Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

VALORACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DURANTE LA BIODIGESTIÓN, PARA LA EVALUACIÓN DE UNA ESTRATEGIA COMPLEMENTARIA DE GESTIÓN DE EFLUENTES

Por:

Edwin Iván Quiroz Ruiz

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora Diciembre de 2016

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Edwin Iván Quiroz Ruiz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

Dr. Alfonso García Galaz
Director de Tesis

Dr Alfonso Antero Gardea Béjar
Co-director

Dr. Humberto González Ríos
Asesor

M.D.R. Antonio Alberto Ulloa Méndez
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT:
Por el apoyo prestado durante el posgrado y para poder concluir con satisfacción mi maestría mediante el apoyo económico que me brindó.

A CIAD:
En dicha institución encontré grandes personas y grandes instructores que me brindaron todo su apoyo para poder llevar con mayor facilidad todos los objetivos que me plantee a lo largo de la maestría.

Al Proyecto:
Sin el apoyo del proyecto encabezado por el Dr. Alfonso Gardea, debido a que cualquier necesidad que se me presentaba, podía resolverla sin ninguna dificultad.

A la Q.B. Rosalva Pérez Morales por su apoyo para la elaboración del presente trabajo.

Al M.C. José Antonio Orozco Avitia por su apoyo y colaboración para el entrenamiento y manejo del microcalorimetro.

DEDICATORIA

A Dios, virgencita y a mis 4 Ángeles:
Muchas gracias por darme la fuerza para día a día poder tener la convicción y la decisión para no rendirme. Bernarda Ramos Saldaña, Sidroneo Ruiz Madrigal, Pragedis Ruiz Ramos y Miguel Ángel Álvarez Amador, ustedes son el motor y la fuerza que me impulsa diariamente a tratar de seguir adelante, superándome y tratando de ser cada vez mejor en todos los ámbitos en que me desempeño.

A mis padres:
Mi más grande inspiración para luchar y salir adelante a pesar de los inconvenientes que se presentaron y mi apoyo incondicional que fue mi madre Gloria Elvia Ruiz Ramos, así como a mi padre Jesús Enrique Quiroz Acuña por siempre estar cerca de mí.

A mis hermanos:
Las personas que tanto quiero, Paola, Enrique, Kenia y Alexis que siempre de distinta manera pero con la misma admiración estuvieron al pendiente de mi persona, mientras cumplía con cada uno de mis objetivos. Además a Julio Díaz Verdugo por el apoyo incondicional que me brindó fungiendo como parte importante de mi vida y a mi mejor amigo y hermano Samuel Camarillo por siempre estar al pendiente y apoyándome con sus consejos y su amistad incomparable.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....viii
LISTA DE CUADROS.....ix
RESUMEN.....x
ABSTRACT.....xii

I. INTRODUCCIÓN..... 2

II. ANTECEDENTES..... 5
II.1 Biodigestión Anaerobia..... 5
II.1.1 Ventajas y Desventajas de la Biodigestión Anaerobia..... 9
II.1.2 Productos de la biodigestión..... 10
II.2 Biodigestores..... 12
II.2.1 Clasificación..... 12
II.2.2 Factores importantes para el funcionamiento del biodigestor..... 13
II.3 Microrganismos Involucrados en la Biodigestión Anaerobia..... 14
II.3.1 Medición de Coliformes Fecales..... 17
II.4 Método Calorimétrico para Cuantificación de Carga Microbiana..... 18

III. HIPÓTESIS..... 24

IV. OBJETIVOS..... 25
IV.1 Objetivo General..... 25
IV.2 Objetivos Particulares..... 25

V. MATERIALES Y MÉTODOS..... 26
V.1 Biodigestor Modelo..... 26
V.2 Corrida Piloto..... 26
V.3 Minibiodigestor Modelo..... 26
V.4 Bioensayo de Valoración de Carga Microbiológica en Minibiodigestor, Bajo Condiciones Controladas..... 27
V.5 Monitoreo de Temperatura Ambiental..... 28
V.6 Alimentación del Biodigestor..... 28
V.7 Recolección de las Muestras..... 29
V.8 Determinación de Mesófilos Aerobios..... 31
V.9 Determinación de Coliformes Totales y Fecales..... 31
V.10 Microcalorimetría..... 32
V.11 Análisis Estadístico..... 33

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 35
VI.1 Construcción del Biodigestor con Bolsa Complementaria..... 35
VI.2 Evaluación de Coliformes Totales Durante la Corrida Piloto..... 36
VI.3 Muestreo Para la Valoración de Cinética Bacteriana Durante los Procesos de Biodigestión.....38

CONTENIDO (Continuación)

VI.4 Comportamiento de las Temperaturas y Valoración de los Indicadores Sanitarios Bajo Condiciones Controladas 45
VI.5 Microcalorimetría 49

VII. CONCLUSIONES 53

VIII. RECOMENDACIONES 57

IX. BIBLIOGRAFÍA 58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Etapas del proceso de la metanogénesis é é é é é é é é é é é é é .	8
2	Procedimiento Secuencial de la Construcción del sistema biodigestivo .	36
3	Cuentas bacterianas de Coliformes Totales (Log de UFC/mL) durante el proceso de biodigestión, en una prueba piloto é é é é é é é é é é	37
4	Cuentas bacterianas del primer cohorte generacional (Log de UFC/mL)	39
5	Cuentas bacterianas del segundo cohorte generacional (Log de UFC/mL) é .	39
6	Cuentas bacterianas del tercer cohorte generacional (Log de UFC/mL)	40
7	Cuentas bacterianas del cuarto cohorte generacional (Log de UFC/mL)	40
8	Población de mesófilos aerobios (Log UFC/mL) a través del proceso de biodigestión y complementario é é é é é é é é é é é é é é é é	41
9	Población de coliformes totales (Log UFC/mL) a través del proceso de biodigestión y complementario é é é é é é é é é é é é é é é é é ..	42
10	Población de coliformes fecales (Log UFC/mL) a través del proceso de biodigestión y complementario é é é é é é é é é é é é é é é é ...	42
11	Temperaturas máxima y mínima a lo largo de los 4 meses en los que se llevó a cabo la biodigestión y el proceso complementario é é é é ...	46
12	Comparativo de conteos de mesófilos aerobios (Log UFC/mL) durante la biodigestión a temperatura ambiente y controlada é é é é é é é é .	46
13	Comparativo de conteos de coliformes totales (Log UFC/mL) entre la biodigestión a temperatura ambiente y controlada é é é é é é é é é .	47
14	Comparativo de conteos de coliformes fecales (Log UFC/mL) entre la biodigestión a temperatura ambiente y controlada é é é é é é é é é .	47

LISTA DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1	Límites Máximos Permisibles para patógenos y parásitos en lodos y biosólidos é .	15
2	Secuencia, puntos de muestreo y conformación de las generaciones muestreadas é	30
3	Valores de calor metabólico (µwatts / mL) de cada uno de los muestreos é	50
4	Ecuaciones de regresión lineal y coeficientes de determinación entre las mediciones de calor metabólico y población bacteriana de cada uno de los indicadores sanitarios é é é é é é é é é é é é é é é é .	51

RESUMEN

Uno de los objetivos de las ciencias de salud ambiental es limitar la prevalencia de enfermedades infecciosas que se transmiten a través del medio ambiente, por lo tanto es necesario conocer la ocurrencia, nivel, destino, exposición y riesgos de salud asociados con patógenos en agua, suelo y aire. Además a nivel mundial existe la necesidad de disminuir la contaminación ambiental, mediante la generación de energías renovables utilizando materiales orgánicos de desecho, con la finalidad de disminuir la emisión de gases de efecto invernadero, mismos que deterioran la atmosfera. Ante estos problemas ha surgido una revolución en el campo de la biotecnología, en la cual se trabaja continuamente en procesos de tratamiento de residuos por medio de estrategias biológicas, cuyos objetivos están encaminados a la protección del medio ambiente. Dentro de los más utilizados se encuentra el uso de biodigestores, por ser un proceso que conlleva un sistema sustentable, económico y práctico que aporta numerosas ventajas como disminuir, o mejor aún, eliminar el potencial infeccioso de los residuos utilizados. La biodigestión anaerobia es una alternativa muy importante para la conversión de desechos orgánicos contenidos en desechos animales. Mediante este proceso biológico, que en ausencia de oxígeno convierte la materia orgánica en biogás y efluentes, se reduce la carga de microorganismos patógenos que representan un riesgo de salud y que funcionan como indicadores de la carga microbiológica en dicho proceso productivo. Si bien los biodigestores anaerobios son una tecnología comercialmente disponible desde hace algún tiempo, la realidad es que las cargas microbianas de dichos efluentes no son adecuadas para su uso posterior. El objetivo de este trabajo es valorar la carga microbiana del efluente al inicio, durante y al final de los procesos de biodigestión y complementario, mediante técnicas microbiológicas (para mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales) y microcalorimétricas que nos brinden análisis más precisos. El diseño estadístico es un DCA con los tres sitios de muestreo arriba

señalados como tratamientos analizados por ANDEVA ($p<0.05$) para determinar su significancia estadística y una posterior comparación de medias por Tukey ï Kramer. Se obtuvieron diferencias significativas ($p<0.05$) en la reducción al comparar el inicio y el final de todo el proceso para todos los indicadores bacterianos. Se concluyó que la estrategia del proceso complementario a la biodigestión es fundamental para reducir a niveles adecuados para usos posteriores los efluentes generados a lo largo del proceso.

Palabras clave: coliformes totales, coliformes fecales, mesófilos aerobios, biodigestión.

ABSTRACT

One of the goals of environmental health sciences is to limit the prevalence of infectious diseases that are spread through the environment, therefore it is necessary to know the occurrence, level, fate, exposure and health risks associated with pathogens in water, soil and air. Also, there is a need to reduce environmental pollution, through the generation of renewable energy using waste organic materials, in order to reduce emission of greenhouse gases, same that will deteriorate the atmosphere. Due to these problems has emerged a revolution in the biotechnology field, in which continuously work in treatment of waste processes by means of biological strategies are made, whose objectives are aimed to the environmental protection. Within the most commonly used there are bio-digesters, for being a process that entails a sustainable, economical and practical system that provides numerous advantages as decrease, or better still, remove the potential infectious of used waste. The anaerobic biodigestion is an important alternative for the conversion of organic waste contained in animal waste. Through this biological process, which converts organic matter in biogas and effluents in the absence of oxygen, it is reduced the load of pathogenic microorganisms that represent a health risk and that act as indicators of microbiological load in the productive process. While anaerobic bio-digesters are a commercially available technology for some time, the reality is that microbial loads of these effluents are unsuitable for further use. The objective of this work was to assess the microbial load of the effluent to the beginning, during, and at the end of biodigestion and complementary process, using microbiological (for aerobic mesophilic bacteria, total and fecal coliforms) and microcalorimetrical techniques that provide more precise analysis. Statistical design was completely randomized with three sampling sites analyzed by ANOVA ($p<0.05$) to determine statistic differences and a media comparison by Tukey-Kramer. Significant differences ($p<0.05$) were obtained in the reduction when comparing the

beginning and the end of the whole process for all the bacterial indicators. It was concluded that the strategy of the process complementary to the biodigestion is fundamental to reduce to suitable levels for later uses the effluents generated throughout the process.

Keywords: Total coliforms, fecal coliforms, aerobic mesophilic bacteria, biodigestion.

I. INTRODUCCIÓN

En el mundo existe necesidad de disminuir la contaminación ambiental en aire, suelo y agua, por lo que es necesario buscar alternativas amigables con el medio ambiente para disponer de los desechos generados, ejemplo de ello, la generación de energías renovables utilizando materiales orgánicos de desecho, como una alternativa viable para la disminución de contaminantes. Los materiales orgánicos desechados en un proceso productivo, pueden ser utilizados en un nuevo proceso biológico para la producción de biogás, sustancias mejoradoras de suelos agrícolas y biofertilizantes.

Un tratamiento apropiado de los materiales orgánicos de desecho coadyuva con la reducción de emisiones de gases generadores de efecto invernadero. Los desechos orgánicos generados particularmente por el sector agropecuario son de suma importancia debido a que son emisores de metano, óxido nitroso y dióxido de carbono; tres componentes importantes, responsables del deterioro de la capa de ozono atmosférica.

Por lo que el impacto ambiental ocasionado por los desechos orgánicos ha impulsado una revolución en el campo de la biotecnología, que busca aportar procesos biológicos para el tratamiento de residuos, encaminados a la protección del medio ambiente.

Dentro de estos procesos, uno de los más utilizados es la biodigestión, un proceso que conlleva un sistema sustentable, económico y práctico que aporta numerosas ventajas como disminuir, o mejor aún, eliminar el potencial infeccioso de los residuos orgánicos tratados (SEMARNAT, 2006).

Mediante la biodigestión anaerobia, el gas metano producido mediante materiales orgánicos de desecho se atrapa dentro del proceso y evita la contaminación ambiental, además de evitar la transmisión de enfermedades causadas por microorganismos patógenos presentes en dichos materiales. Este proceso se conforma como una estrategia para la generación de compuestos de valor agregado a partir de desechos orgánicos, principalmente metano como combustible y biofertilizantes líquido y sólido (Almeida y col., 2011).

México enfrenta un serio problema ambiental y consecuentemente se requieren cambios, entre otros, en legislaciones ambientales con respecto al manejo de desechos orgánicos. En países en vías de desarrollo como el nuestro, los sistemas de controles sanitario y ambiental resultan insuficientes, debido a una planeación escasa para la evaluación del contenido de patógenos y reducción de los mismos en desechos en general.

En el caso particular de los desechos orgánicos, ha surgido un incremento en su generación debido al crecimiento demográfico, principalmente en zonas urbanas y con ello el incremento de los desechos orgánicos tanto sólidos como líquidos, lo que en la actualidad se ha convertido en un problema ambiental importante. Se estima que cada persona produce en promedio 0.77 kg, de desechos orgánicos al día, aunque esta cifra crece constantemente (Troschinetz y Mihelcic, 2009). En los últimos años, la generación de estos desechos sólidos está cerca de los dos billones de toneladas por año, y se cree que incrementará a tres billones en 2025 a nivel global (Charles y col., 2009).

Debido a lo planteado anteriormente, existe la necesidad de optimizar y hacer más eficientes los procedimientos que existen para el tratamiento de desechos orgánicos. El mejoramiento de los sistemas de tratamiento de desechos actuales ayudará a resolver los problemas ambientales que ocasionan los desechos orgánicos, además de aprovecharlos como fuente de producción de energía y remediadores de suelo (Buenrostro y Bocco, 2003).

En el presente trabajo se busca valorar los niveles de los indicadores sanitarios durante el proceso de biodigestión, así como después de un proceso complementario al mismo, encaminado a conocer la cinética de las poblaciones bacterianas durante dicho proceso. El alcance de la información generada aportará un conocimiento cuantitativo de dichas cinéticas que describirá los cambios en los niveles de las poblaciones durante el proceso y cotejar así que los efluentes tengan un menor impacto ambiental y puedan por lo tanto tener una mayor gama de usos posteriores.

II. ANTECEDENTES

2.1 Biodigestión Anaerobia

La biodigestión anaerobia es una alternativa muy importante para la conversión de desechos orgánicos. En diferentes ámbitos productivos como el tratamiento de aguas residuales en la industria, aguas tratadas, los desechos animales tanto de grandes unidades de producción, como los generados en pequeñas granjas en sus actividades cotidianas, se logran procesar mediante este sistema, obteniendo resultados favorables.

Es además, un proceso biológico que en ausencia de oxígeno, convierte la materia orgánica en biogás y otros compuestos sólidos. El biogás consiste primordialmente de dióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4), entre otros gases. El metano generado, puede ser utilizado como fuente de energía renovable para cocinar, generar calor y energía. Mientras que los efluentes líquidos y sólidos pueden ser también utilizados como fertilizantes orgánicos y/o mejoradores de suelos, que incrementan la productividad agrícola (Surendra y col., 2014; Garfí y col., 2011). Por lo que se ha catalogado a la biodigestión, como una tecnología que contribuye a un manejo íntegro de estiércol en la agricultura a pequeña escala.

La tecnología de los biodigestores durante los últimos años se ha difundido ampliamente en diversos países tanto desarrollados como los subdesarrollados. En América Latina durante la última década del siglo pasado estos prototipos han apoyado a los productores rurales esencialmente con la producción de biogás como una energía alternativa para generar electricidad y combustible para motores de combustión interna como generadores eléctricos. Otra alternativa es la utilización del biogás como fuente para cocinar o producir calor en viviendas

rurales, sin dejar de aprovechar el biol (fertilizante orgánico) como mejorador de suelos en la agricultura, debido a sus componentes orgánicos e inorgánicos que resultan de gran importancia para suelos agrícolas (Vinneras y Schonning, 2011). No obstante, la evaluación microbiológica del biol es un importante indicador de higiene que debe controlarse y comprobarse cuando es utilizado para fertilizar cultivos de consumo directo y de productos de contacto más cercano por el hombre, ya que la reducción de microorganismos patógenos a través de este proceso no siempre se alcanza en los niveles óptimos o recomendados para su uso (Vinneras y Schonning, 2011).

Lo anterior es por el riesgo potencial que existe cuando se genera el biol, ya que dicho efluente si no se controla puede contener patógenos tales como: *Salmonella, Listeria, Campylobacter*, entre otros, en cantidades por encima de las normas de aguas de reúso que llegan a afectar severamente la salud pública. Debido a lo anterior, se recomienda que el biol se analice microbiológicamente antes de ser utilizado en tierras de cultivo. En la Unión Europea, tanto el análisis, como el uso están apropiadamente regulados (Bagge y col., 2005).

Los desechos orgánicos de origen animal que generalmente son utilizados para la producción de biogás se dividen en tres categorías, dependiendo del grado de contaminación por patógenos que afectan al ser humano. Dentro de la primera categoría están los materiales que probablemente tienen presencia de priones, por lo cual, es necesario incinerarlos y no pueden ser incluidos en el procesamiento para la producción de biogás. En la categoría 2, se incluye el material que necesariamente tiene que ser esterilizado a 133ºC con 3 bars de presión por 20 minutos, antes de ser utilizado o manipulado en plantas generadoras de biogás. Por último están los productos de la categoría 3 o materiales producidos por animales saludables; éstos requieren una temperatura de 70ºC durante 60 minutos antes del proceso de la biodigestión (Bagge y col., 2005).

La parte orgánica de los desechos sólidos ha sido considerada como una fuente muy importante para la elaboración de productos de interés, mediante procesos en los cuales están involucradas poblaciones microbianas (Lesteur y col., 2010). La conversión de materia orgánica a biogás es llevada a cabo por una estrecha colaboración de microorganismos, a través de una seria de fases metabólicas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Surendra y col., 2014).

En la primera fase de conversión, los compuestos orgánicos complejos son degradados a compuestos más sencillos. Los lípidos son degradados a ácidos grasos de cadena larga, glicerol y otros lípidos simples. Las proteínas son transformadas en aminoácidos libres y oligopéptidos. Por su parte los polisacáridos son convertidos en monómeros solubles y oligómeros. Esta etapa recibe el nombre de licuefacción.

Después, la segunda etapa es llamada acidogénesis y en ésta se lleva a cabo la fermentación. Dicha etapa es llevada a cabo por acción de bacterias fermentadoras o hidrolíticas, que liberan enzimas extracelulares. Los componentes más solubles son fermentados por bacterias acidogénicas, convirtiéndolos en una mezcla de dióxido de carbono (CO_2), hidrógeno molecular (H_2), alcohol y ácidos grasos volátiles de bajo peso molecular, tales como los ácidos propiónico y butírico.

La tercera etapa de la producción de biogás tiene por nombre acetogénesis. En esta etapa los alcoholes y ácidos grasos volátiles son oxidados anaeróbicamente por bacterias acetogénicas, estas bacterias transforman los alcoholes y los ácidos grasos libres en acetato, hidrógeno molecular y dióxido de carbono (Khanal, 2008).

Finalmente se transforman el acetato, hidrógeno molecular y dióxido de carbono a una mezcla de metano y dióxido de carbono. Las bacterias metanogénicas acetotróficas utilizan acetato como sustrato en el proceso que recibe el nombre de metanogénesis acetotrófica, mientras que en la metanogénesis hidrogenotrófica se reduce el dióxido de carbono por acción del hidrógeno

molecular, que funciona como donador de electrones. Ambas forman la fase de la metanogénesis, es decir, producción de metano.

Del total de metano que se produce durante la biodigestión, cerca del 70% proviene de la descarboxilación de acetato, mientras que el restante, es producido en su mayoría por la reducción de dióxido de carbono. Una pequeña porción, es producida por los ácidos fórmico, propiónico y butírico (Zieminski y Frac, 2012).

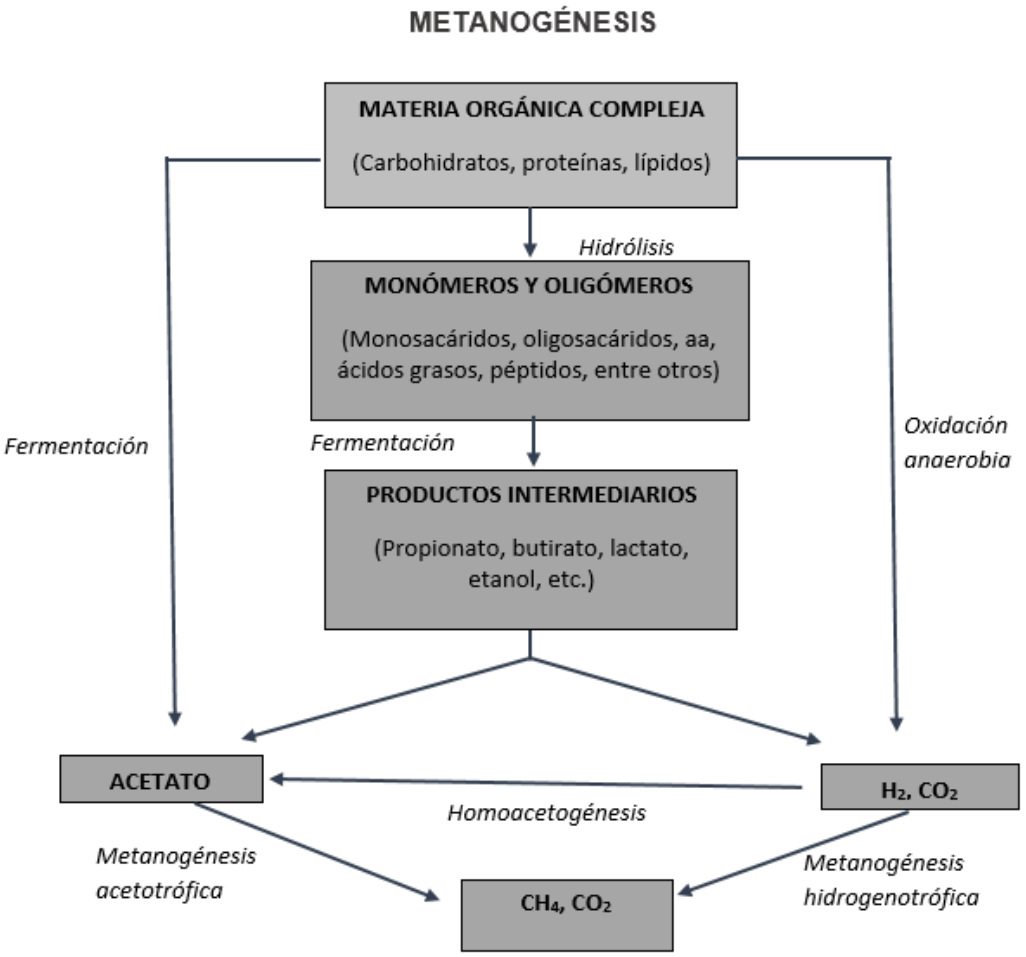

Figura 1. Etapas del proceso de la metanogénesis (Surendra y col., 2014)

2.1.1 Ventajas y Desventajas de la Biodigestión Anaerobia

La retención de desechos orgánicos durante un periodo promedio de 3 semanas en condiciones mesofílicas y anaeróbicas son suficientes para eliminar patógenos causantes de tifoidea, cólera, disentería, esquistosomas y anquilostoma. Sin embargo, para eliminar otro tipo de patógenos que resultan infectivos como *huevos de helminto, E. coli y Enterococcus spp*. se necesita el mismo proceso, pero con un mayor tiempo de retención de desechos entre 8 y 100 días aproximadamente, dependiendo siempre de las condiciones climáticas. Por lo tanto, si la reducción de patógenos por estos procesos no es efectiva, entonces, la biodigestión es una tecnología inadecuada para permitir una subsecuente utilización de biofertilizantes para el uso agrícola (Bond y Temppleton, 2011).

La biodigestión de desechos de ganado en pequeñas granjas de países en vías de desarrollo, tiene diversos beneficios. Provee de un biocombustible para sustituir a la biomasa que debe ser sometida a combustión como madera o estiércol sólido. Debido a que se evita la combustión de madera y estiércol sólido se mejora la calidad del ambiente disminuyendo, por un lado la deforestación masiva y descontrolada; y por otra parte, se disminuye la emisión de gases de efecto invernadero. Además, se protege al ambiente por acción del tratamiento de aguas de desecho. Aunado a lo anterior, otro beneficio para la sociedad aportado por la biodigestión es la disminución en la carga de trabajo en niños y mujeres por el acarreamiento y almacenamiento de leña para cocinar y producir calor en épocas invernales (Garfí y col., 2011). Además bajo este proceso, suma un componente más en la remediación de emisores de gases de efecto invernadero.

Dentro de las pocas desventajas del biodigestor, se encuentra el arranque lento de la biodigestión, debido a la baja velocidad en el desarrollo y metabolismo de los microorganismos presentes en el proceso. También se debe tomar en cuenta

la temperatura ambiente y la del sustrato, misma que debe permanecer cercana a los 35º C, para que la actividad bacteriana sea óptima y se logre la última etapa conocida como metanogénesis, de no mantenerse esta última variable, las fluctuaciones pueden interferir en los productos finales de biodigestión. Aunado a ello, el dispositivo debe instalarse en un área aislada y cercana a donde se recoge el material orgánico de desecho (estiércol) para la facilidad de traslado.

2.1.2 Productos de la biodigestión

La biodigestión anaerobia proporciona un fertilizante orgánico líquido, llamado biol y un combustible conocido como biogás. Ambos pueden tener un buen aprovechamiento; el biogás, como fuente de energía. El biofertilizante, debido a sus macro y micronutrientes, una vez que es aplicado sobre tierras de cultivo, tiene grandes beneficios físicos, químicos y biológicos, que incrementan la productividad del cultivo. El biol es capaz de penetrar el suelo rápidamente y así reducir el riesgo de la conversión del nitrógeno contenido en amoniaco (Weiland, 2010).

El biogás es un producto que puede ser utilizado como fuente de energía en la cocina doméstica y en otras actividades para producir calor, también como combustible alternativo (Botero y Preston, 1987). El uso de este energético contribuye a disminuir la contaminación y deterioro del ambiente, además de coadyuvar a un menor uso de gas LP (Martí, 2008).

La composición del biogás varía dependiendo del tipo de materia prima utilizada y condiciones del biodigestor. En general está constituido entre 50 y 75% de metano y entre 25 y 50% de dióxido de carbono, acompañado de otros componentes como vapor de agua, ácido sulfhídrico y amoniaco (Muyalert y col., 2000). Dentro de sus propiedades destacan, una temperatura de ignición de 650 a 750ºC y su flama alcanza temperaturas de hasta 870 ºC (FAO, 2011).

El biol es considerado un abono y un fertilizante. Un abono, en general, se considera aquel material que se aplica al suelo para estimular el crecimiento de las plantas de manera indirecta, mediante la mejora de las propiedades físicas del suelo. El biol genera un incremento de la actividad biológica, ya que aporta nutrientes, energía y hábitat para los microorganismos del suelo, retiene nutrimentos y metales pesados que de otra forma se lixiviarían, además de favorecer la estructura del suelo mediante su función como agente cementante de las partículas del mismo, formando agregados estables durante periodos de humedecimiento y secado. Por último, incrementa la porosidad, mediante la formación de agregados que aumentan la retención de agua en suelos arenosos y la permeabilidad en suelos arcillosos (Figueroa y cueto, 2003).

Además, se considera como fertilizante cuando estimula el crecimiento de las plantas de manera directa a través del aporte de nutrimentos indispensables. En el contexto anterior, el biol proveniente de ganado cumple con los requisitos para ser considerado, tanto un abono como un fertilizante, ya que mejora las condiciones del suelo, además de aportar nutrimentos a las plantas para potencializar su desarrollo (Figueroa y Cueto, 2003).

La composición química del biol incluye la presencia de varios minerales requeridos para el desarrollo de plantas. Contiene macronutrientes como; nitrógeno, potasio y fósforo; además de contar con calcio, magnesio y zinc en una menor proporción. Estos minerales en conjunto brindan una mejor producción de biomasa vegetal. Un ejemplo valioso son los forrajes, que ocupan estos macronutrientes primordiales para su desarrollo (Manahan, 2007).

Se ha demostrado que durante la biodigestión se disminuyen las bacterias presentes en los desechos orgánicos. Durante la valoración del estiércol de cerdo que ingresa a un biodigestor y el efluente de salida del mismo, disminuye las demandas química y bioquímica de oxígeno en 50 y 68% respectivamente, lo que nos indica cómo se lleva a cabo la degradación de materia orgánica por acción de los microorganismos presentes durante el proceso. El decremento de estas

variables refleja también la disminución de bacterias presentes en los desechos (Soria y col., 2001).

2.2 Biodigestores

Un biodigestor, es un sistema que se utiliza para el tratamiento de desechos orgánicos líquidos o sólidos. Los desechos que son sometidos al tratamiento, resultan perjudiciales para el medio ambiente y contienen un potencial infeccioso o de riesgo para la salud humana. El objetivo del tratamiento en el biodigestor es que el riesgo a la salud y el impacto ambiental de los efluentes generados, sean menores que el riesgo e impacto presentes en los desechos previos al tratamiento (Teglia y col., 2010).

El primer biodigestor que se tiene noticia, fue diseñado en la década de 1770 y desde entonces a la fecha se le han realizado modificaciones hasta contar con modelos modernos a los que se les han incorporado diferentes avances tecnológicos. En Alemania, se construyó por primera vez una planta de biodigestión en 1906 y para el año 2000 ya se contaban con más de 400, para el año 2010 existían alrededor de 5500 biodigestores. En países como España, Dinamarca, Suiza, Suecia y China los biodigestores son ampliamente utilizados con la finalidad de convertir toneladas de desechos en grandes cantidades de biogás (Vízquez, 2011). En México la utilización de la biodigestión no es una práctica rutinaria, que se busca impulsar.

2.2.1 Clasificación

Los biodigestores se clasifican dependiendo de la forma en que son construidos y alimentados con los desechos orgánicos. En la actualidad, los tipos de

biodigestores más utilizados son: (1) régimen estacionario o batch, (2) régimen semicontinuo, (3) desplazamiento horizontal y (4) régimen continuo.

Los biodigestores estacionarios consisten en tanques sellados herméticamente, con una salida de gas en la parte posterior. Se cargan de materia orgánica una vez durante el proceso y se descargan cuando se ha dejado de producir gas. Los de régimen semicontinuo se instalan en una fosa de tierra, se cargan una vez al día y en la parte superior cuentan con una campana donde se almacena el biogás.

Los biodigestores de desplazamiento horizontal también se construyen bajo tierra y operan en forma semicontinua, mientras la carga de desechos se introduce por un extremo y el efluente sale sobre el extremo opuesto. Mientras que los de régimen continuo se utilizan generalmente para el tratamiento de aguas negras, son de gran tamaño y emplean equipos de calefacción para uso industrial (Mandujano y col., 1981).

No existen registros de la utilización de biodigestores que empleen y demuestren la utilidad de un tratamiento anaerobio, seguido del tratamiento aerobio para obtención de efluentes de interés. La mayoría de ellos son bajo condiciones anaerobias únicamente e instalados bajo tierra. Al ser instalados bajo tierra, la temperatura es más estable por lo que las propiedades físicas, químicas y biológicas presentan una menor variabilidad y eso permite una mayor estabilidad para el metabolismo bacteriano catabólico (Domínguez y col., 2012).

2.2.2 Factores Importantes para el Funcionamiento del Biodigestor

Las características físicas, químicas y biológicas con las que debe contar un biodigestor son las siguientes: microorganismos apropiados (acidogénicos, acetogénicos y metanogénicos) que coexisten para desarrollar todas las fases del proceso microbiológico; aunado a ello, se debe mantener la temperatura óptima del sustrato (entre 25 y 35 ºC), así como los nutrientes necesarios en los

desechos orgánicos para la función y sobrevivencia de los microorganismos presentes, el intervalo del pH entre 6.5 y 7.5 y humedad adecuada (Puerta, 2003). Es importante también alcanzar hermeticidad en el biodigestor para que no entre oxígeno al sistema. Una vez obtenidas estas propiedades dentro del reactor biológico, el contenido de nutrientes no se ve afectado, lo que da como resultado un excelente fertilizante de suelos agrícolas (Vízquez, 2011).

2.3 Microrganismos Involucrados en la Biodigestión Anaerobia

El objetivo primordial de las ciencias de salud ambiental, es limitar o disminuir la incidencia de enfermedades infecciosas por acción de diversos factores de impacto ambiental. Los biosólidos de desecho, por su propia naturaleza, son una fuente de diversos microorganismos de importancia sanitaria y también de patógenos, así como una fuente de sustancias tóxicas. Debido lo anterior, cuando los desechos son sometidos a biodigestión, los efluentes obtenidos requieren una exhaustiva examinación antes de ser vertidos en el suelo o en el agua para asegurar que no generen un impacto negativo sobre el medio ambiente.

En las aguas residuales existen una gran cantidad de grupos de microorganismos, entre ellos los microorganismos fecales representan la población predominante. La disposición inadecuada de este tipo de desechos, aunada con la supervivencia debida a la formación de consorcios bacterianos, podría representar un marcado riesgo a la salud de seres humanos, ya que como resultado final de la biodigestión, el biol puede contener una gran cantidad de microorganismos.

En respuesta a las elevadas poblaciones de microorganismos presentes en desechos líquidos como aguas residuales o efluentes de biodigestión, se han desarrollado normas y lineamientos, que establecen los niveles máximos permisibles de contaminantes, al igual que el manejo mismo de los biosólidos.

Como los indicados en la NOM-004-SEMARNAT-2002, que se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Límites máximos permisibles para patógenos y parásitos en lodos y biosólidos

Clase	*Indicador bacteriológico de contaminación*	*Patógenos*	*Parásitos*
	Coliformes fecales NMP/g en base seca	Salmonella s.p.p. NMP/g en base seca	Huevos de helminto/g en base seca
A	Menor de 1000	Menor de 3	Menor de 1 (a)
B	Menor de 1000	Menor de 3	Menor de 10
C	Menor de 2 000 000	Menor de 300	Menor de 35

NMP: número más probable, (a) Huevos helminto viable.
Fuente: NOM-004-SEMARNAT-2002.

Las regulaciones actuales están basadas en indicadores bacterianos convencionales y en ciertos patógenos. Sin embargo, aún es necesario información más certera sobre la supervivencia de los microorganismos después del proceso de biodigestión, al igual que la necesidad de estudiar la posibilidad de algún proceso adicional que permita una mayor disminución de dichos niveles de patógenos, hasta permitir que los efluentes tengan el mínimo impacto en la salud y el ambiente.

La detección de microorganismos en biosólidos y efluentes líquidos es costosa, compleja e involucra ensayos o procedimientos que pueden llegar a ser extensos ya que requieren largos periodos de tiempo, debido a la naturaleza de los procedimientos microbiológicos analíticos. Esto reduce y limita la capacidad para determinar con precisión el nivel de microorganismos presentes al finalizar el proceso de biodigestión en los sistemas comúnmente utilizados en el campo (Guzmán y col., 2007).

La evaluación de niveles de coliformes fecales, *Salmonella* spp., virus entéricos, huevos de helminto y protozoarios, es indispensable para tener un buen indicador del proceso de tratamiento de desechos orgánicos. Además, es de gran utilidad

investigar la ocurrencia de otros patógenos como esporas de *Clostridium*, bacteriófagos y virus de ARN específicos, mediante técnicas que permitan hacer comparaciones con los indicadores convencionales y tener un mayor control en dicho proceso, evitando o disminuyendo los riesgos ambientales y de salud pública (Blanch y col., 2004).

En México existe una norma oficial que establece los límites máximos permisibles de contaminantes, en aguas residuales tratadas con fines de reúso en servicios al público, con el objetivo de proteger el medio ambiente y la salud de la población. Al ser una Norma Oficial Mexicana (NOM) es de observancia obligatoria en todo el país para los usuarios de dichas aguas tratadas (NOM-003-ECOL-1997). Existe también la norma NOM-004-SEMARNAT-2002 que regula los biosólidos. Una limitación de esta norma es que la técnica del ¨número más probable¨ utilizada para contar los microorganismos, no permiten realizar un análisis estadístico robusto para entender la dinámica poblacional de los diferentes grupos bacterianos presentes durante la biodigestión.

Por lo anterior es necesario realizar estudios de dinámica poblacional con análisis microbiológicos utilizando técnicas de conteo basadas en estadística paramétrica que permitan un análisis estadístico robusto, aun cuando se tengan que usar unidades de conteo diferentes a las recomendadas por la Normas previamente mencionadas.

Cuando se estudian las dinámicas poblacionales durante un proceso se evalúan diferentes grupos bacterianos. Entre los indicadores sanitarios más comúnmente utilizados para evaluar dinámica poblacional se pueden considerar los mesófilos aerobios, coliformes totales y coliformes fecales. Estos tres grupos abarcan la mayoría de los microorganismos presentes en las muestras de desechos orgánicos sometidos a biodigestión.

El grupo de los mesófilos aerobios reflejan la calidad sanitaria de muestras analizadas, indicando condiciones higiénicas dentro de la manipulación de las mismas. En este grupo de bacterias se incluyen todos los microorganismos que

son capaces de desarrollarse de manera óptima en presencia de oxígeno y a temperaturas entre 30 y 40º C (36º C como un umbral comúnmente aceptado).
Mientras que el término o población de ñcoliformesòfue establecido para describir a cierto grupo de bacterias entéricas. No representan una clasificación taxonómica, sino una definición de trabajo que se utiliza para describir a un grupo de bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas, en forma de barra y que son capaces de fermentar lactosa para producir ácido y gas dentro de 48 horas a 35 ºC. (Feng y col., 2013).
Se denomina coliformes totales a toda la población bacteriana con las características antes mencionadas y se desprende de éste, un subconjunto llamado coliformes fecales, el cual crece y fermenta la lactosa a temperatura de incubación más elevada (44.5 ºC). Este grupo, está compuesto principalmente por *E. coli* entérica. Por esto el grupo de coliformes es de gran importancia como indicador sanitario de calidad, para evaluar la contaminación de agua y para el procesamiento de alimentos (Feng y col., 2013).

2.3.1 Medición de Coliformes Fecales

Los coliformes fecales son el indicador más utilizado en la microbiología para la detección de prácticas higiénicas inadecuadas. Este indicador puede determinarse en materias primas, diferentes etapas del procesamiento de los alimentos, superficies vivas e inertes y prácticamente todos los diferentes pasos que recorre un alimento desde que es materia prima hasta que llega a la mesa del consumidor.
Igualmente dicho indicador se usa para valorar la calidad sanitaria de agua y hielo utilizados en diferentes áreas de procesamiento de alimentos. También se puede aplicar este indicador a diferentes tipos de bebidas preparadas e infusiones.

Dicho indicador puede ser determinado utilizando tanto medios líquidos, como sólidos.

El objetivo del método es determinar el número de microorganismos coliformes fecales presentes en diferentes tipos de matrices, como las previamente mencionadas. El fundamento de dicho método es determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo en el que se desarrollan bacterias a 45ºC en aproximadamente 24 - 48h. Posteriormente, como resultado, se observa la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH en el medio y precipitan las sales biliares, permitiendo así el conteo de las colonias desarrolladas (Geldreich y col., 1965).

2.4 Método Calorimétrico para Cuantificación de Carga Microbiana

La calorimetría es una técnica que mide la producción de calor en los procesos que ocurren en una muestra determinada (Wadsö, 1997). El flujo de calor (potencia térmica) que se mide bajo este procedimiento, está directamente relacionado con la cinética del proceso que se estudia. Debido a que la microcalorimetría es una técnica no específica, los resultados deben siempre complementarse con determinaciones de tipo físico, químico y microbiológico realizadas mediante técnicas convencionales. La ventaja de esta técnica es que las mediciones son continuas (Cabral, 2007).

Las técnicas modernas de calorimetría, representan un gran avance para establecer comparaciones con los resultados obtenidos para el conteo de microorganismos mediante las técnicas microbiológicas tradicionales. La calorimetría en comparación con las técnicas de cultivo tradicionales tiene requerimientos de funcionamiento sencillos y obtención rápida de resultados (Gardea y col., 2002).

El crecimiento de microorganismos está relacionado con la generación de calor, ya sea en forma aeróbica o anaeróbica y que el producto final sea biomasa o metabolitos. Los procesos catabólicos se asocian con un decrecimiento de la energía libre; parte de la energía liberada se conserva en enlaces de gran energía de adenosín trifosfato (ATP) o en otros compuestos almacenadores de energía, que la suministran cuando es requerida para la biosíntesis y la actividad metabólica en general. El resto de energía de los sustratos originales es liberada como calor; además, la producción de calor durante el catabolismo de nutrientes ricos en energía, así como la energía liberada como calor en la utilización del ATP en la actividad celular, proveen un medio para el crecimiento microbiológico y otras funciones celulares (Moreno y Giraldo, 2006).

Otras aplicaciones de microcalorimetría en ciencias microbiológicas, ha sido usada para valorar la calidad en mariscos, al igual que ha sido usada para medir la degradación de plomo por acción de microorganismos en suelos contaminados (Teeling y Cypionka, 1997).

También se ha reportado (Ravoo y col., 2000), que la microcalorimetría se utilizó para medir la eficacia de extractos de plantas como antimicrobianos, valorando su efecto en cepas de *Streptococcus mutans*; responsable de la caries dental. Otra aplicación importante reportada es el monitoreo del crecimiento bacteriano en leche (Berridge y col., 1974; Gardea y col., 2002).

Las tecnologías de biodigestión comercialmente utilizadas para reducir riesgos de contaminación ambiental y de salud, han resultado insuficientes para disminuir las cargas bacterianas de los efluentes, de manera que cumplan con los requerimientos establecidos en normas oficiales vigentes para los usos posteriores recomendados por las mismas normas. Se ha tratado de buscar alternativas de metodologías factibles, que permitan una evaluación mas rápida y precisa, tanto en la carga contenida de indicadores sanitarios como en la identificación de algunos microorganismos patógenos de interés.

Si bien los biodigestores anaerobios son una tecnología comercialmente disponible desde hace algún tiempo, la realidad es que las cargas microbianas de los efluentes se encuentran por arriba de lo que la norma oficial NOM-003-ECOL-1997 permite para su descarga en cuerpos de agua. Lo anterior implica la acumulación excesiva de éstos y los problemas asociados a la contaminación que generan. Por otro lado, experiencias recientes en CIAD han mostrado la posibilidad de disminuir esas cargas bacterianas mediante un proceso complementario posterior a la digestión anaerobia. Desafortunadamente, esos datos no resisten un análisis estadístico robusto que permita emitir recomendaciones puntuales para poder utilizar los efluentes generados.

Por la problemática expuesta con antelación, resulta importante determinar la dinámica poblacional de los indicadores sanitarios durante la biodigestión y mediante un análisis estadístico, establecer si las reducciones en los parámetros establecidos para el control de la misma, permiten el uso de los efluentes sin que representen un riesgo a la salud, pero cuando el riesgo persiste, se buscó implementar un proceso adicional para disminuir aun más los niveles de los microorganismos. Así mismo, es necesario buscar herramientas más rápidas e igualmente confiables que permitan establecer la inocuidad de los efluentes, sin depender necesariamente del cultivo microbiano,como lo pueden ser las técnicas microcalorimétricas.

III. HIPÓTESIS

La utilización de una estrategia complementaria al proceso de biodigestión disminuye en mayor proporción la carga bacteriana de los efluentes líquidos generados, en comparación al proceso convencional.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Valorar la carga de indicadores sanitarios a lo largo de los procesos de biodigestión y complementario.

4.2 Objetivos Particulares

- Determinar las cinéticas bacterianas de mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales mediante cultivo en placa en el proceso de biodigestión.
- Evaluar los niveles de los indicadores sanitarios mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales después del proceso complementario de efluentes.
- Implementar la utilización de microcalorimetría isotérmica como una técnica alternativa que permita determinar en corto tiempo la carga microbiana de los efluentes, producto de la biodigestión y proceso complementario de desechos orgánicos.
- Comprobar el efecto que puede tener la temperatura controlada en comparación con la temperatura ambiental en la reducción de microorganismos durante la biodigestión.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Biodigestor Modelo

Se construyó un biodigestor tubular horizontal de desplazamiento que consta de 2 bolsas de polietileno de alta densidad (1.5mm), con una capacidad de 4000 litros la primera, donde se llevó a cabo la digestión anaerobia y la segunda con un volumen aproximado similar. Las dos unidades cuentan con un aditamento de salida de metano en la parte superior de las mismas, así como una entrada para alimentación y salida de efluente en cada una de las bolsas mencionadas. El sistema completo se instaló en la unidad Hermosillo de CIAD. El biodigestor contó con una pila de alimentación, donde se lleva a cabo la mezcla de agua y estiércol proveniente de una granja cercana, en una proporción 1:3 a partir de esta pila, la mezcla es alimentada directamente al biodigestor. La pila está a una profundidad de 1.5 m y tiene un declive mínimo hacia el segundo compartimento de 0.3 m.

5.2 Corrida Piloto

Se llevó a cabo un análisis preliminar para asegurar que el biodigestor se encontrará completamente sellado, esta corrida piloto fue evaluada mediante la medición de coliformes totales durante 27 días, se analizaron 5 puntos o fechas de muestreo durante este periodo de biodigestión y se compararon los datos entre sí plasmados en resultados y discusión, para ver si existían reducciones con valor estadístico ($p<0.05$) en el indicador sanitario antes mencionado.

5.3 Minibiodigestor Modelo

Se construyó un minibiodigestor, con la finalidad de controlar la temperatura óptima de biodigestión. Dicho minibiodigestor no fue continuo, sino estacionario, con una capacidad de 40 L. Contaba con una salida de gas con un quemador para la combustión del metano. Fue cerrado hermeticamente y rodeado por una plancha que le suministraba calor para mantener una temperatura perimetral constante de 36 ºC. Para asegurar que ésta era la temperatura, se colocó en el interior del minibiodigestor un termostato que permitía que la temperatura se mantuviera constante. El minibiodigestor se colocó en el interior del laboratorio de microbiología polifásica y bioactividades , se muestreo al inicio y al final de 30 días.

5.4 Bioensayo de Valoración de Carga Microbiológica en Minibiodigestor, Bajo Condiciones Controladas

El minibiodigestor se alimentó con 40 litros de una mezcla de estiércol bovino y agua con la misma proporción (1:3) usada en el biodigestor. Se llevó a cabo el proceso por un lapso de 40 días. La chaqueta térmica mantuvo la temperatura constante a 36ºC durante todo el proceso. Se realizó un análisis de 5 muestras al inicio y 5 muestras al final del proceso, donde se cuantificaron mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales. La temperatura fue mantenida a 36° C, como se describió previamente. Bajo estas condiciones, los indicadores sanitarios fueron analizados después de 4 semanas de biodigestión y dichos resultados fueron comparados con los obtenidos en el biodigestor mantenido a temperatura ambiente.

5.5 Monitoreo de Temperatura Ambiental

Se llevó a cabo un registro de temperatura ambiente diariamente en la mañana y en la tarde, con un termómetro estacionario ubicado a un costado del biodigestor durante los meses que se realizó el proceso experimental. Esto con la finalidad de comparar las fluctuaciones de temperatura, con los resultados de la cinética obtenidos para los diferentes indicadores. El experimento se llevó a cabo en el periodo comprendido del 9 de noviembre del 2015 al 14 de abril del 2016. En Hermosillo, Sonora donde las temperaturas promedio durante el verano oscilan entre los 35° y 40° C. Si bien las altas temperaturas son un factor que favorece el proceso de biodigestión, el experimento en condición de campo se llevó a cabo durante el invierno para poder determinar si las temperaturas más frías representarían un factor limitante. Generalmente en el invierno las temperaturas medias oscilan entre 10 y 25 º C, Las temperaturas fueron monitoreadas durante los cuatro meses que duró el experimento en los parámetros máximos y mínimos de cada día.

5.6 Alimentación del Biodigestor

La recolección de las heces de bovinos, se llevó a cabo con cubetas y palas previamente lavadas, para evitar la posible contaminación de otros microorganismos que no sean propios de la muestra orgánica. Se llevó a cabo la mezcla de estiércol y agua (20 y 60 L respectivamente) alrededor de las 8 de la mañana para su posterior introducción a las bolsas de biodigestión y una vez que este volumen fue ingresado dentro de ésta, un volumen similar fue desplazado hacia la bolsa complementaria.

5.7 Recolección de las Muestras

Durante la primera alimentación del biodigestor correspondiente a nuestro experimento, se tomaron 5 muestras aleatorias de la mezcla (punto 1), representativas de la entrada en la primera bolsa. Una vez transcurrido el tiempo necesario para el desarrollo completo del proceso de biodigestión (25-30 días aproximandamente), se tomaron 5 muestras aleatorias de la salida de la primera bolsa (punto 2) y después de 30 días más se colectaron 5 nuevas muestras de la salida de la segunda bolsa complementaria (punto 3), completando así una generación de microorganismos en el proceso. Esto se repitió hasta tener 4 generaciones consecutivas.

A continuación en el Cuadro 2 se muestra, la secuencia de la toma de muestras que conformaron cada cohorte generacional, con un tiempo de retención de 30 días entre cada posición de muestreo.

Cuadro 2. Secuencia, puntos de muestreo y conformación de las generaciones muestreadas.

	Puntos del muestreo		
Muestreos	***Punto 1***	***Punto 2***	***Punto 3***
M1	NOVIEMBRE 9 5 repeticiones		
M2	DICIEMBRE 9 5 repeticiones	DICIEMBRE 7 5 repeticiones	
M3	ENERO 25 5 repticiones	ENERO 20 5 repeticiones	ENERO 18 5 repeticiones
M4	FEBRERO 17 5 repeticiones	FEBRERO 15 5 repeticiones	FEBRERO 10 5 repeticiones
M5		MARZO 16 5 repeticiones	MARZO 16 5 repeticiones
M6			ABRIL 13 5 repeticiones

Punto 1: Inicio de biodigestión, Punto : Final de biodigestión, Punto 3: Final de proceso complementario.

una vez que se lleva a cabo la recolección de muestras en cada uno de los tiempos y las posiciones del biodigestor, éstas se trasladaron en bolsas estériles comerciales Whirl-pack Nasco con malla separadora y se resguardaron en una hielera térmica con geles para mantener una temperatura constante entre 5 a 10 °C para su transporte al laboratorio.

5.8 Determinación de Mesófilos Aerobios

El conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de los microorganismos tratados en este apartado, se llevó a cabo mediante la técnica propuesta por la norma oficial NOM-092-SSA1-1994. Dicha norma establece el método para estimar la cantidad de microorganismos viables presentes en un alimento o agua, para la cuenta en un medio sólido, incubado bajo condiciones aerobias. En breve, se realizan diluciones seriadas en buffer de fosfatos de Butterfield y dichas diluciones son inoculadas por duplicado mediante el método de cuenta viable en placas petri, a las que se les añade agar para cuenta estándar (BD 247940). Las placas fueron incubadas a 36° C, durante 48 horas. Posterior a la incubación, se seleccionaron aquellas placas que tuvieran entre 25 y 250 UFC para ser utilizadas durante el conteo. Las colonias de mesófilos aerobios presentan una coloración blanco-beige en este medio (NOM-092-SSA1-1994).

5.9 Determinación de Coliformes Totales y Fecales

A partir de las mismas diluciones utilizadas para la determinación de mesófilos aerobios, se realizaron las determinaciones de coliformes totales y fecales. Para los coliformes totales, se realizaron siembras mediante el método de cuenta viable utilizando 1 mL de cada dilución por duplicado, utilizando el agar BRVA (BD 211695), para asegurar la completa anaerobiosis requerida para los coliformes totales, una vez solidificado el agar, se le agregó una segunda capa de aproximadamente 5 mL del mismo medio para posteriormente incubar a 36º C durante 20 a 22 horas y transcurrida la incubación realizar el conteo de colonias típicas de coloración rojo intenso, es importante señalar que para este indicador sanitario, el rango de colonias que se consideró como el apropiado para conteo

fue de 15 a 150. Las colonias de coliformes totales son de color rosa con un halo alrededor de las mismas de color rosa más oscuro (Feng y col., 2013).

Finalmente para la valoración de coliformes fecales, el medio de cultivo utilizado fue agar mFC (BD 267720). Se utilizaron las mismas diluciones seriadas mencionadas en la determinación de mesófilos aerobios, dichas diluciones fueron inoculadas por duplicado con el agar mFC e incubadas durante 20 a 22 horas a una temperatura de 45° C. Posterior a la incubación, se seleccionaron aquellas diluciones que presentaran entre 25 y 250 UFC para realizar el conteo de las mismas. Las colonias de coliformes fecales presentan una coloración azul marino en este medio (Geldreich y col., 1965).

5.10 Microcalorimetría

Las mismas muestras procesadas en el laboratorio de microbiología, una vez analizadas, se llevaron a laboratorio de microcalorimetría ubicado en el mismo centro. La producción de calor se midió con un microcalorímetro de barrido diferencial de operación isotérmica Multi ï cell DSC 4100 (Calorimetry Science Corporation, Pleasant Grove, Utah, E.U.A.), utilizando para la medición celdas de aleación hastelhoy de 1 cc de volumen. La temperatura de lectura se llevó a cabo a 25 ºC, con una previa generación de lineas base para evitar fluctuaciones durante la temporada. Se tomaron 10 mediciones a lo largo de 3600 segundos para poder obtener un promedio que nos permitiera obtener el calor metabólico de los microorganismos contenidos en la muestra y de esta forma poder compararlos con la carga bacteriana determinada por las técnicas microbiológicas anteriormente descritas.

5.11 Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar, para los puntos de muestreo a lo largo del proceso. Los puntos a muestrear incluyen, entrada y salida al proceso de biodigestión anaerobia y salida del proceso complementario. Cuando el ANDEVA arrojó significancias estadísticas, las medias se compararon por la prueba de Tukey-Kramer. Alternativamente se aplicó un análisis de regresión para generar los posibles algoritmos predictivos de carga microbiana en función del calor metabólico generado por las mismas muestras. Se realizó dicho análisis con los datos de calor metabólico. El modelo predictivo incluyó como variable predicha las cuentas bacterianas en Log de UFC, y como variable predictora al calor metabólico en (µwatts / mL). Se obtuvieron las ecuaciones predictivas y se reportó el coeficiente de determinación (R^2). Todas las significancias fueron estimadas a una probabilidad en el error Tipo I menor o igual a 0.05. Todos los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico NCSS versión 2007.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Construcción del Biodigestor con Bolsa Complementaria

Se realizó la construcción del biodigestor con la bolsa complementaria, de acuerdo a lo propuesto en la sección de materiales y métodos. Ambos dispositivos fueron construidos con polietileno de alta densidad (1.5mm), se sellaron con calor y posteriormente se soldó con soldadura industrial, con la finalidad de reunir las condiciones de hermeticidad adecuada, necesaria para su funcionamiento. La construcción de los dispositivos del biodigestor siguió los estándares convencionales. La construcción del sistema biodigestivo se muestra en la Figura 2.

Figura 2. Procedimiento secuencial de la construcción del sistema biodigestivo.a) vista general del biodigestor experimental; b) proceso de soldado de la membrana; c) vista superior de la bolsa una vez que quedó instalada, nótese el tubo de salida del biogás y al final la pila de entrada del estiércol.

6.2 Evaluación de Coliformes Totales Durante la Corrida Piloto

Durante la corrida piloto de biodigestión, se observó una disminución ($P<0.05$) de las poblaciones de coliformes totales a través del tiempo de muestreo. Al inicio del proceso el conteo fue de 5.58 Log UFC/mL y al final se registró un conteo de 3.87 Log UFC/mL, es decir, una reducción logarítimica cercana a 2 (Figura 3). Esta reducción en términos coloquiales es muy importante ya que en números absolutos implicó una reducción desde 380,000 hasta solo 7,400 UFC/mL.

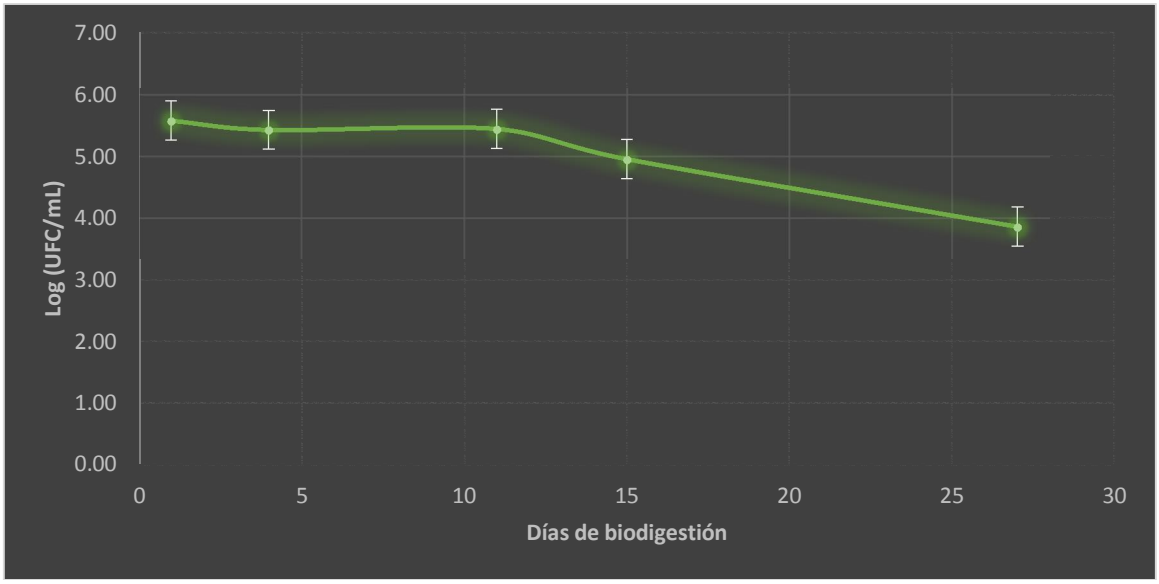

Figura 3. Cuentas bacterianas de Coliformes Totales (Log de UFC/mL) durante el proceso de biodigestión, en una prueba piloto.

En un estudio realizado por Puri y Dudley (2010), en el cual las condiciones fueron controladas (41°C y 35 días de retención) se obtuvo una reducción similar de coliformes totales. Morales y col (2014), evaluaron las cargas bacterianas en un biodigestor bajo las mismas condiciones al presente estudio y ellos reportaron una reducción de coliformes totales del 27%, la cual fue de menor magnitud a la observada en nuestro trabajo que fue del 31% (Cuadro 2). Cabe mencionar que en dicho estudio se utilizó el NMP en el conteo de coliformes, cifra que para fines de nuestro experimento no nos permite obtener datos estadísticos robustos, razón por la cual los valores se transformaron a términos relativos a fin de poder establecer la comparación entre ambos resultados. Una posible explicación de la discrepancia entre estos resultados, puede ser que tanto los medios de cultivo como los métodos utilizados para realizar la evaluación de coliformes totales fueron diferentes. Mientras que en el estudio de Morales y col (2014) se usó la técnica del NMP para el registro de las cuentas bacterianas, en esta investigación se utilizó el conteo en placa por cuenta viable. Ambas técnicas miden una reducción para la misma variable, sin embargo la robustez de los datos es de diferente magnitud, de ahí que el análisis estadístico es más sólido cuando el dato

es más representativo de la población muestreada. A contraparte el NMP es el método comúnmente aceptado por las normas oficiales; no obstante el objetivo de este trabajo no es indicar la observancia de la norma, sino generar un dato que permita una visión más cuantitativa del evento que arroje una visión más realista del evento mismo.

6.3 Muestreo Para la Valoración de Cinética Bacteriana Durante los Procesos de Biodigestión

En cada punto de muestreo se obtuvieron 5 muestras a las cuales se les analizaron los tres indicadores microbiológicos a lo largo de 4 generaciones consecutivas, como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Estos datos fueron transformados a escala logaritmica y promediados para cada generación, como puede observarse en las Figuras 4, 5, 6 y 7.

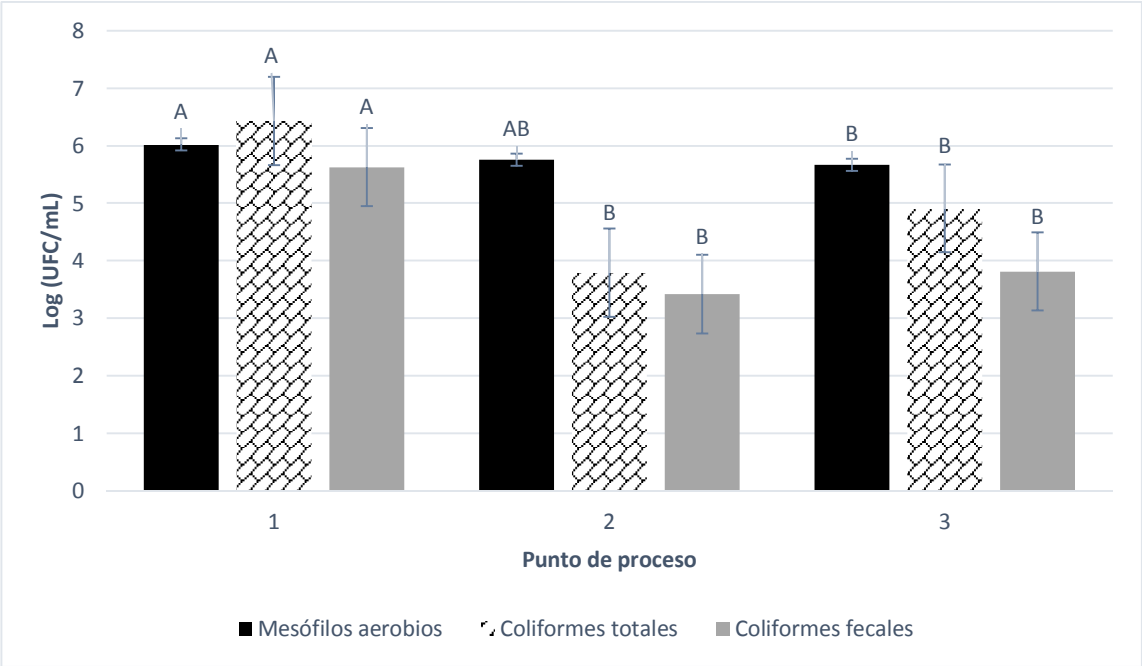

Figura 4. Cuentas bacterianas del primer cohorte generacional (Log de UFC/mL). Los tres indicadores sanitarios evaluados al inicio de la biodigestión (1), al final de la misma (2) y al final del proceso complementario (3). Las barras del mismo color con diferente literal, indican diferencia estadística (P<0.05), n=5.

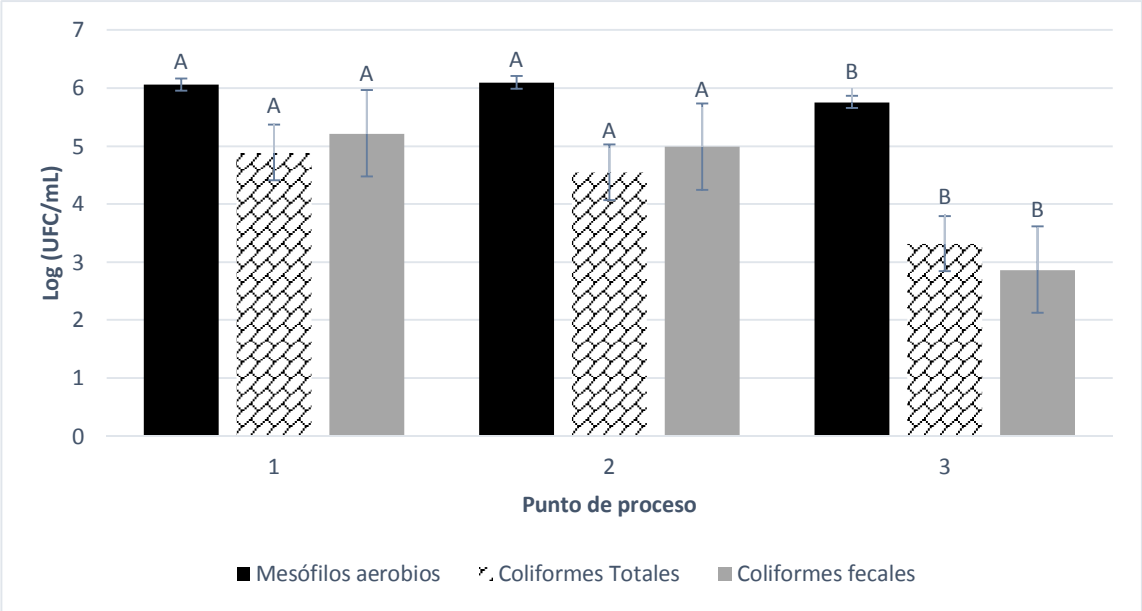

Figura 5. Cuentas bacterianas del segundo cohorte generacional (Log de UFC/mL). Los tres indicadores sanitarios evaluados al inicio de la biodigestión (1), al final de la misma (2) y al final del proceso complementario (3). Las barras del mismo color con diferente literal, indican diferencia estadística (P<0.05), n=5.

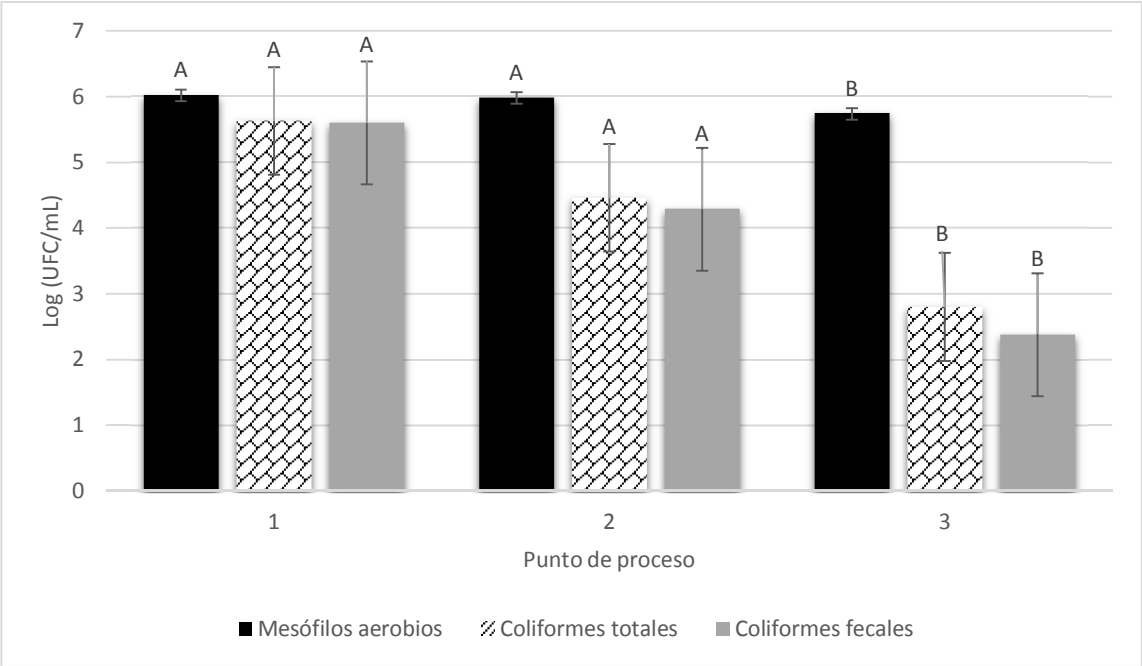

Figura 6. Cuentas bacterianas del tercer cohorte generacional (Log de UFC/mL). Los tres indicadores sanitarios evaluados al inicio de la biodigestión (1), al final de la misma (2) y al final del proceso complementario (3). Las barras del mismo color con diferente literal, indican diferencia estadística (P<0.05), n=5.

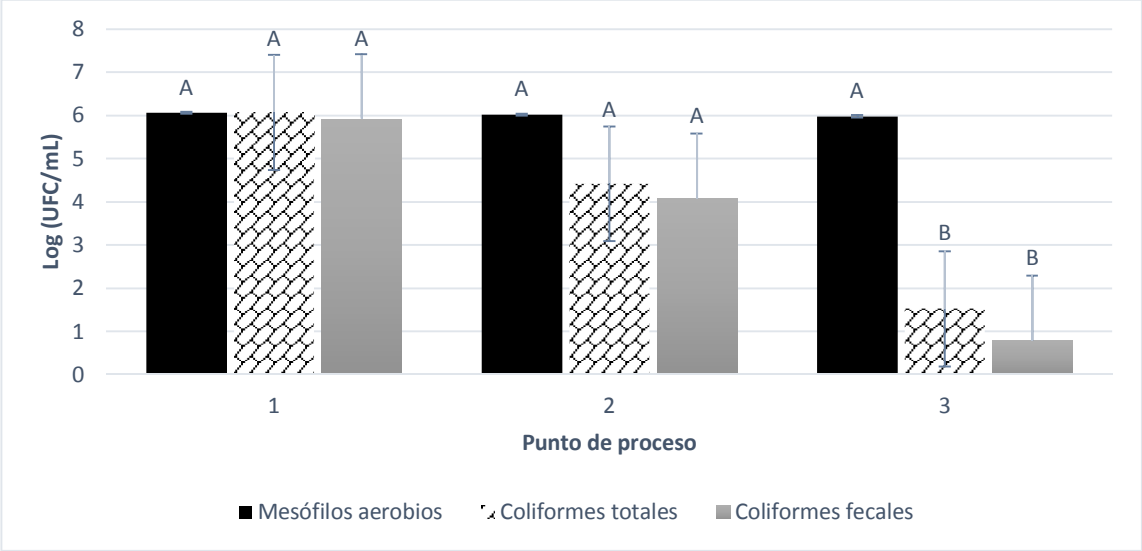

Figura 7. Cuentas bacterianas del cuarto cohorte generacional (Log de UFC/mL). Los tres indicadores sanitarios evaluados al inicio de la biodigestión (1), al final de la misma (2) y al final del proceso complementario (3). Las barras del mismo color con diferente literal, indican diferencia estadística (P<0.05), n=5.

Como puede observarse en las Figuras 4, 5, 6 y 7, la población mesofílica en las cuatro generaciones permaneció prácticamente sin alteración a lo largo del proceso de biodigestión y del proceso complementario, mientras que las poblaciones de coliformes sí presentaron una tendencia hacia la disminución en su población. Considerando que el comportamiento en las cuatro generaciones en general fue similar, se obtuvo un promedio para los indicadores en cada zona, y a partir de esos datos se observaron las diferencias ($p<0.05$) que aparecen en las Figuras 8, 9 y 10.

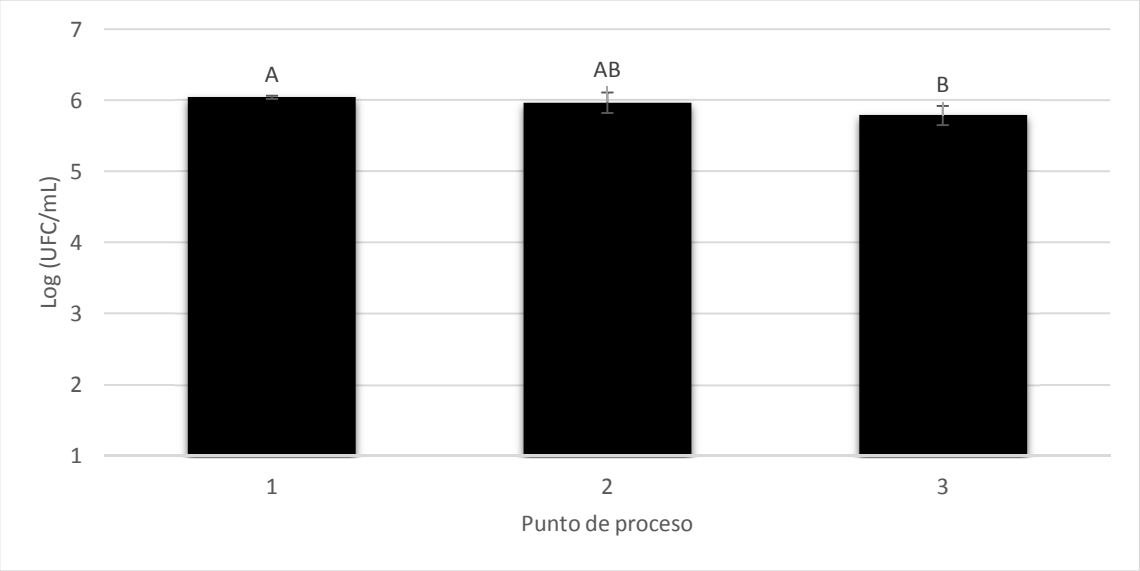

Figura 8. Población de mesófilos aerobios (Log UFC/mL) a través del proceso de biodigestión y complementario. Las barras con diferente literal, indican diferencia estadística ($P<0.05$), n=20.

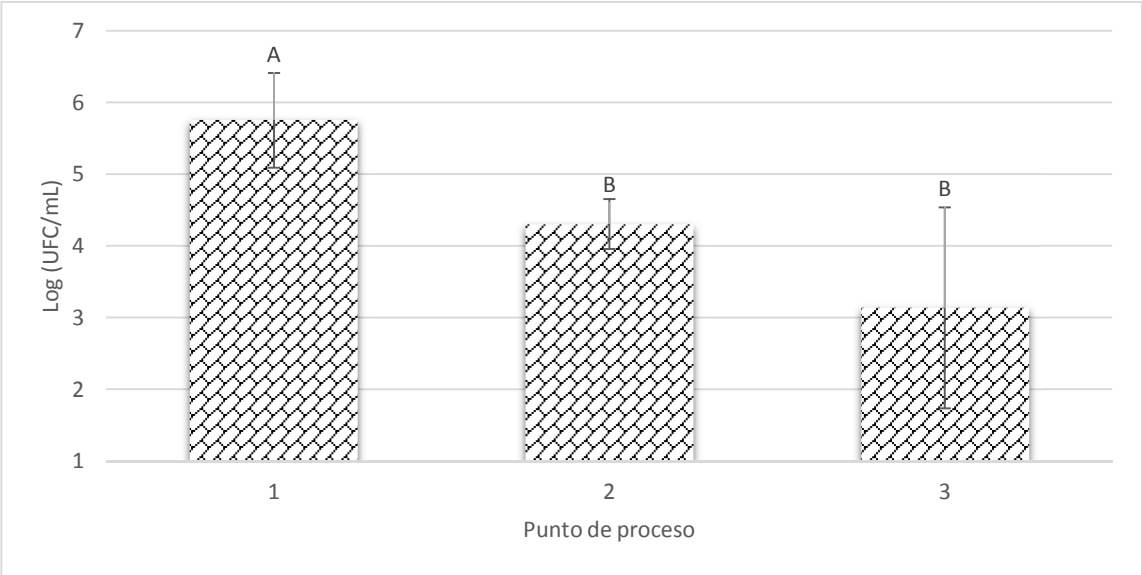

Figura 9. Población de coliformes totales (Log UFC/mL) a través del proceso de biodigestión y complementario. Las barras con diferente literal, indican diferencia estadística (P<0.05), n=20.

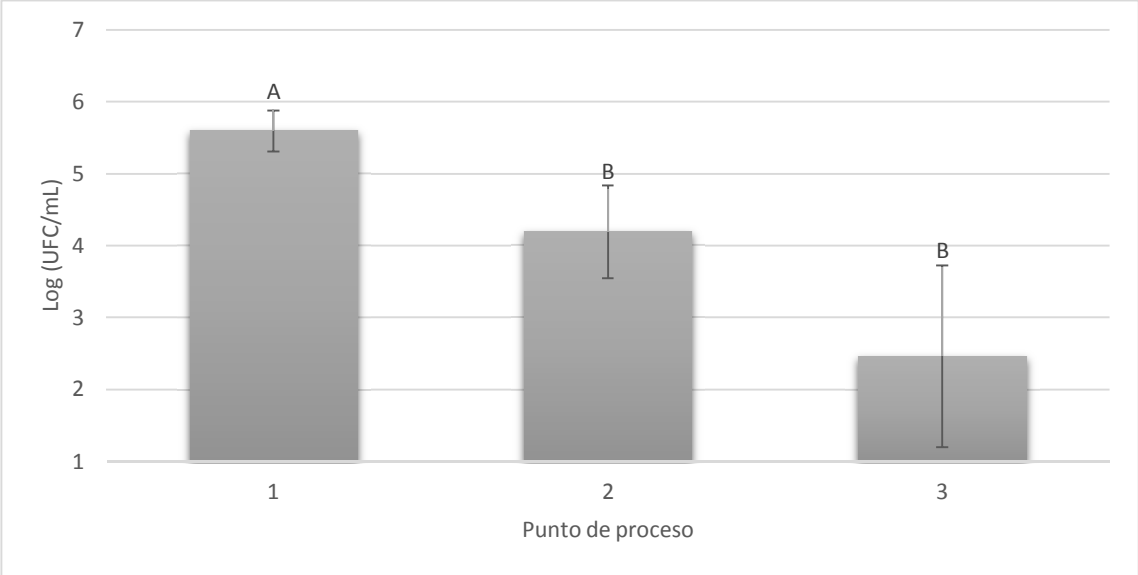

Figura 10. Población de coliformes fecales (Log UFC/mL) a través del proceso de biodigestión y complementario. Las barras con diferente literal, indican diferencia estadística (P<0.05), n=20.

Como puede observarse en la Figura 8, la población mesofílica promedio en los tres puntos analizados fue de 6.03, 5.9 y 5.72 Log de UFC/mL, respectivamente.

Lo que demuestra que la aparente disminución en la población de estas bacterias entre el punto 1 y 2 fue solo una tendencia, ya que el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre estos puntos muestreados, pero sí existió dicha diferencia estadística entre los puntos 1 y 3, es decir entre el inicio y al terminar el proceso complementario. Por lo que se mantiene la importancia de llevar a cabo el proceso complementario, ya que la biodigestión convencional no disminuye estadísticamente ($P>0.05$) dicho parámetro, mientras que el proceso de biodigestión aunado a la estrategia complementaria sí lo hace.

Por otro lado, la población de coliformes totales (Figura 9), presentó valores en los tres puntos analizados de 5.53, 4.37 y 4.32 Log de UFC, respectivamente. Como puede observarse, el proceso de biodigestión logró reducir significativamente la población en 1.16 log UFC/mL y aunque la tendencia hacia la reducción se mantuvo, ya que al finalizar el proceso complementario la reducción en comparación con el valor obtenido al finalizar la biodigestión fue de 0.05 Log UFC/mL, esto solo mostró una tendencia y no una diferencia significativa debido a la alta variabilidad que se obtuvo en los datos durante las diferentes observaciones en el punto 3. En general la reducción de la población de coliformes totales fue de 1.21 log UFC/mL. La población de coliformes totales al inicio y al término de la biodigestión sí fue diferente estadísticamente, y aunque se mantuvo la tendencia hacia la reducción, este cambio no fue significativo entre la biodigestión y el proceso complementario. Puede inferirse que si variabilidad encontrada al final del proceso complementario puede ser reducida, entonces el potencial para reducir la carga de coliformes totales sería verdaderamente interesante, ya que el umbral potencial de reducción puede estar en el orden de los 2 Log, con lo cual es altamente probable que los efluentes puedan cumplir con los estándares establecidos en las normas oficiales correspondientes.

Para el caso de los coliformes fecales (Figura 10), la situación fue similar a la descrita para los coliformes totales. La población de coliformes fecales presentó valores en los tres puntos analizados de 5.70, 4.59 y 3.39 log UFC/mL. Como

puede observarse, el proceso de biodigestión logró reducir (P<0.05) la población en 1.11 log UFC/mL y aunque la tendencia hacia la reducción se mantuvo, no se observó diferencia (P>0.05) entre los valores del final del proceso de biodigestión y el registrado en el proceso complementario. En general la reducción de la población de coliformes fecales fue de 2.31 log UFC/mL. La población de coliformes fecales al inicio y al terminar la biodigestión fue diferente (P<0.05), mientras que los valores entre el final del proceso de biodigestión y el proceso complementario fueron similares (P>0.05). También en este caso se puede decir que el proceso resultó satisfactorio, ya que la reducción sólo con biodigestión fue de 1.11 log UFC/mL, mientras que cuando se tuvieron los procesos de biodigestión y complementario, la reducción fue de 2.31 log UFC/mL. De forma similar a como se presentó en el caso de los coliformes totales debido a la variabilidad encontrada en los resultados de las cuentas de coliformes fecales al final del proceso complementario, si dicha variabilidad puede ser reducida, entonces existiría un potencial para reducir la carga de coliformes fecales hasta en un orden de 3 Log. Lo anterior tiene una alta probabilidad de asegurar que los efluentes sean considerados inocuos y puedan ser utilizados para los fines descritos en las normas oficiales que regulan dichos efluentes.

Soria y col (2001), así como Cruz y col (2004) reportaron una reducción total de coliformes totales (es decir una eliminación al 100% de esta población durante el proceso de biodigestión. En contra parte, otros estudios (Palacio, 2005; Betancur y col., 2016) observaron una escasa reducción de coliformes durante la biodigestión. En el presente estudio se observaron diferencias (P<0.05) entre el punto 1 (inicio de biodigestión) y punto 2 (final de biodigestión) en todos los casos, así como una tendencia hacia la disminución después del proceso complementario, con lo que se puede inferir que la estrategia complementaria es primordial para disminuir aún más los indicadores sanitarios a diferencia de solo utilizar el proceso de biodigestión convencional. Respecto al tiempo de biodigestión, Massé (2011) en un periodo de 14 días de biodigestión obtuvo una

reducción de coliformes fecales de $1.6X10^6$ a $5.0X10^2$, es decir, una reducción de 3.5 Log UFC/mL, mientras que Chen y col. (2012), obtuvieron reducciones en coliformes fecales de 1.93, 2.98 y 3.01 Log de UFC/mL en tiempos de biodigestión de 11, 16 y 25 días, respectivamente. Dichas reducciones son similares y en algunos casos mayores a las observadas en el presente trabajo, probablemente, debido al uso de condiciones de temperatura controlada en dichos estudios, mismas que en el estudio actual fueron monitoreadas y documentadas, para poder dar explicación y atribuir ciertos comportamientos inesperados en los conteos de la carga microbiana, debido a que en algunos días de toma de muestra existían temperaturas inusualmente bajas. Así mismo, en la misma investigación se observó que conforme aumentó el tiempo de biodigestión, disminuyó más la población de coliformes fecales.

6.4 Comportamiento de las Temperaturas y Valoración de los Indicadores Sanitarios Bajo Condiciones Controladas

En la Figura 11 se muestran las temperaturas registradas en condiciones del experimento a cielo abierto. Como se mencionó previamente, el factor temperatura, de acuerdo a lo reportado por la bibliografía, es un factor determinante para que se lleve a cabo la biodigestión en condiciones óptimas. Por tal motivo, a la par del experimento citado y mantenido a temperatura ambiente, se llevó a cabo también otra biodigestión bajo condiciones controladas de temperatura.

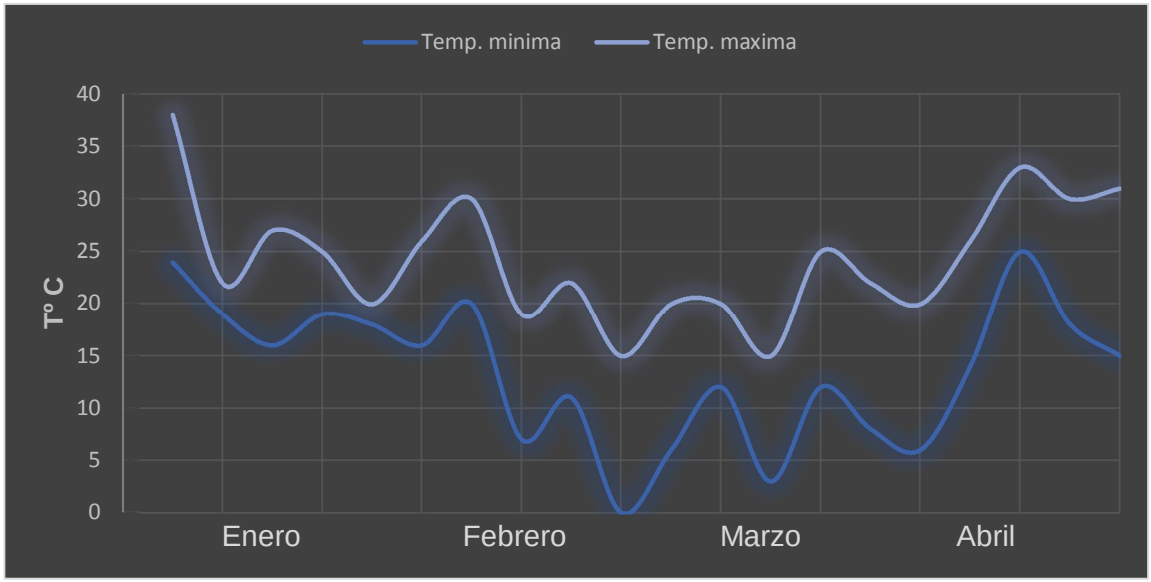

Figura 11. Temperaturas máxima y mínima a lo largo de los 4 meses en los que se llevó a cabo la biodigestión y el proceso complementario. Cada punto en el eje horizontal representa una temperatura semanal.

Las cargas bacterianas en la biodigestión bajo condiciones controladas de temperatura y su comparativo con las registradas a temperatura ambiente, se muestran en las Figuras 12 a la 14.

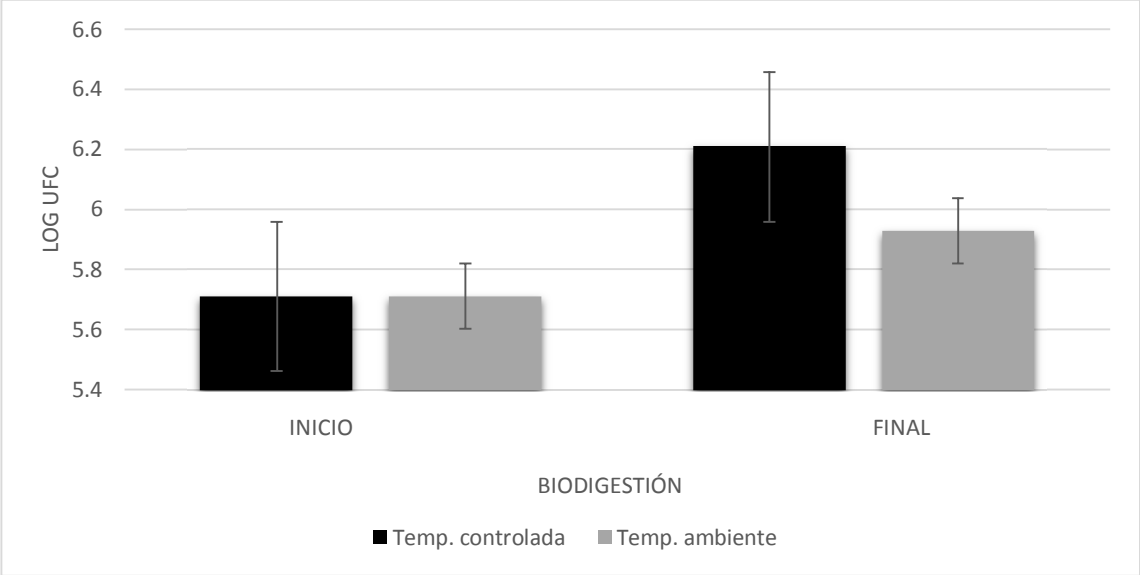

Figura 12. Comparativo de conteos de mesófilos aerobios (Log UFC/mL) durante la biodigestión a temperatura ambiente y controlada.

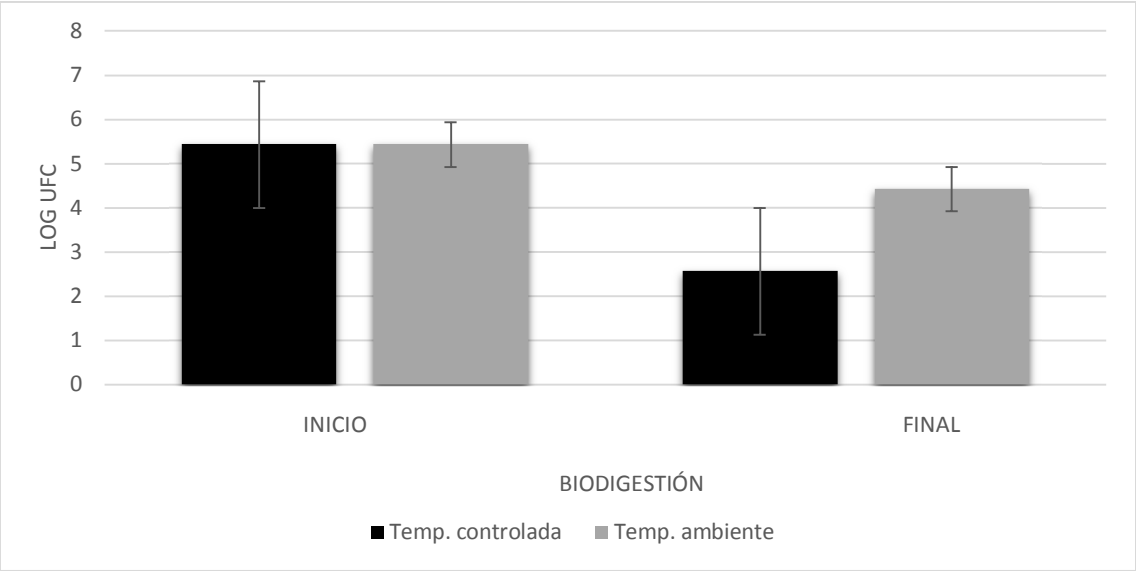

Figura 13. Comparativo de conteos de coliformes totales (Log UFC/mL) entre la biodigestión a temperatura ambiente y controlada.

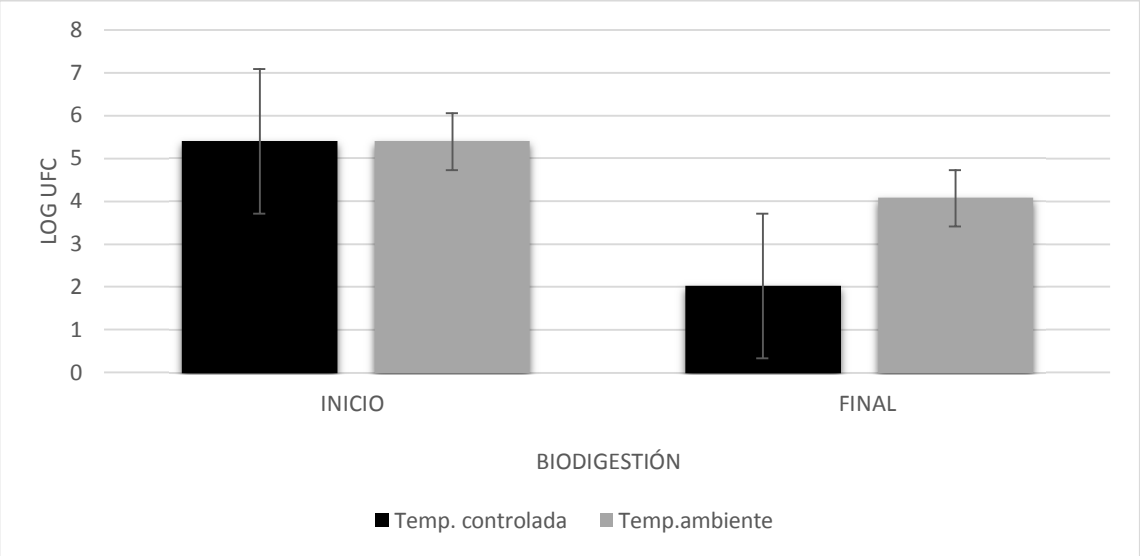

Figura 14. Comparativo de conteos de coliformes fecales (Log UFC/mL) entre la biodigestión a temperatura ambiente y controlada.

En la Figura 12 se puede observar que la población aerobia no sufrió disminución, al contrario aumentó su valor, lo cual puede explicarse considerando que los mesófilos aerobios estaban en condiciones que favorecieron su desarrollo. Este resultado concuerda con el obtenido por Bonjoch y Blanch en 2009; quienes

reportaron que durante una biodigestión anaeróbica en condiciones de temperatura controlada de 35° C, durante 20 días, no se logró observar una disminución de la población mesofílica, manteniéndose durante todo el estudio en un valor promedio de 7.42 log UFC/mL. Es importante mencionar que en dicho estudio para evaluar la población mesofílica siguió un método similar al utilizado en el presente estudio.

Así mismo, dentro del experimento bajo condiciones controladas de temperatura se obtuvo una reducción de coliformes fecales del 99.55% de la población, variando desde 5.23 hasta 2.02 Log UFC/mL, mientras que bajo condiciones ambientales, partiendo de la misma concentración, al final de la biodigestión se observaron poblaciones para este indicador de 4.86 log UFC/mL al final del proceso. Esto nos indica que la reducción de la población de coliformes fecales sería mucho más efectiva si la temperatura se mantiene constante a 36° C. Estas condiciones pueden fácilmente ser mantenidas en la región desértica de Sonora de primavera a otoño. Coté y colaboradores en 2006, mencionan una reducción de coliformes totales y fecales del 97.9% y 99.7% respectivamente, durante 20 días a 20ºC, mientras que un estudio similar (Vargas y Solano, 2012) arrojó una reducción en coliformes fecales del 98.76%, partiendo de una población inicial de 5.17 Log UFC/mL y finalizando con 3.27 Log UFC/mL. Estos datos nos permiten inferir la importancia y el papel fundamental de la temperatura dentro del proceso de biodigestión. Adicional a la biodigestión, el proceso complementario mostró que las poblaciones de coliformes (totales y fecales) pueden disminuir aún más en comparación con la disminución alcanzada solo con la biodigestión.

Es factible mantener el biodigestor acoplado al sistema complementario, alcanzando reducciones muy favorables de la población coliforme que es uno de los principales problemas que imposibilitan la descarga de estos materiales debido al impacto negativo en el medio ambiente y al mayor riesgo a la salud.

Es fundamental en nuestro estudio el monitoreo de las temperaturas, debido a que bajo condiciones controladas de temperatura óptima a la que se lleva a cabo

el proceso de biodigestión, los indicadores analizados disminuyen de la manera esperada, sin embargo, los biodigestores anaerobios comerciales se encuentran bajo condiciones ambientales que pueden sufrir fluctuaciones de temperatura y así afectar el proceso.

La falta de reducción encontrada en el sistema montado con temperatura ambiental, puede ser explicada principalmente considerando el efecto inusual de las temperaturas en la región y esta hipótesis se fortalece aún más al observar los resultados obtenidos en el sistema con temperatura controlada.

6.5 Microcalorimetría

Cada una de las muestras obtenidas para el análisis microbiológico descrito en los apartados anteriores, fue también utilizada para determinar en la misma el calor metabólico. El calor metabólico es el calor producido mediante la energía metabolizable, es decir es el calor que emite una muestra debido a la actividad metabólica de todos los microorganismos presentes en la misma (Martínez y col., 2003). Dicho parámetro fue determinado en alícuotas de cada muestra, mismas que se estabilizaron durante 600 segundos, procediendo a registrar el dato correspondiente a 3600 segundos de medición. Para cada una de las muestras, se seleccionaron 10 datos generados alrededor de estos 3600 segundos y se utilizó el valor promedio de los mismos. Estos resultados pueden observarse en la Cuadro 3.

Cuadro 3. Valores de calor metabólico (µwatts / mL) de cada uno de los muestreos.

Generación	muestra	(µwatts / mL)		
		zona1	zona2	zona3
1	1	33.75	13.47	4.9
	2	35.67	0.47	5.39
	3	37.71	23.42	1.3
	4	28.86	12.45	3.82
	5	25.92	0.65	5.84
2	1	4.52	1.92	23.29
	2	8.14	4.25	14.86
	3	4.49	0.29	3.26
	4	1.18	2.07	14.58
	5	9.25	5.06	14.09
3	1	28.1	12.84	2.26
	2	5.61	13.78	4.92
	3	1.69	15.72	1.06
	4	1.07	20.24	0.41
	5	3.67	19.25	0.98
4	1	108.51	0.95	3.82
	2	105.12	5.24	6.17
	3	91.97	0.59	0.97
	4	125.08	20.42	4.36
	5	117.01	5.21	5.59
	Promedio ± DE	38.86 ± 44.00	8.91 ± 7.96	6.09 ± 5.99

Los datos mostrados en el Cuadro 3 se analizaron por regresión lineal con los valores respectivos obtenidos para cada uno de los indicadores sanitarios analizados. Los algoritmos determinados, así como los valores para el coeficiente de determinación se muestran en el Cuadro 4. Es importante mencionar que los datos correlacionados fueron los valores obtenidos para cada uno de los indicadores sanitarios determinados por la técnica microbiológica correspondiente y expresados en Log UFC/mL y los valores de calor metabólico obtenidos para cada una de las muestras correspondientes en cada uno de los puntos de muestreo (se tenían veinte observaciones en cada zona de muestreo).

Cuadro 4. Ecuaciones de regresión lineal y coeficientes de determinación entre las mediciones de calor metabólico y población bacteriana de cada uno de los indicadores sanitarios

Indicador	Ecuación	Coeficiente de determinación (R^2)
Mesófilos Aerobios	$y = -6x10^{-05}x + 36.309$	0.6166
Coliformes Totales	$y = -6x10^{-05}x - 6.1671$	0.9947
Coliformes Fecales	$y = -8x10^{-05}x - 6.7503$	0.9979

Los altos valores calculados con el coeficiente de determinación indican que la medición de calor metabólico puede ser utilizada como una variable confiable para confirmar las poblaciones de coliformes totales y fecales en muestras de efluentes. La utilización de microcalorimetría para complementar una técnica microbiológica convencional ha sido previamente reportada, aunque para matrices diferentes. Un estudio realizado por Gardea y col. (2002) mostró una alta regresión entre la medición de calor metabólico y población mesofílica aerobia ($R^2 = 0.99$) en muestras de leche, obteniendo resultados similares a los que arrojaron nuestros experimentos. La microcalorimetría, siendo una técnica tan sencilla, solamente relaciona la cantidad de calor generado por una muestra y dicho calor está en función de la actividad metabólica de dicha muestra, así como de la calidad de misma; esto es, si la muestra es homogénea, los datos resultantes también lo son. Considerando las condiciones de este trabajo, esta reflexión implica que el menor coeficiente de determinación estimado para mesófilos aerobios, debe ser causado por una mayor variabilidad dentro de la muestra que se mide en el calorímetro; por lo tanto las técnicas analíticas utilizadas para la determinación de coliformes totales y fecales, al arrojar datos más precisos, aportan menos variación al análisis microcalorimétrico y por lo tanto la regresión es más exacta. Ciertamente que el tiempo de análisis calorimétrico es considerablemente más corto, pero esto no incluye el tiempo de preparación de las muestras que se requiere para que la alta precisión sea

posible. Adicionalmente, los datos sugieren que los mesófilos aerobios están sujetos a otros factores que influyen en su expresión.

.

VII. CONCLUSIONES

Se lograron determinar las cinéticas bacterianas para los tres indicadores sanitarios estudiados (mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales), utilizando métodos microbiológicos basados en el cultivo en placa durante el proceso de biodigestión y el complementario. Mediante estos métodos, se logró observar que la población mesofílica no sufre cambios significativos ($P<0.05$) a lo largo del proceso de biodigestión, aunque si una tendencia hacia la disminución del parámetro, pero al finalizar el proceso complementario, la disminución de la población si fue significativa respecto al inicio del proceso completo ($P<0.05$).

Sin embargo, las poblaciones de coliformes sí presentan cambios significativos. El proceso de biodigestión para el caso de los coliformes tanto totales como fecales mostró disminución significativa ($p<0.05$). Cuando se compararon los valores al finalizar la biodigestión con los valores después del proceso complementario, ya no se presentó una disminución significativa sino una tendencia hacia la reducción del parámetro ($P>0.05$). Se asume que esta reducción solo fue una tendencia debido a las inusuales temperaturas bajas que se presentaron durante el tiempo del estudio. Mientras que la población aeróbica mesofílica se correlacionó en una escala significativamente menor con la medición de calor metabólico, las poblaciones de coliformes totales y fecales sí pudieron ser correlacionadas con valores superiores al 99% según el coeficiente de determinación. Por lo tanto, la evaluación de estas poblaciones mediante microcalorimetría puede ser utilizada para predecir el nivel de eficiencia del proceso de biodigestión y el proceso complementario.

Mediante la valoración de la carga de indicadores sanitarios estudiados durante este trabajo, se pudo confirmar la importancia de una estrategia complementaria al proceso de biodigestión convencional y de esta forma reducir aún más la carga microbiológica de interés.

Mediante la evaluación de los indicadores sanitarios, se logró establecer la importancia del proceso y las diferencias significativas que existen, cuando se implementa solo la biodigestión convencional y como las reducciones son mayores cuando se adiciona un proceso complementario.

Aunado a este trabajo se pudo comprobar el importante rol que juega la temperatura en dichos procesos, ya que la implementación de biodigestores de campo siempre está a expensas de las condiciones ambientales de la región en la que éste sea ubicado.

Además, se obtuvieron datos de correlación entre la microbiología convencional y la microcalorimetría isotérmica, que nos permitieron proponer a este último como un método preciso, rápido y confiable para llevar a cabo valoraciones de los indicadores sanitarios tratados en el presente trabajo, obteniendo como beneficio el ahorro en insumos de laboratorio y tiempo de trabajo aplicado en procedimientos convencionales.

VIII. RECOMENDACIONES

Durante el experimento se tomaron las precauciones una vez iniciado el proceso, de que la materia orgánica no tuviera contacto con el oxígeno, sin embargo el diseño del biodigestor no permite pasar de la bolsa de biodigestión a la bolsa complementaria sin tener contacto con dicho elemento; por lo que se recomienda rediseñar la parte intermedia y buscar la forma de dejar completamente hermético ese punto crítico, para que este paso crucial del experimento no interfiera con la valoración de los indicadores sanitarios, en especial con la disminución de mesófilos aerobios.

Por otra parte, las técnicas de microbiología molecular son de gran importancia para conocer la población en general de todas las bacterias presentes durante el proceso de biodigestión y proceso complementario, o en su caso conocer y monitorear la huella molecular de un microorganismo de fundamental importancia presente durante dicho proceso. Por lo que se recomienda utilizar la técnica de Electroforesis en Gel por Gradiente Desnaturalizante (DGGE), con la finalidad de conocer la identidad particular (género y especie) de microorganismos patógenos.

Debido a que el sistema se encuentra a temperatura ambiente, las fechas recomendadas para llevar el proceso de biodigestión y el proceso complementario para ver la reducción de los indicadores sanitarios debe llevarse a cabo durante el verano, además se propone diseñar una estrategia para poder controlar las fluctuaciones de temperatura que afectan directamente el proceso de biodigestión y proceso complementario, como puede ser algún sistema de serpentines o resistencias que permitan manipular la temperatura en el interior del biodigestor.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Almeida, A., Nafarrate, R., Alvarado, A., Cervantes, O., Luevanos, O. R., & Balagurusamy, N. (2011). Expresión genética en la digestión anaerobia: un paso adelante en la comprensión de las interacciones tróficas de esta biotecnología. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila 3*(6).

Bagge E, Sahlstrom L, Albihn A. 2005. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Research* 39: 4879-4886.

Berridge NJ, Cousins CM, Cliffe AJ. 1974. Microcalorimetry applied to certain species of bacteria growing in sterilized separated milk. *Journal of Dairy Research* 41: 203 ï 215.

Betancur, O., Betancourt, A., Estrada, J. n., & Henao, F. (2016). Persistence of pathogens in liquid pig manure processed in manure tanks and biodigesters. *Revista MVZ Córdoba*, 21(1), 5237-5249.

Blanch AR, Muñoz L, Bonjoch X, Ebdon J, Gantzer C, Lucena F, Ottoson J, Kourtis C. 2004. Tracking the origin of faecal pollution in surface water. *Journal Water Health* 22: 249-260.

Bond T, Templeton MR. 2011. History and future of domestic biogas plants in the developing world. *Energy for Sustainable Development* 15: 347-354Bonjoch, X., & Blanch, A. (2009). Resistance of faecal coliforms and enterococci populations in sludge and biosolids to different hygienisation treatments. *Microbial Ecology*, 57(3), 478-483.

Bonjonch, X., & Blanch, A. 2009. Resistance of faecal coliforms and enterococci populations in sludge and biosolids to different hygienisation treatments. *Microbial ecology*, 57(3):478-483.

Botero, B., & Preston, T. R. (1987). Biodigestor de bajo costo para la producción de combustible y fertilizante a partir de excretas. Manual para su instalación, operación y utilización*. Centro Internacional de Agricultura Tropical.* Cali, Colombia, 353-362.

Buenrostro O, Bocco G. 2003. Solid management in municipalities in Mexico: goals and perspectives*. Resources, Conservation and Recycling* 39: 251 - 263.

Cabral, M. E. S. 2007. Optimizacion de las condiciones para el estudio de actividad microbiana de suelos por calorimetría isotérmica. *Primeras Jornadas de Jóvenes Investigadores* de UNT-AUGM.

Charles W, Walker L, Cord Ruwisch R. 2009. Effect of pre-aeration and inoculum on the start-up of batch thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste. *Bioresources of Technology* 100: 2329ï 2335.

Chen, Y., Fu, B., Wang, Y., Jiang, Q., & Liu, H. (2012). Reactor performance and bacterial pathogen removal in response to sludge retention time in a mesophilic anaerobic digester treating sewage sludge. *Bioresource of Technology, 106*, 20-26.

Côté, C., Massé, D. I., & Quessy, S. (2006). Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. *Bioresource Technology, 97*(4), 686-691.

Cruz, E., Martínez, V., Naranjo, R., Sosa, R., Postal, G., & Brava, P. (2004). Evaluación microbiológica del efluente anaerobio de un biodigestor de cúpula fija. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 11(2), 89-95.

Dominguez G, Salazar G, Galindo AJ, Xenhuatzi J, Castañeda M, Sánchez FJ, Hernandez P. 2012. Implementación de biodigestores para pequeños y medianos productores porcícolas. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. Folleto para Productores 1: 7 ï 23.

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, [PNUD] Programa de las Naciones para el Desarrollo, [GEF] *Global Environmental Facility*. 2011. Manual de Biogás. Santiago de Chile. 1(1): 45 - 114.

Feng, P., Weagant, S. D., Grant, M. A., Burkhardt, W., Shellfish, M., Water, B. (2013). BAM: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. *Bacteriological Analytical Manual*, 13.

Figueroa Viramontes, U., Cueto Wong, J. A. (2003). Uso sustentable del suelo y abonos orgánicos. Abonos Orgánicos y Plasticultura. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Relación Agua-Suelo-Planta-Atmósfera. INIFAP.

Gardea AA, Carvajal E, Higuera I, Figueroa C, Molina J, Rascón A, Orozco A, Inda A. 2002. Calorimetric assessment of microbial growth in milk as affected by different conditions. *Thermochimica Acta* 394: 179 ï 184.

Garfí M, Gelman P, Comas J, Carrasco W, Ferrer I. 2011. Agricultural reuse of digestate from low-cost tubular digesters in rural Andean communities. *Waste Management* 31: 2584-2589.

Geldreich, E. E., Clark, H. F., Huff, C. B., & Best, L. C. (1965). Fecal-coliform-organism medium for the membrane filter technique. *Journal American Water Works Association 57*(2), 208-214.

Guzman C, Jofre J, montemayor M, Lucena F. 2007. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *Journal of Applied Microbiology* 103: 2420-2429.

Khanal, S. K. (2008). Anaerobic biotechnology for bioenergy production. *Iowa: Wiley-Blackwell. p, 179*.

Lesteur M, Bellon Maurel V, Gonzalez C, Latrille E, Roger JM, Junqua G, Steyer JP. 2010. Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: A review. *Process Biochem* 45: 431ï 440.

Manahan SE. 2007. Introducción a la Química Ambiental. 1ª edición. México D.F. Editorial Reverte Ediciones. 320 p.

Mandujano A, Félix A, Martínez AM. 1981. Biogás, energía y fertilizantes a partir de desechos orgánicos. Organización Latinoamericana de Energía. Cuernavaca, Morelos, México 6: 28 ï 41.

Martí HJ. 2008. Biodigestores familiares. Guía de diseño y manual de instalación. Cooperación Técnica Alemana ï GTZ. Bolivia. ISBN: 978-99954-0-339-3

Martínez, G. D. M., Rodríguez, J. M. P., Velasco, R. R., Ibáñez, E. M. A., & Rubio, Y. R. R. (2003). Para estimar el balance calórico de bovinos en pastoreo. *Interciencia, 28*(4), 202-207.

Morales, D. 2014. Identificación de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en un biodigestor alimentado con heces de rumiantes. Universidad de Sonora. Tesis de Licenciatura. Químico Biólogo Clínico.

Moreno, J. C., & Giraldo, L. (2006). Registro del calor desarrollado por levadura seca en presencia de sacarosa por microcalorimetría isotérmica. Revista CENIC. *Ciencias Químicas*, 37(3), 173-177.

Massé, D., Gilbert, Y., & Topp, E. (2011). Pathogen removal in farm-scale psychrophilic anaerobic digesters processing swine manure. *Bioresource Technology, 102*(2), 641-646.

Muylaert MS, Sala J, de Freitas MAV. 2000. Consumo de energía e aquecimiento do planeta: analise do mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL) do protocolo de Quioto. Rio de Janeiro: Post-graduate Engineering Programs Coordination (COPPE).

NORMA OFICIAL MÉXICANA NOM-003-ECOL-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público.

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. Diario Oficial de la Federación, 15.

NORMA OFICIAL MÉXICANA NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Palacio, O. (2005). Evaluación de un sistema discontinuo de biodigestión anaerobia para el tratamiento de desechos avícolas. *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela*, 20(4), 105-112.

Puri A., Dudley EG. 2010. Influence of indigenous eucariotic microbial comunities on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in compost slurry. *FEMS microbiology letters,* 313(2): 148-154.

Puerta S. 2003. Los residuos sólidos municipales como acondicionadores de suelos. Revista Lasallista de Investigación 1: 56 ï 65.

Ravoo BJ, Weringa WD, Engberts JB. 2000. Fusion of Sendai virus with vesicles of oligomerizable lipids: a micro calorimetric analysis of membrane fusion. *Cell Biology International* 24: 787-797.

[SEMARNAT] Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, la gestión ambiental en México. 2006. Hacia el desarrollo sustentable, avances, retos y oportunidades - ISBN SBN 968-817-795-4

Soria FM, Cerrato FR, Barra EJ, Gonzalez AG, Santos TJ, Gomez BL, Perez PG. 2001. Producción de biofertilizante mediante excreta líquida de cerdo. *Terra* 19: 353-362.

Surendra KC, Takara D, Hashimoto AG, Khanal KS. 2014. Biogas as a sustainable energy source for developing countries: Opportunities and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 31: 846-859.

Teeling H, Cypionka H.1997. Microbial degradation of tetraethyl lead in soil monitored by microcalorimetry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 275 ï 279.

Teglia C, Tremier A, Martel JL. 2010. Characterization of solid digestates: part 1, review of existing indicators to assess solid digestates agricultural use. Springer Science. Business Media B.V. 2(1): 43 ï 58.

Troschinetz AM, Mihelcic JR. 2009. Sustainable recycling of municipal solid waste in developing countries. *Waste Management* 29: 915ï 923.

Vargas, M. F., & Solano, O. R. (2012). Obtención de un mejorador de suelos como subproducto de la digestión anaerobia de desechos orgánicos en el TEC. *Tecnología en Marcha*, 25(3), 1.

Vinneras B, Schonning C. 2011. Microbial risks associated with biogas and biodigestor sludge. *Encyclopedia of Environmental Health Burlington*: Elsevier 757-764.

Vízquez JA. 2011. Dimensionamiento de un biodigestor para el sector agropecuario. Lecherías o porquerías. 54:7412 - 8923

Wadsö, I. (1997). Trends in isothermal microcalorimetry. *Chemical Society Reviews*, 26(2), 79-86.

Weiland P. 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 849-860.

Zieminski K, Frac M. 2012. Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: transformations, stages and microorganisms. *African Journal of Biotechnology* 11: 4127- 4139.