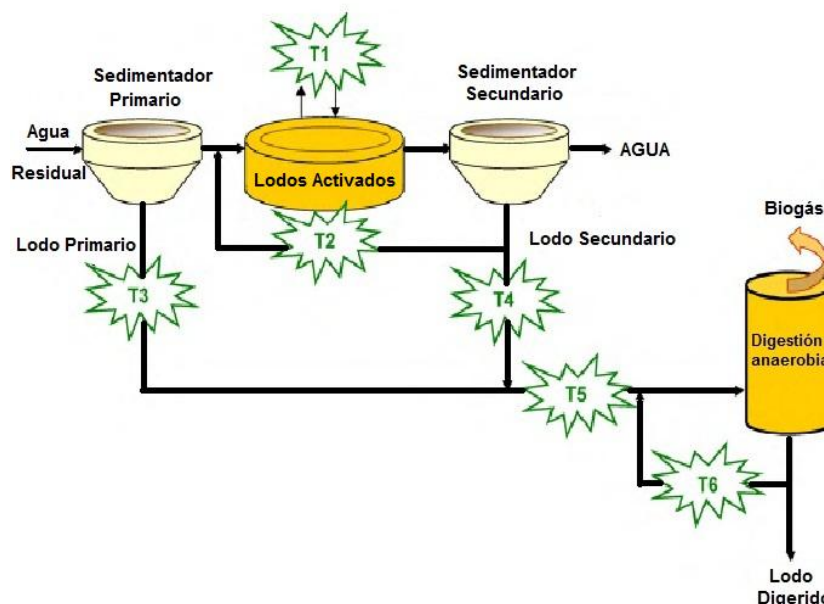


Figura 2.2. Esquema de un tren de tratamiento estándar que emplea lodos activados y los puntos en donde son aplicados los distintos tipos de pre-tratamiento y co-tratamiento. T1:co-tratamiento sobre el proceso de lodos activados; T2:co-tratamiento sobre la re-circulación de lodos activados; T3:pre-tratamiento de lodo primario antes de la digestión anaerobia; T4:pre-tratamiento de lodo secundario antes de la digestión anaerobia; T5:pre-tratamiento del lodo de purga antes de la digestión anaerobia; T6:co-tratamiento sobre la línea de re-circulación del digestor anaerobio.

Se han desarrollado varias tecnologías de pre-tratamiento, que pueden clasificarse en función del efecto ejercido (Carrère *et al.* 2010):

a) Incrementar la biodegradabilidad del lodo (aumentar la disponibilidad de nutrientes), conduciendo así a una mayor recuperación energética y disminución de la cantidad de lodo remanente.

b) Incrementar la cinética de biodegradación del lodo (abatir el tiempo de residencia del lodo, TRS) y con ello conseguir por una parte la disminución del tamaño del reactor, y por otra parte, incrementar la carga orgánica volumétrica de un digestor dado.

Algunos beneficios adicionales de los pre-tratamientos en la digestión anaerobia en una PTAR son: facilitar la posterior deshidratación del lodo, mejorar sus propiedades reológicas, abatir la formación de espuma y especialmente **inactivar microorganismos patógenos** (Neyens y Baeyens, 2003; Pérez-Elvira *et al.*, 2010).

La deshidratación del lodo se ve favorecida por todos aquellos mecanismos que hidrolizan o modifican las SPE del lodo activado de purga, porque vuelven más disponible al agua contenida en los flóculos (Dhar *et al.*, 2012). Con respecto a la formación de espuma, ésta se presenta como un inconveniente durante la digestión anaerobia porque disminuye el volumen útil del digestor, repercutiendo en la modificación del TRS (se ve disminuido). La espuma se forma por la presencia de componentes celulares hidrófobos, detergentes y grasas en el agua residual, bacterias filamentosas y sustancias poliméricas extracelulares, que forman emulsiones por los sistemas de mezclado (Barjenbruch *et al.*, 2003).

### 2.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PRE-TRATAMIENTOS TÉRMICOS

Müller (2001), Neyens y Baeyens (2003) y Carrère *et al.*, (2010) reportan varios métodos de pre-tratamiento (Tablas 2.5 a 2.8), entre los que citan:

- Tratamientos térmicos, en el rango de temperatura de 40° C – 200 °C
- Tratamientos químicos usando ozono, peróxido de hidrógeno, ácidos o álcalis.
- Desintegración mecánica con ultrasonido, molinos, homogeneizadores y otros.
- Congelación/Descongelación.
- Hidrólisis biológica con o sin adición de enzimas.
- Oxidación avanzada: tratamientos termo-químicos.

Los tratamientos térmicos están ampliamente difundidos en el mundo, ya que además de incrementar la eficiencia de hidrólisis y la capacidad de deshidratación, cuentan con mayor potencial para inactivar microorganismos patógenos en comparación con los demás pre-tratamientos (Müller, 2001; Appels *et al.*, 2010; Carrère *et al.*, 2010).

De forma recurrente, se han establecido como las más eficaces aquellas temperaturas en el rango de 160 °C – 180 °C, puesto que superando los 180 °C se promueve la generación de compuestos químicos recalcitrantes (Stuckey y McCarty, 1984; Müller, 2001; Neyens y Baeyens, 2003; Pérez-Elvira *et al.*, 2006; Bougrier *et al.*, 2007; Wilson y Novak, 2009). Estas temperaturas favorecen la mayor hidrólisis del lodo (medida como incremento de la DQO soluble) y se asume que la eficiencia de la digestión anaerobia incrementa de forma directamente proporcional (Donoso-Bravo, 2011).

Con respecto al tiempo de contacto, autores como Neyens y Baeyens (2003) no encontraron influencia significativa en la hidrólisis máxima alcanzada por el lodo ni en la producción de biogás en el rango de temperatura 160 °C - 180 °C. Sin embargo, la hidrólisis mantiene una relación directamente proporcional con el aumento de la temperatura, como demostraron Appels *et al.* (2010) y Való *et al.* (2004). Los pre-tratamientos duran en promedio entre 10 y 30 min (Bougrier *et al.*, 2007, 2008; Fernández-Polanco *et al.*, 2008; Wilson y Novak, 2009).

**Tabla 2.7. Efectos de pre-tratamientos químicos oxidantes sobre los lodos estabilizados por digestión anaerobia (Carrère *et al.*, 2010)**

Sustrato	Condiciones de Tratamiento	Condiciones de Digestión anaerobia	Resultados	Referencias
Lodo mezclado	0.1 g O <sub>3</sub> g <sup>-1</sup> DQO	Lote, 30 días, 33 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 100 <sup>a</sup> a 220 mLg <sup>-1</sup> DQO (+100%)	Weemaes <i>et al.</i> , 2000
Lodo primario	0.1 g O <sub>3</sub> g <sup>-1</sup> SST	Lote, 30 días	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 82 <sup>a</sup> a 173 mLg <sup>-1</sup> DQO (+110%)	Yeom <i>et al.</i> , 2002
Lodo activado (sintético)	0.05 g O <sub>3</sub> g <sup>-1</sup> ST	CSRT, TRH: 28 días, 35 °C	Incremento en la remoción de ST de 31 <sup>a</sup> a 59% (+90%)	Goel <i>et al.</i> , 2003
Lodo activado (sintético)	0.045 g O <sub>3</sub> g <sup>-1</sup> ST recirculación a la salida del digestor	Lote, 25 días, 35 °C	Remoción de ST de 85%	Goel <i>et al.</i> , 2003
Lodo activado	0.16 g O <sub>3</sub> g <sup>-1</sup> SST recirculación a la salida del digestor (25%)	CSTR, 35 °C	Incremento en la remoción de DQO de 38 <sup>a</sup> a 58% (+53%)	Battimelli <i>et al.</i> , 2003
Lodo activado	0.15 g O <sub>3</sub> g <sup>-1</sup> ST	Lote, 18 días, 35 °C	Incremento en la producción de biogás de 150 <sup>a</sup> a 367 mLg <sup>-1</sup> DQO (+16%)	Bougrier <i>et al.</i> , 2007
Lodo activado (17 g L <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : 150 mmol L <sup>-1</sup> , FeSO <sub>4</sub> : 5 mmol L <sup>-1</sup> , 90 °C, 60 min	Lote, 24 días, 35 °C	Incremento en la producción de biogás (+16%)	Valo <i>et al.</i> , 2004
Lodo mezclado	2 g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> SSV, 90 °C, 24 h	CSTR, TRH: 30 días, 37 °C	Incremento en la remoción de DQO de 52.2 <sup>a</sup> a 70.1% (+34%)	Rivero <i>et al.</i> , 2006
Lodo mezclado	2 g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> SSV, 90 °C, 60h, recirculación a la salida del digestor (20% d <sup>-1</sup> )	CSTR, TRH: 30 días, 37 °C	Incremento en la remoción de DQO de 52.2 <sup>a</sup> a 74.6% (+43%)	Rivero <i>et al.</i> , 2006
Lodo digerido mezclado (TRS: 15 días)	2 g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> SSV, 90 °C, 24 h	CSTR, TRH: 15 días, 37 °C	Incremento en la remoción de SSV de 52.2 <sup>a</sup> a 70.6% (+35%)	Rivero <i>et al.</i> , 2006
Lodo primario	Oxidación catalítica hum, 270 °C, 86 Kg m-2, 24 min	UASB, TRH: 24 h, 35 °C, digestión del sobrenadante del lodo pre-tratado	Remoción de DQO soluble de 93.8%	Song <i>et al.</i> , 1992
Lodo activado (de refinera)	Oxidación con aire húmedo, 200 °C, 20Mpa, 30 min	Dos fases: UASB, TRH: 3.8 días, 35 °C y digestión de la fracción líquida del lodo pre-tratado; digestión en lote, 33 días, sin pre-tratamiento	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 2419 <sup>a</sup> a 33,084 mLkg <sup>-1</sup> lodo activado (+27%)	Yang <i>et al.</i> , 2010

CSRT: reactor continuamente mezclado; TRH: tiempo de residencia hidráulica; DQO: demanda química de oxígeno; ST: sólidos totales; SST: sólidos suspendidos totales; SSV: sólidos suspendidos volátiles; SV: sólidos volátiles; CH<sub>4</sub>: metano; X<sup>a</sup>: digestión anaerobia sin pretratamiento.

Es importante señalar que a temperaturas superiores a 200 °C, la producción de biogás durante la digestión anaerobia se ve disminuida, porque incrementan los compuestos orgánicos no biodegradables como consecuencia del calor excesivo. Las reacciones de *Maillard* son una posible explicación para este fenómeno (Bougrier *et al.*, 2007). Estas reacciones entre monosacáridos reductores y aminoácidos comienzan a suceder -aunque a pequeña escala- desde que el lodo alcanza 100 °C, pero la tasa de producción incrementa a medida que la temperatura y/o el tiempo de contacto incrementan, dando como resultado la formación de melanoidinas -con propiedades inhibitorias de la digestión anaerobia- (Stuckey y McCarty, 1984; Müller, 2001).

Paralelamente se han desarrollado pre-tratamientos térmicos moderados en combinaciones temperatura/tiempo de contacto (60 °C a 100°C; 10 min a 240 min) que permiten la inactivación de microorganismos patógenos de manera simultánea a la hidrólisis del lodo (Carrington, 2001; Gavala *et al.*, 2003; Smith, 2008; Appels *et al.*, 2010).

**Tabla 2.8. Efectos de pre-tratamientos termo-químicos sobre los lodos estabilizados por digestión anaerobia (Carrère *et al.*, 2010)**

Sustrato	Condiciones de Tratamiento	Condiciones de Digestión anaerobia	Resultados	Referencias
Lodo activado (43 g L <sup>-1</sup> )	300 meq HCl L <sup>-1</sup> , 175 °C, 60 min	Lote, 25 días, 35 °C	Incremento en la conversión de DQO en CH <sub>4</sub> de 48% <sup>a</sup> a 75% (+56%)	Stuckey y McCarty, 1978
Lodo activado (43 g L <sup>-1</sup> )	300 meq NaOH L <sup>-1</sup> , 175 °C, 60 min	Lote, 25 días, 35 °C	Incremento en la conversión de DQO en CH <sub>4</sub> de 48% <sup>a</sup> a 78% (+62%)	Stuckey y McCarty, 1978
Lodo activado (7 g L <sup>-1</sup> )	0.3 g NaOH g <sup>-1</sup> SSV, 130 °C, 5 min	Lote, 10 días, 37 °C	Incremento en la conversión de DQO en CH <sub>4</sub> de 32% <sup>a</sup> a 42% (+31%)	Tanaka <i>et al.</i> , 1997
Lodo activado (indus 8.4 g L <sup>-1</sup> )	0.3 g NaOH g <sup>-1</sup> SSV, 130 °C, 5 min	Lote, 10 días, 37 °C	Incremento en la conversión de DQO en CH <sub>4</sub> de 11% <sup>a</sup> a 25% (+127%)	Tanaka <i>et al.</i> , 1997
Lodo activado (17 g L <sup>-1</sup> )	7 g NaOH L <sup>-1</sup> , 121 °C, 30 min	Lote, 7 días, 37 °C	Incremento en la producción de biogás de 3657 <sup>a</sup> a 5037 L m <sup>-3</sup> lodo (+38%)	Kim <i>et al.</i> , 2003
Lodo activado	7 g NaOH L <sup>-1</sup> , 121 °C, 30 min	(Dos fases) Acidogénesis: TRH: 6 días, 37 °C; Metanogénesis: TRH: 12 días, 41 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 290 <sup>a</sup> a 520 L kg <sup>-1</sup> SV (+79%)	Park <i>et al.</i> , 2005
Lodo activado (30 g L <sup>-1</sup> )	45 meq NaOH L <sup>-1</sup> , 55 °C, 240 min	Lote, 20 días, 35 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 165 <sup>a</sup> a 310 L kg <sup>-1</sup> SV (+88%)	Heo <i>et al.</i> , 2003
Lodo activado (100 g L <sup>-1</sup> )	pH: 11, 90 °C, 10 h	Lote, 15 días, 55 °C	Producción de CH <sub>4</sub> de 280 L kg <sup>-1</sup> SV	Vlissides y Karlis, 2004
Lodo activado (17 g L <sup>-1</sup> )	1.65 g KOH L <sup>-1</sup> , pH: 10, 130 °C, 60 min	Lote, 24 días, 35 °C	Incremento en la producción de biogás (+30%)	Valo <i>et al.</i> , 2004
Lodo activado (17 g L <sup>-1</sup> )	1.65 g KOH L <sup>-1</sup> , pH: 10, 130 °C, 60 min	CSTR, TRH: 20 días, 35 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 88 <sup>a</sup> a 154 mL g <sup>-1</sup> DQO (+75%)	Valo <i>et al.</i> , 2004
Lodo activado	Microondas, 160 °C, pH: 12 (NaOH), 16 min	Lote, 37 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> (+19%)	Dogan y Sanin, 2009
Lodo activado	Microondas, 160 °C, pH: 12 (NaOH), 16 min	Semi-continuo, TRH: 15 días, 37 °C	Incremento en la producción de CH <sub>4</sub> de 144 <sup>a</sup> a 220 mL g <sup>-1</sup> SV (+53%)	Dogan y Sanin, 2009

CSRT: reactor continuamente mezclado; TRH: tiempo de residencia hidráulica; DQO: demanda química de oxígeno; ST: sólidos totales; SST: sólidos suspendidos totales; SSV: sólidos suspendidos volátiles; SV: sólidos volátiles; CH<sub>4</sub>: metano; X<sup>a</sup>: digestión anaerobia sin pretratamiento.

### 2.3.2 PRE-TRATAMIENTOS TÉRMICOS MODERADOS

A temperaturas moderadas, el tiempo de tratamiento cobra mayor importancia que la temperatura aplicada, tanto en términos de hidrólisis del lodo como de inactivación de patógenos (Cliement *et al.*, 2007; Appels *et al.*, 2010).

El interés por desarrollar pre-tratamientos térmicos moderados radica no solamente en aumentar la eficiencia de la digestión anaerobia abatiendo el TRS (Wang, *et al.*, 1997; Cliement *et al.*, 2007), sino también en que para una PTAR es más sencillo garantizar el control de temperatura y homogeneidad del calor dentro del reactor, comparado con el uso de altas temperaturas por períodos cortos de operación.

Naturalmente, el gasto energético en forma de electricidad o calor, es mayor a medida que la temperatura de pre-tratamiento incrementa. Algunos sistemas implican aumentos de presión (Tablas 2.6 y 2.8) en el sistema por elevar la temperatura por encima del punto de ebullición del agua (Appels *et al.*, 2010).

En la investigación realizada por Wang *et al.* (1997), probaron pre-tratamientos térmicos a 60 °C, 80 °C, 100 °C y 120 °C con digestión anaerobia mesófila, comparando los efectos mediante DQOs, producción de metano y reducción de sólidos volátiles. La mayor hidrólisis se consiguió conforme aumentaba la temperatura, pero el mayor rendimiento en metano y reducción de STV se obtuvo en el intervalo 60 °C – 100 °C.

La liberación de ácidos grasos volátiles (AGVs) durante los pre-tratamientos fue mayor a 60 °C que a 80 °C y más aun que a 100 °C, porque posiblemente los microorganismos encargados de fermentar carbohidratos y proteínas decaen conforme aumenta la temperatura; sin embargo, el efecto observado fue inverso durante la DAM, pues los lodos más hidrolizados condujeron a mayores producciones de AGVs (a 120 °C mayor hidrólisis que a 100 °C, ésta mayor que a 80 °C, a su vez mayor que a 60 °C). Sin tomar en cuenta la desinfección de los lodos, el arreglo recomendado por Wang *et al.* (1997) consistió en 60 °C/ 60 min / DAM a 8 días de TRS.

### 2.4 DESINFECCIÓN DE LODOS

La digestión anaerobia mesófila (DAM) como proceso de estabilización es eficiente reduciendo la materia orgánica y produciendo energía neta, pero contribuye muy poco a la desinfección de los lodos (Riau *et al.*, 2010). La Tabla A-1 (ANEXO I) es un extenso listado de los agentes biológicos

comúnmente encontrados en lodos de purga, donde se exponen las patologías asociadas con cada uno. De forma sintetizada, la Tabla 2.9 muestra ejemplos de dichos microorganismos y virus.

Autores como Gantzer (2001), Moeller y Ferat (2001), Riau *et al.* (2010) y Chen *et al.* (2012) han informado acerca de la inactivación de patógenos mediante DAM, pero emplearon tiempos de residencia del lodo (TRS) entre 20 y 30 días, mientras que en otros casos el arreglo consistió en dos digestores en serie; la inactivación fue muy baja, del orden de 1 a 2 unidades logarítmicas. Esta información fue corroborada por Carrington (2001), quien encontró que los ácidos grasos volátiles (AGVs) producidos dentro del digestor, dificultan la supervivencia de los patógenos bacterianos.

**Tabla 2.9. Patógenos de origen fecal encontrados comúnmente en lodos residuales (Carrington, 2001)**

Bacterias	Protozoarios
<i>Salmonella</i> spp	<i>Entamoeba histolítica</i>
<i>Shigella</i> spp.	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Escherichia coli</i> (enteropatógena)	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Sarcocystis</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<b>Helmintos</b>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Taenia saginata</i>
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Taenia solium</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Diphyllobothrium latum</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Echinococcus granulosus</i>
<i>Vibrio cholera</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>
<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Anylostoma duodenale</i>
<i>Leptospira</i> spp.	<i>Toxocara canis</i>
<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Toxocara cati</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Trichuris trichura</i>
<i>Streptococcus</i>	
<b>Virus</b>	<b>Levaduras</b>
Poliovirus	<i>Candida albicans</i>
Coxsackievirus	<i>Candida krusi</i>
Echovirus	<i>Candida tropicalis</i>
“Nuevos” enterovirus	<i>Candida guilliermondii</i>
Adenovirus	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Reovirus	<i>Trichosporon</i>
Virus de la Hepatitis A	
Rotavirus	<b>Hongos</b>
Astrovirus	<i>Aspergillus</i> spp.
Calicivirus	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Coronavirus	<i>Phialophora richardsii</i>
Calicivirus tipo Norwalk	<i>Geotrichum candidum</i>
Parvovirus	<i>Trichophyton</i> spp.
Virus adeno-asociados	<i>Epidermophyton</i> spp.
Virus de la influenza	

La desventaja principal de emplear TRS superiores a 15 días, es el espacio que se necesita para el almacenamiento de grandes cantidades de lodos que son retenidos en la planta de tratamiento y el aumento en las dimensiones de los propios digestores.

Se sabe que una gran variedad de microorganismos pueden desarrollarse naturalmente en las condiciones fisicoquímicas imperantes dentro de los digestores anaerobios mesófilos (régimen semi-continuo, temperatura de 35 °C, pH 6.2 a 7.8, abundancia de nutrientes, alto contenido de agua, ST

≤ 40 g/l). En la Tabla 2.10 se ilustra con más detalle el rango de temperaturas de inactivación para algunos microorganismos frecuentemente encontrados en lodos residuales.

Castrejón *et al.* (2002) estudiaron arreglos de digestión anaerobia mesófila, de los cuales concluyeron que es necesario acoplar un tratamiento, ya sea al inicio o al término de la digestión anaerobia, para la inactivación de coliformes fecales, *Salmonella* spp. y huevos de helmintos viables.

Es por esta razón que la digestión anaerobia (como proceso de estabilización) es antecedida por un pre-tratamiento térmico, que es el responsable de la *inactivación* de patógenos durante el proceso y que adicionalmente genera las modificaciones ya mencionadas sobre las características fisicoquímicas del lodo. (hidrólisis, principalmente). Ejemplos de este tipo de sistemas combinados se ilustran más adelante en la Tabla 2.18.

**Tabla 2.10. Algunos microorganismos y las condiciones necesarias para inactivarlos térmicamente (con base en Tchobanoglous *et al.*, 1994)**

Organismo	Observaciones
<i>Salmonella typhosa</i>	Sin crecimiento por encima de 46 °C, eliminación* en 30 minutos a 55-60 °C y en 20 minutos a 60 °C
<i>Salmonella</i> sp.	Eliminación en 1 hora a 55 °C y entre 15-20 minutos a 60 °C
<i>Shigella</i> sp.	Eliminación en 1 hora a 55 °C
<i>Escherichia coli</i>	Eliminación en 1 hora a 55 °C y entre 15-20 minutos a 60 °C
<i>Entamoeba histolytica</i>	Eliminación en pocos minutos a 45 °C y en pocos segundos a 55 °C
<i>Taenia saginata</i>	Eliminación en pocos minutos a 55 °C
<i>Trichinella spiralis</i>	Eliminación rápida a 55 °C e instantánea a 60 °C
<i>Brucella abortus</i> o <i>Brucella suis</i>	Eliminación en 1 hora a 55 °C y en 3 minutos a 62-63 °C
<i>Mycrococcus pyogenes</i> var. <i>Aureus</i>	Eliminación en 10 minutos a 50 °C
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Eliminación en 10 minutos a 54 °C
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> var. <i>Homini</i>	Eliminación en 15-20 minutos a 66 °C
<i>Corynebacterium diphtheria</i>	Eliminación en 45 minutos a 55 °C
<i>Necator americanus</i>	Eliminación en 50 minutos a 45 °C
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Eliminación en menos de 1 hora a temperaturas mayores a 50 °C

\* Eliminación fue el término empleado por los autores como sinónimo de inactivación total.

## 2.4.1 DESINFECCIÓN DE LODOS: LA TERMINOLOGÍA

En la literatura se encontraron varios términos empleados indistintamente para referirse al proceso de desinfección de lodos. Tales términos son: remoción, destrucción, eliminación, decaimiento e inactivación. **Remoción** y **eliminación** son maneras imprecisas de referirse a la desinfección, porque no se están “retirando” microorganismos del sistema (Tablas A-1 y 2.10) por métodos de separación físicos, como la filtración o sedimentación; el término **destrucción** es impreciso porque en los

tratamientos no siempre se obtiene la completa lisis celular o desnaturalización irreversible de los patógenos.

El **decaimiento** consiste en la disminución del número de individuos de una población o comunidad en función del tiempo. Efecto particularmente observado en una cinética de desarrollo microbiano estándar, compuesta por la fase de adaptación, seguida de crecimiento exponencial, que antecede a una fase estacionaria y finalmente la fase de muerte o decaimiento. De esta forma queda abierta la posibilidad de que los microorganismos mueran por causas naturales y no exclusivamente por el tratamiento de desinfección.

Por último, el término que parece el más adecuado y por ello se emplea a lo largo de la presente investigación es el de **Inactivación**, que se define como: pérdida de viabilidad de un agente biológico (p. ej. bacterias, huevos de helmintos ó virus). Se entiende que la viabilidad es la capacidad para crecer y desarrollarse causando infección en el hospedero (DOF, 2003), o desarrollarse en medios de cultivo estándar bajo condiciones controladas de laboratorio.

Otro término que aparece con frecuencia relacionado con inactivación es el de supervivencia, definida como la conservación de la viabilidad de una población microbiana a través del tiempo. Este término se emplea en el estudio de tratamientos que no consiguen la completa inactivación de patógenos.

En relación a este último párrafo, surge otro concepto que se maneja en varias publicaciones y con especial atención durante esta investigación, el de la condición celular denominada “viable, pero no cultivable” (VPNC), que se refiere a un estado celular promovido por condiciones de estrés en el medio, como por ejemplo: cambios drásticos en las condiciones fisicoquímicas o de composición, temperatura, pH, disponibilidad de nutrimentos, etc., donde no es posible el crecimiento celular ni su detección por métodos de cultivo estándar, pero conservan de forma latente su patogenicidad (Arthurson, 2008). Por tal razón, los microorganismos en condición VPNC, sólo pueden ser detectados por métodos moleculares, como será abordado más adelante.

## 2.4.2 CÓMO SE DESARROLLAN LOS PROCESOS DE DESINFECCIÓN

La supervivencia de microorganismos es función de múltiples factores como temperatura, condiciones antagónicas del medio, características del género y la especie (Carrington, 2001; US EPA, 2003; Smith, 2008).

Los factores que influyen dentro de un sistema para inactivación de patógenos, según Smith *et al.* (2005) son: temperatura, tiempo de retención de sólidos (TRS), configuración del reactor,



competencia entre la comunidad microbiana, valor de pH e interacciones químicas con los componentes del medio.

Estos mismos autores señalan también que la muerte microbiana en condiciones isotérmicas, obedece generalmente un patrón exponencial -lo cual concuerda con Carrington (2001)- y añade que el grado de inactivación microbiana bajo diferentes condiciones de proceso se puede evaluar mediante modelos y parámetros cinéticos, pero se requiere de datos experimentales previos para elaborar la cinética de inactivación/decaimiento.

De manera consensada, los pre-tratamientos térmicos de temperatura moderada se sitúan en alguna de estas dos combinaciones temperatura/tiempo: 70 °C por 30 min ó 55 °C por 240 min (Arthurson, 2008), condiciones que tienen un fundamento experimental y matemático.

#### 2.4.2.1 CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN MICROBIANA

Antes de ahondar un poco más en cada uno, es importante remarcar que los experimentos efectuados para determinar el decaimiento térmico de cierto microorganismo (cinéticas de inactivación microbiana) suelen efectuarse en laboratorio (Piterina *et al.*, 2010) bajo condiciones muy controladas (no-reales) y pueden elaborarse ocupando cepas provenientes de un laboratorio certificado internacionalmente o emplear agentes biológicos (bacterias, protozoarios, helmintos, hongos, levaduras y virus) aislados, identificados y purificados de la matriz que se estudia (agua, alimentos, suelos, lodos, etc.).

Los agentes biológicos pueden inocularse o re-suspenderse en muestras estériles de la matriz en estudio (Foliguet y Dancoeur, 1972; Wéry *et al.*, 2008), en sobrenadante estéril extraído de dicha matriz (Lang y Smith, 2008), en un medio de cultivo líquido y estéril (p. ej. caldo lactosado, caldo tripton-soya o caldo nutritivo; Smith *et al.*, 2005) o en un medio isotónico estéril (disoluciones amortiguadoras, PBS, disolución salina o agua peptonada; Lang y Smith, 2008).

Los distintos medios de cultivo poseen conductividad térmica, tamaños de partícula y condiciones fisicoquímicas características; tales condiciones influyen en el efecto del calor sobre los agentes biológicos, generando muchas veces combinaciones temperatura/tiempo ligera o marcadamente diferentes para un mismo agente si se prueba con distintas matrices (Smith *et al.*, 2005). Por esa razón, en la literatura se informan -para un microorganismo- intervalos de inactivación térmica que van desde algunos segundos hasta varios minutos de contacto a una misma temperatura.

Para ilustrar lo anterior, en el género *Salmonella*, la inactivación depende de la especie, pero existe mayor afectación por un tratamiento a 71 °C/1.2 s empleando medio nutritivo en vez de lodo estéril; los Enterococos en cultivo puro requieren 40 días a 45 °C, 3 días a 50 °C, 15 horas a 55°C, 2 horas a

60 °C ó 7 minutos a 70 °C para inactivarse completamente (Carrington, 2001; Piterina *et al.*, 2010). En los lodos residuales, los tiempos de exposición varían mucho con respecto al medio sintético.

#### 2.4.2.2 LAS ECUACIONES PROPUESTAS POR LA US EPA

Para determinar el tiempo de contacto del lodo a una temperatura dada, la US EPA sugirió en la disposición oficial *40 CFR Part 503 Regulation* (2003), usar la siguiente ecuación para lodos con un contenido de sólidos totales mayor o igual a 7%:

$$D = (131.7 \times 10^6) / 10^{0.14t} \quad [\text{Ecuación 1}]$$

Donde “D” es el tiempo en días y “t” es la temperatura en °C. El tiempo de contacto no deberá ser menor de 30 minutos y la temperatura no menor de 50 °C. Si las partículas del lodo son pequeñas y se calienta mediante gases o líquidos inmiscibles a altas temperaturas, el tiempo de contacto ha de ser mayor de 15 segundos.

En lodos cuyo contenido de sólidos totales sea menor al 7%, la US EPA sugirió la ecuación:

$$D = (50.07 \times 10^6) / 10^{0.14t} \quad [\text{Ecuación 2}]$$

La US EPA propuso las ecuaciones 1 y 2 basándose en un modelo cinético de tipo lineal, que no es el más adecuado para representar el decaimiento de microorganismos en lodos tratados térmicamente (Carrington, 2001). Sin embargo, de manera generalizada, la US EPA sugiere aplicar a los lodos el tratamiento de 70 °C por 60 minutos según los resultados obtenidos mediante una de sus investigaciones patrocinadas (U.S. EPA. 1979) donde tomaron como base el modelo de pasteurización de la leche usado en aquellos años: 63 °C por 30 minutos.

#### 2.4.2.3 EL DIAGRAMA DE STRAUCH

De forma alterna, se presenta en la Figura 2.3 un diagrama elaborado por Strauch (1991) donde mostró el comportamiento isotérmico de distintos agentes biológicos durante un tratamiento. Este diagrama se encuentra en diversas publicaciones (Strauch 1991; Carrington, 2001; Smith, 2008, Martínez-Arce, 2009; entre otros), porque sugiere las condiciones para obtener un lodo “virtualmente libre de patógenos”.

Sin embargo, pese a su gran difusión y utilidad como parámetro, Strauch construyó su diagrama con base en cinéticas de inactivación térmica empleando cultivos puros. Por esta razón, los valores en él representados, suelen ser distintos de los obtenidos mediante las ecuaciones 1 y 2 establecidas por la US EPA.

El perfil de las curvas de supervivencia (como las esquematizadas por Strauch, 1991) depende de las características intrínsecas del género, la especie y edad del cultivo, composición del medio, condiciones del calentamiento, actividad acuosa, pH, nutrientes y métodos de cuantificación (Le Jean y Abraham, 1996).

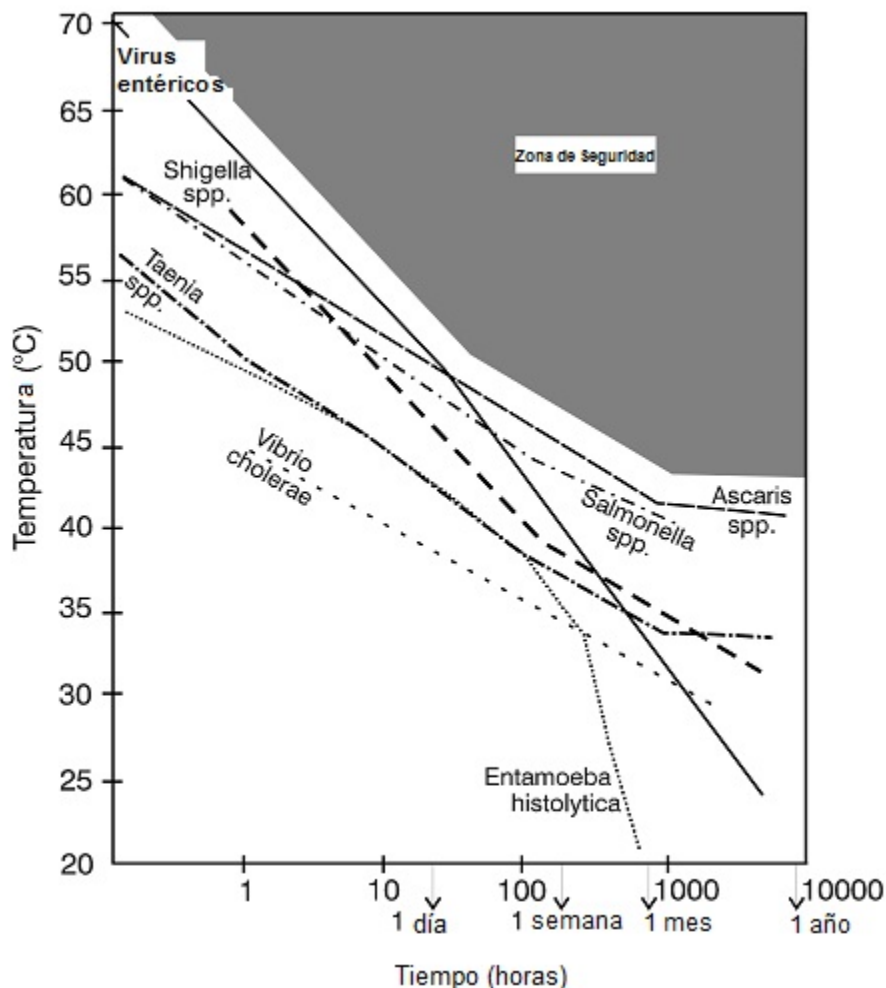


Figura 2.3. Requerimientos de temperatura-tiempo para producir lodo *virtualmente libre de patógenos* (Strauch, 1991).

### 2.4.3 DESINFECCIÓN TÉRMICA: CONSIDERACIONES ADICIONALES

Como parte de la estabilización de lodos (Tablas 2.11 y 2.18), es deseable (mas no necesario) deshidratar los biosólidos obtenidos. Uno de los métodos para hacerlo es el secado térmico, con el cual se cumplen dos funciones en una misma operación unitaria: desinfección y secado. Se utiliza un tambor rotatorio con temperatura de operación 112 °C - 137 °C (Rhomdhana *et al.*, 2009).

Los estudios sobre el secado térmico efectuados por Rhomdhana *et al.* (2009), demostraron inactivación de microorganismos al comienzo de la operación, pero debido a la rapidez con que se

pierde líquido y se concentra la materia seca, se forman agregados de partículas sólidas que enmascaran y protegen a los microorganismos; la pérdida de agua reduce también la conductividad térmica (capacidad de transferencia de calor desde la superficie del tambor hacia los lodos), insensibilizando a los microorganismos.

**Tabla 2.11. Compendio de tratamientos de desinfección para lodos residuales (Carrington, 2001)**

Proceso	Parámetros
<b>Compostaje</b>	Lotes de lodo (+/- agente abultante) conservados a 55 °C por 4 horas en cada uno de tres ciclos de mezclado, seguidos de un período de maduración hasta completar el compostaje.
<b>Compostaje mediante pila aireada y envasada</b>	El lote se mantiene a una temperatura mínima de 40 °C por –al menos- 5 días y por 4 horas –dentro de dicho período- a una temperatura mínima de 55 °C; seguido de un período de maduración hasta completar el proceso de compostaje.
<b>Secado térmico</b>	El lodo debe calentarse a una temperatura mínima de 80 °C por 10 minutos, para reducir el contenido de humedad a menos del 10%
<b>Digestión termófila (aerobia o anaerobia)</b>	El lodo debe alcanzar una temperatura mínima de 55 °C durante –al menos- 4 horas posteriores a la alimentación de los digestores y anteriores a la siguiente purga. La planta de tratamiento debe diseñarse para operar a 55 °C (como mínimo) y asegurar un tiempo de retención de los lodos suficiente para estabilizarlos.
<b>Pre-tratamiento térmico seguido de digestión (PT-DAM)</b>	Calentamiento mínimo de 30 minutos a 70 °C, seguido inmediatamente de digestión anaerobia mesófila a 35 °C y tiempo de retención de 12 días (en promedio).
<b>Tratamiento con cal viva (CaO)</b>	El lodo y la cal deben mezclarse completamente hasta alcanzar pH de 12 y una temperatura de 55 °C por 2 horas –como mínimo- posteriores al mezclado.

De forma opuesta, tanto el hipoclorito de sodio como la cal (óxido de calcio), sensibilizan las membranas celulares de los microorganismos contribuyendo al efecto del tratamiento térmico.

Carrington (2001) recomendó: “si el lodo será secado térmicamente, deberá calentarse al menos a 80 °C por 10 minutos para reducir la humedad a menos de 10%; y si el lodo será tratado (desinfectado) mediante calor húmedo y luego estabilizado, entonces –conforme al diagrama de Strauch- deberá calentarse a 80 °C por 10 min ó 75 °C por 20 min ó 70 °C por 30 min, seguido inmediatamente de digestión anaerobia mesófila”.

En investigaciones como en la de Sahlström *et al.* (2008) y la revisión elaborada por Arthurson (2008) donde se evaluó la efectividad de los tratamientos de pasteurización exigidos por el gobierno de Suecia a las plantas de generación de biogás a partir de residuos biológicos, se demostró experimentalmente que la mayoría de los patógenos e indicadores estudiados se inactivan con tratamientos de 70 °C por 30 minutos (*Salmonella entérica* serovar *typhimurium*; *E. coli* O157:H7, *Lysteria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, el bacteriófago 28B de *Salmonella* spp., huevos de *Ascaris suum*, virus porcinos como el parvovirus y el de enfermedad vesicular).

Paralelamente, en la publicación de Bagge *et al.* (2005) se estableció que las condiciones más adecuadas para la desinfección de residuos de rastro fueron 70 °C por 60 minutos, dado que con ello se aseguraría la inactivación de una variedad más extensa de patógenos e indicadores, entre los que se incluyen aquellos citados por Sahlström *et al.* (2008).

#### 2.4.4 LOS FENÓMENOS DE SUPERVIVENCIA MICROBIANA

Desde la década pasada se han publicado informes sobre el **recrecimiento** de patógenos en lodos digeridos tanto por vía anaerobia como aerobia e indistintamente en procesos termófilos y mesófilos, hechos observados en PTARs municipales que operan en América, Asia y Europa; así mismo hay autores como Soares *et al.* (1995) o Zaleski *et al.* (2005-a y 2005-b) que estudian el mismo fenómeno microbiológico, pero observado en compostas o en suelos remediados usando biosólidos.

Quienes se han avocado a dilucidar estos efectos de **supervivencia**, han diferenciado entre aquellas causas que atañen propiamente a la operación de la PTAR ya sea en el efluente de los digestores, durante la deshidratación del lodo, durante su transporte o durante el almacenamiento en silos (Iranpour y Cox, 2006; Higgins *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2007 y 2008); y aquellas causas atribuibles a factores medioambientales tras la aplicación de biosólidos en su destino final (campos de cultivo o áreas forestales): recolonización bacteriana transmitida por heces de aves o fauna nociva y microbiota asociada al suelo (Soares *et al.*, 1995; Zaleski *et al.*, 2005b).

Si bien los tratamientos térmicos de temperaturas moderadas (menores a 100 °C), donde se incluye la digestión anaerobia termófila, la digestión por separación de fases, la digestión anaerobia auto-térmica y varios pre-tratamientos, se han asociado con la inactivación de patógenos e indicadores, también estimulan la expresión de proteínas de choque térmico en algunos patógenos como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter jejuni*, con lo cual incrementa su resistencia térmica. Además, las temperaturas moderadas son insuficientes para la inactivación de esporas de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* (Skillman *et al.*, 2009).

Naturalmente, los distintos tratamientos de estabilización/desinfección también pueden clasificarse según su capacidad de inactivar microorganismos y virus (Tabla 2.12). Una de esas clasificaciones es la que han propuesto Gattie y Lewis (2004): Desinfección de Bajo-Nivel, Nivel-Intermedio y Alto-Nivel.

Cada categoría tiene efecto sobre un grupo determinado de agentes biológicos, entre los que se encuentran: formas bacterianas vegetativas, endoesporas, virus envueltos, virus no-envueltos, protozoarios y helmintos. La desinfección de alto-nivel es la única capaz de asegurar la inactivación

de todos los patógenos, por lo que deberá ser esporicida, fungicida, bactericida, viricida y vermícida. Esto se ilustra en la Tabla 2.12.

**Tabla 2.12. Niveles de Desinfección requeridos para inactivar patógenos en lodos residuales (Gattie y Lewis, 2004)**

Grupo	Nivel de desinfección requerido
Endoesporas bacterianas (p. ej., <i>Bacillus anthracis</i> )	Alto
Virus sin envoltura (p. ej., Norovirus Coxsackie, Rotavirus)	Alto / Intermedio
Helminths (p. ej., <i>Ascaris</i> , <i>Toxocara</i> )	Intermedio
Protozoarios (p. ej., <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> )	Intermedio
Mycobacteria (p. ej., <i>M. tuberculosis</i> )	Intermedio
Hongos / Levaduras (p. ej., <i>Candida</i> )	Intermedio / Bajo
Bacterias vegetativas (p. ej., <i>Staphylococcus</i> , <i>Salmonella</i> )	Bajo
Virus con envoltura (p. ej., Hepatitis B, HIV, Influenza)	Bajo

Datos obtenidos de la Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI, 1994)

Los niveles de desinfección están basados en susceptibilidades a germicidas líquidos; la resistencia al calor experimenta la misma tendencia, siendo los virus los más sensibles y las endoesporas bacterianas las más resistentes.

Aunque los biosólidos no son alimentos –en el contexto de humanos y animales- se comportan como tal para muchos microorganismos, pues contienen grandes cantidades de nutrientes útiles para diversos géneros bacterianos y fúngicos (Gattie y Lewis, 2004).

#### 2.4.5 REACTIVACIÓN Y RECRECIMIENTO MICROBIANOS: LA TERMINOLOGÍA

Los términos **reactivación** y **recrecimiento**, suelen confundirse como sinónimos, pero el grupo de investigación integrado por Dentel, Higgins y Qi ha dado pautas muy claras para la diferenciación: cuando el aumento en los conteos de cierto microorganismo ocurre entre dos operaciones unitarias (no existe cambio químico) en un tiempo inferior al **tiempo de duplicación** del microorganismo, se trata de **reactivación** (Gattie y Lewis, 2004; Qi *et al.*, 2008).

El recrecimiento, en cambio, puede suceder durante períodos más extensos (desde horas hasta días), siempre que el microorganismo encuentre condiciones favorables para su desarrollo. A continuación, de manera resumida, se desglosa la terminología punto por punto:

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

**Inactivación:** pérdida de viabilidad de un agente biológico (p. ej. bacterias y huevos de helmintos).

**Reactivación:** revitalización de los coliformes fecales que se han convertido en viables pero no cultivables (Qi *et al.*, 2008); incremento repentino de indicadores o patógenos después de un proceso

(Chen *et al.*, 2011); incremento en el número de microorganismos en un tiempo menor al tiempo de duplicación característico (Gattie y Lewis, 2004).

**Recrecimiento:** crecimiento subsecuente de las bacterias supervivientes y/o reactivadas en un ambiente favorable (Qi *et al.*, 2008). También se interpreta como el crecimiento observado después de un período de declinación (Zaleski *et al.*, 2005a).

**Tiempo de duplicación:** es el período que requieren las células de una población microbiana para crecer, dividirse, y dar lugar a dos nuevas células por cada una de las que existían anteriormente. El tiempo de duplicación es, aproximadamente, el mismo para todas las células de una determinada población. No cambia hasta que se agotan los nutrientes o comienzan a acumularse los productos metabólicos tóxicos (Camacho *et al.*, 2009).

El tiempo de duplicación varía dependiendo de la especie microbiana y de las condiciones de crecimiento de la población. La literatura establece para *E. coli* (mayor exponente de los coliformes fecales) tiempos de duplicación que van desde 18 minutos en medio enriquecido hasta 12 y 24 horas en el tracto intestinal de mamíferos. Para *Salmonella* spp. señala entre 15 y 20 minutos. En cambio, en matrices compuestas, Dentel *et al.* (2007) señalan un tiempo de duplicación para *E. coli* en lodos de 60 minutos y Cota-Espericueta (2007) en procesos de estabilización mediante secado solar, menciona que *Salmonella* spp. puede reproducirse aún en condiciones mínimas de nutrientes y humedad en 20 minutos.

De modo contrario a lo observado con *E. coli* o *Salmonella* spp., en las condiciones más favorables para el desarrollo, algunos microorganismos crecen muy lentamente, requiriendo horas o días para duplicar su número; tal es el caso de la microbiota anaerobia.

Dicho lo anterior, la reactivación y el recrecimiento pueden co-existir independientemente; puede ocurrir la reactivación y posteriormente el recrecimiento, o bien presentarse únicamente el recrecimiento sin necesidad de reactivación (Qi *et al.*, 2008). Esto último sucede si existen células viables aun en cantidades muy bajas, como por ejemplo en tratamientos de pasteurización.

Cuando el tratamiento térmico asegura la esterilización del lodo, no podrá presentarse la reactivación. Si la hubiera, sería un claro indicador de mala calidad del proceso: mezclado poco efectivo, temperatura insuficiente o tiempo de contacto menor al establecido.

Por último, si después de un tratamiento que asegure la esterilidad del lodo (altas temperaturas, presión aplicada o tratamiento termoquímico) se presentara el proceso de recrecimiento en el sitio de aplicación, podría deberse a contaminación cruzada (**recolonización** o **re-infección**, en la terminología empleada en el contexto de suelos, biosólidos y compostas).

## 2.4.6 IMPORTANCIA DE ASEGURAR LA DESINFECCIÓN DE LOS LODOS

Controlar la inactivación de patógenos durante los procesos de desinfección es tan importante como el control para evitar el recrecimiento durante la etapa de almacenamiento, transporte y aplicación de biosólidos en el suelo.

Si los patógenos logran sobrevivir y desarrollarse en los biosólidos, pueden ser transmitidos de un organismo a otro por contacto directo, contacto con sus heces o por ingestión de hortalizas cultivadas en el sitio de aplicación. Algunos investigadores han asociado enfermedades respiratorias en los habitantes de las cercanías a una PTAR o sitio de compostaje, mediante la formación de aerosoles (Jenkins *et al.*, 2007; Viau y Peccia, 2009).

Un aerosol se forma de muy pequeñas gotas de agua que, en este caso, transportan microorganismos infecciosos, agentes biológicos inviables, esporas fúngicas, ácaros y endotoxinas que producen alergias e intoxicaciones si son dispersados por acción del viento. Esto no siempre ha sido observado en puntos de aplicación de biosólidos. Los aerosoles son más comunes dentro y cerca de PTARs o sitios de compostaje (Jenkins *et al.*, 2007).

La US EPA ha patrocinado estudios como el US EPA (1979) o el de Jenkins, *et al.* (2007), así como el Parlamento Europeo patrocinó el de Smith (2008) en Inglaterra, para comprobar si existe peligro en la aplicación de biosólidos en los suelos; ambas investigaciones demostraron la inocuidad de los biosólidos si se respetan las restricciones de uso y aplicación, y se cumplen los límites máximos permitidos.

La calidad microbiológica de los lodos digeridos se evalúa conforme a la normatividad oficial de cada país (Tabla 2.16), midiendo la concentración de indicadores y patógenos, cuya supervivencia esté demostrada en suelos que han sido fertilizados con biosólidos. La Tabla 2.13 muestra los tiempos de supervivencia relativos de distintos agentes patógenos en suelos y plantas.

**Tabla 2.13. Tiempos de supervivencia de agentes patógenos en suelos y vegetación (Smith, 2008)**

Patógeno	Suelo		Vegetación	
	Máximo Absoluto	Máximo Común	Máximo Absoluto	Máximo Común
<b>Bacterias</b>	1 año	2 meses	6 meses	1 mes
<b>Virus</b>	6 meses	3 meses	2 meses	1 mes
<b>Protozoarios</b>	10 días	2 días	5 días	2 días
<b>Helmintos</b>	7 años	2 años	5 meses	1 mes

La presencia de estos indicadores o patógenos en cantidades superiores a las permitidas es una medida de la eficiencia de los tratamientos de estabilización y desinfección (Carrington, 2001; DOF, 2003; Smith, 2008).



La supervivencia de microorganismos o virus sobre los terrenos de cultivo y forestales, está influida por las condiciones ambientales, los nutrimentos presentes y el agua de lluvia o de riego. El crecimiento de patógenos sobre el suelo estará determinado también por competencia con la microbiota del ecosistema donde se apliquen los biosólidos o las compostas. Como ejemplo de esto, *Escherichia coli* puede recolonizar un punto de aplicación y desarrollarse si existe humedad suficiente, pero no puede hacerlo en medios más secos; *Salmonella* spp. no puede competir con la microbiota de los suelos, así que sólo recrece o recoloniza biosólidos y compostas estériles (Zaleski *et al.*, 2005a). Las Tablas 2.14 y 2.15 muestran cuáles son estos factores.

**Tabla 2.14. Factores que influyen en la supervivencia de patógenos en biosólidos aplicados en suelos (Carrington, 2001)**

<b>Factores</b>	<b>Efectos</b>
<b><i>Estructura Microbiana</i></b>	
<b>Bacteria</b>	Las bacterias formadoras de esporas (p. ej. <i>Clostridium</i> spp.) son más resistentes que las bacterias vegetativas (p. ej. <i>Salmonella</i> spp.) al estrés ambiental
<b>Virus</b>	Los virus sin envoltura (p. ej. Enterovirus) son más resistentes a los cambios de pH y la deshidratación que los virus con envoltura.
<b>Parásitos</b>	La mayoría de helmintos y protozoarios parásitos han desarrollado un estadio dentro del "ciclo de vida" que les otorga resistencia al estrés medioambiental.
<b><i>Factores Ambientales</i></b>	
<b>Luz Solar</b>	Todos los organismos son sensibles a la radiación ultravioleta de 265 nm
<b>Temperatura</b>	Los tiempos de supervivencia son mayores a temperaturas templadas (pero superiores a las de refrigeración). Las enterobacterias pueden multiplicarse a las temperaturas de verano.
<b>Humedad</b>	Muchos organismos no resisten la deshidratación. Las lluvias pueden reducir las concentraciones de microorganismos por procesos de lixiviación.
<b>pH</b>	La supervivencia se dificulta especialmente en valores de pH bajos (menores a 4) y altos (superiores a 10).
<b><i>Calidad de los biosólidos</i></b>	
<b>Concentración de patógenos</b>	El decaimiento sigue un comportamiento logarítmico; a mayores concentraciones, mayor posibilidad de supervivencia.
<b>Contenido de materia orgánica</b>	El contenido adecuado de nutrimentos orgánicos permitirá el desarrollo de enterobacterias, bajo condiciones favorables de crecimiento; sin embargo esto permitirá también el desarrollo de otros géneros, tanto propios de los desechos, como provenientes del suelo a través del contacto. Estos últimos, más adaptados al medio ambiente y capaces de competir por los recursos mayoritariamente.
<b>Organismos competidores</b>	Los nemátodos y protozoarios provenientes del suelo y otros desechos, son depredadores de bacterias y virus.
<b>Sustancias tóxicas antimicrobianas</b>	Estas sustancias parecen no estar presentes en los biosólidos en concentraciones efectivas, pero muy posiblemente en el suelo existan sustancias antimicrobianas naturales.
<b><i>Distribución de los biosólidos</i></b>	
<b>Modo de aplicación</b>	El grado de penetración de los rayos ultravioleta, el calor, la cantidad de humedad y el contacto con los depredadores del suelo, está ligado íntimamente al grosor de la capa de biosólidos aplicada. Mientras mayor sea el grosor, el efecto de estos factores disminuye.

## 2.4.7 PRODUCCIÓN DE OLORES NOCIVOS

La presencia de ciertas bacterias y hongos en los biosólidos o en compostas, produce olores muy desagradables o nocivos, que reducen el nivel de aceptación por parte del público usuario y de los habitantes de las cercanías a las plantas productoras y a los puntos de aplicación. Esto se debe a que el metabolismo microbiano produce ácidos grasos de cadena corta y otros compuestos volátiles ricos en azufre y nitrógeno, tales como: aminas, indoles, mercaptanos, sulfuros y tioles, entre otros; que son producto de la proteólisis y signo de putrefacción (Chen *et al.*, 2011).

La reducción de estos olores depende en gran medida del tratamiento utilizado para obtener biosólidos. Cuando se perciben malos olores dentro o en las cercanías de un punto de aplicación, se puede interpretar como evidencia de recrecimiento de microorganismos, de este modo, los malos olores se vuelven un indicador de actividad microbiana.

**Tabla 2.15. Factores que influyen en el decaimiento de patógenos en puntos de aplicación (Smith S.R., 2008)**

Factores	Efectos	Referencias
<b>Temperatura</b>	El aumento de la temperatura en 10 °C, duplica el efecto de inactivación Mayor es la supervivencia a temperaturas bajas, así como mayor en invierno que en verano	Tierney <i>et al.</i> , 1977 Bell y Bole, 1978 Reddy <i>et al.</i> , 1981 Andrews <i>et al.</i> , 1983
<b>Humedad contenida</b>	La disminución de humedad, reduce la supervivencia	Boyd <i>et al.</i> , 1969
<b>Capacidad de retención de agua</b>	Poca capacidad de retención de agua, menor posibilidad de supervivencia	Mallman y Litsky, 1951
<b>Absorción de agua en el suelo</b>	La máxima supervivencia se observa en condiciones de saturación del suelo	Kibbey <i>et al.</i> , 1978
<b>Método de Aplicación</b>	Hay menor supervivencia de microorganismos mediante aplicación superficial La inyección de los lodos al suelo puede proteger a los microorganismos	Giddens <i>et al.</i> , 1973 Andrews <i>et al.</i> , 1983 Wallis <i>et al.</i> , 1985
<b>pH</b>	Menor supervivencia en suelos ácidos (pH 3.0 – 5.5)	Beard, 1940 Mc Feters y Stuart, 1972 Lambert, 1974 Ellis y McCalla, 1976
<b>Escasez de nutrientes y flora competidora</b>	El suelo es un medio hostil que limita la supervivencia de microorganismos	Baubinas y Vlodavets, 1974 Gudding y Krogstad, 1975
<b>Luz Solar</b>	Menor supervivencia en suelos a nivel superficial	Van Donsel <i>et al.</i> , 1967 Tannock y Smith, 1971 Gerba <i>et al.</i> , 1975 Ellis y McCalla, 1976
<b>Sustancias Tóxicas</b>	Compuestos antimicrobianos producidos por la microbiota del suelo, pueden inhibir el crecimiento de otros microorganismos	Grossard, 1952 Pinck <i>et al.</i> , 1961 Soulides <i>et al.</i> , 1961

Se ha encontrado que las arqueas metanogénicas consumen compuestos azufrados volátiles, de manera que el desarrollo de la metanogénesis reduce significativamente los olores nocivos (Chen *et al.*, 2011).

Durante el almacenamiento de biosólidos en silos, como operación previa a la transportación hacia su destino, se ha identificado que las proteínas remanentes en los lodos son el sustrato para que la

microbiota superviviente produzca olores nocivos (Novak *et al.*, 2006). Con este enfoque, se han desarrollado metodologías para “secuestrar” proteínas mediante ligandos en las fases finales del tren de tratamiento (Chen *et al.*, 2007).

Muy pocas investigaciones se han realizado para evaluar el impacto que los malos olores tienen sobre la salud, pero en especial Nimmermark *et al.* (2004), así como Schiffman y Williams (2005) profundizaron sobre los efectos que estos estímulos tienen sobre la gente que vive o trabaja cerca de plantas de tratamiento de aguas residuales, mataderos, rastros y puntos de aplicación de biosólidos. Encontraron síntomas asociados a los malos olores tales como: irritación de ojos, nariz y garganta, dolores de cabeza, náusea, diarrea, dolor de garganta, ronquera, opresión en el pecho, congestión nasal, palpitaciones, falta de aliento, estrés general, somnolencia y alteraciones en el estado anímico.

## 2.5 MONITOREO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LODOS Y BIOSÓLIDOS

En el diseño del tren de tratamiento de lodos debe ser igualmente importante favorecer tanto la producción de metano (con todas las variables que implica) como la desinfección efectiva del lodo digerido. Al descuidar alguna de las dos áreas, el tren de tratamiento proyectado se vuelve ineficaz.

La normatividad de cada país, establece metodologías para dar seguimiento a los procesos de estabilización/desinfección de lodos y a los eventos que pueden suscitarse de su disposición final. La Tabla 2.16 se muestra como un compendio de los límites máximos permisibles para indicadores y patógenos en biosólidos según el criterio de distintos países.

Como podrá observarse, en México, las exigencias de la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003) se limitan a cumplir con los límites máximos permisibles para coliformes fecales (menos de 1000 NMP/g ST), *Salmonella* spp. (menos de 3 NMP/g ST) -como representante de las bacterias patógenas- y huevos de helmintos viables (menos de 1HH/g ST), en biosólidos de Clase A; en las clases B y C se monitorean los mismos microorganismos, pero los límites máximos son menos estrictos, tal como se mostraron en la Tabla 2.2 al inicio de este documento.

El Parlamento Europeo, a través de la *Sewage Sludge Directive 86/278/EEC*, tiene establecidos límites máximos en biosólidos para *E. coli* (menos de 1000 NMP/g ST), *Clostridium perfringens* (menos de 3000 esporas/g ST); *Salmonella senftenberg* (reducir al menos 4 log<sub>10</sub>) y huevos de *Ascaris* sp. (cero huevos viables).

Tabla 2.16. Especificaciones para la calidad biológica de biosólidos según la normatividad de distintos países (con base en Torres *et al.*, 2009)

Criterio	Unidad	Unión Europea (1)	EE.UU. (2)	México (3)	Brasil (4)	Chile (5)	Argentina (6)	Colombia (7)
Coliformes fecales	NMP/g	-	Clase A: <math>1 \times 10^3</math> Clase B: <math>2 \times 10^6</math>	Clase A: <math>1 \times 10^3</math> Clase B: <math>1 \times 10^3</math> Clase C: <math>2 \times 10^6</math>	Clase A: <math>1 \times 10^3</math> Clase B: <math>1 \times 10^6</math>	Clase A: <math>1 \times 10^3</math>	-	Clase A: <math>1 \times 10^3</math> Clase B: <math>2 \times 10^6</math>
<i>Salmonella</i> spp.	NMP/g	-	Clase A: <math>3/4g</math>	Clase A: <math>3</math> Clase B: <math>3</math> Clase C: <math>300</math>	Aus/10g	Clase A: <math>3/4g</math>	Clase A: <math>3/4g</math>	Clase A: Ausente Clase B: <math>1 \times 10^3</math>
Huevos de helmintos	HH/g	-	Clase A: <math>1/4g</math>	Clase A: <math>1</math> Clase B: <math>10</math> Clase C: <math>35</math>	Clase A: <math>1/4g</math> Clase B: <math>10</math>	Clase A: <math>1/4g</math>	-	Clase A: <math>1/4g</math>
Virus	UFP/g	-	Clase A: <math>1/4g</math>	-	Clase A: <math>1/4g</math>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	NMP/g	<math>1000</math>	-	-	-	-	Clase A: <math>1 \times 10^3</math> Clase B: <math>2 \times 10^6</math>	-
<i>Salmonella senftenberg</i>	NMP/g	Reducir 4 log	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	Esporas/g	<math>3000</math>	-	-	-	-	-	-
Huevos de <i>Ascaris</i> sp.	HH/g	0 viables	-	-	-	-	-	-

(1) Directiva 86/278/EEC; (2) 40 CFR Part 503 (US EPA, 2003); (3) NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003); (4) Resolución N° 375 de 29 de agosto de 2006 (Conama, 2006); (5) Decreto Supremo N°123 (30/08/2006), (Conama, 2000; Mena, 2008); (6) Resolución N° 97/01(22/11/2001) (Mena, 2008); (7) Propuesta de Norma, versión de abril, 2009 (Minambiente, 2009).

En los EE.UU., la US EPA, a través de la *40 CFR Part 503 Regulation* (2003) contempla dos categorías de biosólidos: la Clase A que estipula límites máximos para coliformes fecales (menos de

1000 NMP/ g ST) o *Salmonella* spp. (menos de 3 NMP/4g ST), huevos de helmintos viables (menos de 1HH/4g ST) y virus entéricos (menos de 1 UFP/4g ST); y para la Clase B: coliformes fecales (menos de 2,000,000 NMP/g ST).

Resulta evidente que los diferentes países monitorean distintos agentes biológicos. Esto obedece al estado de salud y hábitos de vida de la población (Castrejón *et al.*, 2002). En ciertos países al norte de Europa resulta muy poco probable encontrar *Salmonella* spp. en sus aguas residuales (Arthurson, 2008), así como en Latinoamérica se puede encontrar una cantidad más extensa de patógenos e infecciones causadas por helmintos, diferencias todas estrechamente vinculadas con el desarrollo social y cultural.

### 2.5.1 CALIDAD MICROBIOLÓGICA: LA TERMINOLOGÍA

Para abordar el aseguramiento de la calidad en el contexto de desinfección de lodos, es indispensable definir algunos términos:

**Indicadores:** un indicador es un “patógeno sustituto”, y debe tener las siguientes características (Carrington, 2001):

- 1) Estar presente de forma constante y en altas concentraciones en lodos crudos.
- 2) Ser ligeramente más resistente que los patógenos al tratamiento (térmico, químico, mecánico, etc.) al que será sometido el lodo crudo. Pero nunca excesivamente resistente.
- 3) Ser relativamente fácil de cultivar y poseer características que lo hagan fácil de identificar y confirmar.

**Indicadores fecales:** Estos deben de ser constantes, abundantes y exclusivos de la materia fecal, deben tener una sobrevivencia similar a la de los patógenos intestinales pero ser capaces de desarrollarse extraintestinalmente (Camacho *et al.*, 2009). El grupo coliforme es constante, abundante y casi exclusivo de la materia fecal, sin embargo, las características de sobrevivencia y la capacidad para multiplicarse fuera del intestino también se observan en aguas potables, por lo que el grupo coliforme se utiliza como indicador de contaminación fecal en agua; un gran número de enfermedades son transmitidas por vía fecal-oral utilizando como vehículo los alimentos y el agua. En productos alimenticios que han recibido un tratamiento térmico (pasteurización, horneado, cocción, etc.), se utilizan como indicadores de malas prácticas sanitarias.

**Patógeno:** agente biológico capaz de causar enfermedades si está presente en cantidad suficiente y condiciones favorables (DOF, 2003).

**Agente biológico:** bacterias, hongos, levaduras, protozoarios, helmintos (en cualquiera de sus estadios infectivos) y virus.

Dentro del contexto de la normatividad oficial mexicana en materia de agua, alimentos y biosólidos, se enuncian las siguientes definiciones:

**Coliformes totales:** este grupo de bacterias comprende todos los bacilos Gram-negativos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 h a  $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Este grupo está conformado por cuatro géneros principalmente: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. (Camacho *et al.*, 2009).

**Coliformes fecales:** El grupo de coliformes fecales está constituido por bacterias Gram-negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a las 48 h de incubación a  $44.5 \pm 0.1\text{ °C}$ . Este grupo no incluye una especie determinada, sin embargo la más prominente es *Escherichia coli*. (Camacho *et al.*, 2009; DOF, 1995-a)

***Escherichia coli*:** bacilo corto Gram-negativo que se encuentra clasificado dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (bacterias entéricas o enterobacterias), existe como comensal en el intestino delgado de humanos y animales. Sin embargo, hay algunas cepas de *E. coli* patógenas que provocan enfermedades diarreicas. Estas *E. coli* se clasifican con base en las características que presentan sus factores de virulencia únicos, puesto que cada grupo provoca la enfermedad por un mecanismo diferente (Camacho *et al.*, 2009; DOF, 1995-a).

***Salmonella spp*:** Bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Se desarrollan de forma óptima a  $37\text{ °C}$ ; algunas especies presentan motilidad por sus flagelos peritricos. Fermentan de manera característica glucosa y manosa sin producir gas, pero no fermentan lactosa ni sacarosa. La mayoría produce ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ). A menudo, son patógenos para el hombre y los animales cuando se ingieren, ocasionando fiebre tifoidea y enterocolitis (conocida también como gastroenteritis) (DOF, 2003).

**Helminto:** término designado a un amplio grupo de gusanos parásitos (de humanos, animales y vegetales), de vida libre, con forma y tamaños variados. Poseen órganos diferenciados, y sus ciclos vitales comprenden la producción de huevos o larvas, infecciosas o no (DOF, 2003).

**Huevos de helmintos viables:** huevos de helmintos susceptibles de desarrollarse e infectar (DOF, 2003).

## 2.5.2 CONSIDERACIONES ACERCA DE LAS ENTEROBACTERIAS EN ESTUDIO

La amplia distribución de *Salmonella* spp. en diversos ambientes, aunada a las prácticas agrícolas utilizadas en la industria cárnica, pesquera, de moluscos, láctea y el reciclaje de la materia prima como alimento para ganado han favorecido la continua permanencia de este patógeno humano en la cadena alimenticia. El sector avícola se sitúa como la principal fuente de *Salmonella* spp. y enmascara la importancia como vehículos de infección de las carnes de puerco, de res, de cordero, leche y sus derivados.

Las frutas y verduras han ganado notoriedad en años recientes como fuentes de salmonelosis humana. Esto se presenta como una consecuencia de diversos factores como: la fertilización de sembradíos con lodos sin tratamiento o efluentes de drenajes potencialmente contaminados con *Salmonella* spp. resistente a antibióticos; la irrigación de los campos y el lavado de frutas y verduras con aguas contaminadas; la manipulación antihigiénica excesiva por los trabajadores, la exposición a la contaminación ambiental de especias y condimentos durante el secado, y la resistencia del microorganismo a valores de pH bajos (Camacho *et al.*, 2009).

Por practicidad metodológica, se ha elegido a *E. coli* como indicador (coliformes fecales), pues comparte características semejantes a las formas bacterianas vegetativas de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Vibrio* spp., aunque también con algunos virus (Carrington, 2001).

Sin embargo, recientemente se han hecho comparaciones donde los enterococos resultan más resistentes que *E. coli* y otras bacterias y virus de mayor patogenicidad (Rhomdhana *et al.*, 2009; Piterina *et al.*, 2010). Por otra parte, el género *Clostridium* (*C. perfringens*) que se encuentra comúnmente en los lodos y en concentraciones semejantes a las de *E. coli*, es más termo-resistente que cualquiera de las formas vegetativas bacterianas. Su destrucción durante el tratamiento indicaría también la destrucción de otros esporulados como el género *Bacillus* y la destrucción de huevos de helminto (Carrington, 2001; Smith 2008).

## 2.5.3 MÉTODOS DE CULTIVO ESTÁNDAR (MCE)

El aislamiento y recuento de coliformes fecales y *Salmonella* spp. –así como de otros indicadores y patógenos- puede realizarse empleando medios de cultivo líquidos y sólidos con características no-selectivas (contienen nutrimentos aprovechables por todos los géneros presentes), selectivas (permiten el desarrollo de un grupo microbiano en particular, inhibiendo a los demás) y diferenciales (contienen inhibidores y sustancias indicadoras, que permiten confirmar visualmente la presencia aislada del género en estudio).

La identificación del género y especie, requiere de dos pasos subsecuentes y complementarios uno del otro: la identificación bioquímica (donde se aprovechan las características metabólicas del género sobre una batería de pruebas con diversos sustratos) y la serotipificación (que se vale de las características genotípicas del género y la especie).

Para ilustrar lo dicho en el párrafo anterior, la técnica para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos que se presenta a continuación (Camacho *et al.*, 2009), describe un esquema general que consta de cinco pasos básicos:

- Pre-enriquecimiento, es el paso en donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* spp. dañadas, logrando de esta manera una condición fisiológica estable.
- Enriquecimiento selectivo, se logra a partir de un medio de cultivo que conjunte dos condiciones: por un lado debe incrementar las poblaciones de *Salmonella* spp. y por otro inhibir a los demás microorganismos presentes en la muestra.
- Selección en medios sólidos, este punto se deriva directamente del anterior y se utilizan medios selectivos, que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* spp. y que permitan el reconocimiento visual característico de colonias sospechosas.
- Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* spp. y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.
- Serotipificación, es una técnica inmunológica (antígeno-anticuerpo) que permite la identificación específica de un microorganismo.

Carrington (2001) señala las desventajas de los análisis de rutina (MCE) para monitorear la calidad microbiológica de los lodos:

- a) Muchas de las pruebas fueron diseñadas para muestras clínicas, donde se espera una alta carga de patógenos, mientras que en caso de los biosólidos sucede a la inversa.
- b) Los análisis clínicos se enfocan -muchas veces- a la presencia o ausencia de patógenos. La cuantificación es más costosa tanto en materiales y reactivos como en mano de obra.
- c) Los análisis pueden ser caros, sobre todo si conllevan etapas de enriquecimiento.
- d) La técnica estadística de **número más probable** (NMP) es inexacta.
- e) Muchas bacterias requieren medios de cultivo específicos



- f) Los distintos tipos de virus requieren líneas celulares específicas.
- g) Algunos patógenos no pueden ser fácilmente enumerados.
- h) La recuperación de huevos de helmintos o quistes de protozoarios se vuelve peligrosa para el analista, tediosa, ineficiente y la viabilidad no es fácil de determinar.
- i) Los resultados se obtienen en –al menos- 24 horas o en algunos casos semanas después.

Aunque pueden añadirse a la lista otros factores como: demasiado tiempo para la preparación de los medios de cultivo, muchas etapas de aislamiento, limitaciones por el espacio físico donde se incubarán las cajas de Petri y los tubos de ensaye, así como la susceptibilidad de los cultivos a cambios de temperatura cuando el control de la misma se pierde por causas ajenas al analista.

Por otra parte, el uso de medios de enriquecimiento y enriquecimiento selectivo, para la cuantificación de géneros patogénicos da lugar a la sobre estimación del número de células viables y permite el recrecimiento o la reactivación de células en estado viable pero no cultivable (Sidhu y Toze, 2009).

De forma objetiva, el panorama no es tan desalentador en cuanto a los MCE, pues son una ventaja desde el enfoque costo-beneficio para los laboratorios donde se cuenta con vasta experiencia analítica, material suficiente para todas las pruebas (en especial para la técnica de número más probable en todas sus variantes) y facilidades para adquirir y preparar medios de cultivo frecuentemente.

Pese a la inexactitud o elevado precio de ciertos análisis, los MCE siguen siendo adecuados para el nivel de exigencia de algunos solicitantes, muy especialmente si las pruebas no son urgentes o el volumen de muestras remitidas es muy grande. Algunos laboratorios ofrecen descuentos por volumen y otros recurren a la maquila de ciertas pruebas, con lo que se abaten costos y por tanto los precios.

#### **2.5.4 MÉTODOS MOLECULARES (MM)**

Se han mencionado algunos inconvenientes de los análisis microbiológicos usando MCE, así como los puntos favorables de su uso. Sin embargo, existe una razón de fondo para recurrir a métodos complementarios o alternos con el fin de asegurar la calidad microbiológica de un producto: la sensibilidad o límite de detección.

Con los MCE es imposible detectar muy pequeñas concentraciones del (de los) microorganismo(s) en estudio; en ocasiones debido a componentes del medio que enmascaran a los microorganismos, a veces por interferencias con sustancias inhibitoras y especialmente por causa de la condición celular

microbiana “viable, pero no-cultivable” (VPNC) que pueden adquirir ciertos indicadores y patógenos (Dentel *et al.*, 2007; Sidhu y Toze, 2009).

El resultado es que los MCE estiman la concentración real de microorganismos en estudio (Qi *et al.*, 2007 y 2008; Viau y Peccia, 2009; Wong *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012).

En la investigación de Higgins *et al.* (2007) estudiaron la subestimación de los métodos de cultivo estándar comparados con la detección lograda con los métodos moleculares (MM), con diferencias entre 1 y 5 log<sub>10</sub> entre métodos, dependiendo del proceso de estabilización estudiado.

Los MM son una herramienta ampliamente utilizada en distintas disciplinas, con particular utilidad en materia de alimentos y dentro de la ingeniería ambiental, pero desafortunadamente no forman parte de los métodos oficiales que señalan la SEMARNAT (en México) o la US EPA (en EE.UU). para el análisis de lodos y biosólidos.

Estos métodos de extracción/identificación/cuantificación son mucho más sensibles que los MCE estipulados en la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003), porque se basan en las características genómicas de los microorganismos y virus, en vez de las características fisiológicas. Se pueden identificar secuencias genéticas y correlacionarlas con un género y a su vez con una especie; también es posible cuantificar el ADN molde y la concentración del amplicón obtenidos, para extrapolar estos valores a cantidad de organismos presentes en la muestra.

Como es natural, las ventajas de estos MM serán evidentes siempre y cuando se tengan dominados los protocolos de extracción, se utilicen los reactivos biológicos específicos, *primers* (cebadores) y se cuente con técnicas desarrolladas como la PCR en tiempo real. Para este fin se necesitan instrumentos especializados y costosos para muchos laboratorios.

### 2.5.5 COMPARACIÓN ENTRE LOS MCE Y MM

No siempre es posible hacer la comparación entre los métodos moleculares y los métodos de cultivo estándar, puesto que la PCR tiene un alto límite de detección en muestras sólidas con respecto a los MCE. Los valores de qPCR (PCR cuantitativa) obtenidos en investigaciones como las de Wéry *et al.* (2008) y Viau y Peccia (2009), suelen ser mayores a los de cultivo porque el ADN extraído de las muestras corresponde con el ADN total (aquel proviene de células dañadas o inviables, de células intactas en estado viable y de células en estado VPNC).

La PCR es útil para detectar agentes microbianos no-dominantes (minoría poblacional) en los casos donde el cultivo se dificulta; debido a que se requiere de un protocolo de extracción de ADN, las

muestras de composición compleja han sido un pequeño obstáculo técnico, como ha sido el caso en muestras de lodos y composta (Wéry *et al.*, 2008). La Tabla 2.17 muestra los métodos de extracción utilizados por algunos grupos de investigación con aplicaciones muy particulares.

**Tabla 2.17. Técnicas de Extracción de ADN en muestras de biosólidos y aguas residuales, informadas en distintas investigaciones (Von Frankenhuyzen *et al.*, 2011)**

Matriz	Microorganismo(s) blanco	Técnica de extracción de ADN	Referencia
Biosólidos (Digestión Anaerobia)	<i>Escherichia coli</i>	Buffer de lisis, proteasa K, 20% SDS; 65 °C incubación y centrifugación; re-extracción (doble) de pellets con buffer de lisis e incubaciones de 65 °C; purificación utilizando dos extracciones con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, seguidas de una extracción con cloroformo.	Higgins <i>et al.</i> (2007)
Cultivos puros, aguas residuales (influyente), sedimentos	Bacterias aisladas del medio ambiente, <i>E. coli</i> O157:H7	Qbiogene Soil Kit (Qbiogene, Carlsbad, CA, USA)	Nocker <i>et al.</i> (2007)
Biosólidos (compostaje)	Especies de <i>Salmonella</i>	PowerSoil™ DNA Isolation Kit	Novinscak <i>et al.</i> (2007, 2008)
Agua residual cruda, efluentes primarios, licor mezclado, lodos activados de purga, efluentes finales	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Sataphylococcus aureus</i>	Adición de disolución de Lisozima-EDTA a las muestras; incubación en baño de agua a 37 °C/45min; utilización del Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA) potenciado de la siguiente forma: digestión con ribonucleasa A, repetición de protocolo desde precipitación de proteínas hasta adición de etanol.	Shannon <i>et al.</i> (2007)
Lodo (Fermentador Anaerobio)	<i>Clostridium perfringens</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i>	PowerSoil™ DNA Isolation Kit, agregando dos ciclos de congelación-derretimiento para facilitar la lisis celular	Wagner <i>et al.</i> (2008)
Agua residual (influyente y efluente), heces humanas	<i>Bacteroides fragilis</i>	FastDNA Spin Kit for Soil (Biomedicals, Solon, OH), utilizando un batidor Minibread (Biospec Products Inc., Bartlesville, OK) para obtener lisis celular	Bae y Wuez (2009)
Agua	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Qbiogen Soil Kit	Nocker <i>et al.</i> (2009)
Agua residual: influente, tratamiento primario y secundario, desinfección.	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Matriz de molienda y centrifugación, según el procedimiento descrito por Haughland <i>et al.</i> (2005)	Haughland <i>et al.</i> (2005) Varma <i>et al.</i> (2009)

## 2.5.6 CUANTIFICACIÓN CELULAR: EL ADN TOTAL

Para fines de cuantificación (qPCR) puede sortearse el inconveniente de cuantificar el ADN total mediante una técnica que permita detectar solamente las células viables en la muestra, como puede ser la RT-qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real); o bien, empleando qPCR con muestras previamente tratadas con agentes selectivos de células viables (Van Frankenhuyzen *et al.*, 2010).

Viau y Peccia (2009) evaluaron sistemas de estabilización y desinfección de lodos mediante qPCR, encontrando una relación directa entre *E. coli* y sus bacteriófagos (colífagos) con los niveles de inactivación de los patógenos más comunes en lodos.

Durante la revisión bibliográfica para la elaboración de la presente investigación, se encontró un gran número de publicaciones que comparan el uso de métodos de cultivo estándar y métodos moleculares simultáneamente para analizar la calidad microbiológica en muestras de aguas residuales, lodos crudos, lodos estabilizados, biosólidos, compostas y suelos; en todos ellos se efectúan comparaciones cualitativas y cuantitativas. En el ANEXO IV de este documento, se ha incluido una selección de estas publicaciones.

En estos trabajos se efectúan propuestas sobre nuevos microorganismos indicadores y patógenos de mayor virulencia que los especificados por la normatividad en materia de biosólidos. Se efectúan diversos análisis de viabilidad en la aplicación de métodos moleculares durante el tren de tratamiento del agua residual o sobre el tren de tratamiento de lodos. Esto incluye los métodos de estabilización biológicos, mecánicos, térmicos, químicos, termo-químicos, etc. En la Tabla 2.17 se muestran ejemplos de estos métodos y aplicaciones.

### 2.5.7 DIFERENCIACIÓN ENTRE CÉLULAS VIABLES E INVIABLES: PMA

Como parte de los reactivos útiles para seleccionar a las células viables dentro de una muestra, la monoazida de etidio (EMA) y la **monoazida de propidio** (PMA) son dos compuestos usados para inhibir la amplificación del ADN extracelular o ADN proveniente de células muertas o con membrana citoplásmica lesionada/dañada (inviabiles). Las estructuras moleculares de estos compuestos se muestran en la Figura 2.4.

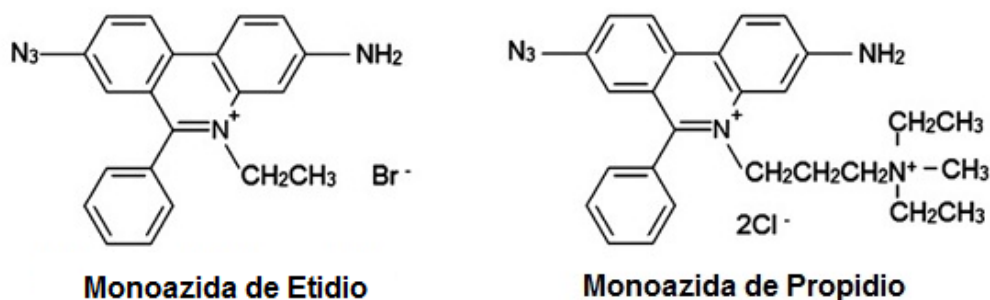
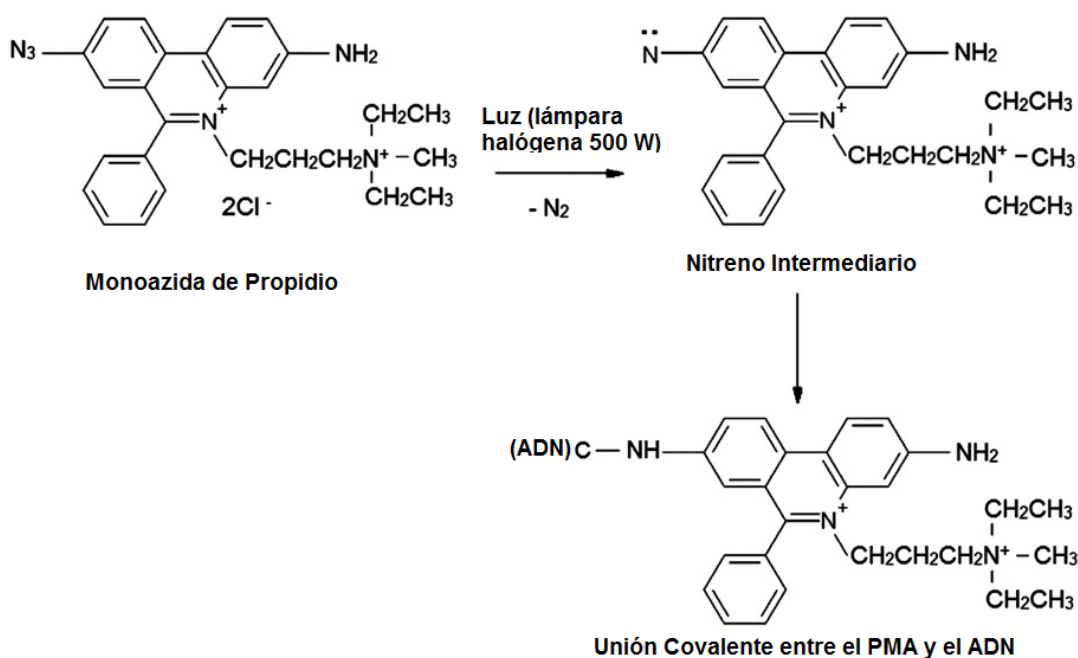


Figura 2.4. Estructura molecular la Monoazida de Etidio (EMA) y la Monoazida de Propidio (PMA).

Si se emplean adecuadamente estos reactivos como parte de la técnica, se evita el principal inconveniente de la qPCR: cuantificar ADN total (Bae y Wuestz, 2009; Varma *et al.*, 2009; Wagner *et*

*al.*, 2008). Los reactivos EMA y PMA son colorantes incapaces de ingresar al citoplasma de células vivas a través de membranas intactas (Nocker *et al.*, 2006-b).

El EMA o el PMA se agregan a la muestra como paso previo a la extracción de ADN. Siguiendo el mecanismo de reacción propuesto por Nocker *et al.*, 2006a, estos reactivos se unen al ADN en proporción 1:4 ó 1:5 (1 molécula de colorante por cada 4 ó 5 nucleótidos). Cuando se expone a la luz, la fotólisis del EMA y el PMA promueve la conversión del grupo azida en un radical nitreno, que se unirá covalentemente a cualquier átomo de carbono medianamente próximo, incluyendo tanto al ADN extracelular como al ADN de doble cadena contenido en las células cuya membrana esté comprometida (dañada), formando un enlace carbono nitrógeno (C-N). Esta unión covalente inhibe la amplificación por PCR. Dicho mecanismo se muestra en la Figura 2.5.



**Figura 2.5. Mecanismo de reacción entre la monoazida de propidio y el ADN empleado fotólisis, propuesto por Nocker *et al.* (2006).**

Nocker y Camper (2006b) encontraron que el complejo EMA-ADN es insoluble en agua y puede ser removido junto a los residuos celulares durante las etapas de extracción de ADN. El exceso de EMA o PMA reacciona con el agua formando un complejo (hidroxilamina) que no se une con el ADN, así que su función queda inhibida. Por tal razón es importante asegurar que la concentración y volumen del reactivo en la mezcla de reacción sea cuidadosamente añadida.

Cronológicamente, el EMA se utilizó primero, pero mostró inconvenientes porque una buena cantidad de células no-comprometidas resultaban permeables a éste; el PMA fue diseñado con base en las cualidades positivas del EMA pero con la ventaja de que las membranas celulares no-comprometidas

(viables) son mucho más impermeables a este compuesto y por tanto su selectividad aumenta. El PMA ha sido usado en todo tipo de matrices, desde muestras alimentarias hasta ambientales para identificar bacterias, esporas bacterianas y hongos en suelos, compostas, biosólidos, etc. (Nocker *et al.*, 2009).

El PMA es usado en especial con muestras que serán sometidas a procesos de desinfección mediante cloración, radiación UV o tratamientos térmicos como la pasteurización.

Durante la Etapa Experimental 3 de la presente investigación se utilizó PMA para diferenciar entre células viables (vivas) y células inviables (muertas) en muestras de lodos pre-tratados térmicamente y enfriados, como parte de la evaluación de cinéticas de reactivación/recrecimiento microbianas, analizadas por PCR cualitativa.

## 2.6 PRE-TRATAMIENTO TÉRMICO Y ENFRIAMIENTO DEL LODO

No se encontró en la literatura especificación acerca de la metodología de enfriamiento aplicada a lodo pre-tratado caliente en la mayoría de las publicaciones que abordan el tema de pre-tratamientos térmicos y digestión anaerobia mesófila (PT/DAM). Exceptuando la publicación de Sanin *et al.* (1994) como el único referente de “congelación/descongelación” en lodos digeridos.

Enfriar el lodo pre-tratado es recomendable para garantizar la integridad de la biomasa, ya que de inyectarse al digestor una mezcla caliente, la actividad biológica al interior podría verse comprometida; tomando en cuenta que los digestores operan en un intervalo de temperatura entre los 20 °C y 40 °C, podría impactar sobre la estabilidad proceso. Sin embargo, este efecto podría no ser tan marcado cuando se emplean pre-tratamientos térmicos moderados, considerando la masa mucho mayor que representa el lodo dentro del digestor en comparación con la masa alimentada.

Autores como Aitken *et al.* (2005) han empleado el baño de hielo a -15 °C o -20 °C para sumergir las muestras inmediatamente extraídas de un digestor anaerobio como paso previo al resto de análisis microbiológicos; otros, como Foliguet *et al.* (1972); Blackburn *et al.* (1997); Humpheson *et al.* (1998) y Lang *et al.* (2008) recurrieron a los baños de hielo (-20 °C) para “frenar” el efecto del calor sobre los microorganismos cuando se realiza una cinética de inactivación térmica.

Pero estos experimentos a nivel laboratorio son distintos a las condiciones de un tren de tratamiento de lodos PT/DAM. En una PTAR, se utilizan cambiadores de calor para los procesos de transferencia de energía, pero no especifican cuál es la temperatura final de la mezcla de lodos ni en cuánto tiempo enfrían.

## 2.6.1 RAPIDEZ DE ENFRIAMIENTO

En el trabajo de Sanin *et al.* (1994) investigaron una modalidad de tratamiento de estabilización denominada *Freeze/Thaw* (**congelar/descongelar**) en las regiones más frías de los EE.UU. y Canadá, donde es posible congelar grandes cantidades de lodo a la intemperie sin invertir energía. Esta técnica se fundamenta en el daño celular inducido por medio de los cristales de agua que se forman en el citoplasma o en torno a las células durante la congelación; aunque el daño celular sucede mayoritariamente durante la descongelación, cuando los cristales se forman y destruyen reversiblemente, perforando las membranas y componentes celulares.

Por esta razón, en la preservación criogénica de tejidos animales y vegetales, es imprescindible el congelamiento súbito -recurriendo muchas veces al nitrógeno líquido- y la descongelación se hace lentamente, para evitar la lisis celular.

Mediante la investigación de Sanin *et al.*, (1994) se determinó el impacto de la temperatura final de enfriamiento (-7 °C, -18 °C y -25 °C) y el tiempo de contacto (7 a 28 días), sobre los coliformes fecales y *Salmonella* spp. presentes en lodos de purga, así como en Poliovirus, *Cryptosporidium parvum* y huevos viables de *Ascaris summ*. Encontraron que *Salmonella* spp. resulta muy afectada mientras más frío se logra, con efecto óptimo en -18 °C; y los coliformes fecales sólo a -25 °C se ven más afectados.

El período de congelación influyó hasta cierto límite (7 días) tanto para *Salmonella* spp. como para los coliformes fecales, pues más allá de siete días no se observaron mayores cambios. *Cryptosporidium parvum* fue reducido en más de 8 log<sub>10</sub>, pero los huevos de *Ascaris summ* no se inactivaron; y Poliovirus fue muy afectado en períodos largos de congelación.

Mediante la técnica de congelar/descongelar, Sanin *et al.* (1994) cumplieron con lo establecido en EE.UU para Biosólidos Clase B.

Ante la escasa información acerca del enfriamiento posterior al calentamiento, se revisó el proceso de enfriamiento en la industria alimentaria, donde se emplean métodos de pasteurización semejantes a los métodos aplicados para el tratamiento de lodos de purga. En alimentos es sabido que el enfriamiento debe hacerse lo más rápido posible, al igual que sucede con la crio-preservación.

El enfriamiento acelerado cumple con ciertos propósitos en la elaboración de alimentos, como por ejemplo evitar la proliferación de microorganismos mesófilos, interrumpir la acción del calor sobre el alimento para evitar la pérdida de atributos sensoriales y propiedades nutricias, y en casos específicos, para propiciar la textura que caracteriza a los embutidos. Los métodos pueden ser por inmersión del producto en agua fría o agua con hielo, o mediante intercambiadores de calor.

Con base en lo anterior, se justifica la importancia de evaluar distintas metodologías de enfriamiento para conocer el impacto de éstas sobre el desarrollo de patógenos e indicadores en los lodos después del pre-tratamiento y durante la digestión anaerobia mesófila.

En esta investigación se generó información relevante sobre la relación entre temperatura de calentamiento y temperatura de enfriamiento, y muy especialmente acerca de la rapidez con que se retira calor del sistema.

El método de enfriamiento utilizado por Noyola (2007) y Martínez-Arce (2009) es considerado -en la terminología del presente proyecto- como de tipo *paulatino*, pues emplearon un dispositivo *termohidrolizador de lodos* que enfriaba mediante corriente de aire provista por un ventilador en la base del reactor. Esta corriente de aire controlada electrónicamente, también ayudaba a disipar el calor excedente para mantener la temperatura del proceso constante.

## **2.7 DESARROLLO DEL SISTEMA PT/DAM (PRE-TRATAMIENTO TÉRMICO / DIGESTIÓN ANAEROBIA MESÓFILA)**

La investigación que aquí se desarrolla está fundamentada en los trabajos elaborados por el Grupo de Investigación de Procesos Anaerobios (GIPA) del Instituto de Ingeniería de la UNAM, y se ha tomado como punto de partida la investigación de Martínez-Arce (2009), quien estableció ciertas condiciones de tiempo y temperatura moderada para el sistema PT/DAM aplicado en lodos de purga provenientes de una PTAR municipal.

Como recomendaciones al final de dicho trabajo, la autora sugirió profundizar en un fenómeno microbiológico que se presentó durante la experimentación: la inactivación de coliformes fecales y *Salmonella* spp. mediante los pre-tratamientos y la reactivación o recrecimiento de estos microorganismos durante la digestión anaerobia mesófila subsecuente, alcanzando concentraciones a la salida del digester superiores a las permitidas por la NOM-004-SEMARNAT-2002 para *biosólidos de clase A*. Este fenómeno se ha reportado previamente por Iranpour y Cox (2006) y Qi *et al.*, (2007 y 2008), entre otros.

Martínez-Arce (2009) formuló las siguientes hipótesis para explicar el fenómeno microbiológico observado:

- a) Tolerancia microbiana al tratamiento térmico aplicado (60 °C durante 60 minutos)
- b) Carga microbiana muy alta en el inóculo de arranque en los digestores



c) Condiciones favorables en el digestor anaerobio mesófilo para el desarrollo de coliformes fecales y *Salmonella* spp.

Algunas recomendaciones propuestas por la autora fueron:

- Operar el dispositivo de hidrólisis térmica a 70 °C durante 60 minutos.
- Emplear un inóculo reducido en coliformes fecales y *Salmonella* spp. para evitar proliferación desde el arranque de los digestores.
- Encontrar los mecanismos por los cuales la bacterias coliformes fecales y *Salmonella* spp. se reactivan o recrecen durante la DAM.

Para comprobar dichas hipótesis y atender a las recomendaciones, es muy importante recordar que la DAM inactiva a las bacterias en muy pequeña medida (entre 1 y 2 log<sub>10</sub>), además inviabiliza muy pocos huevos de helminto (Gantzer *et al.*, 2001; Castrejón *et al.*, 2002) y esta es la razón por la que se acopla el pre-tratamiento térmico. En la Tabla 2.18 tomada de Smith (2008), se muestra la comparación entre los distintos niveles de inactivación alcanzados por diversos sistemas de estabilización/desinfección de lodos, entre los cuales figura el sistema PT/DAM.

El protocolo experimental de la presente investigación, implicó el estudio de dos temperaturas (70 °C y 80 °C) y un tiempo de contacto con la fuente calorífica de 60 minutos, para evaluar la tolerancia microbiana al pre-tratamiento térmico utilizado por Martínez-Arce (2009). De este modo se obtuvieron las condiciones (temperatura/tiempo) con las que es posible obtener la mayor inactivación de coliformes fecales y *Salmonella* spp.

Particularmente, se generó información muy relevante relacionada con el enfriamiento de lodos pre-tratados, determinándose que existe una relación entre el calentamiento y el choque térmico que da lugar a resultados muy distintos en el recrecimiento de los microorganismos en estudio. De este modo, se establecieron condiciones de PT compuestas por tres variables:

- Temperatura de calentamiento
- Tiempo de contacto
- Rapidez de enfriamiento.

Con respecto a la recomendación de emplear un inóculo reducido en coliformes fecales y *Salmonella* spp., se probó arrancando digestores anaerobios mesófilos con distintos inóculos para conocer la influencia de los mismos sobre el recrecimiento de las bacterias en estudio.

Para fines comparativos se utilizaron los mismos digestores anaerobios de geometría oval y el mismo dispositivo termohidrolizador de lodos empleados por Martínez-Arce (2009).

**Tabla 2.18. Niveles de inactivación de algunas bacterias y virus durante el tratamiento de lodos residuales, mostrados en órdenes logarítmicos (Smith, 2008)**

Organismo	Proceso						Secado Térmico (escala piloto)
	DAM	Pasteurización + DAM		Estabilización con Cal -Viva	Compostaje		
		70 °C/30 min	55 °C/240 min		55 °C/4 h	40 °C/5 d	
<i>Escherichia coli</i>	3.38 3.36	8.33* 7.48*	8.33* 7.48*	4.76* 4.35*	6.18*	6.18*	7.26
<i>Listeria monocytogenes</i>	2.23+ 2.23	9.00* 7.24*	9.00* 3.12*	6.75*	3.05 3.15	2.50 2.38	NP
<i>Campylobacter jejuni</i>	0.36 0.32	8.22* 5.31*	5.31* 3.82	7.49* 7.23*	5.72* 5.68*	5.72* 5.68*	NP
<i>Salmonella senftenberg</i>	4.33 4.03	7.97* 7.81*	7.97* 5.74	7.95* 6.11* 4.71*	2.39	2.09	NP
<i>Salmonella typhimurium</i>	NP	9.33* 6.72* 6.12*	6.72* 6.12*	9.67* 8.75*	NP	NP	NP
<i>Salmonella enteritidis</i>	NP	8.24*	8.24*	NP	5.68*	5.68*	NP
<i>Salmonella dublin</i>	NP	NP	NP	7.58* 6.84*	5.58*	5.58*	NP
<i>Poliovirus</i>	4.49 4.43	8.43* 8.17*	8.43* 8.41*	6.82 6.50	7.85*	7.85*	NP
<i>Cryptosporidium</i>	3.20 2.15	Viabilidad reducida hasta en 97% mediante pasteurización y luego hasta cero mediante DAM (1 día)		1.98 0.00	NP	NP	NP

DAM: digestión anaerobia mesófila; +: digestión de lodo primario (únicamente); \*: inactivación total; NP: no practicado.

## 2.8 ESTRUCTURACIÓN DE LA FASE EXPERIMENTAL

La experimentación se dividió en tres etapas, la primera de ellas consistió en el arranque y operación de tres digestores anaerobios mesófilos para estudiar el efecto de tres distintos inóculos en el fenómeno de reactivación y recrecimiento informado por diversos autores. Durante esta etapa los análisis practicados fueron tanto fisicoquímicos como microbiológicos; los primeros para monitorear los parámetros de la digestión anaerobia y los segundos para evaluar los lodos (sin tratamiento, pre-tratados y digeridos) usando los métodos de cultivo estándar estipulados por la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003).

La segunda etapa se diseñó con base en los resultados preliminares de la etapa uno, elaborando distintas cinéticas de crecimiento microbianas –aquí denominadas cinéticas de reactivación/recrecimiento- empleando matrices de lodo de purga sometido a distintos pre-tratamientos térmicos, donde se evaluó tanto el efecto de la temperatura y tiempo de contacto, como

la rapidez y temperatura de enfriamiento. Se practicaron análisis microbiológicos con métodos de cultivo estándar exclusivamente.

Por último, la tercera etapa de experimentación se diseñó una vez concluida la etapa de experimentación, con el fin de generar información adicional que aportara nuevos elementos para explicar los resultados. Se seleccionaron las cuatro cinéticas de reactivación/recrecimiento de especial interés para el cumplimiento de los objetivos y se analizaron paralelamente tanto por métodos de cultivo estándar como por métodos moleculares, siendo estos últimos únicamente cualitativos. En esta etapa de experimentación se utilizó la monoazida de propidio (PMA) para discriminar entre células viables de células inviables.

### 3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El Grupo de Investigación en Procesos Anaerobios (GIPA) del Instituto de Ingeniería (II) de la UNAM, realiza investigaciones en lo referente al tratamiento de las aguas residuales y lodos de purga, siendo una de éstas el pre-tratamiento térmico acoplado al proceso de digestión anaerobia mesófila (PT/DAM). En torno a este tren de tratamiento gira la presente investigación, centrando el interés en la obtención de *biosólidos* con calidad de excelencia (Clase A).

Con el objetivo de ofrecer el arreglo PT/DAM como alternativa atractiva y rentable de estabilización de lodos residuales para la industria de tratamiento y re-uso de aguas residuales, tanto en plantas existentes como futuras, resulta de gran importancia identificar las condiciones que permiten la inactivación efectiva y sin lugar a reactivación ni recrecimiento de los coliformes fecales y de *Salmonella* spp., cumpliendo con las exigencias de la NOM-004-SEMARNAT-2002 para este grupo de bacterias en biosólidos de Clase A.

#### HIPÓTESIS

“Es posible inactivar eficientemente a las bacterias coliformes fecales y *Salmonella* spp. en lodos de purga al aplicar un pre-tratamiento térmico de temperatura moderada (70 °C) durante 60 minutos, y cumplir con lo estipulado por la NOM-004-SEMARNAT-2002 para biosólidos de Clase A”

#### OBJETIVO GENERAL

Evaluar diferentes condiciones de calentamiento y enfriamiento en pre-tratamientos de temperatura moderada que inactiven eficientemente a las bacterias coliformes fecales y *Salmonella* spp. presentes en lodos de purga, evitando su reactivación y recrecimiento durante la digestión anaerobia mesófila subsecuente, asegurando el cumplimiento de lo establecido por la NOM-004-SEMARNAT-2002 al respecto de estos microorganismos en biosólidos de Clase A.

#### OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar la influencia del inóculo en los digestores anaerobios sobre el incremento de la concentración de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en el lodo digerido.
- ❖ Obtener la temperatura mínima de pre-tratamiento que alcance la mayor inactivación de coliformes fecales y *Salmonella* spp.
- ❖ Determinar si el enfriamiento del lodo al final del calentamiento influye en la reactivación y/o recrecimiento de coliformes fecales y de *Salmonella* spp.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 ETAPA DE EXPERIMENTACIÓN 1 - DIGESTIÓN ANAEROBIA MESÓFILA: ARRANQUE Y OPERACIÓN DE DIGESTORES D-I, D-II Y D-III

#### 4.1.1 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LODOS DE PURGA

Muestreo: se eligió trabajar con muestras provenientes de la PTAR (3 m<sup>3</sup>/d) que opera con las descargas de sanitarios de los edificios 12 y 18 del Instituto de Ingeniería de la UNAM, en Ciudad Universitaria, DF. Los lodos provinieron del tanque séptico y de dos plantas de lodos activados tipo paquete, así como de una microplanta que conjunta los tratamientos aerobio-anaerobio-anóxico en un mismo sistema; las plantas paquete y la microplanta son el tratamiento secundario del agua residual. Así se obtuvieron los lodos primarios (LP) y secundarios (LS).

Acondicionamiento de las muestras: los lodos extraídos se dejaron sedimentar durante 4 horas para retirar el exceso de agua por decantación. Una vez concentrados, se envasaron en bidones de 20 litros para ser transportados y almacenados en la cámara fría del laboratorio de Ingeniería Ambiental a  $6 \pm 1$  °C hasta su utilización.

El periodo de refrigeración de 12 horas permitió la máxima sedimentación de los lodos, que se decantaron de nueva cuenta para alcanzar la máxima concentración de sólidos.

A cada lote de lodo se le determinó la cantidad de sólidos totales, sólidos totales volátiles (fracción orgánica) y sólidos totales fijos (fracción inorgánica) (ST, STV y STF, respectivamente), siguiendo las metodologías estándar de la *American Public Health Association* (APHA, 1999).

Los lodos concentrados se mezclaron en proporción 60% LP y 40% LS (p/p), con una base de cálculo de 40g ST/l en la mezcla final, que fue denominada como lodo crudo (LC). La mezcla en proporción 60%-40% se ha estudiado en investigaciones previas y simula la misma corriente de lodos de purga en una PTAR municipal con lodos activados convencionales (Rubio-Loza, 2004; Martínez-Arce, 2009).

El LC fue la matriz de estudio. Se determinaron ST, STV y STF (Métodos Estándar, APHA, 1999) a cada mezcla preparada y se analizaron microbiológicamente para cuantificar coliformes fecales y *Salmonella* spp. mediante la técnica del número más probable usando tubos múltiples, estipuladas en la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003), como será descrito en la sección 4.1.4.

#### 4.1.2 PRE-TRATAMIENTO DE LODOS CRUDOS (PT)

Las temperaturas de pre-tratamiento estudiadas fueron 70 °C y 80 °C y el tiempo de contacto de 60 minutos en ambos casos.

Se utilizó un reactor (termohidrolizador de lodos) de temperatura programable, con agitación mecánica permanente y volumen útil de 1 litro (Figura 4.1). El dispositivo reguló el calentamiento del lodo y mantuvo la temperatura constante (70 °C u 80 °C, dependiendo del tratamiento a probar) con variación de  $\pm 1$  °C durante el ciclo de operación (60 minutos).



**Figura 4.1. Esquema del dispositivo termohidrolizador de lodos. 1: Controlador digital de temperatura y tiempo; 2: agitador tipo propela; 3: termopar; 4: conexiones; 5: ventilador; 6: resistencia eléctrica 200 Watt; 7: reactor de vidrio; 8: acoplamiento de reactor y agitador; 9: volumen útil de 1 litro; 10: sistema ensamblado.**

Para obtener el lodo de alimentación de los digestores en esta etapa experimental, tras los 60 minutos de calentamiento, el lodo se enfrió dentro del reactor mediante la corriente de aire provista por el equipo hasta alcanzar una temperatura aproximada de 40 °C para alimentar a los digestores sin afectar a la biomasa.

Los lodos pre-tratados se analizaron microbiológicamente para cuantificar coliformes fecales y *Salmonella* spp. mediante las técnicas que serán descritas en la sección 4.1.4

### 4.1.3 PREPARACIÓN DE LOS TRES DIFERENTES INÓCULOS

Para conocer el efecto del inóculo sobre la concentración de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en los lodos digeridos, se probaron dos opciones: a) inóculo convencional (lodo granular anaerobio) y b) inóculo no-convencional (lodo pre-tratado térmicamente), esperando en esta última opción menor concentración de microorganismos patógenos e indicadores, pero así también una actividad metanogénica desconocida.

Digestor I (D-I) se arrancó con inóculo no-convencional pre-tratado a 70 °C por 60 min y enfriado por aire; se alimentó al digestor con lodo pre-tratado en las mismas condiciones.

Digestor II (D-II) se arrancó con inóculo convencional, lodo granular anaerobio proveniente del reactor UASB (*Upflow Anaerobic Sludge-Blanket Bioreactor*, Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente de Lecho de Lodos) de la PTAR de una empresa cervecera. Se alimentó con el mismo lodo que el D-I.

Digestor III (D-III) se arrancó empleando inóculo no-convencional pre-tratado a 80 °C por 60 min y enfriado por aire; se alimentó con lodo pre-tratado en las mismas condiciones. Con este digestor se probó un pre-tratamiento térmico más drástico que en el D-I para asegurar la desinfección, e inhibir los procesos de reactivación y/o recrecimiento de coliformes fecales y *Salmonella* spp., a manera de control negativo tanto de la digestión anaerobia mesófila como del fenómeno de re-activación y recrecimiento informado por Martínez-Arce (2009).

Se diseñaron metodologías de arranque para cada digestor, con base en el esquema de alimentación escalonada desarrollada previamente por el Grupo de Investigación en Procesos Anaerobios (se presentan en el ANEXO II), empleando para el monitoreo los siguientes criterios: pH, relación de alcalinidades (valor  $\alpha$ ), producción y composición de biogás. Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos se encuentran desglosados en la Tabla 4.1.

### 4.1.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS – MÉTODOS DE CULTIVO ESTÁNDAR (MCE)

Para cuantificar a las enterobacterias (coliformes fecales y *Salmonella* spp.) se siguieron los métodos descritos en la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003), Anexos III y IV para evaluar la calidad de los tratamientos de estabilización de lodos y biosólidos. Dichas metodologías estiman la densidad de bacterias mediante la técnica del Número Más Probable (NMP) por tubos múltiples en series de tres.

Las muestras de lodos crudos, pre-tratados y digeridos se diluyeron 1:10 empleando agua de disolución recién preparada y estéril ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ , JT Baker<sup>TM</sup>) (DOF, 2003) y

partiendo de esta dilución se prepararon sucesivas diluciones decimales que, debido a su constitución y turbidez, fue necesario llevar hasta  $10^{-10}$  en algunos casos para proceder de acuerdo con la técnica del NMP.

En el caso de coliformes fecales se eligió la “prueba directa”, que consiste en tubos de ensaye con campanas de fermentación (tubos de Durham) y 9 ml de Caldo de Cultivo A-1 (pre-incubación a  $35 \pm 0.5$  °C/3h e incubación a  $44.5 \pm 0.2$  °C/21  $\pm$  2h) para verificar producción de gas por fermentación de la lactosa, indicador del metabolismo de coliformes fecales.

Para la cuantificación de *Salmonella* spp. se utilizó enriquecimiento selectivo en Caldo de Tetrionato (Bioxon™), usándolo como diluyente del lodo (1:10) (incubando a  $37 \pm 0.2$  °C/20  $\pm$  4 h), seguido de un segundo enriquecimiento selectivo mediante inoculación de las subsecuentes diluciones decimales en tubos de ensaye con 9 ml de Caldo Selenito-Cistina (Difco™) que vira del color ambar al “anaranjado intenso” como evidencia del crecimiento del género *Salmonella* (incubando a  $41 \pm 0.2$  °C/24  $\pm$  2 h).

La confirmación de pruebas positivas se llevó a cabo usando medios de cultivo diferenciales para *Salmonella* spp., sembrando por asada e incubando a  $35 \pm 0.2$  °C/24 h para observar el desarrollo de colonias bacterianas típicas: Agares VB (Bioxon™), SB (Bioxon™) y SS (Difco™) (verde brillante, sulfito de bismuto y *Salmonella-Shigella*, respectivamente).

El NMP se calculó mediante el código compuesto por los tubos con resultado positivo en cada una de las pruebas, conforme con lo establecido por la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003), Anexos III y IV. Para ello se seleccionaron y contabilizaron los tubos con resultados positivos en las tres series consecutivas, verificando el valor de NMP correspondiente a dicha combinación (dentro del intervalo de combinaciones entre 3-3-3 y 0-0-0) en tablas como la que se muestra en el Anexo VI del presente documento.

Teniendo el NMP de tablas para dicha combinación, se utilizó la fórmula (DOF, 2003):

$$\text{NMP} = (\text{NMP de Tablas}) \times (10/\text{Dilución Más Alta Inoculada})$$

Entendiéndose como dilución más alta a aquella de entre las tres seleccionadas que más se acercara a  $10^{-1}$  (1:10). La densidad de coliformes fecales y de *Salmonella* spp. se expresó como NMP por gramo de sólidos totales en la muestra (NMP/g ST), una vez hecha la conversión de cuántos gramos de materia seca hubo por mililitro de lodo, pues todas las diluciones decimales fueron volumétricas.



Tabla 4.1. Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos analizados: metodologías y frecuencia de muestreo

Tipo de Análisis	Técnica Analítica	Frecuencia	Muestreo
<b>Fisicoquímicos</b>			
Sólidos Totales Totales (ST; mg/L) Sólidos Totales Volátiles (STV; mg/L) Sólidos Totales Fijos (STF; mg/L)	Métodos Estándar, (APHA, 1999)	3 / Semana	LC, PT, LD
pH (unidades de pH)	Potenciómetro	Diario	LD
Temperatura (T; °C)	Termómetro	Diario	PT, LD
Alcalinidad (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	Métodos Estándar, (APHA, 1999)	Diario	LD
Relación de alcalinidades (valor $\alpha$ )	Métodos internos, GIPA	Diario	LD
Producción de biogás	Medidor de gas húmedo	Diario	Digestores
Composición del biogás	Cromatografía de gases	Diario	Digestores
<b>Microbiológicos</b>			
<b>Métodos de Cultivo Estándar</b>			
Coliformes fecales (NMP/g ST)	NOM-004-SEMARNAT-2002; (DOF, 2003) Métodos Estándar, (APHA, 1999)	<b>DAM</b> (Arranque: 3/semana; Operación: 2/semana)	LC, PT, LD
<i>Salmonella</i> spp. (NMP/g ST)	NOM-004-SEMARNAT-2002; (DOF, 2003) Métodos Estándar, (APHA, 1999)	<b>CRR</b> Todas las muestras desglosadas en la Tabla 4.3	LC, PT, LD
<b>Métodos Moleculares</b>			
Extracción ADN	Gómez-Borraz (2012)	<b>CRR</b> Etapa de Experimentación 3 – Cinéticas de Reactivación/Recrecimiento por Métodos Moleculares Ver Tabla 4.3	
Diferenciación entre Células Viables y Células Inviabiles	Nocker <i>et al.</i> (2006-a)		
Amplificación de ADN para coliformes fecales: PCR Múltiplex	Horáková <i>et al.</i> (2008)		
Amplificación de ADN para <i>Salmonella</i> spp: PCR	McCabe <i>et al.</i> (2011)		

Métodos internos GIPA: Manual de Técnicas Analíticas (basado en APHA) adaptadas por el Grupo de Investigación de Procesos Anaerobios (GIPA), IINGEN – UNAM; APHA: (American Public Health Association, 1999) “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”. 20th Edition. pp 1.134, DAM: Digestión Anaerobia Mesófila (Etapa de Experimentación 1). CRR: Cinéticas de Reactivación/Recrecimiento Microbianas (Etapas de Experimentación 2 y 3); LC: lodo crudo; PT: lodo pre-tratado; LD: lodo digerido.

#### 4.1.5 OPERACIÓN DE DIGESTORES D-I, D-II Y D-III

Los digestores operados fueron de geometría oval (*Egg-Shaped Digesters*, ESD) con capacidad de 9 litros y volumen útil de 5 litros (las características y dimensiones de estos digestores se ilustran en la Figura 4.2). La temperatura de operación fue de  $35 \pm 1$  °C; bajo el régimen de operación de 13 días de Tiempo de Retención Hidráulica (TRH o TRS). La alimentación se efectuó diariamente en un solo momento, purgando previamente el mismo volumen que se alimentó, conservando así el volumen útil constante una vez alcanzado el TRS. Los procedimientos de arranque y operación se describen detalladamente en el Anexo II.

El lodo purgado se analizó fisicoquímicamente de acuerdo con los Métodos Estándar (APHA, 1999) y métodos internos, GIPA (Tabla 4.1) para determinar ST, STV, STF, pH, alcalinidad parcial, alcalinidad intermedia, alcalinidad total y calcular el valor  $\alpha$ . Los análisis microbiológicos se practicaron de acuerdo con lo descrito en la sección 4.1.4 para coliformes fecales y *Salmonella* spp.

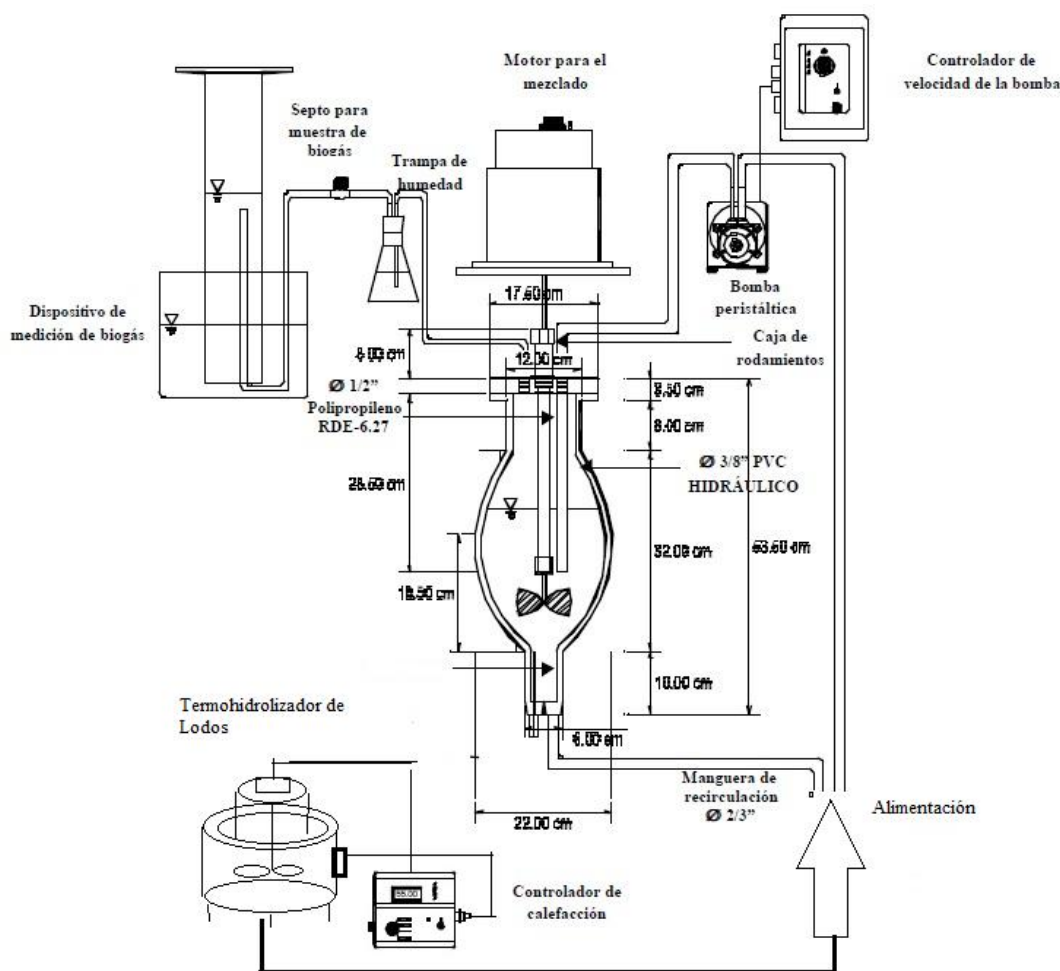


Figura 4.2. Ilustración de un digestor anaerobio e hidrolizador de lodos (con base en Rubio-Loza y Noyola, 2010).

## 4.2 ETAPA DE EXPERIMENTACIÓN 2 - CINÉTICAS DE REACTIVACIÓN / RECRECIMIENTO POR MÉTODOS DE CULTIVO ESTÁNDAR

Con base en los resultados obtenidos mediante la operación de los digestores, se diseñó el estudio de la reactivación y recrecimiento de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en lodos pre-tratados a 70 °C y 80 °C, con especial atención al método y rapidez de enfriamiento de la mezcla caliente, asumiendo que el enfriamiento debe contemplarse como una variable del proceso de pre-tratamiento.

### 4.2.1 LODOS DE PURGA

Procedimientos descritos en la sección 4.1.1

### 4.2.2 PRE-TRATAMIENTO DE LODOS CRUDOS

Procedimientos descritos en la sección 4.1.2

### 4.2.3 RAPIDEZ DE ENFRIAMIENTO

Se evaluó al enfriamiento mediante tres métodos de rapidez distinta e incubando los lodos pre-tratados y fríos a  $35 \pm 1$  °C durante 36 horas (como mínimo) y 72 horas (como máximo).

La rapidez de enfriamiento se clasificó y definió como:

- 1) Enfriamiento Paulatino: enfriamiento por corriente de aire generada por el termohidrolizador hasta alcanzar 25 °C en el lodo pre-tratado.
- 2) Enfriamiento Rápido: inmersión y agitación mecánica permanente del lodo pre-tratado en un baño de hielo hasta alcanzar 25 °C.
- 3) Enfriamiento Acelerado: inmersión del lodo pre-tratado con agitación mecánica permanente en un baño de hielo-cloruro de sodio (10% p/p; a -20 °C) hasta alcanzar temperaturas finales de 20 °C, 10 °C ó 0 °C.

En los tres casos, se monitoreó el descenso de la temperatura mediante un termopar conectado al dispositivo digital que controla al termohidrolizador.

### 4.2.4 LOTES E INCUBACIÓN

Los experimentos se elaboraron con lotes de 1 litro, vertiendo el lodo pre-tratado y frío en matraces Erlenmeyer estériles con tapón de goma, provistos de agitación magnética en una cámara a 35 °C.

Las pruebas se efectuaron por duplicado, aunque en los casos de enfriamiento paulatino se contó con valores de referencia derivados de la operación de digestores en la etapa de experimentación uno.

#### 4.2.5 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Se emplearon los métodos de cultivo estándar estipulados por la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003), tal como fueron descritos en la sección 4.1.4

Para el seguimiento de la dinámica, se tomaron alícuotas de 30 ml del lodo en incubación, según el esquema de muestreo desglosado en la Tabla 4.2. Las muestras se analizaron de acuerdo con las metodologías señaladas en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.2. Condiciones evaluadas e intervalos de muestreo mediante las Cinéticas de Reactivación/Recrecimiento Microbianas**

Pre-tratamiento	Enfriamiento	Intervalos de Muestreo (horas)
70 °C/60 min	Paulatino	0, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36
70 °C/60 min	Rápido	0, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36
70 °C/60 min	Acelerado	0, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 40, 48, 54, 60, 72
80 °C/60 min	Paulatino	0, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36
80 °C/60 min	Rápido	0, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36
80 °C/60 min	Acelerado	0, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 40, 48, 54, 60, 72

### 4.3 ETAPA DE EXPERIMENTACIÓN 3 – CINÉTICAS DE REACTIVACIÓN / RECRECIMIENTO ANALIZADAS POR MÉTODOS MOLECULARES

Con base en los resultados de la etapa de experimentación 2 se seleccionaron cuatro cinéticas. En dos de ellas se demostró que bajo tales condiciones de pre-tratamiento/enfriamiento ocurrió la reactivación de coliformes fecales y *Salmonella* spp., mientras que en las otras dos cinéticas, en función de las condiciones de pre-tratamiento/enfriamiento que las caracterizaron, las enterobacterias estudiadas permanecieron inactivas por –al menos- 72 horas.

Durante esta tercer etapa de experimentación, empleando la técnica de PCR de tiempo final y el tratamiento de las muestras de lodo con monoazida de propidio (PMA) para diferenciar células viables de células inviables, se estudiaron cualitativamente las cuatro cinéticas para confirmar la presencia o ausencia de células viables de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en los casos donde la inactivación fue permanente (de acuerdo con los análisis por métodos de cultivo estándar).

### 4.3.1 LODOS DE PURGA

Procedimientos descritos en la sección 4.1.1

### 4.3.2 PRE-TRATAMIENTO DE LODOS CRUDOS

Procedimientos descritos en las secciones 4.1.2 y 4.1.4.

### 4.3.3 RAPIDEZ DE ENFRIAMIENTO

Procedimientos descritos en la sección 4.2.3

### 4.3.4 LOTES E INCUBACIÓN

Procedimientos descritos en las secciones 4.1.2 y 4.2.5.

### 4.3.5 ELECCIÓN DE LAS CINÉTICAS

Se estudiaron cuatro cinéticas de reactivación/recrecimiento bajo dos condiciones de pre-tratamiento térmico (70 °C y 80 °C), durante 60 minutos de contacto y dos condiciones de enfriamiento (acelerado y paulatino). 70 °C/60 min/paulatino, 70 °C/60 min/acelerado, 80 °C/60 min/paulatino y 80 °C/60 min/acelerado. Los intervalos de muestreo se desglosan en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3. Cinéticas de reactivación/recrecimiento microbianas analizadas cualitativamente por métodos moleculares para diferenciar células viables de células inviables mediante el uso de monoazida de propidio (PMA) y amplificación del ADN por PCR de tiempo final.**

Condiciones de Calentamiento	70 °C / 60 min	70 °C / 60 min	80 °C / 60 min	80 °C / 60 min
Condiciones de Enfriamiento	Paulatino	Acelerado	Paulatino	Acelerado
<b>Muestras (pre-/post-calentamiento)</b>	LC (lodo crudo)	LC	LC	LC
	70 °C / 0 min	70 °C / 0 min	80 °C / 0 min	80 °C / 0 min
	70 °C / 20 min	70 °C / 20 min	80 °C / 20 min	80 °C / 20 min
	70 °C / 40 min	70 °C / 40 min	80 °C / 40 min	80 °C / 40 min
	70 °C / 60 min	70 °C / 60 min	80 °C / 60 min	80 °C / 60 min
<b>Muestras (enfriamiento/incubación)</b>		20 °C		20 °C
		10 °C		10 °C
	25 °C (T-0)	0 °C (T-0)	25 °C (T-0)	0 °C (T-0)
	T-1 (6 horas)	T-1 (6 horas)	T-1 (6 horas)	T-1 (6 horas)
	T-2 (12 horas)	T-2 (12 horas)	T-2 (12 horas)	T-2 (12 horas)
	T-3 (24 horas)	T-3 (24 horas)	T-3 (24 horas)	T-3 (24 horas)
	T-4 (36 horas)	T-4 (36 horas)	T-4 (36 horas)	T-4 (36 horas)
	T-5 (48 horas)	T-5 (48 horas)	T-5 (48 horas)	T-5 (48 horas)
	T-6 (72 horas)	T-6 (72 horas)	T-6 (72 horas)	T-6 (72 horas)

#### 4.3.6 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS CON MONOAZIDA DE PROPIDIO (PMA)

Las muestras referidas en la Tabla 4.3 se diluyeron 1:10 y 1:100 con disolución salina de fosfatos (PBS); cada dilución se separó en dos partes, la primera se trató con monoazida de propidio (PMA) y la otra sin-PMA; se trabajó por duplicado para cada dilución (1:10 y 1:100), con-PMA y sin-PMA.

Se transfirieron 1.5 ml de cada dilución a microtubos de centrífuga con capacidad de 2 ml (Eppendorf). Para el tratamiento se agregó a las muestras 1 microlitro de monoazida de propidio (PMA) (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) a cada microtubo en oscuridad, cubriendo después la gradilla con papel aluminio. Las muestras se reposaron por cinco minutos para permitir la primera activación del PMA. Transcurrido el tiempo, las muestras se colocaron en una cama de hielo horizontalmente para ser expuestas durante 5 min a una distancia de 20 cm de una lámpara de halógeno de 500W para la fotoactivación (fotólisis) del PMA. Este procedimiento se llevó a cabo mediante movimiento oscilatorio suave (aprox. 30 rpm), para permitir la homogenización del reactivo con la muestra y favorecer el mayor contacto de la mezcla con la fuente lumínica. Finalizado este procedimiento se extrajo el ADN de las muestras.

#### 4.3.7 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se realizó tanto a las muestras con-PMA como a aquellas sin-PMA, centrifugando los microtubos a 10000g por 5 min hasta obtener el concentrado en forma de pellet. Dichos pellets fueron procesados para aislar al ADN por medio del MoBio PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories, Carlsbad, CA., USA), de acuerdo con las recomendaciones de Gómez-Borraz (2012) para la extracción de ADN en muestras de lodos anaerobios, pues encontró que la lisis mecánica y enzimática conjuntas brindan los mayores rendimientos en este tipo de matrices. Los extractos se preservaron a -20 °C hasta su amplificación.

#### 4.3.8 AMPLIFICACIÓN DEL ADN POR PCR DE TIEMPO FINAL

Se emplearon las metodologías para detectar coliformes fecales (PCR Múltiplex) (Horáková *et al.*, 2008) y *Salmonella* spp. (PCR Uniplex) (McCabe *et al.*, 2011) descritas a continuación:

Coliformes fecales: a 2.5 microlitros de ADN molde se agregaron 0.5  $\mu$ M de cada uno de los cebadores directos (F) e inversos (R), concentraciones finales de 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 50 mM KCl, 0.1% Tritón X-100, 200  $\mu$ M de cada desoxinucleósido trifosfato (dNTP), 1 U de Ampli Taq Gold Polimerasa

y 1X de PCR Buffer Gold. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador *Master Cycler* de Eppendorf, mediante el programa descrito a continuación: 1) desnaturalización inicial por 90 s/94 °C, 2) 30 ciclos desnaturalizantes de 30 s/94 °C, 3) hibridación por 25 s/58 °C, 4) extensión por 30 s/72 °C. Los cebadores (*primers*) específicos para coliformes fecales se enlistan en la Tabla de 4.4

*Salmonella spp.*: a 5 microlitros de ADN molde se agregaron 0.5 µM de cebadores directo (F) e inverso (R), concentraciones finales de 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 4.0 mM de desoxinucleósidos trifosfato (dNTP's), 2.5 U de Ampli Taq Gold Polimerasa y 1X de PCR Buffer Gold. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador *Master Cycler* de Eppendorf, mediante el programa descrito a continuación: 1) desnaturalización inicial por 5 min/95 °C, 2) 35 ciclos desnaturalizantes de 15 s/95 °C, 3) hibridación por 60 s/65 °C, 4) extensión por 60 s/72 °C, 5) extensión final por 5 min/72 °C. Los cebadores específicos para el gen *hilA* de *Salmonella spp.* se enlistan en la Tabla de 4.4.

**Tabla 4.4. Cebadores específicos para coliformes fecales y *Salmonella spp.* para amplificación del ADN por PCR**

Aplicación	Clave	Secuencia 5' → 3'	nt	T <sub>m</sub> (°C)	Tamaño del amplicón	Referencias
Coliformes fecales	<b>lacZ-F</b>	ATG AAA GCT GGC TAC AGG AAG GCC	24	74	264 pb	Horáková <i>et al.</i> , 2008
Coliformes fecales	<b>lacZ-R</b>	GGT TTA TGC AGC AAC GAG ACG TCA	24	72		
Coliformes fecales	<b>uidA-F</b>	ATC GGC GAA ATT CCA TAC CTG	21	62	319 pb	Horáková <i>et al.</i> , 2008
Coliformes fecales	<b>uidA-R</b>	GTT CTG CGA CGC TCA CAC C	19	62		
Coliformes fecales	<b>cyd-F</b>	CCG TAT CAT GGT GGC GTG TGG	21	68	393 pb	Horáková <i>et al.</i> , 2008
Coliformes fecales	<b>cyd-R</b>	GCC GGC TGA GTA GTC GTG GAA G	22	72		
Coliformes fecales	<b>lacY-F</b>	ACC AGA CCC AGC ACC AGA TAA G	22	68	463 pb	Horáková <i>et al.</i> , 2008
Coliformes fecales	<b>lacY-R</b>	GCA CCT ACG ATG TTT TTG ACC A	22	64		
<i>Salmonella spp.</i>	<b>hilA-F</b>	CGC CGG CGA GAT TGT GAG TA	20	64	270 pb	McCabe <i>et al.</i> , 2011
<i>Salmonella spp.</i>	<b>hilA-R</b>	AGA CTC TCG GAT TGA ACC TGA	21	62		

#### 4.3.9 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Se utilizaron geles de agarosa al 1%, preparados con el colorante GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (10,000X en DMSO) (Biotium Inc., USA). El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler™ Express DNA Ladder, Ready-to-use (Thermo Fischer Scientific Inc.) con un rango de 100 a 5000pb (Figura 4.3). Se agregó en cada pozo 5 microlitros de ADN amplificado, 2 microlitros de disolución amortiguadora de carga (*buffer* de carga) y 1.5 microlitros de marcador de peso molecular (GR). Las

condiciones de electroforesis fueron de 80 volt por 90 min para coliformes fecales y de 85 volt por 90 min para *Salmonella* spp.

En el caso de *Salmonella* spp. el amplicón se visualiza mediante la presencia de una sola banda característica del gen *hilA*, mientras que en el caso de coliformes fecales se observa la aparición de cuatro bandas correspondientes con los genes *lacZ*, *uidA*, *cyd* y *lacY*. De aparecer menos de cuatro bandas, el resultado se asocia con la presencia de bacterias coliformes totales.

Aquellas muestras tratadas con monoazida de propidio se visualizan como bandas tenues, opacas o muy poco brillantes con respecto a las muestras sin-PMA, porque la cantidad de ADN molde es menor (sólo provienen de células viables), ya que en las muestras sin-PMA el ADN molde proviene del ADN total (extraído del total de células presentes, tanto viables como inviables).

Cabe recordar que los geles de agarosa cuentan con diversos carriles, en cuyos pozos o puntos de aplicación se colocan las muestras a separar mediante la técnica de electroforesis. Cuando la separación se da por concluida, es necesario revelar los geles (p.ej. mediante lámpara de UV) para la observación de los resultados, mismos que se traducen como la presencia de bandas (fragmentos) de distinto peso molecular en cada carril. Estas bandas se correlacionan con un marcador de pesos moleculares localizado en los carriles de los extremos derecho e izquierdo del gel de agarosa para interpolar el tamaño de dichos fragmentos.

La intensidad de color o brillo de cada una de estas bandas conserva una relación directamente proporcional con la concentración de dicho fragmento molecular (amplicón), de modo que para un tamaño molecular dado las bandas tenues corresponden con bajas concentraciones del amplicón en la muestra y una mayor intensidad de color o brillo en un fragmento del mismo peso molecular corresponde con mayor concentración de dicho amplicón.

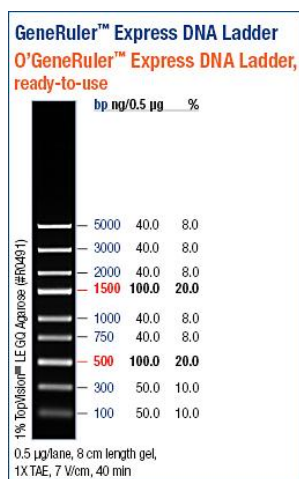


Figura 4.3. Marcador de peso molecular (GR), GeneRuler® (100-5000pb).



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 ETAPA DE EXPERIMENTACIÓN 1 – DAM

Los resultados se muestran y discuten agrupados de acuerdo con el tipo de análisis y la sub-etapa experimental donde se obtuvieron, ya sea en lo correspondiente al monitoreo de la digestión anaerobia o al análisis microbiológico de los digestores, pre-tratamientos y tipo de inóculo. El orden dentro de cada sub-etapa corresponde a los objetivos particulares propuestos al inicio y al diseño cronológico de la metodología.

#### 5.1.1 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DE LOS DIGESTORES

El lodo tratado térmicamente no se ha reportado como inóculo en otras investigaciones, por lo que no se contó con datos de referencia. Debido al calentamiento, se esperaba una comunidad microbiana disminuida en microorganismos fermentadores, acidogénicos y metanogénicos, suponiéndose un período de arranque más prolongado en los digestores D-I y D-III comparados con el arranque del digestor D-II.

Se comprobó que la actividad metanogénica se vio afectada por los pre-tratamientos en el inóculo no-convencional, ya que los digestores D-I y D-III tardaron 22 y 23 días, respectivamente, en mostrar evidencia de actividad biológica (p. ej. producción de biogás); en tanto que el digestor D-II fue activo desde el primer día, aunque alcanzó estabilidad pocos días después, como es natural en los procesos biológicos.

Resulta conveniente recordar que uno de los parámetros monitoreados en la digestión anaerobia es la relación de alcalinidades o relación  $\alpha$  -tal como fue descrito en los antecedentes y metodología del presente documento- cuyos valores deben ser mayores o iguales a 0.4 para considerar que el digestor es capaz de procesar la carga orgánica suministrada. De este modo, en la Figura 5.1 se muestra que el D-II presentó un valor  $\alpha \geq 0.4$  desde el día cero, con fluctuaciones moderadas hacia la baja, pero en creciente aumento con respecto al período de operación; en contraste, los digestores D-I y D-III mostraron valores  $\alpha < 0.4$  desde el día cero y hasta el día 22 y 23, respectivamente, con fluctuaciones hasta alcanzar 40 días de operación (aprox.), para conseguir después de esos cuarenta días incrementos moderados en la relación  $\alpha$ . Esta información se presenta desglosada en las Tablas A-2, A-3 y A-4 en el ANEXO V.

Los tres digestores se encontraron en el rango de pH comprendido entre 6.5 y 7.9, según se monitoreó desde el arranque hasta el último día de operación, tal como puede observarse en la

Figura 5.2. Estos valores de pH corresponden con lo esperado en la digestión anaerobia mesófila, cuyo intervalo –según se ha mencionado- se localiza entre 6.2 y 7.8, debido a que el sistema posee capacidad amortiguadora.

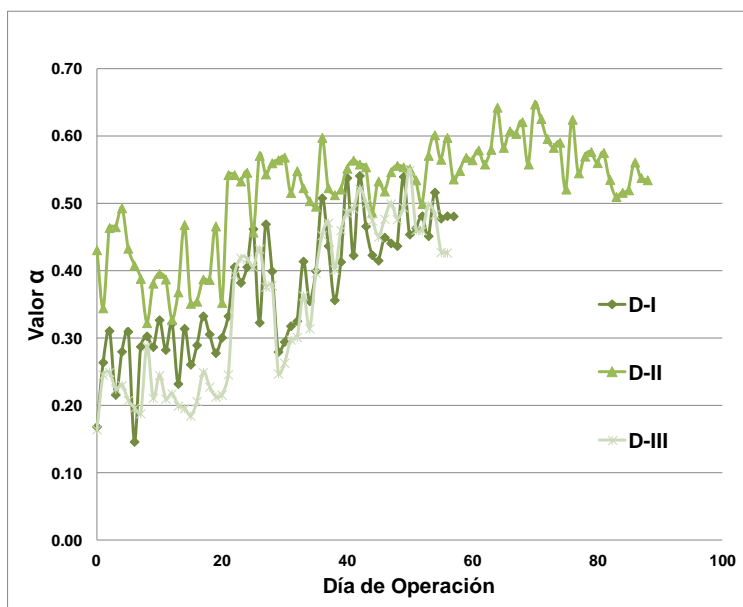


Figura 5.1. Monitoreo del Valor  $\alpha$  en los tres digestores anaerobios mesófilos (D-I, D-II y D-III)

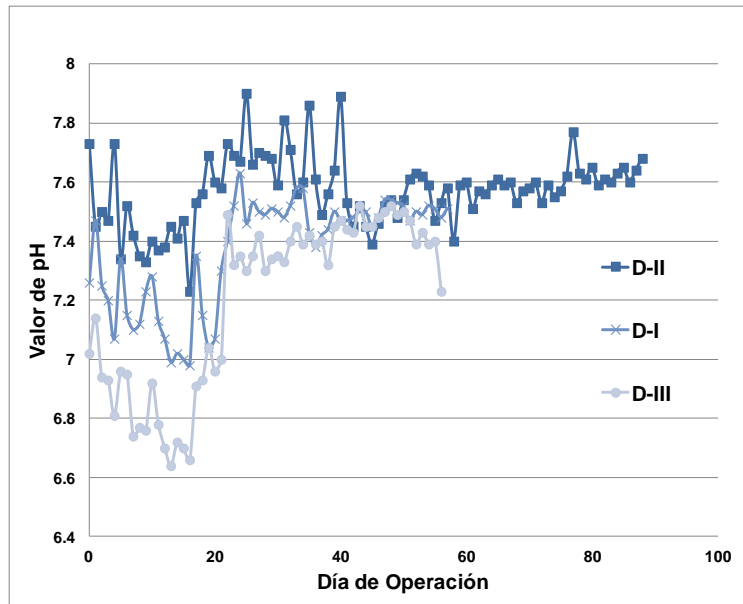


Figura 5.2. Monitoreo del valor de pH en los tres digestores anaerobios mesófilos (D-I, D-II y D-III)

El biogás sólo pudo medirse en el digestor D-II desde el arranque y hasta el fin de la operación; los digestores D-I y D-III presentaron grandes dificultades para medir el biogás producido y por implicación tampoco pudo determinarse con exactitud la composición del mismo.

El período de arranque de digestores anaerobios es un factor determinante para la rentabilidad y conveniencia del proceso en una PTAR, pues debe recordarse que un período de arranque corto siempre es más valorado por la rápida puesta en marcha del sistema, además la inversión en tecnología reditúa en menor tiempo que en los arranques prolongados. En función de lo anterior y de los resultados obtenidos, no fue buena elección emplear lodo pre-tratado como inóculo.

### 5.1.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE LOS DIGESTORES

De acuerdo con los resultados microbiológicos de los digestores D-I, D-II y D-III, se presentó en todos los casos el fenómeno de *recrecimiento* de coliformes fecales y *Salmonella* spp. durante las primeras horas de arranque. En la Tabla 5.1 se muestran las concentraciones de estas bacterias en los tres inóculos, así como del lodo crudo que fue procesado para generar los inóculos no convencionales (NC). Adicionalmente, se muestran de forma numérica (Tablas 5.2 a 5.4) y gráfica (Figuras 5.3 a 5.5), el cambio en las concentraciones de estos microorganismos en cada digestor en función del tiempo.

**Tabla 5.1. Concentración de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en los tres inóculos estudiados medidos como número más probable por gramo de sólidos totales (NMP/g ST)**

Inóculo / Digestor	Características	Coliformes fecales (NMP/g ST)	<i>Salmonella</i> spp. (NMP/g ST)
Lodo Crudo	Sin pretratamiento	$3.54 \times 10^7$	$1.48 \times 10^8$
NC / D-I	Lodo pretratado (70 °C/60 min)	$8.13 \times 10^1$	$6.23 \times 10^2$
NC / D-III	Lodo pretratado (80 °C/60 min)	$8.10 \times 10^1$	$6.23 \times 10^2$
C / D-II	Lodo anaerobio granular	$4.50 \times 10^1$	$3.45 \times 10^3$

NC: no convencional; C: inóculo convencional.

**Tabla 5.2. Concentración de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en el digestor D-I a través del período de operación, medidos como número más probable por gramo de sólidos totales (NMP/g ST)**

Día de Operación	Coliformes fecales (NMP/g ST)	<i>Salmonella</i> spp. (NMP/g ST)
0	$8.13 \times 10^1$	$6.23 \times 10^2$
1	$8.43 \times 10^4$	$1.84 \times 10^4$
3	$1.52 \times 10^6$	$1.46 \times 10^3$
5	$1.44 \times 10^5$	$1.44 \times 10^3$
7	$5.07 \times 10^4$	$1.58 \times 10^3$
9	$5.54 \times 10^4$	$1.39 \times 10^3$
12	$2.73 \times 10^4$	$1.46 \times 10^3$
16	$2.88 \times 10^4$	$1.54 \times 10^4$
23	$9.15 \times 10^4$	$6.71 \times 10^5$
27	$8.37 \times 10^4$	$6.14 \times 10^6$
35	$8.30 \times 10^6$	$3.81 \times 10^7$
41	$6.31 \times 10^6$	$3.16 \times 10^5$
47	$5.59 \times 10^7$	$1.53 \times 10^5$
54	$1.15 \times 10^7$	$1.50 \times 10^5$

**Tabla 5.3. Concentración de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en el digestor D-II a través del período de operación, medidos como número más probable por gramo de sólidos totales (NMP/g ST)**

Día de Operación	Coliformes fecales (NMP/g ST)	<i>Salmonella</i> spp. (NMP/g ST)
0	$4.5 \times 10^1$	$3.45 \times 10^3$
1	$2.5 \times 10^5$	$1.14 \times 10^7$
3	$5.95 \times 10^6$	$2.50 \times 10^8$
6	$5.41 \times 10^6$	$4.58 \times 10^7$
10	$8.15 \times 10^6$	$1.52 \times 10^7$
13	$1.80 \times 10^5$	$3.83 \times 10^5$
17	$8.07 \times 10^4$	$5.26 \times 10^5$
22	$4.64 \times 10^4$	$1.50 \times 10^5$
25	$8.94 \times 10^3$	$1.17 \times 10^3$
28	$4.61 \times 10^4$	$5.46 \times 10^5$
31	$1.43 \times 10^4$	$6.53 \times 10^6$
33	$1.39 \times 10^4$	$1.39 \times 10^4$
35	$1.53 \times 10^2$	$1.17 \times 10^3$
37	$7.30 \times 10^3$	$1.12 \times 10^3$
39	$1.15 \times 10^5$	$1.10 \times 10^3$
42	$5.22 \times 10^5$	$1.09 \times 10^3$
46	$5.13 \times 10^6$	$2.10 \times 10^3$
51	$4.74 \times 10^6$	$1.98 \times 10^5$
57	$4.63 \times 10^7$	$4.63 \times 10^6$
65	$1.01 \times 10^8$	$9.69 \times 10^4$
71	$8.52 \times 10^5$	$1.87 \times 10^5$
77	$1.33 \times 10^6$	$9.27 \times 10^4$
84	$1.34 \times 10^8$	$3.19 \times 10^5$

**Tabla 5.4. Concentración de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en el digestor D-III a través del período de operación, medidos como número más probable por gramo de sólidos totales (NMP/g ST)**

Día de Operación	Coliformes fecales (NMP/g ST)	<i>Salmonella</i> spp. (NMP/g ST)
0	$8.10 \times 10^1$	$6.23 \times 10^2$
1	$5.85 \times 10^4$	$2.45 \times 10^5$
3	$1.14 \times 10^6$	$2.04 \times 10^4$
5	$3.32 \times 10^6$	$1.66 \times 10^3$
7	$2.67 \times 10^6$	$1.49 \times 10^5$
9	$1.43 \times 10^6$	$6.84 \times 10^5$
12	$1.45 \times 10^6$	$1.39 \times 10^3$
16	$2.97 \times 10^5$	$1.59 \times 10^3$
23	$2.50 \times 10^5$	$6.39 \times 10^5$
27	$1.74 \times 10^3$	$6.39 \times 10^6$
35	$1.55 \times 10^4$	$4.73 \times 10^6$
41	$1.34 \times 10^4$	$2.67 \times 10^7$
47	$5.27 \times 10^5$	$1.44 \times 10^5$
54	$4.38 \times 10^7$	$4.38 \times 10^5$

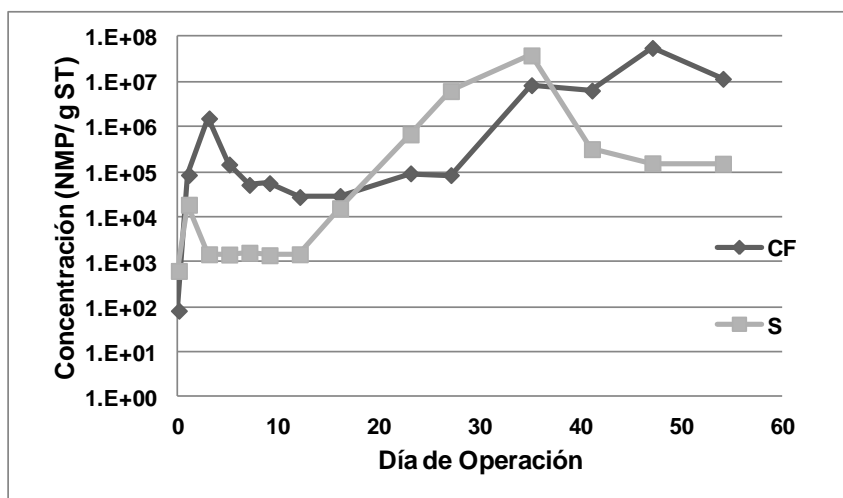


Figura 5.3. Concentración de coliformes fecales (CF) y *Salmonella* spp. (S) en el digestor D-I a través del período de operación, medidos como número más probable por gramo de sólidos totales (NMP/g ST).

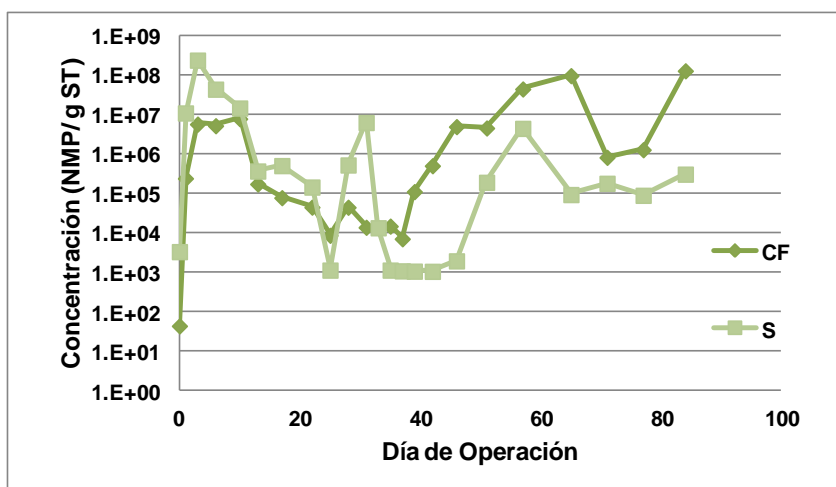


Figura 5.4. Concentración de coliformes fecales (CF) y *Salmonella* spp. (S) en el digestor D-II a través del período de operación, medidos como número más probable por gramo de sólidos totales (NMP/g ST).

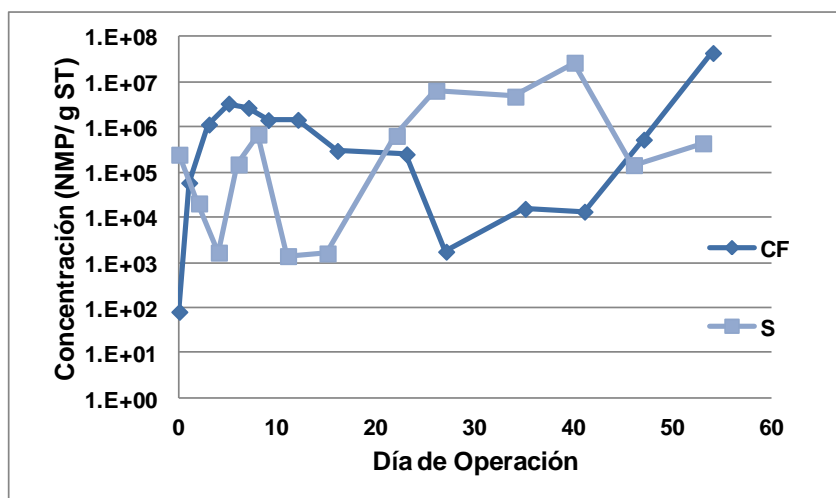


Figura 5.5. Concentración de coliformes fecales (CF) y *Salmonella* spp. (S) en el digestor D-III a través del período de operación, medidos como número más probable por gramo de sólidos totales (NMP/g ST).

La posibilidad de observarse reactivación antes que recrecimiento no se comprobó experimentalmente porque -recordando la definición de estos dos conceptos- la reactivación se presenta como el incremento repentino o en un período más corto que el tiempo de duplicación de un género microbiano en particular. Y entre las cero y las 24 horas no se analizaron los digestores.

El día cero, los digestores D-I y D-III mostraron concentraciones del orden de  $1 \log_{10}$  NMP/g ST para coliformes fecales y de  $2 \log_{10}$  NMP/g ST para *Salmonella* spp. (Tablas 5.2 y 5.4), conteos que demuestran -hasta cierto grado- la efectividad del pre-tratamiento térmico aplicado. Sin embargo, ambos indicadores aumentaron notablemente en las primeras 24 horas de arranque hasta niveles de  $4 \log_{10}$  y  $5 \log_{10}$  NMP/g ST, respectivamente, como se muestra en las Figuras 5.3 y 5.5.

Con respecto al digestor D-II, presentó concentraciones de coliformes fecales del orden de  $1 \log_{10}$  NMP/g ST y para *Salmonella* spp. de  $3 \log_{10}$  NMP/g ST en el día cero (Tabla 5.3), incrementándose estos valores durante las primeras 24hrs de arranque hasta  $5 \log_{10}$  y  $7 \log_{10}$  NMP/g ST, respectivamente, tal como se aprecia en la Figura 5.4.

Los resultados de las primeras 24 horas demuestran exclusivamente recrecimiento. En ese lapso no hubo alimentación que diera lugar a sospechas de re-inoculación, ni manipulación alguna a la cual atribuirle contaminación cruzada.

El recrecimiento y desarrollo de los coliformes fecales y *Salmonella* spp. concuerda con lo informado por Martínez-Arce (2009). Dicho crecimiento se mantuvo fluctuante a lo largo del período de operación de los tres digestores, lo cual es explicable puesto que los digestores se operaron a  $35^\circ\text{C}$  con un tiempo de residencia de 13 días, que en términos prácticos significa: temperatura favorable y aporte continuo de nutrimentos para la microbiota del digestor, la cual incluye -por supuesto- a los coliformes fecales y *Salmonella* spp.

La operación de los digestores se dio por finalizada en vista de que la concentración de las enterobacterias estudiadas se mantuvo en valores superiores a los establecidos por la NOM-004-SEMARNAT-2002 para biosólidos de Clase A. Los parámetros fisicoquímicos indicaban estabilidad, únicamente dentro del digestor D-II ( $\alpha \geq 0.4$  y producción continua de biogás). Los tres digestores anaerobios se operaron de forma paralela durante 88 días (D-II) y 58 días (D-I y D-III).

Con base en lo descrito en los párrafos anteriores, puede decirse que los microorganismos fermentadores, acidogénicos y metanogénicos se encontraban activos en co-existencia con los coliformes fecales y *Salmonella* spp., sin verse afectados debido a la competencia por los nutrimentos (Smith *et al.*, 2005). Lo cual es posible porque el lodo de alimentación contuvo los nutrimentos

suficientes para alimentar a toda la microbiota, por esta razón fue imposible la reducción en los conteos de coliformes fecales ni de *Salmonella* spp.

Si bien los resultados microbiológicos reiteran que la DAM es un proceso de estabilización de lodos que por si mismo no consigue inactivar patógenos, para los fines de la presente investigación fue de suma importancia evaluar los pre-tratamientos y estudiar a través del tiempo los tres digestores arrancados con diferentes inóculos, antes de proponer arreglos experimentales adicionales o alternos.

### 5.1.3 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE RETENCIÓN DEL LODO (TRS) Y EL MEZCLADO SOBRE LOS MICROORGANISMOS

De manera exclusivamente comparativa, resulta conveniente añadir que en el caso de la Digestión Anaerobia Termófila (DAT), la capacidad de inactivación de patógenos en un digestor está influida marcadamente por el TRS y el mezclado, además de la temperatura de operación. A continuación se expone este punto de forma muy breve:

En la investigación de Skillman *et al.* (2009) se afirmó que a mayores TRS, menor cantidad de nutrimentos se aporta al medio y por tanto, la tasa de decaimiento de coliformes fecales y *Salmonella* spp. se ve incrementada. Además, la producción de metabolitos inhibitorios que se acumulan como consecuencia de TRS aumentados, también puede impactar sobre el decaimiento de los microorganismos patógenos e indicadores.

El TRS influye directamente sobre la comunidad microbiana del digestor, pues aunque se estén comparando dos procesos mesófilos o dos termófilos entre si, la predominancia de los microorganismos se espera sea distinta en género, especie y cantidad a diferentes TRS, porque –de acuerdo con Smith *et al.* (2005)- la comunidad compite por el medio y sus nutrimentos, e inhibe el desarrollo de ciertos patógenos.

La agitación o mezclado dentro de un digestor, según señalan Záborská *et al.* (2003), es un factor de alta influencia sobre la remoción de los sólidos volátiles y la inactivación de patógenos. Esta operación está directamente relacionada con el TRS y características de diseño del digestor. El mezclado ineficiente repercute en el abatimiento del TRS y por tanto disminuye la efectividad del tratamiento sobre los patógenos.

En la digestión anaerobia operada en lotes, sería muy notorio el decaimiento de los microorganismos por la extinción de nutrimentos y la toxicidad del medio generada por la acumulación de productos metabólicos de desecho (Kim *et al.*, 2003). Pero este régimen de operación por lotes produce menor volumen de biogás diario promedio, comparado con el régimen semi-continuo, según los autores.

### 5.1.4 INFLUENCIA DEL INÓCULO

La intención de arrancar tres distintos digestores, fue comparar entre un inóculo pretratado (reducido en coliformes fecales y *Salmonella* spp.) y un inóculo convencional, donde estén presentes estas enterobacterias de manera habitual, como es el caso del lodo granular anaerobio.

Es difícil interpretar cuál fue el efecto que tuvo la naturaleza del inóculo sobre el fenómeno de reactivación y recrecimiento de coliformes fecales y *Salmonella* spp. dado que la concentración de estas bacterias fue similar en los tres digestores (Tabla 5.1), situación muy distinta de lo proyectado. Los resultados de esta etapa no permitieron hacer conclusiones al respecto del inóculo.

Como se explicará más adelante, en la etapa experimental dos, mediante la realización de las cinéticas de reactivación / recrecimiento microbianas (CRR) –entre muy valiosa información- se encontró que los pre-tratamientos elegidos para producir los inóculos no convencionales (70 °C y 80 °C, con una hora de contacto) fueron ineficientes para inactivar patógenos.

### 5.1.5 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE PRE-TRATAMIENTO

En las Tablas 5.5 a 5.7 se muestran las concentraciones de coliformes fecales y *Salmonella* spp. en distintas muestras de lodos crudos y lodos pre-tratados analizados durante esta etapa experimental. En ellas pueden observarse los niveles de inactivación alcanzados con las temperaturas de 70 °C y 80 °C durante 60 minutos de contacto, en virtud de los cuales sólo se cumple con lo estipulado por la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003), para coliformes fecales en biosólidos de clase A (menor a  $10^3$  NMP/g ST), mientras que *Salmonella* spp. continúa por encima del límite (menor a 3 NMP/g ST).

**Tabla 5.5. Análisis Microbiológicos de algunas muestras de lodos crudos durante la operación de los digestores, expresados como número más probable por gramo de sólidos totales (NMP/g ST)**

Día de Operación	Coliformes fecales (NMP/g ST)	<i>Salmonella</i> spp (NMP/g ST)
0	$3.54 \times 10^7$	$1.48 \times 10^8$
3	$2.17 \times 10^6$	$3.50 \times 10^7$
7	$5.39 \times 10^6$	$5.71 \times 10^6$
11	$2.17 \times 10^6$	$1.07 \times 10^6$
17	$2.30 \times 10^6$	$2.73 \times 10^9$
22	$2.96 \times 10^5$	$3.50 \times 10^6$
26	$2.24 \times 10^6$	$1.07 \times 10^7$
30	$1.07 \times 10^6$	$3.74 \times 10^7$
35	$1.51 \times 10^6$	$1.51 \times 10^8$



**Tabla 5.6. Análisis Microbiológicos de algunas muestras de lodos pre-tratados a 70° C/60 min, con enfriamiento paulatino, durante la operación de los digestores, expresados como número más probable por gramo de sólidos totales (NMP/g ST)**

Día de Operación	Coliformes fecales (NMP/g ST)	<i>Salmonella</i> spp (NMP/g ST)
0	$8.13 \times 10^1$	$6.23 \times 10^2$
7	$4.92 \times 10^2$	$4.71 \times 10^2$
13	$9.42 \times 10^2$	$4.92 \times 10^3$
17	$5.05 \times 10^6$	$5.05 \times 10^2$
22	$6.50 \times 10^1$	$6.50 \times 10^2$
25	$1.32 \times 10^2$	$7.05 \times 10^2$
28	$7.05 \times 10^1$	$7.36 \times 10^2$
31	$7.01 \times 10^1$	$7.00 \times 10^2$

**Tabla 5.7. Análisis Microbiológicos de algunas muestras de lodos pre-tratados a 80° C/60 min, con enfriamiento paulatino, durante la operación de los digestores, expresados como número más probable por gramo de sólidos totales (NMP/g ST)**

Día de Operación	Coliformes fecales (NMP/g ST)	<i>Salmonella</i> spp (NMP/g ST)
0	$8.10 \times 10^1$	$6.23 \times 10^2$
7	$4.92 \times 10^2$	$4.70 \times 10^2$
13	$9.40 \times 10^3$	$5.00 \times 10^4$
28	$6.55 \times 10^1$	$6.55 \times 10^1$
31	$6.44 \times 10^1$	$6.44 \times 10^2$
32	$8.41 \times 10^0$	$6.44 \times 10^2$

A este respecto, en el trabajo de Villalba (2012) realizado de manera complementaria a esta investigación, se encontró que los pre-tratamientos durante 60 min, tanto a 60 °C como 70 °C, son efectivos para la inactivación de coliformes fecales, mas no así para la inactivación de *Salmonella* spp. Situación que contrasta con lo informado por Martínez-Arce (2009), quien señalaba que a 70 °C y una hora de calentamiento, la concentración de *Salmonella* spp. fue “indetectable”.

Sin embargo, el tratamiento a 80 °C probado por Villalba (2012), demostró ser el más favorable para inactivar *Salmonella* spp., pues al alcanzar esta temperatura (al tiempo cero) estas bacterias fueron indetectables; como resultado adicional, consiguió la inactivación de coliformes fecales hasta niveles permitidos por la NOM-004-SEMARNAT-2002 para biosólidos de clase A.

Cabe recordar que según Strauch (1991), Carrington (2001), Arthurson (2008), Piterina *et al.* (2010) y la US EPA, entre otros, aseguraron que los tratamientos a 70 °C por 30 min en lodos de purga, producen un lodo “**virtualmente libre de patógenos**”. Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que esta combinación temperatura/tiempo es insuficiente para inactivar *Salmonella* spp., al menos en los lodos provenientes de la PTAR en estudio.

### 5.1.6 ACERCA DE EMPLEAR MÉTODOS DE CULTIVO ESTÁNDAR

Es sabido que el número más probable (NMP) es una técnica que permite estimar la densidad de una población microbiana empleando algoritmos de probabilidad. Por otra parte, los medios de cultivo suelen presentar baja selectividad y el tiempo requerido para liberar resultados suele medirse en días. De acuerdo con la literatura, la conveniencia de emplear como método de cuantificación sigue siendo motivo de debate, pues pese a las desventajas mencionadas, el costo de materiales y reactivos es menor comparado con métodos moleculares.

En algunas investigaciones consultadas, como aquella elaborada por Chen *et al.* (2012) con digestores anaerobios mesófilos que operaban con TRS entre 16 y 25 días, encontraron mediante qPCR que la remoción de indicadores y patógenos era menor de la calculada por métodos de cultivo estándar (MCE). Concluyendo que la inactivación de *Salmonella* spp. –cuantificada tanto por métodos moleculares (MM) como por MCE- resultó muy baja en todos los TRS estudiados, pues las cuentas finales superaron al límite permitido por la US EPA (menos de 3 NMP/ 4g ST).

Wéry, *et al.* (2008) hicieron hincapié sobre la investigación de Chen *et al.* (2012) acerca de que la cuantificación por MM suele ser mayor que la cuantificación por MCE pues se contabilizan también las células en estado “viable, pero no-cultivable” (VPNC). Es importante señalar que en estas publicaciones, no se utilizaron reactivos para diferenciar células viables de inviables durante la qPCR.

## 5.2 ETAPA DE EXPERIMENTACIÓN 2 – CINÉTICAS DE REACTIVACIÓN/RECRECIMIENTO POR MÉTODOS DE CULTIVO ESTÁNDAR

Los resultados se muestran y discuten agrupados de acuerdo con la sub-etapa experimental donde fueron obtenidos, ya sea en lo referente a las temperaturas de calentamiento o en lo correspondiente a la rapidez y técnicas de enfriamiento. El orden en que se presenta cada sub-etapa corresponde a los objetivos particulares propuestos al inicio y al diseño cronológico de la metodología.

### 5.2.1 PRE-TRATAMIENTOS E INACTIVACIÓN

Los tratamientos térmicos a 70 °C por 60 minutos, reducen la concentración de coliformes fecales y *Salmonella* spp. entre 5 y 7 log<sub>10</sub> con respecto al lodo crudo, como se muestra en la Tabla 5.8. Información que coincide con lo publicado por Bagge *et al.* (2005) quienes evaluando la

*pasteurización* de residuos cárnicos encontraron que 70 °C por 60 minutos son suficientes para inactivar a la microbiota patógena y poder utilizar dichos residuos en plantas de biogás.

**Tabla 5.8. Concentración de coliformes fecales y *Salmonella* spp antes y después del pre-tratamiento térmico de 70 °C durante 60 min, mostrados por duplicado como número más probable por gramo de sólidos totales (NMP/g ST)**

Condiciones (calentamiento / enfriamiento)	Coliformes fecales (NMP/g ST)		<i>Salmonella</i> spp. (NMP/g ST)	
	Lodo crudo	Lodo pre-tratado	Lodo crudo	Lodo pre-tratado
70 °C / Paulatino	$3.62 \times 10^7$	$9.22 \times 10^0$	$1.04 \times 10^8$	$7.07 \times 10^2$
	$3.62 \times 10^7$	$7.19 \times 10^1$	$1.04 \times 10^8$	$9.61 \times 10^1$
70 °C / Rápido	$3.62 \times 10^7$	$5.18 \times 10^1$	$1.04 \times 10^8$	$5.18 \times 10^2$
	$3.62 \times 10^7$	$9.65 \times 10^1$	$1.04 \times 10^8$	$6.73 \times 10^1$
70 °C / Acelerado / 0 °C	$3.62 \times 10^7$	$5.00 \times 10^1$	$1.04 \times 10^8$	$6.52 \times 10^1$
	$3.62 \times 10^7$	$6.96 \times 10^0$	$1.07 \times 10^9$	$6.96 \times 10^1$
70 °C / Acelerado / 10 °C	$5.97 \times 10^6$	$7.02 \times 10^0$	$1.14 \times 10^9$	$7.02 \times 10^1$
	$5.85 \times 10^6$	$6.97 \times 10^0$	$1.12 \times 10^9$	$6.97 \times 10^1$
70 °C / Acelerado / 20 °C	$3.74 \times 10^7$	$6.80 \times 10^0$	$2.32 \times 10^9$	$6.80 \times 10^1$
	$3.83 \times 10^7$	$7.05 \times 10^0$	$2.37 \times 10^9$	$7.05 \times 10^1$

**Tabla 5.9. Concentración de coliformes fecales y *Salmonella* spp antes y después del pre-tratamiento térmico de 80 °C durante 60 min, mostrados por duplicado como número más probable por gramo de sólidos totales (NMP/g ST)**

Condiciones (calentamiento / enfriamiento)	Coliformes fecales (NMP/g ST)		<i>Salmonella</i> spp. (NMP/g ST)	
	Lodo crudo	Lodo pre-tratado	Lodo crudo	Lodo pre-tratado
80 °C / Paulatino	$1.03 \times 10^7$	$1.84 \times 10^1$	$1.03 \times 10^8$	$6.00 \times 10^1$
	$1.08 \times 10^7$	$4.71 \times 10^1$	$1.08 \times 10^8$	$6.15 \times 10^1$
80 °C / Rápido	$3.66 \times 10^7$	$4.66 \times 10^1$	$1.05 \times 10^8$	$4.66 \times 10^2$
	$3.62 \times 10^7$	$4.51 \times 10^1$	$1.04 \times 10^8$	$4.51 \times 10^2$
80 °C / Acelerado / 0 °C	$5.37 \times 10^4$	$5.05 \times 10^1$	$1.00 \times 10^7$	$6.59 \times 10^1$
	$1.09 \times 10^5$	$4.58 \times 10^1$	$1.09 \times 10^8$	$5.90 \times 10^1$
80 °C / Acelerado / 10 °C	$1.09 \times 10^6$	$6.20 \times 10^0$	$1.90 \times 10^9$	$6.20 \times 10^1$
	$1.06 \times 10^6$	$6.07 \times 10^0$	$1.85 \times 10^9$	$6.07 \times 10^1$
80 °C / Acelerado / 20 °C	$5.66 \times 10^8$	$6.17 \times 10^0$	$5.43 \times 10^9$	$6.17 \times 10^1$
	$5.82 \times 10^8$	$6.02 \times 10^0$	$5.58 \times 10^9$	$6.02 \times 10^1$

El tratamiento a 80 °C durante 60 minutos y enfriamiento acelerado (se discutirá en la sección 5.2.2) mostró la mayor inactivación de las enterobacterias en estudio, logrando reducir entre 6 y 7 log<sub>10</sub> el NMP de coliformes fecales y entre 7 y 8 log<sub>10</sub> en el caso de *Salmonella* spp. con respecto al lodo crudo, como se puede verificar en la Tabla 5.9.

Cabe recordar que con los tratamientos tanto a 70 °C/ 60 min como 80 °C/ 60 min, tanto en la etapa de experimentación uno como en la presente etapa, sólo se consigue cumplir con lo establecido por

la NOM-004-SEMARNAT-2002 en lo referente a coliformes fecales (menor a  $10^3$  NMP/g STT), mas no así para *Salmonella* spp. (menor a 3 NMP/g STT).

## 5.2.2 LA RAPIDEZ DE ENFRIAMIENTO Y EL RECRECIMIENTO

Se experimentó con tres distintos métodos de enfriamiento (paulatino, rápido y acelerado) aplicados a los lodos pre-tratados para conocer si la rapidez de enfriamiento impacta sobre la reactivación y/o recrecimiento de los microorganismos en estudio (Figura 5.6). La evaluación de esta variable es de suma importancia porque en las publicaciones consultadas se omite precisar el método empleado para enfriar el lodo al término del calentamiento (sea en laboratorio o a escala real), especialmente si se alimentarán los digestores inmediatamente.

Únicamente algunos autores (Foliguet *et al.*, 1972; Blackburn *et al.*, 1997; Humpheson *et al.*, 1998; Lang y Smith, 2008) que elaboraron cinéticas de inactivación térmica a nivel laboratorio, informan haber utilizado baños de hielo entre  $-15^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  para interrumpir el efecto del calor sobre la muestra tomada a un tiempo dado. El caso de Foliguet es más drástico, porque emplean baños de hielo seco/etanol, con los que informaron haber obtenido  $-70^{\circ}\text{C}$  como temperatura de enfriamiento.

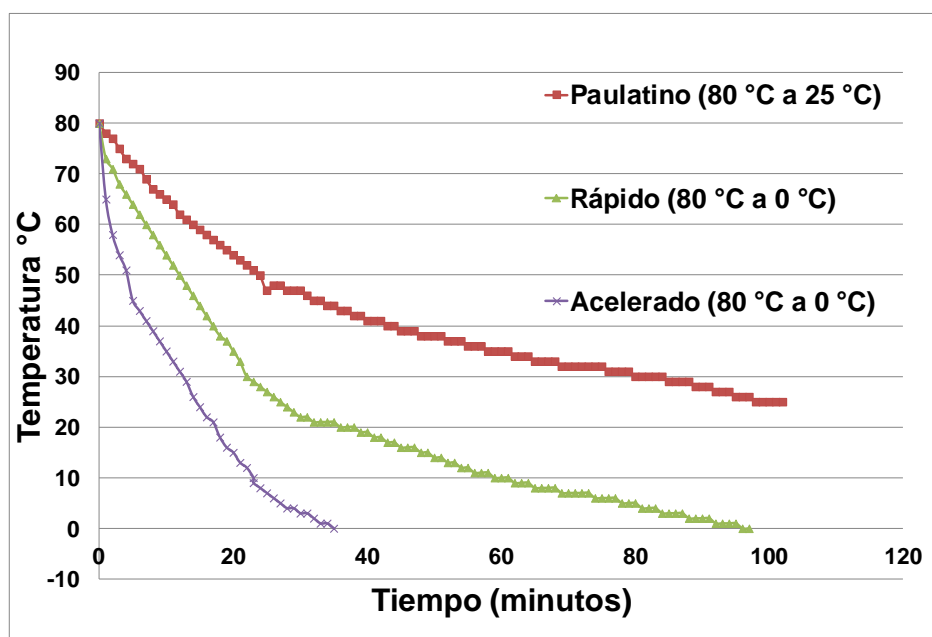
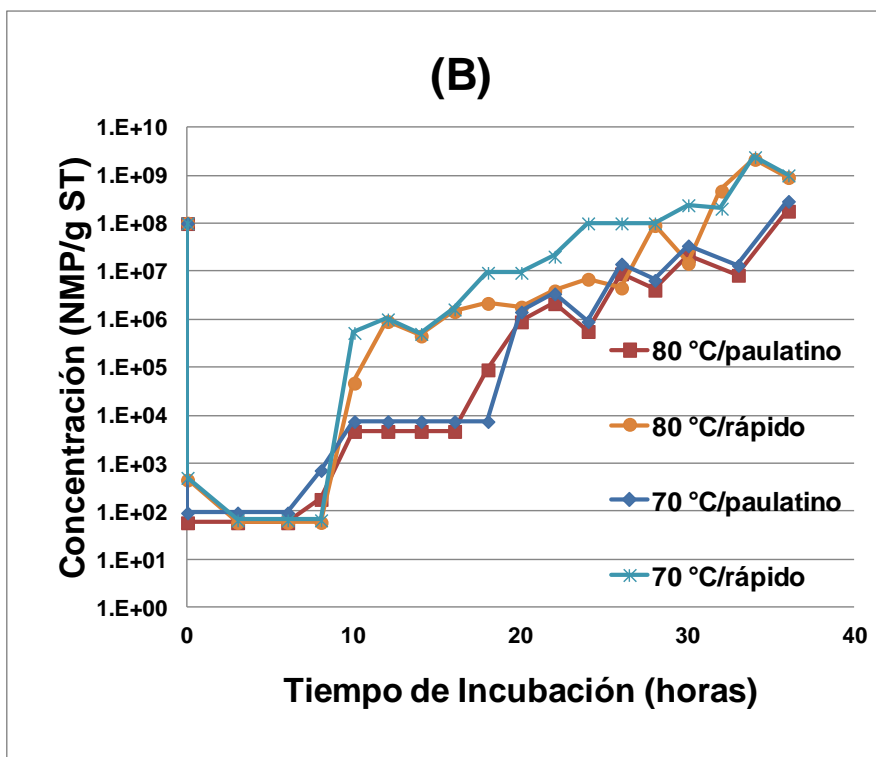
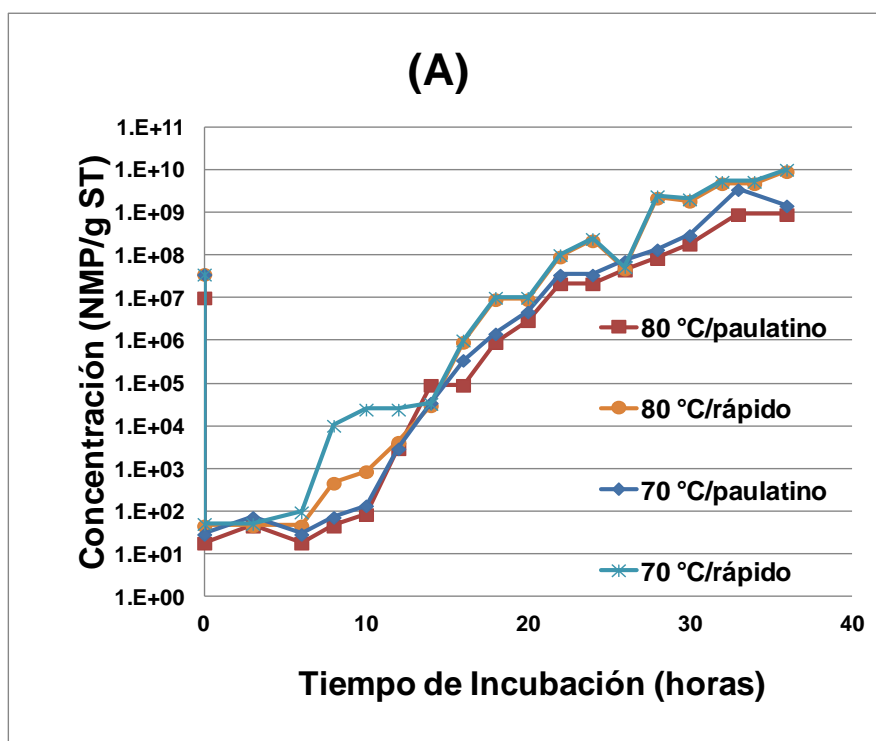


Figura 5.6. Descenso de la temperatura en función del tiempo (rapidez de enfriamiento) en lotes de lodos pre-tratados a  $80^{\circ}\text{C}/60$  minutos, seguido de enfriamiento paulatino, enfriamiento rápido o enfriamiento acelerado

En ambos tratamientos ( $70^{\circ}\text{C}/60$  min y  $80^{\circ}\text{C}/60$  min) bajo las condiciones de enfriamiento paulatino y enfriamiento rápido, incrementaron las concentraciones de coliformes fecales y *Salmonella* spp. durante las primeras 36 horas de incubación a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , como se ilustra en las Figuras 5.7-A y 5.7-B.



Figuras 5.7-A y 5.7-B. Concentración de coliformes fecales (A) y *Salmonella* spp. (B) en función del tiempo de incubación a  $35 \pm 1$  °C, en lodos tratados térmicamente a 70 °C y 80 °C, y enfriados mediante corriente de aire (paulatino) y baño de hielo (rápido) hasta 25 °C.

La información presentada en las Figuras 5.7-A y 5.7-B sugiere que se trató de recrecimiento microbiano exclusivamente, porque los incrementos se registraron después de varias horas de

incubación, nunca antes de tres horas. Esto puso en evidencia que *no existe reactivación* de coliformes fecales ni de *Salmonella* spp. mediante estos pre-tratamientos (muy importante recordar que la reactivación habría ocurrido repentinamente o en un rango menor al tiempo de duplicación de las enterobacterias).

Para diseñar estos experimentos, se tuvieron todas las precauciones para impedir la re-inoculación o recolonización de microorganismos. Se laboró al margen de manipulación de lodos crudos y de cultivos microbiológicos dentro del área de incubación de los lotes pre-tratados. Razones por las que se tiene seguridad de que el fenómeno observado fue recrecimiento microbiano a causa de células supervivientes.

Dado que el recrecimiento se presentó en lodos pre-tratados tanto a 70 °C/ 60 min como a 80 °C/ 60 min con enfriamiento paulatino y rápido, se deduce que dichas temperaturas de calentamiento fueron poco eficaces para inactivar permanentemente a las enterobacterias en estudio (ver sección 5.1.4).

Estos resultados son de importancia porque ayudan a explicar lo observado durante el arranque de los digestores D-I y D-III (inoculados y alimentados con lodos pre-tratados y enfriados por corriente de aire), donde el recrecimiento observado tras 24 horas fue de 3 log<sub>10</sub> para coliformes fecales y 4 log<sub>10</sub> para *Salmonella* spp. con respecto al día cero.

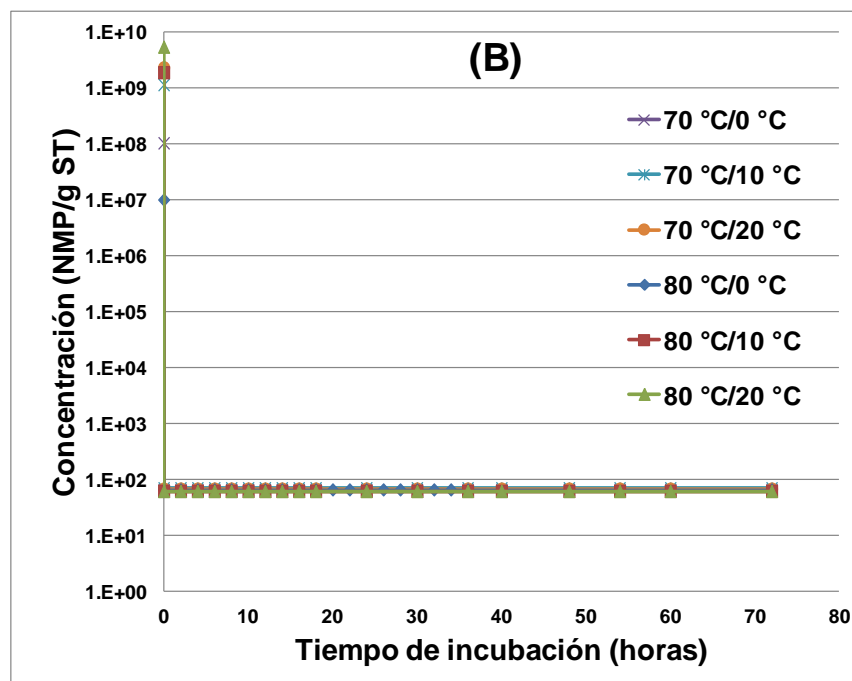
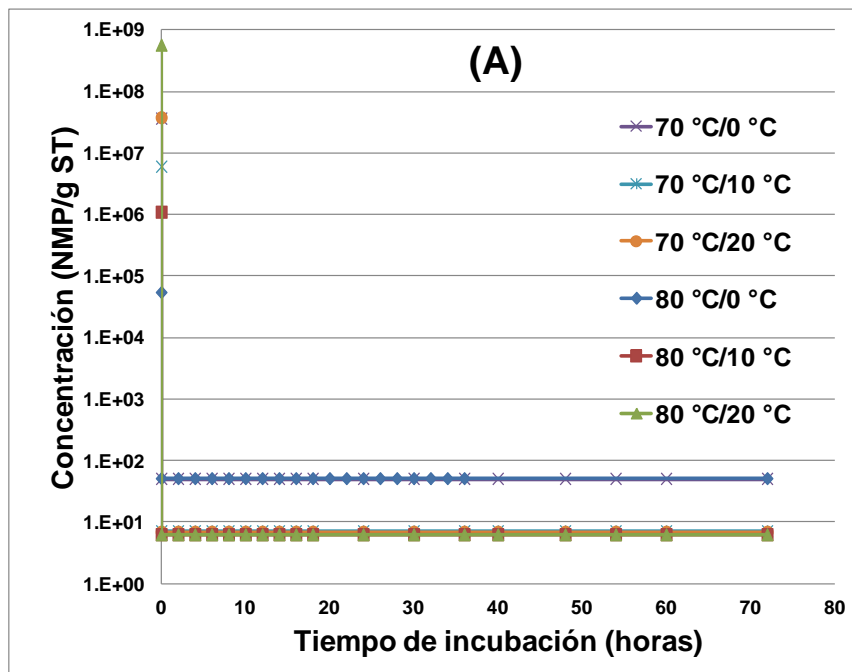
### 5.2.3 IMPACTO DEL ENFRIAMIENTO ACELERADO Y TEMPERATURA FINAL

Al probar con el enfriamiento acelerado hasta 20, 10 y 0 °C (choque térmico de -20 °C mediante un baño de hielo y cloruro de sodio al 10%), los lodos pre-tratados tanto a 70 °C/ 60 min como a 80 °C/ 60 min, no presentaron reactivación ni recrecimiento de coliformes fecales y *Salmonella* spp. durante la incubación a 35 ± 1 °C. La concentración de las enterobacterias se mantuvo constante durante 72 horas de incubación, como se muestra en las Figuras 5.8-A y 5.8-B.

La inactivación permanente se observó en todos los lotes pre-tratados con enfriamiento acelerado, en las tres temperaturas finales de enfriamiento: 20 °C, 10 °C y 0 °C. Mediante esta información se dedujo que para el enfriamiento acelerado la temperatura final del lodo no influye en la reactivación bacteriana, sino que es la rapidez del descenso en la temperatura quien ejerce un efecto directo.

La eficacia de inactivación de coliformes fecales y *Salmonella* spp. entre las tres distintas temperaturas finales de enfriamiento acelerado (20 °C, 10 °C ó 0 °C) es muy semejante, según lo mostrado en las Tablas 5.8 y 5.9, o bien en las Figuras 5.8-A y 5.8-B.

Con estos resultados, se estableció que después de los pre-tratamientos mediante enfriamiento acelerado, es suficiente llevar el lodo hasta 20 °C y obtener mayor eficiencia que llevándolo hasta 0 °C por requerir sólo la mitad del tiempo de enfriamiento y adicionalmente, dada la alta humedad del lodo, se presenta congelación si desacelera la agitación mecánica.



Figuras 5.8-A y 5.8-B. Concentración de coliformes fecales (A) y *Salmonella* spp. (B) en función del tiempo de incubación a  $35 \pm 1$  °C, en lodos tratados térmicamente a 70 °C y 80 °C, y enfriamiento acelerado hasta tres diferentes temperaturas (20 °C, 10 °C y 0 °C).

#### 5.2.4 LAS CONCENTRACIONES CONSTANTES EN EL NMP

Para explicar las causas por las que, en el caso de las cinéticas 70 °C/60 min/acelerado y 80 °C/60 min/acelerado –específicamente en los conteos de coliformes fecales- el mismo número de pruebas positivas (tripletes 1-0-0, 2-0-0 ó 3-0-0, sección 4.1.4) fuera el mismo desde el tiempo cero de la cinética hasta las 72 horas de incubación, se formularon tres hipótesis:

- a) las enterobacterias supervivientes se mantienen en fase estacionaria
- b) por causa del estrés físico provocado, las funciones celulares bacterianas se limitan al mantenimiento y el tiempo de duplicación incrementa
- c) la mayor parte de las células que adoptan el estado “viable pero no-cultivable” (VPNC) recuperan viabilidad con la misma rapidez con que mueren (como se explicará en la sección 5.3.8, Etapa de Experimentación 3).

La demostración de estas hipótesis exigió estudios adicionales para ser comprobadas. Sin embargo, desde el enfoque de los métodos de cultivo estándar señalados por la normatividad mexicana vigente, el resultado fue satisfactorio al haber logrado la inactivación e inhibición del recrecimiento de coliformes fecales y *Salmonella* spp. por medio de dos distintos pre-tratamientos térmicos moderados.

#### 5.2.5 LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Salmonella* spp.

Los resultados obtenidos con *Salmonella* spp. dieron lugar a sospechas sobre la exactitud de los métodos de cuantificación utilizados o sobre la escasa selectividad en los medios de cultivo (ver sección 4.1.4).

La diferencia de concentraciones entre coliformes fecales y *Salmonella* spp. es muy notoria en términos prácticos, porque todas las pruebas de NMP (tubos múltiples en series de tres) en caldo Selenito-Cistina fueron negativas, dicho de otra manera: no se observó crecimiento de *Salmonella* spp. (tripletes 0-0-0) en las tres diluciones decimales consecutivas más altas (0.01, 0.001 y 0.0001). Pero después del tratamiento matemático para calcular el NMP a partir de tripletes 0-0-0, la concentración de *Salmonella* spp. aumentó notablemente (1 a 2 log<sub>10</sub>).

Otra dificultad relevante asociada con la detección de *Salmonella* spp. es la interpretación visual de las pruebas positivas, ya que las tonalidades de “anaranjado” fueron muy variables (los tubos con caldo Selenito-Cistina, viran del color ámbar al anaranjado intenso en presencia de *Salmonella* spp., DOF, 2003); al re-sembrar las pruebas consideradas positivas en medios sólidos diferenciales (Agar-



SB, sulfito de bismuto; Agar-SS, *Salmonella-Shigella*) se observó la presencia de colonias típicas tanto en los tubos anaranjado-rojizo como en los tubos anaranjado-intermedio e incluso anaranjado-amarillento. La situación contraria también se observó: ausencia de colonias típicas en las cajas resembradas con los tubos anaranjado-rojizo y anaranjado-intermedio.

Resultaba imposible por la cantidad de tiempo, incubadoras, preparación de reactivos y recursos humanos, resembrar en cajas todas y cada una de las pruebas con Selenito-Cistina para confirmar presencia de colonias típicas, de modo que se seleccionaron sólo algunas.

Con esta información se puede concluir que el método de detección de *Salmonella* spp. señalado por la NOM-004-SEMARNAT-2002 resultó inadecuado para esta investigación porque depende de la interpretación visual del analista, que para comprobar sus suposiciones, debe re-sembrar repetidas veces e identificar bioquímicamente las colonias que aísle, consumiendo muchísimo tiempo para liberar resultados; adicionalmente, la técnica del número más probable es inexacta y probabilística.

### 5.2.6 ¿SON LOS COLIFORMES FECALES UN INDICADOR ADECUADO?

En esta investigación se cuestiona el uso de los coliformes fecales como indicador de calidad en biosólidos, puesto que su reducción no guardó relación directa con la reducción de *Salmonella* spp., lo cual es el fundamento del por qué la US EPA designó a los coliformes fecales como microorganismos indicadores.

Las concentraciones de *Salmonella* spp. al término de los distintos pre-tratamientos estudiados excedieron el límite permisible en biosólidos de clase A (menor a 3 NMP/g ST), información contrastante con lo observado para coliformes fecales.

Al respecto de lo expuesto en el párrafo anterior y al margen del objetivo general, se elaboró un análisis crítico de la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003), para identificar puntos susceptibles de ser mejorados. Para ello se amplió la información en torno a los microorganismos y virus presentes en lodos, aquellos de relevancia por su potencial patógeno y aquellos que pueden utilizarse como indicadores alternos o sustitutos de los ya existentes. Estos puntos se abordan en el ANEXO I, subcapítulos A.1.2, A.1.4 Y A.1.5.

Suponiendo -sin conceder- que la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003) estableciera los mismos límites bacteriológicos máximos para biosólidos de clase A, que los establecidos por la US EPA en 2003, donde los coliformes fecales deberán ser menores a 1000 NMP/ g ST, o bien *Salmonella* spp.

ser menor a 3 NMP/4g ST (una u otra opciones), los dos pre-tratamientos estudiados conseguirían la clase A, puesto que los coliformes fecales se mantuvieron por debajo de 1000 NMP/ g ST.

Si la US EPA ofrece la opción de elegir entre coliformes fecales y *Salmonella* spp. por la correlación que existe entre el comportamiento de inactivación de ambos grupos de enterobacterias, es importante encontrar la causa de haber obtenido valores tan dispares para uno y otro grupo de enterobacterias durante el presente proyecto.

Con respecto al comportamiento de inactivación, en investigaciones consultadas (Zábranská *et al.*, 2003; Arthurson, 2008; Viau y Peccia, 2009; Ziemba y Peccia, 2011) se prefiere al género *Enterococcus* por ser más termo-resistente que *Escherichia coli* y poseer características de inactivación semejantes a las de virus entéricos y otros patógenos de importancia presentes en lodos residuales.

### 5.2.7 LA INACTIVACIÓN DE *Salmonella* spp. Y COLIFORMES FECALES EN OTRAS INVESTIGACIONES

En el trabajo realizado por Silva y Gibbs (2012) obtuvieron los valores  $D$  -a distintas temperaturas- para un conjunto de especies de *Salmonella* spp. en productos de origen animal con alta humedad. El valor  $D$  es el tiempo en minutos que es necesario exponer a la muestra a una temperatura dada para reducir la concentración inicial de microorganismos en  $1 \log_{10}$ . Los valores  $D$  obtenidos fueron:  $4.1 \text{ min} \leq D 55 \text{ }^\circ\text{C} \leq 68 \text{ min}$ ;  $0.28 \text{ min} \leq D 60 \text{ }^\circ\text{C} \leq 16 \text{ min}$ ;  $D 65 \text{ }^\circ\text{C} \leq 2 \text{ min}$ ;  $D 70 \text{ }^\circ\text{C} \leq 0.25 \text{ min}$ . Información que corresponde con autores como Carrington (2001) o Piterina *et al.* (2010) ya mencionados en los antecedentes de este documento.

Al final de la investigación de Ward *et al.* (1999) obtuvieron las siguientes conclusiones: 1) lodos correctamente pasteurizados no presentan recrecimiento alguno de *Salmonella* spp. ni de coliformes fecales, pues con un tratamiento de  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min son indetectables por métodos de cultivo estándar; 2) al inocular lodos pasteurizados con *Salmonella* spp. y *E. coli*, descubrieron que, incubándolos por 5 y 30 días, sólo recrecen un tiempo y luego decaen, por efecto de la competencia entre la comunidad microbiana.

Con esta información, podría suponerse que después de 60 minutos de contacto con temperaturas de pre-tratamiento entre  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , la persistencia de *Salmonella* spp. en los lodos sería imposible. Sin embargo, no fue el caso en esta investigación y resulta extraño que la concentración de estas bacterias se mantuviera entre 2 y  $3 \log_{10}$ .

## 5.3 ETAPA DE EXPERIMENTACIÓN 3 – CINÉTICAS DE REACTIVACIÓN/RECRECIMIENTO POR MÉTODOS MOLECULARES

Esta etapa fue diseñada con base en las inquietudes que generaron las concentraciones constantes (NMP) de coliformes fecales en las cinéticas de enfriamiento acelerado y los resultados obtenidos por la técnica del NMP con *Salmonella* spp., dado que las concentraciones detectadas fueron muy altas y siempre mayores que los conteos de coliformes fecales antes y después de los pre-tratamientos, durante la operación de los digestores y especialmente durante el desarrollo de las cinéticas de reactivación/recrecimiento microbianas en las etapas experimentales previas.

Los resultados se muestran y discuten agrupados de acuerdo con la cinética en la cual se obtuvieron. El orden en que se presenta cada cinética corresponde a los objetivos particulares propuestos al inicio y al diseño cronológico de la metodología.

### 5.3.1 TRATAMIENTOS CON MONOAZIDA DE PROPIDIO (PMA)

Las técnicas descritas en la metodología del presente trabajo (con base en Nocker *et al.*, 2006) para la diferenciación entre células viables y células no-viables, consisten en la utilización de monoazida de propidio (PMA) y son de tipo cualitativo exclusivamente, lo cual quiere decir que la concentración de ADN molde y amplicón obtenidos fue desconocida y toda comparación entre muestras amplificadas por PCR sería presuntiva.

Una vez que se cuenta con los productos de PCR y se separan por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™, es posible visualizar las bandas obtenidas y comparar entre una misma muestra tratada con-PMA (menor concentración de ADN molde) y sin-PMA (mayor concentración de ADN molde), mas no así entre distintas muestras.

### 5.3.2 VISUALIZACIÓN DE BANDAS EN GELES DE AGAROSA

De acuerdo con la metodología, en el caso de *Salmonella* spp. el amplicón obtenido se visualiza mediante la aparición de una sola banda característica del gen *hila* (270pb), como se muestra en la Fig. 5.9 (carriles 1 a 6), y en el caso de coliformes fecales mediante la aparición de cuatro bandas correspondientes con los genes *lacZ* (264pb), *uidA* (319pb), *cyd* (393pb) y *lacY* (463pb), mostrados en la Fig. 5.9, carriles 7 a 12. La aparición de menos de cuatro bandas en algunos de los geles mostrados a continuación, se interpreta como presencia de bacterias coliformes totales en la muestra.

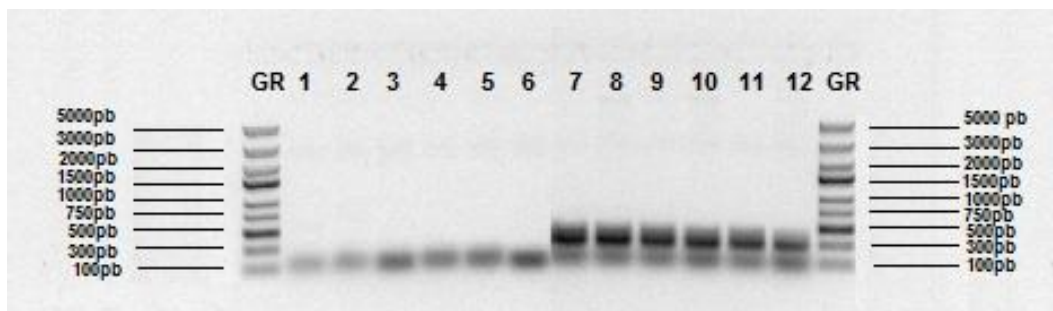


Figura 5.9. Presencia de bandas características de coliformes fecales (carriles 7 a 12) y *Salmonella* spp. (carriles 1 a 6) en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™, con aplicaciones en cada pozo de 5 microlitros de ADN amplificado, 2 microlitros de buffer de carga y 1.5 microlitros de control de peso molecular GeneRuler™ (GR).

La dureza del gel influyó directamente en la adecuada diferenciación del número de bandas por carril. En el caso presente se ocuparon geles con 1% de agarosa, por lo que en el caso de coliformes fecales se observan dos pares de bandas superpuestos en la mayoría de los geles, localizando el primer par entre 100pb y 300pb y el segundo par entre 300pb y 500pb –con respecto al marcador de peso molecular- dando la apariencia de sólo dos bandas gruesas. Mientras que para coliformes totales, su presencia se confirma observando menos de cuatro bandas que aparecen como un solo par sobrepuesto por arriba de 100pb y –en ocasiones- una banda muy cercana a 300pb o por arriba de este marcador.

Con respecto a *Salmonella* spp. la visualización del amplicón es más sencilla pues se trata de una sola banda que aparece por arriba del marcador de 100pb.

La intensidad de las bandas está influida tanto por la concentración del amplicón (directamente proporcional), como por el tratamiento con-PMA (bandas tenues o poco brillantes) o sin-PMA (bandas más intensas).

### 5.3.3 RESULTADOS DE ACUERDO CON CADA CINÉTICA

#### 5.3.3.1 CINÉTICA 80 °C/60 min/ACELERADO

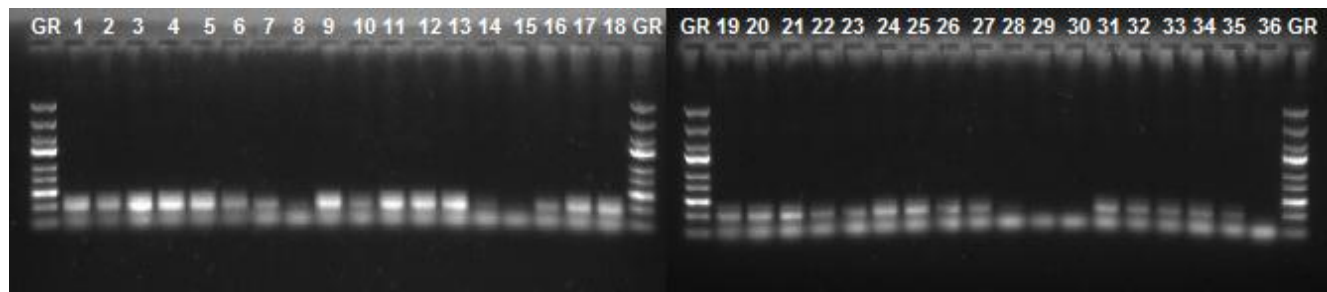
En las figuras 5.10-A y 5.10-B se muestran los geles de agarosa que contienen las muestras de ADN amplificado provenientes de la cinética de 80 °C/60 min/enfriamiento acelerado, donde se observan las bandas correspondientes a los genes *lacZ*, *vida*, *lacY* y *cyd* para coliformes fecales y *hila* para *Salmonella* spp. Las muestras que aparecen colocadas en los carriles 1 a 36 se desglosan en la Tabla 5.10; dicha tabla está conformada por lodo crudo, lodo pre-tratado enfriado a distintas temperaturas y lodo pre-tratado e incubado.

**Tabla 5.10. Cinética de Reactivación/Recrecimiento 80 °C/60 min/enfriamiento acelerado: Ordenamiento en geles de agarosa de las muestras tratadas con-PMA y sin-PMA, amplificadas por PCR Múltiplex y Uniplex**

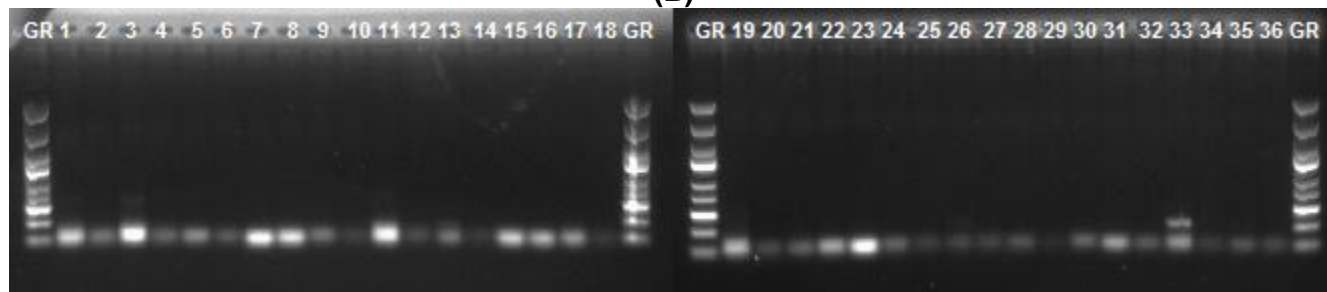
No. Carril	Condiciones de la Muestra	No. Carril	Condiciones de la Muestra	No. Carril	Condiciones de la Muestra
1	LC-1 (+)	13	T2 <sup>-1</sup> (+) 80 °C/60 min/10 °C	25	T5 <sup>-2</sup> (+) 12 h/35 °C
2	LC-2 (+)	14	T2 <sup>-2</sup> (+) 80 °C/60 min/10 °C	26	T5 <sup>-2</sup> (-) 12 h/35 °C
3	LC-1 (-)	15	T2 <sup>-1</sup> (-) 80 °C/60 min/10 °C	27	T6 <sup>-1</sup> (+) 24 h/35 °C
4	LC-2 (-)	16	T2 <sup>-2</sup> (-) 80 °C/60 min/10 °C	28	T6 <sup>-2</sup> (+) 24 h/35 °C
5	T0 <sup>-1</sup> (+) 80 °C/60 min	17	T3 <sup>-1</sup> (+) 80 °C/60 min/0 °C	29	T6 <sup>-1</sup> (-) 24 h/35 °C
6	T0 <sup>-2</sup> (+) 80 °C/60 min	18	T3 <sup>-2</sup> (+) 80 °C/60 min/0 °C	30	T6 <sup>-2</sup> (-) 24 h/35 °C
7	T0 <sup>-1</sup> (-) 80 °C/60 min	19	T3 <sup>-1</sup> (-) 80 °C/60 min/0 °C	31	T7 <sup>-1</sup> (+) 36 h/35 °C
8	T0 <sup>-2</sup> (-) 80 °C/60 min	20	T3 <sup>-2</sup> (-) 80 °C/60 min/0 °C	32	T7 <sup>-2</sup> (+) 36 h/35 °C
9	T1 <sup>-1</sup> (+) 80 °C/60 min/20 °C	21	T4 <sup>-1</sup> (+) 6 h/35 °C	33	T7 <sup>-1</sup> (-) 36 h/35 °C
10	T1 <sup>-2</sup> (+) 80 °C/60 min/20 °C	22	T4 <sup>-2</sup> (+) 6 h/35 °C	34	T7 <sup>-2</sup> (-) 36 h/35 °C
11	T1 <sup>-1</sup> (-) 80 °C/60 min/20 °C	23	T4 <sup>-2</sup> (-) 6 h/35 °C	35	T8 <sup>-1</sup> (+) 48 h/35 °C
12	T1 <sup>-2</sup> (-) 80 °C/60 min/20 °C	24	T5 <sup>-1</sup> (+) 12 h/35 °C	36	T8 <sup>-2</sup> (+) 48 h/35 °C

LC: lodo crudo, LC: lodo crudo, Tn: número de muestra, (+): con-PMA, (-): sin-PMA, temperatura de pre-tratamiento/tiempo de calentamiento/temperatura durante enfriamiento, horas de incubación a 35 ±1 °C (nh/35 °C).

(A)



(B)



**Figuras 5.10-A y 5.10-B. Cinética de reactivación/recrecimiento microbiana con condiciones de pre-tratamiento de 80 °C/60 min/enfriamiento acelerado e incubación a 35 ±1 °C/72 h. Presencia de bandas características (carriles 1 a 36) de coliformes fecales (A) y *Salmonella* spp. (B) en geles de agarosa al 1% teñido con GelRed™, con aplicaciones en cada pozo de 5 microlitros de ADN amplificado, 2 microlitros de buffer de carga y 1.5 microlitros de control de peso molecular GeneRuler™ (GR).**

Esta fue la primera cinética y por ende los primeros geles de agarosa elaborados durante la Fase Experimental 3, de modo que durante el avance experimental se efectuaron algunos ajustes a la manera de organizar las muestras para electroforesis. Por esta razón, para facilitar el análisis de las figuras 5.10-A y 5.10-B, se recomienda tomar en consideración únicamente los carriles impares del número 1 a 23 así como los carriles pares 24 y 26, 27 y 29, 31, 33 y 35, mientras que el resto de los carriles se descarta por tratarse de las mismas muestras pero con una dilución decimal adicional.

Los carriles 1 y 3 de ambas figuras corresponden a lodo crudo con-PMA y sin-PMA -respectivamente- y es visible que entre ambas muestras hay mayor intensidad de brillo en aquella sin-PMA donde existe mayor concentración del amplicón obtenido, por efecto a su vez de mayor cantidad de ADN molde (proveniente tanto de células viables como de células inviables).

Un efecto muy semejante se observa entre los pares de carriles 5 y 7 ó 9 y 11 en la figura 5.10-B correspondiente a *Salmonella* spp. en lodo pre-tratado caliente y al inicio del enfriamiento acelerado – respectivamente- con mayor intensidad de brillo en las muestras sin-PMA.

A partir de los carriles 21 en adelante (ambas figuras), las muestras pertenecen a lodo-pre-tratado en incubación y en todas ellas es visible la presencia de células viables de coliformes fecales (carriles 21 y 23, 24 y 26, 31 y 33), coliformes totales (carriles 28, 29, 30 y 36) y *Salmonella* spp. (en todas las muestras), lo cual significa que células de estos microorganismos resistieron las condiciones de pre-tratamiento evaluadas.

Al respecto de la intensidad del brillo en las bandas, recordando que el estudio fue cualitativo, comparando aquellas presentes en los carriles 5 a 36 (lodo pre-tratado) con las bandas de los carriles 1 y 3 (lodo crudo) en ambas figuras, resulta imposible saber si durante la cinética hubo aumentos en las concentraciones de ambos grupos de bacterias, ya fuera por reactivación o por recrecimiento. No obstante, se confirmó que las células bacterianas resistieron el pre-tratamiento de 80 °C/60 min/enfriamiento acelerado y estuvieron presentes en estado viable durante el período de ensayo.

### 5.3.3.2 CINÉTICA 80 °C/60 min/PAULATINO

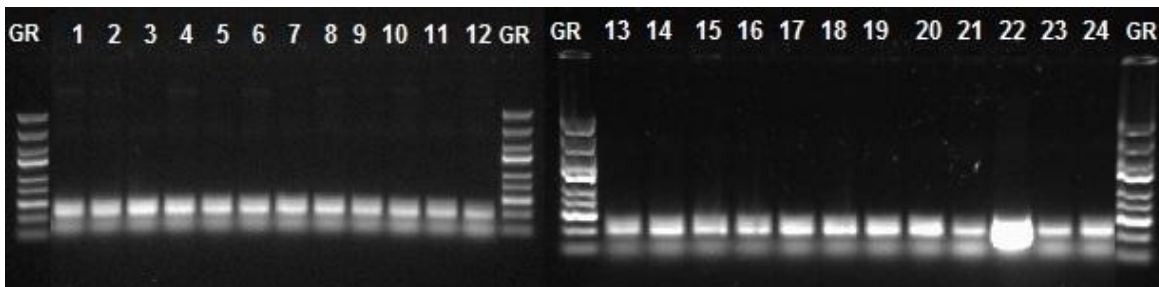
Por otro lado, las figuras 5.11-A y 5.11-B muestran los geles de agarosa que contienen las muestras de ADN amplificado provenientes de la cinética de 80 °C/60 min/enfriamiento paulatino, donde se observan las bandas correspondientes a los genes *lacZ*, *vida*, *lacY* y *cyd* para coliformes fecales y *hilA* para *Salmonella* spp. Las muestras que aparecen colocadas en los carriles 1 a 24 se desglosan en la Tabla 5.11; dicha tabla está conformada por lodo crudo, lodo pre-tratado durante el calentamiento, lodo pre-tratado frío y lodo pre-tratado e incubado, así como una muestra de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*.

**Tabla 5.11. Cinética de Reactivación/Recrecimiento 80 °C/60 min/enfriamiento paulatino: Ordenamiento en geles de agarosa de las muestras tratadas con-PMA y sin-PMA, amplificadas por PCR Múltiplex y Uniplex**

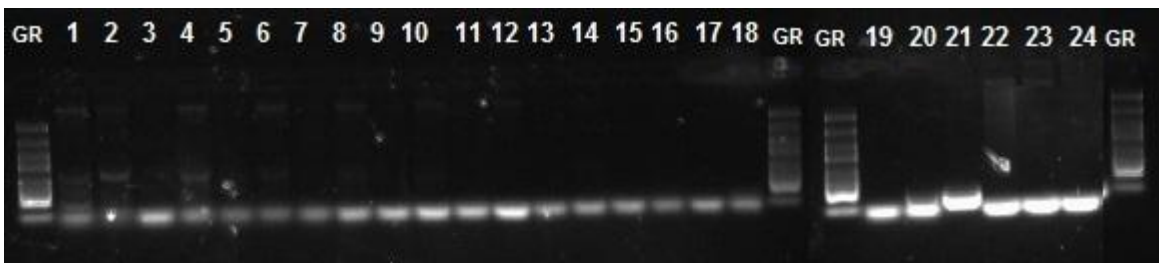
No. Carril	Condiciones de la Muestra	No. Carril	Condiciones de la Muestra	No. Carril	Condiciones de la Muestra
1	LC (+)	9	T17 (+) 80 °C/40 min	17	T15 (+) 72 h/35 °C
2	LC (-)	10	T17 (-) 80 °C/40 min	18	T15 (-) 72 h/35 °C
3	T10 (+) 80 °C/0 min	11	T12 (+) 80 °C/60 min/25 °C	19	LE (+) 121 °C/15 min
4	T10 (-) 80 °C/0 min	12	T12 (-) 80 °C/60 min/25 °C	20	LE (-) 121 °C/15 min
5	T11 (+) 80 °C/60 min	13	T13 (+) 24 h/35 °C	21	<i>Salmonella enterica</i> (-)
6	T11 (-) 80 °C/60 min	14	T13 (-) 24 h/35 °C	22	<i>Escherichia coli</i> (-)
7	T16 (+) 80 °C/20 min	15	T14 (+) 48 h/35 °C	23	144 h/35 °C (+)
8	T16 (-) 80 °C/20 min	16	T14 (-) 48 h/35 °C	24	144 h/35 °C (-)

LC: lodo crudo, LC: lodo crudo, Tn: número de muestra, (+): con-PMA, (-): sin-PMA, temperatura de pre-tratamiento/tiempo de calentamiento/temperatura durante enfriamiento, horas de incubación a 35 ±1 °C (nh/35 °C) LE: lodo crudo sometido a 121 °C/15min.

(A)



(B)



**Figuras 5.11-A y 5.11-B. Cinética de reactivación/recrecimiento microbiana con condiciones de pre-tratamiento de 80 °C/60 min/enfriamiento paulatino e incubación a 35 ±1 °C/144 h. Presencia de bandas características (carriles 1 a 24) de coliformes fecales (A) y *Salmonella* spp. (B) en geles de agarosa al 1 teñidos con GelRed™, con aplicaciones en cada pozo de 5 microlitros de ADN amplificado, 2 microlitros de buffer de carga y 1.5 microlitros de control de peso molecular GeneRuler™ (GR).**

Esta cinética fue la segunda que se analizó por métodos moleculares, así que se ajustó el orden de presentación de las muestras de forma que fuera sencillo comparar entre muestras con-PMA (carriles impares 1 a 19) y sin-PMA (carriles pares 2 a 20). Si bien la intensidad de brillo en las bandas es proporcional a la concentración del amplicón obtenido, cabe señalar nuevamente que estos análisis fueron cualitativos y la concentración de ADN no fue determinada, de modo que se discute únicamente acerca de las diferencias de intensidad de bandas debida a la aplicación del PMA en una misma muestra y no entre pares distintos.

En la Figura 5.11-A, las bandas que se presentan en los carriles impares entre 1 y 21 confirman la presencia de células de coliformes fecales en estado viable a lo largo del pre-tratamiento, enfriamiento e incubación del lodo, a diferencia de la cinética de 80 °C/60 min/acelerado, donde menos de cuatro bandas en algunos carriles del gel indican la presencia de coliformes totales.

Del mismo modo, se confirmó la supervivencia de células de *Salmonella* spp. en estado viable mediante la aparición de una sola banda en los carriles impares entre 1 y 21, como se ilustra en la Figura 5.11-B.

### 5.3.3.3 CINÉTICA 70 °C/60 min/ACELERADO

Las figuras 5.12-A y 5.12-B corresponden a los geles de agarosa que contienen las muestras de ADN amplificado provenientes de la cinética de 70 °C/60 min/enfriamiento acelerado, donde se observan las cuatro bandas correspondientes a los genes *lacZ*, *vidA*, *lacY* y *cyd* para coliformes fecales y una sola banda para el gen *hilA* de *Salmonella* spp. En la Tabla 5.12, se enlistan las muestras tal como aparecen ordenadas en los carriles 1 a 18 en las citadas figuras; la tabla se compone de muestras de lodo crudo, lodo pre-tratado durante el calentamiento, lodo pre-tratado enfriado a distintas temperaturas y lodo pre-tratado e incubado.

Como se ve en la figura 5.12-A la aparición de cuatro bandas en los carriles impares 1 a 17 (excepto en el carril 13 donde aparentemente hubo un error en la aplicación de la muestra) indica la presencia de células viables de coliformes totales (carriles 5, 16 y 17) y coliformes fecales (demás carriles). Resultados muy semejantes a los obtenidos en las cinéticas anteriores.

Con respecto a *Salmonella* spp. se comprobó la presencia de células viables en todas las muestras, tal como se ilustra en la figura 5.12-B, mediante una sola banda en los carriles impares 1 a 17.

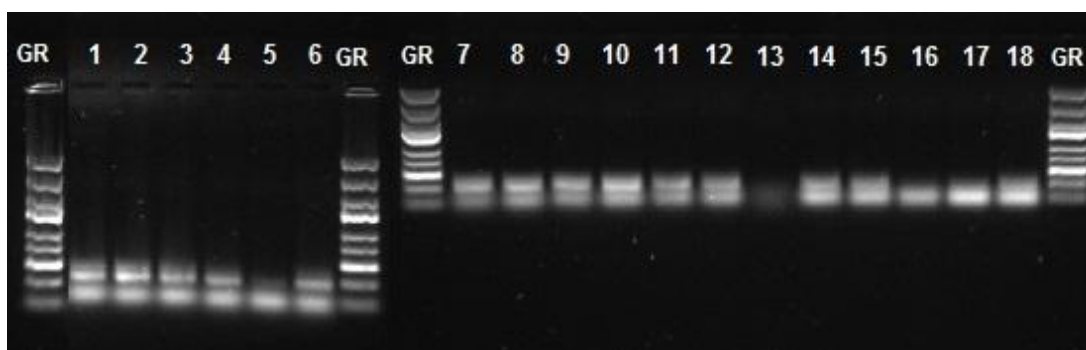


**Tabla 5.12. Cinética de Reactivación/Recrecimiento 70 °C/60 min/enfriamiento acelerado: Ordenamiento en geles de agarosa de las muestras tratadas con-PMA y sin-PMA, amplificadas por PCR Múltiplex y Uniplex**

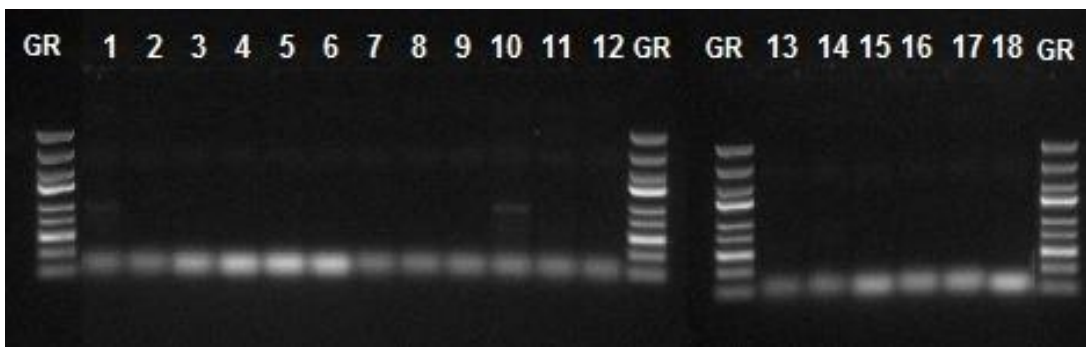
No. Carril	Condiciones de la Muestra	No. Carril	Condiciones de la Muestra	No. Carril	Condiciones de la Muestra
1	LC (+)	7	T2 (+) 70 °C/60 min/20 °C	13	T5 (+) 24 h/35 °C
2	LC (-)	8	T2 (-) 70 °C/60 min/20 °C	14	T5 (-) 24 h/35 °C
3	T0 (+) 70 °C/0 min	9	T3 (+) 70 °C/60 min/10 °C	15	T6 (+) 48 h/35 °C
4	T0 (-) 70 °C/0 min	10	T3 (-) 70 °C/60 min/10 °C	16	T6 (-) 48 h/35 °C
5	T1 (+) 70 °C/60 min	11	T4 (+) 70 °C/60 min/0 °C	17	T7 (+) 72 h/35 °C
6	T1 (-) 70 °C/60 min	12	T4 (-) 70 °C/60 min/0 °C	18	T7 (-) 72 h/35 °C

LC: lodo crudo, Tn: número de muestra, (+): con-PMA, (-): sin-PMA, temperatura de pre-tratamiento/tiempo de calentamiento/temperatura durante enfriamiento, horas de incubación a  $35 \pm 1$  °C (nh/35 °C).

(A)



(B)



**Figuras 5.12-A y 5.12-B. Cinética de reactivación/recrecimiento microbiana con condiciones de pre-tratamiento de 70 °C/60 min/enfriamiento acelerado e incubación a  $35 \pm 1$  °C/72 h. Presencia de bandas características (carriles 1 a 18) de coliformes fecales (A) y *Salmonella* spp. (B) en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed™, con aplicaciones en cada pozo de 5 microlitros de ADN amplificado, 2 microlitros de buffer de carga y 1.5 microlitros de control de peso molecular GeneRuler™ (GR).**

### 3.3.3.4 CINÉTICA 70 °C/60 min/PAULATINO

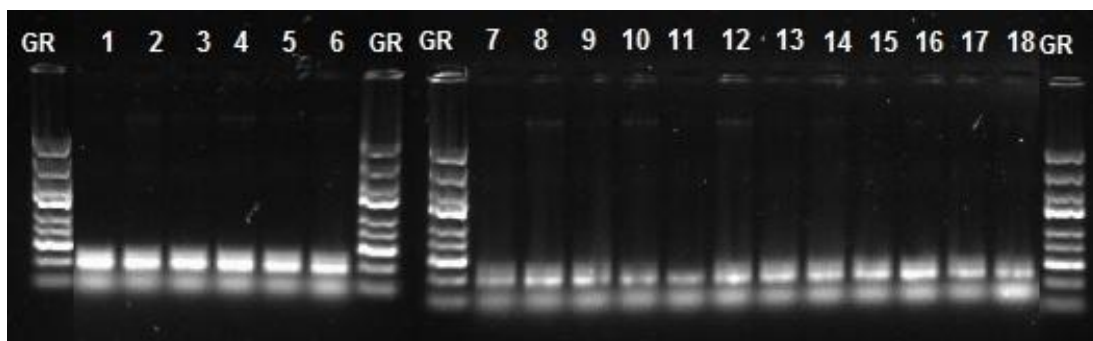
Esta fue la cuarta y última cinética analizada por métodos moleculares y el ordenamiento de las muestras fue muy semejante al utilizado en 70 °C/60 min/acelerado. Se enlistan en la tabla 5.13.

**Tabla 5.13. Cinética de Reactivación/Recrecimiento 70 °C/60 min/enfriamiento paulatino: Ordenamiento en geles de agarosa de las muestras tratadas con-PMA y sin-PMA, amplificadas por PCR Múltiplex y Uniplex**

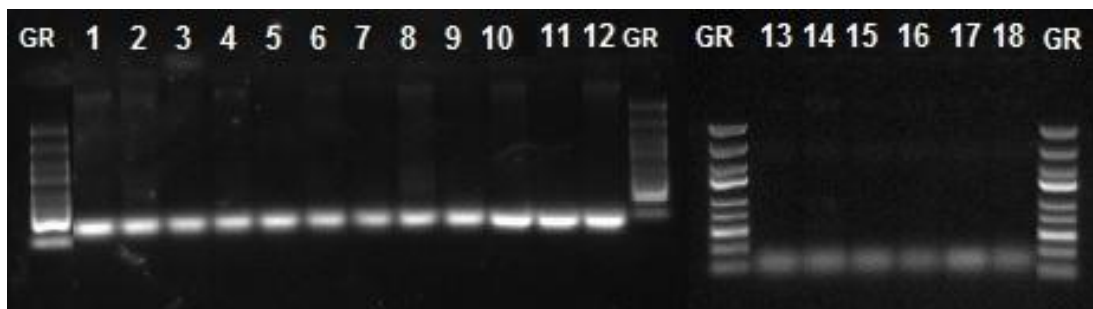
No. Carril	Condiciones de la Muestra	No. Carril	Condiciones de la Muestra	No. Carril	Condiciones de la Muestra
1	LC (+)	7	T2 (+) 70 °C/40min	13	T5 (+) 24h/35 °C
2	LC (-)	8	T2 (-) 70 °C/40min	14	T5 (-) 24h/35 °C
3	T0 (+) 70 °C/0min	9	T3 (+) 70 °C/60min	15	T6 (+) 48h/35 °C
4	T0 (-) 70 °C/0min	10	T3 (-) 70 °C/60min	16	T6 (-) 48h/35 °C
5	T1 (+) 70 °C/20min	11	T4 (+) 70 °C/60min/25 °C	17	T7 (+) 72h/35 °C
6	T1 (-) 70 °C/20min	12	T4 (-) 70 °C/60min/25 °C	18	T7 (-) 72h/35 °C

LC: lodo crudo, LC: lodo crudo, Tn: número de muestra, (+): con-PMA, (-): sin-PMA, temperatura de pre-tratamiento/tiempo de calentamiento/temperatura durante enfriamiento, horas de incubación a 35 ±1 °C (nh/35 °C).

(A)



(B)



**Figuras 5.13-A y 5.13-B. Cinética de reactivación/recrecimiento microbiana con condiciones de pre-tratamiento de 70 °C/60 min/enfriamiento paulatino e incubación a 35 ±1 °C/72 h. Presencia de bandas características (carriles 1 a 18) de coliformes fecales (A) y *Salmonella* spp. (B) en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed™, con aplicaciones en cada pozo de 5 microlitros de ADN amplificado, 2 microlitros de buffer de carga y 1.5 microlitros de control de peso molecular GeneRuler™ (GR).**

Resulta difícil comparar entre las muestras con-PMA y sin-PMA porque la intensidad del brillo es muy semejante en cada par, situación contraria a lo observado en las otras tres cinéticas de reactivación/recrecimiento. Esto se ilustra tanto en la figura 5.13-A correspondiente a coliformes fecales como en la figura 5.13-B correspondiente a *Salmonella* spp.

Tal como se ha discutido en las cinéticas anteriores, es evidente la presencia de células viables de coliformes fecales (cuatro bandas) y *Salmonella* spp. en todas las muestras amplificadas por PCR.

#### **5.3.4 PERSISTENCIA DE COLIFORMES FECALES Y *Salmonella* spp.**

Con base en los resultados obtenidos se puede verificar que existen coliformes fecales y totales viables sobrevivientes a los tratamientos térmicos, tanto a 70 °C por 60 min como a 80 °C por 60 min, usando enfriamiento paulatino y acelerado. Correlacionando esta información con los resultados microbiológicos de la etapa de experimentación 2, la persistencia de células viables ayuda a explicar el recrecimiento de coliformes fecales en los casos de enfriamiento paulatino, no obstante, la información obtenida es insuficiente para explicar cómo en los casos del enfriamiento acelerado las células viables remanentes de los coliformes fecales se detectan en igual número más probable en los lodos incubados durante las 72 horas que duró el estudio (ver sección 5.2.6).

Así también, en el caso de *Salmonella* spp. se confirmó la presencia de células viables sobrevivientes a los tratamientos térmicos de 70 °C y 80 °C durante 60 min, en combinación con los dos tipos de enfriamiento evaluados. Correlacionando esta información con los resultados microbiológicos de la etapa de experimentación 2, la presencia de células viables ayuda a explicar el recrecimiento observado con métodos de cultivo estándar en el enfriamiento paulatino, mas no brinda información sobre cómo estas células viables fueron indetectables por métodos de cultivo estándar (tripletes negativos en caldo Selenito-Cistina, 0-0-0) (ver sección 5.2.7).

#### **5.3.5 EFECTO DE LOS PRE-TRATAMIENTOS**

Con los métodos empleados y el número de ensayos realizados, es difícil elaborar comparaciones entre el efecto de las temperaturas de calentamiento y el efecto de los enfriamientos sobre la supervivencia de las enterobacterias estudiadas, principalmente por tratarse de ensayos cualitativos exclusivamente. Lo anterior imposibilitó determinar si las células viables de estos microorganismos se multiplicaron o mantuvieron constantes a lo largo de las distintas cinéticas.

Para conocer cuál es el impacto del enfriamiento sobre la estructura celular bacteriana, se requieren análisis adicionales que no formaron parte de los objetivos particulares de la presente investigación.

Se buscó información que ayudara a explicar estos fenómenos o al menos diera elementos para demostrar algunas de las nuevas hipótesis formuladas (ver sección 5.2.6). De acuerdo con la literatura especializada se describen a continuación algunas hipótesis elaboradas por autores que han investigado los efectos del calor y del enfriamiento sobre la estructura y fisiología celular de bacterias con importancia para la salud pública en distintos países.

### 5.3.6 EFECTOS DEL CALOR SOBRE LA ESTRUCTURA CELULAR BACTERIANA

Los daños o lesiones celulares por efecto del calor, según la literatura van más allá de la inactivación de enzimas o desnaturalización proteínica (Mackey *et al.*, 1991), sino que se localizan en organelos, muy especialmente en los ribosomas, cuya desnaturalización térmica es la principal causa de pérdida de viabilidad en células de *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Lee y Kaletunc, 2002).

Autores como Mackey *et al.*, (1991) o Lee y Kaletunc (2002) desarrollaron grandes avances en la técnica de calorimetría diferencial de barrido para estudiar la disociación de los componentes celulares en distintos microorganismos expuestos al calor de los tratamientos térmicos de pasteurización. Mediante extracción de organelos, de ácidos nucleicos, de membranas celulares y reconstitución de liposomas, obtuvieron termogramas característicos que después relacionaron con la disociación de cada uno de los constituyentes celulares. La pérdida de viabilidad ocurre entre 55 °C y 70 °C, pero la desnaturalización total de ADN de los diferentes géneros ocurre siempre por encima de la temperatura de inactivación particular, misma información corroborada más recientemente por Chen *et al.* (2012).

Por medio de la calorimetría diferencial de barrido, Mackey y su grupo de investigación propusieron durante la década de los 90 en distintas publicaciones, el siguiente mecanismo de desnaturalización celular tomando como base *Escherichia coli* (se cita textualmente):

“Durante el primer calentamiento, una amplia isoterma que va de 20 °C a 40 °C causada por el derretimiento de la *membrana citoplasmática*. Seguida del cambio conformacional de los péptidoglicanos; la primera desnaturalización irreversible ocurre justo por encima de 47 °C, asociada con la desnaturalización de la subunidad ribosomal 30S y las proteínas citoplásmicas solubles. La *disociación de ribosomas* es un proceso compuesto que ocurre entre los 47 °C y 85 °C. Entre 75 °C y 76 °C se define otro evento desconocido –presuntamente la disociación del tRNA-; el siguiente evento se observa a los 95 °C con la disociación de una fracción del ADN y una fracción de la pared celular. Un evento compuesto se identifica entre 118 °C y 125 °C, asociado con la desnaturalización de

componentes de la envoltura celular y posiblemente ADN. Tras el enfriamiento y re-calentamiento, se observa que a 23 °C hay re-disociación de lípidos de membrana, y un evento compuesto que ocurre entre los 40 °C y 100 °C debido la re-disociación del ARN-ribosomal. A 94 °C la disociación del ADN recircularizado”.

### 5.3.7 EFECTO DEL ENFRIAMIENTO SOBRE LA ESTRUCTURA CELULAR BACTERIANA

Tomando como base que el enfriamiento acelerado de los lodos (de 80 °C a 20 °C en 18 minutos) inhibió la reactivación y el recrecimiento de las enterobacterias eficientemente, se formuló la hipótesis de que el *choque térmico* -o “golpe de frío” en palabras de Humpheson *et al.* (1998)- tiene un fuerte impacto sobre la estructura celular bacteriana.

Correlacionando esta información con el trabajo de Sanin *et al.* (1994), la exposición de los microorganismos lesionados por el calentamiento y agitación a las condiciones de congelación del enfriamiento acelerado (-20 °C), podrían haber potenciado los efectos dañinos que el calor ejerce sobre la estructura celular, en un mecanismo semejante al de congelar/descongelar.

Se puede hacer la suposición de que el efecto sinérgico de calentamiento y enfriamiento desacelera el metabolismo microbiano o daña la capacidad de adquirir nutrimentos y procesarlos, afectándose por consecuencia la capacidad de duplicación de estos microorganismos.

### 5.3.8 EL ESTADO “VIABLE PERO NO-CULTIVABLE” (VPNC)

La inactivación permanente de las células bacterianas puede ser ocasionada por daños celulares internos que no consiguen ser reparados en -al menos- 72 horas de incubación a  $35 \pm 1$  °C. Esto sugiere como una de las posibilidades que mediante el estrés térmico causado, las células bacterianas adquieran el *estado viable pero no-cultivable* (VPNC) (Smith *et al.*, 2005; Higgins *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2008) de manera que por métodos de cultivo estándar sean indetectables, es decir, no puede observarse crecimiento bacteriano.

Una vez que se han recuperado y las condiciones son adecuadas para el desarrollo celular, las bacterias VPNC pueden recobrar viabilidad, y en ese momento vuelven a detectarse por métodos de cultivo estándar; no obstante las técnicas de biología molecular permiten detectar ambas condiciones celulares (Wéry *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012). Cabe destacar que mediante los pre-tratamientos con enfriamiento acelerado diseñados en esta investigación no hay recuperación de viabilidad.

### 5.3.9 DAÑOS EN LA ESTRUCTURA CELULAR BACTERIANA

Especulando sobre la condición que adoptan las células de coliformes fecales después del calentamiento y enfriamiento acelerado, se puede decir que la actividad celular es sólo suficiente para el mantenimiento, pero insuficiente para la multiplicación celular.

Tomando en consideración que la monoazida de propidio penetra en células cuya membrana celular se ha visto afectada (células inviables), la detección de células viables en los experimentos realizados indica que las membranas de dichas bacterias no fueron afectadas por los pre-tratamientos y los daños estructurales –de haberlos- podrían localizarse interiormente.

Con base en lo anterior, se elaboró la hipótesis de que debido a “lesiones celulares internas” provocadas por el enfriamiento acelerado en sinergia con el calentamiento, el tiempo de duplicación bacteriano incrementó hasta niveles desconocidos, o bien se indujo un estado estacionario prolongado.

Por otra parte, la persistencia de células viables de *Salmonella* spp. en las cinéticas de enfriamiento acelerado, contrastan con lo observado en tubos con caldo Selenito-Cistina donde fueron indetectables y se asumieron como pruebas negativas (etapa de experimentación 2). Lo anterior da elementos para proponer como una explicación que algunas células de *Salmonella* spp. adoptaron el estado VPNC, mismo que fue inducido por el pre-tratamiento.

### 5.3.10 CONSIDERACIONES FINALES

Mediante estos resultados se suma nueva información que demuestra cómo los métodos de cultivo estándar estipulados por la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003) son inadecuados para determinar la concentración de los microorganismos que exige monitorear, para el aseguramiento de la calidad de biosólidos, dado que sólo estiman la densidad poblacional y presentan inconvenientes para la interpretación de resultados positivos, principalmente en el caso de *Salmonella* spp.

El control sobre la estabilización/desinfección de lodos y sobre la aplicación de biosólidos, debe contemplar la presencia de *Salmonella* spp. y otros patógenos tanto en estado viable como en estado VPNC, puesto que la recuperación de viabilidad en el punto de aplicación representaría un peligro latente para los operarios, el público y la fauna local.

Para efectos de asegurar la salud pública, lo siguiente cobra especial importancia: si los límites máximos permisibles para coliformes fecales y *Salmonella* spp. fueron diseñados con base en la dosis infectiva, pero todos estos valores partieron de información generada por los métodos de cultivo

estándar, que –como se ha demostrado en la presente investigación- son inexactos o inadecuados, entonces merece el esfuerzo de re-considerar estos valores y métodos para así establecer nuevas dosis infectivas y/o nuevos límites máximos con base en métodos exactos.

Utilizando métodos moleculares cuantitativos en lo futuro, podría analizarse desde un enfoque más certero la conveniencia de utilizar monoazida de propidio (PMA) como agente para diferenciar células viables de células inviables, pues es verificable este efecto distintivo en algunas muestras presentadas aquí, aunque sólo visualmente.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 CONCLUSIONES

#### 6.1.1 CON BASE EN LOS ESTUDIOS POR MCE:

1. Las condiciones de pre-tratamiento térmico moderado (70 °C por 30 min y 55 °C por 240 min) para desinfección de lodos de purga recomendadas por la US EPA (2003) y autores como Strauch (1991), Ward (1999), Carrington (2001), Smith (2008) –entre muchos otros- fueron insuficientes para inactivar a los coliformes fecales y *Salmonella* spp. en los lodos residuales usados en este proyecto.
2. Se encontró que los enfriamientos paulatinos y rápidos (corriente de aire o baño de hielo) fueron ineficaces para inactivar coliformes fecales y *Salmonella* spp. en lodos de purga tratados tanto a 70 °C/60 minutos como a 80 °C/60 minutos. Con lo cual se rechaza la hipótesis planteada al comienzo de esta investigación, ya que el pre-tratamiento moderado al que se hacía referencia únicamente contemplaba calentamiento y enfriamiento paulatino.
3. Se requirieron tiempos de contacto de 60 minutos tanto a 70 °C como a 80 °C acoplados a enfriamiento acelerado (de 80 °C a 20 °C, en menos de 18 minutos) usando choque térmico (baño de hielo y NaCl, -20 °C) para la inactivación eficaz de coliformes fecales a valores de 1 log<sub>10</sub> NMP/g ST y la inactivación eficaz de *Salmonella* spp. (1 a 2 log<sub>10</sub> NMP/ g ST) en los lodos de purga estudiados, cuantificando por métodos de cultivo estándar.
4. Con estas condiciones de pre-tratamiento, cuando se cuantifica por métodos de cultivo estándar, es posible cumplir con lo establecido por la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003) para coliformes fecales en biosólidos de Clase A e inhibir su recrecimiento.
5. Mediante los pre-tratamientos 70 °C/60 min/enfriamiento acelerado y 80 °C/60 min/enfriamiento acelerado, cuantificando por métodos de cultivo estándar, se inhibe el recrecimiento de *Salmonella* spp., pero no se consigue cumplir con lo establecido por la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003) para este patógeno en biosólidos de Clase A.

#### 6.1.2 CON BASE EN LOS ESTUDIOS POR MM:

6. Se montó la técnica para utilizar *monoazida de propidio* (PMA) como tratamiento previo a la amplificación por PCR para diferenciar cualitativamente el ADN molde proveniente de células viables de aquel proveniente de células inviables en lodos de purga y lodos pre-tratados.



7. Se confirmó que los pre-tratamientos a 70 °C por 60 minutos con choque térmico, y a 80 °C por 60 minutos con choque térmico, afectan a las células de coliformes fecales posiblemente aumentando el tiempo de duplicación o induciendo la fase estacionaria sin posibilidad de recobrar su estado original durante la incubación a 35 °C ±1 °C durante 72 horas.
8. Es posible que los pre-tratamientos a 70 °C por 60 minutos con choque térmico, y a 80 °C por 60 minutos con choque térmico, induzcan a algunas células de *Salmonella* spp. a adoptar el estado “*viable pero no cultivable*” (VPNC), aunque sin posibilidad de recobrar viabilidad durante la incubación a 35 °C ±1 °C durante 72 horas.
9. Los métodos de cultivo estándar establecidos en la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003) resultaron ser inadecuados para la cuantificación de coliformes fecales y muy especialmente de *Salmonella* spp. en las muestras de lodo estudiadas en esta investigación.

## 6.2 RECOMENDACIONES

1. Evaluar la operación del sistema PT/DAM experimentando con diferentes TRS y verificar que la inactivación de coliformes fecales y *Salmonella* spp. persista durante las primeras horas de arranque de los digestores.
2. Con base en las dificultades operativas que representa la técnica de Número Más Probable (NMP) empleando tubos múltiples, se sugiere para análisis futuros adoptar la técnica de filtración a través de membrana y conteo en placa como método de cuantificación. Puesto que en diversas publicaciones consultadas se utilizan estos métodos con resultados satisfactorios para los autores. Lo cual demuestra que actualmente han sido eludidos todos los inconvenientes señalados por la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003) en su Anexo III, inciso 1.4 (riesgo de subestimación debido a la alta turbidez de los lodos y al número de diluciones decimales necesarias).
3. La metodología para cuantificación de *Salmonella* spp. parece ser inadecuada, pues presentó dificultades metodológicas para la interpretación visual de resultados en caldo selenito-cistina, mismos que –en ocasiones- dieron lugar a resultados falsos positivos comprobados mediante re-siembra en medios diferenciales. Existen publicadas metodologías alternas que tiene la ventaja de ahorrar –al menos-doce horas para la obtención de resultados. En el ANEXO III del presente trabajo se incluyen dos de estas técnica descritas por Chen *et al.* (2012) y Zabranská *et al.* (2003).

4. El laboratorio encargado de evaluar la calidad de lodos y biosólidos (que cuentan con el equipamiento y dominio de las técnicas) puede auxiliarse de métodos moleculares para la detección y cuantificación de microorganismos, complementariamente a los métodos de cultivo estándar que señala la NOM-004-SEMARNAT-2002.
5. Conviene estudiar la dinámica microbiana del arreglo PT/DAM, usando métodos moleculares cuantitativos acoplados a metodologías para discriminar entre células viables y células inviables, como por ejemplo la técnica puesta en práctica en la presente investigación usando monoazida de propidio (PMA).
6. Promover las reformas y enmiendas necesarias para que la NOM-004-SEMARNAT-2002: a) cuantifique las células bacterianas patógenas en estado viable pero no cultivable (VPNC); b) se reemplacen los medios de cultivo para detección y cuantificación de *Salmonella* spp. por aquellos que demuestren mayor selectividad, facilidad para su preparación y faciliten la interpretación de resultados; y c) se contemplen otros indicadores biológicos como el género *Enterococcus* (propuestos en el ANEXO I, subcapítulos A.1.2 - A.1.5 del presente documento) para efectos de situar a las disposiciones oficiales en un contexto actualizado en términos clínicos.

# ANEXO I

## ANÁLISIS DE LA NOM-004-SEMARNAT-2002 CON UN ENFOQUE MICROBIOLÓGICO

A través del presente documento se han planteado paralelismos entre los lodos residuales (LC y PT), los biosólidos y los alimentos; de forma análoga, los modelos que previenen riesgos en alimentos sirven también para prevenir riesgos en materia de lodos.

Un método preventivo debe sustentarse a su vez en un sistema que haya probado eficacia en su aplicación, como por ejemplo el *HACCP* (Godfree y Farrell, 2005), que evalúa los riesgos y determina cuáles son los puntos críticos de control dentro de un proceso que implique elaboración y consumo de alimentos.

Las autoridades en materia de salud deben avocarse a minimizar el riesgo de infecciones, dedicando más recursos de los que suelen dirigirse a la atención de enfermedades. Un sistema de salud que utilice a la prevención como método, garantizará los siguientes resultados: menor diseminación de patógenos, menores peligros biológicos, pobladores saludables, reducción del número de hospitales y medicamentos, entres otros. De modo que los recursos sean dedicados a fines más constructivos, continuando así en una espiral ascendente donde ser humano experimente todos los beneficios asociados con la vida en salud.

Los hábitos de consumo, la higiene personal, las buenas o malas prácticas en la preparación de alimentos, el consumo del agua y administración de los recursos hídricos, son algunos factores que inciden directamente en el nivel de riesgo ante una infección por *vía entérica*; factores que a su vez, experimentan variabilidad dependiente de la región geográfica, disponibilidad de agua y servicios sanitarios, cultura, educación, economía e incluso religión de los pobladores.

Así mismo, la composición de los lodos residuales y sus características biológicas, están determinadas por la naturaleza de las aguas residuales, que a su vez son resultado de la salud de la población y estilos de vida (Moeller y Ferat, 2001; Castrejón *et al.*, 2002; Arthurson, 2008), así como de todas las actividades antropológicas, entre las que están incluidas tanto la agricultura como la producción pecuaria e industrias de la transformación.

En el contexto de cada país, los géneros y especies microbianas y víricas encontradas en los lodos residuales se clasifican de acuerdo con su origen, nivel de patogenia, abundancia relativa, importancia clínica, enfermedades asociadas y resistencia a los tratamientos de desinfección.

Los patógenos humanos y animales están ausentes en las aguas residuales de la industria de procesado vegetal, industria del papel y de curtiembre. En el caso de los patógenos que afectan plantas y vegetales, estos pueden inactivarse a 40 °C, que es el límite máximo de la digestión anaerobia mesófila, así que un tratamiento de estabilización/desinfección que elimine patógenos animales, eliminará patógenos vegetales por implicación (Carrington, 2001).

Cada país ha diseñado su normatividad con base en el riesgo para los seres vivos ante la exposición directa e indirecta a lodos no estabilizados donde con toda seguridad se hallan los patógenos. La Tabla 2.16 muestra los límites máximos permisibles para biosólidos en México y distintos países.

Pese a que no se ha encontrado información determinante que indique si existen problemas de salud relacionados con los patógenos recalcitrantes en biosólidos (Jenkins *et al.*, 2007), es necesario para la comunidad científica y el público en general obtener dicha información orientando los estudios hacia el análisis de riesgos (Godfree y Farrell, 2005); dicho análisis de riesgos debe integrar el conocimiento acerca de organismos emergentes, mecanismos de exposición, vías de infección e información referente a la difusión, el transporte y destino final de los patógenos.

Analizando la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003) con un enfoque crítico sobre el aseguramiento de la desinfección, se encontraron puntos susceptibles de perfeccionamiento. Las observaciones van desde los indicadores y patógenos vigentes, hasta los métodos de cultivo estándar para cuantificar *Salmonella* spp.

En los subcapítulos siguientes se detallan estas observaciones:

### **A.1.1 LOS MICROORGANISMOS CONTEMPLADOS EN LA NOM-004-SEMARNAT-2002**

Los indicadores seleccionados por la SEMARNAT, fueron los coliformes fecales porque la norma oficial mexicana está basada -mayoritariamente- en la *40 CFR Part 503 Regulation* de la US EPA de 1996, criterio semejante para la elección de *Salmonella* spp. como patógeno.

En investigaciones patrocinadas por la US EPA en los años 1987 y 1993, se encontró en biosólidos obtenidos por compostaje que la tasa de inactivación de los coliformes fecales era directamente proporcional a la tasa de inactivación de *Salmonella* spp., siendo una de las razones por las que se eligieron como indicador. De este modo se supo que a concentraciones de coliformes fecales menores a 1000 NMP/g ST, la cantidad de *Salmonella* spp. es mínima.

Por practicidad metodológica, se ha elegido a *E. coli* (el más representativo de los coliformes fecales) como indicador, pues comparte características semejantes a las formas bacterianas vegetativas de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Vibrio* spp., aunque también con algunos virus (Carrington, 2001).

Sin embargo, en años recientes, con base en los estudios de Záborská *et al.* (2003), Viau y Peccia (2009), Ziamba y Peccia, (2011) se ha demostrado que el género *Enterococcus* (Gram-positivos) es más resistente a tratamientos termófilos que los coliformes totales, es más resistente a condiciones ambientales adversas, no se multiplican tan fácilmente fuera del intestino, tienen un rango limitado de huéspedes, poseen patrones de inactivación muy semejantes a *E. coli* y se encuentran en concentraciones menores en las heces, aunque en número suficiente para ser detectables por métodos de cultivo estándar.

*E. faecalis* en particular es un indicador muy adecuado para el “rastreo del origen bacteriano” (*bacterial source tracking*, BST) propuesto por la US EPA en 2002, porque sólo infecta humanos, perros y aves de corral (Sidhu y Toze, 2009).

### **A.1.2 CUÁLES PODRÍAN SER MEJORES INDICADORES Y PATÓGENOS QUE LOS CONTEMPLADOS EN LA NOM-004-SEMARNAT-2002**

Desde un enfoque práctico, la detección de bacterias sigue siendo más factible que la detección virus, a menos que se cuente con técnicas bien establecidas y se tengan las líneas celulares específicas para su cultivo. La detección y cuantificación de helmintos requiere del absoluto dominio de las metodologías puesto que es una labor peligrosa y engorrosa. En cambio, si el laboratorio cuenta con métodos moleculares, la detección se facilita aunque el precio de los análisis aumenta.

En el contexto de los pre-tratamientos térmicos más actuales (mostrados en la Tabla 2.6), se aplican temperaturas de esterilización que garantizan la inactivación de –prácticamente- todos los patógenos, por tanto es posible contemplar como indicadores a los géneros *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp., porque las temperaturas de pre-tratamiento superan la tolerancia máxima de las endoesporas que estos forman para protegerse. La inactivación térmica de los agentes biológicos más resistentes asegura la inocuidad de los lodos.

Pero en el contexto de los pre-tratamientos térmicos de temperaturas moderadas (menores a 100 °C) y de la digestión anaerobia mesófila (20 °C – 40 °C), los géneros *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp. permanecen inafectados, de manera que no pueden usarse como indicador.

En México, el grueso de la población observa malas prácticas en el manejo de alimentos y el consumo de agua, por lo que las infecciones gastrointestinales son muy recurrentes; de estos patógenos interesan aquellos que producen gastroenteritis, diarreas, vómitos y problemas más severos, como daño al hígado o al sistema nervioso. La Tabla A-1 consiste en una recopilación de los patógenos más comunes hallados en lodos junto a una breve descripción de los trastornos y enfermedades asociadas con algunos de ellos.

**Tabla A-1. Los patógenos de origen fecal hallados comúnmente en lodos y las enfermedades o síntomas que producen en el ser humano. Fuentes principales: Carrington (2001), Moeller-Ferat (2001), Jenkins *et al.* (2007), Tomasini (2007), Arthurson (2008) y Smith (2008)**

	Patógenos	Enfermedades Asociadas o Síntomas
<b>Bacterias</b>	<i>Salmonella</i> spp	Salmonelosis, fiebre tifoidea y paratifoidea
	<i>Shigella</i> spp	Disentería bacilar
	<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	Gastroenteritis
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Otitis externa, infecciones dérmicas
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteritis aguda (incluida diarrea y dolor abdominal)
	<i>Clostridium perfringens</i>	Gastroenteritis, intoxicación alimentaria, gangrena gaseosa
	<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo
	<i>Bacillus anthracis</i>	Anthrax
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriosis
	<i>Vibrio cholera</i>	Cólera
	<i>Mycobacterium</i> spp.	Lepra, tuberculosis
	<i>Leptospira</i> spp.	Leptospirosis
	<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritis
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Infección de heridas, intoxicación por alimentos
	<i>Streptococcus</i> spp.	Dolor de garganta, escarlatina, facitis plantar necrozante
	<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritis infecciosa
	<i>Legionella</i> spp.	Enfermedades respiratorias en ancianos e inmunodeficientes
<b>Virus</b>	Virus de la Hepatitis A	Hepatitis infecciosa
	Virus Norwalk y Tipo-Norwalk	Gastroenteritis epidémica con diarrea severa, vómito y fiebre
	Rotavirus	Gastroenteritis aguda, diarrea severa y vómitos
	Enterovirus	
	Poliovirus	Poliomielitis, meningitis, parálisis
	Coxsackievirus	Meningitis, miocarditis, neumonía, hepatitis, fiebre, síntomas semejantes al resfriado
	Echovirus	Meningitis, parálisis, encefalitis, fiebre, diarrea y síntomas semejantes al resfriado
	Calicivirus	
	Norovirus	Gastroenteritis epidémica
	Sapporo virus	Gastroenteritis epidémica
	Astrovirus	Gastroenteritis epidémica
	Reovirus	Infecciones respiratorias, gastroenteritis
	Adenovirus	Enfermedades intestinales, gastroenteritis, enfermedades respiratorias, infecciones en ojos
	Coronavirus	Enfermedades respiratorias, aneurismas coronarios, diarrea, gastroenteritis, peritonitis
	Parvovirus	Gastroenteritis hemorrágica en perros, vómito y diarrea
Virus de la influenza	Gripe virulenta en mamíferos y aves	

**Tabla A-1. (CONTINUACIÓN) Los patógenos de origen fecal hallados comúnmente en lodos y las enfermedades o síntomas que producen en el ser humano. Fuentes principales: Carrington (2001), Moeller-Ferat (2001), Jenkins et al. (2007), Tomasini (2007), Arthurson (2008) y Smith (2008)**

Protozoarios	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Gastronteritis, diarreas, cistes recalcitrantes
	<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis (diarreas y espasmos abdominales, pérdida de peso), cistes recalcitrantes
	<i>Balantidium coli</i>	Diarrea y disentería
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosis, riesgo de abortos
	<i>Entamoeba histolytica</i>	Enteritis aguda, disentería amibiana
	<i>Naegleria fowleri</i>	Meningitis
	<i>Sarcocystis</i>	Inflamación muscular, dificultad respiratoria, infección al miocardio
Helmintos	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Trastornos digestivos y nutricionales, dolor abdominal, vómito, sensación de fatiga
	<i>Ascaris suum</i>	Tos, opresión en el pecho y fiebre
	<i>Toxocara canis</i>	Fiebre, malestar estomacal, dolor muscular, perturbaciones neurológicas, lesiones oculares y viscerales por <i>larva migrans</i>
	<i>Trichuris trichiura</i>	Dolor abdominal, diarrea, anemia, pérdida de peso
	<i>Taenia saginata</i>	Nerviosismo, insomnio, anorexia, dolor abdominal y trastornos digestivos
	<i>Taenia solium</i>	Nerviosismo, insomnio, anorexia, dolor abdominal y trastornos digestivos
	<i>Hymenolepis nana</i>	Taeniasis
	<i>Necator americanus</i>	Perforación de la pared intestinal
	<i>Fasciola hepática</i>	Inflamación de los conductos biliares
	<i>Hymenolepis diminuta</i>	Infección intestinal en mamíferos y aves
	<i>Strongyloides stercoralis</i>	Daños en piel, mucosa intestinal y pulmón en pacientes inmunodeprimidos
	<i>Enterobius vermicularis</i>	Enterobiasis, prurito anal, apendicitis, peritonitis e infecciones genitourinarias en mujeres
	<i>Ancylostoma duodenale</i>	Anemia, daño pulmonar, daños en piel
	<i>Dipylidium caninum</i>	Dipilidiasis, prurito anal, dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso
	<i>Schistosoma mansoni</i>	Esquistosomiasis con fiebres muy altas
Hongos	<i>Aspergillus</i> spp	Aspergilosis pulmonar invasiva, onicomicosis, oncomicosis, sinusitis alérgica
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Aspergilosis pulmonar invasiva
	<i>Phialophora richardsii</i>	Cromomicosis elefantíaca, infecciones dérmicas severas (principalmente en pies)
	<i>Geotrichum candidum</i>	Afección de vías respiratorias y tracto gastrointestinal; destrucción del policarbonato en CD y DVD
	<i>Tricophyton</i> spp	Infecciones en la piel y cuero cabelludo (pie de atleta y tiña)
	<i>Epidermophyton</i> spp	Micosis superficiales y cutáneas
	<i>Microsporidium</i> spp	Infecciones en intestino, ojos, pulmón, de senos paranasales, riñón y músculos
Levaduras	<i>Candida albicans</i>	Infecciones de mucosa oral y vaginal, afecta principalmente a personas inmunocomprometidas
	<i>Candida krusi</i>	Infecciones de mucosa oral y vaginal, afecta principalmente a personas inmunocomprometidas
	<i>Candida tropicalis</i>	Infecciones de mucosa oral y vaginal, afecta principalmente a personas inmunocomprometidas
	<i>Candida guilliermondii</i>	Infecciones de mucosa oral y vaginal, afecta principalmente a personas inmunocomprometidas
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Meningitis y meningo-encefalitis en personas con VIH

Las infecciones por helmintos afectan a casi toda la población mediante vehículos diversos. El ciclo de vida de estos géneros les permite pasar de un hospedero a otro con facilidad cuando no se tienen precauciones o buenos hábitos de higiene. Por esta razón, los huevos de helmintos –que son los

patógenos con mayores períodos de supervivencia en suelos y recalcitrantes en la mayoría de trenes de tratamiento de lodos- son un mejor indicador de calidad en lodos si se comparan con las bacterias.

Al desarrollarse dentro del hospedero, los helmintos parasitan el intestino y provocan trastornos nutricionales importantes, así como molestias intestinales y problemas digestivos severos.

Los protozoarios son otra causa de problemas de salud asociados con el consumo de agua o alimentos contaminados. Pero son eliminados con relativa facilidad mediante tratamientos térmicos moderados.

Las modificaciones sugeridas a la NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003) con base en esta investigación serían las siguientes:

- (1) Sustituir a los coliformes fecales por *Enterococcus faecalis*, siguiendo para su detección la técnica descrita por Záborská *et al.* (2003).
- (2) Conservar a *Salmonella* spp., pero sustituir el método de detección y cuantificación. Dos opciones factibles se describen en las publicaciones de Záborská *et al.* (2003) y de Chen *et al.* (2012), puesto que permiten ahorrar –al menos- 12 horas para la liberación de resultados y porque el caldo *Rappaport-Vassiliadis* (que sustituye al caldo de Selenito-Cistina, sección 4.1.4) es cada vez más usado por investigadores en cinéticas de inactivación para el género *Salmonella*; situación conveniente para fines de estudios comparativos.
- (3) Al referirse a huevos de helmintos viables, se debe especificar que se trata de *Ascaris suum* (que infecta al hombre pese a ser característico de los cánidos) por ser los de mayor dureza y resistencia al calor y fuerzas de corte, así como *Ascaris lumbricoides* por su resistencia térmica.
- (4) Los protozoarios que demuestran mayor persistencia e infectan agua y alimentos con mayor incidencia de casos según la CONAGUA (2007) son *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*. Estos son inactivados bajo condiciones menos drásticas que los huevos de helmintos, de modo que su presencia en biosólidos aplicados en el suelo sería resultado de re-infección por materia fecal o por agua de riego contaminada. Quedaría a consideración del laboratorio especializado la detección de protozoarios en muestras de suelo fertilizado recientemente.
- (5) Actualmente no se contemplan límites máximos para virus entéricos, pero si la Secretaría de Salud en México aporta evidencia suficiente que respalde la importancia clínica de estos virus, mediante el aumento en la incidencia de casos o brotes, entonces deberán contemplarse en la normatividad los virus más patogénicos de acuerdo con tales evidencias.



- (6) Alternativamente pueden detectarse los bacteriófagos que infectan a *Escherichia coli* o a *Salmonella spp.* porque son semejantes morfológicamente a los virus entéricos, muestran cinéticas de inactivación con tendencias muy parecidas a las de virus hepáticos y su presencia es resultado de que las enterobacterias mencionadas se encuentran presentes en estado viable o incluso viable pero no cultivable (VPNC).
- (7) La detección de bacteriófagos confirma la presencia de *E. coli*, *Salmonella spp.* y enterovirus, lo cual puede ser una ventaja para la entrega pronta de resultados.
- (8) Ofrecer la opción de analizar bacterias, protozoarios, huevos de helmintos y virus, mediante métodos de biología molecular, amplía el horizonte del monitoreo de calidad de lodos y biosólidos. La tendencia mundial está orientándose hacia el conocimiento y caracterización de comunidades microbianas, con lo cual se genera información que ayuda en gran medida para evaluar los trenes de tratamiento.
- (9) El límite máximo permisible para cada indicador y patógeno en la nueva normatividad deberá establecerse con información realista y bien contextualizada, apoyándose en la información que la Secretaría de Salud e Institutos y centros de investigación públicos y privados, generan acerca de las *dosis infectivas* en México, adecuadas al estado de salud y susceptibilidad ponderada de la población nacional, pues son distintas de aquellas observadas en países europeos y norteamericanos.

### A.1.3 ¿CÓMO SE ELIGE UN INDICADOR?

Para evaluar la calidad del agua y de lodos, se ha tenido que recurrir a la extrapolación de riesgos de contaminación bacteriológica mediante microorganismos tipo, a los que se conoce con el nombre de indicadores de contaminación o microorganismos testigo.

La mayoría de los patógenos transmitidos por el agua son de origen fecal, por lo que se emplean indicadores de esta clase de contaminación. Los indicadores son, por tanto, “**patógenos sustitutos**” y poseen algunas características particulares, como son las señaladas por Carrington (2001), Jenkins *et al.* (2007) y Tomasini (2007):

- 1) Ser poco o nada patógenos
- 2) Estar presentes de forma constante y en altas concentraciones en aguas y en lodos crudos.
- 3) Ser ligeramente más resistentes que los patógenos a los tratamientos fisicoquímicos aplicados a las aguas o a los lodos, pero nunca excesivamente resistentes.

- 4) Ser relativamente fáciles de cultivar y poseer características que los hagan fáciles de identificar y confirmar.
- 5) Que los resultados de su detección se obtengan rápido y a un precio moderado.

Si una muestra de agua o biosólidos contiene indicadores, se toma como evidencia de contaminación y existe posibilidad de que haya patógenos en la muestra en relación directamente proporcional. Aunque es sumamente importante hacer la aclaración de que la ausencia de un indicador no implica forzosamente ausencia de patógenos (Sidhu y Toze, 2009).

1.- Indicadores bacteriológicos (Tomasini, 2007): son organismos de un grupo específico, cuya sola presencia demuestra que ocurrió contaminación asociada a ese género y en ocasiones sugiere el origen de dicha contaminación (*bacterial source tracking*). Tradicionalmente los coliformes fecales son el grupo de bacterias indicadoras que se consideran en los estudios y trabajos para evaluar la calidad del agua. Los coliformes fecales no suelen representar peligro para la salud humana, porque forman parte de la flora intestinal habitual. El mayor exponente de este grupo es *Escherichia coli* (*E. coli*), que pertenece al grupo de la *Enterobacteriaceae* o bacterias de origen entérico (intestinales). Algunas subespecies patogénicas de *E. coli* son causantes de diarreas y malestares estomacales; su dosis infectiva es de aproximadamente  $10^2$  NMP/100 ml de agua.

Las bacterias entéricas requieren de un hospedero, pero también pueden multiplicarse en el medio ambiente en condiciones favorables para su recrecimiento.

2.- Indicadores parasitarios (Tomasini, 2007): Para determinar la contaminación por parásitos se toman como indicador los huevos de helmintos. Los helmintos son un amplio grupo de organismos que incluye a todos los gusanos parásitos (de humanos, animales o vegetales) de forma libre con estructura y tamaño variados. El peligro para la salud se debe principalmente a que a) sus estadios presentan una alta persistencia en el ambiente, b) su dosis mínima infectiva es de un huevo, c) no existe inmunidad en los humanos, d) su periodo de latencia es largo (meses) y e) son resistentes a los procedimientos convencionales de desinfección.

Cuentan con altísima capacidad de ovoposición (huevos puestos en un día, h/d) durante los 10 a 24 meses que tienen de vida, por ejemplo: *Taenia* sp. 700,000 h/p; *Ascaris* sp. 200,000 h/d; *Hymenolepis* sp. 100,000 h/d y *Trichuris* sp. 5,000 a 7,000 h/d. Los parásitos no pueden reproducirse fuera del hospedero, por lo que son incapaces de reproducirse de forma libre en el medio ambiente.

Existe una gran diversidad de huevos de helmintos de importancia sanitaria recuperados de aguas residuales que afectan al hombre y animales. Los huevos son eliminados por el portador con la materia fecal y la vía de entrada al hospedero es oral, ya sea por contaminación del agua y alimentos

(mediante agua residual y/o heces de animales de sangre caliente), o por lodos residuales dispuestos al medio ambiente sin tratamiento (US EPA, 2003).

3.- Indicadores víricos: Existen varios virus que infectan el tracto gastrointestinal (enterovirus) y otros relacionados con enfermedades respiratorias que son transmitidos a través de las heces. La inactivación de los enterovirus más recalcitrantes como Coxsackievirus, Poliovirus y Echovirus implica la inactivación de los menos resistentes. Sin embargo, en años recientes se ha encontrado mayor resistencia térmica en bacteriófagos, por lo que estos últimos podrían ser un indicador más veraz. En México, la legislación no contempla límites máximos permisibles para virus en biosólidos.

Citando un párrafo del trabajo de Carrington (2001): “Los términos sobre los que se define la calidad de los lodos deberán referirse a la salud animal, vegetal y humana. Los límites de indicadores y patógenos deben ser equiparables a la cuenta en que se encuentran en el medio ambiente. Ser realistas en los límites máximos permisibles”.

#### **A.1.4 PROPUESTAS DE OTROS INVESTIGADORES SOBRE NUEVOS PATÓGENOS**

En la publicación de Jenkins *et al.* (2007) se menciona que el criterio para identificar nuevos microorganismos patógenos (patógenos emergentes) o establecer nuevos indicadores de la calidad en biosólidos o compostas estaría sujeto a las siguientes consideraciones:

- 1) Disponibilidad de métodos analíticos precisos para su cuantificación
- 2) Que el agente patogénico se encuentre en aguas residuales y sea transmisible por aire, agua o contacto directo
- 3) Contar con información que sustente la posible resistencia del agente patógeno a los tratamientos para producir biosólidos, especialmente alta resistencia al calor y al pH
- 4) Demostrar la capacidad de supervivencia del agente patógeno en el medio ambiente.

Mediante el NRC, recientemente se ha sugerido a la US EPA investigar a fondo a los siguientes patógenos: Adenovirus 40, Astrovirus, Virus de la Hepatitis A (HAV), Rotavirus y *E. coli* O157:H7.

Difícilmente podrían establecerse límites máximos específicos para cada patógeno, sólo de los más dominantes; sin embargo, los límites actuales están sujetos a cambio si se demuestra mayor incidencia de enfermedades humanas asociadas con otro tipo de patógenos.

De acuerdo con Smith *et al.* (2004), los patógenos de mayor relevancia en biosólidos deberían ser los siguientes: *E. coli* O157:H7, *Listeria* spp., *Helicobacter pylori*; Coxsackievirus, Echovirus, HAV, Rotavirus y Norovirus; *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora* sp., *Toxoplasma gondii*, *Microsporidium* sp. y *Giardia* sp.

Estos mismos investigadores, propusieron indicadores alternos: Anaerobios fecales (*Bacteroides* y *Bifidobacterium*), *C. perfringens*, *Enterococcus* spp., colifagos y bacteriófagos que infectan a *Bacteroides fragilis* y F-RNAfagos.

Ziembra y Peccia, (2011) estudiaron al Bacteriófago MS-2 porque es un colífago macho-específico (F+) muy semejante a los virus entéricos humanos termo-resistentes a tratamientos térmicos. La misma propuesta fue encontrada en la investigación de Nappier *et al.* (2006).

Los indicadores más termo-resistentes encontrados en la investigación de Mocé-Llivina *et al.* (2003) fueron los bacteriófagos que infectan a *E. coli* y a *Bacteroides fragilis*, pues demostraron mayor resistencia que *Salmonella* spp., *E. coli* y que los virus entéricos de prueba: Poliovirus, Coxsackie virus, Echovirus y los enterovirus EV1 y EV2. Sidhu y Toze, (2009), apoyaron la propuesta de usar bacteriófagos como indicador indirecto de enterovirus porque se asemejan morfológicamente.

Adicionalmente, los microorganismos y virus que Gattie y Lewis (2004) propusieron cuantificar en lodos y biosólidos, así como los criterios para su selección, fueron los siguientes:

Bacterias: *Clostridium* spp. y *Bacillus* spp., porque 1) forman esporas termo-resistentes, 2) son anaerobios facultativos, 3) están fuertemente asociados con la producción de toxinas altamente termoresistentes que pueden lixiviar al subsuelo una vez que los biosólidos se aplican en la tierra, 4) se asocian fuertemente con exotoxinas bacterianas transportadas en partículas de polvo suspendidas en el aire y 5) se les relaciona con enfermedades pulmonares crónicas, episodios agudos de obstrucción respiratoria, alergias y –en menor medida- padecimientos del tracto gastrointestinal.

*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Listeria monocitogenes*. *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Mycobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Mycobacterium* spp. por su capacidad para desarrollar resistencia al calor mediante la expresión de proteínas de choque térmico.

Protozoarios: *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* infectan el tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente. Los mamíferos semi-acuáticos pueden servir de hospederos, transmitiendo la enfermedad hacia humanos que consumen aguas contaminadas. Los animales domésticos (ruminantes, especialmente) pueden servir como hospederos y contaminar el agua de

consumo. Se estima que el 7% de los casos de diarreas en EE.UU. se debe a *Cryptosporidium parvum* (US EPA, 2003).

*Giardia* sp. y *Cryptosporidium* sp. cuentan con distintas vías que facilitan su transmisión por medio del agua: 1) pueden ser excretadas con las heces en grandes cantidades durante la enfermedad; 2) logran sobrevivir a los tratamientos convencionales en una PTAR; 3) poseen alta resistencia a la inactivación en la PTAR; 4) son resistentes a los desinfectantes comúnmente usados para potabilizar el agua, 5) su supervivencia es alta en digestores anaerobios mesófilos y 6) su dosis infectiva es muy baja (US EPA, 2003).

La digestión anaerobia convencional consigue la inactivación aproximadamente de 2 log<sub>10</sub> de estos protozoarios, que es mayor que la inactivación de bacterias y virus, pero no es suficiente para la producción de biosólidos de Clase A (Jenkins *et al.*, 1998).

En los métodos de estabilización alcalina, el amoníaco libre producido contribuye marcadamente a la inactivación de los quistes de *Giardia* sp. y *Cryptosporidium* sp., así como el propio pH alcalino.

Virus pequeños sin-envoltura: Norovirus, Rotavirus, HAV y HEV, Poliovirus, Coxsackievirus, Reovirus, Rhinovirus, Astrovirus, Echovirus, Parvovirus y Aphthovirus, por ser altamente resistentes a los tratamientos térmicos y ser causantes de patologías diversas -generalmente asociadas con diarreas- en niños, adultos mayores y especialmente en pacientes con inmunodeficiencias o enfermedades terminales.

Desde un enfoque médico, Gattie y Lewis (2004) reconocieron la importancia de evaluar la cantidad de *endotoxinas* (*lipopolisacáridos* provenientes de la destrucción celular de las bacterias Gram-negativas de alta resistencia térmica) presentes en los biosólidos por el potencial alergénico que presentan en casos de ingestión e inhalación mediante la formación de aerosoles.

### A.1.5 TIEMPO DE PERMANENCIA EN EL PUNTO DE APLICACIÓN

Los virus se ven afectados por la temperatura, el pH, la humedad y el tipo de suelo; si bien son los patógenos de vida más corta en el medio ambiente, son los que se transportan a través del suelo con mayor rapidez. Las bacterias también se ven afectadas por las mismas condiciones, pero la disponibilidad de nutrimentos limita su supervivencia en un rango que va de semanas a meses (Tablas 2.13, 2.14 y 2.15). Algunas bacterias pueden recrecer a casusa de las lluvias, pero en su mayoría son incapaces de hacerlo (Jenkins *et al.*, 2007).

Las bacterias patógenas en estado VPNC (viable pero no-cultivable) pueden reactivarse y multiplicarse, pero en ocasiones la microbiota asociada a los suelos contribuye competitivamente a reducir el número de dichos patógenos, minimizando el riesgo para la salud humana (Smith *et al.* 2008). Los patógenos recalcitrantes en biosólidos y compostas pueden contaminar aguas superficiales y subterráneas si no existe control sobre los procesos de lixiviación.

Cabe señalar que -contrariamente a las bacterias- los parásitos no pueden multiplicarse en los biosólidos dado que requieren de un huésped. Los más recalcitrantes son los helmintos, en especial los huevos viables, que pueden sobrevivir durante años en el suelo (Tabla 2.13).

### **A.1.6 CONSIDERACIONES AL RESPECTO DE LOS PATÓGENOS (NO TODO ES LO QUE APARENTA)**

Para investigaciones reconocidas por el *National Research Council* de los EE.UU. como Jenkins *et al.* (1998 y 2007), los patógenos pueden aislarse del lodo crudo y del lodo tratado, pero eso no representa forzosamente un peligro para la salud humana. Para estos autores, el riesgo está en función del nivel de exposición, dosis infecciosa de cada patógeno y grado de susceptibilidad de la persona expuesta, y citan como ejemplos las dosis infectivas de *Cryptosporidium parvum* (de 1 a  $10^3$  cistes) o *Vibrio* spp. y *E. coli* ( $10^8$  células).

La probabilidad de que un organismo patógeno consiga implantarse en el organismo y provoque una infección depende de su grado de invasión. Si se produce infección, los patógenos se multiplicarán en el organismo huésped. Una única exposición a un patógeno puede bastar para provocar una enfermedad (Tomasini, 2007).

Cada individuo es distinto, algunos son más susceptibles y otros menos, ante los mismos agentes patogénicos. Factores como la exposición crónica, inmunidad adquirida y la herencia genética, complican un poco cualquier análisis de riesgos. Las personas inmunodeficientes, recién nacidos y ancianos suelen ser más proclives a contraer infecciones.

La información sugiere que la herencia genética tiene un papel fundamental en la manifestación de síntomas ante la exposición a organismos infecciosos, partículas, olores, endotoxinas o alérgenos. Estos estudios se han realizado entre individuos que trabajan como recolectores de basura, en plantas de composta y PTARs, y en los animales domésticos de personas expuestas continuamente a los agentes mencionados (Jenkins *et al.*, 2007).

## ANEXO II

### METODOLOGÍAS DE ARRANQUE

Se operaron digestores de 9 litros de capacidad y volumen útil de 5 litros, en régimen semi-continuo y un TRS de 13 días durante su etapa de estabilidad. Esto en la práctica consistió en que el digester tendría cinco litros de lodo activo en su interior y trece días es el tiempo necesario para recambiar la totalidad del volumen útil (los 5 litros). Dicho de otro modo, el volumen de alimentación sería 5 litros divididos entre 13 días, que da como resultado 386 ml/día.

Cada digester anaerobio, una vez alcanzado el TRS, sería alimentado con 386 ml de lodo todos los días y previamente a la alimentación se retiraría el mismo volumen de lodo digerido (purgándose 386 ml) para mantener el volumen útil constante. Para lo cual se caracterizó al lodo de alimentación, conociéndose cuánta materia orgánica contenían (%STV).

#### A.2.1 DIGESTOR D-II (INÓCULO CONVENCIONAL - LODO GRANULAR ANAEROBIO DE UN REACTOR UASB)

1. El inóculo preservado en refrigeración, se acondicionó unas horas dentro de la cámara caliente hasta alcanzar la temperatura de operación de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .
2. La cantidad de lodo anaerobio mesófilo necesaria para un digester con 5 L de volumen útil fue de 1000 ml.
3. Se agregaron 4 L de agua destilada al digester, que previamente se mantuvo en un recipiente cerrado dentro de la cámara caliente para alcanzar la temperatura de operación.
4. El inóculo se inyectó al digester mediante el sistema de bombeo y se encendió el sistema de agitación a 60 rpm para evitar apelmazado y distribuir homogéneamente.
5. Finalmente se agregaron a la mezcla de agua e inóculo, 100 ml de lodo pre-tratado a  $70^\circ\text{C}/60$  min, y se cerró el sistema. Se conectaron las líneas de recirculación y la agitación se mantuvo en 60 rpm.
6. La línea de biogás se conectó a la probeta invertida para medir el volumen desplazado.
7. Se dejó funcionar el sistema durante una hora para asegurar el completo mezclado y se tomó una muestra de 100 ml para determinar pH, alcalinidad a pH de 5.75 (alcalinidad parcial) y

- alcalinidad a pH de 4.3 (alcalinidad total) en 25 ml de muestra. Se registraron los valores de estos parámetros correspondientes al Día Cero.
8. Con el volumen restante de muestra (75 ml) se practicaron los análisis microbiológicos y de sólidos (ST, STV y STF) al día cero. Mientras que 5 ml de muestra se preservaron en microtubos de centrifuga estériles, para los análisis de ácidos grasos volátiles (AGVs).
  9. El valor  $\alpha$  (cociente alcalinidad parcial / alcalinidad total) se calculó diariamente para decidir si se alimentaba o no el digestor: si  $\alpha \geq 0.4$ , el digestor soportaba el aumento de carga y puede alimentarse; un valor  $\alpha < 0.4$  indica que la carga es demasiada y no debe alimentarse.
  10. Transcurridas 24 horas de operación, se registró el volumen de agua desplazado en la probeta. Y se tomó una muestra de la mezcla gaseosa para medir composición de biogás por cromatografía de gases.
  11. Se purgaron 30 ml para medir pH y alcalinidades. Se calculó el valor  $\alpha$  del día y se registraron los valores, cuidando que el pH se mantuviera entre 6.5 y 7.5.
  12. Los restantes 5 ml de muestra se preservaron en microtubos de centrifuga estériles, para los análisis para AGVs.
  13. Siguiendo el criterio del valor  $\alpha$ , se decidió la alimentación del digestor. Si el  $\alpha < 0.4$ , se suspendería la alimentación de ese día, esperando 24 horas más. En caso de  $\alpha \geq 0.4$ , se alimentaría con 50 ml más que el día anterior (150 ml de lodo), purgando idéntico volumen previo a alimentar.
  14. Se registró el volumen de biogás producido y su composición.
  15. Cada 24 hrs se repitió la operación de muestreo y determinación del valor  $\alpha$ . Conforme el esquema de alimentación escalonada, se agregaron 50 ml más de lodo días a día (si  $\alpha \geq 0.4$ ), purgando idéntico volumen previamente.
  16. En el momento de la operación donde se alimentó al digestor con 386 ml/día, se alcanzó el TRS de trece días. Esto se previó el día anterior, cuando la alimentación fue de 350 ml. Así que el día en cuestión sólo se incrementaron 36 ml para obtener los 386mL.
  17. A partir del momento donde se alcanzó el TRS de trece días, comenzó el período de estabilización, que normalmente dura el equivalente a 3 TRS (39 días).



18. El monitoreo de pH, alcalinidades, producción y composición de biogás se realizó diariamente.
19. La determinación de sólidos se efectuó el mismo día que los análisis microbiológicos porque se requiere de estos valores para elaborar los cálculos. La frecuencia de los análisis microbiológicos fue de tres veces por semana durante el arranque y dos veces por semana una vez alcanzado el TRS de trece días.

### **A.2.2 DIGESTORES D-I Y D-III (INÓCULO NO-CONVENCIONAL - LODO PRE-TRATADO)**

1. La cantidad de lodo pre-tratado necesaria para un digestor con 5 litros de volumen útil fue de 2 litros.
2. Para obtener 2 litros de lodo pre-tratado se requirió procesar tres lotes de 800 ml cada uno, en el dispositivo de hidrólisis térmica, bajo las condiciones de tiempo y temperatura requeridas: 70 °C/60 min (D-I) y 80 °C/60 min (D-II).
3. Cada lote se enfrió por corriente de aire para envasarse asépticamente y conservarse en refrigeración para evitar su deterioro. Cada lote requirió 2 horas para estar listo.
4. El inóculo preservado en refrigeración, se acondicionó al día siguiente durante unas horas dentro de la cámara caliente hasta alcanzar la temperatura de operación de  $35 \pm 1$  °C.
5. Se agregaron al digestor 2 litros de agua destilada y atemperada a  $35 \pm 1$  °C.
6. El inóculo se inyectó al digestor mediante el sistema de bombeo y encendiendo el sistema de agitación en 60 rpm.
7. La línea de biogás se conectó a la probeta invertida para medir el volumen desplazado.
8. Se dejó funcionar el sistema durante una hora para asegurar el completo mezclado y se tomó una muestra de 100 ml para determinar pH, alcalinidad a pH de 5.75 (alcalinidad parcial) y alcalinidad a pH de 4.3 (alcalinidad total) en 25 ml de muestra. Se registraron los valores de estos parámetros correspondientes al Día Cero.
9. Con el volumen restante de muestra (75 ml) se practicaron los análisis microbiológicos y de sólidos (ST, STV y STF) al día cero. Los restantes 5 ml de muestra se preservaron en microtubos de centrifuga estériles, para los análisis de ácidos grasos volátiles (AGVs).

10. El valor  $\alpha$  (cociente alcalinidad parcial / alcalinidad total) se calculó diariamente para decidir si se alimentaba o no el digestor: si  $\alpha \geq 0.4$ , el digestor soportaba el aumento de carga y podía alimentarse; un valor  $\alpha < 0.4$  indicaría que la carga era demasiada y no debía alimentarse.
11. Transcurridas 24 horas de operación, se registró el volumen de agua desplazado en la probeta. Y se tomó una muestra de la mezcla gaseosa para medir composición de biogás por cromatografía de gases.
12. Se purgaron 30 ml para medir pH y alcalinidades. Se calculó el valor  $\alpha$  del día y se registraron los valores, cuidando que el pH se mantuviera entre 6.5 y 7.5.
13. Los restantes 5 ml de muestra se preservaron en microtubos de centrifuga estériles, para los análisis de AGVs.
14. Siguiendo el criterio del valor  $\alpha$ , se decidió la alimentación del digestor. Si el  $\alpha < 0.4$ , se suspendía la alimentación de ese día, esperando 24 horas más. En caso de  $\alpha \geq 0.4$ , se alimentaría con 50 ml más que el día anterior (150 ml de lodo), purgando idéntico volumen previo a alimentar.
15. Se registró el volumen de biogás producido y su composición.
16. Cada 24 hrs se repitió la operación de muestreo y determinación del valor  $\alpha$ . Conforme el esquema de alimentación escalonada, se agregaron 50 ml más de lodo días a día (si  $\alpha \geq 0.4$ ), purgando idéntico volumen previamente.
17. En el momento de la operación donde se alimentó al digestor con 386 ml/día, se alcanzó el TRS de trece días. Esto se previó el día anterior, cuando la alimentación fue de 350 ml. Así que el día en cuestión sólo se incrementaron 36 ml para obtener los 386ml.
18. A partir del momento donde se alcanzó el TRS de trece días, comenzó el período de estabilización, que normalmente dura el equivalente a 3 TRS (39 días).
19. El monitoreo de pH, alcalinidades, producción y composición de biogás se realizó diariamente.
20. La determinación de sólidos se efectuó el mismo día que los análisis microbiológicos porque se requiere de estos valores para elaborar los cálculos. La frecuencia de los análisis microbiológicos fue de tres veces por semana durante el arranque y dos veces por semana una vez alcanzado el TRS de trece días.

## ANEXO III

### TÉCNICAS ALTERNAS PARA CUANTIFICACIÓN DE *Salmonella* spp.

#### A.3.1 Chen *et al.* (2012)

Tomar cinco gramos de lodo y hacer diluciones decimales de esta muestra partiendo de la primer dilución 1:10, ocupando caldo nutritivo estéril. Incubar las diluciones durante 8-18 horas; tomar un mililitro de cada dilución y transferirlo a tubos de fermentación que contengan 9 ml de caldo tetratonato. Hacer triplicado de cada dilución, a manera de respetar la mecánica del NMP mediante tubos múltiples. Incubar los tubos de fermentación a 42 °C durante 18-24 horas. Tomar los tubos de fermentación y mediante un asa sembrar por estría en cajas de Petri con agar-SB (sulfito de bismuto); sembrar una caja por cada tubo de fermentación incubado (tres o cinco cajas por cada dilución decimal). Incubar las cajas a 37 °C durante 18-24 horas. La aparición de colonias negras es resultado positivo para la reacción e indica la presencia de *Salmonella* spp. Los tubos positivos se cuentan y se determina el NMP.

#### A.3.2 Zábranská *et al.* (2003)

Esta es una prueba de detección (presencia/ausencia) que consta de cuatro pasos: enriquecimiento no-selectivo en agua peptonada, disolviendo 50 g de lodo e incubando durante 16-20 h a  $33 \pm 1$  °C. Simultáneamente se efectúan los enriquecimientos selectivos usando caldo *Rappaport-Vassiliadis* (24 h,  $41.5 \pm 0.5$  °C) y caldo *Selenito-Cistina* (24 h,  $37 \pm 1$  °C). Después del enriquecimiento, se resiembran en agares XLD (xilosa-lisina-desoxicolato) y VB (agar verde brillante), incubándolos 24-48 h a 35 °C. Los medios líquidos se incuban por 24 h más y se re-siembran como se describió. Al menos cinco colonias (o todas, si se detectan menos) se usan para las pruebas confirmativas y serológicas.

## ANEXO IV

### REFERENCIAS SOBRE LA APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES EN ANÁLISIS DE LODOS, BIOSÓLIDOS, COMPOSTAS Y SUELOS

- Bae, S.** and Wuertz, S. (2009). Discrimination of Viable and Dead Fecal Bacteroidales Bacteria by Quantitative PCR with Propidium Monoazide. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No.9, p. 2940-2944.
- Burtscher, C.** and Wuertz, S. (2003). Evaluation of the Use of PCR and Reverse Transcriptase PRC for Detection of Pathogenic Bacteria in Biosolids from Anaerobic Digestors and Aerobic Composters. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 8, p. 4618-4627.
- Chang, B.,** Sugiyama, K., Taguri, T., Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Watanabe, H. (2009). Specific Detection of Viable Legionella Cells by Combined Use of Photoactivated Ethidium Monoazide and PCR/Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No. 1, p. 147-153.
- Gilbride, K.A.,** Lee, D.-Y., Beaudette, L.A. (2006). Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *Journal of Microbiological Methods* 66, 1-20.
- González-Escalona, N.,** Hammack, T.S., Rusell, M. Jacobson, A.P., De Jesús, A.J., Brown, E.W., Lampel, K.A. (2009). Detection of Live *Salmonella* sp. Cells in Produce by a TaqMan-Based Quantitative Reverse Transcriptase Real-Time PCR Targeting *invA* mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No. 11, p. 3714-3720
- Horáková, K.,** Mlejnkova H., Mlejnek P. (2008). Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: cytochrome bd complex, lactose permease, beta-D-glucuronidase, and beta-D-galactosidase. *Journal of Applied Microbiology* 105, (4): 970-976.
- Lebuhn, M.,** Effenberger, M., Gronauer, A., Wilderer, P.A., Wuertz, S., (2003). Using quantitative real-time PCR to determine the hygienic status of cattle manure. *Water Sci. Technol.* 48, 97–103.
- Lebuhn, M.,** Effenberger, M., Garces, G., Gronauer, A., Wilderer, P.A., (2004). Evaluating real-time PCR for the quantification of distinct pathogens and indicator organisms in environmental samples. *Water Sci. Technol.* 50, 263–270.
- Lebuhn, M.,** Effenberger, M., Garces, G., Gronauer, A., Wilderer, P.A., (2005). Hygienization by anaerobic digestion: comparison between evaluation by cultivation and quantitative real-time PCR. *Water Sci. Technol.* 52, 93–99.
- Lee, D.Y.,** Shannon, K., Beaudette, L.A., (2006). Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *J. Microbiol. Methods* 65, 453–467.
- Marsh, P.,** Morris, N.Z., Wellington, E.M.H., (1998). Quantitative molecular detection of *Salmonella typhimurium* in soil and demonstration of persistence of an active but non-culturable population. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27, 351–363.
- McCabe, E.M.,** Burgess, C.M., Walsh, D., O'Regan, E., McGuinness, S., Barry, T. Fanning, S., Duffy, G. (2011). Validation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the *hilA* gene of *Salmonella enterica* serovars. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 84, No. 1, p. 19-26.
- McCabe, E.M.,** Burgess, C.M., Walsh, D., O'Regan, E., McGuinness, S., Barry, T. Fanning, S., Duffy, G. (2011). Development and evaluation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the *hilA* gene of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*. *Food Microbiology*, Vol. 28, No. 3, p. 447-456.
- Nocker, A.,** Cheung, C.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.
- Nocker, A.,** Camper, A.K., (2006). Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1997–2004.
- Nocker, A.,** Sossa-Fernandez, P., 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., Sossa-Fernandez, P., Burr, M.D., Camper, A.K.** (2007). Use of Propidium Monoazide for Live/dead Distinction in Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 16, p. 5111-5117.
- Nocker, A., Mazza, A., Masson, L., Camper, A.K., Brousseau, R.,** (2009). Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *Journal of Microbiological Methods* 76, 253–261.
- Pan, Y. and 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 and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 24, p. 8028-8031
- Parshionikar, S., Laseke, I., Fout, G.S.** (2010). Use of Propidium Monoazide in Reverse Transcriptase PCR to Distinguish between Infectious and Noninfectious Enteric Viruses in Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 76, No. 13, p. 4318-4326.
- Pecson, B.M., Barrios, J-A., Johnson, D.R., Nelson, K.L.** (2006). A Real-Time PCR Method for Quantifying Viable *Ascaris* eggs Using the First Transcribed Spacer Region of Ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 12, p. 7864-7872.
- Rawsthorne, H., Dock, C.N., Jaykus, L.A.** (2009). PCR-Based Method Using Propidium Monoazide To Distinguish Viable from Nonviable *Bacillus subtilis* Spores. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No. 9, p. 2936-2939.
- Rousselon, N., Delgenes, J.-P., Godon, J.-J.,** (2004). A new real time PCR (TaqMans PCR) system for detection of the 16S rDNA gene associated with fecal bacteria. *J. Microbiol. Methods* 59, 15–22.
- Rowan, N.J.,** (2004). Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? *Trends Food Sci. Technol.* 15, 462–467.
- Sanz, J.L. and Köchling, T.** (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview. *Process Biochemistry* 42, 119-133.
- Straub, T.M., Pepper, I.L., Abbaszadegan, M., Gerba, C.P.** (1994). A Method To Detect Enteroviruses in Sewage Sludge-Amended Soil Using the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, No. 3, p. 1014-1017
- 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*, Vol. 77, No. 13, p. 4329-4335.
- Van Frankenhuyzen, J.K., Trevors, J.T., Lee, H., Flemming, C.A., Habash, M.B.** (2011). Molecular pathogen detection in biosolids with focus on quantitative PCR using propidium monoazide for viable cell enumeration. *Journal of Microbiological Methods* Vol. 87, No. 3, p. 263-272.
- Viau, E. and Peccia, J.** (2009). Evaluation of the enterococci indicator in biosolids using cultura-based and quantitative PCR assays. *Water Research* 43, 4878-4887.
- Wagner, A.O., Malin, C., Knapp, A., Illmer, P.** (2008). Removal of Free Extracellular DNA from Environmental Samples by Ethidium Monoazide and Propidium Monoazide. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 74, No. 8, p. 2537-2539.
- Wéry, N., Pourcher, A.M., Stan, V., Delgenes, J.P., Picard-Bonnaud, F., Godon, J.J.,** (2006). Survival of *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecium* in sludge evaluated by real-time PCR and culture methods. *Letters of Applied Microbiology*. 43, 131–136.
- Wéry, N. Lhoutellier, C., Ducray, F. Delgenès, J.P., Godon, J.J.** (2008). Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Research* 42, 53-62.
- Wolf, S., Hewitt, J., Greening, G.E.** (2010). Viral Multiplex Quantitative PCR Assays for Tracking Sources of Fecal Contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 76, No. 5, p. 1388-1394.

## ANEXO V

## ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DAM: TABLAS COMPLEMENTARIAS

Tabla A-2. Valores de pH, alcalinidades y relación  $\alpha$  durante la operación del digestor D-1

Fecha	Día	pH	Alcalinidad 5.75	Alcalinidad 4.3	$\alpha$	Fecha	Día	pH	Alcalinidad 5.75	Alcalinidad 4.3	$\alpha$
09-Mar-11	0	7.26	880	5200	0.17	08-Abr-11	30	7.50	1240	4200	0.30
10-Mar-11	1	7.47	720	2720	0.26	09-Abr-11	31	7.48	1160	3640	0.32
11-Mar-11	2	7.25	760	2440	0.31	10-Abr-11	32	7.52	1200	3680	0.33
12-Mar-11	3	7.20	520	2400	0.22	11-Abr-11	33	7.58	1360	3280	0.41
13-Mar-11	4	7.07	640	2280	0.28	12-Abr-11	34	7.58	1480	4160	0.36
14-Mar-11	5	7.34	900	2900	0.31	13-Abr-11	35	7.43	1280	3200	0.40
15-Mar-11	6	7.15	1000	6800	0.15	14-Abr-11	36	7.38	1200	2360	0.51
16-Mar-11	7	7.10	680	2360	0.29	15-Abr-11	37	7.42	1400	3200	0.44
17-Mar-11	8	7.12	680	2240	0.30	16-Abr-11	38	7.44	1400	3920	0.36
18-Mar-11	9	7.23	840	2920	0.29	17-Abr-11	39	7.50	1440	3480	0.41
19-Mar-11	10	7.28	760	2320	0.33	18-Abr-11	40	7.47	1400	2600	0.54
20-Mar-11	11	7.13	680	2400	0.28	19-Abr-11	41	7.47	1440	3400	0.42
21-Mar-11	12	7.07	800	2480	0.32	20-Abr-11	42	7.48	1560	2880	0.54
22-Mar-11	13	6.99	680	2920	0.23	21-Abr-11	43	7.50	1680	3600	0.47
23-Mar-11	14	7.02	680	2160	0.31	22-Abr-11	44	7.50	1560	3680	0.42
24-Mar-11	15	7.00	680	2600	0.26	23-Abr-11	45	7.45	1680	4040	0.42
25-Mar-11	16	6.98	720	2480	0.29	24-Abr-11	46	7.48	1800	4000	0.45
26-Mar-11	17	7.35	840	2520	0.33	25-Abr-11	47	7.54	1960	4440	0.44
27-Mar-11	18	7.15	760	2480	0.31	26-Abr-11	48	7.54	1960	4480	0.44
28-Mar-11	19	7.04	680	2440	0.28	27-Abr-11	49	7.53	1880	3480	0.54
29-Mar-11	20	7.07	760	2520	0.30	28-Abr-11	50	7.52	2000	4400	0.45
30-Mar-11	21	7.30	800	2400	0.33	29-Abr-11	51	7.47	2080	4480	0.46
31-Mar-11	22	7.40	1040	2560	0.41	30-Abr-11	52	7.50	2120	4400	0.48
01-Abr-11	23	7.52	1800	4700	0.38	01-May-11	53	7.49	2080	4600	0.45
02-Abr-11	24	7.63	1040	2560	0.41	02-May-11	54	7.52	2440	4720	0.52
03-Abr-11	25	7.46	1240	2680	0.46	03-May-11	55	7.51	2200	4600	0.48
04-Abr-11	26	7.53	1360	4200	0.32	04-May-11	56	7.48	2120	4400	0.48
05-Abr-11	27	7.50	1560	3320	0.47	05-May-11	57	7.51	2080	4320	0.48
06-Abr-11	28	7.49	1280	3200	0.40	06-May-11	58	7.53	2120	4440	0.48
07-Abr-11	29	7.51	1200	4280	0.28						

Fecha	Día	pH	Alcalinidad 5.75	Alcalinidad 4.3	$\alpha$	Fecha	Día	pH	Alcalinidad 5.75	Alcalinidad 4.3	$\alpha$
07-Feb-11	0	7.73	880	2040	0.43	24-Mar-11	45	7.39	2240	4200	0.53
08-Feb-11	1	7.45	1160	3360	0.35	25-Mar-11	46	7.46	2240	4320	0.52
09-Feb-11	2	7.50	1040	2240	0.46	26-Mar-11	47	7.52	2320	4240	0.55
10-Feb-11	3	7.47	1080	2320	0.47	27-Mar-11	48	7.54	2360	4240	0.56
11-Feb-11	4	7.73	1560	3160	0.49	28-Mar-11	49	7.48	2240	4040	0.55
12-Feb-11	5	7.34	1440	3320	0.43	29-Mar-11	50	7.54	2560	4640	0.55
13-Feb-11	6	7.52	1520	3720	0.41	30-Mar-11	51	7.61	2440	4560	0.54
14-Feb-11	7	7.42	1680	4320	0.39	31-Mar-11	52	7.63	2360	4720	0.50
15-Feb-11	8	7.35	2120	6560	0.32	01-Abr-11	53	7.62	2240	3920	0.57
16-Feb-11	9	7.33	1680	4400	0.38	02-Abr-11	54	7.59	2480	4120	0.60
17-Feb-11	10	7.40	1760	4440	0.40	03-Abr-11	55	7.47	2240	3960	0.57
18-Feb-11	11	7.37	1800	4640	0.39	04-Abr-11	56	7.53	2440	4080	0.60
19-Feb-11	12	7.38	1680	5120	0.33	05-Abr-11	57	7.58	2360	4400	0.54
20-Feb-11	13	7.45	1800	4880	0.37	06-Abr-11	58	7.40	2240	4080	0.55
21-Feb-11	14	7.41	1800	3840	0.47	07-Abr-11	59	7.59	2320	4080	0.57
22-Feb-11	15	7.47	1760	5000	0.35	08-Abr-11	60	7.60	2440	4320	0.56
23-Feb-11	16	7.23	1520	4280	0.36	09-Abr-11	61	7.51	2480	4280	0.58
24-Feb-11	17	7.53	2080	5360	0.39	10-Abr-11	62	7.57	2480	4440	0.56
25-Feb-11	18	7.56	2200	5680	0.39	11-Abr-11	63	7.56	2600	4480	0.58
26-Feb-11	19	7.69	2800	6000	0.47	12-Abr-11	64	7.59	2520	3920	0.64
27-Feb-11	20	7.60	2120	6000	0.35	13-Abr-11	65	7.61	2520	4320	0.58
28-Feb-11	21	7.58	2280	4200	0.54	14-Abr-11	66	7.59	2480	4080	0.61
01-Mar-11	22	7.73	2280	4200	0.54	15-Abr-11	67	7.60	2440	4040	0.60
02-Mar-11	23	7.69	2240	4200	0.53	16-Abr-11	68	7.53	2560	4120	0.62
03-Mar-11	24	7.67	2360	4320	0.55	17-Abr-11	69	7.57	2480	4440	0.56
04-Mar-11	25	7.90	2160	4720	0.46	18-Abr-11	70	7.58	2720	4200	0.65
05-Mar-11	26	7.66	2560	4480	0.57	19-Abr-11	71	7.60	2680	4280	0.63
06-Mar-11	27	7.70	2480	4560	0.54	20-Abr-11	72	7.53	2600	4360	0.60
07-Mar-11	28	7.69	2600	4640	0.56	21-Abr-11	73	7.59	2520	4320	0.58
08-Mar-11	29	7.68	2440	4320	0.56	22-Abr-11	74	7.55	2600	4400	0.59
09-Mar-11	30	7.59	2480	4360	0.57	23-Abr-11	75	7.57	2920	5600	0.52
10-Mar-11	31	7.81	2520	4880	0.52	24-Abr-11	76	7.62	2800	4480	0.63
11-Mar-11	32	7.71	2480	4520	0.55	25-Abr-11	77	7.77	3120	5720	0.55
12-Mar-11	33	7.56	2240	4280	0.52	26-Abr-11	78	7.63	2920	5120	0.57
13-Mar-11	34	7.60	2440	4840	0.50	27-Abr-11	79	7.61	3000	5200	0.58
14-Mar-11	35	7.86	2520	5080	0.50	28-Abr-11	80	7.65	2960	5280	0.56
15-Mar-11	36	7.61	2560	4280	0.60	29-Abr-11	81	7.59	3040	5280	0.58
16-Mar-11	37	7.49	2240	4280	0.52	30-Abr-11	82	7.61	3000	5600	0.54
17-Mar-11	38	7.56	2360	4600	0.51	01-May-11	83	7.60	2960	5800	0.51
18-Mar-11	39	7.64	2440	4680	0.52	02-May-11	84	7.63	3120	6040	0.52
19-Mar-11	40	7.89	2320	4200	0.55	03-May-11	85	7.65	3080	5920	0.52
20-Mar-11	41	7.53	2280	4040	0.56	04-May-11	86	7.60	2920	5200	0.56
21-Mar-11	42	7.45	2480	4440	0.56	05-May-11	87	7.64	3080	5720	0.54
22-Mar-11	43	7.52	2040	3680	0.55	06-May-11	88	7.68	3040	5680	0.54

Tabla A-3. Valores de pH, alcalinidades y relación  $\alpha$  durante la operación del digestor D-II

Tabla A-4. Valores de pH, alcalinidades y relación  $\alpha$  durante la operación del digestor D-III

Fecha	Día	pH	Alcalinidad 5.75	Alcalinidad 4.3	$\alpha$	Fecha	Día	pH	Alcalinidad 5.75	Alcalinidad 4.3	$\alpha$
09-Mar-11	0	7.02	680	4120	0.17	08-Abr-11	30	7.35	1160	4400	0.26
10-Mar-11	1	7.14	600	2440	0.25	09-Abr-11	31	7.33	1240	4160	0.30
11-Mar-11	2	6.94	600	2400	0.25	10-Abr-11	32	7.40	1280	4240	0.30
12-Mar-11	3	6.93	450	2000	0.23	11-Abr-11	33	7.45	1280	3520	0.36
13-Mar-11	4	6.81	450	1950	0.23	12-Abr-11	34	7.39	1360	4320	0.31
14-Mar-11	5	6.96	400	1920	0.21	13-Abr-11	35	7.42	1240	3120	0.40
15-Mar-11	6	6.95	480	2440	0.20	14-Abr-11	36	7.39	1160	2560	0.45
16-Mar-11	7	6.74	400	2120	0.19	15-Abr-11	37	7.40	1320	2800	0.47
17-Mar-11	8	6.77	600	2080	0.29	16-Abr-11	38	7.32	1400	3480	0.40
18-Mar-11	9	6.76	440	2080	0.21	17-Abr-11	39	7.45	1400	3040	0.46
19-Mar-11	10	6.92	520	2120	0.25	18-Abr-11	40	7.47	1440	2960	0.49
20-Mar-11	11	6.78	480	2280	0.21	19-Abr-11	41	7.44	1360	2760	0.49
21-Mar-11	12	6.70	480	2200	0.22	20-Abr-11	42	7.43	1440	2760	0.52
22-Mar-11	13	6.64	440	2200	0.20	21-Abr-11	43	7.52	1440	2880	0.50
23-Mar-11	14	6.72	440	2240	0.20	22-Abr-11	44	7.45	1520	3200	0.48
24-Mar-11	15	6.70	400	2160	0.19	23-Abr-11	45	7.45	1640	3640	0.45
25-Mar-11	16	6.66	480	2320	0.21	24-Abr-11	46	7.48	1680	3520	0.48
26-Mar-11	17	6.91	560	2240	0.25	25-Abr-11	47	7.50	1680	3360	0.50
27-Mar-11	18	6.93	520	2280	0.23	26-Abr-11	48	7.52	1640	3440	0.48
28-Mar-11	19	7.04	640	3000	0.21	27-Abr-11	49	7.49	1760	3560	0.49
29-Mar-11	20	6.96	640	2960	0.22	28-Abr-11	50	7.50	2000	3640	0.55
30-Mar-11	21	7.00	720	2920	0.25	29-Abr-11	51	7.47	2120	4600	0.46
31-Mar-11	22	7.49	1120	2840	0.39	30-Abr-11	52	7.39	2080	4520	0.46
01-Abr-11	23	7.32	1040	2480	0.42	01-May-11	53	7.43	2200	4420	0.50
02-Abr-11	24	7.35	1120	2680	0.42	02-May-11	54	7.39	2400	4960	0.48
03-Abr-11	25	7.30	1120	2760	0.41	03-May-11	55	7.40	2020	4720	0.43
04-Abr-11	26	7.35	1160	2680	0.43	04-May-11	56	7.23	1760	4120	0.43
05-Abr-11	27	7.42	1280	3400	0.38	05-May-11	57	7.33	2000	4400	0.45
06-Abr-11	28	7.30	1000	2640	0.38	06-May-11	58	7.50	1920	4200	0.46
07-Abr-11	29	7.34	1120	4520	0.25						



**Tabla A-5. Valores de Sólidos Totales (ST), Sólidos Totales Volátiles (STV) y Sólidos Totales Fijos (STF) en el Digestor D-I**

Fecha	Día	STT (mg/L)	STV (mg/L)	STF (mg/L)	% STF	% STV
10-Mar-11	1	13050.00	8923.33	4126.67	31.62	68.38
12-Mar-11	3	15780.00	11165.00	4615.00	29.25	70.75
14-Mar-11	5	16005.00	10870.00	5135.00	32.08	67.92
16-Mar-11	7	14596.67	10920.00	3676.67	25.19	74.81
18-Mar-11	9	16575.00	11565.00	5010.00	30.23	69.77
21-Mar-11	12	15725.00	12090.00	3635.00	23.12	76.88
25-Mar-11	16	14950.00	11223.33	3726.67	24.93	75.07
01-Abr-11	23	16393.33	10890.00	5503.33	33.57	66.43
05-Abr-11	27	17920.00	13610.00	4310.00	24.05	75.95
13-Abr-11	35	28913.33	21526.67	7386.67	25.55	74.45
20-Abr-11	42	23756.67	17143.33	6613.33	27.84	72.16
25-Abr-11	47	19666.67	14283.33	5383.33	27.37	72.63
02-May-11	54	53800.00	37150.00	16650.00	30.95	69.05

**Tabla A-6. Valores de Sólidos Totales (ST), Sólidos Totales Volátiles (STV) y Sólidos Totales Fijos (STF) en el Digestor D-III**

Fecha	Día	STT (mg/L)	STV (mg/L)	STF (mg/L)	% STF	% STV
10-Mar-11	1	18790.00	14393.33	4396.67	23.40	76.60
12-Mar-11	3	21096.67	15560.00	5536.67	26.24	73.76
14-Mar-11	5	13850.00	10846.67	3003.33	21.68	78.32
16-Mar-11	7	16113.33	12760.00	3353.33	20.81	79.19
18-Mar-11	9	16083.33	12803.33	3280.00	20.39	79.61
21-Mar-11	12	16555.00	12920.00	3635.00	21.96	78.04
25-Mar-11	16	14496.67	11446.67	3050.00	21.04	78.96
01-Abr-11	23	15533.33	12146.67	3386.67	21.80	78.20
05-Abr-11	27	17206.67	13293.33	3913.33	22.74	77.26
13-Abr-11	35	23273.33	14553.33	8720.00	37.47	62.53
20-Abr-11	42	17206.67	13293.33	3913.33	22.74	77.26
25-Abr-11	47	20876.67	16273.33	4603.33	22.05	77.95
02-May-11	54	25136.67	17166.67	7970.00	31.71	68.29

Tabla A-7. Valores de Sólidos Totales (ST), Sólidos Totales Volátiles (STV) y Sólidos Totales Fijos (STF) en el Digestor D-II

Fecha	Día	STT (mg/L)	STV (mg/L)	STF (mg/L)	% STF	% STV
07-Feb-11	0	37750.00	24705.00	13045.00	34.56	65.44
09-Feb-11	2	18470.00	14850.00	3620.00	19.60	80.40
11-Feb-11	4	18333.33	15436.67	2896.67	15.80	84.20
13-Feb-11	6	20323.33	16666.67	3656.67	17.99	82.01
17-Feb-11	10	28230.00	18610.00	9620.00	34.08	65.92
19-Feb-11	12	32530.00	21505.00	11025.00	33.89	66.11
20-Feb-11	13	23940.00	16810.00	7130.00	29.78	70.22
22-Feb-11	15	28785.00	20950.00	7835.00	27.22	72.78
24-Feb-11	17	28500.00	18193.33	10306.67	36.16	63.84
26-Feb-11	19	24970.00	16726.67	8243.33	33.01	66.99
01-Mar-11	22	20023.33	15830.00	4193.33	20.94	79.06
04-Mar-11	25	25735.00	17230.00	8505.00	33.05	66.95
05-Mar-11	26	20610.00	16126.67	4483.33	21.75	78.25
07-Mar-11	28	20160.00	15176.67	4983.33	24.72	75.28
10-Mar-11	31	16835.00	11285.00	5550.00	32.97	67.03
12-Mar-11	33	16536.67	13140.00	3396.67	20.54	79.46
14-Mar-11	35	19635.00	13375.00	6260.00	31.88	68.12
16-Mar-11	37	20563.33	15326.67	5236.67	25.47	74.53
18-Mar-11	39	20840.00	15100.00	5740.00	27.54	72.46
21-Mar-11	42	21075.00	15620.00	5455.00	25.88	74.12
22-Mar-11	43	23770.00	16006.67	7763.33	32.66	67.34
25-Mar-11	46	21443.33	15843.33	5600.00	26.12	73.88
30-Mar-11	51	23223.33	16030.00	7193.33	30.97	69.03
02-Abr-11	54	32320.00	22045.00	10275.00	31.79	68.21
05-Abr-11	57	23756.67	17143.33	6613.33	27.84	72.16
11-Abr-11	63	22355.00	17300.00	5055.00	22.61	77.39
13-Abr-11	65	23726.67	17763.33	5963.33	25.13	74.87
16-Abr-11	68	21976.67	16876.67	5100.00	23.21	76.79
18-Abr-11	70	23116.67	18003.33	5113.33	22.12	77.88
20-Abr-11	72	24646.67	19030.00	5616.67	22.79	77.21
23-Abr-11	75	35116.67	27273.33	7843.33	22.34	77.66
25-Abr-11	77	32363.33	25323.33	7040.00	21.75	78.25
27-Abr-11	79	34530.00	26473.33	8056.67	23.33	76.67
29-Abr-11	81	35296.67	26350.00	8946.67	25.35	74.65
02-May-11	84	34453.33	26496.67	7956.67	23.09	76.91

## ANEXO VI

### TABLA PARA CALCULAR EL NMP

Tabla A-8. Número Más Probable para series de tres tubos con 0.1, 0.01 y 0.001 g de inóculo cada uno (NMP/g) del *Bacteriological Analytical Manual (BAM)* de la *Food and Drugs Administration (FDA)*, EE.UU.

Table 1. For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.											
Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

## REFERENCIAS

- Aitken**, M.D., Sobsey, M.D., Blauth, K.E., Shehee, M., Crunk, P.L., Walters, G.W. (2005). Inactivation of *Ascaris suum* and Poliovirus in Biosolids under Thermophilic Anaerobic Digestion Conditions. *Environmental Science Technology* 39, 5804-5809.
- APHA** (American Public Health Association) (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th Edition. 1.134 pp
- Appels**, L., Degreève, J., Van der Bruggen, B., Van Impe, J., Dewil, R. (2010). Influence of low temperature thermal pre-treatment on sludge solubilisation, heavy metal release and anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 101, 5743-5748.
- Arthurson**, V. (2008). Proper Sanitization of Sewage Sludge: a Critical Issue for a Sustainable Society. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, No. 17, p. 5267-5275.
- Bae**, S. and Wuertz, S. (2009). Discrimination of Viable and Dead Fecal Bacteroidales Bacteria by Quantitative PCR with Propidium Monoazide. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No.9, p. 2940-2944.
- Bagge**, E., Sahlström, L., Albiñ, A. (2005). The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Research* 39, 4879-4886.
- Barjenbruch**, M., Kopplow, O., (2003). *Enzymatic*, mechanical and thermal pre-treatment of surplus sludge. *Advances in Environmental Research* 7, p. 715–720
- Blackburn**, C. de W., Curtis, L.M., Humpheson, L., Billon, C., McClure, P.J. (1997). Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *International Journal of Food Microbiology* 38, 31-44.
- Bougrier**, C., Delgenés, J.P., Carrère, H., (2006). Combination of Thermal Treatments and Anaerobic Digestion to Reduce Sewage Sludge Quantity and Improve Biogas Yield. *Institution of Chemical Engineers Trans IChemE, Part B, Process Safety And Environmental Protection*, 84(B4): 280-284.
- Bougrier**, C., Albasi, C., Delgenés, J.P., Carrère, H., (2006). Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability. *Chemical Engineering and Processing* 45 p. 711–718
- Bougrier**, C., Delgenés, J.P., Carrère, H., (2007). Impacts of thermal pre-treatments on the semi-continuous anaerobic digestion of waste activated sludge. *Biochemical Engineering Journal* 34 p. 20–27
- Bougrier**, C., Delgenés, J.P., Carrère, H., (2008). Effects of thermal treatments on five different waste activated sludge samples solubilisation, physical properties and anaerobic digestion. *Chemical Engineering Journal* 139 p. 236–244
- Camacho**, A., M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez., (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México. “Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple (Número más Probable o NMP)”. “Métodos para la determinación de *Salmonella* spp., en alimentos”.

**Carrington, E.G.** (2001) Evaluation of Sludge Treatments for Pathogen Reduction – Final Report. Study Contract No B4-3040/2001/322179/MAR/A2 for the European Commission Directorate-General Environment.

**Carrere, H., Dumas, C., Battimelli, A., Batstone, D.J., Delgenes, J.P., Steyer, J.P., Ferrer, I.** (2010). Pretreatment Methods to Improve Sludge Anaerobic Degradability: A Review. *Journal of Hazardous Materials* 185 1-15.

**Castrejón, A., Barrios, J.A., Jiménez, B., Maya, C., Rodríguez, A., González, A.** (2002). Evaluación de la calidad de Lodos Residuales de México. *Memorias, XIII Congreso Nacional. 2002 FEMISCA*, p. 15-34.

**Chen, Min** (1987). Difference in Sporogenous Bacterial Populations in Thermophilic (55°C) and Mesophilic (35°C) Anaerobic Sewage Digestion. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 53, No. 10, p. 2414-2419

**Chen, Y.C., Adams, G., Erdal, Z., Forbes, R.H., Hargreaves, R., Higgins, M.J., Murthy, S.N., Novak, J.T., Witherspoon, J., Toffey, W.E.**, (2007). The effect of aluminum sulfate addition during condition on production of volatile organic sulfur compounds from anaerobically digested biosolids. *Water Practice* 1 (4) 1e13 (13).

**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(8), p. 2616-2626

**Chen Yan, Bo Fu, Yan Wang, Qian Jiang, He Liu** (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.

**Clement, M., Ferrer, I., Baeza, M. de M., Artola, A., Vázquez, F., Font, X.** (2007). Effects of Thermal and Mechanical Pretreatments of Secondary Sludge on Biogas Production Under Thermophilic Conditions. *Chemical Engineering Journal* 133, 335-342.

**Coelho, N.M.G., Droste, R., Kennedy, K.** (2011). Evaluation of continuous mesophilic, thermophilic and temperatura phased anaerobic digestion of microwaved activated sludge. *Water Research* 45, 2822-2834.

**Cota-Espéricueta, A.D, Ponce-Corral, C.** (2008). Eliminación de Bacterias Patógenas en Lodos Residuales Durante el Secado Solar. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* Vol. 24, No.4, 161-170.

**Dentel, S.K., Qi, Y.N., Herson, D.S.**, (2007). Improving the assessment of risk from pathogens in biosolids: fecal coliform regrowth, survival, enumeration and assessment. In *Proceedings Moving Forward Wastewater Biosolids Sustainability. Technical, Managerial, and Public Synergy, IWA Specialist Conference, June 25–27, p.635.640. Moncton, Canada.*

**Dhar, B. R., Nakhla, G., Ray, M. B.** (2012). Techno-economic evaluation of ultrasound and thermal pretreatments for enhanced anaerobic digestion of municipal waste activated sludge. *Waste Management* 32, 542-549.

**DOF**, (1995-a) Norma Oficial Mexicana **NOM-110-SSA1-1994**, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

**DOF**, (1995-b) Norma Oficial Mexicana **NOM-112-SSA1-1994**, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.

**DOF**, (2003) Norma Oficial Mexicana **NOM-004-SEMARNAT-2002** Protección ambiental.- Lodos y Biosólidos. -especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final.

- Donoso-Bravo, A., Pérez-Elvira, S.I., Fernández-Polanco, F. (2010).** Application of simplified models for anaerobic biodegradability tests. Evaluation of pre-treatment processes. *Chemical engineering Journal* 160 607-614.
- Donoso-Bravo, A., Pérez-Elvira, S.I., Aymerich, E., Fdz-Polanco, F. (2011).** Assessment of the influence of thermal pre-treatment time on the macromolecular composition and anaerobic digestion biodegradability of sewage sludge. *Bioresource Technology* 102, 660-666.
- FDA, U.S. Food and Drug Administration "Bacteriological Analytical Manual (BAM) (2006) - Appendix 2. Most Probable Number from Serial Dilutions".**
- Foliguet, J.M., Doncoeur, F. (1972)** Inactivation Assays of Enteroviruses and Salmonella in Fresh and Digested Wastewater Sludges by Pasteurization. *Water Research Pergamon Press*, Vol.6, pp.1399-1407.
- Gantzer, C., Gaspard, P., Galvez, L., Huyard, A., Dumouthier, N., Schwartzbrod, J. (2001).** Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge. *Water Research*, Vol. 55, No. 16, pp. 3763-3770.
- Gattie D. K. and Lewis, D. L. (2004).** A High-Level Disinfection Standard for Land-Applied Sewage Sludges (Biosolids). *Environmental Health Perspectives*. Vol. 112, No. 2, 126-131.
- Gavala, H.N., Yenal, U., Skiadas I.V., Westermann P. and Ahring B.K. (2003).** Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of pre-treatment at elevated temperature, *Water research*. Vol. 37. p. 4561-4572.
- Godfree, A., Farrell, J. (2005).** Processes for Managing Pathogens. *Journal of Environmental Quality*. 34:105-113.
- Gómez-Borraz, T.L. (2012)** Microbiota asociada a un bioreactor anaerobio de membrana sumergida. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Higgins, M.J., Chen, Y.C., Murthy, S.N., Hendrickson, D., Farrel, J., Schafer, P. (2007).** Reactivation and growth of non-culturable indicator bacteria in anaerobically digested biosólidos after centrifuge dewatering. *Water Research* 41, 665-673.
- Horáková, K., Mlejnkova H., Mlejnek P. (2008).** Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: cytochrome bd complex, lactose permease, beta-D-glucuronidase, and beta-D-galactosidase. *Journal of Applied Microbiology* 105, (4): 970-976.
- Humpheson, L., Adams, M.R., Anderson, W.A., Cole, M.B., (1998).** Biphasic Thermal Inactivation Kinetics in *Salmonella enteritidis* PT4. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 64, No. 2, p. 459-464.
- 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), 1005-1012.
- Iranpour, R. and Cox, H.H.J. (2007a).** On the Way To Sustainability: Use of Biosolids in Land Application. Presented at Poster Session PT01 – Organic Solids 11th IWA World congress on Anaerobic Digestion, 23-27 September 2007, Brisbane, Australia.
- Iranpour, R. and Cox, H.H.J. (2007b).** Evaluation of Thermophilic Anaerobic Digestion Processes for Full-Scale Class A Biosolids Disinfection at Hyperion Treatment Plant. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 97, No. 1, p. 19-39.

- Jenkins, M.B., D.D. Bowman, and W.C. Ghiorse.** (1998). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ammonia. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, No. 2, p. 784-788.
- Jenkins, S.R., Armstrong, C.W., Monti, M. M.,** (2007). Health Effect of Biosolids Applied to Land: Available Scientific Evidence. Virginia Department of Health, US. Division of Environmental Epidemiology.
- Kim, J., Park, C., Kim, T., Lee, M., Kim, S., Kim, S and Lee, J.** (2003). Effects of Various Pretreatments For Enhanced Anaerobic Digestion with Waste Activated Sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 95, No. 3, p. 271-275
- Kim, W., Hwang, K., Shin, S.G., Lee, S., Hwang, S.** (2010). Effect of high temperature on bacterial community dynamics in anaerobic acidogenesis using mesophilic sludge inoculum. *Bioresource Technology* 101, S17-S22.
- Lang, N.L. and Smith, S.R.** (2008) Time and temperature inactivation kinetics of enteric bacteria relevant to sewage sludge treatment processes for agricultural use. *Water Research* 42, 2229-2241.
- Lee, J., & Kaletunc, G.** (2002). Evaluation of the Heat Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by Differential Scanning Calorimetry. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 11, p. 5379-5386.
- Le Jean, G., Abraham, G.,** (1996). Modeling disease transmission and its prevention by disinfection. In: Hurst, C.J. (Ed.), *Manual of Environmental Microbiology*. American Society of Microbiology, Washington.
- Lu, J., Gavala H.N., Skiadas, I., Mladenovska, Z., Ahring, B.** (2007). Improving anaerobic sewage sludge digestion by implementation of a hyper-thermophilic prehydrolysis step. *Journal of Environmental Management*, Vol. 88, No. 4, p. 881-889.
- Mackey, B.M., Miles, C.A., Parsons, S.E., Seymour, D.A.,** (1991). Thermal denaturation of whole cells and cell components of *Escherichia coli* examined by differential scanning calorimetry. *Journal of General Microbiology*, 137, p. 2361-2374.
- 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.
- McCabe, E.M., Burgess, C.M., Walsh, D., O'Regan, E., McGuinness, S., Barry, T. Fanning, S., Duffy, G.** (2011b). Development and evaluation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the *hilA* gene of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*. *Food Microbiology*, Vol. 28, No. 3, p. 447-456.
- Mocé-Llivina, L., Muniesca, M., Pimienta-Vale, H., Lucena, F., Jofre, J.** (2003) Survival of Bacterial Indicator Species and Bacteriophages after Thermal Treatment of Sludge and Sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 3, p. 1452-1456.
- Müller, J.A** (2001). Prospects and problems of sludge pre-treatment processes. *Water Science and Technology*. Vol 44 N°10, p. 121-128
- Nappier, S.P., Aitken, M.D., Sobsey, M.D.** (2006). Male-Specific Coliphages as Indicators of Thermal Inactivation of Pathogens in Biosolids. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72, No.4, p. 2471-2475.
- Neyens, E., Baeyens, J.,** (2003). A review of thermal sludge pre-treatment processes to improve dewaterability. *Journal of Hazardous Materials*. 5, 375-398.
- Nimmermark, S.** (2004). Odour influence on well-being and health with specific focus on animal production emissions. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 11, 163-173.

- Nocker, A.,** Cheung, C.Y., Camper, A.K., (2006a). 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.
- Nocker, A.,** Camper, A.K., (2006b). Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1997–2004.
- Novak, J.T.,** Adams, G., Chen, Y., Erdal, Z., Forbe, R.H., Glindemann, D., Hargreaves, J.R., Hentz, L., Higgins, M.J., Murthy, S.N., Witherspoon, J., (2006). Generation pattern of sulfur containing gases from anaerobically digested sludge cakes. *Water Environment Research* 78 (8), 821e827.
- Noyola, A.** (1994). “Diseño, Inoculación y Arranque de Reactores UASB” Memorias del tercer taller y seminario latinoamericano “Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales”. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. pp. 331-340.
- 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.
- Pérez-Elvira, S.I.,** Nieto-Diez, P., Fdz-Polanco, F., (2006). Sludge minimisation technologies. *Rev. Environmental Science and Biotechnology*. 5, 375–398.
- Pérez-Elvira, S.I.,** Fdz-Polanco, M., Fdz-Polanco, F., (2010). Enhancement of the Conventional Anaerobic Digestion of Sludge. Memorias del 12º Congreso Internacional de Digestión Anaerobia AD12, Guadalajara, Jalisco. México.
- Pind, P.F.,** Angelidaki, I., Ahring, B.K., Stamatelatou, K., Lyberatos, G., (2003). Monitoring and controlling of anaerobic reactors. *Advance Biochemical Biotechnology* 82, 135–182.
- Piterina, A.V.,** Barlett, J., Pembroke, T.J. (2010). Evaluation of the Removal of Indicator Bacteria from Domestic Sludge Processed by Autothermal Thermophilic Aerobic Digestion (ATAD). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, p. 3422-3441.
- Prabhakar, R.P.,** Mohamed, F.D., Rao, S. (1997). Effects of different biosolids treatment systems on pathogen and pathogen indicator reduction. *Water Environment Research*. Vol. 69, No.7, 1195-1206.
- 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.,** Dentel, S.K., Herson, D.S. (2008). Effect of total solids on fecal coliform regrowth in anaerobically digested biosolids. *Water Research* 42, 3817-3825
- Rhomdhana, M.H.,** Lecomte, D., Ladevie, B., Sablayrolles, C. (2009). Monitoring of pathogenic microorganisms contamination during heat drying process of sewage sludge. *Process Safety and Environmental Protection* 87, 377-386.
- Riau, V.,** De la Rubia, M.A., Pérez, M. (2010). Temperature-phased anaerobic digestión (TPAD) to obtain Class A biosolids: A semi-continuous study. *Bioresource Technology* 101, 2706-2712.
- Rojas, M.,** Cabirol N., Ortega, S., Ortiz, L.P and Noyola, A. (2001). Removal of fecal indicator organisms and parasites (fecal coliforms and helminth eggs) from municipal biologic sludge by anaerobic mesophilic and thermophilic digestion. *Water Science and Technology*. Vol 44, p. 97-101.
- Rubio-Loza, L.A.,** (2004). Producción de biosólidos de clase “A” mediante digestión anaerobia en dos fases a partir de lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. Universidad Nacional Autónoma de México.



- 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.
- Sahlström, L., Baggie, E., Emmoth, E., Holmqvist, A., Danielsson-Tham, M.L., Albiñ, A. (2008).** A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. *Bioresource Technology* 99, 7859-7865.
- Sanin, F.D., Vesilind, P.A., Martel, J. (1994).** Pathogen Reduction Capabilities of Freeze/Thaw Sludge Conditioning. *Water Research* Vol. 28 No. 11, pp. 2393-2398.
- Schiffman, S.S. and Williams, C.M. (2005).** Science of odor as a potential health issue. *Journal of Environmental Quality* 34, 129-138
- Sidhu, J., Toze, S. (2009).** Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environment International* 35, 187-201.
- Silva, F.V.M., & Gibbs, P.A. (2012).** Thermal pasteurization requirements for the inactivation of Salmonella in foods, *Food Research International*, Volume 45, Issue 2, p. 695–699
- Skillman, L.C., Bajsa, O., Ho, L., Santhanam, B., Kumar, M., Ho, G. (2009).** Influence of high gas production during thermophilic anaerobic digestion in pilot-scale and lab-scale reactors on survival of the thermotolerant pathogens *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* in piggy wastewater. *Water Research* 43, 3281-3291
- 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.
- Smith, S.R. (2008).** The Implications for Human Health and Environment of Recycling Biosolids on Agricultural Land. Centre for Environmental Control and Waste Management Department of Civil and Environmental Engineering. Imperial College London. South Kensington Campus, London SW7 2AZ.
- Soares, H.M., Cárdenas, B., Weir, D., Switzenbaum, M.S. (1995).** Evaluating Pathogen Regrowth in Biosolids Compost. *BioCycle* Vol. 36, No. 6, p. 70-76.
- Stuckey, D.C., McCarty P.L. (1984).** The effect of thermal pre-treatment on the anaerobic biodegradability and toxicity of waste activated sludge, *Water Research* 18, 1343–1353.
- Tchobanoglous, G.; Theisen, H. y Vigil, S. (1994).** Gestión integral de residuos sólidos. McGraw-Hill: Madrid.
- Tomasini-Ortíz, A.C. (2007).** Muestreo y Preservación para Coliformes Fecales y Huevos de Helminto. Serie Autodidáctica para la Medición de la Calidad del Agua. Comisión Nacional del Agua, CNA e Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, IMTA. ISBN 968-7417-85-4
- Torres, P., Madera, C., Silva, J. (2009).** Mejoramiento de la calidad microbiológica de biosólidos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas. *Revista EIA. Escuela de Ingeniería de Antioquía*, Número 11, p. 21-37.
- US EPA (2003)** 40 CFR Part 503 Regulation – Environmental Regulations and Technology - Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge (Including Domestic Septage).
- US EPA (1979).** Process design manual for sludge treatment and disposal. Report No.: EPA/625/1-79/001. Cincinnati, OH: Water Engineering Research Laboratory and Center for Environmental Research Information.

- Uma-Rani, R., Adish Kumar, S., Kaliappan, S., Yeom, I.T., Rajesh Banu, J. (2012).** Low temperature thermo-chemical pretreatment of dairy waste activated sludge for anaerobic digestion process. *Bioresource Technology* 103, 415-424.
- Való, A., Carrére, H. and Delgenés, J.P (2004).** Thermal, chemicals and thermo-chemical pre-treatment of waste activated sludge for anaerobic digestion. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Vol. 79, p. 1197-1203
- Van Frankenhuyzen, J.K., Trevors, J.T., Lee, H., Flemming, C.A., Habash, M.B. (2011).** Molecular pathogen detection in biosolids with focus on quantitative PCR using propidium monoazide for viable cell enumeration. *Journal of Microbiological Methods* Vol. 87, No. 3, p. 263-272.
- Viau, E., Peccia, J. (2009a).** Evaluation of enterococci indicator in biosolids using culture-based and quantitative PCR assays. *Water Research* 43 (19), 4878.
- Viau, E., Peccia, J. (2009b).** Survey of Wastewater Indicators and Human Pathogen Genomes in Biosolids Produced by Class A and Class B Stabilization Treatments. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 75, No. 1, p. 164-174.
- 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.
- Wang, Q., Noguchi, C., Hara, Y., Sharon, C., Kamimoto, K. and Kato, Y. (1997).** Studies on anaerobic digestion mechanism: Influence of pretreatment temperature on biodegradation of waste activated sludge. *Environmental Technology*. Vol 18. p 999-1008.
- Ward, A. Stensel, H., Ferguson, J., Hummel, S. (1999).** Preventing Growth of Pathogens in Pasteurized Digester Solids. *Water Environmental Research*. 71, 2; 176-182.
- Watanabe, H., Kitamura, T., Ochis, S., Ozaki, M. (1997).** Inactivation of pathogenic bacteria under mesophilic and thermophilic conditions. *Water Science Technology* Vol.36 No.6-7, p.25-32.
- Wéry, N. Lhoutellier, C., Ducray, F. Delgenès, J.P., Godon, J.J. (2008).** Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Research* 42, 53-62.
- Wilson, C.A., Novak, J.T. (2009).** Hydrolysis of macromolecular components of primary and secondary wastewater sludge by thermal hydrolytic pretreatment. *Water Research*, Vol. 43, 18, p. 4489–4498
- Woese C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990).** Hacia un sistema natural de los organismos: propuesta para los dominios Archaea, Bacteria y Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4576-4579. Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana 6180.
- Xuan, Y., Pingfang, H., Xiaoping, L., Yanru, W. (2004).** A review on the dewaterability of bio-sludge and ultrasound pretreatment. *Ultrasonics Sonochemistry* 11, 337-348.
- Yu, Y., Chan, W.I., Liao, P.H., Lo, K.V. (2010).** Disinfection and solubilization of sewage sludge using the microwave enhanced advanced oxidation process. *Journal of Hazardous Materials* 181, 1143-1147.
- Zábranská, J., Dohányos, M., Jenicek, P., Ruziciková, H., Vránová, A. (2003).** Efficiency of autothermal thermophilic aerobic digestion and thermophilic anaerobic digestion of municipal wastewater sludge in removing *Salmonella* spp. and indicator bacteria. *Water Science and Technology* Vol. 47 No. 3, 151-156.

**Zaleski, K.J., Josephson, K.L., Gerba, C.P., Pepper, I.L. (2005a).** Survival, Growth and Regrowth of Enteric Indicator and Pathogenic Bacteria in Biosolids, Compost, Soil and Land Applied Biosolids. *Journal of Residuals Science & Technology*, Vol. 2, No. 1, p. 49-63.

**Zaleski, K.J., Josephson, K.L., Gerba, C.P., Pepper, I.L. (2005b).** Potential regrowth and recolonization of *Salmonellae* and Indicators in Biosolids and Biosolid-Amended Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71, No. 7, p. 3701-3708.

**Ziemba, C., Peccia, J. (2011).** Net energy production with pathogen inactivation during mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research* 45, 4758-4768.