



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

MASTER EN INGENIERIA AMBIENTAL

MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Autor: Claudia Chao Reyes
Tutor 1: Pedro Antonio García Encina
Tutor 2: Israel Díaz Villalobos

Valladolid, Julio, 2022

Resumen

En el presente trabajo se evaluó el proceso de digestión anaerobia mesófila como alternativa de tratamiento a los residuos provenientes de las granjas industriales porcinas y de una planta de tratamiento de aguas residuales. La experimentación se desarrolló a escala de laboratorio, durante un período de 40 días. El proceso se realizó en dos reactores (R_1 y R_2) de mezcla perfecta, operando en modo semicontinuo a una temperatura de ± 35 °C. Para el montaje del experimento fueron agregados en cada reactor 2 L del inóculo Fango Anaerobio y con respecto a la alimentación, se estudiaron dos sustratos: el Purín de Cerdo (P), añadido a R_1 , y el Fango Mixto Espesado (FME), añadido a R_2 . Como parte del montaje, diariamente se alimentaron 100 mL de cada sustrato y fueron retirados 100 mL de efluente de R_1 y R_2 . Para el seguimiento y evaluación del proceso se estudiaron 9 variables: Producción de Biogás DQO_{Total} , Sólidos Totales (ST), Sólidos Volátiles (SV), Nitrógeno Total, Nitrógeno Amoniacal, pH, Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) y cuantificación de patógenos a partir de la técnica qPCR. Para la digestión de purines se obtuvieron rendimientos de eliminación de SV y DQO de 43 y 70 %, respectivamente y una producción de 285 mL CH_4/g $DQO_{eliminada}$. Con respecto a la digestión de lodos se reportaron rendimientos de eliminación de SV y DQO de 48 y 57 %, respectivamente y una producción de 310 mL CH_4/g $DQO_{eliminada}$. A partir del proceso de digestión llevado a cabo, se eliminan de los purines los genes de resistencia *intl1* y *sul1*, con un 81 y 86% de eliminación, respectivamente. Para la digestión de lodos, se alcanzaron valores de remoción de 96 y 73% para los genes *intl1* y *sul1*, respectivamente.

Abstract

In the present work, the mesophilic anaerobic digestion process was evaluated as an alternative treatment for waste from industrial pig farms and a wastewater treatment plant. The experimentation was carried out on a laboratory scale, for a period of 40 days. The process was carried out in two perfectly mixed reactors (R_1 and R_2), operating in semi-continuous mode at a temperature of ± 35 °C. For the set-up of the experiment, 2 L of the Anaerobic Sludge inoculum were added to each reactor and, with respect to the feed, two substrates were studied: swine manure (P), added to R_1 , and mixed sludge (FME), added to R_2 . As part of the setup, 100 mL of each substrate were fed daily and 100 mL of effluent from R_1 and R_2 were withdrawn. For the monitoring and evaluation of the process, 9 variables were studied: Biogas Production COD_{Total} , Total Solids (TS), Volatile Solids (VS), Total Nitrogen, Ammoniacal Nitrogen, pH, Volatile Fatty Acids (VFAs) and quantification of pathogens from the qPCR technique. For swine manure digestion, SV and COD elimination yields of 43 and 70%, respectively and a production of 285 mL CH_4/g COD eliminated were obtained. Regarding sludge digestion, SV and COD elimination yields of 48 and 57%, respectively, and a production of 310 mL CH_4/g COD eliminated were reported. From the digestion process carried out, the resistance genes *intl1* and *sul1*, with 81 and 86% elimination, respectively, are eliminated from the manure. For sludge digestion, removal values of 96 and 73% were reached for the *intl1* and *sul1* genes, respectively.

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Agradecimientos

A Dios y a la Virgencita, por acompañarme en esta etapa de mi vida.

A mis padres y mi hermano, por darme su apoyo incondicional, a pesar de la distancia que nos separa.

A Edu, por ser mi compañero y sostén, por entregarme su amor y apoyo día a día.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) y a la Universidad de Valladolid, por haberme brindado la oportunidad de superarme académica y profesionalmente a través del Máster de Ingeniería Ambiental.

A mis profesores, por haberme formado durante este año.

A mi tutor Israel, por brindarme la posibilidad de desarrollar el tema de tesis.

A Dani y a su familia, por haberme apoyado incondicionalmente.

A Gabita, por sus consejos.

A Amanda, Sandra, Yanet, Adry, Gaby, Grissel, Talusita y Luisito, por ser incondicionales a pesar de la distancia.

A mis niños Shey, Patri, Belu, Ilo, Mile, Yohana, Lau y Susana, y a todos mis amigos del Máster, por recorrer conmigo esta bella etapa y haberse convertido en mi familia.

A mis compañeros de trabajo y a Roberto, por contribuir en mi formación académica y profesional.

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Dedicatoria

A Mimí, porque sé que los temas tratados en esta investigación te gustaban tanto, que seguramente esta tesis hubiese sido tuya.

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Índice	
Introducción.....	1
Capítulo 1. Revisión bibliográfica.	3
1.1. Purín de cerdo. Origen, características y composición.....	3
1.2. Usos del purín.	4
1.3. Contaminación por purines.....	5
1.3.1. Contaminación por microorganismos patógenos presentes en purines. ...	5
1.4. Contaminación por microorganismos patógenos presentes en lodos de depuradora.....	6
1.5. Bacterias resistentes a antibióticos (ARB).....	7
1.5.1. Genes de resistencia a antibióticos (ARG).....	8
1.5.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos.	8
1.6. Técnicas para la eliminación de la contaminación por purines y lodos de depuradora.....	9
1.6.1. Digestión anaerobia.	10
1.6.1.1. Etapas de la digestión anaerobia.	11
1.6.1.2. Digestión anaerobia como alternativa para la eliminación de bacterias resistentes a los antibióticos.	12
1.6.2. Hidrólisis térmica.	13
1.6.2.1. Hidrólisis térmica como alternativa para la eliminación de bacterias resistentes a los antibióticos.	14
Capítulo 2. Materiales y métodos.	15
2.1. Caracterización de las materias primas empleadas.	15
2.1.1. Inóculo.....	15
2.1.2. Fango mixto espesado.	15
2.1.3. Purín de cerdo.....	15
2.2. Proceso de digestión anaerobia.	16
2.2.1. Montaje del experimento.	17
2.2.2. Variables respuestas.	20
2.2.2.1. Eficiencia de eliminación Sólidos Volátiles y DQOTotal.	23
2.2.2.2. Carga Orgánica Volumétrica.	23
2.2.2.3. Relación metano producido/ DQO _{Total} eliminada.	24
2.3. Toma de muestras.	25
Capítulo 3. Resultados y discusión.	26
3.1. Caracterización de las materias primas empleadas.	26
3.1.1. Inóculo.....	26

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

3.1.2. Fango mixto espesado.	26
3.1.3. Purín de cerdo.	27
3.2. Evaluación del desempeño de la digestión anaerobia.	28
3.2.1. Eliminación de materia orgánica.	28
3.2.1.1. Análisis de la DQO _{Total} en la digestión de purines.	28
3.2.1.2. Análisis de la DQO _{Total} en la digestión de lodos.	29
3.2.1.3. Sólidos volátiles y rendimiento de eliminación de sólidos volátiles en la digestión de purines.	31
3.2.1.4. Sólidos volátiles y rendimiento de eliminación de sólidos volátiles en la digestión de lodos.	31
3.2.3. Nitrógeno total y nitrógeno amoniacal.	32
3.2.3.1. Digestión de purines.	32
3.2.3.2. Digestión de lodos.	33
3.2.4. pH.	34
3.2.4.1. Digestión de purines.	34
3.2.4.2. Digestión de lodos.	35
3.2.5. Ácidos Grasos Volátiles.	35
3.2.5.1. Digestión de purines.	35
3.2.5.2. Digestión de lodos.	36
3.2.6. Producción de Biogás.	37
3.2.4. Carga orgánica volumétrica.	38
3.3. Cuantificación de genes.	39
3.3.1. Gen <i>ARNr 16s</i>	39
3.3.1.1. Digestión de purines.	40
3.3.1.2. Digestión de lodos.	41
3.3.2. Gen de resistencia <i>intl1</i>	41
3.3.2.1. Digestión de purines.	41
3.3.2.2. Digestión de lodos.	42
3.3.3. Gen de resistencia <i>sul1</i>	42
3.3.3.1. Digestión de purines.	43
3.3.3.2. Digestión de lodos.	43
Conclusiones.	45
Referencias bibliográficas.	46
Anexos.	52

Introducción

En la actualidad, la sobrepoblación y los grandes consumos de alimentos derivados de ella, han propiciado la creación de sistemas de producción alimentaria poco sostenibles. La cría intensiva de animales ha sido, en este sentido, una de las prácticas más utilizadas a nivel mundial y se estima que más del 50% de la producción porcina y el 75% de la avícola, es obtenida a través de este método [1].

En el caso de la industria porcina el empleo de macrogranjas se ha convertido en una opción factible, ya que permite la concentración de decenas de miles de cabezas de ganado en un área muy reducida, incrementando los niveles de producción. Además, con su uso se ha logrado disminuir el empleo de mano de obra y los costes asociados al proceso y al mantenimiento de las instalaciones destinadas a esta actividad [2].

A pesar de las ventajas que presenta este modelo productivo, su implementación trae consigo un impacto negativo en el medioambiente y en la salud de los animales y seres humanos. Para el caso de la cría intensiva de ganado porcino, los problemas medioambientales se derivan de los residuales generados en esta práctica.

El principal residuo de las granjas industriales porcinas es el denominado purín de cerdo, una mezcla de los excrementos sólidos y líquidos de estos animales, junto a restos de comida utilizados en su alimentación y el agua de limpieza [3]. Alrededor del 95 % del purín es agua, y el resto sólidos, que contienen materia orgánica y numerosos nutrientes [4].

De manera general se estima que un cerdo produce al día de 4 a 7 L de purín, por lo que, en las macrogranjas donde pueden llegar a existir 2000 cerdos, el gran volumen de este residual generado, supone un problema [4]. Como alternativa para su disposición final, y debido a su contenido de nutrientes, se ha optado por la valorización de este residuo como fertilizante orgánico. Sin embargo, ante el incremento en el número de granjas y la necesidad de estas de deshacerse del purín, la aportación de los mismos como abono se ha realizado de manera excesiva, contaminando suelos, aguas y emitiendo a la atmósfera gran cantidad de gases [3].

Otro de los problemas derivados de la cría intensiva en la industria porcina, es el empleo de los antibióticos como tratamiento a enfermedades infecciosas, en los cerdos y como estimulante para el crecimiento animal [1]. En tal sentido, el uso reiterado de estos fármacos puede provocar en los animales la aparición de microorganismos patógenos que contengan genes de resistencia a antibióticos

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

[5], los cuales serán expulsados del organismo del animal a través de su sistema renal, por lo que pasaría a formar parte de la composición del purín.

Al ser el purín utilizado como fertilizante, las bacterias patógenas pueden contaminar suelos y aguas, además de ser absorbidos por las plantas. Respecto a esto, se tiene conocimiento que puede llegar a alojarse en los frutos que luego serán consumidos por animales y seres humanos, causando problemas en su salud.

Debido a esto se ha optado por el uso de la digestión anaerobia, como alternativa para el aprovechamiento energético de este residual y la obtención de un biofertilizante estabilizado libre de patógenos.

A pesar de los estudios realizados en este campo, queda aún mucho por investigar, por lo que este trabajo tiene como objetivos:

- **Implementar un protocolo de determinación de genes de resistencia a los antibióticos (ARG) desarrollado por investigadores del ISP, dentro de la red REPARES, para su aplicación en residuos orgánicos y digestatos.**
- **Estudiar la evolución de los genes de resistencia antimicrobiana durante el proceso de digestión anaerobia de lodos de depuradora y de purines porcinos.**
- **Evaluar la eficacia de los procesos de digestión en términos de eliminación de materia orgánica y producción de biogás.**

Capítulo 1. Revisión bibliográfica.

En el presente capítulo se abordará la temática de los purines, sus orígenes, composición y principales características. Como parte de este tema, se hará énfasis sobre la contaminación en suelos, aguas y aire producida por este residual, debido a un incorrecto manejo y disposición final de los mismos. Otro de los aspectos tratados dentro de la contaminación, será la presencia de microorganismos patógenos en los purines, y los efectos negativos que estos suponen para la salud de los seres humanos, animales y plantas. Además, se abordará la contaminación de los lodos de depuradora por patógenos. Finalmente se expondrán las diferentes tecnologías desarrolladas para el tratamiento de dichos residuos y la eliminación de los microorganismos patógenos presentes en ellos.

1.1. Purín de cerdo. Origen, características y composición.

El purín de cerdo es un tipo de estiércol compuesto por la mezcla de heces, orines, paja, restos de alimentos y agua de limpieza, que se generan en las granjas de ganado porcino. Debido a su origen y composición, puede poseer un aspecto licuado, pastoso o semilíquido, y un fuerte olor amoniacal [4]. La composición de los purines es muy variable, y depende de numerosos factores tales como la alimentación, edad y metabolismo del ganado, las condiciones ambientales y el régimen de explotación de la granja [6].

De manera general, los purines están compuestos principalmente por agua, materia orgánica, macronutrientes primarios (nitrógeno, fósforo, potasio), macronutrientes secundarios (calcio, azufre, magnesio) y micronutrientes (boro, hierro, manganeso, níquel, molibdeno, cobre y zinc) [5]. Las cantidades de cada componente varían en dependencia de la procedencia del purín, pero en general todos contienen entre 1,8 y 6,1% de materia seca, de la cual un 60 - 70% es materia orgánica. El agua ocupa los mayores porcentajes en cuanto a composición, siendo este valor igual o superior al 95% [4]. La siguiente tabla resume los porcentajes de cada componente en los purines de la Unión Europea y España.

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Tabla 1.1. Composición del purín de cerdo [7].

TABLA IV Composición típica de purines en la Unión Europea y en España			
	UNIÓN EUROPEA		ESPAÑA
	Purines Sólidos	Purines Líquidos	Purines Líquidos
Sólidos (%)	25	1 - 18	5 - 7
Materia Orgánica (%)	16,0	3,4 - 7,0	
DBO (mg l-1)	--	--	5.000 - 25.000
N-TK (%)	0,5 - 0,7	0,2 - 1,6	
N-NH4 (%)	0,07 - 0,25	0,21 - 0,36	0,30 - 0,50
P ₂ O ₅ (%)	0,10 - 0,76	0,10 - 1,20	0,10 - 0,30
K ₂ O (%)	0,4	0,2 - 0,9	0,10 - 0,30
CaO (%)	0,60	0,14 - 0,67	
MgO (%)	0,25	0,05 - 0,18	
Na ₂ O (%)	--	0,08 - 0,09	
Cd (ppm p.s.)	0,7	0,2 - 0,5	
Cr (ppm p.s.)	1,9	2,4 - 18,0	
Cu (ppm p.s.)	346	180 - 574	333 - 666
Hg (ppm p.s.)	--	0,05	
Ni (ppm p.s.)	5,0	3,2 - 17,0	
Pb (ppm p.s.)	2,8	<1,0 - 12,0	
Zn (ppm p.s.)	387	403 - 919	333 - 666
Se (ppm p.s.)	--	0,6	

1.2. Usos del purín.

A nivel mundial el purín es utilizado como un fertilizante órgano-mineral para el abono de los campos de cultivo y como materia orgánica para la mejora de los suelos. Esta alternativa demanda el empleo de grandes cantidades del residual, lo que permite la disposición final de una buena parte de los desechos generados.

En la aplicación del purín como abono, además de la cantidad de estiércol por unidad de superficie, es necesario tener en cuenta otros factores, tales como las condiciones de aplicación en suelos declarados vulnerables, terrenos en pendiente, época del año, estado del suelo en que se aplica (húmedo, helado o con nieve) y profundidad a la que será depositado el estiércol [4].

De manera general la fertilización con purín de cerdo mejora la respuesta del cultivo, aumentando los valores de producción respecto a los obtenidos con la fertilización mineral. Los suelos enmendados con este tipo de abono experimentan un incremento del pH, la conductividad eléctrica y el contenido de nitratos, fósforo, calcio y sodio. Se conoce, además, que aporta ácidos húmicos que propician la mejora de la estructura de los suelos y su capacidad de intercambio catiónico [5].

Aproximadamente entre el 85 y el 90% del fósforo que se encuentra en los purines está en forma inorgánica como fosfato de calcio, y se encuentra mayormente en la fracción sólida (90%). El fósforo contenido en el purín, es un fertilizante tan eficiente como el contenido en los fertilizantes fosforados minerales [8].

Otro de los macronutrientes imprescindibles para el crecimiento de las plantas es el potasio. Este se encuentra en los purines en forma de sales solubles, por lo que su eficiencia como abono es similar a la de los fertilizantes minerales tales como cloruro o sulfato potásico [8].

1.3. Contaminación por purines.

El uso del purín como fertilizante ha generado un problema de contaminación ambiental, producto a su inadecuada utilización. Un aporte excesivo de esta enmienda orgánica puede causar la contaminación de los suelos, debido a la ruptura del balance entre los nutrientes contenidos en el residual y los demandados por los cultivos [9]. Estos nutrientes en exceso, una vez depositados en la tierra, pueden migrar hacia las capas subterráneas contaminando las aguas que se encuentran a ese nivel.

Otro de los principales inconvenientes que presenta el uso de este residual como abono, es el impacto causado por alguno de sus componentes en el ecosistema. En el caso de los cultivos, el nitrógeno contenido en el purín puede resultar tóxico en dependencia de la forma en la que se encuentre, ya que para las plantas este nutriente solo está biodisponible en forma de nitritos y nitratos. Además, durante el proceso de conversión del nitrógeno, la fracción orgánica puede penetrar en las capas más profundas del suelo, debido a su solubilidad, y contaminar las aguas subterráneas [8].

La contaminación por fósforo es otro de los problemas derivados del uso inadecuado del purín, como fertilizante. En suelos erosionados, un exceso de fósforo y nitrógeno representa un problema, ya que estas tierras podrían llegar a los ríos contaminándolos debido a la eutrofización. Este proceso favorece la proliferación de algas que impiden que se pueda realizar la fotosíntesis, lo que afecta a la fauna acuática al reducirse el oxígeno disponible [5,8].

Otro de los problemas de contaminación es la producción de gases contaminantes. Los purines inicialmente son almacenados para su posterior utilización. Precisamente durante este almacenamiento, se puede propiciar la generación de condiciones anaerobias incontroladas, se pueden producir sulfuro de hidrógeno (SH_2), amoníaco (NH_3), metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O), siendo estos dos últimos, gases de efecto invernadero [8].

1.3.1. Contaminación por microorganismos patógenos presentes en purines.

En la industria ganadera el uso de antibióticos se ha incrementado en las últimas décadas, debido al aumento en el número de macrogranjas empleadas para la cría intensiva de animales. Este método de producción trae consigo la aparición de numerosas enfermedades infecciosas en el ganado, debido a la aglomeración de animales de diversa procedencia.

En la cría del ganado porcino los antibióticos son utilizados con dos objetivos: con fines terapéuticos, para evitar la propagación de enfermedades infecciosas entre el ganado, y como promotores de crecimiento animal, favoreciendo el control de la flora bacteriana, lo que conlleva un mayor aprovechamiento de los nutrientes y un aumento considerable de peso [10]. En la actualidad este último uso es ampliamente criticado, ya que el empleo excesivo de antibióticos puede producir graves consecuencias, no tan solo para los animales en sí, sino también para el ser humano y el medio ambiente.

En relación con este tema, diversos estudios han demostrado que la aplicación de estos medicamentos está estrechamente vinculada con la aparición, en el ganado porcino, de bacterias patógenas que poseen en su material genético genes de resistencia a antibióticos [11].

Debido a esto actualmente se investiga la prevalencia de dichos microorganismos en los excrementos del ganado porcino, uno de los principales componentes del purín del cerdo, el cual es ampliamente utilizado como fertilizante orgánico para el abono de las tierras cultivables. Muchos científicos han enfocado sus estudios en la búsqueda e identificación de los genes de resistencia a antibióticos en el estiércol porcino, ya que se tiene conocimiento que estos pueden ser transmitidos a los cultivos, que luego serán consumidos por seres humanos y animales, causando graves enfermedades.

Por esta razón, dichos microorganismos han sido calificados como contaminantes emergentes y se han creado leyes para controlar y disminuir su uso en animales de granja [12, 13].

1.4. Contaminación por microorganismos patógenos presentes en lodos de depuradora.

Los lodos de depuradora son subproductos generados en los tratamientos primarios y secundarios que tienen lugar durante el proceso de depuración de aguas residuales.

Su composición varía según la procedencia del agua residual, que puede ser de origen industrial o urbano, pero de manera general es un producto semisólido o líquido compuesto por materia orgánica, macronutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio), micronutrientes (níquel, cobre, zinc), metales pesados (cadmio, mercurio, plomo) y un gran contenido de agua (80-90%) [14].

Las aguas residuales domésticas, además de poseer los anteriores componentes, albergan concentraciones de microorganismos patógenos, debido a que estos son eliminados del organismo humano a través de sus excretas. Respecto a este tema, investigaciones han determinado la presencia de genes de resistencia a antibióticos en muchas de estas bacterias patógenas, lo cual es

consecuencia del uso excesivo de estos fármacos por parte de los seres humanos.

Las plantas de tratamientos de aguas residuales, representan un área de propagación para estos genes de resistencia a antibióticos, debido a la alta densidad de bacterias existente en ellas. Según estudios realizados, estos microorganismos no son totalmente eliminados durante los tratamientos primarios y secundarios, por lo que pueden encontrarse concentraciones de los mismos en los lodos generados en ambas etapas [15].

Debido a su contenido de nutrientes, los fangos de depuradora son ampliamente utilizados como un abono orgánico en las tierras de cultivo, llegando a sustituir en su gran mayoría a los fertilizantes químicos. La problemática que genera su empleo como fertilizantes, viene dada por los patógenos con resistencia a antibióticos que pueden contener. Estos, una vez en el suelo, son capaces de incorporarse a la cadena trófica contaminando las frutas y vegetales, que posteriormente serán consumidos por seres humanos y animales [15].

Por tal razón numerosos estudios han identificado y analizado los genes de resistencia a los antibióticos presentes en las aguas residuales y su presencia en los lodos de depuradora.

1.5. Bacterias resistentes a antibióticos (ARB).

Las bacterias resistentes a los antibióticos son aquellas que pueden sobrevivir tras el contacto con un antibiótico, ya que poseen la capacidad de resistir a los efectos del mismo. Esta capacidad adquirida es consecuencia de un proceso de selección natural, el cual viene dado por una serie de mutaciones que pueden ocurrir al azar en el material genético de una bacteria [16]. Cabe destacar que estas mutaciones se originan, debido a la gran cantidad de errores producidos en los mecanismos de reparación del ADN bacteriano.

Una vez entran en contacto los microorganismos con el antibiótico, ocurre un proceso de presión selectiva por el cual solo las bacterias que poseen el mecanismo para resistir, sobrevivirán. Dichas bacterias transmitirán esta capacidad de resistencia a través de los mecanismos de transferencia horizontal de genes, por lo que cada vez existirán más microorganismos con dicha característica [17,18].

Cualquier bacteria que adquiriera genes de resistencia, ya sea por mutación espontánea o por intercambio genético, tiene la capacidad de resistir a uno o más antibióticos. Esto se debe a que con el tiempo son capaces de acumular múltiples rasgos de resistencia, por lo que pueden volverse resistentes a muchas familias de antibióticos, denominándose bacterias multirresistentes.

1.5.1. Genes de resistencia a antibióticos (ARG).

Un gen es un segmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) que contiene la información necesaria para la síntesis de un producto génico, ya sea algún tipo de ácido ribonucleico (ARN) o una proteína.

1.5.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos.

En el caso de la resistencia a antibióticos, el gen puede codificar algún producto génico que tenga como función inhibir la acción de un determinado antibiótico. Dependiendo del producto que codifique el gen, se han establecido varios mecanismos de resistencia.

El más común de estos mecanismos es la inactivación del antibiótico por modificaciones enzimáticas. En este caso el gen codifica a una enzima (molécula orgánica de naturaleza proteica) capaz de crear cambios en la estructura del antibiótico, haciendo que este pierda su funcionalidad. La inactivación de los antibióticos β -lactámicos, se debe a las modificaciones en su estructura realizadas por las enzimas β -lactamasas, a partir de reacciones de hidrólisis. Por otra parte, las enzimas metilasas, acetil-transferasas, nucleotidiltransferasas y fosfotransferasas inhiben la acción de los antibióticos aminoglucósidos, mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación [16,19].

Otro de los mecanismos es la modificación del sitio activo, los cuales se pueden encontrar en diferentes componentes bacterianos, que involucran actividades celulares vitales. En estos sitios, el antibiótico ejerce su acción para interrumpir alguna de las funciones de la bacteria, causando su muerte. Un cambio en cualquiera de estos blancos de acción, debido a mutaciones ocurridas en los genes que los codifican, impide que el antibiótico ejerza su acción en la bacteria [16].

Los cambios en la permeabilidad de la membrana externa de la bacteria, es otro de los mecanismos de resistencia a antibióticos que se conoce. En este caso, las porinas, proteínas que se encuentran en la membrana exterior de la célula bacteriana y que tienen como función el transporte a través de la membrana de algunos elementos, entre ellos los antibióticos, pueden sufrir cambios en su estructura. Estas modificaciones estructurales, las cuales se deben a mutaciones que ocurren en el material genético de la bacteria, provocan la pérdida de la funcionalidad de la proteína, bloqueando la entrada de los antibióticos al interior de la bacteria [19].

1.5.2.1. Transferencia horizontal de genes (HGT).

La transferencia horizontal de genes es el proceso por el cual se transfiere el material genético entre organismos unicelulares, sin relación de descendencia. Este tipo de transferencia es la vía principal para propagación de los genes de resistencia a antibióticos entre bacterias [20].

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Los principales mecanismos, a través de los cuales tiene lugar este proceso son: transformación, transducción y conjugación. En la transformación la bacteria toma material genético del medio exterior, incorporándolo a su estructura [21].

La conjugación consiste en la transferencia de un plásmido (molécula de ADN extracromosómico, generalmente circular) entre una bacteria donadora y una bacteria receptora, durante el contacto directo entre ellas. Mientras que, durante la transducción, el ADN cromosómico es transferido de una bacteria a otra mediante un bacteriófago (virus que infecta a una bacteria) [22].

Existe un cuarto mecanismo denominado transposición que consiste en el movimiento de transposones, los cuales son elementos genéticos móviles que pueden tomar genes de resistencia a antibióticos, e incorporarlos en un plásmido o un cromosoma [22].

Los mecanismos descritos anteriormente se muestran en la siguiente figura.

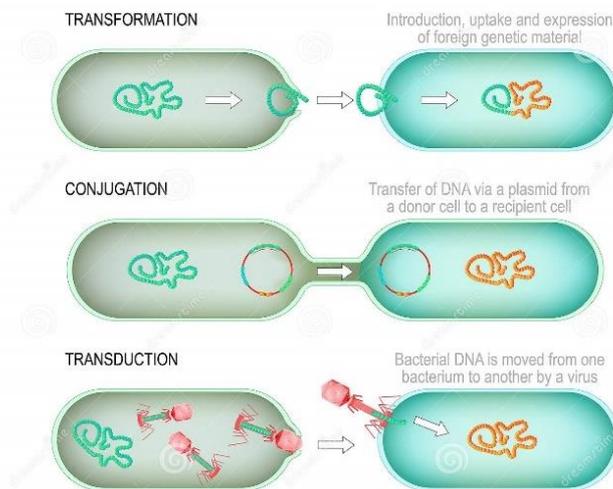


Figura 1.1. Mecanismos de transferencia horizontal de genes [23].

1.6. Técnicas para la eliminación de la contaminación por purines y lodos de depuradora.

En la actualidad, numerosas técnicas han sido implementadas con el objetivo de disminuir o eliminar la contaminación por genes de resistencia a antibióticos, presentes en los residuales provenientes de las plantas de tratamiento de aguas y de la industria ganadera.

En este aspecto, algunas de las técnicas más utilizadas son los tratamientos biológicos, entre los que se encuentran la digestión anaerobia y los físicos tales como, la hidrólisis térmica, la filtración por membranas, el proceso de adsorción

con carbón activo, la desinfección por radiación ultravioleta, ozonización, la oxidación avanzada, la fotocatalisis, la oxidación catalítica y la sonólisis [24].

Entre estos tratamientos, la digestión anaerobia se presenta como una alternativa factible para la remoción de genes de resistencia a antibióticos, debido a la experiencia y resultados adquiridos a partir del uso de este proceso para la eliminación de microorganismos patógenos. Sumando a esto, investigaciones realizadas han confirmado que las otras tecnologías son, a pesar de su eficacia, sumamente costosas y demandan un gran consumo de energía. Además de que, durante la aplicación de muchas de ellas, se generan compuestos tóxicos, que resultar dañinos para el ser humano y el medio ambiente.

El empleo de la digestión presenta numerosas ventajas, tales como altos rendimientos de eliminación de materia orgánica, bajos requerimientos nutricionales, baja demanda de energía y, parejo a todo esto, el biogás generado en el proceso [24].

La hidrólisis térmica también se ha mostrado como una propuesta tentativa ya que es ampliamente utilizada como pretratamiento de la digestión anaerobia, con el objetivo de hidrolizar la materia orgánica, cuando la etapa limitante en este proceso es la hidrólisis. Referido a este uso, numerosas investigaciones han demostrado que posibilita, además, la remoción de microorganismos patógenos.

En la actualidad, se ha apostado por su empleo como postratamiento debido a que, durante etapa de digestión anaerobia, pueden crearse las condiciones para que estas colonias de microorganismos vuelvan a proliferar. Sumado a esto, la implementación de la hidrólisis térmica, presenta bajos costos operacionales y altas eficiencias [25].

1.6.1. Digestión anaerobia.

La digestión anaerobia es un proceso bioquímico mediante el cual los microorganismos, en ausencia de oxígeno, degradan la materia orgánica obteniéndose como producto final biogás y un lodo estabilizado, conocido como digestato.

En la actualidad este proceso es ampliamente utilizado en el tratamiento de las aguas residuales que poseen altas cargas orgánicas y de residuos orgánicos provenientes de los sectores industriales, urbano, ganadero, agrícola y alimenticio. Con su aplicación se logra la mineralización de la materia orgánica, el aprovechamiento energético de los residuos orgánicos y el incremento del valor fertilizante del lodo obtenido [26].

El biogás es el subproducto más importante de la fermentación anaerobia ya que es considerado una fuente de energía renovable por su alto contenido de metano

(CH₄), el cual representa entre un 50 y un 70% de la composición total del mismo. La cantidad final de metano dependerá de la materia prima empleada y del correcto funcionamiento del proceso. El otro componente mayoritario es el dióxido de carbono (CO₂), cuya proporción oscila entre un 30 y un 50%, aunque también puede contener otros gases tales como hidrógeno (H₂), nitrógeno (N₂), oxígeno (O₂) y sulfuro de hidrógeno (H₂S), en pequeñas proporciones [27].

El digestato obtenido en la fermentación anaerobia es una suspensión acuosa que contiene una gran cantidad de compuestos orgánicos de origen vegetal y microbiano, además de numerosos elementos minerales entre los que se encuentran nitrógeno, fósforo, potasio (K) y calcio (Ca). Por su contenido de nutrientes inorgánicos, el lodo constituye un potencial biofertilizante para el abono de las tierras de cultivo [28].

1.6.1.1. Etapas de la digestión anaerobia.

El proceso de digestión anaerobia resulta complejo tanto por el número de reacciones bioquímicas que tienen lugar, como por la cantidad de grupos de bacterias involucradas en él. La degradación de la materia orgánica en ausencia de oxígeno consta de cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

Durante la primera etapa, enzimas extracelulares excretadas por bacterias hidrolíticas, transforman las moléculas orgánicas complejas y los sólidos orgánicos no disueltos en compuestos más simples y solubles, respectivamente, a partir de reacciones de hidrólisis. En esta fase las enzimas rompen las cadenas que componen a los polímeros para su conversión en monómeros, moléculas más simples utilizadas como fuente de alimento y energía por las bacterias que no son capaces de degradar estos compuestos. De manera general se degradan proteínas, carbohidratos y lípidos, por medio de amilasas y proteasas, formándose los correspondientes monómeros: aminoácidos, azúcares y ácidos grasos [29].

En la acidogénesis, los productos obtenidos en la fase hidrolítica son transformados, por la acción de bacterias acidogénicas, en ácidos grasos volátiles tales como acético, propiónico y butírico. En esta etapa también se produce amoníaco (NH₃), debido a que, durante la transformación de las proteínas, el nitrógeno orgánico es convertido en nitrógeno amoniacal [30].

Seguido de esta etapa tiene lugar la acetogénesis en la cual las bacterias productoras de acetatos, transforman los ácidos orgánicos en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono [30].

Por último, tiene lugar la metanogénesis en la cual se obtienen como productos finales metano y dióxido de carbono. En esta fase participan dos grupos

principales de bacterias, las metanogénicas acetoclásticas y las metanogénicas hidrogenotróficas. El primer grupo es el encargado de transformar el ácido acético, obtenido durante la acetogénesis, en dióxido de carbono y metano. Esta será la principal vía de formación del metano, proporcionando alrededor del 70% del total producido. Las bacterias metanogénicas hidrogenófilas, tiene como función formar agua y metano a partir del hidrógeno y dióxido de carbono producidos en la etapa anterior [31]. La figura 1.2 muestra las etapas que fueron descritas anteriormente.

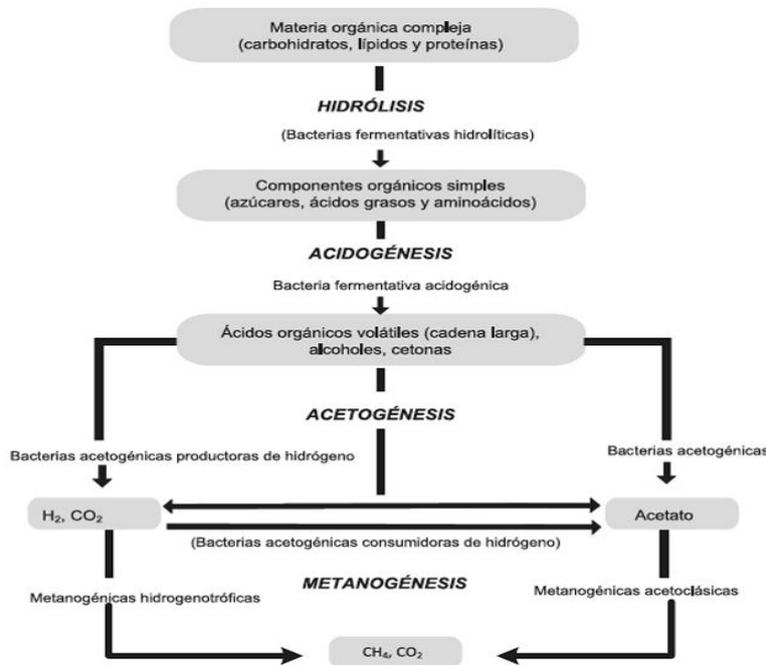


Figura 1.2. Etapas de la digestión anaerobia [32].

1.6.1.2. Digestión anaerobia como alternativa para la eliminación de bacterias resistentes a los antibióticos.

En la actualidad, numerosas investigaciones se han enfocado en la evaluación de la digestión anaerobia como método para la eliminación de genes de resistencia a los antibióticos, presentes en las aguas residuales y en los residuos orgánicos provenientes de diversas industrias.

Si bien el proceso se presenta como una alternativa viable, se han de tener en cuenta una serie de factores de los cuales dependerá su eficacia. La tecnología empleada para llevar a cabo la digestión anaerobia y la temperatura a la cual se operará el reactor, son los dos aspectos principales en este sentido [33,34].

En una investigación realizada por Aziz et al., 2022 [33] fueron analizadas distintas tecnologías para la remoción de genes de resistencia a antibióticos, presentes en aguas residuales, a través de la digestión anaerobia. El estudio comprendió la evaluación de cinco sistemas y los resultados obtenidos

permitieron seleccionar al biorreactor anaerobio de membranas como el más conveniente. El diseño en cuestión brinda los mejores rendimientos de eliminación para los genes resistentes a los antibióticos de los siguientes grupos: sulfamidas (*sul1*, *sul2*), tetraciclinas (*tetO*, *tetW*), macrólidos (*ermF*, *ermB*) y betalactámicos (*bla_{NDM-1}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{oxa-48}*, *bla_{oxa-1}*).

En relación con la temperatura (T), recientes estudios han demostrado que la digestión anaerobia operada en modo termófilo (T>45 °C), es más eficiente que la operada en modo mesófilo (20 °C <T<45 °C). Probablemente, esto se asocia con la desnaturalización que sufren algunos de los componentes de las células bacterianas a elevadas temperaturas, lo que causa la inactivación del microorganismo.

Pandey et al., 2011 [35] analizaron el impacto de la temperatura en la eliminación de patógenos presentes en estiércol vacuno, para lo cual llevaron a cabo tres procesos de digestión anaerobia a 25, 37 y 55 °C. Tras finalizar la experimentación se pudo concluir que las tasas de inactivación de patógenos a 55 °C, fueron de 15 a 17 veces mayores que las alcanzadas a 25 y 37 °C.

Otro estudio realizado por **Zhang et al., 2021 [36]** compara también la digestión anaerobia mesófila y termófila en cuanto a remoción de patógenos resistentes a antibióticos presentes en lodos de depuradora. Con este objetivo evaluó el proceso a las temperaturas de 25, 37 y 55 °C, concluyendo que la digestión anaerobia termófila brinda una remoción mayor que la mesófila.

1.6.2. Hidrólisis térmica.

La hidrólisis térmica es un proceso físico-térmico en el cual se logra romper la estructura de los polímeros de cadena larga, obteniéndose moléculas orgánicas más simples, a partir de la aplicación de elevadas temperaturas (de 140 a 170 °C) y presiones (de 6 a 9 bar), durante un tiempo establecido [37].

Esta tecnología es ampliamente utilizada como pretratamiento en la digestión anaerobia cuando la materia orgánica se encuentra en forma de partículas, lo que sitúa a la hidrólisis como etapa limitante en el proceso. Sus funciones principales: son solubilizar los sólidos orgánicos suspendidos y desintegrar la estructura de las moléculas orgánicas complejas, presentes en el residual, con el objetivo de que el sustrato esté más asequible para las bacterias, durante la biodegradación [38].

La aplicación de la hidrólisis térmica como pretratamiento consigue aumentar el rendimiento del proceso de digestión anaerobia, ya que permite acelerar la velocidad de la reacción en la etapa de hidrólisis, obteniéndose menores tiempos de retención en los reactores. Además, se incrementa la carga orgánica del digestor, lo que trae consigo una mayor producción de biogás. Otro de los

resultados de la implementación de esta tecnología es que logra una disminución en el volumen del digestato y aumenta su calidad, ya que reduce la concentración de microorganismos patógenos presentes en él, permitiendo su utilización como biofertilizante [39].

1.6.2.1. Hidrólisis térmica como alternativa para la eliminación de bacterias resistentes a los antibióticos.

La hidrólisis térmica, como pretratamiento, también es empleada para eliminar de los residuales, microorganismos patógenos que contienen genes de resistencia a los antibióticos. En este proceso, la remoción de los patógenos tiene lugar debido a las altas temperaturas que se alcanzan, las cuales destruyen el material genético de la célula, causando la inactivación de las bacterias [40].

A pesar de que son bien conocidos los beneficios que muestra el pretratamiento con hidrólisis térmica en la eliminación de bacterias resistentes a antibióticos, recientes estudios evidencian que, durante el proceso de digestión anaerobia, estos microorganismos pueden regenerarse [41]. Por esta razón, numerosas investigaciones han sido encaminadas al análisis de las ventajas que brinda la hidrólisis térmica como postratamiento. Los ensayos experimentales muestran que, con el nuevo diseño, se logra reducir considerablemente la concentración de bacterias presentes en el residual.

En un estudio realizado por **Cai et al., 2021 [41]**, fueron evaluados los efectos de la temperatura en la remoción de patógenos presentes en un digestato, durante el postratamiento con hidrólisis térmica. El diseño experimental consistió en un proceso de hidrólisis a diferentes temperaturas (80, 120, 160 y 180 °C), para un período fijo de 30 minutos. En este caso no se varió el tiempo ya que investigaciones anteriores afirman que, la temperatura tiene más impactos significativos en la biodegradabilidad, durante la hidrólisis térmica, que el tiempo de duración del proceso.

Los resultados alcanzados permitieron concluir que para un tiempo de 30 minutos y una temperatura de 180 °C, se redujo la concentración de microorganismos en 4 logs con respecto a la cantidad inicial, lo que supone una remoción considerable. Los autores afirman también que, el lodo estabilizado puede ser utilizado como biofertilizante, ya que no representa ningún riesgo ecológico debido a su baja concentración de microorganismos patógenos [41].

Con el empleo de esta tecnología también se logra reducir la viscosidad del fango, por lo que aumenta su capacidad de deshidratación. La mejora obtenida favorece el proceso de separación sólido-líquido, permitiendo alcanzar mayores rendimientos en la etapa de deshidratación posterior a la hidrólisis térmica. Como resultado, se obtiene un lodo más deshidratado, lo que representa una ventaja, ya que facilita su manejo y reduce los costos asociados a su gestión [42].

Capítulo 2. Materiales y métodos.

En el presente capítulo se describe el procedimiento experimental del proceso de digestión anaerobia, el montaje de la experimentación y la evaluación de los parámetros físico-químicos y microbiológicos durante el tiempo de investigación. El estudio se realizó en el Instituto de Procesos Sostenibles (ISP) de la Universidad de Valladolid (Uva).

2.1. Caracterización de las materias primas empleadas.

2.1.1. Inóculo.

El fango anaerobio utilizado durante la experimentación proviene del proceso de digestión anaerobia, realizado en la Planta de Tratamientos de Aguas Residuales de la provincia de Valladolid. La caracterización físico-química del lodo se realizó mediante la determinación de los parámetros que se presentan en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Parámetros físico-químicos analizados en el fango anaerobio.

Parámetros	Método de ensayo
Físico-Químicos	
Demanda Química de Oxígeno Total (DQO _{Total})	Reflujo cerrado
Demanda Química de Oxígeno Soluble (DQO _{Soluble})	APHA-AWWA-WPCF (1992)
Nitrógeno Total (NKT)	APHA-AWWA-WPCF (1992)
Nitrógeno Amoniacal	Destilación APHA-AWWA-WPCF (1992)
Sólidos Totales (ST)	APHA-AWWA-WPCF (1992)
Sólidos Volátiles (SV)	APHA-AWWA-WPCF (1992)
pH	Electrométrico APHA-AWWA-WPCF (1992)

2.1.2. Fango mixto espesado.

El fango mixto espesado (FME) que se utilizó para realizar los ensayos, está compuesto por los lodos provenientes de los tratamientos primarios y secundarios de la Planta de Tratamientos de Aguas Residuales de la provincia de Valladolid.

2.1.3. Purín de cerdo.

El purín de cerdo (P) empleado en los ensayos, proviene de una granja porcina localizada en el pueblo Narros de Cuéllar, perteneciente a la provincia de Segovia.

La caracterización físico-química y microbiológica de ambos sustratos se realizó a partir la determinación de los parámetros que se presentan en la tabla 2.2.

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Tabla 2.2. Parámetros físico-químicos y microbiológicos analizados en los sustratos.

Parámetros	Método de ensayo
Microbiológico	
Rección en Cadena de la Polimerasa (qPCR)	Método Interno
Físico-Químicos	
Demanda Química de Oxígeno Total (DQO _{Total})	Reflujo cerrado
Demanda Química de Oxígeno Soluble (DQO _{Soluble})	APHA-AWWA-WPCF (1992)
Nitrógeno Total (NKT)	APHA-AWWA-WPCF (1992)
Nitrógeno Amoniacal	Destilación APHA-AWWA-WPCF (1992)
Sólidos Totales (ST)	APHA-AWWA-WPCF (1992)
Sólidos Volátiles (SV)	APHA-AWWA-WPCF (1992)
Ácidos Grasos Volátiles (AGVs)	Cromatografía de Gases
pH	Electrométrico APHA-AWWA-WPCF (1992)

2.2. Proceso de digestión anaerobia.

Con el objetivo de estudiar la eliminación de los microorganismos patógenos que contienen genes de resistencia a antibióticos, presentes en el purín de cerdo y en el fango mixto anaerobio, se evaluó un proceso de digestión anaerobia mesófila. También se analizó el aprovechamiento energético de ambos residuales a partir de la producción de biogás. Para ello se realizó un estudio a escala de laboratorio durante 40 días comprendidos entre el 23 de mayo y el 1 de julio del 2022.

Para el desarrollo de la investigación se llevaron a cabo, de manera simultánea, dos procesos de digestión anaerobia. En ambos se utilizó como inóculo el fango anaerobio, que porta el consorcio bacteriano encargado de degradar la materia orgánica y producir el biogás. Como fuente aportadora de nutrientes y materia orgánica fueron empleados dos sustratos, el fango mixto espesado y el purín de cerdo.

La tabla 2.3 muestra el esquema del ensayo experimental, representado también en la figura 2.1, y la distribución de los sustratos en el mismo.

Tabla 2.3. Estructura del ensayo experimental.

Reactor	Identificación	Inóculo	Sustrato
Reactor No.1	R ₁	Fango anaerobio	Purín de cerdo
Reactor No.2	R ₂		Fango mixto espesado

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

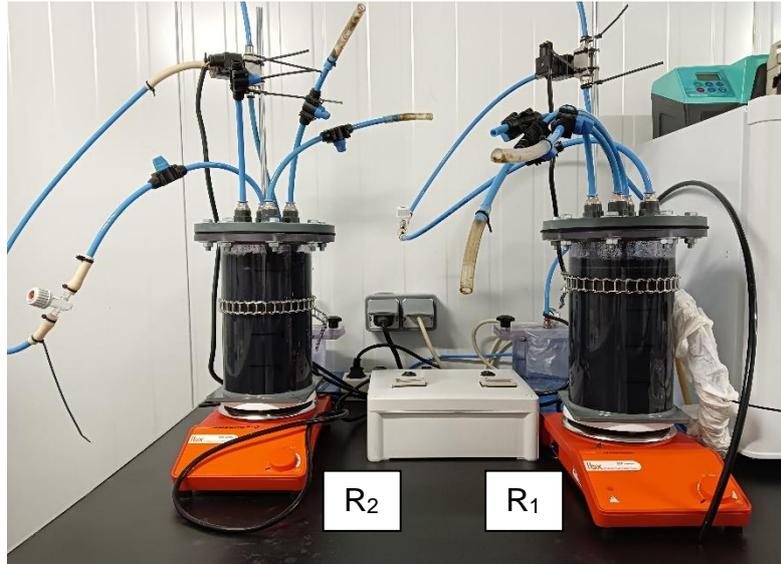


Figura 2.1. Esquema del proceso de digestión anaerobia. Izquierda (Reactor No.2), derecha (Reactor No.1).

2.2.1. Montaje del experimento.

El ensayo se llevó a cabo en dos reactores de mezcla perfecta operando en modo semicontinuo. El patrón de flujo mezcla perfecta se obtuvo por agitación magnética y para garantizar las condiciones termófilas se situaron ambos reactores en una cámara caliente, a una temperatura de ± 35 °C.

Para determinar el volumen al cual iban a operar los reactores, se calculó el volumen total a partir de la siguiente ecuación.

$$V = \pi * r^2 * h \quad \text{Ec. 2.1}$$

Donde:

r: radio del reactor

h: altura del reactor

La siguiente tabla muestra las medidas para ambos reactores.

Tabla 2.4. Dimensiones de los reactores.

Altura (h) (cm)	Diámetro (D) (cm)	Radio (r) (cm)	Volumen (V) (L)
21,20	11,80	5,90	2,50

Una vez calculado el volumen total, se estableció que el volumen de operación, en cada reactor, sería de 2 L. Este ajuste se realizó debido a que durante la digestión anaerobia puede ocurrir un proceso de formación de espumas. Según la literatura consultada, ese suceso ocurre principalmente por dos razones, una sobrealimentación durante la fase de arranque del digestor o, debido a que las bacterias tuvieron una rápida adaptación al sustrato, por lo que pueden generar en un corto período de tiempo una gran cantidad de biogás [42].

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Con el objetivo de cuantificar la producción de biogás, se utilizaron dos medidores de pulsos, los cuales fueron acoplados a los digestores a través de unos tubos de poliuretano de diámetros externo e interno, 8 y 5,5 mm, respectivamente. Al reactor No.1 fue conectado el medidor No.1, mientras que al reactor No.2 se acopló el medido No.2.

Previo a iniciar el proceso ambos medidores fueron calibrados, con el objetivo de detectar algún error en las conexiones realizadas que pudiera provocar la fuga del gas. Para iniciar la etapa de calibración se determinó el volumen de biogás que se obtenía por cada pulso emitido, para lo cual se calculó el volumen ocupado por el gas entre las varillas pequeña y mediana que posee el medidor. La siguiente figura muestra el diseño del equipo y la ubicación de las varillas anteriormente mencionadas.

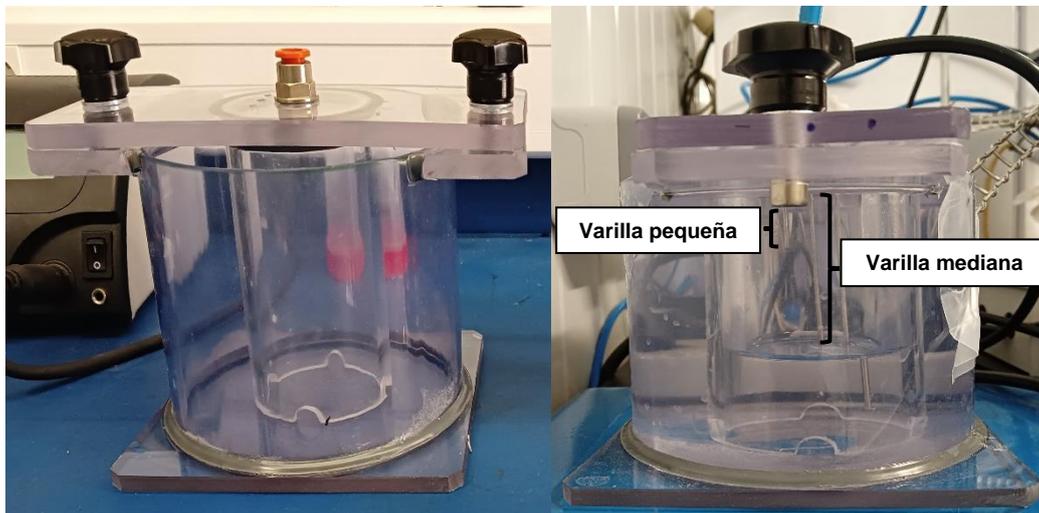


Figura 2.2. Medidor de pulsos. Izquierda (Vista frontal), derecha (Vista lateral).

La tabla 2.5 muestra las mediciones asociadas a las varillas y el volumen de biogás obtenido por pulso.

Tabla 2.5. Dimensiones de los medidores de pulso.

	Medidor No.1	Medidor No.1
Longitud de la varilla pequeña (cm)	2,70	2,90
Longitud de la varilla mediana (cm)	7,00	7,10
Distancia entre varillas (cm)	4,30	4,20
Diámetro del medidor (cm)	5,00	5,00
Radio del medidor (cm)	2,50	2,50
Volumen de Biogás producido por pulso (cm³)	84,40	82,46

Durante la calibración fue utilizada una bomba marca Watson-Marlow modelo 323 (**Figura 2.3**), la cual se estableció que operaría a una velocidad angular de 5 rpm.

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”



Figura 2.3. Bomba empleada en la calibración de los medidores.

Para determinar el caudal de aire que suministraría la bomba a esa velocidad, se realizó la prueba de la probeta invertida. El inicio del experimento consistió en colocar una probeta llena de agua hasta un volumen de 100 mL, de manera invertida, en un recipiente lleno de agua hasta una altura inferior a la de la probeta. Posteriormente se bombeó aire en el interior de la misma, durante un determinado tiempo, con el objetivo de hallar el volumen de agua que ha sido desplazado por el aire. La prueba se realizó por triplicado y el tiempo empleado en cada experimento fue de 6 minutos.

La figura 2.4 muestra un esquema de la prueba y los resultados obtenidos, con la misma, se muestran en la tabla 2.6.



Figura 2.4. Representación de la prueba de la probeta invertida [43].

Tabla 2.6. Resultado de la prueba de la probeta invertida.

Pruebas realizadas	Tiempo consumido (minutos)	Volumen consumido (mL)	Caudal suministrado (mL/min)
No.1	6	64	10,67
No.2	6	64	10,67
No.3	6	64	10,67

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Para la calibración de los medidores ambos reactores se llenaron de agua hasta un volumen de 2 L y la bomba fue conectada primeramente a R₁ y posteriormente a R₂, durante un tiempo determinado. Al finalizar la prueba se debía comprobar si el caudal de aire suministrado por la bomba era el mismo que estaba llegando al medidor de biogás. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla 2.7. Resultados de la calibración de los medidores.

Medidor	Tiempo de la medición (minutos)	Pulsos	Caudal emitido por el medidor (mL/min)
No.1	1 320	132	8,44
No.2	1 340	161	9,90

Tras la medición realizada se concluyó que no existen fugas ya que el aire que llega al medidor es, aproximadamente, el mismo que el suministrado por la bomba.

Una vez finalizada la calibración se procedió al montaje del experimento, para lo cual se alimentaron en ambos reactores 2 L de fango anaerobio. El inóculo se fue sometido a una fase de acondicionamiento durante 48 horas, con el objetivo de que los microorganismos se adaptaran a las nuevas condiciones presentes en el medio.

Posteriormente fueron inoculados en el reactor No.1, 100 mL del sustrato purín y en el reactor No.2, 100 mL del sustrato fango mixto espesado, se esperaron 48 horas para que los microorganismos adaptaran su sistema al nuevo sustrato y se extrajeron los primeros 100 mL de efluente. Para garantizar que el proceso operara en modo semicontinuo se alimentaron diariamente 100 mL de ambos sustratos y se extrajeron 100 mL de efluente de cada digestor.

2.2.2. Variables respuestas.

Las variables estudiadas para el seguimiento y evaluación del proceso se muestran en la tabla 2.8.

Tabla 2.8. Parámetros físico-químicos y microbiológicos analizados en el fango anaerobio.

Parámetros	Método de ensayo
Microbiológico	
Rección en Cadena de la Polimerasa (qPCR)	Método Interno
Físico-Químicos	
Demanda Química de Oxígeno Total (DQO _{Total})	Reflujo cerrado
Demanda Química de Oxígeno Soluble (DQO _{Soluble})	APHA-AWWA-WPCF (1992)
Nitrógeno Orgánico	APHA-AWWA-WPCF (1992)
Nitrógeno Amoniacal	Destilación APHA-AWWA-WPCF (1992)

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Sólidos Totales	
Sólidos Volátiles	APHA-AWWA-WPCF (1992)
Ácidos Grasos Volátiles (AGVs)	
Composición del Biogás	Cromatografía de Gases
pH	Electrométrico
	APHA-AWWA-WPCF (1992)

Como paso previo al ensayo de qPCR, se realizó el procedimiento de extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN), con el fin de separar y purificar el material genético para su posterior análisis. El método empleado para realizar la extracción fue el DNeasy PowerSoil Pro Kit, el cual es ampliamente utilizado para el aislamiento del ADN bacteriano de muestras de suelo, incluidas muestras de compost, sedimentos y estiércol [44].

Una vez purificado el ADN de la muestra, se procedió a realizar el ensayo de qPCR a partir de la metodología descrita a continuación.

1. Preparar de 2 a 7 diluciones seriadas del gblock correspondiente al gen a amplificar, a partir de un medio conservado en esperma de salmón.
2. Preparar la cabina de seguridad para proceder a la preparación de la máster mix.
3. Preparar 40 muestras de la máster mix, añadiendo los siguientes componentes:
 - 400 μ L NZY MM
 - 32 μ L primer
 - 32 μ L R primer
 - 16 μ L H₂O
4. Mezclar los reactivos a medida que se añadan.
5. Identificar y preparar la placa.
6. Añadir 12 μ L de la máster mix en cada posición de la placa.
7. Añadir 3 μ L del gblock , de los controles positivo y negativo y de las muestras, según el orden dispuesto en la plantilla.
8. Una vez finalizado el procedimiento, sellar y centrifugar la placa.
9. Insertar la placa en el equipo.
10. Esperar 1 hora y observar los resultados.

Para la medición de las DQO se realizaron diluciones previo al análisis debido a que, si la muestra está demasiado concentrada, el valor de la DQO será superior al valor máximo del intervalo de trabajo (300-1000 mg O₂/L), por lo que el dicromato de potasio utilizado para oxidar la materia orgánica se consumirá completamente y no será posible realizar la medición. Las diluciones realizadas para durante el ensayo, se muestran en la tabla 2.9

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Tabla 2.9. Diluciones (mL) realizadas para la determinación de las DQO.

	Purín de cerdo	Fango mixto espesado	R1	R2
DQO _{Total}	1:100	1:50	1:100/1:50	1:50/1:25
DQO _{Soluble}	1:50	1:50/1:25	1:50	1:50/1:25

Para el análisis del Nitrógeno orgánico fueron pesados 2,5 g de cada muestra y no fue necesario realizar diluciones. Para el caso del Nitrógeno amoniacal primeramente se determinó el pH de las muestras, con el objetivo de verificar que su valor no fuera superior a 8, ya que valores mayores que este desplazan el equilibrio hacia la formación de amoniaco. Este proceso traería consigo la pérdida de muestra, ya que el amoniaco formado, al ser un gas, se volatiliza.

Una vez verificado el valor del pH, se realizaron diluciones de las muestras con el objetivo de minimizar el consumo de ácido sulfúrico, reactivo utilizado durante la valoración. La tabla 2.10 muestra las diluciones realizadas para la determinación del Nitrógeno amoniacal, durante el ensayo experimental.

Tabla 2.10. Diluciones (mL) realizadas para la determinación del Nitrógeno amoniacal.

Purín de cerdo	Fango mixto espesado	R1	R2
2:25	2:25	2:25	2:25

El análisis cuantitativo de los ácidos grasos volátiles se realizó mediante la Cromatografía de Gases en un cromatógrafo Agilent 7820. Se utilizó una columna TEKNOCROMA Packed, con Helio como gas portador a un flujo de 45 mL/min. La temperatura del inyector se mantuvo a 350 °C, mientras que la temperatura del horno fue ascendiendo hasta alcanzar un valor de 180 °C (**Tabla 2.11**). El detector FID se mantuvo a una temperatura de 350 °C y los flujos de H₂, Aire y N₂ fueron de 45 mL/min, 350 mL/min y 10 mL/min, respectivamente. El volumen de muestra a inyectar fue de 6 µL.

Tabla 2.11. Temperatura del horno (rampas).

°C/min	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Tiempo total (minutos)
	135	10	10,00
3	151	0	15,33
8	180	5	23,95

Para realizar este análisis, las muestras fueron centrifugadas y filtradas, y posteriormente se realizó, de cada una, las siguientes diluciones.

Tabla 2.12. Diluciones (µL) realizadas para la determinación de AGVs.

Purín de cerdo	Fango mixto espesado	R1	R2
1:10	1:10	1:10	1:10

El análisis de la composición del biogás se realizó mediante la Cromatografía de Gases en un cromatógrafo Varian CP 3800. Se utilizó una columna Porabond (Agilent) x Molesieve (Bruker), con Helio como gas portador a una presión de 18 psi. La temperatura del inyector se mantuvo a 150 °C, mientras que la temperatura del horno se mantuvo a 45 °C, durante 5 minutos. El detector TCD se mantuvo a una temperatura de 200 °C. El volumen de muestra a inyectar fue de 10 µL.

2.2.2.1. Eficiencia de eliminación Sólidos Volátiles y DQOTotal.

Para determinar la eficiencia de eliminación de sólidos volátiles y DQO_{Total} se utilizaron las ecuaciones 2.2 y 2.3, respectivamente.

$$\% \text{ Eliminación } SV = \frac{Q_0 * SV_0 - Q_f * SV_f}{Q_0 * SV_0} * 100 \quad \text{Ec. 2.2}$$

Donde:

Q_0 : caudal de alimentación (kg/d)

SV_0 : concentración de sólidos volátiles en la alimentación (g/kg)

Q_f : caudal a la salida del reactor (kg/d)

SV_f : concentración de sólidos volátiles en el efluente (g/kg)

$$\% \text{ Eliminación } DQO_{Total} = \frac{Q_0 * DQO_0 - Q_f * DQO_f}{Q_0 * DQO_0} * 100 \quad \text{Ec. 2.3}$$

Donde:

Q_0 : caudal de alimentación (L/d)

DQO_0 : valor de DQO_{Total} en la alimentación (mg/L)

Q_f : caudal a la salida del reactor (L/d)

DQO_f : valor de DQO_{Total} en el efluente (mg/L)

2.2.2.2. Carga Orgánica Volumétrica.

Este parámetro fue evaluado para cada sustrato a partir de la siguiente ecuación.

$$COV = \frac{Q_0 * SV_0}{V_r} \quad \text{Ec. 2.4}$$

Donde:

COV: carga orgánica volumétrica (g SV/L*d)

Q_0 : caudal de alimentación (kg/d)

SV_0 : concentración de sólidos volátiles en la alimentación (g/kg)

V_r : volumen efectivo del reactor (L)

2.2.2.3. Volumen de biogás y metano producidos.

Los volúmenes de biogás y metano producidos diariamente se determinaron a través de las ecuaciones 2.5 y 2.6, respectivamente.

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

$$V_{biogás} = N_{Pulsos} * V_{biogás \text{ por pulso}} \quad \text{Ec. 2.5}$$

Donde:

N_{pulsos} : número de pulsos registrados diariamente

$V_{biogás \text{ por pulso}}$: volumen de biogás producido por cada pulso emitido por el medidor (mL). Para el caso del medidor No.1 acoplado a R_1 y del medidor No.2 acoplado a R_2 estos valores fueron 84,40 y 82,46 mL, respectivamente.

$$V_{metano} = F_{metano} * V_{biogás} \quad \text{Ec. 2.6}$$

Donde:

F_{metano} : fracción de metano en el biogás

$V_{biogás}$: volumen de biogás producido (mL)

2.2.2.3. Relación metano producido/ DQO_{Total} eliminada.

Con el objetivo de obtener la cantidad de metano que se estaba produciendo por cada gramo de DQO_{Total} eliminada, durante el proceso de digestión anaerobia, se empleó la ecuación 2.9. Los valores sustituidos en dicha ecuación fueron determinados a partir de las ecuaciones 2.7 y 2.8.

$$DQO_{Total \text{ eliminada}} = Q_0 * DQO_0 - Q_f * DQO_f \quad \text{Ec. 2.7}$$

Donde:

Q_0 : caudal de alimentación (L/d)

DQO_0 : valor de DQO_{Total} en la alimentación (g/L)

Q_f : caudal a la salida del reactor (L/d)

DQO_f : valor de DQO_{Total} en el efluente (g/L)

$$V_{metano} (TPN) = \frac{V_{metano} * T_N * P_N}{T * P} \quad \text{Ec. 2.8}$$

Donde:

$V_{metano} (TPN)$: metano producido en condiciones normales (mL)

V_{metano} : metano producido (mL)

T_N : temperatura en condiciones normales (K)

P_N : presión en condiciones normales (mmHg)

T : temperatura a la que fue realizada la experimentación (K)

P : presión a la que fue realizada la experimentación (mmHg)

$$\frac{\text{NmL metano producido}}{\text{g } DQO \text{ eliminada}} = \frac{V_{metano} (TPN)}{DQO_{Total \text{ eliminada}}} \quad \text{Ec. 2.9}$$

Donde:

NmL metano producido: volumen de metano producido en condiciones normales

2.3. Toma de muestras.

Durante el desarrollo de la experimentación se realizó un muestreo semanal en los dos procesos para el análisis de todas las variables, a excepción del qPCR y la composición del biogás. Para la identificación y cuantificación de patógenos se tomaron muestras cada 21 días, mientras que para el análisis de la composición del biogás el muestro se realizó diariamente. En la tabla 2.13 se observa la distribución de los análisis durante el período de experimentación.

Tabla 2.13. Distribución de los análisis durante el período de experimentación.

Parámetros	Método de ensayo
Microbiológico	
Rección en Cadena de la Polimerasa (qPCR)	Cada 21 días
Físico-Químicos	
Demanda Química de Oxígeno Total (DQO _{Total})	Cada 7 días
Demanda Química de Oxígeno Soluble (DQO _{Soluble})	Cada 7 días
Nitrógeno Orgánico	Cada 7 días
Nitrógeno Amoniacal	Cada 7 días
Sólidos Totales	Cada 7 días
Sólidos Volátiles	Cada 7 días
Ácidos Grasos Volátiles (AGVs)	Cada 7 días
Composición del Biogás	Cada 24 horas
pH	Cada 7 días

Capítulo 3. Resultados y discusión.

En el presente capítulo se exponen los resultados alcanzados a partir del proceso de digestión anaerobia, evaluándose la efectividad del tratamiento aplicado, a partir del análisis de las variables respuestas seleccionadas.

3.1. Caracterización de las materias primas empleadas.

3.1.1. Inóculo.

La tabla 3.1. muestra los resultados obtenidos en la caracterización inicial del fango anaerobio, utilizado como inóculo durante los ensayos experimentales.

Tabla 3.1. Caracterización del fango anaerobio.

Parámetros físico-químicos						
DQO _{Total} (mg O ₂ /L)	DQO _{Soluble} (mg O ₂ /L)	S _{Totales} (g/kg)	S _{Volátiles} (g/kg)	N _{Total} (mg N/L)	N _{Amoniacal} (mg N/L)	pH (25 °C)
15 591	612	18,54	13,04	2 133	2 084	7,36

Para el caso de las DQO_{Total} y DQO_{Soluble}, los valores obtenidos son similares a los reportados en un estudio en el cual fue utilizado, como inóculo, un fango anaerobio de origen similar al empleado en este trabajo [45]. Las concentraciones de sólidos totales y volátiles se corresponden con los valores típicos para este tipo de residual [46].

Respecto al nitrógeno total y amoniacal presentes en el inóculo, las concentraciones de ambos son superiores a las reportadas en la literatura [46], lo cual podría ocasionar problemas durante el proceso, por amonificación del sistema. En relación al valor del pH, este es similar a los registrados en otros estudios para lodos anaerobios [47].

3.1.2. Fango mixto espesado.

La tabla 3.2. presenta los resultados para la caracterización del fango mixto espesado, utilizado como sustrato en el reactor No.2, durante los ensayos experimentales.

Tabla 3.2. Caracterización del fango mixto espesado.

Parámetros físico-químicos						
DQO _{Total} (mg O ₂ /L)	DQO _{Soluble} (mg O ₂ /L)	S _{Totales} (g/kg)	S _{Volátiles} (g/kg)	N _{Total} (mg N/L)	N _{Amoniacal} (mg N/L)	pH (25 °C)
33 045	1 153	27,82	15,31	2 335	1 274	6,04

Los valores de DQO total y DQO soluble obtenidos se encuentran en el intervalo de datos reportados en diversos estudios, para fangos mixtos [46]. En relación a los sólidos totales y volátiles, las concentraciones son similares a las expuestas en otras caracterizaciones realizadas para este tipo de residual. Cabe destacar

que la fracción de sólidos volátiles representa un 55% del total de sólidos, encontrándose este valor dentro del intervalo habitual para un lodo mixto [47].

Las concentraciones de nitrógeno total y amoniacal son elevadas, en relación a los valores típicos. Con respecto al valor del pH, este se encuentra dentro del intervalo establecido [47].

La siguiente tabla muestra la composición de los ácidos grasos volátiles presentes en el fango mixto. Según la literatura consultada [46], estos valores son similares a los reportados habitualmente para este tipo de sustrato.

Tabla 3.3. Composición de los Ácidos Grasos Volátiles presentes en el fango mixto espesado.

AGVs	Concentración (mg/L)
Acético	83,28
Propiónico	44,09
Butírico	18,58

3.1.3. Purín de cerdo.

Los resultados obtenidos tras la caracterización inicial del purín de cerdo, se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Caracterización del purín de cerdo.

Parámetros físico-químicos						
DQO _{Total} (mg O ₂ /L)	DQO _{Soluble} (mg O ₂ /L)	S _{Totales} (g/kg)	S _{Volátiles} (g/kg)	N _{Total} (mg N/L)	N _{Amoniacal} (mg N/L)	pH (25 °C)
67 385	40 053	33,08	23,54	5 796	4 914	7,50

Los valores de DQO, ST y SV obtenidos se encuentran en los intervalos registrados para estos parámetros [48], lo cual evidencia las condiciones óptimas que presenta el residual evaluado, para su aplicación como sustrato durante el ensayo experimental.

Respecto a las concentraciones de sólidos volátiles estas representan un 71% de los sólidos totales. El valor obtenido resulta elevado en comparación con los mencionados en otros estudios, los cuales reportan una relación SV/ST de un 65%, para este tipo de sustrato [48,49].

Para el caso del nitrógeno total se conoce que los residuales porcinos poseen una alta concentración del mismo, con valores que oscilan entre los 2 000 y 10 000 g/kg [48,49]. En este caso el contenido de NKT es superior a este intervalo. El nitrógeno amoniacal también es superior a las cifras reportadas por la literatura, que habitualmente se encuentran entre los 1 000 y 8 000 g/kg [49]. Respecto a este valor obtenido, cabe mencionar que altas concentraciones de

nitrógeno amoniacal podrían generar problemas durante proceso de digestión anaerobia, inhibiendo el crecimiento de los microorganismos. El pH obtenido en la caracterización, es similar a los reportados en la literatura consultada con un valor de 7,60 [50]

Con respecto a la concentración de ácidos grasos volátiles, los valores obtenidos se muestran en la siguiente tabla. De manera general se puede afirmar que el contenido de ácidos grasos volátiles presente en el sustrato, es inferior a las concentraciones reportadas por la literatura para el estiércol porcino [48].

Tabla 3.5. Composición de los Ácidos Grasos Volátiles presentes en el purín de cerdo.

AGVs	Concentración (mg/L)
Acético	933
Propiónico	338
Butírico	293

3.2. Evaluación del desempeño de la digestión anaerobia.

Los resultados obtenidos durante el proceso de digestión anaerobia, se exponen a continuación. Para su análisis y discusión serán comparados con resultados obtenidos anteriormente, en estudios similares.

3.2.1. Eliminación de materia orgánica.

3.2.1.1. Análisis de la DQO_{Total} en la digestión de purines.

Los gráficos mostrados a continuación permiten evaluar el comportamiento de la DQO y su rendimiento de eliminación en el proceso de digestión anaerobia de purines, realizado en el reactor No.1.

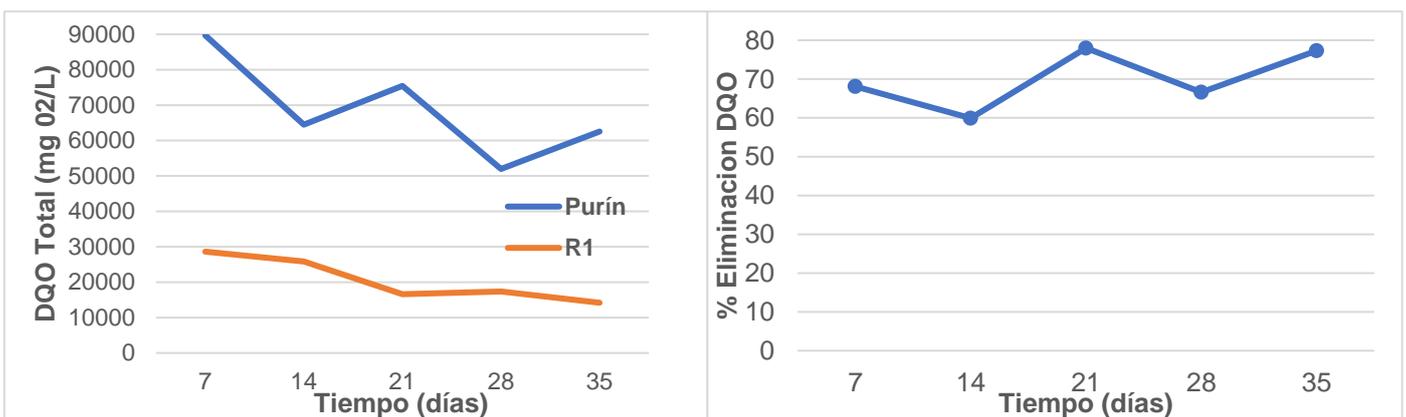


Figura 3.1. Comportamiento de la biodegradabilidad en R₁.

Se puede observar que para el caso del sustrato purín los valores de DQO oscilaron en el intervalo de 89 703 a 51 972 mg O₂/L. Esta disminución de la materia orgánica puede deberse a que, a pesar de que el sustrato estaba

almacenado a una temperatura de 4 °C para preservar el contenido del mismo, pueden existir en él microorganismos psicrófilos capaces de degradar la materia orgánica a bajas temperaturas. No obstante, los valores obtenidos se mantuvieron, durante el período de experimentación, en el intervalo habitual reportado en la literatura para eyecciones porcinas [49].

Con respecto a la etapa de digestión anaerobia, durante la segunda semana de experimentación (7^{mo} al 14^{to} día) se observó una disminución en los valores de DQO a la salida del reactor, desde 30 000 a 25 000 mg O₂/L, con un porcentaje eliminación de 68 y 60%, respectivamente. Cabe destacar que, el inóculo empleado fue confeccionado con 1 L de FME procedente de la EDAR de Valladolid y con 1 L de un FME, proveniente de proceso de digestión anaerobia de purines de cerdo. Debido a esto es que, al inicio del proceso, se obtienen rendimientos de eliminación de materia orgánica tan elevados.

Entre los días 14 y 21 la DQO medida en el efluente continuó disminuyendo hasta un valor de 16 612 mg O₂/L, para un rendimiento de eliminación del 78%. A partir del día 21 el sistema logra estabilizarse, provocando una disminución en la variación de DQO en el efluente, la cual alcanzó valores de 17 354 y 14 199 mg O₂/L, para los días 28 y 35, respectivamente. Dicha estabilidad se logra debido a que el tiempo de retención óptimo para estos sistemas es de 15 a 20 días [49]. Los rendimientos de eliminación obtenidos en esta etapa fueron de 67 y 77%.

En estudios realizados por **Fernández, L. (2016) [51]** y **Ndegwa et al. (2008) [52]**, en los cuales fueron evaluados procesos de digestión anaerobia a 35 °C empleando como fuente de sustrato eyecciones porcinas, se obtienen niveles de remoción de materia orgánica de 65 y 80%, respectivamente. De manera general se puede afirmar que los niveles de remoción de materia orgánica alcanzados son similares a los obtenidos en investigaciones previas, por lo que se concluye que el proceso se realizó correctamente.

3.2.1.2. Análisis de la DQO_{Total} en la digestión de lodos.

Los gráficos mostrados a continuación muestran los valores de los parámetros DQO y rendimiento de eliminación de DQO, obtenidos en el proceso de digestión anaerobia del fango mixto espesado.

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

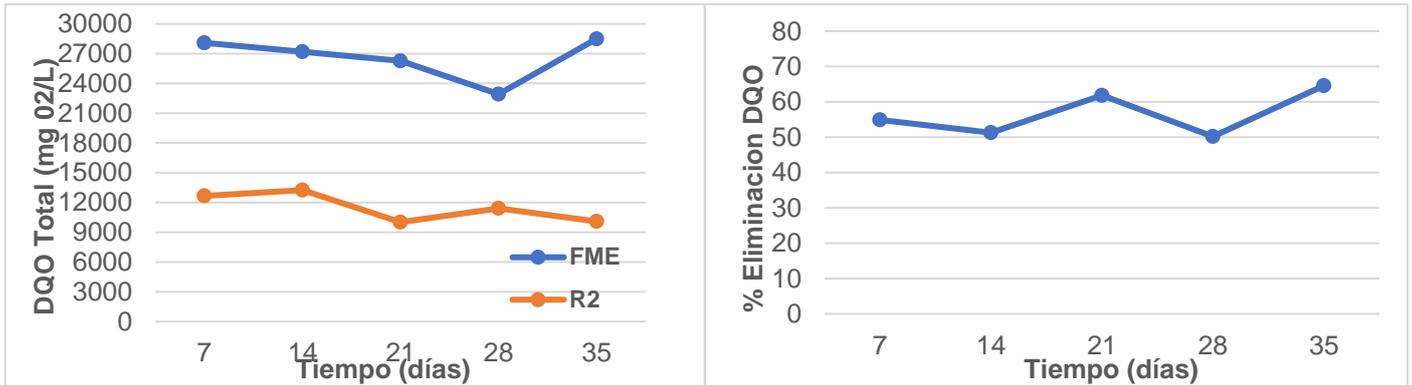


Figura 3.2. Comportamiento de la biodegradabilidad en R₂.

En relación a la DQO medida en la alimentación, se observa que durante las 3 primeras semanas no existió gran variación con respecto a este parámetro, obteniéndose cifras entre los 28 086 y 26 246 mg O₂/L. Posteriormente se produce una disminución hasta 22 923 mg O₂/L, registrada el día 28, pero luego los valores vuelven a aumentar hasta 28 491 mg O₂/L, en la última semana. El descenso registrado el día 28 pudo deberse a un error producido en la toma de muestras, específicamente durante la homogeneización, lo que conllevó a la obtención de resultados incorrectos. Los valores presentados son similares a los reportados en otro estudio en el cual se realizó un proceso de digestión anaerobia utilizando como alimentación el FME [53].

Con respecto a la DQO medida a la salida del reactor los valores obtenidos durante los primeros 14 días, fueron de 12 668 y 13 248 mg O₂/L. Posteriormente ocurrió una disminución hasta 10 023 mg O₂/L el día 21, fecha a partir de la cual el sistema alcanza la estabilidad, mostrando cifras de 11 415 y 10 092 mg O₂/L, para los días 28 y 35, respectivamente. Dicha fase, en la cual el sistema alcanza la estabilidad, coincide con el tiempo de retención reportado para estos sistemas, el cual es de 20 días [54].

Para el caso de los rendimientos de eliminación, de manera general se puede afirmar que los valores tuvieron un comportamiento estable durante toda la experimentación. En las tres primeras semanas se registraron porcentajes de 54, 51 y 61%, para los días 7, 14 y 21, respectivamente. Posteriormente el nivel de remoción presentó un descenso hasta el 50% en la cuarta semana, pero luego aumentó nuevamente hasta el 64% el día 35.

Los niveles de remoción determinados en los días 7, 14 y 28, coinciden con el rendimiento de eliminación de 52%, obtenido en un ensayo de digestión de lodos realizado por Díaz, I. et al., (2010) [54]. Los valores obtenidos en los días 21 y 35, son superiores a los reportados habitualmente para este tipo de procesos, los cuales son de un 50% [55].

A pesar de que estos valores no se corresponden con los típicos, en un estudio realizado por **Seco, S. (2022) [53]**, en el que fue empleado FME procedente de una EDAR como alimentación, se reportan porcentajes de eliminación de un 68%.

3.2.1.3. Sólidos volátiles y rendimiento de eliminación de sólidos volátiles en la digestión de purines.

La figura 3.3 representa el contenido de sólidos volátiles presentes en la alimentación y el efluente del reactor No.2, además de los niveles de remoción alcanzados durante el proceso digestión anaerobia.

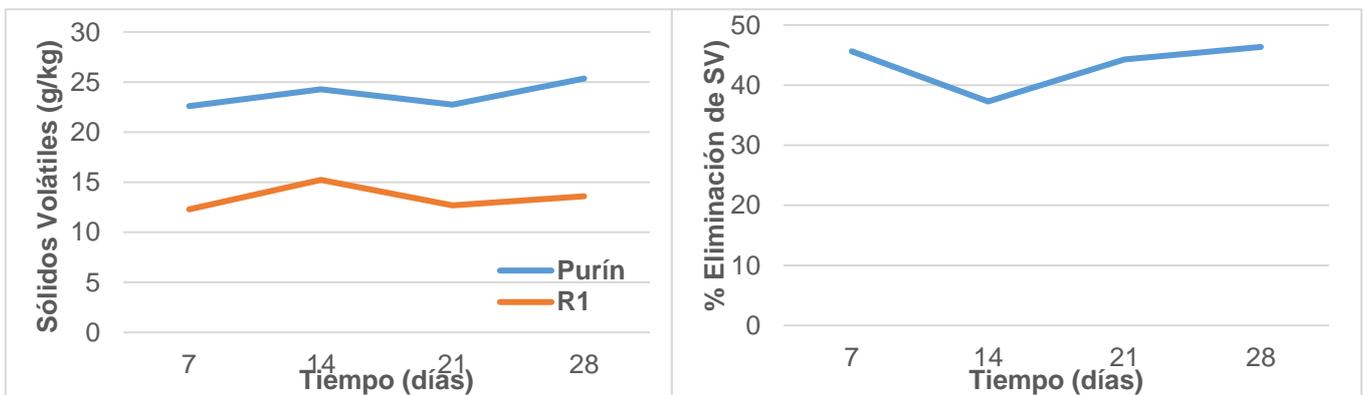


Figura 3.3. Comportamiento y rendimiento de eliminación de los sólidos volátiles en R₁.

Durante el período de experimentación el contenido de sólidos volátiles presentes en el sustrato purín osciló entre 22,60 y 25,35 g/kg, cifras similares a las reportadas por la literatura para proceso en los cuales es utilizado el estiércol porcino como sustrato [51]. Los valores de este parámetro medidos a la salida del reactor oscilaron entre los 12,29 y 15,23 g/kg.

Con respecto al porcentaje de eliminación de sólidos volátiles, entre los días 7 y 14 se registró una disminución del 45,62 al 37,27 %, lo cual puede deberse a que la microbiota presente en el inóculo aún está adaptando su sistema a la nueva fuente de sustrato. A partir de esa fecha se observa un incremento en este parámetro hasta el valor de 46,35 %, registrado el día 28. Los rendimientos de eliminación obtenidos son similares los reportados por la literatura para este tipo de procesos, oscilando entre un 35 y 55% [51].

3.2.1.4. Sólidos volátiles y rendimiento de eliminación de sólidos volátiles en la digestión de lodos.

Los gráficos mostrados a continuación presentan las concentraciones de sólidos volátiles medidas en la alimentación y el efluente del reactor No.2, y los rendimientos de eliminación que se obtienen durante el ensayo experimental.

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

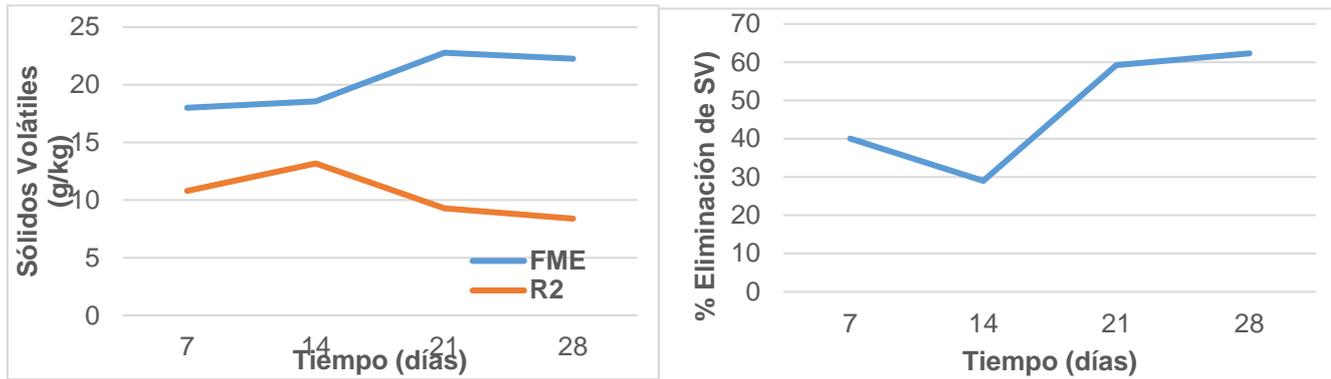


Figura 3.4. Comportamiento y rendimiento de eliminación de los sólidos volátiles en R₂.

Para el caso del sustrato, los valores de sólidos volátiles registrados en las dos primeras semanas fueron de 18,01 y 18,56 g/kg. Entre los días 14 y 21 se produjo un aumento de la concentración, alcanzando la cifra de 22,78 g/kg. Durante la semana comprendida entre los días 21 y 28 prácticamente no se evidenció variación en la concentración de sólidos volátiles, obteniéndose un valor de 22,26 g/kg. Las concentraciones obtenidas son similares a las reportadas por **Seco, S. (2022) [53]**, para un FME utilizado como sustrato en un proceso de digestión anaerobia.

En el efluente la concentración de sólidos volátiles entre los días 7 y 14 se mantuvo entre 10,80 y 13,18 g/kg, mientras que a partir del día 14 y hasta el día 28 estos fueron disminuyendo paulatinamente hasta alcanzar un valor de 8,39 g/kg.

Con respecto a la eliminación de los sólidos volátiles entre el día 7 y el día 14, se observa una disminución de un 40,03 a un 28,99 %. A partir del día 14, se produce un incremento en este parámetro hasta alcanzar el valor de 59,22 % el día 21. Durante la semana comprendida entre los días 21 y 28, prácticamente no existió variación, registrándose un valor de 62,31 % en el día 28. Los rendimientos de eliminación obtenidos, a partir del día 21, son superiores a reportados por otros autores que oscilan entre 30-50% [47].

3.2.3. Nitrógeno total y nitrógeno amoniacal.

3.2.3.1. Digestión de purines.

La figura 3.5 muestra las concentraciones de nitrógeno total obtenidas para el sustrato y el efluente, correspondientes al proceso de digestión anaerobia ocurridos en el reactor No.1

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

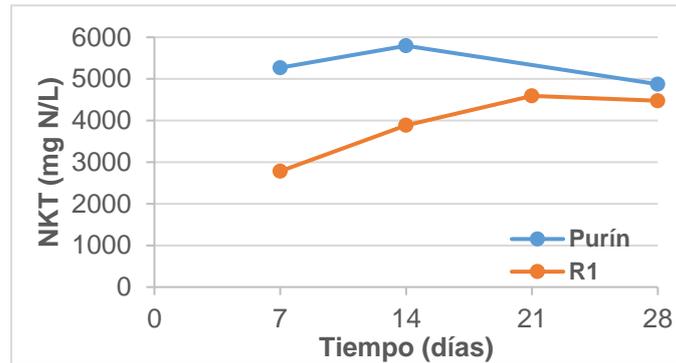


Figura 3.5. Comportamiento del NKT en R₁.

Se puede observar que, para el sustrato, los valores de nitrógeno total durante los días 7 y 14, se mantuvieron entre 5 269,60 y 5 796 mg/L, a partir del día 14 y hasta el día 28, los valores de nitrógeno total presentaron una ligera disminución hasta alcanzar valores de 4 872 mg/L. Los resultados alcanzados para estos parámetros en la alimentación son similares a los obtenidos en un estudio realizado en el cual se empleó el estiércol porcino como fuente de sustrato, con un valor de 5 090 mg/L [49].

Con respecto al proceso de digestión anaerobia, para los días 7 y 14 se observan concentraciones que oscilan entre los 3 000 y los 4 000 mg N/L. A partir del día 14 el contenido de nitrógeno a la salida fue similar al de la entrada, comportamiento que se ve más acentuado a partir del día 21.

En cuanto al nitrógeno amoniacal, las concentraciones a la salida del proceso siempre fueron superiores a las determinadas en la alimentación, debido a que durante la degradación de la materia orgánica el nitrógeno orgánico se transforma en nitrógeno amoniacal.

3.2.3.2. Digestión de lodos.

La figura 3.6 muestra los resultados obtenidos del nitrógeno total contenido en el sustrato FME y en el efluente del reactor No.2.

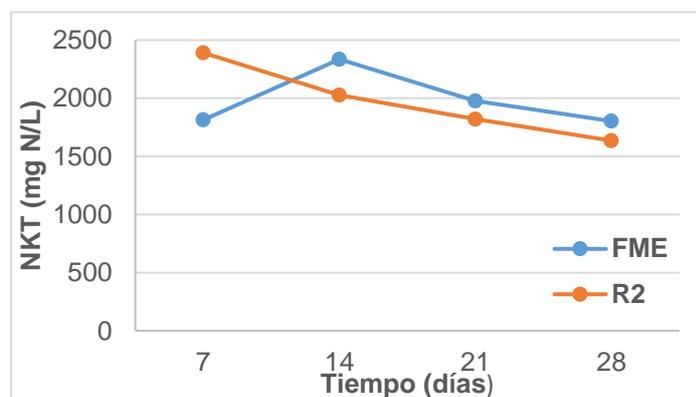


Figura 3.6. Comportamiento del NKT en R₂.

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

En el día 7 se puede observar que la concentración en el sustrato es inferior que la concentración en el efluente, lo cual es un comportamiento erróneo, pudiendo deberse a un error durante la medición. A partir del día 14 y hasta el día hasta el día 28 las concentraciones oscilaron entre 23 00 mg/L y 16 00 mg/L.

Para el caso del proceso de digestión anaerobia, el día 7 la concentración de NKT fue mayor que en la de la entrada, lo cual puede deberse al error en la medición ocurrida. A partir del día 14 y hasta el día 28, los valores oscilaron entre 2000 y 1600 g/kg.

Con respecto al nitrógeno amoniacal, las concentraciones a la salida del proceso siempre fueron superior al contenido obtenido en el sustrato fango mixto espesado, lo cual se deb a que, al ocurrir la degradación de compuestos tales como proteínas, los cuales están compuestos por nitrógeno orgánico, este pasa a su forma inorgánica en nitrógeno amoniacal.

3.2.4. pH

3.2.4.1. Digestión de purines.

La gráfica presentada a continuación (Figura 3.7) muestra los valores de pH obtenidos a lo largo de todo el proceso para el sustrato y efluente del reactor No.1.

Se puede observar que, para el caso del sustrato Purín, el pH se ha mantenido en torno a la neutralidad con valores entre 7,30 y 7,50 [50], lo cual es típico para este tipo de residual. Para el caso del proceso de digestión anaerobia que tiene lugar en el reactor No.1, el pH ha tenido un ligero aumento hacia la alcalinidad ocasionada por la producción de nitrógeno amoniacal, debido a la degradación de la materia orgánica.

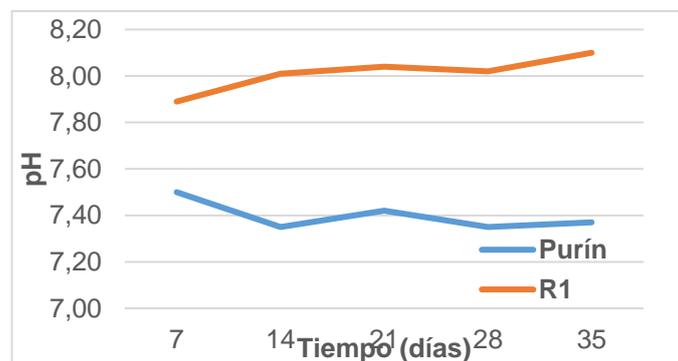


Figura 3.7. Comportamiento del pH en R₁.

3.2.4.2. Digestión de lodos.

La figura 3.8 presenta los valores de pH obtenidos para la alimentación y efluente del reactor No.2.

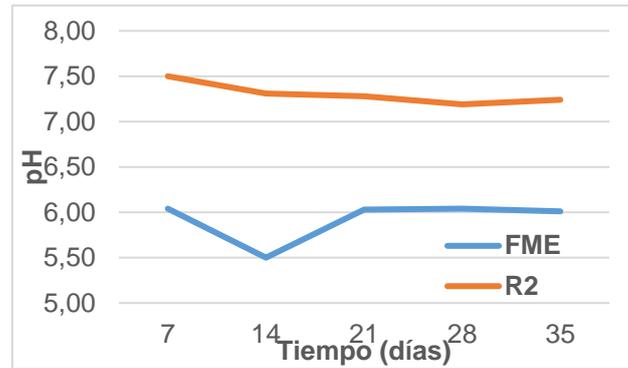


Figura 3.8. Comportamiento del pH en R₂.

En la gráfica se puede observar que, para el caso del Fango mixto espesado, utilizado como alimentación, los valores de pH se mantuvieron en torno a la acidez durante el tiempo de experimentación. Esta situación puede provocar problemas de acidificación o de acumulación de AGVs [47]. En cuanto al proceso de digestión anaerobia, ocurrido en el reactor No.2, se puede observar que los valores de pH se mantuvieron en torno a 7,22, valor habitual obtenido en el proceso [56].

3.2.5. Ácidos Grasos Volátiles.

3.2.5.1. Digestión de purines.

El gráfico a continuación muestra las concentraciones de ácidos grasos volátiles obtenidas para la alimentación y el efluente del reactor No.1 durante la etapa de digestión anaerobia.

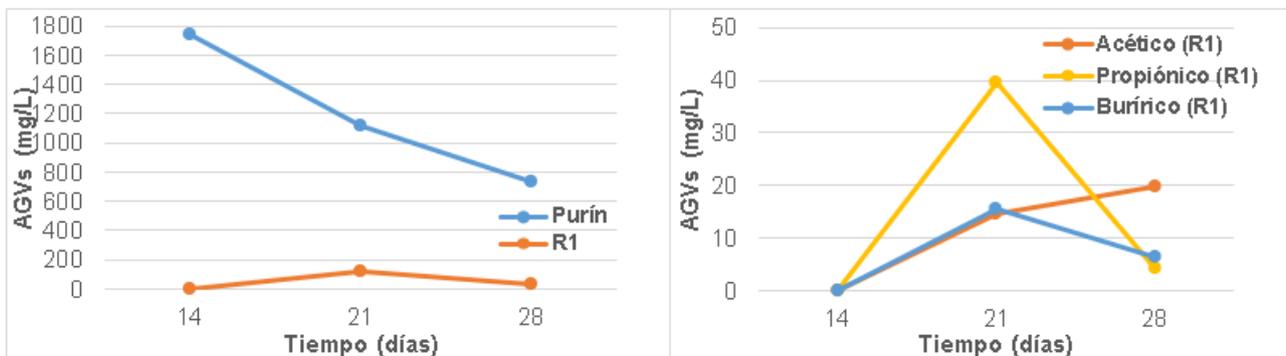


Figura 3.9. Ácidos Grasos Volátiles en R₁.

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Con respecto al sustrato Purín, se observa una disminución gradual de este parámetro a lo largo de todo el proceso, con valores entre 1741,10 y 738,71 mg/L, registrados en los días 14 y 28, respectivamente. Cabe destacar que las concentraciones obtenidas a lo largo de todo el proceso son inferiores a las reportadas por la literatura con valores que oscilan entre 5569,50 y 32 400 mg/L [49,57].

Para el caso del proceso de digestión anaerobia, el día 14 no se registraron ácidos grasos en el efluente. En las dos semanas siguientes la concentración se incrementó hasta 118,75 mg/L para luego disminuir hasta 30,36 mg/L el día 28. Los resultados alcanzados permiten concluir que, durante el ensayo experimental, el sistema no presentó acumulación de AGVs, lo cual está estrechamente vinculado con los elevados volúmenes de biogás obtenidos a partir de este proceso.

El gráfico situado a la derecha muestra el contenido de ácidos acético, propiónico y butírico registrados a la salida del reactor. Se puede observar que en los tres casos las concentraciones obtenidas superan los 40 mg/L, confirmando que no existe acumulación de AGVs en la fase de digestión anaerobia. Esta afirmación se comprobó tras consultar un ensayo de digestión anaerobia para estiércol porcino, en el cual la concentración de ácido acético a la salida del reactor fue inferior a los 100 mg/L [58].

3.2.5.2. Digestión de lodos.

La figura 3.10 muestra el contenido de AGV presentes en el sustrato y efluente del reactor No.2.

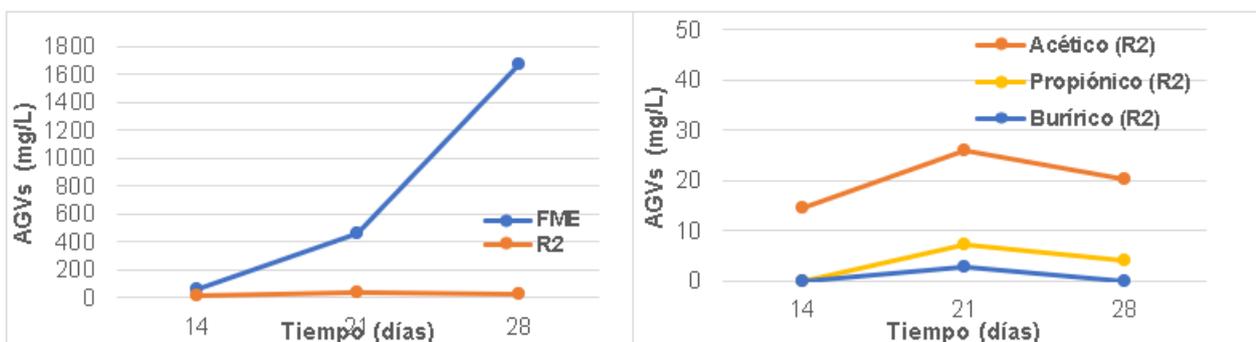


Figura 3.10. Ácidos Grasos Volátiles en R₂.

Se puede observar que para el FME la concentración de AGVs experimentó un aumento a lo largo de todo el proceso, con valores mínimo y máximo de 27,36 y 702,49 mg/L, los cuales se encuentran en el intervalo de concentraciones reportadas para este sustrato [46]. En relación al contenido de AGVs presentes en el efluente, los valores oscilan entre 14,36 y 35,67 mg/L, lo cual evidencia que no se produjo acumulación de ácidos grasos a la salida del reactor. En consecuencia, se obtienen altos volúmenes de biogás.

Como parte de la evaluación de los AGVs durante el proceso, se analizaron las concentraciones de ácidos acético, propiónico y butírico en el efluente. Las cifras alcanzadas no superan los 30 mg/L, corroborando que no existe acumulación de AGVs en el proceso. Los valores alcanzados para los tres compuestos son miliares a los obtenidos en ensayos de digestión anaerobia para lodos mixtos, en los cuales las concentraciones no exceden los 50 mg/L [56].

3.2.6. Producción de Biogás.

El siguiente gráfico muestra el caudal de biogás producido cada 24 horas, durante el ensayo experimental realizado para la digestión de purines (R₁) y la digestión de lodos (R₂).

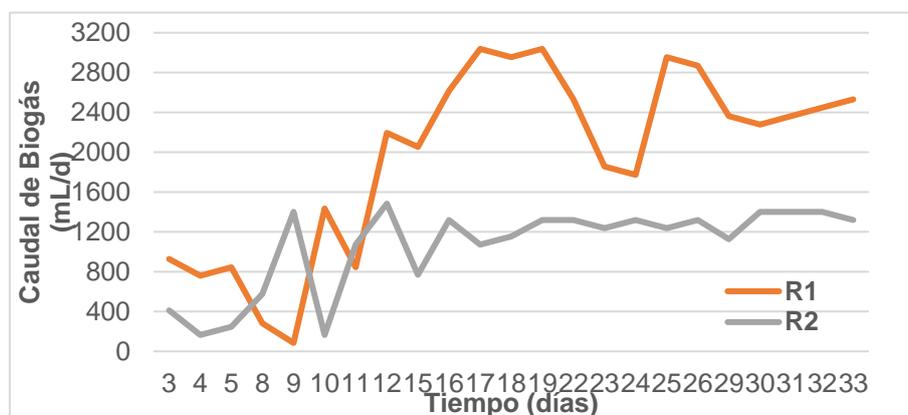


Figura 3.11. Caudal de biogás producido.

Con respecto al proceso de digestión anaerobia que tuvo lugar en R₁, se puede observar que la producción de biogás durante los primeros 9 días de experimentación se mantuvo entre 928,4 y 84,0 mL/d. A partir de esa fecha la producción de biogás comenzó a aumentar diariamente.

Cabe destacar que a partir de día 15 y hasta el día 29, los valores de biogás producido oscilaron entre 25320 y 2363,2 mL/d, observándose un descenso desde 3038,4 hasta 1772,4 mL/d entre los días 22 y 24. Este suceso pudo deberse a que los días 19 y 22 se alimentaron a los reactores con 150 mL del sustrato y se retiraron 150 mL de efluente, lo cual pudo derivar en la sobrealimentación de los reactores. La problemática anteriormente explicada

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

pudo ocurrir debido a que los microorganismos no tengan suficiente tiempo para degradar la materia orgánica y producir el biogás.

En la última semana de experimentación, la producción aumentó a 2954,0 mL/d, el día 25, para luego estabilizarse en valores de 2363,2 hasta 2532,0 mL/d hasta el final del ensayo.

Para el proceso de digestión anaerobia que tuvo lugar en R₂ se puede observar que desde el inicio del ensayo hasta el día 9 la producción aumentó de 412,3 a 1401,8 mL/d. En los días 10 y 15 se registraron descensos en la producción, para luego alcanzar una etapa de estabilidad, con una media de 1282,1 mL/d de biogás producido.

Con el objetivo de analizar la cantidad de metano producido por cada gramo de DQO eliminada en el sistema, se determinaron ambos valores en los Reactores No.1 y No.2

Para el caso de la digestión de purines se obtuvo un valor de 285 mL CH₄/g DQO eliminada mientras que para la digestión de lodos se alcanzó la cifra de 309 mL CH₄/g DQO eliminada. Estos valores permiten concluir que en ambos procesos existe una elevada producción de metano.

3.2.4. Carga orgánica volumétrica.

La carga orgánica volumétrica obtenida a lo largo del ensayo experimental, para los sustratos purín y FME, queda representada en el siguiente gráfico.

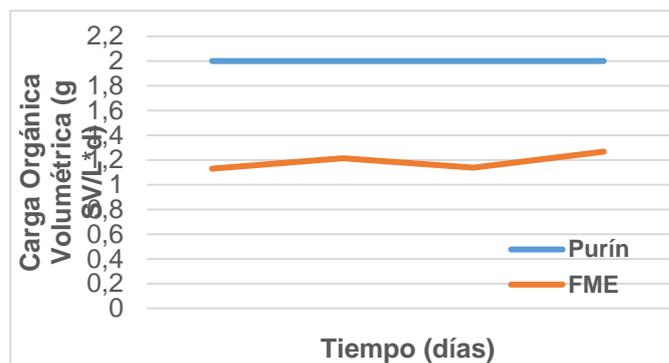


Figura 3.12. Carga Orgánica Volumétrica.

Con respecto al sustrato purín, la carga orgánica se mantuvo prácticamente constante durante todo el proceso, con valores mínimo y máximo de 1,13 y 1,27 g SV/L*d, respectivamente. Los resultados obtenidos son similares a los reportados para procesos anaerobios mesófilos, en los que son utilizados como sustrato el estiércol porcino [58].

En el caso del sustrato FME, el parámetro de carga volumétrica experimentó un aumento durante los primeros 21 días de la experimentación, para luego mantenerse estable, con cifras de 1,14 y 1,11 g SV/L*d registrados en los días

21 y 28, respectivamente. Los valores alcanzados son similares a los reportados por **Díaz, I. et al., (2020) [46]**.

3.3. Cuantificación de genes.

Uno de los principales objetivos de la presente investigación, consistió en evaluar la eficacia del proceso de digestión anaerobia en la eliminación de genes resistentes a los antibióticos, presentes en los purines de cerdo y en los fangos de depuradora.

Para determinar si el proceso provocó la disminución o eliminación de los mismos, se realizó la cuantificación de los genes de resistencia, en las corrientes de entrada y salida del reactor. Dicha cuantificación se realizó a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (qPCR, por sus siglas en inglés), para la cual previamente se tuvo que realizar una extracción del ADN.

Para dar cumplimiento a uno de los principales objetivos de la presente investigación, se realizó la cuantificación de los genes a través de la técnica de qPCR, desarrollada por los investigadores del ISP. Las eficiencias del método utilizado para la determinación de los genes *ARNs 16s*, *intl1* y *sul1*, con cifras de 89, 81 y 86%, respectivamente, evidencian que el método en cuestión se aplicó correctamente, no existiendo errores durante la toma y/o procesamiento de las muestras. Una vez realizada la técnica de qPCR se obtuvo la curva de calibración, a partir de la cual se determinaron las concentraciones de los genes de resistencia.

En la presente investigación se cuantificaron tres genes: *ARNr 16s*, *intl1* y *sul1*. El gen *ARNr 16s*, es un importante constituyente de la subunidad menor de los ribosomas procariontes presentes en las células bacterianas. La determinación de este gen es utilizada para detectar y cuantificar microorganismos **[59]**.

El integrón de clase 1 (*intl 1*) es un integrón móvil que permite que la bacteria produzca resistencia a los antibióticos. Su presencia es, por tanto, un indicativo de la existencia de microorganismos patógenos resistentes a antibióticos, en un determinado organismo **[60]**.

El gen *sul 1* codifica en los microorganismos la resistencia a las sulfamidas, grupo de antibiótico de amplio espectro utilizados para tratar una amplia variedad de enfermedades infecciosas **[61]**.

3.3.1. Gen *ARNr 16s*.

El siguiente gráfico muestra la curva de calibrado obtenida a partir de la cuantificación del gen *ARNr 16s*. La ecuación asociada a la curva presenta un

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

$R^2=0,99$, lo cual indica que el modelo seleccionado se ajusta en gran medida al comportamiento de la variable.

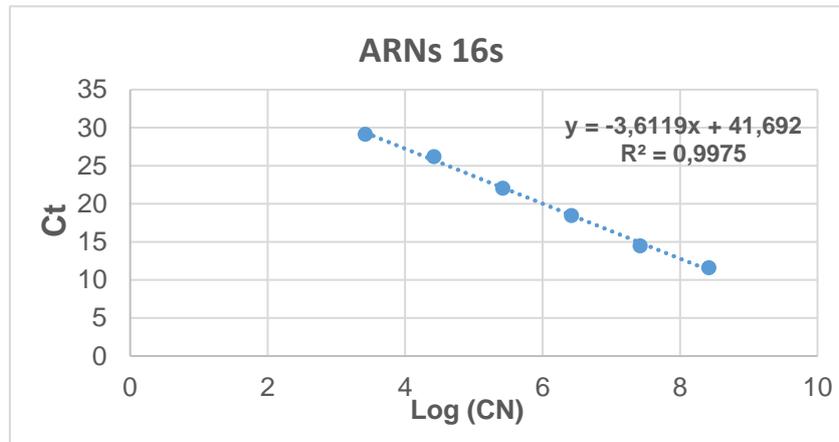


Figura 3.13. Curva de calibrado para el gen *ARNr 16s*.

Una vez obtenida la ecuación fueron determinadas las concentraciones del gen en la alimentación y el efluente del reactor. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

3.3.1.1. Digestión de purines.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos en la cuantificación del gen *ARNr 16s*, para el sustrato y efluente del reactor No.1.

Tabla 3.6. Cuantificación del gen *ARNs 16s* en R_1 .

Tiempo (días)	Purín		R_1	
	CT	Concentración (CN/mL)	CT	Concentración (CN/mL)
7	10,55	$2,09 \cdot 10^8$	13,33	$3,55 \cdot 10^7$
28	9,96	$3,05 \cdot 10^8$	10,43	$2,26 \cdot 10^8$

En relación al sustrato purín, estudios realizados por **Huang, X. et al., (2019) [62]** y **Song, W. et al., (2017) [63]** reportan concentraciones del orden de 10^8 y 10^{11} CN/mL, respectivamente. Para este caso los valores obtenidos son similares a los mencionados, confirmando la presencia de elevado número de genes en el residual.

Para el caso del efluente se observa que las muestras analizadas en los días 7 y 28 poseen una concentración inferior a la presente en el sustrato, lo cual se debe a que el proceso de digestión anaerobia ha provocado la disminución en la cantidad total de material genético.

3.3.1.2. Digestión de lodos.

La tabla 3.7 muestra las concentraciones del gen *ARNr 16s*, obtenidas en las corrientes de entrada y salida del reactor No.2.

Tabla 3.7. Cuantificación del gen *ARNs 16s* en R₂.

Tiempo (días)	Fango Mixto Espesado		R ₂	
	CT	Concentración (CN/mL)	CT	Concentración (CN/mL)
7	14,08	2,20*10 ⁷	14,42	1,77*10 ⁷
28	13,76	2,70*10 ⁷	11,85	9,14*10 ⁷

Las concentraciones del gen *ARNs 16s* determinadas para sustrato son ligeramente inferiores a las reportadas por Díaz, I. et al., (2021) [64], con valores del orden de 10⁹ CN/mL.

Con respecto a la cuantificación realizada en el efluente, se evidencia en el séptimo día una ligera disminución en las concentraciones del gen, mientras que para el día 28, se observa un aumento de este parámetro. El aumento en la concentración en la última etapa puede deberse a la degradación que ha sufrido el sustrato, durante su período de almacenamiento.

3.3.2. Gen de resistencia *intl1*.

El gráfico representado en la figura No. 3.14, muestra la curva de calibrado elaborada a partir de la cuantificación del gen *intl1*. La ecuación de la recta presenta un R²=0,99, lo cual indica que el modelo seleccionado se ajusta en gran medida al comportamiento de la variable.

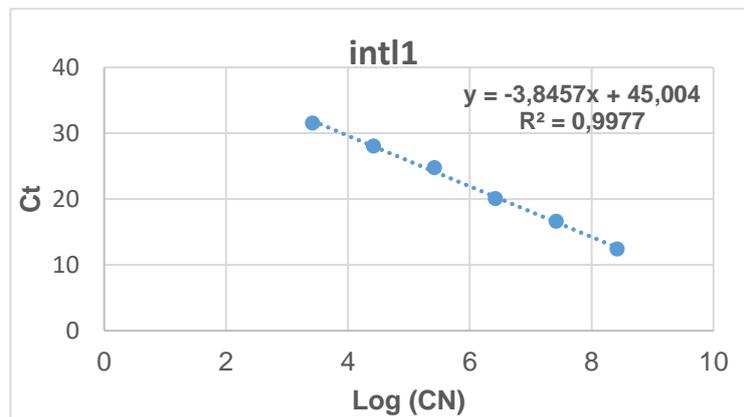


Figura 3.14. Curva de calibrado para el gen *intl1*.

3.3.2.1. Digestión de purines.

La tabla 3.8 muestra las concentraciones del gen *intl1*, halladas en las corrientes de entrada y salida del reactor No.1.

Tabla 3.8. Cuantificación del gen *intl 1* en R₁.

Tiempo (días)	Purín		R ₁		Eliminación (%)
	CT	Concentración (CN/mL)	CT	Concentración (CN/mL)	
7	19,33	2,37*10⁶	24,62	9,98*10⁴	95
28	19,07	2,77*10⁶	22,08	4,56*10⁵	83

Las concentraciones determinadas en el sustrato purín, se encuentran en el intervalo de valores reportados por **Song, W. et al., (2017) [63]** y **Stiborova, H. et al., (2021) [65]**, confirmando la presencia de genes con resistencia a los antibióticos.

En este caso la digestión anaerobia provocó una disminución prácticamente total en las concentraciones del gen *intl*, a los 7 y 28 días de iniciado el proceso, con rendimientos de eliminación del 95 y 83%, respectivamente. Lo anteriormente explicado permite concluir que el proceso de digestión anaerobia, resulta una alternativa eficaz para la eliminación de genes de resistencia a los antibióticos, presentes en el estiércol porcino,

3.3.2.2. Digestión de lodos.

La tabla mostrada a continuación presenta las concentraciones del gen *intl1* determinadas para el sustrato y el efluente del reactor No.2.

Tabla 3.9. Cuantificación del gen *intl1* en R₂.

Tiempo (días)	FME		R ₂		Eliminación (%)
	CT	Concentración (CN/mL)	CT	Concentración (CN/mL)	
7	22,79	2,98*10⁵	28,40	1,03*10⁴	96
28	22,77	3,02*10⁵	25,63	5,45*10⁴	82

Para este caso las concentraciones del gen *intl1*, determinadas en el sustrato fango mixto espesado, son inferiores a las reportadas por **Stiborova, H. et al., (2021) [65]**, del orden de 10⁻² CN/mL. Aun así, estos valores confirman la presencia de genes resistentes a los antibióticos en lodo mixto.

En referencia a los valores obtenidos en el efluente, se puede observar que son inferiores a los hallados para el sustrato. Los rendimientos de eliminación del 95 y 83% obtenidos para los días 7 y 28, respectivamente, permiten afirmar que el proceso de digestión anaerobia redujo, en casi su totalidad, el gen *intl1* presente en el lodo mixto.

3.3.3. Gen de resistencia *sul1*.

La siguiente figura muestra la curva de calibrado, graficada a partir de los datos obtenidos en el ensayo del qPCR, para el gen *sul1*. La ecuación de la recta

pertenciente a dicha curva posee un $R^2=0,99$, indicando que el modelo seleccionado se ajusta bastante al comportamiento de la variable.

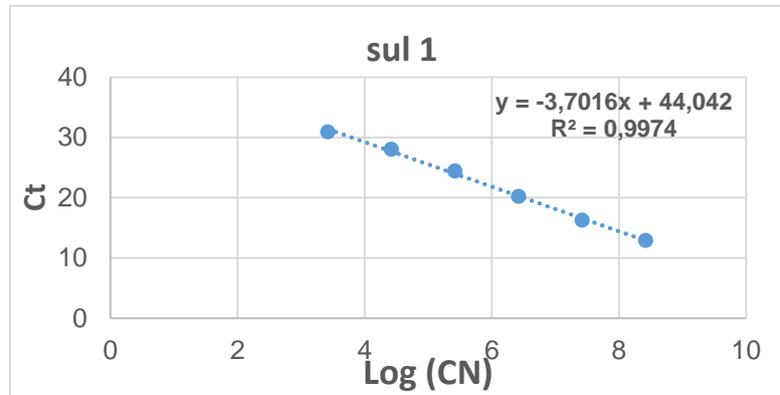


Figura 3.15. Curva de calibrado para el gen *sul1*.

3.3.3.1. Digestión de purines.

La tabla 3.10 presenta las concentraciones y los niveles de remoción del gen *sul1*, en las corrientes de entrada y salida del reactor No.1.

Tabla 3.10. Cuantificación del gen *sul1* en R₁.

Tiempo (días)	Purín		R ₁		Eliminación (%)
	CT	Concentración (CN/mL)	CT	Concentración (CN/mL)	
7	18,81	$3,27 \cdot 10^6$	22,22	$3,92 \cdot 10^5$	88
28	18,41	$4,20 \cdot 10^6$	20,30	$1,29 \cdot 10^6$	70

Según los estudios realizados por **Song, W. et al., (2017) [63]** y **Stiborova, H. et al., (2021) [65]**, las concentraciones típicas del gen *sul1* en el estiércol porcino oscilan en el intervalo de 10^{-3} - 10^{10} CN/mL. Respecto al purín de cerdo, utilizado como sustrato en la presente investigación, se muestran cifras similares a las reportadas, que confirman la presencia de genes resistentes al grupo de antibióticos sulfamidas en este residual.

Para determinar la eficacia del proceso de digestión anaerobia se monitorearon las concentraciones del gen en el efluente del reactor No.1. Los valores obtenidos a la salida del reactor en los días 7 y 28, fueron inferiores a los detectados en el sustrato, alcanzándose rendimientos de eliminación del 88 y 70%, respectivamente. Los resultados alcanzados permiten afirmar que el proceso de digestión anaerobia, es una alternativa eficaz para la eliminación gen *intl1* presente en el lodo mixto.

3.3.3.2. Digestión de lodos.

La tabla No.2 reúne los valores obtenidos para la cuantificación del gen *sul1*, en la alimentación y el efluente del reactor No.2.

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Tabla 3.11. Cuantificación del gen *sul1* en R₂.

Tiempo (días)	FME		R ₂		Eliminación (%)
	CT	Concentración (CN/mL)	CT	Concentración (CN/mL)	
7	22,05	4,36*10⁵	24,20	1,14*10⁵	73
28	22,92	2,54*10⁵	23,22	2,10*10⁵	18

Con respecto a la presencia del gen en el fango mixto espesado, las concentraciones obtenidas son similares a las reportadas por **Stiborova, H. et al., (2021) [65]** para este tipo de residual, siendo del orden de 10^{-3} - 10^{-2} CN/mL.

Para el caso de las concentraciones determinadas en el efluente, se puede observar que ambas son inferiores a las obtenidas en la alimentación. En cuando a los rendimientos de eliminación alcanzados, el séptimo día se obtuvo una remoción del 73%. Se puede observar que en el día 28, el nivel de remoción descendió hasta un valor de 18%. A pesar de esta disminución, el valor obtenido es similar al reportado por **Aziz, A. et al, (2022) [33]** para el gen *sul1*, con cifras entre un 22 %.

Los resultados obtenidos permiten concluir que, el proceso de digestión anaerobia termófila promueve la eliminación del mencionado gen en los lodos mixtos de depuradora.

Conclusiones

Tras la realización de los ensayos de digestión anaerobia para purines (R₁) y lodos (R₂) fueron analizados determinados parámetros que permitieron evaluar dichos procesos.

1. En cuanto a la degradación de la materia orgánica se obtuvieron, en la digestión de purines, rendimientos de eliminación de DQO y sólidos volátiles promedios de 69,98 y 43,38%, respectivamente, lo que evidencia la eficiencia de este proceso para la disminución de la contaminación en residuos de la industria porcina.
2. El biogás producido en este proceso alcanza un valor promedio de 1958,32 mL/d, con una composición promedio de metano de 70,57%, para un rendimiento de 285,35 mL CH₄/g DQO eliminada.
3. Para el ensayo de digestión de lodos, los rendimientos de eliminación de DQO y materia orgánica alcanzados fueron de 56,56 y 47,64%, respectivamente.
4. La producción de biogás obtenida alcanzó un valor promedio de 1054,05 mL/d, con un 56,42% de metano en su composición. El rendimiento de este proceso fue de 309,60 mL CH₄/g DQO eliminada.
5. La determinación de los genes de resistencia se realizó a través del método desarrollado por los investigadores del ISP. Las eficiencias del método utilizado, para la determinación de los genes *ARNs 16s*, *intl1* y *sul1*, alcanzaron cifras de 89, 81 y 86%, respectivamente.
6. Los rendimientos de eliminación de genes de resistencia en la digestión de lodos, presentaron valores de 96 y 73% para los genes *intl1* y *sul1*, respectivamente.

Referencias bibliográficas

1. **Duarte, J. H. (2010).** “Sistemas de producción intensivos: ¿La próxima Crisis Mundial de Salud?”. I Simposio Internacional de Agroecología “Hacia un desarrollo rural sustentable endógeno”.
2. **Miranda, D. (2022).** “¿Qué es una macrogranja y cómo impacta en el medioambiente?”
https://www.nationalgeographic.com.es/naturaleza/que-es-macrogranja-y-como-impacta-medioambiente_17760. (Consultada el 29/05/2022).
3. <https://www.cyclucid.com/referencias/agroalimentaria/purines-de-cerdo-y-vacuno/>. (Consultada el 29/05/2022).
4. <https://www.ecologistasenaccion.org/17382/granjas-de-cerdos-y-purines/>. (Consultada el 03/06/2022).
5. **Hernández, D. (2006).** “Utilización del purín de cerdo como enmienda orgánica en suelos degradados: valoración agronómica y ambiental”. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
6. **Parera, J. (2010).** “Importancia de conocer el contenido de nutrientes del purín porcino para una correcta fertilización: caracterización y medida rápida”. https://www.3tres3.com/articulos/conocer-los-nutrientes-del-purin-para-la-correcta-fertilizacion_2978/. (Consultada el 03/06/2022).
7. **Idrugo, R. (2015).** “Concentración de nitratos en agua contaminada con purines en la explotación ganadera Tartar Pecuario, Baños del Inca-Cajamarca”. Tesis para optar por el Título de Máster en Gestión Ambiental. Universidad Nacional de Cajamarca.
8. **Antezana, W. (2016).** “Análisis de los factores que influyen en las emisiones de amoníaco y metano de purines porcinos: composición del purín y factores nutricionales”. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
9. **Flotats, X and Palatsi, J. (2003).** “Tecnologías de tratamientos de purines de cerdo”. Nuestra Cabaña.
https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/6709/6_3_10.pdf
10. **Cancho Grande, B., García Falcón, M. S. and Simal Gándara, J. (2000).** “El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual”. CYTA - Journal of Food, 3(1), 39-47.
11. **Li, Y., Gu, J., Wang, X., Song, Z., Hu, T., Xie, J., Guo, H., Ding, Q., Xu, L., Wei, Y. and Jiang, H. (2022).** “The fate of antibiotic resistance genes and their influential factors in swine manure composting with sepiolite as additive”. Bioresource Technology, 347, 126727.
12. **Koch, N., Islam, N., Sonowal, S., Prasad, R., Sarma, H. (2021).** “Environmental antibiotics and resistance genes as emerging

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

- contaminants: Methods of detection and bioremediation”. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100027.
13. <https://porcino.info/nuevas-normas-para-limitar-el-uso-de-antibioticos-en-animales-en-la-ue/>. (Consultada el 25/05/2022).
 14. <https://www.recytrans.com/blog/lodos-de-depuradora/>. (Consultada el 30/05/2022)
 15. <https://lacontaminacion.org/las-plantas-depuradoras-de-aguas-residuales-producen-patogenos-muy-poderosos/> (Consultada el 30/05/2022)
 16. **Calderón, G., Aguilar, L. (2016).** “Resistencia microbiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad”. *Revista médica de Costa Rica y Centro América*, 621, 757-763.
 17. **Munita, J. M. and Arias, C. A. (2016).** “Mechanisms of Antibiotic Resistance”. *Microbiology spectrum*. 4(2).
 18. **Soni, K., Jyoti, K., Chandra, H., Chandra R. (2021).** “Bacterial antibiotic resistance in municipal wastewater treatment plant; mechanism and its impacts on human health and economy”. *Bioresource Technology Reports*, 101080.
 19. **Blair, J., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. and Piddock, L. (2015).** “Molecular mechanisms of antibiotic resistance”. *Nature reviews*, 13, 42-59.
 20. **Alkorta, I. and Garbisu, C. (2019).** “Así se propaga la resistencia a los antibióticos en el medioambiente”. <https://theconversation.com/asi-se-propaga-la-resistencia-a-los-antibioticos-en-el-medioambiente-110390>. (Consultada el 24/05/2022).
 21. **Burmeister, A. (2015).** “Horizontal Gene Transfer”. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 1, 193–194.
 22. **Valencia, P. (2009).** “Evidencia de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos provenientes de bacterias ambientales”. Proyecto Final como requisito para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos, Universidad San Francisco de Quito.
 23. <https://www.alamy.es/mecanismos-de-transferencia-horizontal-de-genes-conjugacion-transferencia-de-adn-a-traves-de-un-plasmido-de-una-celula-donante-a-un-receptor-transduccion-adn-bacteriano-image389237220.html>. (Consultada el 25/05/2022)
 24. **Torres, G. (2014).** “Tratamiento de aguas residuales mediante la combinación de técnicas avanzadas de oxidación y biofiltro”. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
 25. <https://www.membranechemicals.com/es/water-treatment/hidrolisis-termica/>. (Consultada el 28/05/2022).

26. <https://www.biodisol.com/que-es-el-biogas-digestion-anaerobia-caracteristicas-y-usos-del-biogas/digestion-anaerobia-proceso-de-produccion-de-biogas-biocombustibles-energias-renovables/>. (Consultada el 12/05/2022).
27. **Cano, P. (2018)**. “Producción de biometano y recuperación de nutrientes de digestato en fotobiorreactores High Rate Algal Pond”. Grado en Ingeniería Química, Universidad de Valladolid.
28. **Gómez, P., Bardales, R. and Zeballos, O. (2020)**. “Digestatos procedentes de la obtención de biogás a partir de purines vacunos en la calidad físico-química de un suelo árido”. Revista de investigación y agroproducción sustentable, 4(2), 62-68.
29. **Lorenzo, Y., Obaya, M. (2005)**. “La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I”. Revista del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), 1, 35-48.
30. **Chen, L. and Neibling, H. (2014)**. “Anaerobic Digestion Basics”. University of Idaho Extension, 6.
31. <https://www.aqualimpia.com/digestion-anaerobica/>. (Consultada el 25/05/2022).
32. **Saéz, J. (2017)**. “Diseño de un reactor anaerobio para la digestión de fangos”. Tesis para optar por el Título de Ingeniero Químico. Universidad Politécnica de Valencia.
33. **Aziz, A., Sengar, A., Basheer, F., Farooqi, I., Isa, M. (2022)**. “Anaerobic digestion in the elimination of antibiotics and antibiotic-resistant genes from the environment – A comprehensive review”. Journal of Environmental Chemical Engineering, 10(1), 106423.
34. **Liu, Y. and Zhao, Q. (2019)**. “Is anaerobic digestion a reliable barrier for deactivation of pathogens in biosludge?”. Science of The Total Environment, 668, 893-902.
35. **Pandey, P. and Soupir, M. (2011)**. “*Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures”. AMB Express, 1(18).
36. **Zhang, Y., Mao, Q., Su, Y., Zhang, H., Liu, H., Fu, B., Su, Z. and Wen, D. (2021)**. “Thermophilic rather than mesophilic sludge anaerobic digesters possess lower antibiotic resistant genes abundance”. Bioresource Technology, 329, 124924.
37. **Ngo, P., Udugama, I., Gernaey, K., Young, B. and Baroutian, S. (2021)**. “Mechanisms, status, and challenges of thermal hydrolysis and advanced thermal hydrolysis processes in sewage sludge treatment”. Chemosphere, 281, 130890.
38. **García, J. (2017)**. “La hidrólisis térmica como medio para incrementar la producción de biogás y energía eléctrica en una depuradora de aguas

- residuales”. *Energía & Minas: Revista Profesional, Técnica y Cultural de los Ingenieros Técnicos de Minas*, 13, 12-28.
39. **Fernández-Polanco, F., Aagesen, E., Fernández-Polanco, M. and Pérez-Elvira, S. (2021)**. “Comparative analysis of the thermal hydrolysis integration within WWTPs as a pre-, inter- or post-treatment for anaerobic digestion of sludge”. *Energy*, 223, 120041.
40. **Pei, J., Yao, H., Wang, H., Ren, J. and Yu, X. (2016)**. “Comparison of ozone and thermal hydrolysis combined with anaerobic digestion for municipal and pharmaceutical waste sludge with tetracycline resistance genes”, 99, 122-128.
41. **Cai, C., Hu, C., Yang, W., Hua, Y., Li, L., Yang, D. and Dai, X. (2021)**. “Sustainable disposal of excess sludge: Post-thermal hydrolysis for anaerobically digested sludge”. *Journal of Cleaner Production*, 321, 128893.
42. **Novoa, F. J. (2022)**. “El problema del foaming en la digestión anaerobia de fangos EDAR/PTAR”. <https://www.aguasresiduales.info/revista/noticias/el-problema-del-foaming-en-la-digestion-anaerobia--rcggg>. (Consultada el 06/06/2022).
43. <https://www.uncuyo.edu.ar/olimpiadas/upload/2015-prueba-nacional-experimental-nivel-ii.pdf>. (Consultada el 06/06/2022).
44. https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-powersoil-pro-kit/?cmpid=PC_QF_MB_microbiome-sales-brand_0520_SEA_GA#orderinginformation&qclid=Cj0KCQjw-pCVBhCFARIsAGMxhAfMmzpnZpc-cDbEHrz-0bE_CRviJ3XGL_maOOWVla720PbrhQYIXJkaAI2vEALw_wcB. (Consultada el 06/06/2022).
45. **Bishoff, D., AlSayed, A., Hosen, S., Menon, H. & EIDyasti, A. (2021)**. “Effect of COD on methanotrophic growth and the anaerobic digestibility of its sludge as a further step for integration in WWTPS”. *Journal of Environmental Management*, 290, 112543.
46. **Díaz, I., Fernández-Polanco, F., Mutsvene, B. and Fernández-Polanco, F. (2020)**. “Effect of operating pressure on direct biomethane production from carbon dioxide and exogenous hydrogen in the anaerobic digestion of sewage sludge”. *Applied Energy*, 280, 115915.
47. **Arhoun, B. (2017)**. “Digestión y codigestión anaerobia de residuos agrícolas, ganaderos y lodos de depuradora”. Tesis para optar por el grado de Doctor. Universidad de Málaga.
48. **Jo, Y., Cayetano, R., Kim, G., Park, J. and Kim, S. (2022)**. “The effects of ammonia acclimation on biogas recovery and the microbial population

- in continuous anaerobic digestion of swine manure”. *Environmental Research*, 212 (D), 113483.
- 49. Blanco, L. (2016).** “Análisis y caracterización de purines para la obtención de estruvita y biogás”. Trabajo Fin de Grado. Universidad Politécnica de Valencia.
- 50. Chartier, C. (2011).** “Evaluación de la retención de bacterias Gram negativas entéricas lactosa positivo en columnas de suelo franco limoso, tras aplicación de purín de cerdo tratado anaeróticamente y sin tratamiento”. Tesis para optar por el título de Bioingeniero. Universidad de Concepción.
- 51. Fernández, L. (2016).** “Selección y dimensionado de un sistema de generación de biogás mediante digestión anaerobia de purines codigeridos con glicerina”. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Cádiz
- 52. Ndegwa, P.M., Hamilton, D.W., Lalman, J.A. and Cumba, H.J. (2008).** “Effects of cycle-frequency and temperature on the performance of anaerobic sequencing batch reactors (ASBRs) treating swine waste”. *Bioresource Technology*, 99(1972–1980).
- 53. Seco, S. (2022).** “Propuesta de diseño de experimento para el tratamiento por microoxigenación de lodos de EDAR”. Trabajo de Orientación Investigadora. Universidad de Valladolid.
- 54. Díaz, I., Lopes, A., Pérez, S. and Fernández-Polanco, M. (2010).** “Performance evaluation of oxygen, air and nitrate for the microaerobic removal of hydrogen sulphide in biogas from sludge digestion”. *Bioresource Technology*, 101 (20).
- 55. Riau, V., de la Rubia, M., Foster-Carneiro, T. & Pérez, M. (2015).** “Comparación entre la digestión anaerobia mesofílica y termofílica de lodos de depuradora”. https://www.researchgate.net/publication/268403439_COMPARACION_ENTRE_LA_DIGESTION_ANAEROBIA_MESOFILICA_Y_TERMOFILICA_DE_LODOS_DE_DEPURADORA. (Consultada el 09/07/2022).
- 56. García, K. (2009).** “Codigestión anaeróbica de estiércol y lodos de depuradora para producción de biogás”. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Cádiz.
- 57. Campos, E. (2001).** “Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. Tesis Doctoral. Universidad de Lleida.
- 58. Deng, X., Gao, K., Zhang, R., Addy, M., Lu, Q., Ren, K., Chen, P., Liu, Y. and Ruan, R. (2017).** “Growing *Chlorella vulgaris* on thermophilic anaerobic digestion swine manure for nutrient removal and biomass production”. *Bioresource Technology*, 243.

59. Rampini, S., Bloemberg, G., Keller, P., **Büchler**, A., Dollenmaier, R., Speck, R. and **Böttger**, E. (2011). “Broad-range 16S rRNA gene polymerase chain reaction for diagnosis of culture-negative bacterial infections”.
60. **Souque, C. Escudero, J. and MacLean, R. (2021)**. “Integron activity accelerates the evolution of antibiotic resistance”. <https://elifesciences.org/articles/62474>
61. **Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. and Peixe, L. (2005)**. “Dissemination of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* Strains and Relation with Integrons”. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(2).
62. **Huang, X., Zheng, J., Tian, S., Liu, S., Liu, L., Wei, L., Fan, H., Zhang, T., Wang, L., Zhu, L. & Xud, K. (2019)**. “Higher Temperatures Do Not Always Achieve Better Antibiotic Resistance Gene Removal in Anaerobic Digestion of Swine Manure”. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(7).
63. **Song, W., Wang X., Gu, J., Zhang, S., Yin, Y., Li, Y., Qian, X. & Sun, W. (2017)**. “Effects of different swine manure to wheat straw ratios on antibiotic resistance genes and the microbial community structure during anaerobic digestion”. *Bioresource Technology*, 231.
64. **Díaz, I., Gonçalves, J., Torres, A., Rodríguez, E. & García, P. (2021)**. “Detection of antimicrobial resistance genes in sludge processed by anaerobic digestion”. Universidad de Valladolid.
65. **Stiborova, H., Kracmarova, M., Vesela, T., Biesiekierska, M., Cerny, J., Balik, J. & Demnerova, K. (2021)**. “Impact of Long-Term Manure and Sewage Sludge Application to Soil as Organic Fertilizer on the Incidence of Pathogenic Microorganisms and Antibiotic Resistance Genes”. *Agronomy*, 11, 1423.
66. **Aziz, A., Sengar, A., Basheer, F., Farooqi, I., Isa, M. (2022)**. “Anaerobic digestion in the elimination of antibiotics and antibiotic-resistant genes from the environment – A comprehensive review”. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(1), 106423.

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Anexos

Anexo 1. Valores de DQO obtenidos durante la digestión de purines.

Tiempo	Purín	R1	% eliminación
7	89703,50	28625,34	68,09
14	64501,16	25846,87	59,93
21	75452,44	16612,53	77,98
28	51972,16	17354,99	66,61
35	62552,20	14199,54	77,30

Anexo 2. Valores de DQO obtenidos durante la digestión de lodos.

Tiempo	FME	R2	% eliminación
7	28086,25	12668,46	54,89
14	27192,58	13248,26	51,28
21	26264,50	10023,20	61,84
28	22923,43	11415,31	50,20
35	28491,88	10092,81	64,58

Anexo 3. Valores de SV obtenidos durante la digestión de purines.

Tiempo	Purín	R1	% eliminación
7	22,60	12,29	45,62
14	24,28	15,23	37,27
21	22,75	12,68	44,26
28	25,35	13,60	46,35

Anexo 4. Valores de SV obtenidos durante la digestión de lodos.

Tiempo	FME	R2	% eliminación
7	18,01	10,80	40,03
14	18,56	13,18	28,99
21	22,78	9,29	59,22
28	22,26	8,39	62,31

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Anexo 5. Valores de NKT obtenidos durante la digestión de purines.

Tiempo (días)	Purín	R1
7	5269,60	2783,20
14	5796,00	3886,40
21		4592,00
28	4872,00	4474,40
35		4788,00

Anexo 6. Valores de NKT obtenidos durante la digestión de lodos.

Tiempo (días)	FME	R2
7	1814,40	2391,20
14	2335,20	2027,20
21	1976,80	1820,00
28	1803,20	1635,20
35	1825,60	1489,60

Anexo 7. Valores de pH obtenidos durante la digestión de purines.

Tiempo (días)	Purín	R1
7	7,50	7,89
14	7,35	8,01
21	7,42	8,04
28	7,35	8,02
35	7,37	8,10

Anexo 8. Valores de pH obtenidos durante la digestión de lodos.

Tiempo (días)	FME	R2
7	6,04	7,50
14	5,50	7,31
21	6,03	7,28
28	6,04	7,19
35	6,01	7,24

“Evaluación del desempeño energético y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en digestión anaerobia de residuos orgánicos”

Anexo 9. Caudales de biogás obtenidos en los reactores No.1 y No.2

Tiempo (días)	Flujo de Biogás (mL/d)	
	R1	R2
3	928,4	412,3
4	759,6	164,9
5	844,0	247,4
8	281,3	577,2
9	84,4	1401,8
10	1434,8	164,9
11	844,0	1072,0
12	2194,4	1484,3
15	2053,7	769,6
16	2616,4	1319,4
17	3038,4	1072,0
18	2954,0	1154,4
19	3038,4	1319,4
22	2532,0	1319,4
23	1856,8	1236,9
24	1772,4	1319,4
25	2954,0	1236,9
26	2869,6	1319,4
29	2363,2	1127,0
30	2278,8	1401,8
31	2363,2	1401,8
32	2447,6	1401,8
33	2532,0	1319,4