

Trabajo Fin de Máster

Evaluación de procedimientos de diagnóstico del
grado de higienización de fangos procedentes del
tratamiento de aguas residuales urbanas

Autora

Bárbara Baguer Canales

Directora

Andrea López Martín

Ponente

M^a Peña Ormad Melero

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

2017



Escuela de
Ingeniería y Arquitectura
Universidad Zaragoza

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

(Este documento debe acompañar al Trabajo Fin de Grado (TFG)/Trabajo Fin de Máster (TFM) cuando sea depositado para su evaluación).

D./D^a. BÁRBARA BAGUER CANALES

con nº de DNI 73010941V en aplicación de lo dispuesto en el art.

14 (Derechos de autor) del Acuerdo de 11 de septiembre de 2014, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueba el Reglamento de los TFG y TFM de la Universidad de Zaragoza,

Declaro que el presente Trabajo de Fin de (Grado/Máster)
MÁSTER, (Título del Trabajo)

Evaluación de procedimientos de diagnóstico del grado de higienización de
fangos procedentes del tratamiento de aguas residuales urbanas

es de mi autoría y es original, no habiéndose utilizado fuente sin ser citada debidamente.

Zaragoza, 20 Junio 2017

Fdo: Bárbara Baguer Canales

AGRADECIMIENTOS A

M^a Peña Ormad Melero y Andrea López Martín, por su excelente labor como directoras y su asesoramiento y ayuda a lo largo de la realización de todo el proyecto.

A todo el grupo de Calidad y Tratamiento de Aguas de la Universidad de Zaragoza, por su buena acogida.

A los trabajadores de la EDAR de Tudela por la facilidad a la hora de proporcionar los datos y las muestras necesarias para este proyecto.

A mis personas queridas, por todo su apoyo.

RESUMEN

Los fangos resultantes del tratamiento de aguas residuales urbanas son un residuo de suma importancia. Aproximadamente el 80% de los fangos generados en el año 2012 se valorización en la agricultura, a pesar de tratarse de un tema polémico, debido a la posible contaminación por la presencia de patógenos. Sin embargo, no existe legislación nacional que establezca límites de parámetros microbiológicos. Para los fangos no existe una metodología analítica desarrollada y los resultados en ocasiones no pueden ser comparados. El presente Trabajo Fin de Máster se centra en el estudio y la evaluación de las herramientas que se utilizan actualmente para determinar el grado de higienización de los fangos de aguas residuales urbanas utilizando *E.faecalis* como indicador bacteriano. Para ello, se aplican cuatro métodos normalizados (filtración en membrana, siembra en superficie, siembra en masa y número más probable) para el análisis de *E.faecalis* en aguas y alimentos, tanto en muestras reales de fango como en muestras estériles fortificadas con cepa. Además, se analizan estadísticamente datos tanto de concentración microbiológica como de parámetros de control físico químicos de 3 plantas piloto con tratamientos biológicos de: digestión anaerobia mesófila, digestión anaerobia termófila y digestión aeróbica autotérmica sostenida. Se determina que para muestras de fango con alto rango de concentración, el método de filtración en membrana es el más óptimo y que para rangos bajos es el método de Número Más Probable. Asimismo, se evidencia que en función del método analítico aplicado se llegan a determinaciones diferentes del grado de cumplimiento de los criterios de calidad de higienización de fangos. Se determina el diferente comportamiento entre indicadores, la no influencia del tiempo de retención hidráulico en el rango estudiado y una evolución similar entre la reducción microbiológica y el valor de amonio en la digestión anaerobia termófila.

Palabras clave: Fango, tratamiento biológico, *Enterococcus*, metodología analítica, TRH, ANOVA

ABSTRACT

Sludge resulting from urban wastewater treatment is a major waste. Around 80% of the sludge produced in 2012 was recovered in agriculture, despite being a controversial issue, due to the possible pollution by the presence of pathogens. However, there is no national legislation that establishes limits of microbiological parameters. For the sludge there is no analytical methodology developed and the results can sometimes not be compared. This report is focused on the study and evaluation of the tools that are currently used to determine the degree of hygienisation of urban sewage sludge using *E.faecalis* as a bacterial indicator. In order to do this, four standard methods (membrane filtration, surface spread, pour plate and most probable number) for the analysis of *E. faecalis* in water and food, were applied in both real sludge samples and in sterilized sludge samples fortified with a strain. Moreover, data of both microbiological concentration and chemical control parameters of 3 pilot plants with biological treatments of: mesophilic anaerobic digestion, thermophilic anaerobic digestion and sustained autothermic aerobic digestion, were statistically analyzed. It is claimed that for samples with a high concentration range, the membrane filtration method is the most optimal and that for low ranges is the NMP method. Besides, it is stated that depending on the analytical method that is applied, different determinations of the degree of compliance with the sludge sanitation quality criteria are reached. The different behavior between indicators, the non-influence of the hydraulic retention time in the studied range and a similar evolution between the microbiological reduction and the ammonium value in the thermophilic anaerobic digestion were determined.

Key- words. Sludge, biological treatment, *Enterococcus*, analytical methodology, TRH, ANOVA

GLOSARIO

AGV= Ácidos grasos volátiles
AN= Agar nutritivo
ANOVA= Análisis de varianza
ATAD= Digestión Aeróbica Autotérmica sostenida
BEA= Bile esculin azide agar
CCA= Agar cromogénico Coliformes
CSTR= mezcla continua
DQO= Demanda Química de Oxígeno
EDAR= Estación Depuradora de Aguas Residuales
EU= Unión Europea
GL= Grado de libertad
ICs= Gráficas individuales (Individual chart)
LD= Límite de detección
Log= base logarítmica
LSD= Least Significance difference
MAD= Digestión anaerobia mesófila
MC Ajust= Cuadrados medios ajustados
NILSA= Navarra de Infraestructuras Locales S.A
NMP= Número más probable
PEMAR= Plan estatal Marco de Gestión de Residuos
PNIR= Plan Nacional Integrado de Residuos
R-ajust= Valor regresión
S= desviación estándar
SB= Slanetz y Bartley
SC Ajust= Suma de cuadrados
SM= Método estandarizado (Standard Method)
SS= Sólidos volátiles
ST= Sólidos totales
t.m.s= Toneladas de materia seca
TAD= Digestión anaerobia termófila
TBX= Tryptone Bile Agar
TRH= Tiempo retención hidráulico
UFC= Unidades de Formación de Colonias
US DA= Base de datos de nutrientes de Estados Unidos

US EPA= Agencia medioambiental de Estados Unidos

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
1.1	Tratamiento biológico y valorización de fangos de depuradora	1
1.1.1	Generación de fangos de EDAR.....	1
1.1.2	Legislación y normativa vigente relativa al tratamiento y valorización de fangos.....	2
1.1.3	Procesos convencionales y avanzados de tratamiento biológico de fangos de EDAR.....	4
1.1.4	Parámetros de control físico químicos y microbiológicos en la higienización de fangos.....	5
1.2	Contaminación microbiológica presente en fangos de EDAR.....	6
1.2.1	Contaminación microbiológica como problema en la valorización de fangos de EDAR	6
1.2.2	Bacterias indicadoras en fangos y biosólidos	7
1.2.3	Metodología de análisis microbiológico en muestras de fangos	8
2	OBJETIVOS	11
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
3.1	Descripción de métodos analíticos.....	13
3.2	Datos complementarios objeto de estudio	16
3.3	Análisis estadístico de datos	18
4	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL, RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1	Procedimiento experimental y resultados de análisis de <i>E.faecalis</i> en fangos	19
4.2	Interpretación de resultados previos de análisis de <i>E.coli</i> en fangos	26
4.3	Diagnóstico de higienización de fangos	27
4.3.1	Variables influyentes en la reducción microbiológica.....	27
4.3.2	Determinación del grado de cumplimiento de criterios de calidad.....	31
5	CONCLUSIONES	33
6	BIBLIOGRAFÍA.....	35
	ANEXO 1: FANGOS DE DEPURADORA.....	a
	ANEXO 2: PLANTAS PILOTO Y EDAR TUDELA.....	g
	ANEXO 3: METODOLOGÍA.....	y
	ANEXO 4: AMPLIACIÓN DE RESULTADOS	gg

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Requerimientos de tiempo y temperatura para la producción de fango virtualmente libre de patógenos (Strauch, 1991)	6
Figura 3-1. Procedimiento para el análisis de muestras mediante la técnica de filtración en membrana	14
Figura 3-2. Procedimiento para el análisis de muestras mediante la técnica de siembra en masa	14
Figura 3-3. Procedimiento para el análisis de muestras mediante la técnica de siembra en superficie	14
Figura 3-4. Procedimiento para el análisis de muestras mediante la técnica del número más probable	14
Figura 4-1. Técnica de aislamiento en superficie por agotamiento.(Interdisciplinary y Conference, 2012)	19
Figura 4-2. Esquema del método de diluciones seriadas (Interdisciplinary y Conference, 2012)	20
Figura 4-3. Filtro con alto contenido en sólidos	23
Figura 4-4. Asa con muestra adherida	23
Figura 4-5. Tubos resultantes NMP de diferente grado de turbidez	23
Figura 4-6. Diferencia entre medias para reducción de <i>E.faecalis</i> resultados Ensayo 1	24
Figura 4-7. Diferencia entre medias para reducción de <i>E.faecalis</i> resultados Ensayo 3	25
Figura 4-8. Diferencia entre medias para concentración <i>E.coli</i> para los resultados de medios de cultivo en siembra en superficie	26
Figura 4-9 Diferencia entre medias para concentración <i>E.coli</i> para los resultados de diferentes métodos analíticos	27
Figura 4-10. Intervalos de reducción de <i>E.faecalis</i> para diferentes tratamientos	28
Figura 4-11. Diferencia entre medias para reducción de <i>E.faecalis</i> para diferentes tratamientos	28
Figura 4-12. Intervalos de reducción de <i>E.faecalis</i> para diferentes TRH en tratamiento termófilo	29
Figura 4-13. Intervalos de reducción de <i>E.coli</i> para diferentes tratamientos	29
Figura 4-14. Intervalos de reducción de C.totales para diferentes tratamientos	30
Figura 4-15 Intervalos de reducción de <i>S.aureus</i> para diferentes tratamientos	30
Figura 4-16. Evolución de amonio y reducción de <i>E.faecalis</i> para TRH y diferentes tratamientos	31
Figura 4-17 Evolución de amonio y reducción de <i>E.coli</i> para TRH y diferentes tratamientos	31

ÍNDICE DE FIGURAS ANEXOS

Figura A1-1. Etapas de generación de los fangos de depuración. Fuente: Mapama	a
Figura A1-2. Alternativas a la gestión de los fangos. Fuente: ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE ABASTECIMIENTO DE AGUA Y SANEAMIENTO	c
Figura A2-1. Esquema de uno de los digestores pilotos	h
Figura A2-2. Dibujo esquemático de la EDAR de Tudela	i
Figura A2-3. Etapas de la EDAR de Tudela	i
Figura A2-4- DQO filtrada para TRH 10 y 5 días en mesófilo y termófilo	j

Figura A2-5. Amonio para TRH 10 y 5 días en mesófilo y termófilo.....	k
Figura A2-6. Sólidos volátiles eliminados para TRH 10 y 5 días en mesófilo y termófilo.....	k
Figura A2-7 AGV para TRH 10 y 5 días en mesófilo y termófilo.....	l
Figura A2-7. DQO filtrada para TRH 12 y 7 días en mesófilo y termófilo.....	l
Figura A2-8. Amonio para TRH 12 y 7 días en mesófilo y termófilo.....	m
Figura A2-9. Sólidos volátiles eliminados para TRH 12 y 7 días en mesófilo y termófilo.....	m
Figura A2-10 AGV para TRH 12 y 7 días en mesófilo y termófilo.....	n
Figura A2-11. DQO filtrada para TRH 15 y 10 días en mesófilo y termófilo.....	n
Figura A2-12. Amonio para TRH 15 y 10 días en mesófilo y termófilo.....	o
Figura A2-13. Sólidos volátiles eliminados para TRH 15 y 10 días en mesófilo y termófilo..	o
Figura A2-14. AGV para TRH 15 y 10 días en mesófilo y termófilo.....	p
Figura A2-14. DQO filtrada para TRH 20 y 15 días en mesófilo y termófilo.....	p
Figura A2-15. Amonio para TRH 20 y 15 días en mesófilo y termófilo.....	q
Figura A2-16. Sólidos volátiles eliminados para TRH 20 y 15 días en mesófilo y termófilo..	q
Figura A2-17. AGV para TRH 20 y 15 días en mesófilo y termófilo.....	r
Figura A2-18. DQO filtrada para ATAD 5 días.....	r
Figura A2-19. Sólidos volátiles para ATAD 5 días.....	s
Figura A2-20. Amonio para ATAD 5 días.....	s
Figura A2-21. AGV para ATAD 5 días.....	t
Figura A2-22. DQO filtrada para ATAD 10 días.....	t
Figura A2-23. Sólidos volátiles para ATAD 10 días.....	u
Figura A2-24. Amonio para ATAD 10 días.....	u
Figura A2-25. AGV para ATAD 10 días.....	v
Figura A2-26. DQO filtrada para ATAD 15 días.....	v
Figura A2-27. Sólidos volátiles para ATAD 15 días.....	w
Figura A2-28. Amonio para ATAD 15 días.....	w
Figura A2-29. AGV para ATAD 15 días.....	x
Figura A3-7. Representación pasos método filtración en membrana.....	cc
Figura A3-8. Tubos NMP con y sin turbidez.....	dd
Figura A3-9. Tabla interpretación resultados NMP.....	ee
Figura A3-10. Equipo Scan pressure sensitive pad.....	ee
Figura A4-1. Análisis de residuos Ensayo 1.....	nn
Figura A4-2. Gráfica de intervalos para los diferentes métodos Ensayo 1.....	nn
Figura A4-3. Análisis de residuos Ensayo 2.....	oo
Figura A4-4. Gráfica de intervalos para los diferentes métodos Ensayo 2.....	oo
Figura A4-5. Diferencia entre medias para las diferentes metodologías Ensayo 2.....	pp
Figura A4-6. Análisis de residuos Ensayo 3.....	pp
Figura A4-7. Gráfica de intervalos para los diferentes métodos Ensayo 3.....	qq
Figura A4-8. Análisis de residuos Ensayo 4.....	qq
Figura A4-9. Gráfica de intervalos para los diferentes métodos Ensayo 4.....	rr
Figura A4-10. Diferencia entre medias para las diferentes metodologías Ensayo 4.....	rr
Figura A4-11. Análisis de residuos Ensayo 5.....	ss
Figura A4-12. Gráfica de intervalos para los diferentes métodos Ensayo 5.....	ss
Figura A4-13. Diferencia entre medias para las diferentes metodologías Ensayo 5.....	tt
Figura A4-14. Análisis de residuos muestra real 2.....	uu
Figura A4-15 Gráfica de intervalos para los diferentes métodos muestra real 2.....	uu
Figura A4-16. Diferencia entre medias para las diferentes metodologías muestra real	vv
Figura A4-17. Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 1 y 2 filtración.....	ww
Figura A4-18. Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 1 y 4 filtración.....	ww
Figura A4 -19 Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 1 y 2 siembra en masa	xx
Figura A4 -20 Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 1 y 3 siembra en masa	xx

Figura A4-21 Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 3 y 4 siembra en masa	yy
Figura A4-22. Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 1 y 2 siembra en superficie	yy
Figura A4-23. Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 1 y 4 siembra en superficie	zz
Figura A4-24 Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 2 y 5 siembra en superficie	zz
Figura A4-25. Análisis de los residuos comparación medios de cultivo para Filtración	aaa
Figura A4-26. Comparación entre medias comparación medios de cultivo para Filtración	bbb
Figura A4-27 Análisis de los residuos comparación medios de cultivo para Siembra en masa	bbb
Figura A4-28 Gráfica de intervalos comparación medios de cultivo para Siembra en masa	ccc
Figura A4-29 Comparación entre medias comparación medios de cultivo para Siembra en masa	ccc
Figura A4-30. Análisis de los residuos comparación medios de cultivo para Siembra en superficie	ddd
Figura A4-31 Gráfica de intervalos comparación medios de cultivo para Siembra en superficie	ddd
Figura A4-32 Comparación entre medias comparación medios de cultivo para Siembra en superficie	eee
Figura A4-33 Gráfica de intervalos comparación métodos analíticos	fff
Figura A4-34 Comparación entre medias comparación métodos analíticos	fff
Figura A4-35. Intervalo de confianza de las desviaciones entre ensayos para filtración	ggg
Figura A4-36 Intervalo de confianza de las desviaciones entre ensayos para siembra en masa	ggg
Figura A4-37. Intervalo de confianza de las desviaciones entre ensayos para siembra en superficie	hhh
Figura A4-38. Análisis de los residuos comparación TRH tratamiento mesófilo	hhh
Figura A4-39 Comparación entre medias comparación TRH tratamiento mesófilo	iii
Figura A4-40. Análisis de los residuos comparación TRH tratamiento termófilo	jjj
Figura A4-41 Gráfica de intervalos comparación TRH tratamiento termófilo	jjj
Figura A4-42 Comparación entre medias comparación TRH tratamiento termófilo	kkk
Figura A4-43. Análisis de los residuos comparación TRH tratamiento ATAD	kkk
Figura A4-44 Gráfica de intervalos comparación TRH tratamiento ATAD	lll
Figura A4-45 Comparación entre medias comparación TRH tratamiento ATAD	lll
Figura A4-46 Análisis de los residuos comparación tratamientos para <i>E.coli</i>	mmm
Figura A4-47 Gráfica de intervalos comparación tratamientos para <i>E.coli</i>	nnn
Figura A4-48 Comparación entre medias comparación tratamientos para <i>E.coli</i>	nnn
Figura A4-49 Análisis de los residuos comparación tratamientos para <i>E.coli</i>	ooo
Figura A4-50 Gráfica de intervalos comparación tratamientos para <i>E.coli</i>	ooo
Figura A4-51 Comparación entre medias comparación tratamientos para <i>E.coli</i>	ppp
Figura A4-52. Análisis de los residuos comparación TRH tratamiento mesófilo <i>E.coli</i>	ppp
Figura A4-53 Gráfica de intervalos comparación TRH tratamiento mesófilo <i>E.coli</i>	ppp
Figura A4-54 Gráfica de intervalos comparación TRH tratamiento termófilo <i>E.coli</i>	qqq
Figura A4-55 Comparación entre medias comparación TRH tratamiento termófilo <i>E.coli</i>	qqq
Figura A4-56 Análisis de los residuos comparación TRH tratamiento ATAD <i>E.coli</i>	rrr
Figura A4-57 Gráfica de intervalos comparación TRH tratamiento ATAD <i>E.coli</i>	rrr
Figura A4-58 Comparación entre medias comparación TRH tratamiento ATAD <i>E.coli</i>	sss
Figura A4-59 Análisis de los residuos comparación tratamientos Coliformes totales	ttt
Figura A4-60 Gráfica intervalos comparación tratamientos Coliformes totales	ttt

Figura A4-61 Comparación de medias comparación tratamientos Coliformes totales.....	uuu
Figura A4-62 Análisis de los residuos comparación tratamientos <i>S.aureus</i>	uuu
Figura A4-63 Gráfica intervalos comparación tratamientos <i>S.aureus</i>	vvv
Figura A4-64 Comparación de medias comparación tratamientos <i>S.aureus</i>	vvv
Figura A4-65 Análisis de los residuos comparación tratamientos Amonio.....	www
Figura A4-66 Gráfica intervalos comparación tratamientos Amonio.....	www
Figura A4-67 Comparación de medias comparación tratamientos Amonio.....	xxx
Figura A4-68 Evolución de DQOf y reducción de <i>E.faecalis</i> para TRH y diferentes tratamientos.....	yyy
Figura A4-69 Evolución de ST y reducción de <i>E.faecalis</i> para TRH y diferentes tratamientos.....	yyy
Figura A4-70 Evolución de SV eliminados y reducción de <i>E.faecalis</i> para TRH y diferentes tratamientos.....	zzz
Figura A4-71 Evolución de AGV o y reducción de <i>E.faecalis</i> para TRH y diferentes tratamientos.....	zzz

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Evolución de la producción de fangos de depuración en España (2008-2012)	
Fuente: Registro Nacional de Fangos.....	2
Tabla 1-2. : Criterios de calidad relacionados con la higienización de fangos de EDARs para su uso agrícola.....	10
Tabla 3-1. Metodologías de análisis utilizadas para determinar <i>Enterococcus</i>	13
Tabla 3-2. Datos de reducción de contaminación microbiológica en las plantas piloto para los diferentes TRH	17
Tabla 3-3. Datos promedio de parámetros físico químicos de las plantas piloto para los diferentes TRH	17
Tabla 3-4. Resultados promedio de concentración en base logarítmica de <i>E.coli</i> en muestras de fango digerido obtenidos mediante diferentes metodologías y medios de cultivo	18
Tabla 4-1. Nomenclatura, tipo de muestra y rango de concentración esperado de los ensayos realizados	21
Tabla 4-2. Resultados valores promedio base logarítmica de concentración de <i>E.faecalis</i> de cada ensayo	21
Tabla 4-3. Resultados de concentración de <i>E.faecalis</i> en muestras fortificadas de fango y de agua con la misma suspensión bacteriana	24

ÍNDICE DE TABLAS ANEXOS

Tabla A1-1. Evolución de la producción de fangos de depuración por CCAA. Fuente: PEMAR.....	c
Tabla A1-2. Ejemplos de reducción base log10 del número de patógenos hipotéticos durante una serie de situaciones de digestión mesofílica. Fuente: (Carrington, 2001)	e
Tabla A3-1 Ingredientes del medio SB(APHA, et al., 2009)	y
Tabla A3-2. Ingredientes del medio BEA (APHA, et al., 2009).....	z
Tabla A3-3 Ingredientes del medio Azide dextrose broth(APHA et al., 2009).....	aa
Tabla A3-4 Ingredientes del medio agar CCA(ISO 9308-1:2014).....	bb
Tabla A3-5 Ingredientes del medio agar TBX(ISO 16649-1:2013).....	cc
Tabla A3-6 Ingredientes del medio agar MacConkey(CM 0109).....	dd
Tabla A3-7. Metodologías de análisis de <i>E.coli</i>	ff
Tabla A4-1. Datos valores físico químicos de la muestra de fangos para los ensayos con cepafortificada.....	gg
Tabla A4-2. Resultados del Ensayo 1 para los diversos métodos utilizados	hh
Tabla A2-3. Resultados del Ensayo 2 para los diversos métodos utilizados	ii
Tabla A2-4. Resultados del Ensayo 3 para los diversos métodos utilizados	jj
Tabla A2-5 Resultado del Ensayo 4 para los diversos métodos utilizados	kk
Tabla A2-6. Resultados del Ensayo 5 para los diversos métodos utilizados	ll
Tabla A2-7 Resultados de la muestra real 2 para los diversos métodos utilizados	mm
Tabla A4-8. Resultados ANOVA cualitativo diferentes metodologías Ensayo 1	oo
Tabla A4-9 Resultados ANOVA cualitativo diferentes metodologías Ensayo 2	pp
Tabla A4-10 Resultados ANOVA cualitativo diferentes metodologías Ensayo 3	qq
TablaA4-11. Resultados ANOVA cualitativo diferentes metodologías Ensayo 4	rr
TablaA4-12. Resultados ANOVA cualitativo diferentes metodologías Ensayo 5	tt
Tabla A4-13 Resultados ANOVA cualitativo diferentes metodologías muestra real 2	ss

Tabla A4 -14. Resultados ANOVA cualitativo comparación medios de cultivo para Filtración.....	bbb
Tabla A4-15 Resultados ANOVA cualitativo comparación medios de cultivo para Siembra en masa.....	ccc
Tabla A4-16 Resultados ANOVA cualitativo comparación medios de cultivo para Siembra en superficie.....	eee
Tabla A4-17 Resultados ANOVA cualitativo comparación métodos analíticos.....	fff
Tabla A4-18 Resultados ANOVA cuantitativo TRH para tratamiento mesófilo.....	iii
Tabla A4-19 Resultados ANOVA cuantitativo TRH para tratamiento termófilo.....	kkk
Tabla A4-20 Resultados ANOVA cuantitativo TRH para tratamiento ATAD.....	lll
Tabla A4-22 Resultados ANOVA cualitativo tratamientos para <i>E.coli</i>	nnn
Figura A4-51 Comparación entre medias comparación tratamientos para <i>E.coli</i>	ooo
Tabla A4-24 Resultados ANOVA cuantitativo TRH para tratamiento mesófilo <i>E.coli</i>	qqq
Tabla A4-25 Resultados ANOVA cuantitativo TRH para tratamiento termófilo <i>E.coli</i>	sss
Tabla A4-26 Resultados ANOVA cuantitativo TRH para tratamiento ATAD <i>E.coli</i>	sss
Tabla A4-27 Resultados ANOVA cualitativo o tratamientos Coliformes totales.....	uuu
Tabla A4-28 Resultados ANOVA cualitativo o tratamientos <i>S.aureus</i>	vvv
Tabla A4-29 Resultados ANOVA cualitativo o tratamientos Amonio.....	xxx

1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 TRATAMIENTO BIOLÓGICO Y VALORIZACIÓN DE FANGOS DE DEPURADORA

1.1.1 Generación de fangos de EDAR

El agua es esencial para la vida, es por ello de suma importancia, realizar una gestión adecuada de la misma. La gran mayoría del volumen de agua disponible en la tierra es agua salada siendo el porcentaje de agua dulce aproximadamente de un 2.5% (Gleick, 1996), por lo que existe un conflicto creciente en relación a la accesibilidad de este bien indispensable.

El objetivo principal de un tratamiento de aguas residuales es producir un efluente que no dañe y que beneficie, en lo posible, el curso del agua donde va a ser vertido y los ecosistemas circundantes a él. La población humana es parte de este ecosistema y, por lo tanto, el principal objetivo de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) es reducir, o eliminar en la medida de lo posible, tal y como marca la legislación vigente (Directiva 91/271/CEE) los sólidos totales y la carga orgánica presentes en el agua que supongan un riesgo para la salud humana (Huete, 2007).

Como subproducto derivado de la depuración de las aguas residuales se produce fango. El fango se genera en distintos procesos que configuran una EDAR, en concreto se distingue el fango primario y el secundario. Información ampliada respecto a estos tratamientos se encuentra disponible en el ANEXO 1. Deshacerse del subproducto que suponen los fangos es difícil y caro, requiriendo, a menudo, más de un 50% del presupuesto total de la EDAR (Elías, 2009).

El fango procedente de la depuración de aguas residuales es una suspensión de sólidos inorgánicos y orgánicos, en una concentración generalmente entre un 1 y un 5%, mezclados en un líquido que presenta además una gran variedad de sólidos disueltos, entre los que se encuentran compuestos orgánicos, micronutrientes y patógenos, pudiendo estar presentes en algunos casos compuestos peligrosos como los metales pesados. La cantidad de estos contaminantes en los fangos de depuración depende, en la mayoría de los casos, del tipo de vertido y de su componente industrial, así como del tratamiento realizado en la estación depuradora. Los procesos industriales en los que se emplean materias primas que contienen un alto contenido en metales pesados son una importante fuente de los mismos en los fangos de depuradoras. Los metales pesados principalmente detectados en fangos son: Cu, Ni, Zn, Cr, Hg, Pb y Cd (European Comision, 2001). También cabe destacar, que los fangos provenientes de las estaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas contienen una gran variedad de patógenos. Debido a su capacidad infectiva, su control supone un importante reto médico y de salud pública. Su destrucción o supervivencia está muy controlada en sistemas simples pero en matrices biológicas complejas como habitualmente son los fangos de depuradora, es más difícil predecir (Sobrados et al., 2010).

Los fangos de depuradora son un residuo de suma importancia, debido a las grandes cantidades en las que se produce. En la Tabla 1.1 se muestra la cantidad de fangos de depuración generados a nivel nacional, conforme a la información más reciente disponible en el Registro Nacional de Fangos (2012). En el ANEXO 1 se encuentran disponibles más datos sobre la producción de este residuo.

Con el objetivo de intentar solventar esta problemática, se buscan diferentes vías de valorización de este residuo para evitar de esta manera y en la medida de la posible que su destino final sea un vertedero.

Tabla 1-1 Evolución de la producción de fangos de depuración en España (2008-2012) Fuente: (Registro Nacional de Fangos)

PRODUCCIÓN DE FANGOS DE DEPURACIÓN (t m.s. ¹ /año)					
	2008	2009	2010	2011	2012
TOTALES ESPAÑA	1.156.175	1.205.124	1.086.720	1.058.999	1.082.669

1.1.2 Legislación y normativa vigente relativa al tratamiento y valorización de fangos

La Comisión Europea ha presentado propuestas legislativas revisadas sobre residuos, así como un completo plan de acción con una visión a largo plazo, claro y ambicioso, respecto al aumento del reciclado y la reducción de los vertidos. Se tiene por objeto el sustituir una economía lineal basada en producir, consumir y tirar, por una economía circular en la que se reincorporen al proceso productivo una y otra vez los materiales que contienen los residuos para la producción de nuevos productos o materias primas. De esta manera, el reciclaje o la valorización material de los residuos tienen un papel primordial (EU, 2012).

Por su parte, la Directiva 2008/98/CE, de 19 de noviembre, del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre residuos y por la que se derogan determinadas Directivas (Directiva Marco de Residuos), señala que los Estados miembros tienen la obligación de elaborar planes de gestión de residuos que deberán ajustarse a los principios generales de la política de residuos, para alcanzar el objetivo principal de integrar el desarrollo económico con la protección del medio ambiente. Dentro de estos principios destacan el principio de prevención, el de jerarquía, el de proximidad y suficiencia y el de responsabilidad del productor. Además, con el fin de romper el vínculo existente entre el crecimiento económico y los impactos ambientales asociados a la generación de residuos, la Directiva contempla también la obligación de elaborar programas de prevención que incluyan objetivos y medidas específicas de prevención en la generación de residuos. Estas medidas de prevención deberán ser claramente identificables y tener como finalidad la consecución de los objetivos propuestos así como el desarrollo y la mejora de actuaciones en materia de prevención (Minimi et al., 2015).

La Directiva 2008/98/CE se ha traspuesto al ordenamiento español mediante la Ley 22/2011 de 28 de julio, de Residuos y Suelos contaminados. Esta Ley establece que los planes deben presentar un análisis actualizado en cuanto a la gestión de los residuos, estableciendo objetivos de prevención, preparación para la reutilización, reciclado,

¹ Toneladas de materia seca

valorización y eliminación y la estimación de la contribución a la consecución de los objetivos globales previstos en materia de residuos. Se definen 13 flujos de residuos, siendo uno de ellos los fangos de depuradora.

En España se elabora el Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (PEMAR) 2016-2022, que incluye los contenidos indicados en la Ley 22/2011 para los planes de gestión y para los programas de prevención. En concreto, el PEMAR estima que si se considera una humedad media aproximada de un 80%, se generan alrededor de 5.000.000 t/año de fangos (Agricultura y Medio Ambiente, 2016). En cuanto a los tratamientos y destinos finales, según los datos del Registro Nacional de Lodos, aproximadamente el 80% de los lodos generados en 2012 tuvo como destino final su utilización agrícola y el 6% se destinaron a otros destinos como la fabricación de fertilizantes, el 7% fueron incinerados/coincinerados y el restante 7% fueron eliminados en vertedero.

Si el tratamiento final de los lodos de depuración es la aplicación en los suelos agrícolas, el gestor que realice la aplicación debe, además de cumplir lo establecido en la Ley de Residuos y Suelos contaminados, cumplir lo establecido en el Real Decreto 1310/1990, por el que se regula la utilización de lodos de depuración en el sector agrario y que traspone la Directiva del consejo de 12 de junio de 1986 relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura (European Commission, 1991).

Si los fangos de depuradora se aplican a zonas vulnerables, se debe cumplir de manera complementaria la Directiva 91/676/CEE, traspuesta a través del Real Decreto 261/1996, de 16 febrero, sobre protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos procedentes de fuentes agrarias, estableciendo limitaciones en las cantidades de nitrógeno orgánico anuales.

En el Real Decreto 1310/1990 se contempla la problemática de almacenamiento y eliminación que supone la elevada producción de lodos procedentes de aguas residuales domésticas o urbanas. Por otra parte, destaca la fuente de materia orgánica y nutrientes que supone para su posible uso en la actividad agraria permitiendo así la incorporación a los ciclos naturales de la materia y la energía. Existen pruebas científicas de que la aplicación de fangos de depuradora en la agricultura proporciona una serie de beneficios agronómicos, en particular, relacionado con el reciclado de nutrientes vegetales como el nitrógeno y el fósforo, por lo que los fangos son un sustituto eficaz en ocasiones de los fertilizantes químicos (Ottoson et al., 2008; Carballa et al, 2009; Sidhu and Toze, 2009; Scaglia et al., 2014; Joo et al., 2015; Levantesi et al., 2015). Sin embargo, el principal carácter perjudicial que pueden tener los lodos según el Real Decreto surgen cuando determinadas especies químicas inorgánicas como los denominados metales pesados, alcanzan concentraciones superiores a un cierto umbral y son aplicados de manera sistemática o discontinua, en determinados tipos de suelos, a dosis muy altas o en momentos determinados del ciclo vegetativo de las plantas que van a ser aprovechadas directamente por los animales domésticos o por el hombre (Agricultura y Medio Ambiente, 2016). Por ello, establece limitaciones en el contenido de metales pesados para la utilización de fangos en el sector agrario como pueden ser Cd, Cu, Ni, Hg o Cr. Por el contrario, no establece límites ni restricciones de parámetros microbiológicos. Sin embargo, en otros países como en los Estados Unidos de América, el nivel máximo recomendado de coliformes fecales presentes

en los fangos digeridos anaeróbicamente puede llegar hasta 2×10^6 NMP (Número Más Probable) por gramo de materia seca, o en Dinamarca, donde los requisitos relativos a los agentes patógenos establecen que no deben tener presencia de *Salmonella*, y que los estreptococos fecales deben ser inferiores a 100 unidades formadas por colonias por gramo de materia seca (European Commission, 2001).

En la actualidad en España, los formularios que deben rellenar las instalaciones que tratan los lodos y los gestores que vayan a realizar la aplicación agrícola, tal y como establece el Registro Nacional de lodos, son los establecidos en los Anexos de la Orden AAA/1072/2003 sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario (Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente, 2013). Se deben controlar parámetros agronómicos, metales y microorganismos tales como la *Samonella* o la *Escherichia coli*. Por tanto, la utilización de fangos de depuradoras de aguas residuales como fertilizantes de suelos agrícolas, es un procedimiento polémico por la posible contaminación de suelos y aguas debido a la difusión de patógenos (Zaleski et al., 2005; Guzmán et al., 2007; Sidhu and Toze, 2009; Lloret et al., 2012; Mininni et al., 2014; Pascual-Benito et al., 2014; Levantesi et al., 2015)

1.1.3 Procesos convencionales y avanzados de tratamiento biológico de fangos de EDAR

Hay dos objetivos a cumplir al tratar fangos de depuradora; la reducción de la putrefacción, denominada estabilización, y la reducción de los niveles de patógenos, denominada higienización. Ambos aspectos pueden lograrse mediante numerosos procesos en una o varias etapas (Joo et al., 2015).

La Comisión Europea considera dos posibles niveles de tratamiento; avanzado y convencional. Se considera que un tratamiento es avanzado cuando reduce el contenido de patógenos a niveles insignificantes. Se entiende por "niveles insignificantes" cuando existe un riesgo mínimo para la vida humana, animal y vegetal en el contexto tanto de agricultura como de los recursos de los ecosistemas. La Comisión Europea establece una relación de los considerados como tratamientos convencionales y avanzados, los cuales se encuentran disponibles en el ANEXO 1 (European Commission, 2000).

La digestión anaerobia² mesófila (MAD), que se trata de un tratamiento convencional, ha sido la elección mayoritaria para el tratamiento de los fangos de depuradora desde el siglo pasado, debido a sus menores requerimientos energéticos y a su mayor robustez y facilidad de operación comparada con la termófila. Sin embargo, la capacidad de la digestión anaerobia termófila (TAD) para higienizar el fango junto con su mayor capacidad de carga orgánica ha conseguido dar un papel protagonista a este proceso en los últimos años, ya sea como tratamiento único o como parte integrante de un tratamiento más complejo (Ahring, 1994).

Cuando la digestión anaerobia funciona a temperaturas termófilas (entre 45 y 55°C) el proceso se considera un tratamiento avanzado, siendo más eficiente en la reducción de los indicadores bacterianos, logrando más de 3 unidades logarítmicas de reducción de la concentración microbiana. Un tratamiento TAD ofrece otras ventajas tales como un

² En ausencia de oxígeno

aumento de la reducción de materia orgánica, una mayor solubilización de la materia orgánica en las partículas, un aumento en la tasa de producción de metano y el nivel de sequedad de los fangos y la reducción del tiempo de retención requerido para el tratamiento de fangos. Por el contrario, los fangos tratados obtenidos presentan una calidad más baja y una menor estabilidad del sobrenadante y un mayor olor (Chen, Cheng y Creamer, 2008, Astals et al., Levantesi et al., 2015). Otro inconveniente observado por algunos autores en relación a los procesos anaeróbicos es que son complejos y difíciles de manejar y controlar (Tomei y Carozza, 2015), aunque otros estudios concluyen argumentos totalmente contrarios (Huete, 2007; Sobrados et al., 2010).

Por otro lado, la Digestión Aeróbica Autotérmica sostenida (ATAD) también se considera una tecnología avanzada de tratamiento de fangos y entre sus beneficios relacionados se encuentran el efecto de la pasteurización asociado a la elevada temperatura utilizada, la alta tasa de estabilización, la conservación de nitrógeno y la posibilidad de recuperación de calor; de ahí el término sostenida (Piterina, Bartlett y Pembroke, 2010, Lloret et al., 2012).

1.1.4 Parámetros de control físico químicos y microbiológicos en la higienización de fangos

Son numerosos los parámetros de control que hay que tener en cuenta en los procesos biológicos de higienización de los fangos. Entre ellos se puede destacar como parámetros físico químicos la temperatura, el tiempo de retención, el pH y la concentración de amoníaco, y por otro lado, los parámetros microbiológicos. A su vez, la concentración de microorganismos es función de diferentes factores, que incluyen la temperatura local, las condiciones ambientales y las características de sus especies o géneros. La inactivación de la población de microorganismos específicos es gradual y siguen diferentes cinéticas, como por ejemplo la ley exponencial de la desinfección denominada Ley de Chick³ (Carrington, 2001).

Los patógenos son inactivados durante la exposición al calor, que para ser eficaz y relativamente rápida, debe estar por encima de la temperatura óptima de crecimiento de los mismos. El período durante el que deben estar expuestas depende tanto de la temperatura como de las especies del organismo. Feacham et al. (1983) determinaron la curva de mortalidad térmica de una serie de patógenos entéricos. Strauch (1991) indicó una "zona de seguridad" donde, si los parámetros operativos estuvieran por encima de los requisitos mínimos, los fangos resultantes estarían virtualmente libres de patógenos (ver Figura 1.1).

Otro parámetro a tener en cuenta en la higienización de los fangos es el tiempo de retención en el digestor. El tiempo de residencia necesario para la inactivación de los microorganismos depende a su vez de la temperatura. Ciertos estudios determinan que para la inactivación de ciertas bacterias se necesita un tiempo de residencia mínimo que varía en función de la temperatura (Strauch, 1998; Carrington et al., 1998).

Otros parámetros a tener en cuenta son el pH y la concentración de amonio en el caso de tratamientos anaerobios. El nitrógeno amoniacal es originado durante la metabolización de

³ La ley de Chick se define como: $\frac{X_t}{X_0} = e^{-k(t-t_0)}$

los compuestos nitrogenados. Debido a que las cinéticas catalíticas de los microorganismos termófilos son más rápidas que las de los microorganismos mesófilos, en los digestores termófilos se dan una mayor metabolización del material nitrogenado y, como consecuencia, se produce más nitrógeno amoniacal (Reusser and Zelinka, 2004; Song *et al.*, 2004; Gavala *et al.*, 2003). La temperatura y el pH afectan al equilibrio entre la forma tóxica y no tóxica del amoníaco (Scaglia *et al.*, 2014).

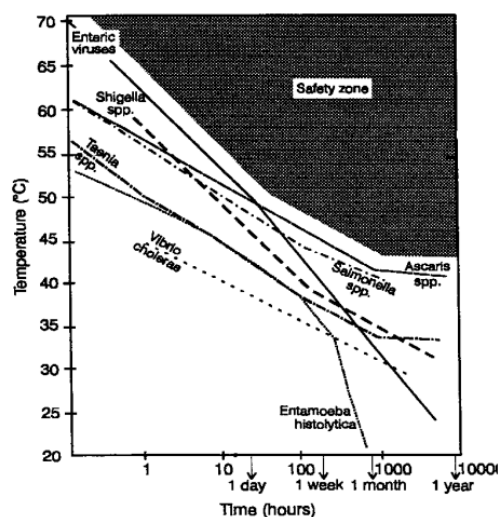


Figura 1-1. Requerimientos de tiempo y temperatura para la producción de fango virtualmente libre de patógenos Fuente: (Strauch, 1991)

En cuanto al pH, éste suele ser superior en el fango de digestores termófilos anaerobios respecto a los mesófilos. El mayor pH alcanzando en los digestores termófilos es consecuencia de la mayor constante de Henry para el dióxido de carbono. El mayor pH en estos digestores junto con la mayor temperatura alcanzada favorece el desplazamiento del equilibrio amonio/amoniaco hacia la formación de amoníaco libre (Kim *et al.*, 2002).

1.2 CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA PRESENTE EN FANGOS DE EDAR

1.2.1 Contaminación microbiológica como problema en la valorización de fangos de EDAR

La valorización de biosólidos y fangos en la agricultura está aumentando, debido al esfuerzo mundial existente en reutilizar fangos con el objetivo de reducir la contaminación ambiental, así como fomentar la economía circular. Sin embargo, la aplicación de biosólidos bajo ciertas condiciones podría potencialmente conducir a la contaminación de las aguas superficiales, subterráneas, suelo y cadena alimentaria. Los procesos convencionales de tratamiento de aguas residuales no están diseñados para reducir el número de microorganismos patógenos en el agua y al mismo tiempo tienden a concentrar los microorganismos en los fangos resultantes. Entre otros, la presencia de virus entéricos, protozoos o bacterias patógenas, como *Campylobacter*, *Salmonella* o *Shigella*, y otros como *Escherichia coli* o *Enterococcus faecalis*, son motivo de preocupación a la hora de hablar de la reutilización de dichos fangos (Sidhu y Toze, 2009).

La lista realizada por la US EPA y US DA⁴ (2001) de patógenos de interés en los biosólidos incluye las siguientes bacterias: *E. coli* O157: H7, *Listeria* y *H. pylori*; los virus: coxsackievirus, echovirus, hepatitis A, rotavirus y norovirus y los parásitos *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Toxoplasma*, *Microsporidia* y *Giardia* (Smith et al., 2004). Por lo tanto, la búsqueda de indicadores microbianos en los fangos de aguas residuales es de gran importancia para minimizar la exposición de seres humanos o animales a estos microorganismos patógenos y de la misma manera proteger el medio ambiente. Hasta la fecha, no se ha estudiado en detalle el comportamiento de diferentes patógenos en este tipo de matriz debido a limitaciones de la metodología, además de que diferentes estudios no pueden ser comparados debido a la falta de técnicas estandarizadas (Pascual Benito et al, 2015).

1.2.2 Bacterias indicadoras en fangos y biosólidos

Es imposible cuantificar todos los microorganismos patógenos presentes en biosólidos debido a la dificultad de las técnicas específicas de detección e identificación. Además, la cuantificación se hace costosa y consume mucho tiempo ya que la mayoría de los patógenos aparecen en baja concentración. El principal motivo de usar microorganismos indicadores es que un organismo que está siempre presente en la matriz estudiada podría servir como sustituto para la detección de patógenos en los biosólidos. Históricamente, las bacterias indicadoras de contaminación, tales como coliformes totales y *Enterococcus faecalis* se han utilizado como indicativo de la presencia de un patógeno en el agua.

La inactivación de los patógenos durante el tratamiento de las aguas residuales no sólo depende del tipo de proceso utilizado sino también de la naturaleza del patógeno, debido a sus diferentes potenciales de inactivación. En consecuencia, la ausencia de un indicador no garantiza la ausencia de un patógeno en toda la matriz estudiada.

Una de las clasificaciones principales de naturaleza entre las bacterias es entre Gram positivas y negativas. Las bacterias Gram negativas son aquellas que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue (Pascual Benito et al, 2015). Esta característica está íntimamente ligada a la estructura didérmica dada por la envoltura celular, pues presenta doble membrana celular (una externa y la otra citoplasmática), lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Los coliformes totales pertenecen a este grupo, dentro del cual se encuentra la *E.coli*. Por otro lado, los *Enterococcus* sp. son bacterias Gram positivas (Sidhu y Toze, 2009).

Existe una escasez de información sobre la evolución de patógenos en los biosólidos debido a las dificultades con los métodos de detección, especialmente para los patógenos vírico y protozoario. Se han llevado a cabo diversos estudios para cuantificar el número de patógenos y organismos indicadores en los biosólidos. Pero sin embargo, debido a la falta de métodos estandarizados y porque muy pocos autores han mencionado los límites de detección de los métodos utilizados, pocos resultados de estos estudios son comparables (Mininni et al., 2014).

⁴ US EPA(Agencia medioambiental de Estados Unidos) US DA (Base de datos de nutrientes de Estados Unidos)

Los indicadores bacterianos sufren de una serie de limitaciones, incluyendo tiempos de supervivencia cortos, orígenes distintos de la fuente fecal y recrecimiento. Las características de supervivencia de los patógenos bacterianos, virales y parasitarios varían en el medio ambiente, lo que indica que ningún microorganismo puede predecir la presencia de todos los patógenos. El seguimiento de una serie de indicadores predice la presencia de ciertos patógenos en los biosólidos (Joo et al., 2015).

Los fangos deben cumplir los criterios de higienización no solo inmediatamente después de ser sometidos a procesos de digestión cuando se miden en una planta de tratamiento de aguas residuales, sino que también durante su almacenamiento y transporte hasta su destino final. Respecto a esto, la idoneidad de ciertos microorganismos indicadores de contaminación fecal, como la *E.coli*, es controvertida, ya que se ha demostrado que crecen después del proceso de digestión anaerobia y durante el almacenamiento de fangos bajo ciertas condiciones (Monteleone et al., 2004; 2007, Higgins et al., 2007). Algunos investigadores han explicado que este recrecimiento se produce durante el almacenamiento durante largos períodos de tiempo en muestras procedentes de procesos de digestión termófila y mesofílica que utilizan la deshidratación centrífuga (Chen et al., 2011).

Los *Enterococcus* sp. tienen una serie de ventajas como indicador bacteriano sobre las bacterias coliformes, tales como la resistencia a condiciones ambientales adversas y rara vez se multiplican en el ambiente, entre otras (Wheeler et al., 2002). Además, tienen un patrón de inactivación similar a *E. coli* (Pourcher et al., 2005), por lo que pueden predecir un comportamiento en este microorganismo. A pesar de ser aproximadamente un orden de magnitud menos numeroso que los coliformes fecales y *E. coli* en las heces humanas, su concentración es lo suficientemente alta para ser fácilmente detectado en aguas residuales, fangos y compost. Sin embargo, existe información contradictoria sobre su utilidad en el monitoreo de la eficiencia de los procesos. En general, se ha informado de que los *Enterococcus* sp sobreviven más tiempo que los coliformes (Pereira-Neto et al., 1986, Gantzer et al., 2001). Dentro del grupo de *Enterococcus* sp, *E. faecalis*, es un indicador conservador, ya que tiene un rango limitado de huéspedes que incluye a humanos, perros y pollos y ha sido sugerido como un indicador útil para el rastreo de fuentes de contaminación fecal (Wheeler et al., 2002). En la actualidad, todavía hay poca información sobre el comportamiento y el valor potencial de *E. faecalis* como indicador o modelo de microorganismo en fangos.

1.2.3 Metodología de análisis microbiológico en muestras de fangos

Es necesario ser capaces de detectar y cuantificar diferentes patógenos en biosólidos con un grado de confianza conocido. El método de detección ideal debe ser sensible, rápido, muy preciso y fácil de realizar.

La detección de patógenos en los fangos y biosólidos es compleja, costosa e incurre en demoras prolongadas debido a la naturaleza de la prueba analítica. Esto limita la capacidad de las empresas de tratamiento de biosólidos para determinar con precisión la concentración de los patógenos, así como sus niveles en los productos finales (Guzman et al., 2007).

Los métodos estandarizados para la detección y enumeración de indicadores microbianos y patógenos son limitados. Además, el debate y el establecimiento de una nueva directiva sobre fangos no ha avanzado en la Unión Europea (Mininni et al., 2014).

La US EPA recomienda la utilización del método estandarizado del Número Más Probable como metodología analítica para la determinación de microorganismos en fangos. Sin embargo, los criterios de calidad establecidos para países europeos vienen expresados en Unidades de Formación de Colonias (UFC), resultado que se obtiene por métodos de placas de cultivo (ver Tabla 1-2) Existe una problemática asociada a ello debido a la diferencia de expresión de los resultados en función de la metodología aplicada, ya que los resultados no pueden ser comparados entre sí. Asimismo, en el caso de la expresión en UFC, es necesario determinar si se trabaja en base húmeda por mL de muestra, o en base seca por gramo de muestra. En el caso de una matriz como son los fangos de depuradora, donde se tiene una composición variable en sólidos totales, esto puede llevar a cabo una interpretación errónea de los resultados.

En la Tabla 1-2 se pueden ver resumidas las pautas que existen actualmente a la hora de establecer los criterios de higienización de fangos, y las diferencias que existen entre cada referencia. Se observa que se utilizan diferentes indicadores microbiológicos en cada caso, y tal y como se ha mencionado en el apartado 1.2.2 el comportamiento entre microorganismos y por lo tanto su concentración puede variar. El control microbiológico en fangos es un tema relativamente nuevo a diferencia de lo que ocurre en el caso de alimentos o de aguas, además de que no hay legislación al respecto. Es por ello que no existe una metodología concreta desarrollada y se solventa aplicando métodos usados en otras matrices para poder analizar los fangos.

Tabla 1-2. : Criterios de calidad relacionados con la higienización de fangos de EDARs para su uso agrícola

REFERENCIAS	TRATAMIENTO RECOMENDADO	NORMA DE CALIDAD		
		INDICADOR MICROBIOLÓGICO	VALOR	UNIDADES
USA EPA, 2003	Biosólido Clase A ⁵ : ≥50°C / ≥30min sin carga/descarga	coliformes fecales	<1E+03	NMP/g base seca
	Biosólido clase B: 35-55°C/15 días	coliformes fecales	<2E+06 o reducción de 2unidades-log	NMP/g base seca
Decisión 98/488/CEE	-	<i>E.coli</i>	1E+03	NMP/g
Environment DG, EU, 2000	Tratamiento avanzado: Digestión anaerobia o aerobia termófila ≥55°C / ≥20h sin descargar	<i>E.coli</i>	Reducción 6 unidades-log hasta <5E+02	UFC/g base húmeda
	Tratamiento convencional: Digestión anaerobia mesófila 35°C/15 días	<i>E.coli</i>	Reducción 2unidades-log	-
EU working document 2003	Tratamiento avanzado (condiciones no especificadas)	<i>E.coli</i>	<1E+03 o reducción 4unidades-log	UFC/g base seca
EU working document 2010	-	<i>E.coli</i>	<5E+05	UFC/g base húmeda

⁵ Para obtener un fango de Clase A se debe someter a un proceso con el que se consigue una alta reducción de patógenos, entre los que se encuentran los procesos de compostaje, digestión aerobia y anaerobia termófila o secado térmico. Por tanto, un fango de Clase A presenta mejores condiciones de higienización que un fango Clase B.

2 OBJETIVOS

El presente Trabajo Fin de Máster tiene como objetivo general el estudio y la evaluación de las herramientas que se utilizan actualmente para determinar el grado de higienización de los fangos procedentes del tratamiento de aguas residuales urbanas. En concreto, se emplea *Enterococcus faecalis* como indicador de contaminación microbiológica.

Para conseguir este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la metodología analítica más adecuada para la determinación y cuantificación de *Enterococcus faecalis* en fangos de depuradora.
- Determinar el grado de higienización generado en fangos de depuradora sometidos a tratamiento biológico de digestión aerobia y anaerobia, (en condiciones mesofílicas y termofílicas), en función de los diferentes criterios de calidad propuestos por la US EPA y la Unión Europea.
- Estudiar la influencia de los parámetros de control operacional de tratamiento biológico en la reducción de la contaminación microbiológica.
- Comparación de la respuesta de los indicadores bacterianos *Enterococcus faecalis* y *E.coli* ante diferentes tratamientos biológicos aplicados a fangos de depuradora.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Para la realización de ese trabajo se siguen cuatro métodos analíticos normalizados para el análisis de *E.faecalis*, que se utilizan habitualmente en el análisis de aguas y alimentos. La referencia de los mismos se incluye en la Tabla 3-1. Los resultados se expresan como Unidades Formadas de Colonias (UFC) por gramo de muestra si es en base seca o por mL de muestra si es en base húmeda.

Tabla 3-1. Metodologías de análisis utilizadas para determinar *Enterococcus*

Normativa	Título	Muestras	Medios de cultivo	Condiciones de operación	Expresión de resultados
UNE-EN ISO 7899-2:2001	Detección y recuento de enterococos intestinales. Parte 2: Método de filtración por membrana	Aguas potables y alimentos	Slanetz y Bartley (Scharlau) (SB). Bile esculin azide agar (BEA)	37°C, 48h 44°C, 2h para etapa confirmación	UFC/g UFC/mL
SM⁶9215 B	Heterotrophic plate count. Part B- Método siembra en masa	Aguas y alimentos	Slanetz y Bartley (Scharlau) (SB). Bile esculin azide agar (BEA)	37°C, 48h 44°C, 2h para etapa confirmación	UFC/g UFC/mL
SM9215 C	Heterotrophic plate count. Part C- Método siembra en superficie	Aguas y alimentos	Slanetz y Bartley (Scharlau) (SB). Bile esculin azide agar (BEA)	37°C, 48h 44°C, 2h para etapa confirmación	UFC/g UFC/mL
SM9230 B	Número más probable <i>Enterococcus</i>	Aguas residuales y alimentos	Azide dextrose broth. Bile esculin azide agar (BEA)	37°C, 48h 44°C, 2h para etapa confirmación	Nº más probable (NMP/mL, NMP/g)

Se amplía la información con respecto a los métodos analíticos que se muestran en la Tabla 3-1.

⁶ Método estandarizado (Standard Method)

Método de filtración en membrana

El método de filtración en membrana es el referenciado en las normas UNE-EN ISO 7899-2:2001 para el análisis de muestras de aguas y alimentos. En la Figura 3-1 se puede observar un esquema del contenido teórico del método y del procedimiento seguido.

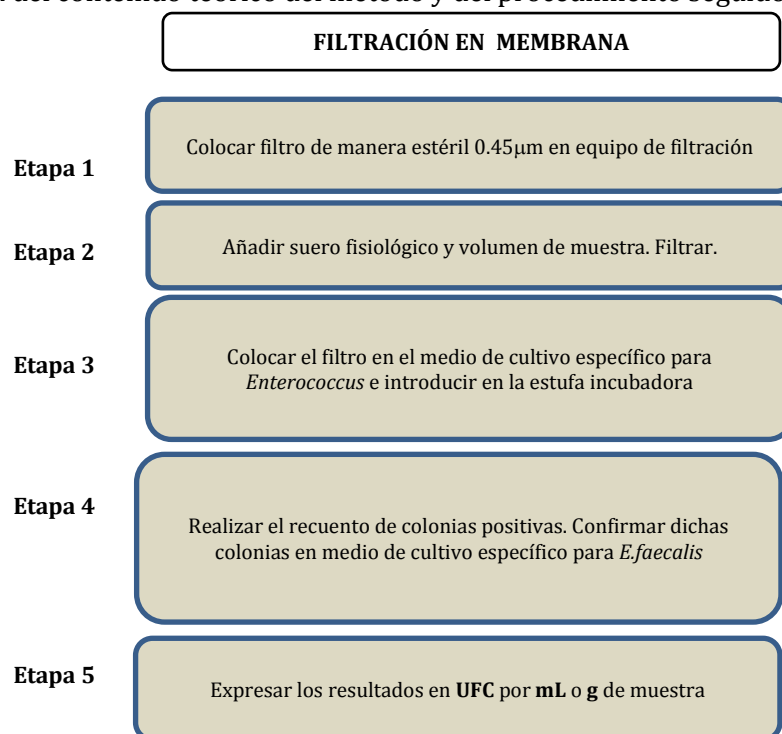


Figura 3-1. Procedimiento para el análisis de muestras mediante la técnica de filtración en membrana

Método de vertido en placa (siembra en masa)

El método de siembra en masa es el establecido en las normas SM 9215B para el análisis de muestras de aguas y alimentos. En la Figura 3-2 se puede observar un esquema del contenido teórico del método y de los pasos que se siguen.

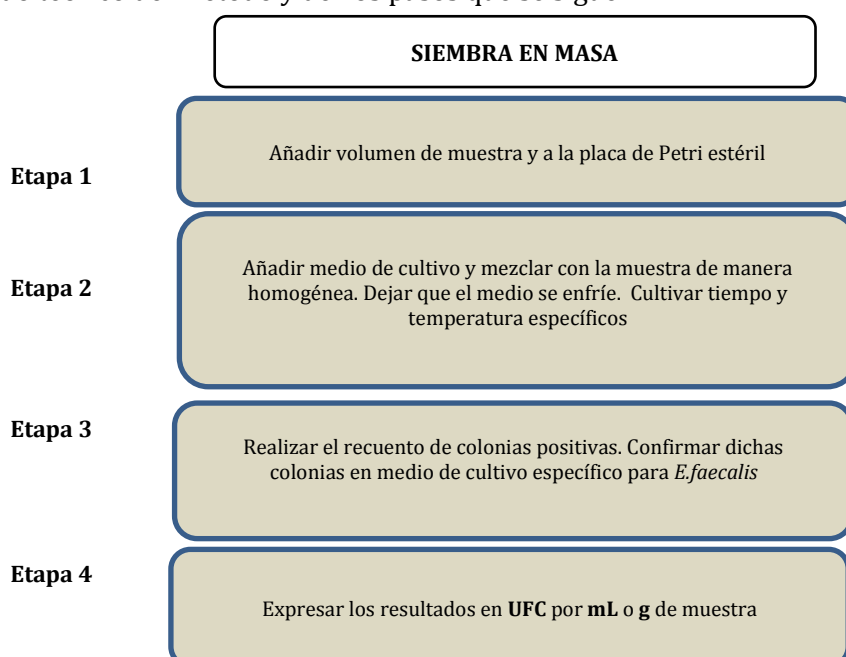


Figura 3-2. Procedimiento para el análisis de muestras mediante la técnica de siembra en masa

Método de placa difusa (siembra en superficie)

El método de siembra en superficie es el establecido en la norma SM 9215C para el análisis de muestras de aguas. En la Figura 3-3 se puede observar un esquema del contenido teórico del método y de los pasos que se siguen.

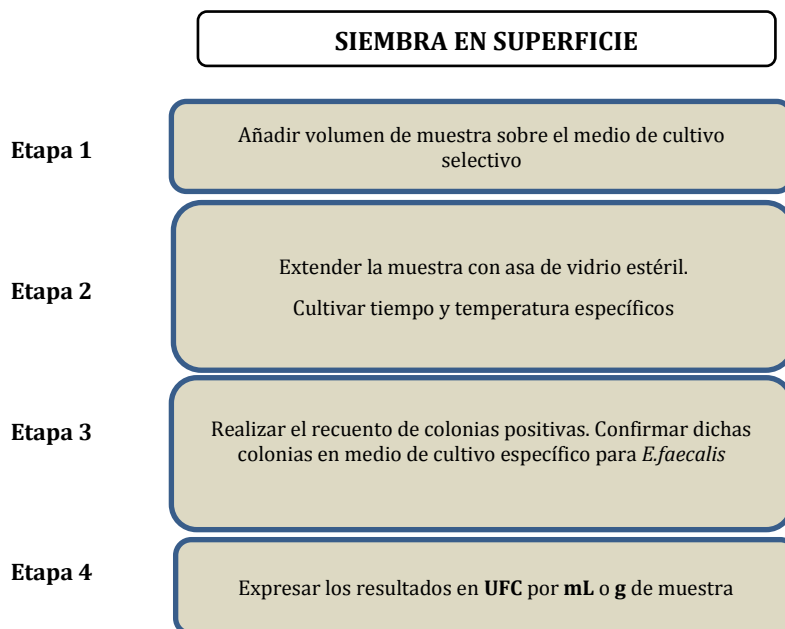


Figura 3-3 Procedimiento para el análisis de muestras mediante la técnica de siembra en superficie

Método del número más probable (NMP)

El método del Número Más Probable es el establecido en la norma SM9230 B para el análisis de muestras de aguas. En la Figura 3-4 se puede observar un esquema del contenido teórico del método y de los pasos que se siguen.

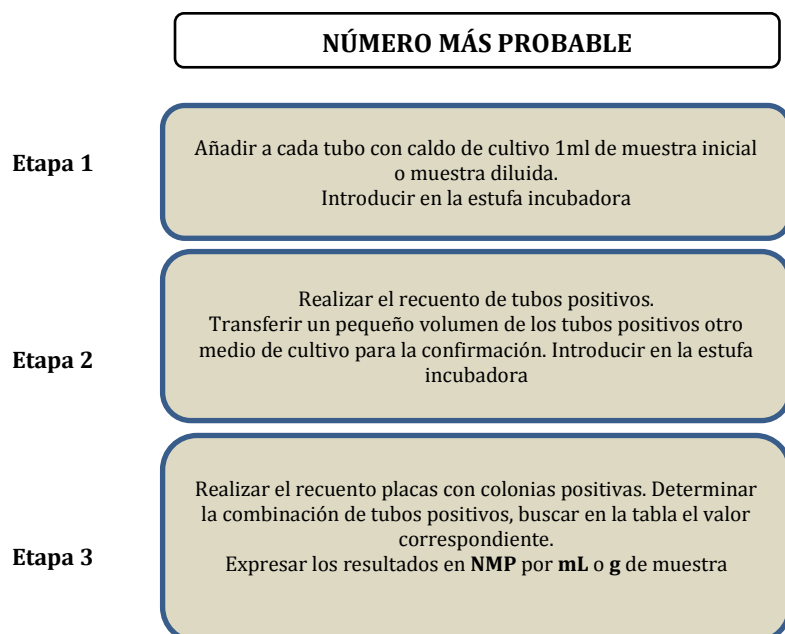


Figura 3-4. Procedimiento para el análisis de muestras mediante la técnica del Número Más Probable

3.2 DATOS COMPLEMENTARIOS OBJETO DE ESTUDIO

Para la realización de este trabajo se utilizan datos de control operativo de 3 plantas piloto de tratamiento biológico de fangos situadas en la EDAR de Tudela (Navarra) y construidas por Navarra de Infraestructuras Locales S.A. (NILSA). Dos de ellas trabajan en régimen anaerobio y otra en régimen aerobio.

Una de las plantas de digestión anaerobias realiza un tratamiento convencional a temperatura mesófila y la otra un tratamiento avanzado a temperatura termófila (ver apartado 1.1.3), ambas con un volumen útil de 2,75 m³, diseñadas para trabajar en mezcla continua (CSTR). En estas condiciones, el tiempo de retención de sólidos es igual al tiempo de retención hidráulico (TRH). El fango de alimentación de las plantas piloto se almacena en un tanque de poliéster dentro del cual hay instalado un sistema de agitación/aireación, tipo jet, que funciona de forma intermitente para minimizar, durante el almacenamiento del fango, degradaciones tanto aerobias como anaerobias.

La tercera planta piloto es de digestión aerobia termófila autosostenida (ATAD). También se trata de un tanque CSTR fabricado en acero inoxidable, cuyo volumen útil para tratar fango es aproximadamente 10 m³. El digester ha sido diseñado para trabajar a altas temperaturas que tienen lugar en el proceso (hasta 60°C). Al tratarse de un tanque completamente agitado, la descarga y la carga de fango se realizan en dos fases diferentes para evitar que parte del fango alimentado salga del digester sin tratar. Para alimentar las plantas piloto se utiliza el fango fresco real generado en la EDAR de Tudela. El fango fresco es una mezcla de fango primario, que procede de los decantadores primarios, y de fango secundario, que en este caso proviene de la decantación intermedia y final de un proceso de filtros percoladores de dos etapas. En las Figuras 3-5 y 3-6 se pueden observar imágenes de dichas plantas.

Durante su operación se han ido variando los valores de tiempo de retención hidráulico (TRH), en la planta mesófila entre 10 y 20 días y en las termofílicas 2 entre 5 y 15 días.



Figura 3-5. Plantas piloto anaerobias



Figura 3-6. Planta piloto ATAD

La información ampliada respecto a las plantas piloto está disponible en el ANEXO 2.

Durante su operación en régimen estacionario se lleva a cabo el control de una serie de parámetros físico químicos indicadores del correcto funcionamiento de dichos procesos. Todos estos datos se encuentran integrados dentro del Proyecto CTM2013-41397-R financiado por MINECO-FEDER, obtenidos por parte del grupo de investigación Calidad y Tratamiento de Aguas. Los datos que se recopilan para este trabajo en concreto son: Demanda Química de Oxígeno (DQO), sólidos totales y volátiles (ST y SV), nitrógeno amoniacal (N-NH⁴⁺), pH, ácidos grasos volátiles (AGV) y por otro lado datos de reducción de *E.faecalis*, *E.coli*, Coliformes totales y *Staphylococcus aureus*, todos ellos correspondientes al año 2016. En el caso de los datos físico químicos se utilizan valores promedio de cada periodo estacionario, correspondientes a TRH diferentes y en el caso de los datos de reducción microbiológica se utilizan valores promedio en escala logarítmica.

En las Tablas 3-2 y 3-3 se muestran los resultados promedio de estos datos recopilados para las distintas plantas piloto, las cuales se denominan: mesófilo (digestión anaerobia mesófila, MAD), termófilo (digestión anaerobia termófila, TAD) y ATAD

Tabla 3-2. Datos de reducción de contaminación microbiológica en las plantas piloto para los diferentes TRH

Tratamiento	TRH (días ⁻¹)	Reducción <i>E.faecalis</i> (log)	Reducción <i>E.coli</i> (log)	Reducción Coliformes totales (log)	Reducción <i>S.aureus</i> (log)
MAD	10	1,2±0,1	1,2±0,1	2,0±0,1	1,3±0,1
	12	1,5±0,1	1,5±0,2	2,7±0,2	0,0
	15	2,5±0,2	2,5±0,1	2,7±0,2	0,0
	20	2,2±0,1	1,9±0,2	2,2±0,2	0,0
TAD	5	2,1±0,2	2,1±0,1	2,4±0,1	0,1
	7	3,8±0,1	3,8±0,1	3,7±0,1	0,0
	10	2,4±0,1	2,4±0,1	2,8±0,1	0,0
	15	3,0±0,2	3,0±0,1	3,4±0,1	0,7±0,1
ATAD	5	3,3±0,1	3,3±0,2	3,9±0,1	0,0
	10	4,4±0,2	4,4±0,1	4,7±0,3	0,7±0,1
	15	2,5±0,1	1,9±0,1	1,6±0,1	0,1±0,1

Tabla 3-3. Datos promedio de parámetros físico químicos de las plantas piloto para los diferentes TRH

Tratamiento	TRH (días ⁻¹)	DQOf (mg/L)	N-NH ⁴⁺ (mg/L)	pH	ST (mg/L)	SV eliminados (%)	AGV (mg/L)
MAD	10	706±100	526±40	7,2±0,1	21±1	37,2±3	1929±150
	12	774±110	549±20	7,3±0,1	21±1	40,4±3	1931±140
	15	860±100	544±20	7,3±0,1	20±1	41,2±3	1781±140
	20	693±120	536±30	7,4±0,1	20±1	46,9±3	1699±130
TAD	5	3019±450	610±60	7,4±0,2	20±2	40,4±2	2129±150
	7	3044±480	683±40	7,6±0,2	20±2	42,6±2	1975±150
	10	3141±470	649±40	7,6±0,2	19±2	43,1±2	1781±150
	15	2726±440	667±30	7,7±0,2	18±2	48,1±2	1799±140
ATAD	5	4818±530	333±20	8,1±0,5	23±2	16±2	-
	10	3735±500	268±15	8,1±0,3	23±2	16±2	917±60
	15	3459±510	246±15	7,4±0,2	25±2	18±2	584±50

Por otro lado, se recopilan datos correspondientes a concentración de *E.coli* en fangos tratados mediante una digestión anaerobia mesófila. En la Tabla 3-4 se observan los resultados promedio y las varianzas en base logarítmica y base de gramo seco, obtenidos en dos muestras de fangos tras aplicar las diferentes metodologías analíticas detalladas en el apartado 3.1 y en 3 tipos de medio de cultivo diferentes. Las características de los diferentes medios de cultivo se encuentran disponibles en el ANEXO 3.

Tabla 3-4. Resultados promedio de concentración en base logarítmica de E.coli en muestras de fango digerido obtenidos mediante diferentes metodologías y medios de cultivo

		Resultados	
Método	Medio de cultivo	Muestra 1 (log)	Muestra 2 (log)
Filtración en membrana	Maconkey	3,0±0,2	2,6±0,1
	TBX	2,9±0,1	2,3±0,2
	CCA	2,9±0,1	2,6±0,1
Siembra en masa	Maconkey	2,2±0,4	2,5±0,1
	TBX	2,4±0,1	2,6±0,1
	CCA	2,5±0,2	2,4±0,1
Siembra en superficie	Maconkey	2,0±0,7	2,7±0,2
	TBX	2,4±0,1	2,6±0,3
	CCA	2,2±0,2	2,3±0,1

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Para el análisis estadístico de datos se utiliza el programa MiniTab® (v.17). Se aplica un análisis ANOVA de una vía usando el test F-Fisher y LSD (Least Significance difference) de Fisher, que muestra si existen o no diferencias significativas entre los datos estudiados.

En todos los casos se utiliza un nivel de confianza del 95%. El test F-Fisher da como resultado un valor p, de manera que cuando ese valor es mayor que el nivel de significación ($p > 0,05$), la diferencia entre los tratamientos comparados, o la influencia de los parámetros, no se considera significativa. El test LSD estudia la diferencia mínima entre dos medias muestrales para considerar que dos medias poblacionales son distintas. De esta manera, si el intervalo de confianza contiene el 0, se puede afirmar que las medias comparadas no son significativamente diferentes (Montgomery, 2004).

Por último, se realiza un test F-Fisher de comparación de varianzas muestrales, que demuestra las diferencias o no significativas entre las varianzas correspondientes a los diferentes datos estudiados.

4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS DE ANÁLISIS DE *E. FAECALIS* EN FANGOS

Con el objetivo de optimizar la metodología experimental para el análisis de *E. faecalis* en muestras de fango, se siguen los 4 métodos analíticos normalizados que se describen en el apartado 3.1. Concretamente, para este estudio se realizan 9 réplicas para cada método de cultivo en placa y 15 tubos de Azide dextrose broth para el método NMP para cada uno de los ensayos. El modo de preparación de las placas de cultivo se encuentra explicado en el ANEXO 3.

Con el objetivo de poder realizar una comparativa de los métodos analíticos utilizados, se emplean dos tipos de muestras de fangos, muestras estériles fortificadas y muestras reales.

En primer lugar, las muestras estériles fortificadas de fango proceden de un digestor termófilo anaerobio. Antes de fortificar una muestra, se procede a eliminar cualquier microorganismo presente en los fangos utilizando un autoclave a temperatura de 121°C y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. La fortificación de las muestras se realiza a partir de un vial que contiene la cepa congelado a -20 °C. La cepa de *E. faecalis* utilizada proviene del stock del grupo de investigación Calidad y Tratamiento de Aguas. Tras descongelarse, se toma un inóculo con el asa de siembra y se realiza traspasa a una placa con agar nutritivo (ver Figura 4-1) incubándose las placas a 37 °C durante 48 horas en aerobiosis con el fin de disponer de un cultivo bacteriano joven y abundante. El agar nutritivo (AN) es un tipo de agar no selectivo, por lo que en él puede crecer cualquier tipo de bacteria. Las colonias de *E. faecalis* en este agar son de color crema, redondas, con límite definido. Tras el periodo de incubación (37°C durante 48 horas), se prepara una suspensión bacteriana concentrada transfiriendo las colonias a un tubo con 6 mL de suero fisiológico estéril (NaCl 0,9%).

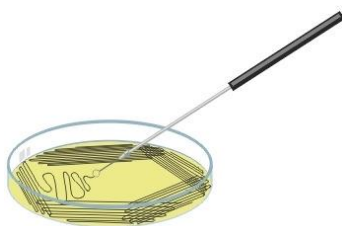


Figura 4-1. Técnica de aislamiento en superficie por agotamiento. Fuente: (Interdisciplinary y Conference, 2012)

De los 6 mL de suspensión concentrada, 1 mL se transfiere a otro tubo con 9 mL de suero, y los otros 5 mL se añaden a 0,5 L de la muestra de fango esterilizado. Se realiza la fortificación de muestras de fangos con 2 rangos de suspensión bacteriana diferentes. El grado de turbidez de la suspensión sirve para conocer la concentración bacteriana presente en las muestras. Para la medida de la turbidez se utiliza el parámetro de densidad óptica (Lanao, 2012). Este se mide mediante la absorbancia de la suspensión a una longitud de onda de 600 nm, estando directamente relacionado este valor con la concentración de bacterias presentes en la solución (Ibarz, 2008). Los rangos de suspensión resultantes son:

entre 1 y 3 placas de AN para rango alto (concentración mayor a 10^4 colonias por mL de muestra) y entre 1 placa y un cuatro de placa para un rango medio-bajo (concentración menor a 10^4 colonias por mL de muestra).

En segundo lugar, se emplean los 4 métodos analíticos detallados en el apartado 3.1, aplicados a muestras de fangos reales con el objetivo de ver el posible efecto de la competencia microbiana presente o las diferencias entre los microorganismos de una muestra real respecto a los presentes en la cepa. Además, se tiene por objetivo el confirmar si los resultados en relación a las diferentes metodologías pueden aplicarse de la misma manera en muestras estériles fortificadas y reales. Las muestras reales de fango son de la salida de una planta de digestión que trata los fangos generados en una EDAR real mediante un proceso termófilo anaerobio, descrito en el apartado 3.2 (muestra real 1) y del fango fresco previo a tratamiento (muestra real 2).

Debido a las características de la matriz, con el objetivo de una manipulación viable para aplicar los métodos analíticos de manera que permita un recuento adecuado de colonias, se realizan diluciones decimales seriadas. Tal y como se observa en la Figura 4-2, se transfiere 1 mL de la muestra inicial a 9 mL de agua destilada al 0,9 % NaCl estéril, obteniéndose así la primera dilución. Este paso se repite para obtener las diluciones seriadas que sean necesarias en cada caso.

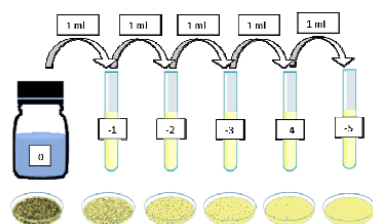


Figura 4-2. Esquema del método de diluciones seriadas Fuente: (Interdisciplinary y Conference, 2012)

Como último paso a todos los métodos descritos, se realiza una etapa de confirmación utilizando placas BEA. Para ello, se selecciona una pequeña parte de cada una de las placas de SB, o el filtro en caso de la filtración en membrana, y se colocan sobre estas nuevas placas. Si al cabo de 2 horas, se colorean las colonias de marrón oscuro, se confirma que son *E.faecalis*.

Se realizan 5 ensayos con muestras estériles fortificadas y un ensayo con cada una de las muestras reales mencionadas. La nomenclatura y el tipo de muestra de los ensayos realizados se observa en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1. Nomenclatura, tipo de muestra y rango de concentración esperado de los ensayos realizados

Nombre del Ensayo	Tipo de muestra	Rango de concentración bacteriana esperada (log)
Ensayo 1	Fango estéril fortificado	5-6
Ensayo 2	Fango estéril fortificado	4,5-5
Ensayo 3	Fango estéril fortificado	4-4,5
Ensayo 4	Fango estéril fortificado	3,5-4
Ensayo 5	Fango estéril fortificado	3-3,5
Muestra real 1	Fango real	2-3,5
Muestra real 2	Fango real	5-6

En la Tabla 4-2 se muestran los resultados promedio de concentración de *E.faecalis* obtenidos en cada uno de los ensayos realizados con cada metodología según la nomenclatura de la Tabla 4-1. Los resultados obtenidos en UFC/g se transforman a base logarítmica. Los resultados al completo están disponible en el ANEXO 4.

Tabla 4-2. Resultados valores promedio base logarítmica de concentración de *E.faecalis* de cada ensayo

Método	Unidades	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Muestra real 1	Muestra real 2
Filtración en membrana	log	5,0±0,2	4,5±0,2	4,7±0,2	4,3±0,1	3,1±0,2	<LD	5,3±0,1
Siembra en masa	log	4,1±0,3	4,8±0,2	4,8±0,1	4,6±0,1	2,9±0,2	<LD	5,3±0,1
Siembra en superficie	log	5,2±0,3	5,1±0,2	5,2±0,1	4,8±0,1	3,3±0,2	<LD	5,3±0,1
Nº más probable	NMP/g	645±167	99±7	51±17	645±167	<L.D ⁷	51±17	645±167

Comparando los resultados obtenidos por cada método se puede observar en general como los resultados obtenidos mediante el método de la siembra en masa son los valores más bajos de concentración en 3 de los 5 ensayos, mientras que los resultados obtenidos mediante el método de siembra en superficie son los valores más altos en todos los casos. Por otro lado, tal y como se menciona en el apartado 1.2.3, los resultados obtenidos con el método del número más probable no se pueden comparar a los obtenidos por los otros 3 métodos, debido a que no existe una correlación entre los mismos.

⁷ Límite de Detección del método

En los Ensayos del 1 al 4 se observa un rango promedio de mayor de 4,5 unidades logarítmicas. Con respecto a la primera muestra real, se observa que solamente con el método del NMP ha sido posible cuantificar la presencia de *E.faecalis* en la muestra. En los análisis realizados por los otros 3 métodos, la concentración está por debajo del límite de detección de los mismos. Esto puede deberse a la dificultad operacional que conlleva trabajar en rangos bajos con este tipo de métodos debido al tipo de matriz semisólida. La alta presencia de sólidos totales y en suspensión provoca un ensuciamiento de los medios de cultivo que puede derivar en que las colonias de *E.faecalis* no entren en contacto con los nutrientes del medio. Asimismo, la presencia de otros microorganismos en las muestras puede conllevar una competencia microbiana que dificulte el crecimiento en un medio selectivo como el SB si las bacterias se encuentran parcialmente dañadas. Dichos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, que determinaron que al trabajar con la muestra de fango sin diluir, se obtuvieron diferencias de más de una unidad logarítmica al utilizar diferentes métodos analíticos (Guzmán et al, 2007). En cambio, se observa que para el caso de la segunda muestra real, se han obtenido resultados de concentración microbiológica similares con los 3 métodos utilizados. Esta diferencia puede deberse a que la influencia del tipo de matriz semisólida es menor cuando la presencia de microorganismos es alta, debido a la necesidad de utilizar un mayor número de diluciones seriadas, lo que implica una reducción en la presencia de ST, SS y turbidez. Por otra parte, con respecto al Ensayo 5, es posible cuantificar la presencia de *E.faecalis* en una concentración baja en 3 de los métodos, sin embargo, el método de NMP muestra resultados por debajo del límite de detección. Se observan discrepancias por lo tanto entre la muestra estéril fortificada y la muestra real a rangos de concentración bacteriana bajos.

Se observan también diferentes ventajas y desventajas operacionales en el procedimiento experimental de cada uno de los métodos. El método de la filtración en membrana tiene como principal ventaja que conlleva una menor manipulación de la muestra, lo que puede facilitar una mayor reproducibilidad al cometer menores errores experimentales. En cambio, debido al menor tamaño del filtro con respecto a las placas usadas para los métodos de siembra, el límite de cuantificación es inferior con respecto a los métodos de siembra. Asimismo, se observa que cuando la concentración microbiológica esperada indica realizar pocas diluciones o trabajar con la muestra de fango directamente (lo que es de esperar en un fango tratado en condiciones termófilas (Carrington, 2001)) , se forma una torta de sólidos en el filtro, lo que provoca unos tiempos de filtración muy altos. Además, existe la posibilidad de que debido a la suciedad que se forma en dicha torta se dificulte el contacto de los microorganismos con el medio de cultivo, impidiendo su crecimiento y por lo tanto su detección (ver Figura 4-3)(Environmental Protection Agency, 2003).

El método de la siembra en masa también conlleva una manipulación de la muestra mínima, además de permitir un mayor recuento de colonias al disponer tanto de placas más grandes como de toda la extensión del medio para distribuirse. Sin embargo, al tener que añadir el medio de cultivo fundido encima de la muestra, puede provocarse la muerte de algunos microorganismos presentes por someterlos a temperaturas demasiado altas (50°C aproximadamente), lo que provocaría un falseo en los resultados, además de un ensuciamiento del medio de cultivo, si se añade la muestra directamente sin diluir, lo que dificulta el recuento de colonias.

Con respecto a la siembra en superficie, se destaca la ventaja con respecto a la filtración de la mayor extensión que se consigue en las placas, lo que permite facilitar el recuento de un mayor número de colonias. Sin embargo, se observa que en el caso de tener que trabajar con la muestra de fango sin diluir, por presentar baja concentración de bacterias, parte de la muestra se queda adherida al asa estéril (ver Figura 4-4), lo que puede suponer un menor recuento de colonias. Esto puede provocar un falseo de los resultados, o la necesidad de utilizar otro método adicional como la filtración, para analizar la muestra al completo.

Por último, con respecto al método de NMP, se observa en la Figura 4-5 que en los ensayos correspondientes a las cepas que el nivel de turbidez resultante en los tubos presuntos positivos no siempre es el mismo. Se pueden ver tubos de diferente color, lo que puede llevar a una interpretación errónea de los resultados. En este método se observa además que en los ensayos realizados en la etapa de confirmación con BEA se necesita de un tiempo mayor a 2 horas para determinar los resultados, lo que representa una desventaja de tiempo con respecto a los otros 3 métodos, siendo más cortos en tiempo.

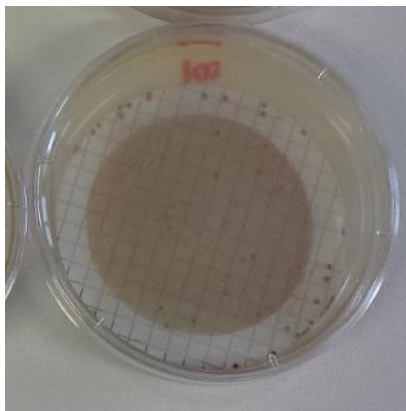


Figura 4-3. Filtro con alto contenido en sólidos



Figura 4-4. Asa con muestra adherida



Figura 4-5. Tubos resultantes NMP de diferente grado de turbidez

De manera complementaria, con el objetivo de determinar el posible efecto de la matriz en el análisis de concentración microbiológica, se realiza una comparación de los valores obtenidos de concentración de *E.faecalis* en una matriz de fango y una matriz de agua como es el suero fisiológico estéril, ambas fortificadas con la misma suspensión bacteriana. En la Tabla 4-3 se muestran los resultados obtenidos en base húmeda y transformados a base logarítmica. El método utilizado es el de filtración en membrana.

Tabla 4-3. Resultados de concentración de *E.faecalis* en muestras fortificadas de fango y de agua con la misma suspensión bacteriana

	Réplica 1 (log)	Réplica 2 (log)
Fango	6,3± 0,2	5,4 ± 0,2
Agua	6,4 ± 0,1	5,1 ± 0,2

Se observa que en ambos casos se obtiene un resultado del mismo orden de magnitud en ambas matrices. Esto implica que al realizar el análisis siguiendo la misma metodología en diferentes matrices con la misma suspensión bacteriana y obteniendo resultados similares, se puede concluir que la matriz no supone interferencias en la detección de microorganismos y que el método se puede aplicar de forma indiferente en matrices de agua y fango.

Por otra parte, con el objetivo de comprobar si existen diferencias significativas entre los resultados de los métodos detallados en el apartado 3.1 que son comparables entre sí (filtración en membrana, siembra en superficie y siembra en masa), se analizan dichos resultados obtenidos en los 5 Ensayos realizados en muestras estériles de fango fortificadas y mostrados en el Tabla 4.2, mediante el análisis estadístico ANOVA F-Fisher detallado en el apartado 3.3. Los resultados objeto de este análisis se encuentran disponibles en el ANEXO 4.

La Figura 4-6 muestra los resultados del test LSD F-Fisher, según lo explicado en el apartado 3.3, para el caso de los resultados obtenidos en el Ensayo 1 (ver nomenclatura Tabla 4-1). El método de siembra en masa es el método cuyos resultados tienen diferencias significativas con respecto a los resultados obtenidos mediante los otros dos métodos (p valor de 0,001, mayor al nivel de confianza del 95%). Esto implica que no se podría sacar un valor promedio entre los resultados obtenidos por el método de siembra en masa y los obtenidos por los otros 2 métodos.

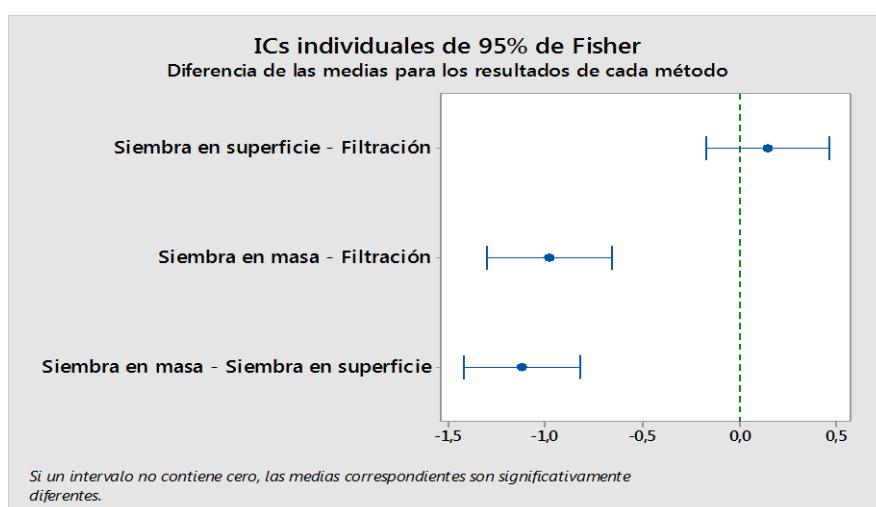


Figura 4-6. Diferencia entre medias para reducción de *E.faecalis* resultados Ensayo 1

Los resultados obtenidos tras aplicar los tres métodos en el Ensayo 2 y el Ensayo 4 presentan diferencias significativas entre ellos (p valor de 0,001), siendo el método de

siembra en superficie donde se obtienen resultados más altos (ver Tabla 4-2). Por tanto, no se podría sacar un valor promedio con los resultados obtenidos mediante los 3 métodos. Comparando los resultados obtenidos en el Ensayo 3 y Ensayo 5, (ver Figura 4-7) puede observarse que el método de siembra en superficie muestra resultados significativamente diferentes con respecto a los otros 2 métodos (p valor de 0,003 y 0,05). De esta manera, tampoco se podría obtener un valor promedio de los resultados obtenidos por el método de siembra en superficie y los obtenidos en los métodos de filtración en membrana y siembra en masa.

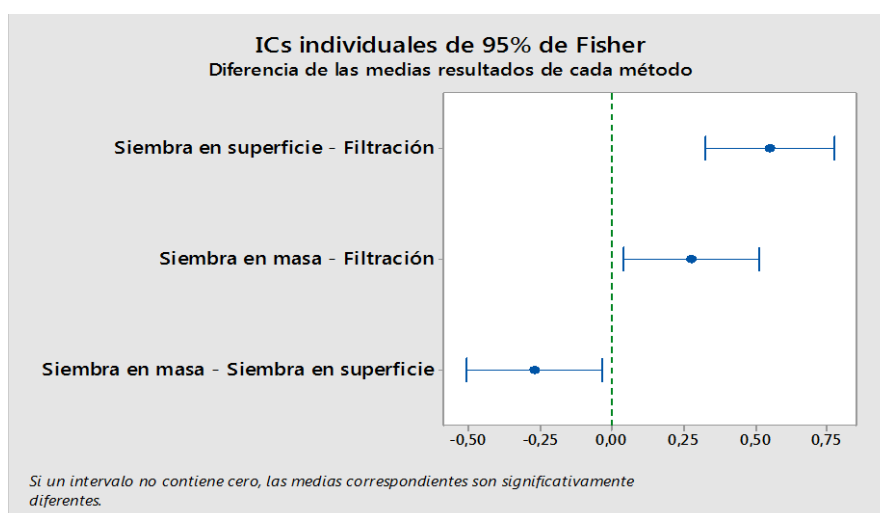


Figura 4-7. Diferencia entre medias para reducción de *E.faecalis* resultados Ensayo 3

Por otro lado, con el objetivo de determinar si existen diferencias significativas entre las varianzas de los resultados obtenidos aplicando cada método para cada uno de los ensayos, se analizan estadísticamente los resultados obtenidos en cada método por separado, mediante una comparación por pares.

Para el caso del método de filtración en membrana no se puede concluir que las varianzas entre los resultados de cada ensayo sean significativamente diferentes (p valor entre 0,226 y 0,989). Sin embargo, los resultados obtenidos mediante el método de siembra en masa muestran unas varianzas entre los ensayos, salvo en el caso entre el Ensayo 3 y el 4, con diferencias estadísticas significativas al 92% de confianza (p valor entre 0,007 y 0,08). Para finalizar, en el caso del método de siembra en superficie no se encuentran diferencias significativas entre las varianzas de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos (p valor entre 0,18 y 0,807), salvo en el caso entre el Ensayo 1 y el Ensayo 4 al 93% de confianza (p valor de 0,068). Por lo tanto, se puede afirmar que el método de filtración en membrana es el que muestra una menor diferencia entre las varianzas de los resultados de cada ensayo con respecto a los métodos de siembra. Otros autores determinaron que los métodos de siembra son en muchos casos no reproducibles (Guzmán et al, 2007) debido a la manipulación de la muestra y las características de la matriz.

Por otra parte, se analizan estadísticamente los resultados obtenidos para la muestra real 2 (ver nomenclatura Tabla 4-1, y resultados en Tabla 4-2). Con el resultado del p valor (0,823) se observa que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante

cada uno de los métodos utilizados. Por lo tanto, se podría obtener un valor promedio entre dichos resultados (obtenidos mediante los 3 métodos utilizados).

4.2 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS PREVIOS DE ANÁLISIS DE *E. COLI* EN FANGOS

De manera complementaria al estudio realizado para *E. faecalis* (apartado 4.1), se realiza un estudio similar sobre *E. coli*, haciendo uso de los datos incluidos en el apartado 3.2, en concreto en la Tabla 3-4. De la misma manera que para *E. faecalis*, se determina si existen diferencias significativas entre los resultados de métodos analíticos utilizados. Además, se determina si existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos en los diferentes medios de cultivo empleados. Los resultados objeto de este análisis se encuentran disponibles en el ANEXO 4.

Tanto para el caso del método de filtración en membrana, como para el método de siembra en masa, no se observan diferencias significativas entre los resultados de concentración en los 3 medios de cultivo utilizados (p valor entre 0,478 y 0,942). Se podría obtener por lo tanto un valor promedio de concentración entre todos estos resultados. Sin embargo, para el caso de del método de siembra en superficie (ver Figura 4-8), se observa que a un nivel de confianza de 87% (p valor de 0,129) sí que existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos en los diferentes medios de cultivo empleados. En concreto, el medio CCA es el que muestra los resultados con diferencias significativas al nivel de confianza nombrado.

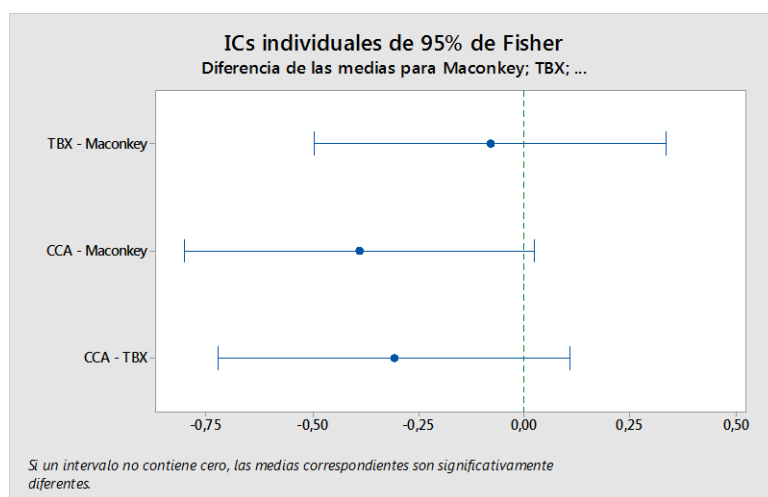


Figura 4-8. Diferencia entre medias para concentración *E. coli* para los resultados de medios de cultivo en siembra en superficie

Con respecto a la comparación entre los resultados obtenidos con los diferentes métodos analíticos aplicados, se observa en la Figura 4-9 las diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante el método de filtración en membrana y los obtenidos mediante los dos métodos de siembra (p valor 0,001).

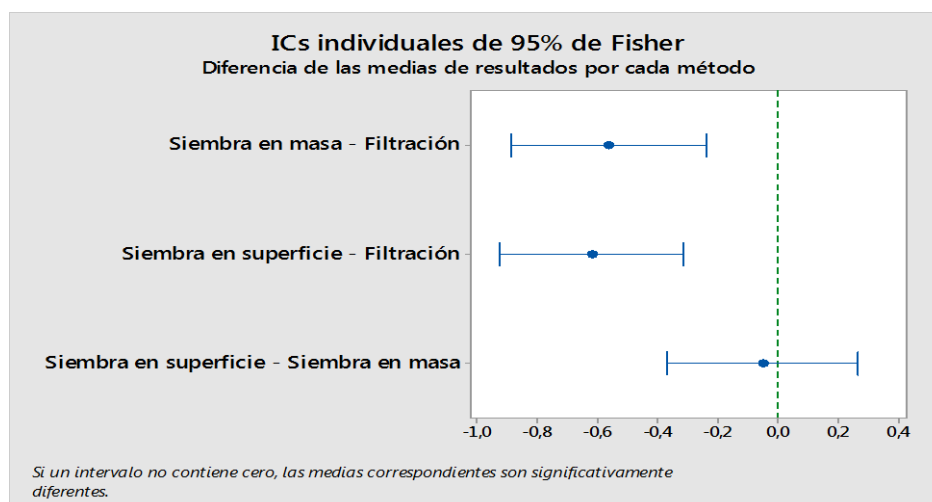


Figura 4-9 Diferencia entre medias para concentración *E.coli* para los resultados de diferentes métodos analíticos

Por último, con respecto a las varianzas obtenidas en los resultados de cada ensayo y a partir de cada método, no se observan diferencias significativas para el caso de los resultados obtenidos mediante el método de filtración en membrana (p valor de 0,731). En cambio, sí se observan diferencias significativas de varianza para los resultados de ambos métodos de siembra al 90% de confianza (p valor entre 0,001 y 0,1). Esta conclusión se obtiene también para el caso de *E.faecalis* (ver apartado 4.1).

4.3 DIAGNÓSTICO DE HIGIENIZACIÓN DE FANGOS

4.3.1 Variables influyentes en la reducción microbiológica

Con el objetivo de estudiar el efecto significativo del TRH y de cada tratamiento en la concentración microbiológica presente en fangos tras los procesos de digestión, se realiza un análisis estadístico siguiendo lo establecido en el apartado 3.3. Para dicho análisis, se emplean los valores de los parámetros rutinarios de control que se utilizan para determinar el correcto funcionamiento de las plantas piloto y los procesos de digestión descritos en el apartado 3.2 y que se muestran en las Tablas 3-2, así como los datos de reducción de concentración microbiológica que se muestran en la Tabla 3-3. Los resultados objeto de este análisis se encuentran disponibles en el ANEXO 4.

Se observa que los datos de parámetros de control y reducción de contaminación microbiológica tras los diferentes tratamientos (Tabla 3-2 y Tabla 3-3) son similares a los obtenidos por otros autores (Levantesi et al., 2014), (Orzi et al., 2015a).

En primer lugar, se estudia el efecto del tipo de tratamiento en los datos de reducción de *E.faecalis*. Con el p valor obtenido de 0,001, se puede determinar que el tipo de tratamiento utilizado según la planta piloto empleada es un factor significativo en la variable de reducción de *E.faecalis*. Para comprobar qué tratamiento de los 3 (MAD, TAD o ATAD) consigue mayores valores de reducción, se realiza el test LSD F-Fisher, cuyos resultados se pueden ver en las Figuras 4-10 y 4-11. En este caso, en el tratamiento termófilo se obtienen los valores más altos de reducción de *E.faecalis*. Además, esta diferencia entre tratamientos resulta estadísticamente significativa (Figura 4-11). Este resultado está en concordancia a

lo estudiado por otros autores que afirman que el tratamiento termófilo anaerobio resulta más eficiente en la reducción de esta bacteria en menores tiempos de retención (Sahlström et al., 2008). Sin embargo, difiere de otros estudios que no encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos de tipo mesófilo y termófilo anaerobio para la eliminación de *E.faecalis* en fangos (Bagge y Albiñ, 2005).

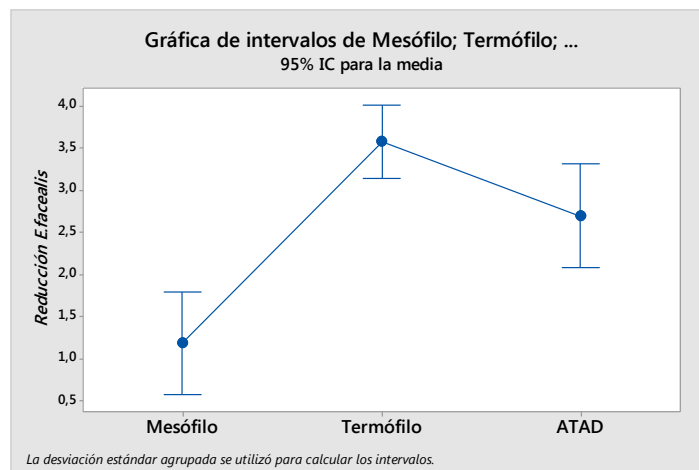


Figura 4-10. Intervalos de reducción de *E.faecalis* para diferentes tratamientos

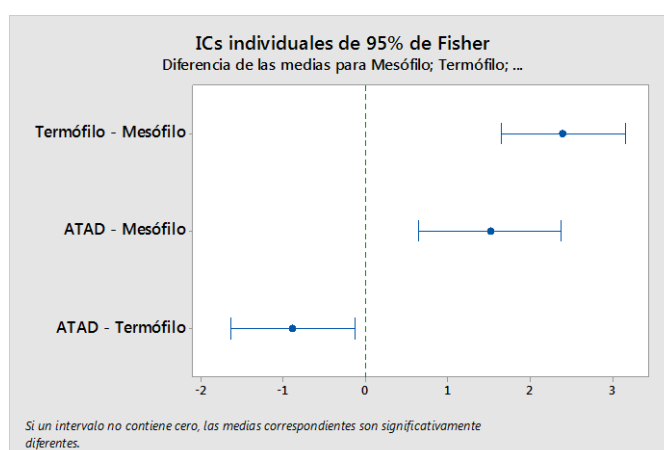


Figura 4-11. Diferencia entre medias para reducción de *E.faecalis* para diferentes tratamientos

Asimismo, se estudia mediante un ANOVA de tipo cuantitativo el posible efecto del TRH de cada uno de los 3 tratamientos de digestión, también sobre la variable de reducción de *E.faecalis*. Se muestran los resultados para el caso del tratamiento termófilo en la Figura 4-12. Los resultados objeto de este análisis se encuentran disponibles en el ANEXO 4.

Tal y como se muestra en la Figura 4-12 y con un resultado de p valor de 0,452, a pesar de que se observe un máximo a 7 días de tiempo de retención, el TRH no muestra una influencia significativa en el rango estudiado. Este resultado concuerda con otros autores que determinaron que la correcta digestión e higienización del fango era independiente del valor de TRH al que operar a partir de un valor mínimo de 2 horas (Maspolim, Zhou, Guo, Xiao, y Ng, 2015), y otros estudios (disponible en Anexo 1) donde se observa que un incremento del TRH no aumenta de forma proporcional la reducción de patógenos

(Carrington, 2001). Para los otros tratamientos se obtienen resultados similares en cuanto a la influencia no significativa del TRH.

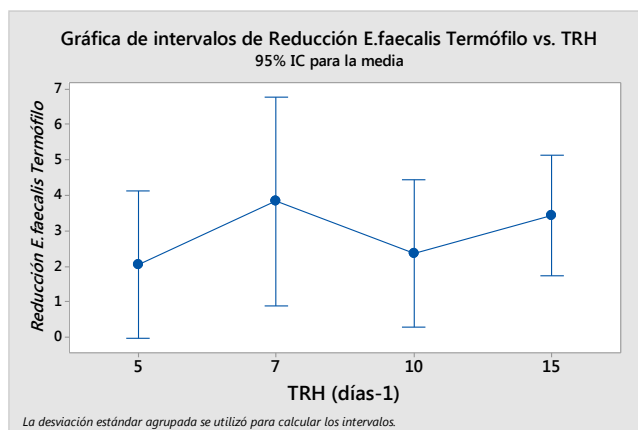


Figura 4-12. Intervalos de reducción de *E.faecalis* para diferentes TRH en tratamiento termófilo

Se realiza el mismo tipo de estudio de evaluación de la influencia del TRH y del tipo de tratamiento en los valores de reducción de *E.coli* a partir de los datos observados en la Tabla 3-3. Se muestra con el p valor de 0,001 que el efecto del tipo de tratamiento también resulta significativo, pero como puede verse en la Figura 4-13, para el caso de la *E.coli* es el ATAD el tratamiento con mayores resultados de reducción de contaminación microbiológica. Estos resultados se ajustan a lo dicho por otros autores, que afirman que el tratamiento ATAD resulta ser eficiente en la eliminación de este tipo de bacterias (Lloret et al., 2012). Al igual que para el caso de los *E.faecalis*, el TRH no tiene una influencia significativa en la reducción de *E.coli* en ninguno de los 3 tratamientos en el rango estudiado (p valor entre 0,183 y 0,379), lo cual determinaron también otros autores (Orzi et al., 2015a).

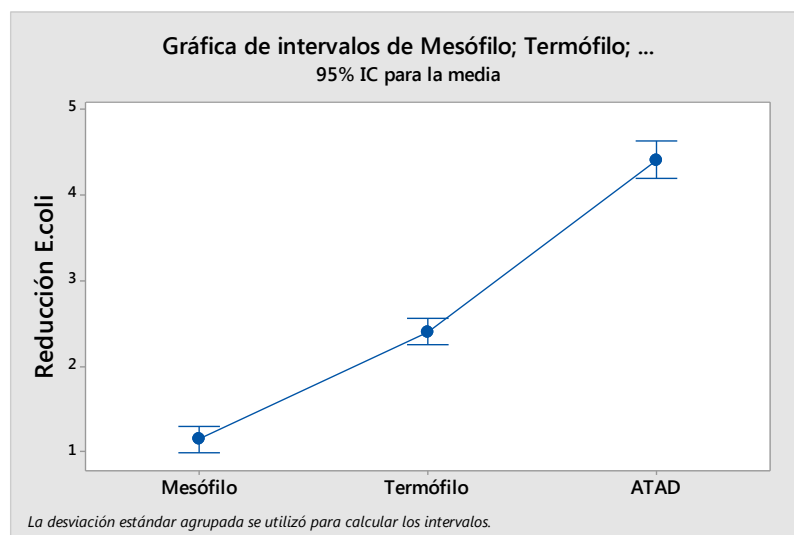


Figura 4-13. Intervalos de reducción de *E.coli* para diferentes tratamientos

Por lo tanto, se observan diferentes resultados entre las bacterias de *E.coli* y *E.faecalis*. Esto puede deberse a que la *E.coli* se trata de una bacteria Gram negativa, y los *E.faecalis* Gram positiva, lo que puede derivar en diferentes comportamientos tal y como se ha comentado en el apartado 1.2. Con el objetivo de corroborar dicha afirmación, se realizan los mismos estudios para las variables de coliformes totales (Gram negativa) y *S.aureus* (Gram positiva).

Para el caso de reducción de coliformes totales, se observa un efecto significativo del tipo de tratamiento a un nivel de confianza del 94% (p valor de 0,06), en donde el ATAD al igual que para la *E.coli* es el mejor tratamiento de eliminación (ver Figura 4-14). Se puede determinar que todos los géneros de coliformes se comportan de forma similar. Por otro lado, para el caso de reducción de *S.aureus* también hay un efecto significativo del tipo de tratamiento (p valor de 0,017) siendo el termófilo anaerobio el mejor tratamiento (ver Figura 4-15). Se confirma por lo tanto el diferente comportamiento de las bacterias en los tratamientos según si se tratan de Gram positivas o Gram negativas. Asimismo, en ambas bacterias el TRH no resulta un parámetro significativo en la reducción microbiológica en el rango estudiado.

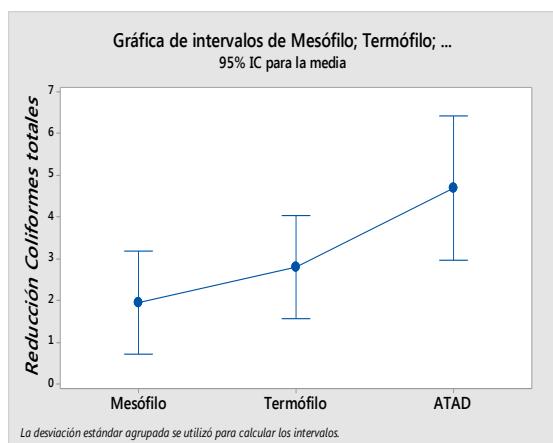


Figura 4-14. Intervalos de reducción de *C.totales* para diferentes tratamientos

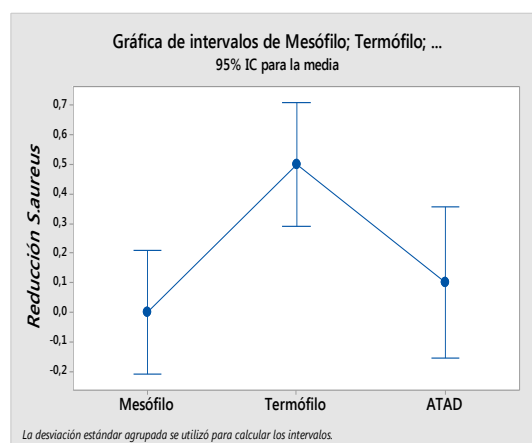


Figura 4-15 Intervalos de reducción de *S.aureus* para diferentes tratamientos

Por último, se estudia la influencia de los parámetros físico químicos en la reducción tanto de *E.faecalis* como de *E.coli*. En la Figura 4-16 se observa la evolución del parámetro de amonio y de la reducción de *E.faecalis* con respecto al TRH para los 3 tratamientos estudiados. Se observa que para el caso del tratamiento TAD ambos parámetros siguen una evolución similar. Esto puede deberse a los productos de degradación microbiológica resultantes de la digestión termófila anaerobia, comentado en el apartado 1.1.4. Otros estudios determinaron que el amonio tiene un efecto significativo en la reducción de bacterias en el caso de tratamientos termófilos (Orzi et al., 2015b). Eso último concuerda con lo obtenido en el análisis estadístico realizado al amonio, donde el tipo de tratamiento resulta ser significativo (p valor de 0,001) en la concentración del mismo, siendo el de mayores resultados de concentración el tratamiento termófilo. Para el caso de la *E.coli*, se obtienen resultados similares a *E.faecalis* en los 3 tipos de tratamientos de digestión (ver Figura 4-17). Otros estudios determinaron que el amoníaco tiene efectos sobre los agentes patógenos y suele utilizarse para sanear los fangos de las aguas residuales. Ottoson et al., (2008) destacaron en un estudio que el amoníaco tiene un efecto sobre la reducción de patógenos para el proceso termofílico, pero que en cambio desempeña un papel menor en el proceso mesófilo.

Para el resto de parámetros físico químicos no se observa ninguna evolución similar a la correspondiente con los datos de reducción microbiológica. Todos los resultados restantes de los análisis estadísticos nombrados se encuentran disponibles en el ANEXO 4.

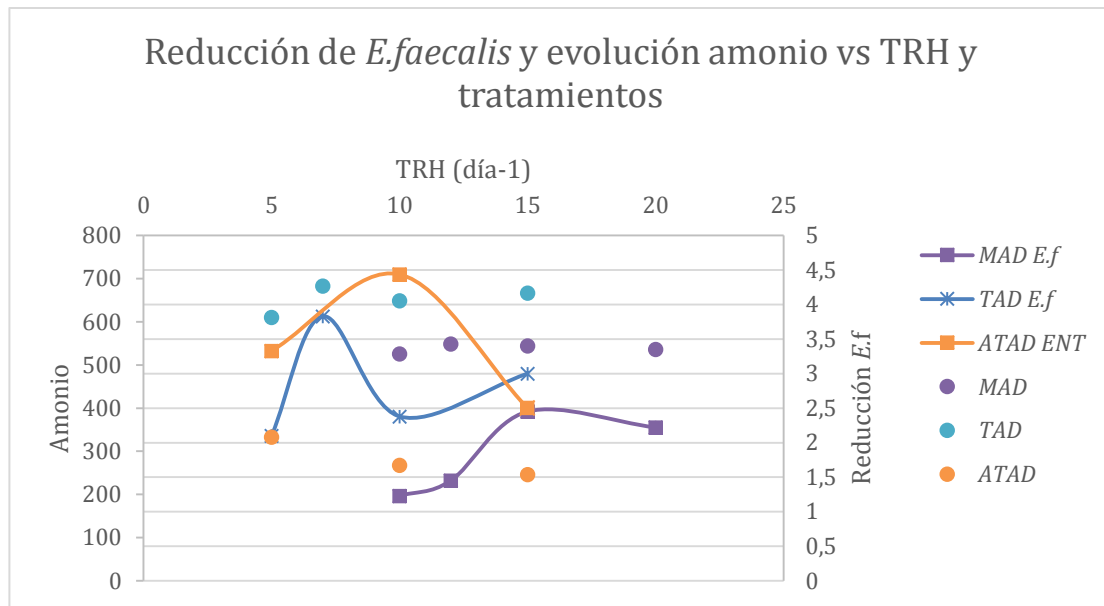


Figura 4-16. Evolución de amonio y reducción de *E. faecalis* para TRH y diferentes tratamientos

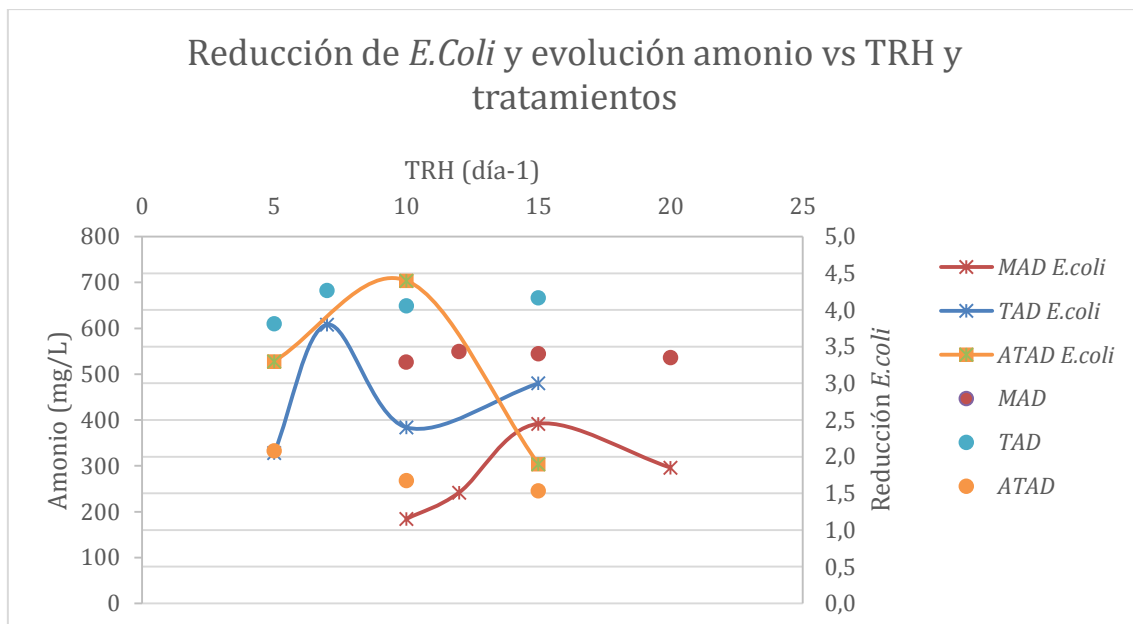


Figura 4-17 Evolución de amonio y reducción de *E. coli* para TRH y diferentes tratamientos

4.3.2 Determinación del grado de cumplimiento de criterios de calidad

En el apartado 1.2.3 se observa la Tabla 1-2 que muestra los criterios de calidad respecto a la higienización de fangos de EDAR. Dichos criterios de calidad se comparan con los resultados de concentración de *E. coli* obtenidos en 2 muestras de fango tratadas mediante digestión anaerobia mesófila mostrados en la Tabla 3-4. Para establecer el criterio de higienización de las muestras de fango se compara el valor que establece la norma de calidad con el dato de concentración de *E. coli*.

Para el caso de la norma de calidad EU working document del 2010 se observa que los resultados de ambas muestras cumplen con el criterio de calidad establecido (menor a

5E+05 equivalente a 5,7 unidades logarítmicas). Para el caso de la norma de calidad EU working document del 2003 que establece un criterio de calidad <1E+03 (equivalente a 3 unidades logarítmicas) para fangos tratados mediante un tratamiento avanzado, se puede observar que los resultados obtenidos en los 3 tipos de medio de cultivo mediante el método de siembra en superficie cumplen con dicho criterio. Sin embargo, para el caso de los resultados obtenidos mediante el método de filtración en membrana se puede observar como dichos valores no cumplen con el criterio de calidad.

Se puede concluir por lo tanto que la aplicación de diferentes métodos analíticos a una misma muestra conlleva a diferentes diagnósticos de cumplimiento de los criterios de calidad de higienización en fangos.

Respecto a la determinación del grado de higienización de los fangos de depuradora sometidos a los diferentes tratamientos biológicos (ver datos reducción de *E.coli* en Tabla 3-2), se observa que solamente el tratamiento ATAD cumple los criterios de calidad detallados en la Tabla 1-2 de higienización, para el caso de 10 días de tiempo de retención.

5 CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son:

- Se recomienda que para la determinación y cuantificación de *E.faecalis* en muestras de fango con concentraciones altas (>3,5 unidades logarítmicas) se utilice el método analítico de filtración en membrana. Por otro lado, para el caso de muestras con concentraciones bajas (<3,5 unidades logarítmicas), se recomienda el uso del método del NMP. También se contempla en este caso la posibilidad de utilizar el método de filtración en membrana siempre que el volumen de muestra sea pequeño, para evitar tiempos de procedimiento experimental muy largos. Con el objetivo de comparar resultados entre estudios y debido a las diferencias significativas observadas entre los métodos, se destaca la necesidad de utilizar en la medida de la posible los mismos métodos de análisis microbiológico tanto a nivel europeo como mundial.
- Se observa que la utilización de diferentes métodos analíticos sobre una misma muestra de fangos puede conllevar a determinaciones diferentes del grado de cumplimiento de los criterios de calidad de higienización de fangos.
- Se determina la influencia de los parámetros de control operacional de tratamiento biológico en los datos de reducción tanto de *E.faecalis* como de *E.coli*. En concreto, se observa la influencia del amonio en el tratamiento TAD, pero en cambio la no influencia del TRH en ninguno de los 3 tipos de tratamiento. De esta manera, teniendo medidas en continuo del parámetro del amonio, se podrían obtener resultados indicativos de la evolución de la reducción de contaminación microbiológica durante el proceso de digestión anaerobia termófila.
- Se observa una respuesta claramente diferente entre el comportamiento de *E.coli* y de *E.faecalis* ante los procesos de tratamiento biológico utilizados, por lo que se recomienda la inclusión de ambos parámetros de control en futura normativa relacionada con criterios de calidad de fangos procedentes de depuradoras.

Con respecto a posibles trabajos futuros se plantean:

- Estudio de una correlación entre el método de NMP y los métodos de placas de cultivo, con el objetivo de poder comparar resultados.
- Realización de un diseño de experimentos de modelo cuadrático, con el objetivo de observar el efecto de las curvaturas del factor de TRH. Se observan valores máximos de dicho factor, y de esta manera podría establecerse el valor más óptimo con respecto a la reducción microbiológica.

- Estudio de la influencia de otros parámetros de control en la reducción de contaminación microbiológica, como la producción de biogás.

6 BIBLIOGRAFÍA

Angelidaki, I., y Ahring, B. K. (1994). Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: effect of temperature. *Water Research*, 28(3), 727-731.

Astals, S., Venegas, C., Peces, M., Jofre, J., Lucena, F. and Mata-Alvarez, J. (2012) 'Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge', *Water Research*. Elsevier Ltd, 46(19), pp. 6218-6227. doi: 10.1016/j.watres.2012.07.035.

Bagge, E., Sahlström, L., Albiñ, A., (2005). The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Res.* 39, 4879-4886.

Carballa M, Omil F, Lema JM (2009) Influence of different pretreatments on anaerobically digested sludge characteristics: suitability for final disposal. *Water Air Soil Pollut* 199:311-321

Carrington, E. (2001). Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction. Luxemburgo: European Commission.

Carrington, EG; Davis, RD; Hall, JE; Pike, EB; Smith, SR; Unwin, RJ. (1998) Review of the scientific evidence relating to the controls on agricultural use of sewage sludge. In Report DETR4415/3 [part1] and Report DETR 4454/4; WRC Publications: Medmenham, UK,

Chen, Y., Cheng, J. J. and Creamer, K. S. (2008) 'Inhibition of anaerobic digestion process: A review', *Bioresource Technology*, 99(10), pp. 4044-4064. doi: 10.1016/j.biortech.2007.01.057.

Chen, Y.C., Murthy, S.N., Hendrickson, D., Araujo, G. and Higgins, M.J. (2011) The effect of digestion and dewatering on sudden increases and regrowth of indicator bacteria after dewatering. *Water Environ Res* 83, 773-783

Elías, X. (2009). Reciclaje de residuos industriales: residuos sólidos urbanos y fangos de depuradora. Díaz de Santos.

Environmental Protection Agency (2003). Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land.

Feacham, R., Bradley, D., Garelick, H. a., y D.D. (1983). Health aspects of excreta and wastewater management. Chichester: John Wiley and Sons.

Gavala, H.N., Yenal, U., Skiadas, I.V., Westermann, P. and Ahring, B.K. (2003). Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of pre-treatment at elevated temperature. *Wat. Res.*, 37, 4561-4572.

Gleick, P. H. (1996). Basic water requirements for human activities: Meeting basic needs. *Water international*, 21(2), 83-92.

Gondim Porto, G. (2013). Análisis microbiológico de un suelo agrícola mediterráneo tras la aplicación de fangos de depuradora urbana. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

Higgins, M.J., Chen, Y.C., Murthy, S.N., Hendrickson, D., Farrel, J. and Schafer, P. (2007) Reactivation and growth of non- culturable indicator bacteria in anaerobically digested biosolids after centrifuge dewatering. *Water Res* 41,665–673

Guzmán C, Jofre J, Montemayor M, Lucena F (2007a) Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *J Appl Microbiol* 103(6):2420–2429

Huete, E. (2007). Estudio comparativo de la digestión anaerobia. Pamplona, España: Universidad de Navarra.

Ibarz C. (2008). Desactivación de enterococos en agua natural mediante fotocátalisis con dióxido de titanio y radiación solar. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

Joo, S. H., Monaco, F. D., Antmann, E., y Chorath, P. (2015). Sustainable approaches for minimizing biosolids production and maximizing reuse options in sludge management: A review. *Journal of environmental management*, 158, 133-145.

Kim, M., Ahn, Y. and Speece, R.E. (2002). Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs thermophilic. *Wat. Res.*, 36, 4369-4385.

leick, P. (1996). Water resources. En: *Encyclopedia of Climate and Weather* (S. H.). Oxford University Press, New York, 817:823.

Lanao, M. (2012). Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus* sp. en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación. Universidad de Zaragoza.

Levantesi, C., Beimfohr, C., Blanch, A. R., Carducci, A., Gianico, A., Lucena, F., ... y Mininni, G. (2015). Hygienization performances of innovative sludge treatment solutions to assure safe land spreading. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(10), 7237-7247.

Lloret, E., Pastor, L., Martínez-Medina, A., Blaya, J., y Pascual, J. A. (2012). Evaluation of the removal of pathogens included in the Proposal for a European Directive on spreading of sludge on land during autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD). *Chemical engineering journal*, 198, 171-179.

Mapama. (2015). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible en http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion_y-gestion-residuos/flujo/lodos-depuradora/Default.aspx. Consulta: Febrero 2017

Maspolim, Y., Zhou, Y., Guo, C., Xiao, K., y Ng, W. J. (2015). The effect of pH on solubilization of organic matter and microbial community structures in sludge fermentation. *Bioresource technology*, 190, 289-298.

Minimi, G., Laera, G., Bertanza, G., Canato, M., y Sbrilli, A. (2015). Mass and energy balances of sludge processing in reference and upgraded wastewater treatment plants. *Environ Sci Pollut Res*, 22,7203–7215.

Monteleone, M.C., Furness, D., Jefferson, B. and Cartmell, E. (2004) Fate of *E. coli* across mechanical dewatering processes. *Environ Technol* 25, 825–831.

Montgomery, D.C. (2004) *Diseño y análisis de experimentos*. 2ª ed. México: Limusa-Wiley,

Ottoson, J.R., Schnürer, A., Vinnerås, B., (2008). In situ ammonia production as a sanitation agent during anaerobic digestion at mesophilic temperature. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 325–330.

Orzi, V., Cadena, E., D'Imporzano, G., Artola, A., Davoli, E., Crivelli, M., Adani, F., (2010). Potential odour emission measurement in organic fraction of municipal solid waste during anaerobic digestion: relationship with process and biological stability parameters. *Bioresour.*

Pascual Benito, M., García Aljaro, C., Casanovas, A., Blanch, A., y Lucena, F. (2015). Effect of hygienization treatment on the recovery and/or regrowth of microbial indicators in sewage sludge. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072, 118, 412-418.

PEMAR. (2016). Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (PEMAR) 2016-2020. España: Ministerio de Agricultura, alimentación y medio ambiente.

Piterina, A. V., Bartlett, J. and Pembroke, T. J. (2010) 'Evaluation of the removal of indicator bacteria from domestic sludge processed by autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD)', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(9), pp. 3422–3441. doi: 10.3390/ijerph7093422.

Pourcher AM, Morand P, Picard-Bonnaud F, Billaudel S, Monpoeho S, Fererighi M, et al. (2005) Decrease of enteric microorganisms from rural sewage sludge during their composting in straw mixture. *J Appl Microbiol* 99(3):528–39.

Reusser, S. and Zelinka, G. (2004) Laboratory-Scale comparison of anaerobic-digestion alternatives. *Wat. Env. Res.*, 76 (4), 360-379.

Sahlström, L., Bagge, E., Emmoth, E., Holmqvist, A., Danielsson-Tham, M.L., Albiñá, A., (2008). A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. *Bioresour. Technol.* 99 (16), 7859–7865

Sidhu, J., y Toze, S. (2009). Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. *Environ Int*, 35, 197-201.

SM 9215B. Heterotrophic plate count. Part B- Diffuse plate method.

SM 9215C. Heterotrophic plate count. Part C- Pour on plate method.

SM9230. Multiple Tube Technique.

Smith Jr JE, Millner PD, Jakubowski W, Goldstein N, Rynk R. (2004) Contemporary perspectives on infectious disease agents in sewage sludge and manure. Emmaus, P.A: The JG Press.

Sobrados, L., Gomez, J., Lasheras, A. M., Garcia-Heras, J. L. and Huete, E. (2010) 'Comparison of the behaviour in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge coming from two WWTPs with different biological wastewater treatment', 12th Congress on anaerobic digestion - International Water Association (IWA).

Song, Y-C., Kwon, S-J. and Woo, J-H. (2004) Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic and thermophilic digestion of sewage sludge. *Wat. Res.*, 38, 1653-1662.

Strauch, D. (1991). Microbiological treatment of municipal sewage waste and refuse as a means of disinfection prior to recycling in agriculture. *Studies in Environmental Science*, 42,121-136.

Strauch, D. (1998) Pathogenic micro-organisms in sludge. Anaerobic digestion and disinfection methods to make sludge usable as a fertiliser. *Eur. Water Manage*, 1, 12-2

Tomei, M. C. and Carozza, N. A. (2015) 'Erratum to Sequential anaerobic/aerobic digestion for enhanced sludge stabilization: comparison of the process performance for mixed and waste sludge[*Environ Sci Pollut Res*, DOI 10.1007/s11356-014-3130-2]', *Environmental Science and Pollution Research*, 22(10), p. 7280. doi: 10.1007/s11356-014-3948-7.

UNE-EN ISO 7899-2:2001. Detección y recuento de enterococos intestinales. Parte 2: Método de filtración por membrana

Unión Europea (2012). Estrategia Europea 2020. Disponible en https://ec.europa.eu/info/strategy/european-semester/framework/europe-2020-strategy_es Consulta: Marzo 2017

Wheeler AL, Hartel PG, Godfery DG, Hill JL, Segars WI. (2002) Potential of *Enterococcus faecalis* as a human faecal indicator for microbial source tracking. *J Environ Qual*; 31:1286-93. Wilcox

Scaglia, B., D'Imporzano, G., Garuti, G., Negri, M., Adani, F., (2014). Sanitation ability of anaerobic digestion performed at different temperature on sewage sludge. *Sci. Total Environ*. 466-467, 888-897.

Zaleski KJ, JL, Gerba CP, Pepper I. (2005) Potential regrowth and recolonization of *Salmonellae* and indicators in biosolids and biosolid-amended soil. *Appl Environ Microbiol* 71(7):3701-8.

ANEXOS

ANEXO 1: FANGOS DE DEPURADORA

Los fangos de depuración son una mezcla de agua y sólidos generada en el tratamiento de aguas residuales, como resultado de procesos naturales o artificiales. Se generan principalmente en las estaciones depuradoras que reciben aguas residuales urbanas, en las fosas sépticas y en otras estaciones depuradoras de aguas residuales que traten aguas de composición similar (principalmente de la industria agroalimentaria). Según los datos del Registro Nacional de Fangos, en España se producen anualmente alrededor de 1.200.000 toneladas (en materia seca, m.s.) de estos fangos de depuradora. En la figura A1-1 se puede ver un esquema de la generación y el tratamiento de estos fangos.

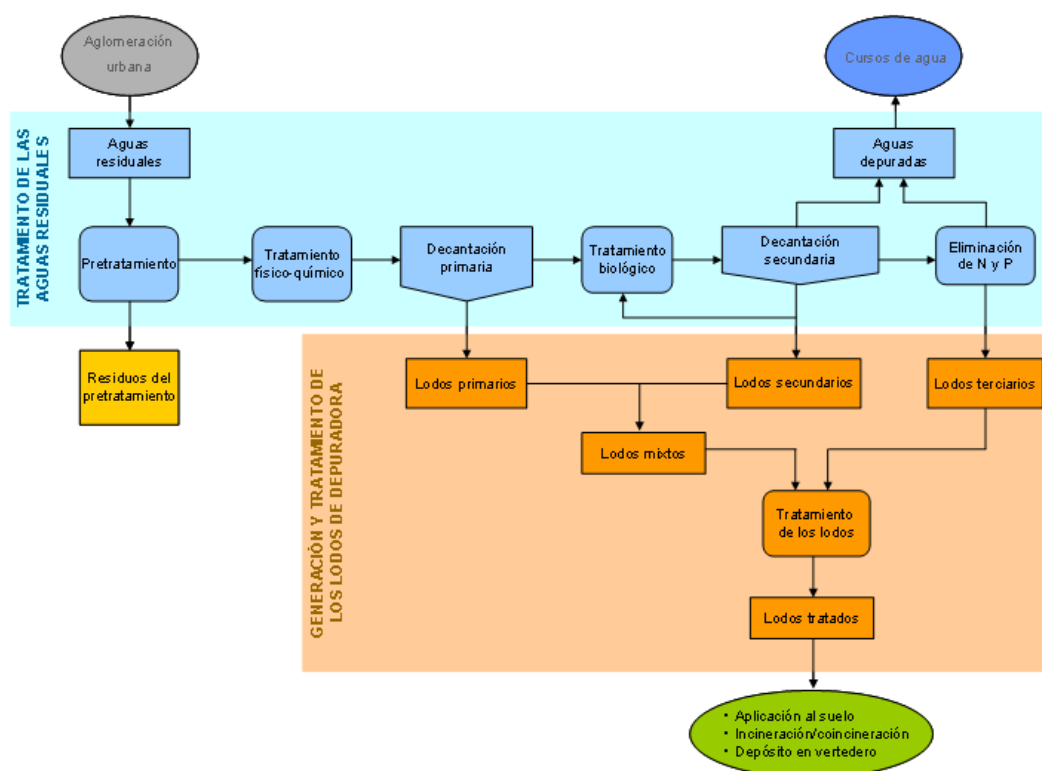


Figura A1-1. Etapas de generación de los fangos de depuración. Fuente: Mapama

Los fangos se caracterizan por ser un residuo extremadamente líquido (más de un 95% de agua). Su composición es variable y depende de la carga de contaminación del agua residual inicial y de las características técnicas de los tratamientos llevados a cabo en las aguas residuales. Los tratamientos del agua concentran la contaminación presente en el agua, y por tanto, los fangos contienen amplia diversidad de materias suspendidas o disueltas. Algunas de ellas con valor agronómico, materia orgánica, nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) y en menor cantidad calcio (Ca), magnesio (Mg) y otros micronutrientes esenciales para las plantas y otras con potencial contaminante como los metales pesados, entre ellos cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), mercurio (Hg), níquel (Ni), plomo (Pb) y zinc (Zn), los patógenos, y los contaminantes orgánicos.

Las plantas de tratamiento de aguas residuales consisten en una secuencia de operaciones que, consiguen el resultado de eliminar materia orgánica y sólidos en suspensión. En

general, las operaciones que se suceden en una planta de tratamiento de aguas residuales se pueden dividir en las siguientes:

- Pretratamiento
- Tratamiento primario
- Tratamiento secundario
- Tratamiento terciario o avanzado
- Desinfección
- Tratamiento de fangos

Los diferentes tipos de fangos que se producen durante el tratamiento de las aguas residuales no son susceptibles de un uso beneficioso sin un tratamiento previo, lo que incluye una estabilización, una higienización y, generalmente, una deshidratación del mismo. El término “biosólidos” se utiliza para denominar al fango procedente del agua residual destinado a un uso beneficioso. La cantidad de biosólidos producidos depende del tipo de estabilización utilizado, mientras que la forma de los biosólidos depende del método de deshidratación.

El término de biosólidos es recomendado para el fango apropiadamente tratado que es utilizado de forma beneficiosa como acondicionador de suelos y fertilizante, de acuerdo con la normativa vigente al respecto y las buenas prácticas agrícolas. A pesar de que esta es la mejor opción para un uso sostenible del fango, despierta ciertos rechazos en la opinión pública. En la figura A1-2 se muestra a nivel nacional los principales destinos alternativos de la gestión de los fangos de depuradora.

La reducción de patógenos es un objetivo cuantificable. Es imprescindible someter los biosólidos a un control microbiológico para evitar posibles infecciones tras su aplicación al suelo. Los animales pueden jugar un papel importante en los ciclos infecciosos, ya que pueden entrar en contacto con los biosólidos aplicados, infectarse y transportar después esta infección a otras zonas. Este efecto se trata bajo el nombre de atracción de vectores y es uno de los puntos que tienen en cuenta todas las legislaciones medioambientales para asegurar la seguridad pública. . El fango contiene organismos patógenos que pueden causar fiebres tifoideas, cólera, disentería, polio, infecciones por parásitos intestinales y muchas otras enfermedades, los microorganismos causantes eran utilizados para medir la calidad del fango. Sin embargo, hay cierta resistencia a identificar un organismo específico que actúe como indicador de patógenos en el fango (comparable a la medida de *E. coli* en el agua) y todavía hoy es necesario medir una serie de organismos para estimar la peligrosidad del fango para la salud humana (Comisión Europea, 2001).

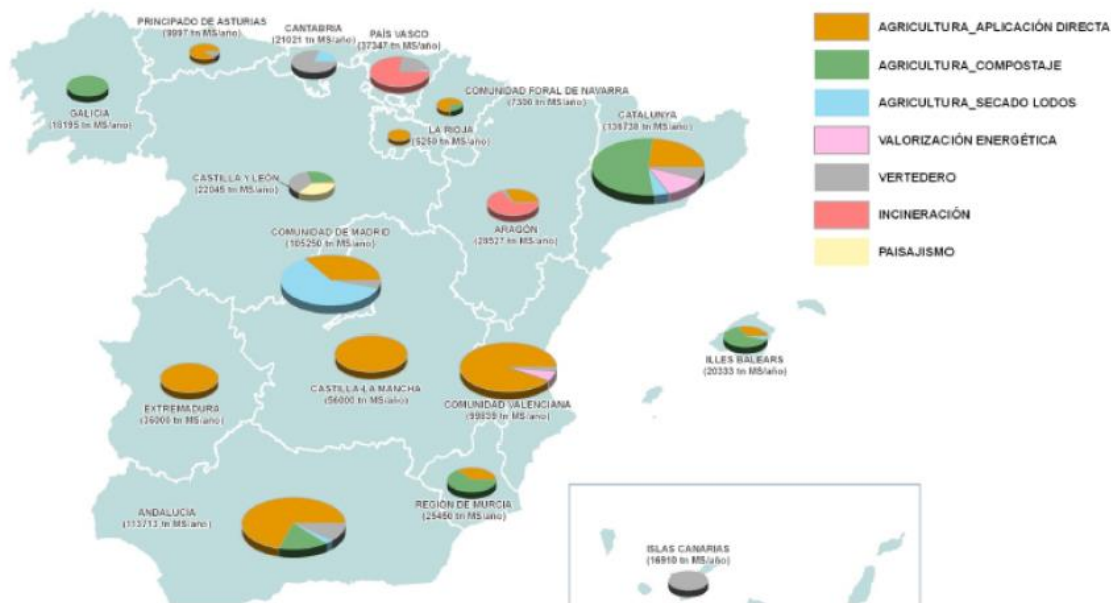


Figura A1-2. Alternativas a la gestión de los fangos. Fuente: ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE ABASTECIMIENTO DE AGUA Y SANEAMIENTO

Observando el Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (PEMAR) 2016-2022, se puede apreciar como en el periodo considerado, las comunidades autónomas que se presentan como mayores productoras de fangos son las Comunidad Valenciana, Madrid, Cataluña y Andalucía (ver tabla A1-1).

Tabla A1-1. Evolución de la producción de fangos de depuración por CCAA. Fuente: PEMAR

PRODUCCIÓN DE LODOS DE DEPURACIÓN (t m.s./año)					
CCAA	2008	2009	2010	2011	2012
ANDALUCÍA	100.057	111.437	119.688	126.447	128.727
ARAGÓN	31.049	31.254	29.753	28.823	29.537
PRINCIPADO DE ASTURIAS	2.229	2.551	4.686	5.303	3.504
ISLAS BALEARES	66.811	66.811	53.324	46.758	44.221
ISLAS CANARIAS	17.940	26.335	31.455	31.422	31.422
CANTABRIA	8.383	14.279	9.995	12.505	27.800
CASTILLA LA MANCHA	46.976	48.070	51.768	57.802	58.094
CASTILLA Y LEÓN	48.369	61.757	64.995	67.055	64.912
CATAUÑA	302.537	136.145	140.078	134.806	135.058
CIUDADES AUTÓNOMAS DE MELILLA Y CEUTA	1.460	1.460	1.418 1	1.267	982
EXTREMADURA	9.430	9.430	7.829	7.829	11.480
GALICIA	63.091	73.513	68.200	60.161	60.201
LA RIOJA	14.769	16.476	9.199	10.635	9.533
COMUNIDAD DE MADRID	228.888	260.192	229.462	199.544	193.722
REGIÓN DE MURCIA	10.558	18.262	29.954	31.808	34.623
COMUNIDAD DE NAVARRA	9.794	8.469	8.469	10.268	10.473
PAÍS VASCO	24.399	24.407	28.125	24.620	39.690
COMUNIDAD VALENCIANA	169.435	292.951	198.322	198.690	198.690
TOTALES	1.156.175	1.205.124	1.086.720	1.058.999	1.082.669

En cuanto a los tratamientos o destinos finales, y según la información del Registro Nacional de Fangos, el 80% de los fangos generados en 2012 fueron aplicados en los suelos agrícolas y el 6% se destinaron a otros destinos como la fabricación de fertilizantes, el 7% fueron incinerados, y el restante 7% fueron eliminados en vertedero. Por lo tanto, se han alcanzado los objetivos cuantitativos establecidos en el Plan Nacional Integrado de Residuos (PNIR) para el periodo 2008-2015 en cuanto a la aplicación en suelos agrícolas (67% como mínimo) y eliminación en vertedero (12% como máximo). Sin embargo, el porcentaje en fangos destinados a incineración ha disminuido entre 2008 y 2012, y a pesar de ello no se ha alcanzado el objetivo establecido (3% como máximo), así como tampoco se ha llegado a alcanzar el objetivo de valorización en otros suelos u otros tipos de valorización (18% objetivo mínimo). Dentro de los diferentes tratamientos que se les puede realizar a los fangos antes de su uso posterior, la Comisión Europea resume los siguientes (Comisión Europea, 2003):

Tratamientos convencionales

- Estabilización aeróbica termofílica a una temperatura de al menos 55 ° C con un período de retención medio de 20 días
- Digestión anaeróbica termofílica a una temperatura de al menos 53 ° C con un período de retención medio de 20 días
- Acondicionamiento con cal que garantiza una mezcla homogénea de cal y fango. La mezcla debe alcanzar un pH de más de 12 directamente después del encalado y mantener un pH de al menos 12 durante 24 horas
- La digestión anaeróbica mesofílica a una temperatura de 35 ° C con un período de retención medio de 15 días
- La ventilación prolongada a temperatura ambiente como lote, sin mezcla o retirada durante el período de tratamiento
- Estabilización aeróbica simultánea a temperatura ambiente

Tratamientos avanzados

- El secado térmico garantiza que la temperatura de las partículas de fango es superior a 80 ° C con una reducción del contenido de agua inferior al 10% y manteniendo una actividad de agua por encima de 0,90 en la primera hora de tratamiento
- Estabilización aeróbica termófila a una temperatura de al menos 55 ° C durante 20 horas como lote, sin mezcla o retirada durante el tratamiento
- Digestión anaerobia termófila a una temperatura de al menos 53 ° C durante 20 horas como lote, sin mezcla o retirada durante el tratamiento
- Tratamiento térmico de los fangos líquidos durante un mínimo de 30 minutos a 70 ° C seguido de digestión anaerobia mesófila a una temperatura de 35 ° C con un período de retención medio de 12 días
- Acondicionamiento con cal que alcanza un pH de 12 o más y mantenimiento de una temperatura de al menos 55 ° C durante 2 horas
- Acondicionamiento con cal que alcanza y mantiene un pH de 12 o más durante tres meses

En estos tratamientos, son numerosos los parámetros de control que se deben tener en cuenta para el correcto funcionamiento del proceso, tal y como se ha comentado en la memoria. Se destaca de nuevo la influencia del TRH. Se presenta un estudio como ejemplo de la reducción en el número de un hipotético patógeno durante la digestión primaria

mesofílica. Para este estudio, se ha supuesto que la concentración del patógeno en el fango es constante y que tiene una tasa de decaimiento decimal de 1 d^{-1} , que es una cifra arbitraria pero bastante realista. Los cálculos se han hecho para situaciones que utilizan tres intervalos diferentes entre la alimentación y para dos períodos de retención medios diferentes. Los resultados se pueden ver en la Tabla 1-2:

Tabla A1-2. Ejemplos de reducción base log10 del número de patógenos hipotéticos durante una serie de situaciones de digestión mesofílica. Fuente: (Carrington, 2001)

Intervalo entre alimentaciones (horas)	Tiempo de retención en el digestor 12 días	Tiempo de retención en el digestor 15 días
2,4	0,61	0,69
24	2,04	2,10
72	4,01	4,18

Estas cifras muestran que el aumento del período de retención (TRH) no aumenta proporcionalmente la reducción de los patógenos.

La supervivencia de los patógenos en los fangos, aplicado en el suelo, depende principalmente de las condiciones ambientales, el pH, la humedad, el tiempo de retención de tratamiento de los fangos y las características de los organismos presentes. Con respecto a los microorganismos indicadores que destaca la Comisión Europea en recomendaciones y normas de calidad se pueden observar las diferentes condiciones ambientales en las que se ve favorecido su crecimiento a continuación (Comisión Europea, 2001):

Clostridium spp. Las condiciones que favorecen el crecimiento y la producción de toxinas de *Clostridium spp* son: Alta cantidad de proteínas, baja concentración de sales, pH ligeramente ácido o alcalino y temperaturas entre 3 y 50 °C

Escherichia coli. Puede sobrevivir en suelos contaminados hasta 20 meses. Además, puede sobrevivir durante largos períodos en las hojas y raíces de los cultivos. Las hojas más tiernas ofrecen un hábitat mejor que las maduras, y las hojas con mayores niveles de nitrógeno o las hojas y las frutas acelerando la multiplicación de la *Escherichia coli* y prolongando su supervivencia.

Salmonella spp. El tiempo de supervivencia de *Salmonella spp* en el suelo puede variar entre 15 a 280 días. Por ello se recomienda realizar tanto análisis de presencia como la cuantificación del patógeno *Salmonella spp* en el suelo para definir el tiempo de permanencia y la concentración en la que pueda llegar a convertirse en un problema de salud pública.

Tal y como se ha comentado en la memoria de este trabajo, existen otros microorganismos potenciales de riesgo, los cuales se están empezando a utilizar como indicador patógeno, como es el caso de los Enterococos.

ANEXO 2: PLANTAS PILOTO Y EDAR TUDELA

En este anexo se amplía la información respecto al campo de estudio que se ha comentado en el apartado 3.2 de este mismo trabajo (NILSA).

PLANTAS PILOTO ANAEROBIAS (MESÓFILO Y TERMÓFILO)

El fango de alimentación a las plantas piloto ha sido el fango real que produce la EDAR de Tudela, el cual es almacenado en un tanque realizado en poliéster con un diámetro de 2.35 m y una altura de 2 m. La agitación/aireación del tanque de poliéster se ha realizado mediante un “jet”. Este aparato consta de una bomba que coge el fango por su parte inferior y lo expulsa a gran velocidad horizontalmente, creando un efecto venturi por el que entra aire de forma perpendicular al flujo de fango. El aire y el fango se mezclan y salen por las trompetas. El jet funciona habitualmente controlado por un autómata. El régimen de funcionamiento que sigue son 15 segundos funcionando y 200 parado. Los digestores se cargan una vez al día.

Los digestores son plantas gemelas, ambos están realizados en acero inoxidable con un material aislante adicional para minimizar las pérdidas de temperatura a través de las paredes del digestor y recubiertos con láminas de aluminio para protegerlos de las inclemencias climatológicas. Uno de ellos opera en rango de temperatura mesófilo (35°C) y el otro, en rango termófilo (55°C). El diámetro de los tanques es de 1.30 m y la altura, de 3 m. La salida del fango de los tanques se realiza por rebose mediante un tubo sumergido unos 20 cm en el fango del digestor. Respecto al volumen útil de los digestores el mesófilo tiene un volumen de 2.78 m³ y el termófilo de 2.75 m³. En la figura A2-1 se puede observar un esquema de estos equipos.

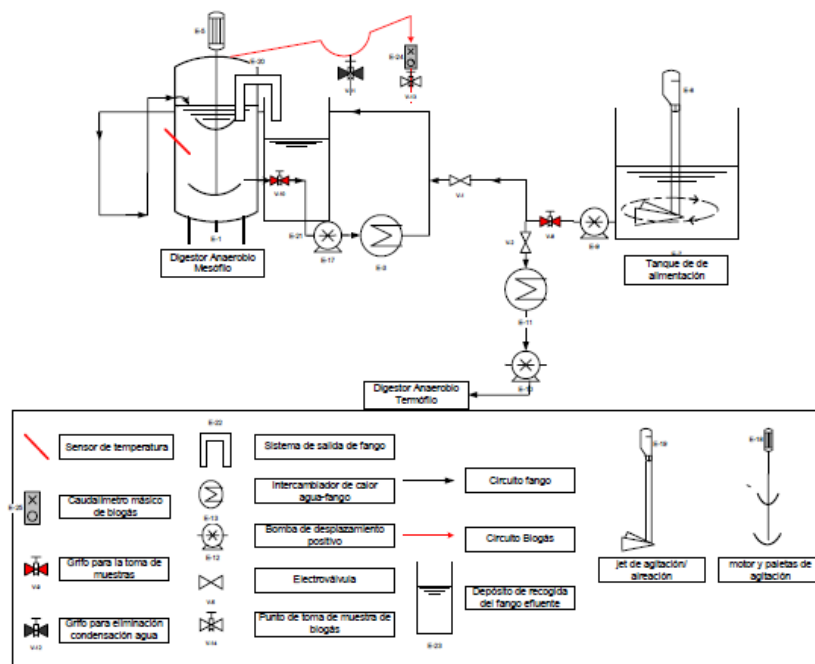


Figura A2-1. Esquema de uno de los digestores pilotos

Cada tanque cuenta con una agitación mecánica que funciona en continuo. La agitación se realiza mediante un eje de acero inoxidable, girado por un motor, en el que se acopla un par de hélices también de acero inoxidable, una de ellas a la altura de la parte inferior del reactor y la otra a la altura del nivel del fango en los digestores para evitar la formación de espumas. Los agitadores están acoplados a los digestores mediante un sistema de cierre hidráulico para evitar que se produzcan fugas del biogás generado o que entre aire del exterior.

Cada digestor cuenta con una recirculación en continuo del fango que se lleva a cabo por una bomba de desplazamiento volumétrico. La recirculación sale por la parte inferior del tanque, pasa a través de un intercambiador de calor agua-fango y retorna al digestor por la parte superior. Cada tanque cuenta con un intercambiador de calor. Este sistema, además de mantener la temperatura interior del digestor aporta una agitación adicional a la agitación mecánica. Para mantener la temperatura del interior del digestor mesófilo y termófilo a 35°C y 55°C respectivamente, el fango se calienta en los intercambiadores de calor. El agua de los intercambiadores de calor proviene de una caldera de resistencias eléctricas. El calentamiento de uno u otro digestor se controla por un autómata mediante la apertura y cierre de las electroválvulas del circuito de agua. La apertura y cierre de estas electroválvulas (hay una para cada intercambiador) permite o impide el paso del agua caliente de la caldera al intercambiador de calor del digestor mesófilo o termófilo.

PLANTA PILOTO ATAD

El digestor piloto ATAD es un tanque completamente agitado (CSTR) fabricado de acero inoxidable, cuyo volumen útil para tratar el fango es aproximadamente de 10 metros cúbicos.

El digestor ha sido diseñado para trabajar a altas temperaturas que tienen lugar en el proceso (60°C). Para minimizar las pérdidas de calor, la superficie de acero del digestor se ha recubierto con una capa de 10 cm de material aislante.

El sistema de aireación empleado es el de aspiración de aire por venturi, según el diseño patentado por NILSA. Mediante este diseño, además de airear, se puede controlar el nivel de espumas para la correcta operación del digestor por adecuación del caudal de aire externo.

Para conseguir las condiciones requeridas para la higienización del fango, cada ciclo de operación del digestor se divide en tres fases:

- Fase de descarga de fango: Durante esta fase se extrae del reactor el volumen de fango tratado correspondiente al tiempo de retención hidráulico elegido.
- Fase de carga de fango: En una segunda fase se introduce el fango crudo en el reactor y se mezcla con el contenido restante del ciclo anterior produciéndose un descenso en la temperatura inferior por estar el fango crudo a una temperatura mucho menor.
- Fase de calentamiento: Durante esta última fase el fango se mantiene en batch (sin carga ni descarga del fango del digestor) a una temperatura superior a 55°C durante al menos 20 horas.

Al tratarse de un tanque completamente agitado, la descarga y carga de fango se realizan en dos fases diferentes para evitar que parte del fango alimentado salga del digestor sin tratar ni higienizar.

Por otro lado, la EDAR de Tudela está compuesta por dos líneas, la línea de tratamiento de agua y la línea de tratamiento de fango. La EDAR de Tudela recibe aguas de origen doméstico e industrial asimilables a urbanas. El cauce receptor es el río Ebro. La población censada es de 38970 habitantes y la carga tratada es de 82500 habitantes equivalentes. En la Figura A2-2 se puede ver un esquema de la planta.

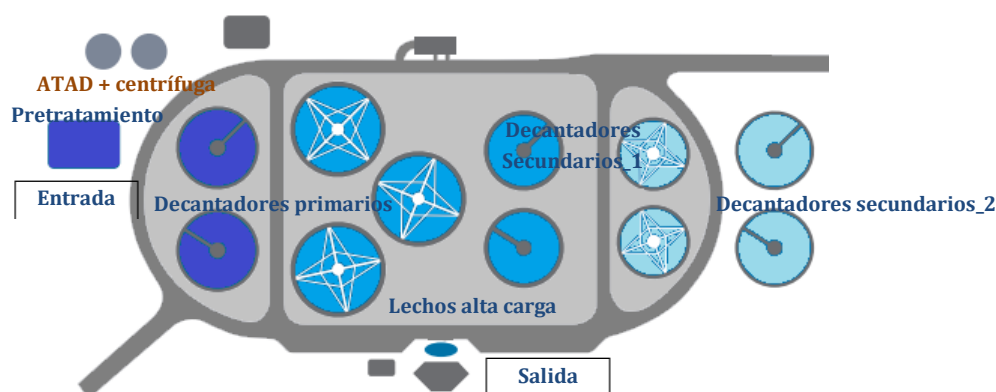


Figura A2-2. Dibujo esquemático de la EDAR de Tudela

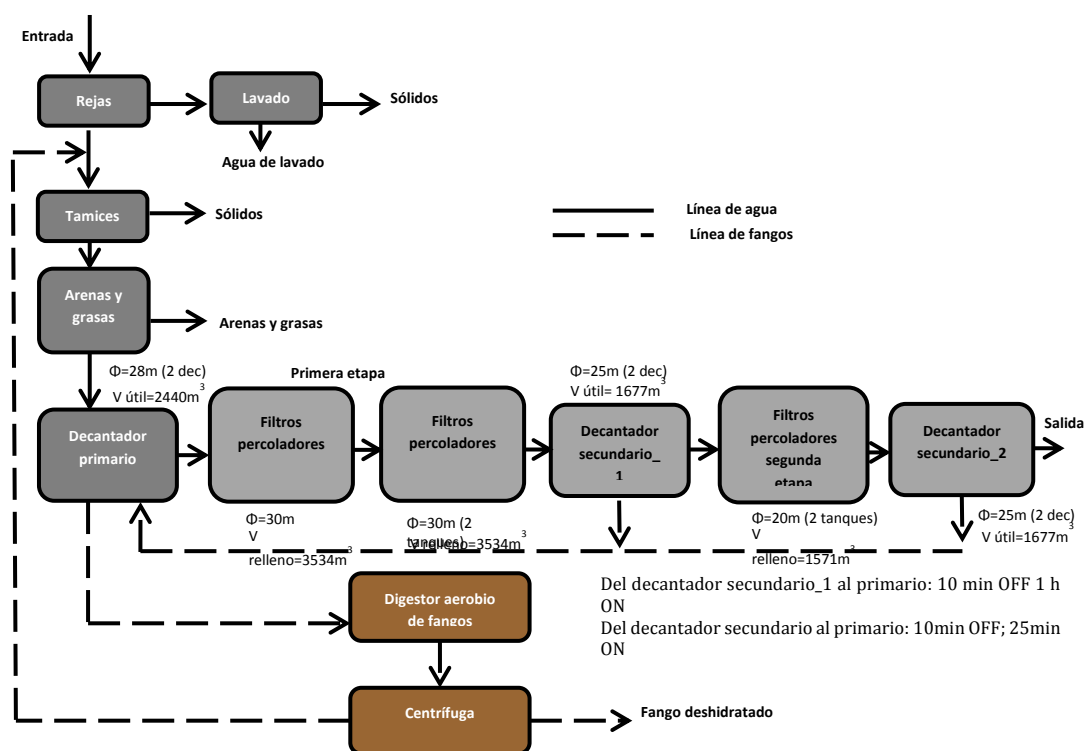


Figura A2-3. Etapas de la EDAR de Tudela.

DATOS PERIODOS ESTACIONARIOS

Se muestran los datos que obtenidos en los diferentes periodos estacionarios a diferentes TRH para cada una de las plantas. Los datos que recopilados son los que han sido explicados en el apartado 3.2. En las figuras de A2-4 a A2-17 se muestran los datos para las plantas piloto mesófila y termófila, para los diferentes TRH y periodos estacionarios, y para cada una de las variables estudiadas. En concreto, son los parámetros de DQOf, amonio, SV, ST y AGV.

TRH de mesófilo 10 días y termófilo 5 días

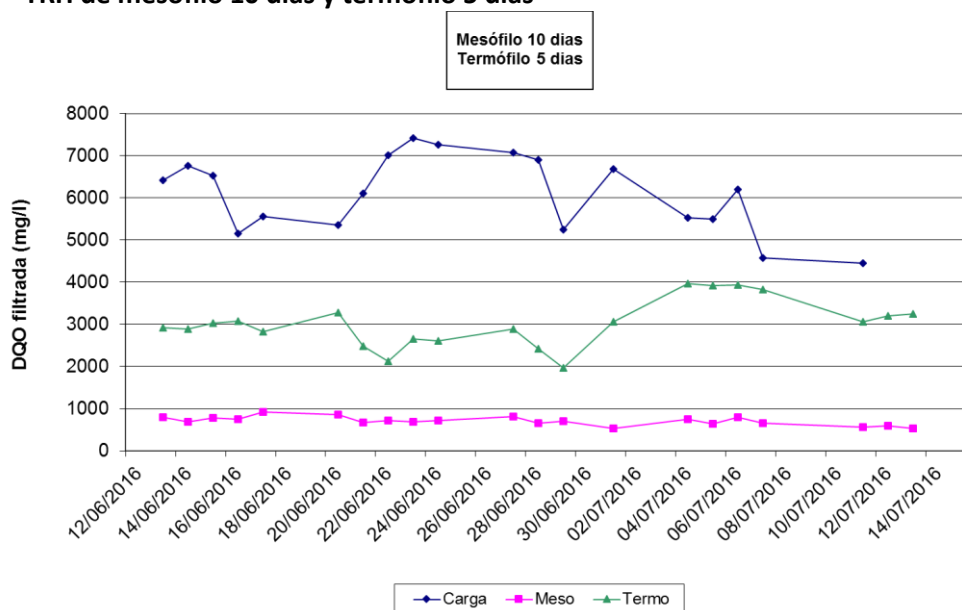


Figura A2-4- DQO filtrada para TRH 10 y 5 días en mesófilo y termófilo

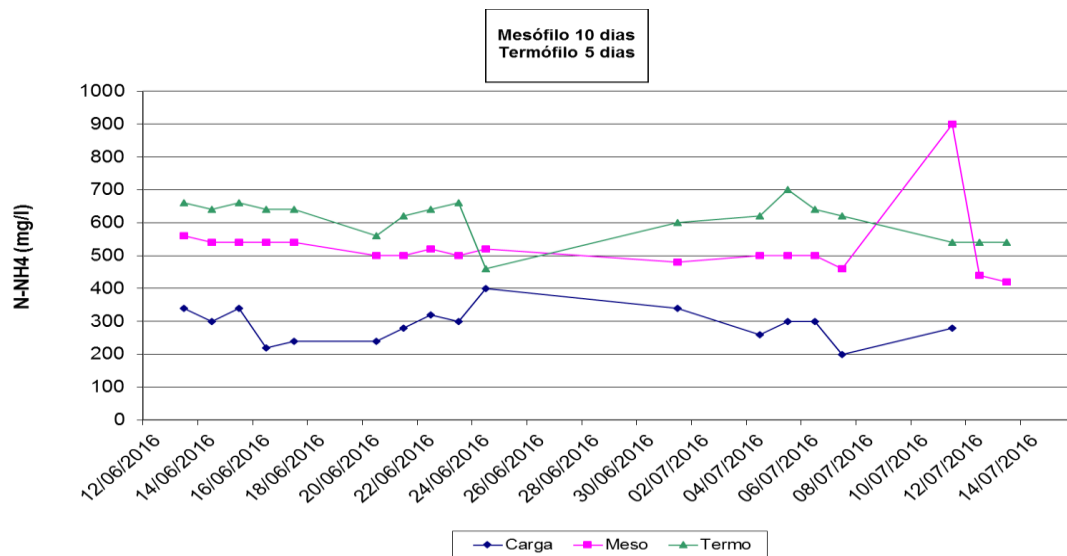


Figura A2-5. Amonio para TRH 10 y 5 días en mesófilo y termófilo

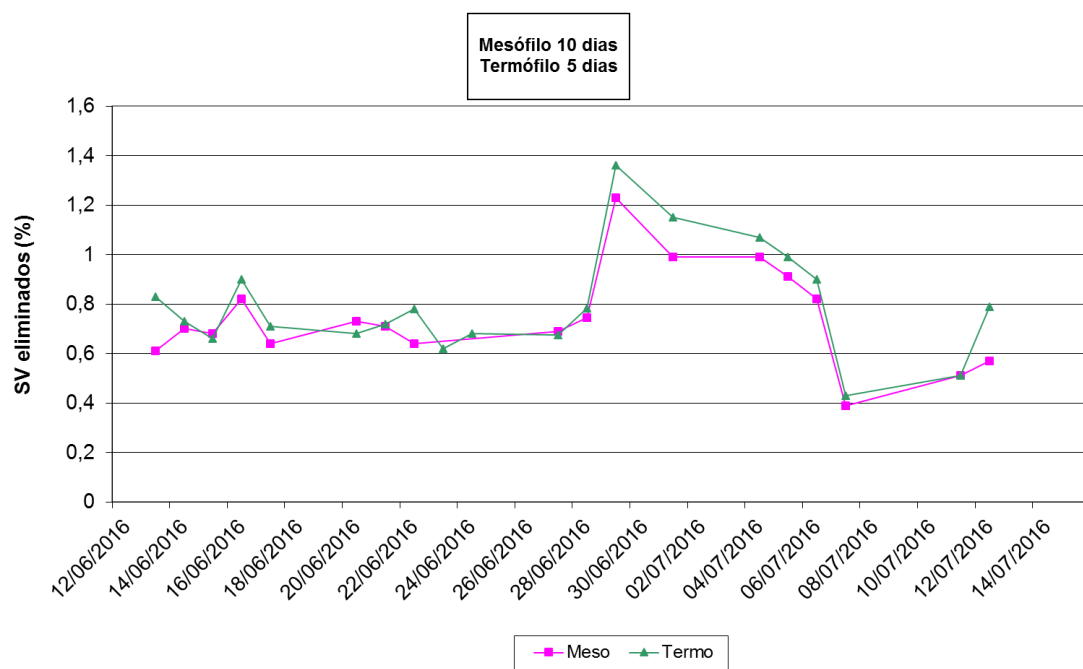


Figura A2-6. Sólidos volátiles eliminados para TRH 10 y 5 días en mesófilo y termófilo

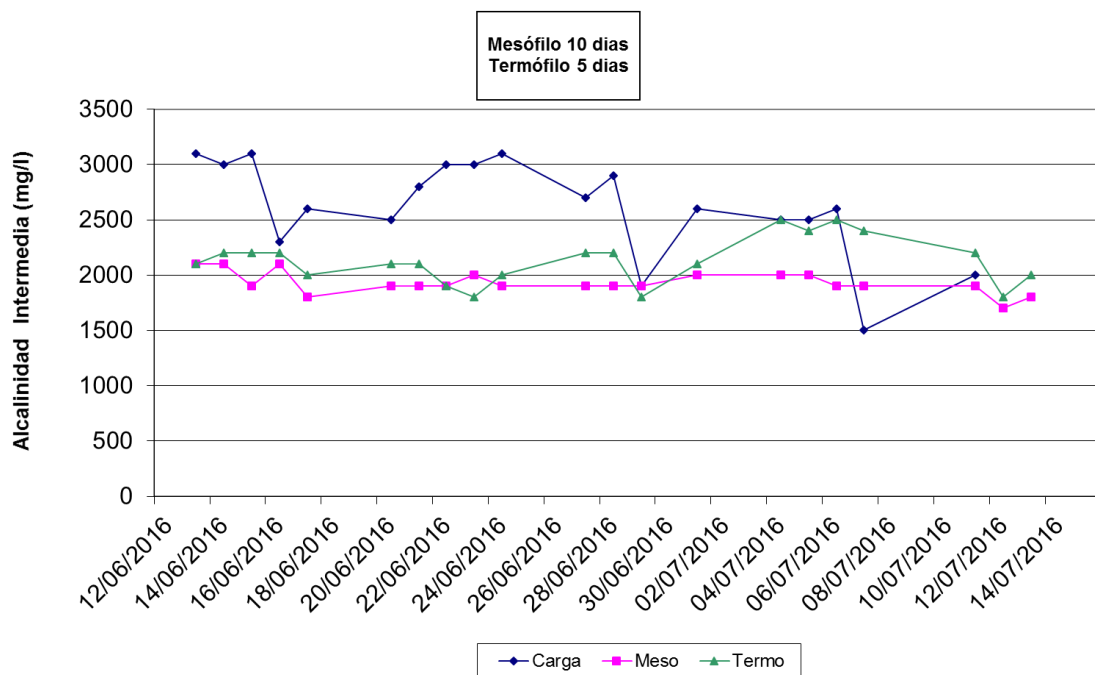


Figura A2-7 AGV para TRH 10 y 5 días en mesófilo y termófilo

TRH de mesófilo 12 días y termófilo 7 días

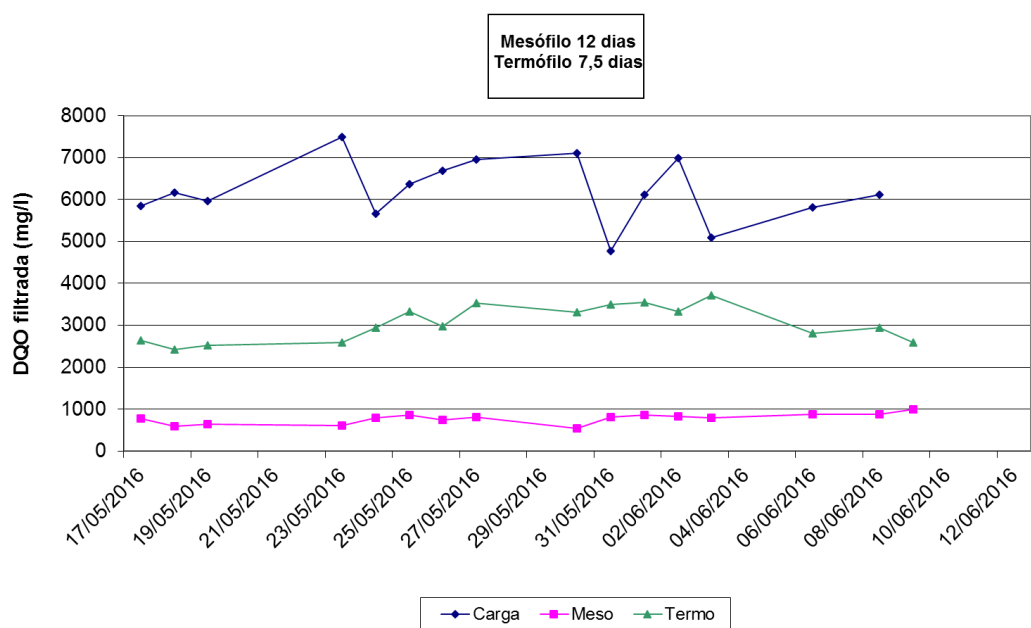


Figura A2-7. DQO filtrada para TRH 12 y 7 días en mesófilo y termófilo

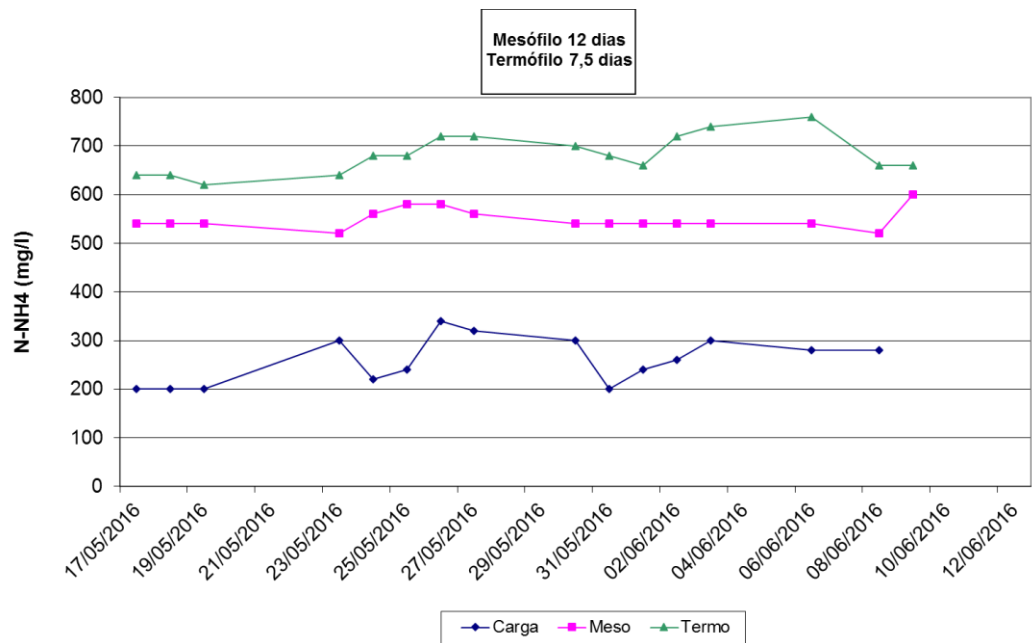


Figura A2-8. Amonio para TRH 12 y 7 días en mesófilo y termófilo

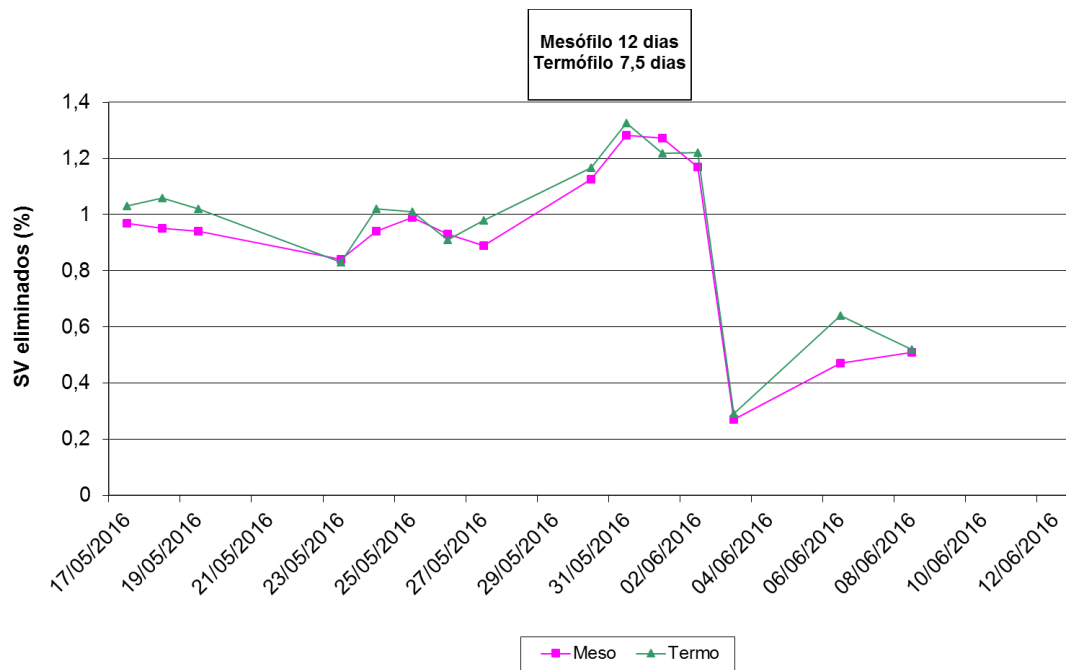


Figura A2-9. Sólidos volátiles eliminados para TRH 12 y 7 días en mesófilo y termófilo

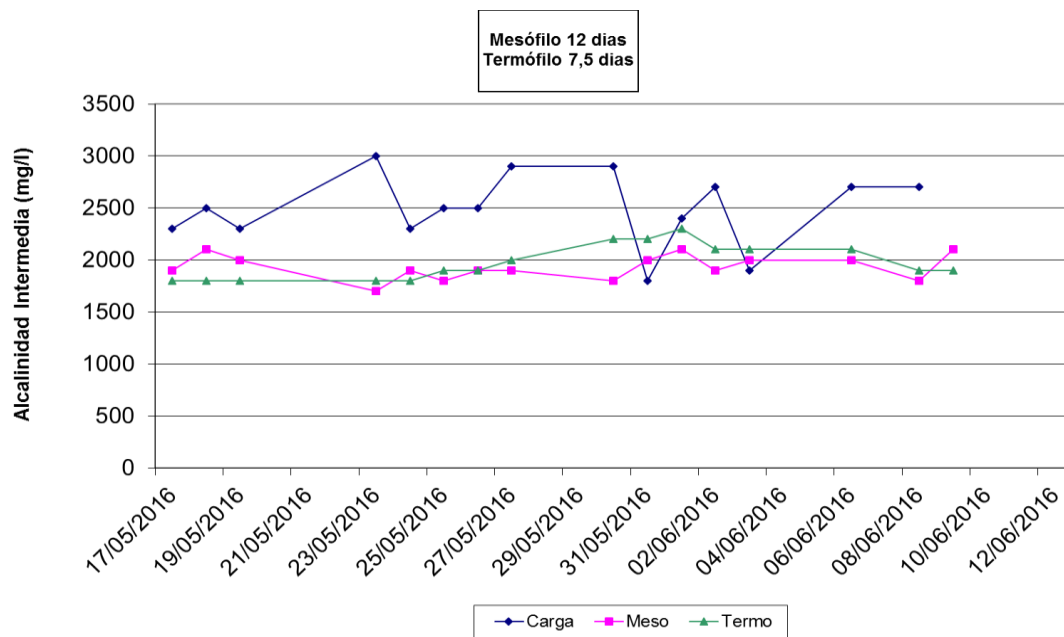


Figura A2-10 AGV para TRH 12 y 7 días en mesófilo y termófilo

TRH de mesófilo 15 días y termófilo 10 días

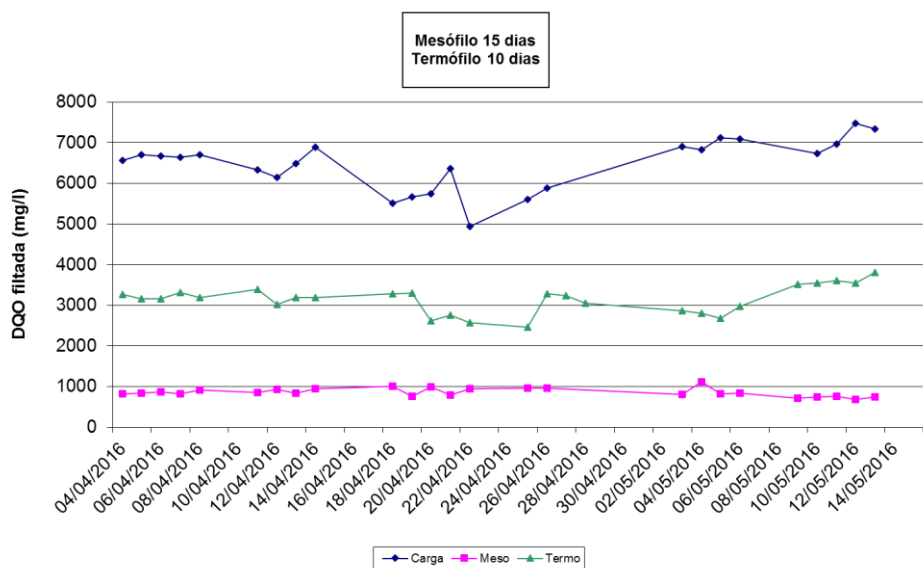


Figura A2-11. DQO filtrada para TRH 15 y 10 días en mesófilo y termófilo

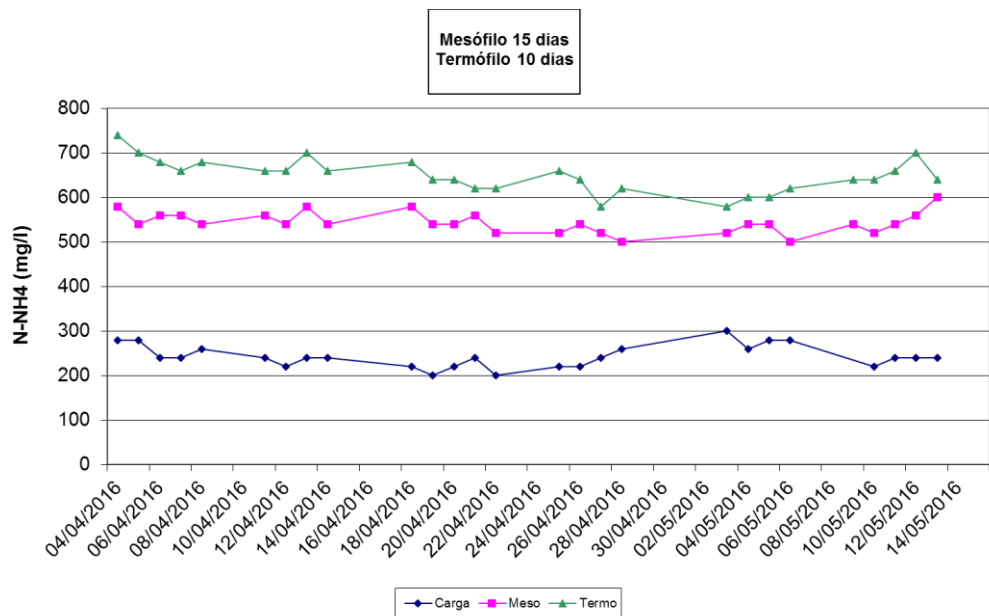


Figura A2-12. Amonio para TRH 15 y 10 días en mesófilo y termófilo

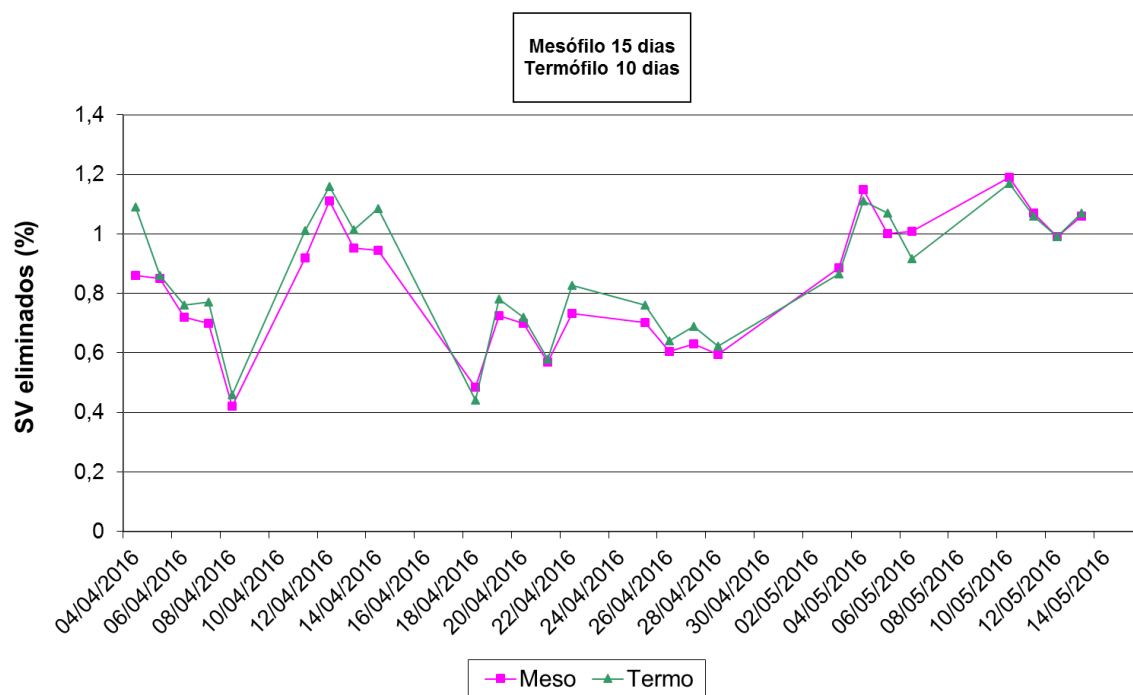


Figura A2-13. Sólidos volátiles eliminados para TRH 15 y 10 días en mesófilo y termófilo

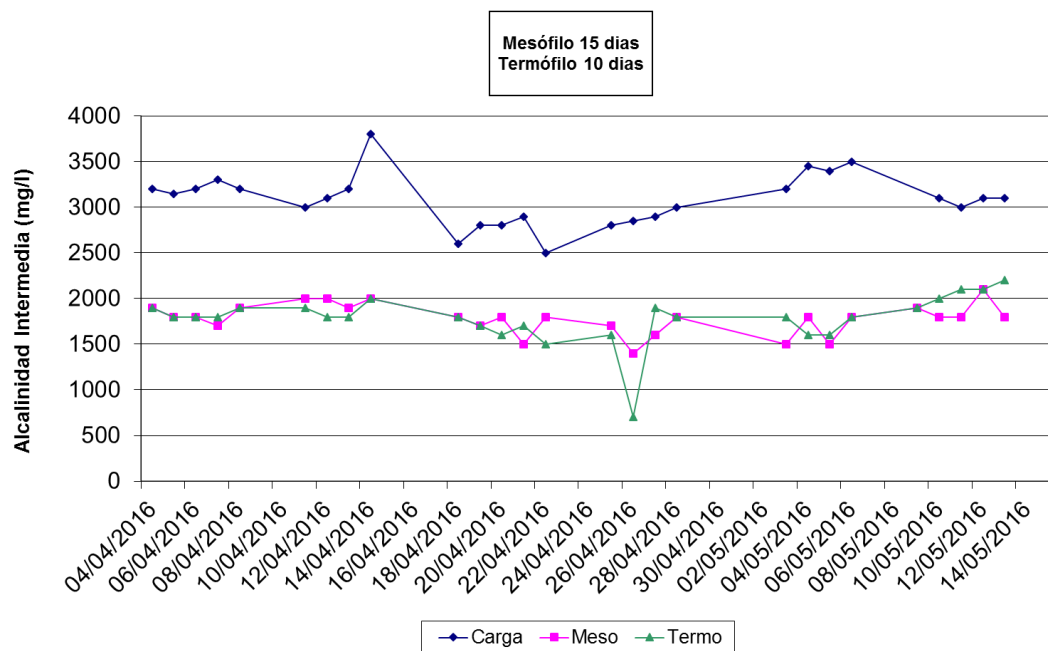


Figura A2-14. AGV para TRH 15 y 10 días en mesófilo y termófilo

TRH de mesófilo 20 días y termófilo 15 días

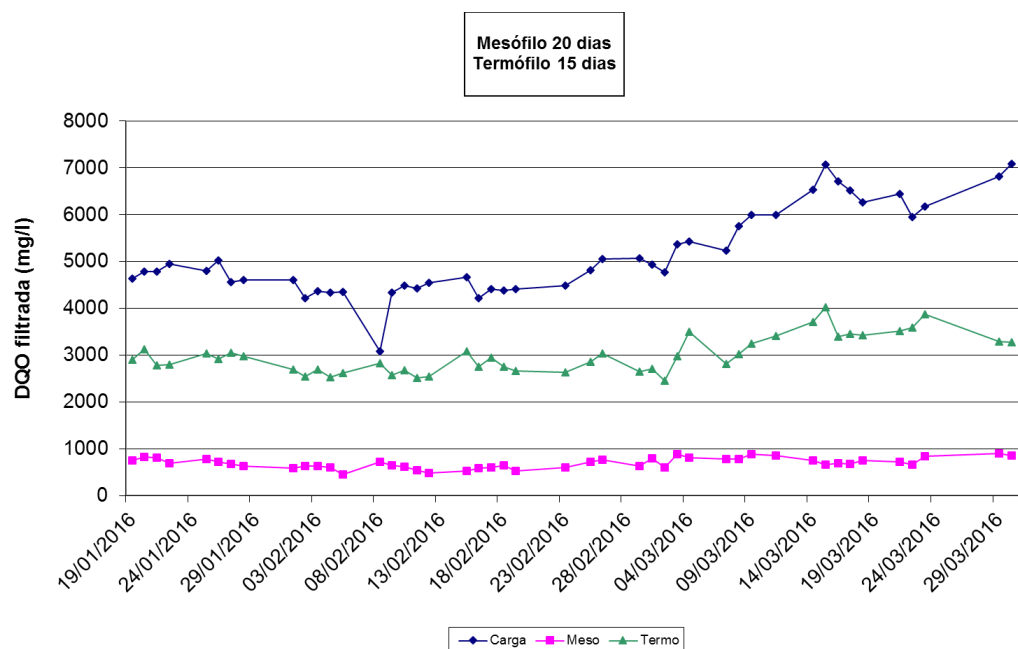


Figura A2-14. DQO filtrada para TRH 20 y 15 días en mesófilo y termófilo

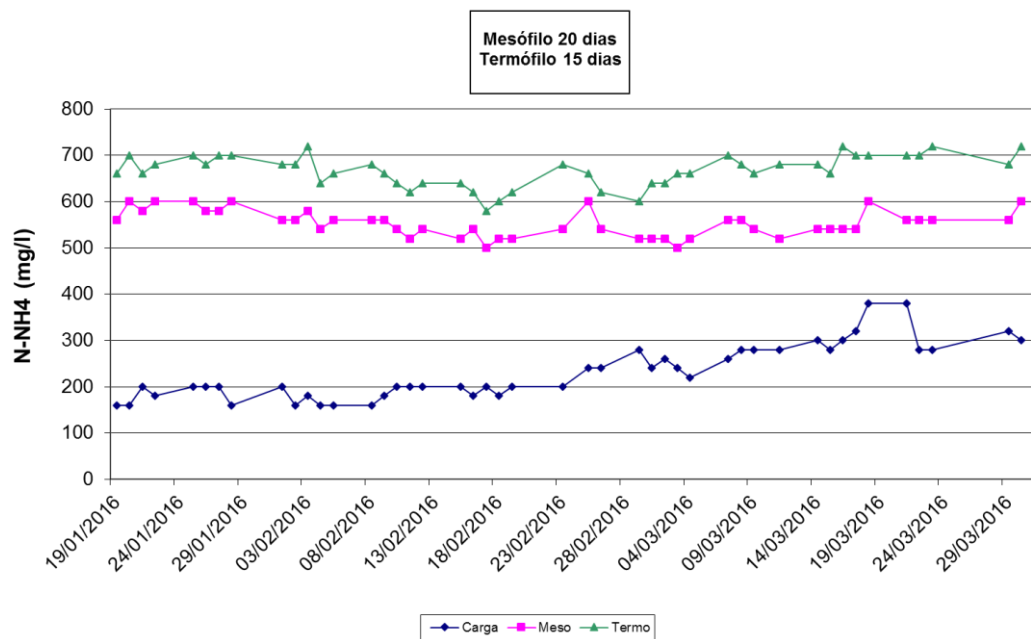


Figura A2-15. Amonio para TRH 20 y 15 días en mesófilo y termófilo

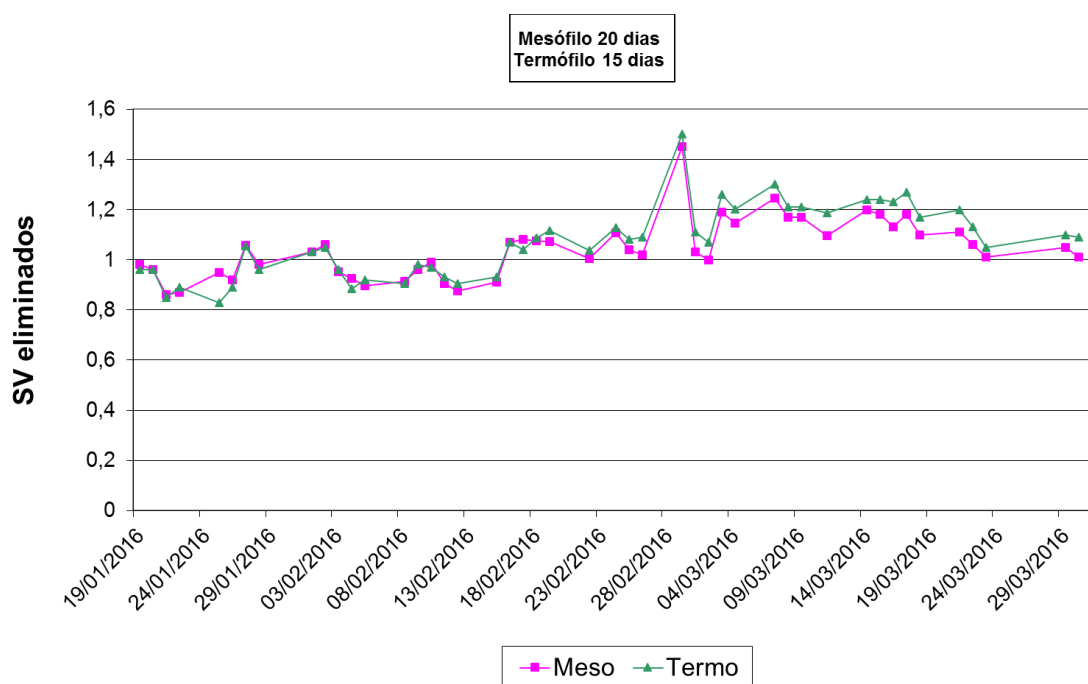


Figura A2-16. Sólidos volátiles eliminados para TRH 20 y 15 días en mesófilo y termófilo

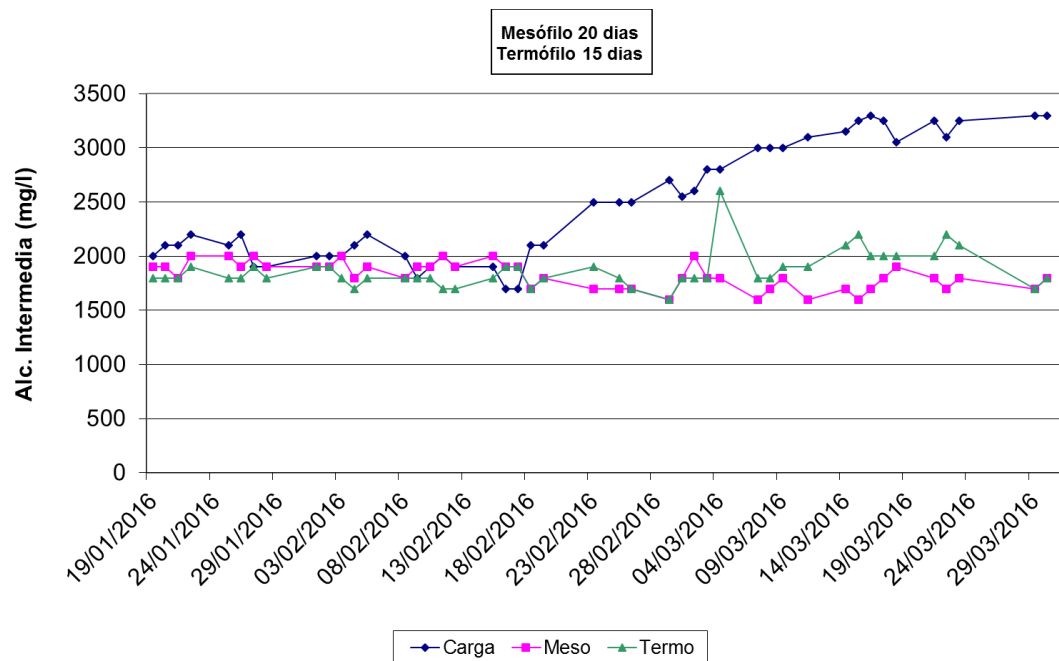


Figura A2-17. AGV para TRH 20 y 15 días en mesófilo y termófilo

Para finalizar, de las Figuras A2-18 a A2-29 se muestran los parámetros de control para cada TRH para la planta de ATAD.

ATAD TRH de 5 días

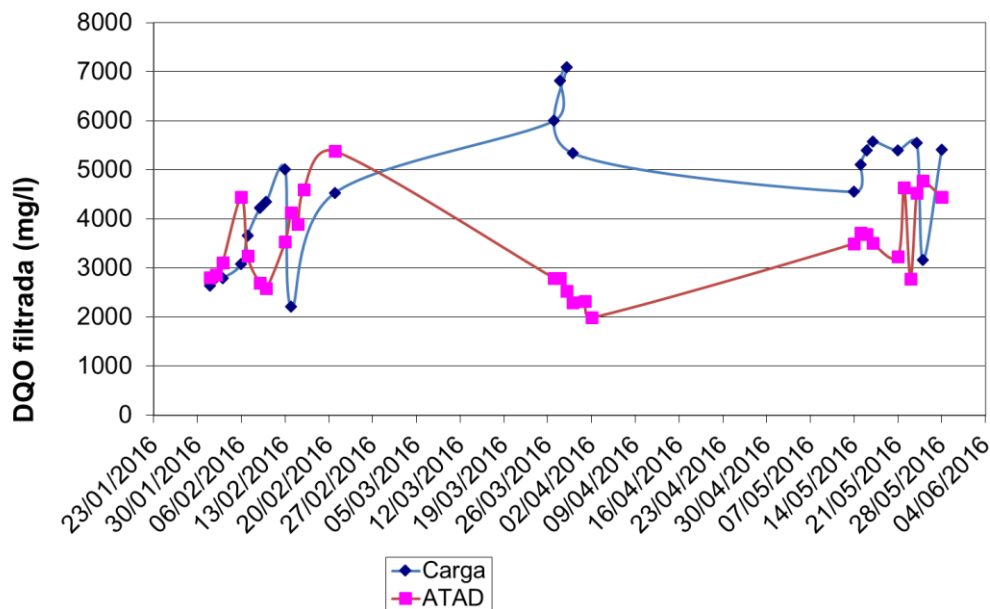


Figura A2-18. DQO filtrada para ATAD 5 días

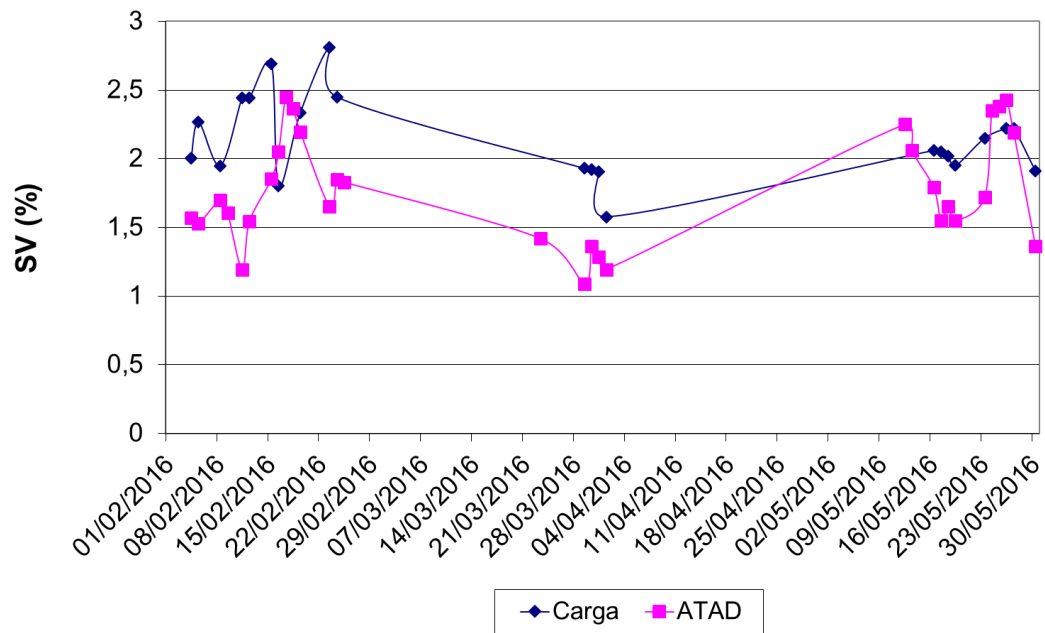


Figura A2-19. Sólidos volátiles para ATAD 5 días

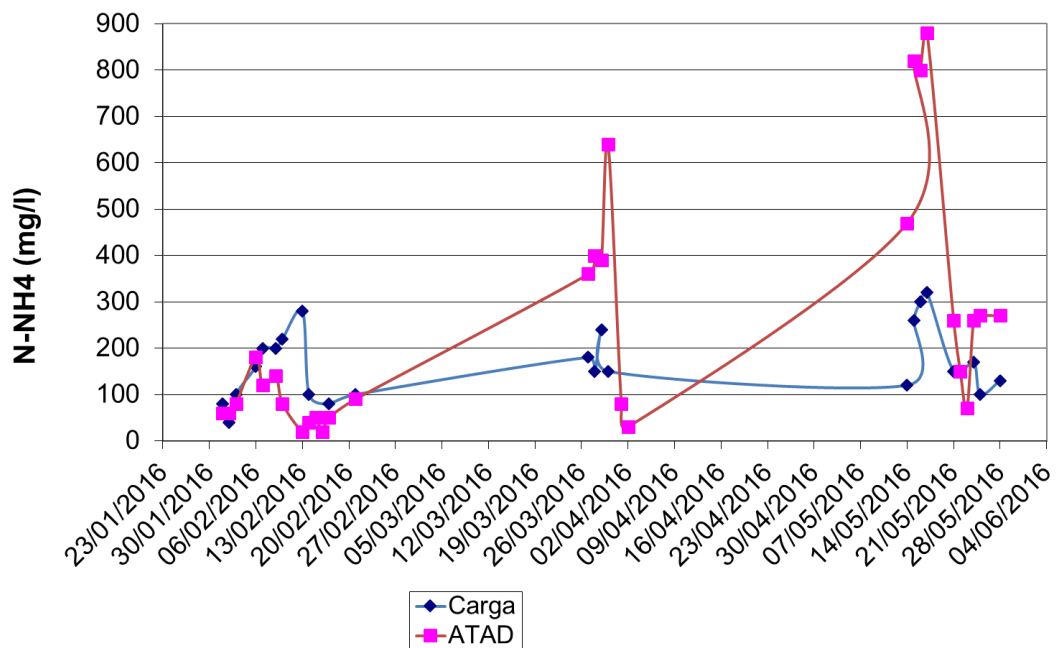


Figura A2-20. Amonio para ATAD 5 días

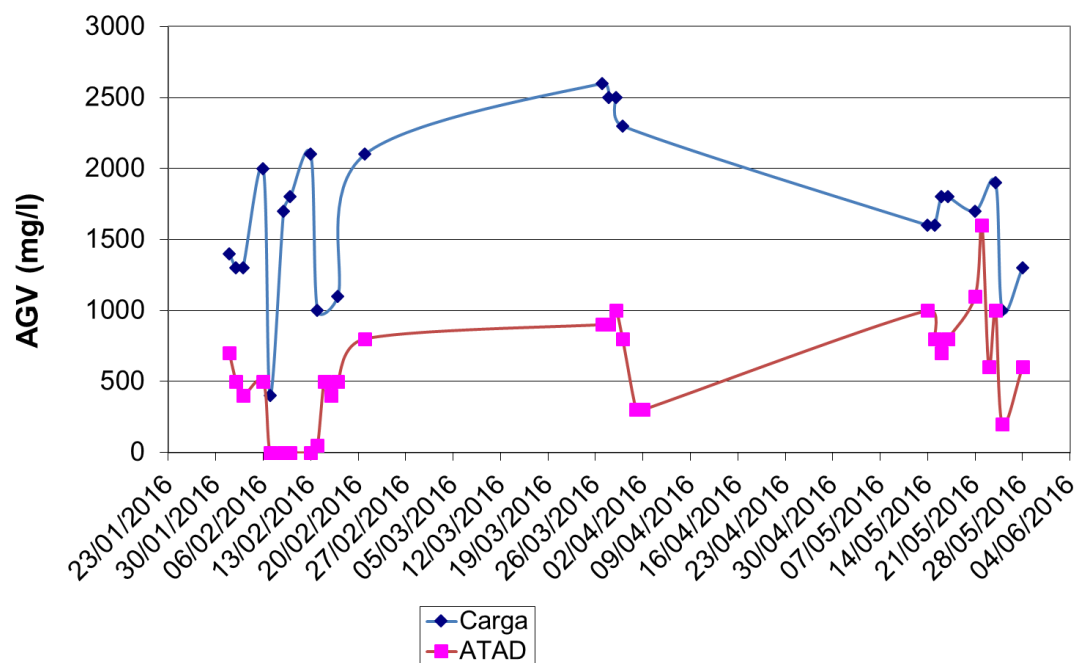


Figura A2-21. AGV para ATAD 5 días

ATAD TRH de 10 días

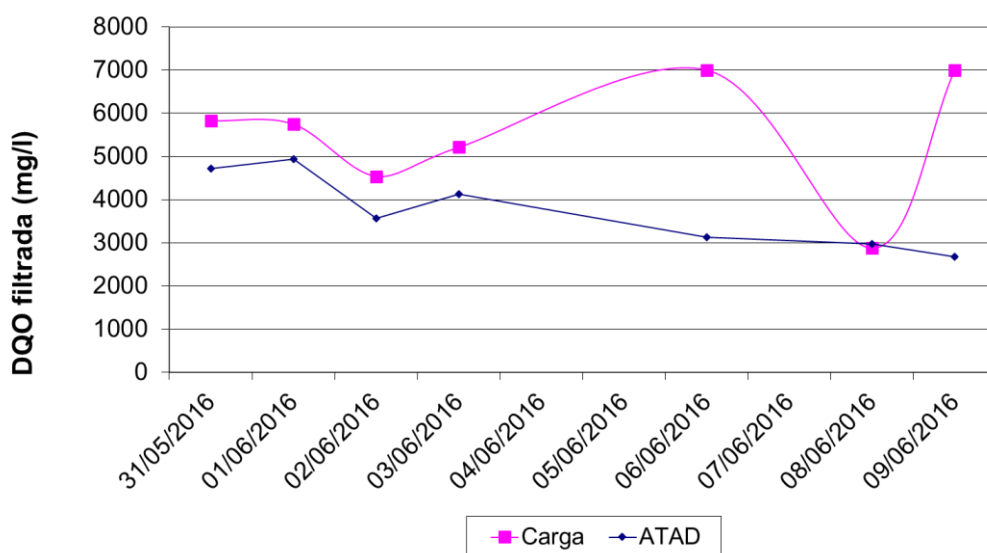


Figura A2-22. DQO filtrada para ATAD 10 días

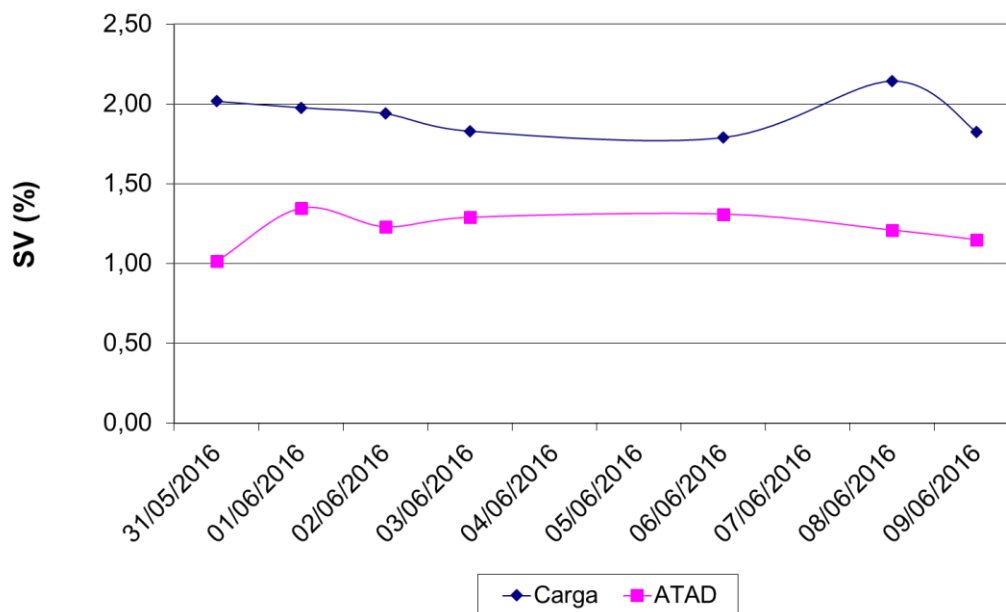


Figura A2-23. Sólidos volátiles para ATAD 10 días

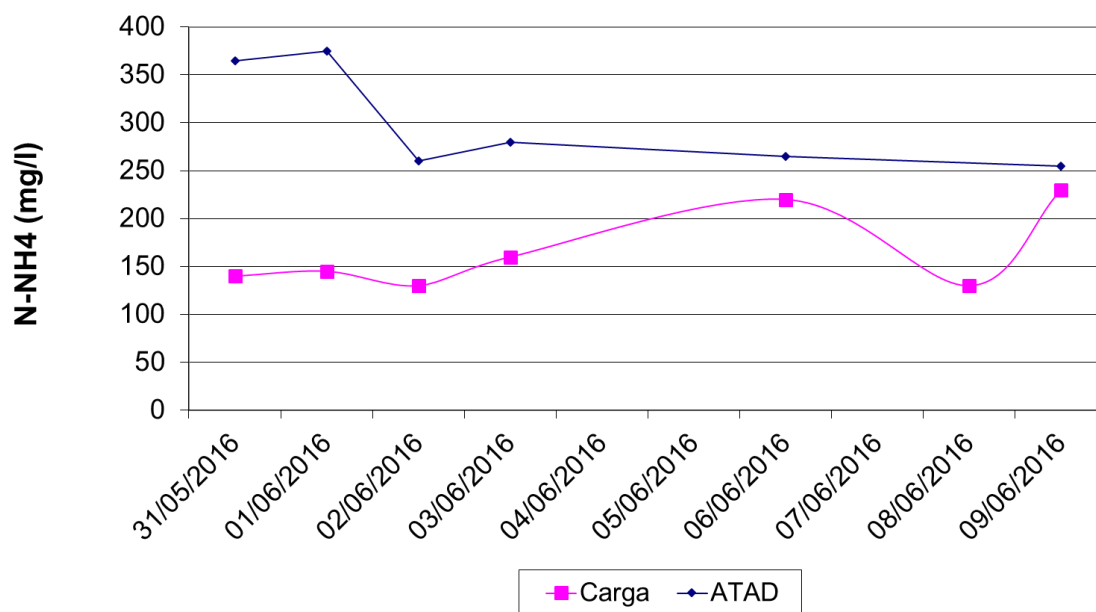


Figura A2-24. Amonio para ATAD 10 días

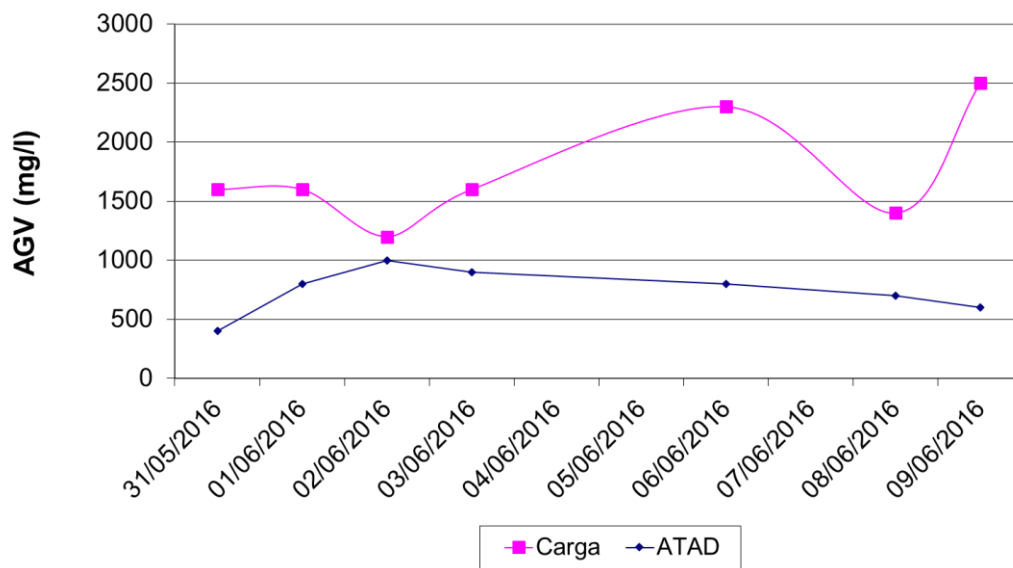


Figura A2-25. AGV para ATAD 10 días

ATAD TRH de 15 días

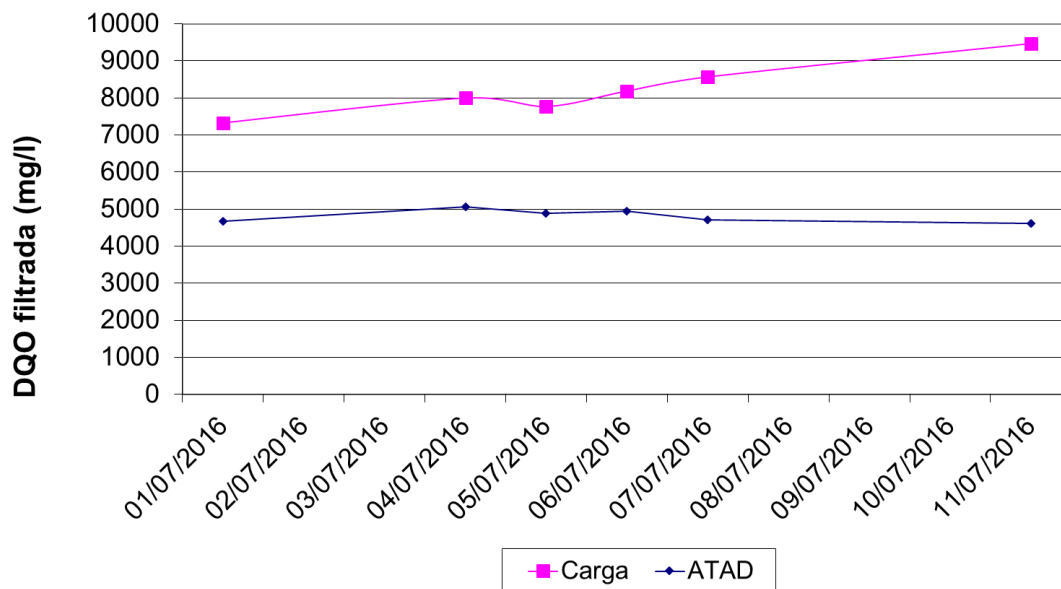


Figura A2-26. DQO filtrada para ATAD 15 días

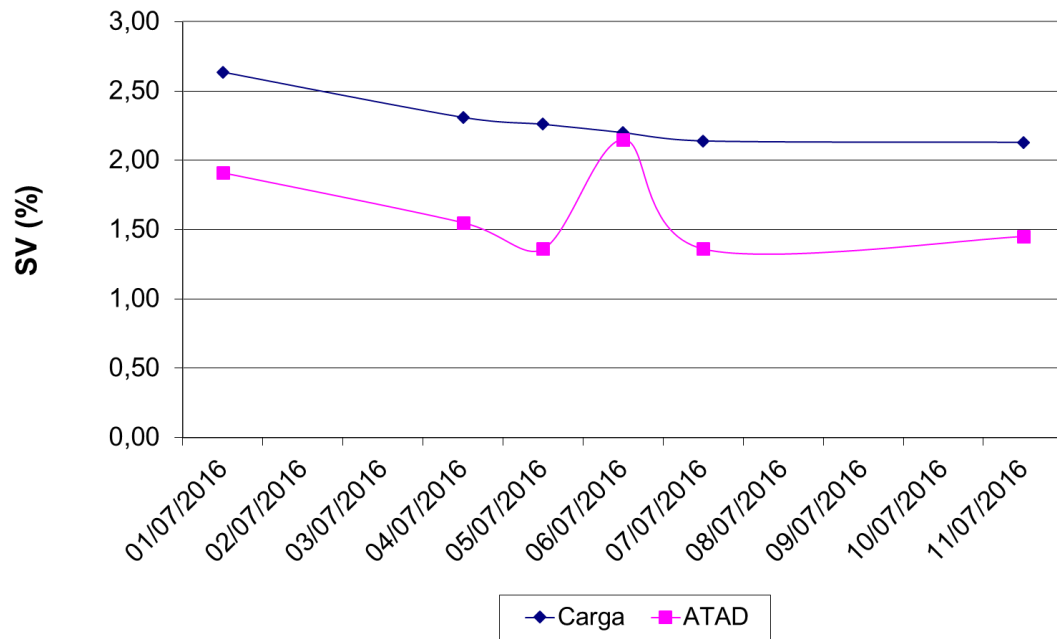


Figura A2-27. Sólidos volátiles para ATAD 15 días

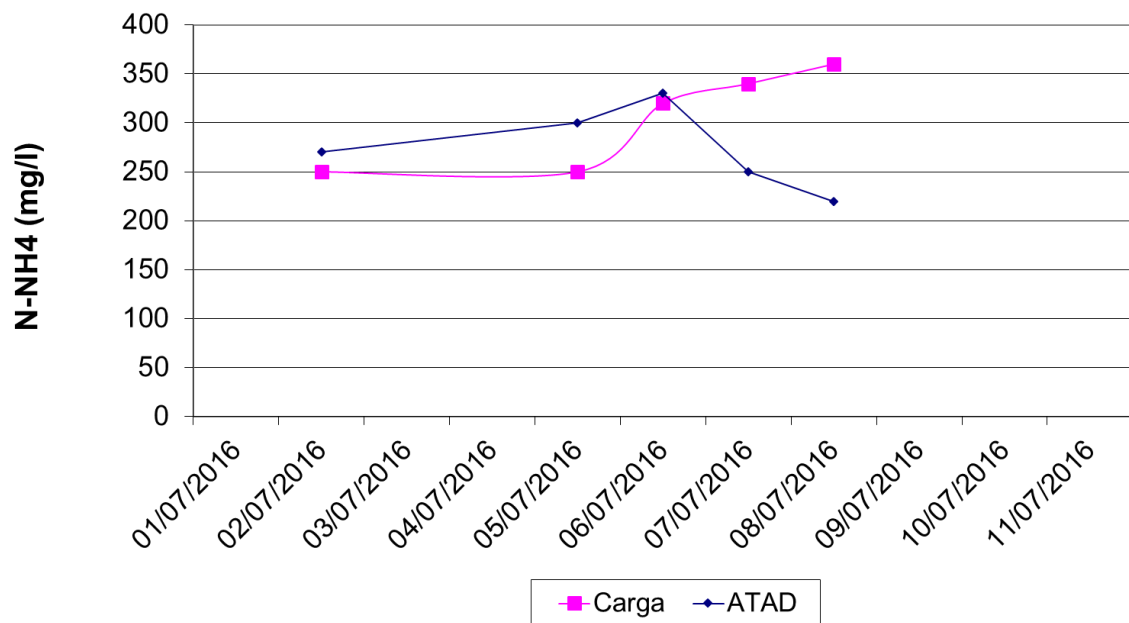


Figura A2-28. Amonio para ATAD 15 días

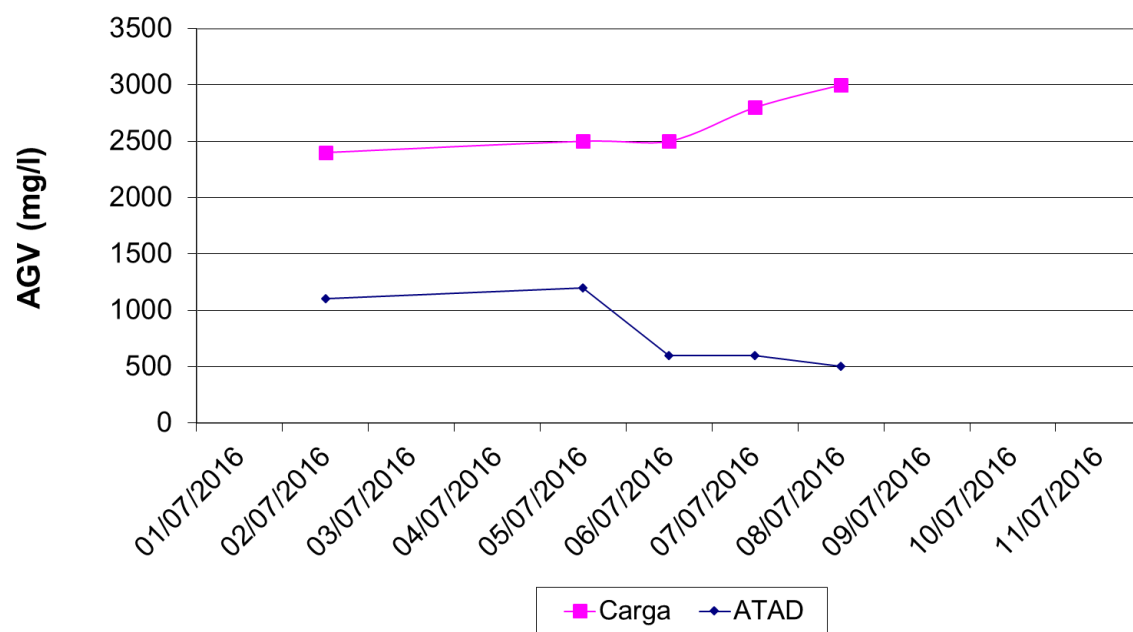


Figura A2-29. AGV para ATAD 15 días

ANEXO 3: METODOLOGÍA

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO DE *E. FAECALIS* Y *E. COLI*

El medio utilizado para el cultivo de *Enterococcus* sp. es el agar selectivo Slanetz y Bartley (Scharlau) (Tabla A3-1). La preparación de este agar conlleva, después de su esterilización y enfriamiento a 50 °C, la adición de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) en una proporción de 10 mL por cada litro de medio base. La solución TTC indica la actividad biológica de los enterococos, ya que el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (incoloro) se reduce a trifenilformazan (rojo), de manera que las colonias adquieren un color granate característico. Una vez añadido el aditivo, se vierte un pequeño volumen en placas estériles y una vez enfriado, el medio se solidifica y se mantiene guardado en nevera hasta su utilización.

Tabla A3-1 Ingredientes del medio SB (APHA, et al., 2009)

Ingredientes	Concentración gL ⁻¹
Triptosa	20
Extracto de levadura	5,0
Glucosa	2,0
Hidrogenofosfato de dipotasio	4
Azida de sodio (NaN ₃)	0,4
Cloruro de trifeniltetrazolio	0,1
Agar	10

Por otro lado, para la etapa de confirmación, tal y como se ha comentado en el apartado 3.1.1, se han utilizado placas con el medio de cultivo Bile esculin azide agar (BEA), cuyos ingredientes se observan en la Tabla A3-2.

Tabla A3-2. Ingredientes del medio BEA (APHA, et al., 2009)

Ingredientes	Concentración gL ⁻¹
Extracto de levadura	5,0
Proteína peptona No. 3	3,0
Tryptona	17,0
Oxgall	10,0
Esculina	1,0
Citrato de amonio férrico	0,5
Cloruro de sodio	5,0

Estos ingredientes vienen en sobres preparados (Sharlab). Para su elaboración, se vierte un sobre en medio litro de agua destilada, y tras llevarlo a ebullición se lleva a esterilización y enfriamiento a 50 °C.

Los tubos preparados con el medio de cultivo relativo al método de análisis de Multiple-Tube Technique for *Enterococcus* se adquieren preparados (Sharlab). Sus ingredientes se observan en la Tabla A3-3.

Tabla A3-3 Ingredientes del medio Azide dextrose broth (APHA et al., 2009)

Ingredientes	Concentración gL⁻¹
Extracto de carne	4,5
Triptona o polipeptona	15,0
Glucosa	7,5
Cloruro de sodio	7,5
Azida de sodio (NaN ₃)	0,2

Tal y como se ha comentado en el apartado 3.2 de la memoria se disponen de datos de concentración de *E.coli* para diferentes medios de cultivo y métodos de análisis. En concreto, se han utilizado el agar TBX (tabla A3-5) de acuerdo con la norma UNE EN ISO 16649-1:2013, así como el agar cromogénico CCA (tabla A3-4) y el agar MacConkey (tabla A3-6).

Tabla A3-4 Ingredientes del medio agar CCA (ISO 9308-1:2014)

Ingredientes	Concentración gL⁻¹
Digerido Enzimático de Caseína	1,00
Extracto de Levadura	2,00
Cloruro de Sodio	5,00
Fosfato Monosódico	2,20
Fosfato Disódico	2,70
Triptófano	1,00
Piruvato Sódico	1,00
Tergitol®7	0,15
Sorbitol	1,00
6-Cloro-3-indoxil β-D-galactopiranosido	0,20
5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-glucuronido	0,10
IPTG	0,10
Agar	13,00
pH: 6,8 ±0,2	

Tabla A3-5 Características del medio agar TBX(ISO 16649-1:2013)

Ingredientes	Concentración gL⁻¹
Sales biliares nº3	1,5
Tryptona o polipeptona	20,0
BCIG	0,75
Agar	9

Tabla A3-6 Características del medio agar MacConkey(CM 0109)

Ingredientes	Concentración gL⁻¹
Digerido pancreático de gelatina	17,0
Digerido pancreático de caseína	1,5
Digerido péptico de tejido animal	1,5
Lactosa	10,0
Mezcla de sales biliares	1,5
Cloruro de sodio	5,0
Agar	13,5
Rojo neutro	0,3
Cristal violeta	0,01
Digerido pancreático de gelatina	17,0

MÉTODOS DE ANÁLISIS

En este apartado se amplía la información recogida en las normas UNE nombradas acerca de los métodos utilizados para el análisis de *E.faecalis* en fangos.

Método de filtración en membrana

El procedimiento consiste en colocar un filtro de 0,45µm en un equipo de filtración con embudo estéril. Se hace pasar por el embudo de filtración un pequeño volumen de suero fisiológico y a continuación un volumen determinado de muestra. El filtro se coloca con unas pinzas estériles sobre una placa Petri que contiene el medio de cultivo selectivo para las bacterias que se quieren analizar. Con el objetivo de asegurar que el recuento de colonias en las placas sea adecuado se filtran varios volúmenes de varias diluciones. Cada volumen se filtra al menos por triplicado. En la Figura A3-7 se pueden ver fotos del método esquematizado.

En el análisis de enterococos se ha empleado el medio de cultivo SB. Una vez colocado el filtro las placas se introducen en la estufa incubadora el tiempo y temperatura requeridos para cada medio de cultivo (en este caso 48h). Tras el periodo de cultivo se realiza el recuento de las bacterias que dan una coloración positiva para *E.faecalis* en cada medio y los resultados se expresan en UFC/ml de muestra en base húmeda o UFC/g de muestra, si es en base seca.

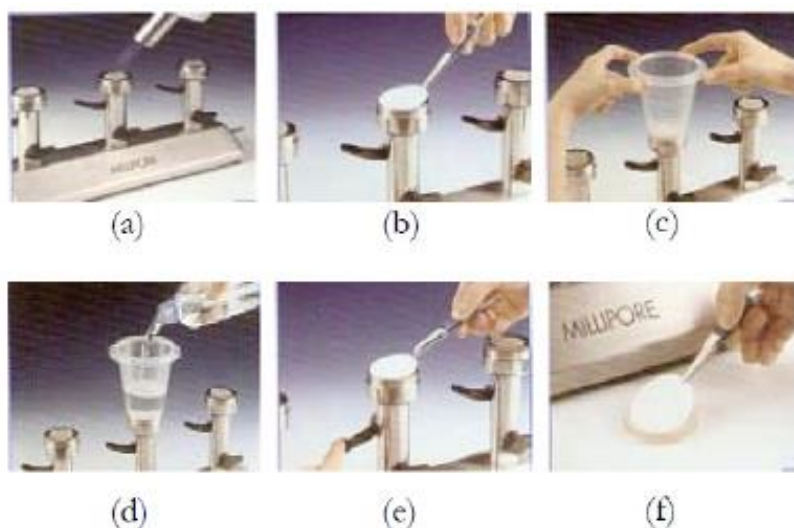


Figura A3-7. Representación pasos método filtración en membrana.

Método de siembra en masa (vertido en palca)

El método de siembra en masa es el establecido en las normas SM 9215B e ISO 16649-2:2001. Se pipetea sobre una placa Petri estéril el volumen deseado de muestra, normalmente entre 20-1000µl, y a continuación se añade el medio de cultivo fundido, mezclando todo de manera homogénea con movimientos circulares y dejando que el agar se enfríe y solidifique. Cada volumen se siembra por triplicado. En este caso, para el análisis de enterococos el medio de cultivo es el SB.

Método de siembra en superficie (placa difusa)

El método de siembra en superficie es el establecido en la norma SM 9215C. Consiste en añadir el volumen de muestra, normalmente entre 20-200µl, a las placas que contienen el medio de cultivo selectivo para la determinación del microorganismo objeto de estudio. La muestra se distribuye por la placa con un asa de vidrio estéril. Cada volumen de muestra se siembra al menos por triplicado. En este caso el medio de cultivo es el SB.

Método del número más probable

El método del Número Más Probable (NMP) es el establecido en las normas SM 9221E, ISO 7251:2005 e ISO 16649-3:2005 aplicable al análisis de aguas y alimentos o muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos. Debido a que los medios de cultivo y procedimientos difieren ligeramente entre las normas consideradas, se denomina NMP_A a la metodología que siguen SM9221E e ISO 7251:2005 para el análisis en aguas y alimentos y NMP_B al procedimiento establecido en la norma ISO 16649-3:2005 para alimentos y muestras ambientales en la producción de alimentos. Para llevar a cabo el

procedimiento se dispone de al menos tres diluciones de la muestra (apartado 3) y entre tres y cinco tubos de cada dilución.

En general, el método del NMP consiste realizar pruebas bioquímicas en serie para detectar y cuantificar el microorganismo objeto de estudio. La densidad microbiológica media se determina con el resultado de los tubos positivos y negativos tras las pruebas bioquímicas y una tabla de probabilidad basada en una distribución de Poisson del Standard Methods y que se muestra en la Figura A3-9.

De los tubos del paso 1 que tras 24 horas de incubación se consideran positivos, se transfiere un pequeño volumen a otro tubo de caldo de cultivo selectivo para la confirmación (BEA). En la Figura A3-8 se puede ver la diferencia entre un tubo presunto positivo y uno sin turbidez (presunto negativo).

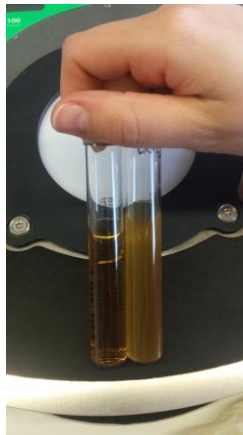


Figura A3-8. Tubos NMP con y sin turbidez

MICROBIOLOGICAL EXAMINATION (9002)

TABLE 9221:IV. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATIONS OF POSITIVE RESULTS WHEN FIVE TUBES ARE USED PER DILUTION (10 mL, 1.0 mL, 0.1 mL)*

Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	Confidence Limits		Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	Confidence Limits	
		Low	High			Low	High
0-0-0	<1.8	—	6.8	4-0-3	25	9.8	70
0-0-1	1.8	0.090	6.8	4-1-0	17	6.0	40
0-1-0	1.8	0.090	6.9	4-1-1	21	6.8	42
0-1-1	3.6	0.70	10	4-1-2	26	9.8	70
0-2-0	3.7	0.70	10	4-1-3	31	10	70
0-2-1	5.5	1.8	15	4-2-0	22	6.8	70
0-3-0	5.6	1.8	15	4-2-1	26	9.8	50
1-0-0	2.0	0.10	10	4-2-2	32	10	70
1-0-1	4.0	0.70	10	4-2-3	38	14	70
1-0-2	6.0	1.8	15	4-3-0	27	9.9	100
1-1-0	4.0	0.71	12	4-3-1	33	10	70
1-1-1	6.1	1.8	15	4-3-2	39	14	70
1-1-2	8.1	3.4	22	4-3-3	34	14	100
1-2-0	6.1	1.8	15	4-4-0	40	14	100
1-2-1	8.2	3.4	22	4-4-1	47	15	100
1-3-0	8.3	3.4	22	4-4-2	41	14	130
1-3-1	10	3.5	22	4-5-0	48	15	100
1-4-0	10	3.5	22	4-5-1	23	6.8	120
2-0-0	4.5	0.79	15	5-0-0	31	10	70
2-0-1	6.8	1.8	15	5-0-1	43	14	70
2-0-2	9.1	3.4	22	5-0-2	58	22	100
2-1-0	6.8	1.8	17	5-0-3	58	22	150
2-1-1	9.2	3.4	22	5-1-0	33	10	100
2-1-2	12	4.1	26	5-1-1	46	14	120
2-2-0	9.3	3.4	22	5-1-2	63	22	150
2-2-1	12	4.1	26	5-1-3	84	34	220
2-2-2	12	4.1	26	5-2-0	49	15	130
2-3-0	14	5.9	36	5-2-1	70	22	170
2-3-1	12	4.1	26	5-2-2	94	34	230
2-4-0	14	5.9	36	5-2-3	120	36	250
3-0-0	15	5.9	36	5-2-4	150	58	400
3-0-1	7.8	2.1	22	5-3-0	79	22	220
3-0-2	11	3.5	23	5-3-1	110	34	250
3-1-0	13	5.6	35	5-3-2	140	52	400
3-1-1	11	3.5	26	5-3-3	170	70	400
3-1-2	14	5.6	36	5-3-4	210	70	400
3-2-0	17	6.0	36	5-4-0	130	36	400
3-2-1	14	5.7	36	5-4-1	170	58	400
3-2-2	17	6.8	40	5-4-2	220	70	440
3-3-0	20	6.8	40	5-4-3	280	100	710
3-3-1	17	6.8	40	5-4-4	350	100	710
3-3-2	21	6.8	40	5-4-5	430	150	1100
3-4-0	24	9.8	70	5-5-0	240	70	710
3-4-1	21	6.8	40	5-5-1	350	100	1300
3-4-2	24	9.8	70	5-5-2	540	150	1700
3-5-0	25	9.8	70	5-5-3	920	220	2600
4-0-0	13	4.1	35	5-5-4	1600	400	4800
4-0-1	17	5.9	36	5-5-5	>1600	700	—
4-0-2	21	6.8	40				

* Results to two significant figures.

Figura A3-9. Tabla interpretación resultados NMP

Por último, se muestra (Figura A3-4) el equipo que se ha utilizado para contar las colonias pasadas 48 horas tal y como indica cada método que implica la utilización de placas SB.

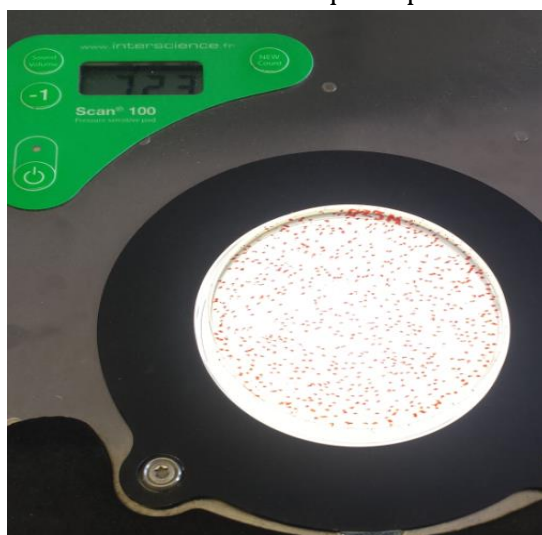


Figura A3-10. Equipo Scan pressure sensitive pad

Por otro lado, en la tabla A3-7 se muestran los diferentes métodos y medios de cultivo que se pueden utilizar para la *E.coli*.

Tabla A3-7. Metodologías de análisis de *E.coli*

NORMATIVA	TÍTULO	MEDIOS CULTIVO	MUESTRAS	EXPRESIÓN RESULTADOS	OBSERVACIONES
SM 9221 E (Eaton, Clesceri, Rice, y Greenberg, 2005)	Multiple-tube fermentation technique for members of the coliform group. Part E-Fecal coliform procedure	Caldo lauril tryptona Caldo EC Agua tryptona Caldo Indol	Aguas potables, naturales, residuales y marinas. Fangos, sedimentos.	NMP/ml o NMP/g	Metodología recomendada por la EPA
ISO 7251:2005 (ISO, 2005)	Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive <i>Escherichia coli</i> -- Most probable number technique		Leche y productos lácteos		Metodología recomendada por la UE
SM 9222 D (Eaton et al., 2005)	Membrane filter technique for members of the coliform group. Part D- Fecal coliform membrane filter procedure	Agar lactosado enriquecido	Aguas naturales, aguas potables	UFC/ml o UFC/g	Recomendada por la EPA
ISO 9308-1:2014 (ISO y AENOR, 2014)	Water quality -- Enumeration of <i>Escherichia coli</i> and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora	Agar de lactosa TTC	Aguas destinadas al consumo humano		En vez del TTC se emplean medios cromogénicos
SM9215B (Eaton et al., 2005)	Heterotrophic plate count. Part B- Pour plate method	Medios de cultivo genéricos para crecimiento de bacterias heterótrofas	Aguas		
SM9215C (Eaton et al., 2005)	Heterotrophic plate count. Part C-Spread plate method.				
SM9215D (Eaton et al., 2005)	Heterotrophic plate count. Part D-Membrane filter method				
UNE EN ISO 16649-1:2013 (ISO y AENOR, 2013)	Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la enumeración de <i>Escherichia coli</i> beta-glucuronidasa positivo. Parte 1: Técnica de recuento de colonias a 44ºC utilizando membranas y 5-bromo-4-cloro-3-indolil beta-D-glucurónido.	Agar TBX	Productos de consumo humano o animal	UFC/ml o UFC/g	
ISO 16649-2:2001 (ISO, 2001)	Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i> -- Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide	Agar TBX		UFC/ml o UFC/g	
UNE EN ISO 16649-3:2015 (International Organization for Standardization y Asociación Española de Acreditación y Certificación, 2015)	Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la enumeración de <i>Escherichia coli</i> beta-glucuronidasa positiva. Parte 3: Técnica del número más probable utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indol beta-D-glucoronato.	Caldo glutamato Agar TBX		NMP/ml o NMP/g	

ANEXO 4: AMPLIACIÓN DE RESULTADOS

En este apartado se incluyen los resultados adicionales a los que se han incluido en el apartado 4 de este trabajo.

RESULTADOS DE COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE *E. FAECALIS* EN FANGOS

En la tabla A4-1 se muestran los datos físico químicos de la muestra de fango que se utiliza para los ensayos realizados con muestra fortificada.

Tabla A4-1. Datos valores físico químicos de la muestra de fangos para los ensayos con cepa fortificada

Valor	DQOf (mg/L)	N-NH4 (mg/L)	pH	ST (%)	SV (%)	Alcalinidad bicarbonatos (mg CaCO ₃ /L)	Alcalinidad intermedia (mg CaCO ₃ /L)	Alc.Total (mg CaCO ₃ /L)	Ratio alcalinidad
Dato	4300	880	8,53	2,48	1,35	4700	1500	6200	0,32

En las tablas A4-2 a la tabla A4-7 se muestran los resultados de todos los métodos para los ensayos realizados, donde se detallan las diluciones empeladas y los resultados de concentración obtenidos en cada método analítico empelado.

ENSAYO 1

Tabla A4-2. Resultados del Ensayo 1 para los diversos métodos utilizados

Filtración en membrana				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D2	1	>100	1,00E+04	4,0
D2	2	>100	1,00E+04	4,0
D2	3	>100	1,00E+04	4,0
D3	1	>100	1,00E+05	5,0
D3	2	95	9,50E+04	5,0
D3	3	51	5,10E+04	4,7
D4	1	14	1,40E+05	5,1
D4	2	20	2,00E+05	5,3
D4	3	14	1,40E+05	5,1
Siembra en superficie				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D1	1	>300	3,00E+04	4,5
D1	2	>300	3,00E+04	4,5
D1	3	>300	3,00E+04	4,5
D2	1	227	2,27E+05	5,4
D2	2	111	1,11E+05	5,0
D2	3	111	1,11E+05	5,0
D3	1	12	1,20E+05	5,1
D3	2	12	1,20E+05	5,1
D3	3	12	1,20E+05	5,1
D4	1	5	5,00E+05	5,7
Siembra en masa				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D1	1	>300	3,00E+03	3,5
D1	2	>300	3,00E+03	3,5
D1	3	>300	3,00E+03	3,5
D2	1	72	7,20E+03	3,9
D2	2	44	4,40E+03	3,6
D2	3	131	1,31E+04	4,1
D3	1	24	2,40E+04	4,4
D3	2	19	1,90E+04	4,3
D3	3	14	1,40E+04	4,1

ENSAYO 2

Tabla A2-3. Resultados del Ensayo 2 para los diversos métodos utilizados

Filtración en membrana				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D1	1	>100	1,00E+03	3,0
D1	2	>100	1,00E+03	3,0
D1	3	>100	1,00E+03	3,0
D2	1	300	3,00E+04	4,5
D2	2	263	2,63E+04	4,4
D2	3	158	1,58E+04	4,2
D3	1	68	6,80E+04	4,8
D3	2	55	5,50E+04	4,7
D3	3	34	3,40E+04	4,5
Siembra en superficie				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D1	1	>300	3,00E+04	4,5
D1	2	>300	3,00E+04	4,5
D1	3	>300	3,00E+04	4,5
D2	1	81	8,10E+04	4,9
D2	2	190	1,90E+05	5,3
D2	3	138	1,38E+05	5,1
D3	1	9	9,00E+04	5,0
D3	2	8	8,00E+04	4,9
D4	1	2	2,00E+05	5,3
Siembra en masa				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D1	1	>300	3,00E+03	3,5
D1	2	>300	3,00E+03	3,5
D2	1	>300	3,00E+04	4,5
D2	2	>300	3,00E+04	4,5
D2	3	548	5,48E+04	4,7
D3	1	62	6,20E+04	4,8
D3	2	56	5,60E+04	4,7
D3	3	64	6,40E+04	4,8
D4	1	9	9,00E+04	5,0

ENSAYO 3

Tabla A2-4. Resultados del Ensayo 3 para los diversos métodos utilizados

Filtración en membrana				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D0	1	>100	2,00E+02	2,3
D0	2	>100	2,00E+02	2,3
D0	3	>100	1,00E+03	3,0
D0	1	>100	1,00E+03	3,0
D1	2	>100	1,00E+03	3,0
D1	3	>100	1,00E+03	3,0
D1	1	>100	2,00E+03	3,3
D1	2	>100	2,00E+03	3,3
D2	3	524	5,24E+04	4,7
Siembra en superficie				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D0	1	>300	3,00E+03	3,5
D0	2	>300	3,00E+03	3,5
D0	3	>300	1,50E+03	3,2
D1	1	>300	1,50E+04	4,2
D1	2	>300	3,00E+04	4,5
D1	3	>300	3,00E+04	4,5
D2	1	133	1,33E+05	5,1
D2	2	173	1,73E+05	5,2
D2	3	248	1,24E+05	5,1
Siembra en masa				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D0	1	>300	3,00E+02	2,5
D0	2	>300	3,00E+02	2,5
D0	3	>300	6,00E+02	2,8
D1	1	>300	3,00E+03	3,5
D1	2	>300	3,00E+03	3,5
D1	3	>300	3,00E+03	3,5
D2	1	723	7,23E+04	4,9
D2	2	678	6,78E+04	4,8
D2	3	686	6,86E+04	4,8

ENSAYO 4

Tabla A2-5 Resultados del Ensayo 4 para los diversos métodos utilizados

Filtración en membrana				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D0	1	>100	2,00E+02	2,3
D0	2	>100	2,00E+02	2,3
D0	3	>100	1,00E+03	3,0
D1	1	>100	1,00E+03	3,0
D1	2	>100	1,00E+03	3,0
D1	3	>100	1,00E+03	3,0
D2	1	228	2,28E+04	4,4
D2	2	171	1,71E+04	4,2
D2	3	240	2,40E+04	4,4
Siembra en superficie				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D0	1	>300	3,00E+03	3,5
D0	2	>300	3,00E+03	3,5
D0	3	>300	3,00E+03	3,5
D1	1	604	6,04E+04	4,8
D1	2	627	6,27E+04	4,8
D1	3	378	3,78E+04	4,6
D2	1	68	6,80E+04	4,8
D2	2	71	7,10E+04	4,9
D2	3	66	6,60E+04	4,8
Siembra en masa				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D0	1	>300	6,00E+02	2,8
D0	2	>300	3,00E+02	2,5
D0	3	>300	3,00E+02	2,5
D1	1	>300	3,00E+03	3,5
D1	2	>300	3,00E+03	3,5
D1	3	>300	3,00E+03	3,5
D2	1	400	4,00E+04	4,6
D2	2	409	4,09E+04	4,6
D2	3	379	3,79E+04	4,6

ENSAYO 5

Tabla A2-6. Resultados del Ensayo 5 para los diversos métodos utilizados

Filtración en membrana				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D0	1	>100	1,00E+02	2,0
D0	2	>100	2,00E+02	2,3
D0	3	>100	2,00E+02	2,3
D0	4	214	2,14E+03	3,3
D0	5	170	1,70E+03	3,2
D0	6	191	1,91E+03	3,3
D1	1	33	6,60E+02	2,8
D1	2	47	9,40E+02	3,0
D1	3	45	9,00E+02	3,0
Siembra en superficie				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D0	1	248	2,48E+03	3,4
D0	2	210	2,10E+03	3,3
D0	3	145	2,90E+03	3,5
D0	4	157	3,14E+03	3,5
D0	5	120	2,40E+03	3,4
D0	6	19	1,90E+03	3,3
D1	1	4	8,00E+02	2,9
D1	2	6	1,20E+03	3,1
D1	3	7	1,40E+03	3,1
Siembra en masa				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D0	1	>300	3,00E+02	2,5
D0	2	>300	3,00E+02	2,5
D0	3	>300	3,00E+03	3,5
D0	4	>300	3,00E+03	3,5
D0	5	>300	3,00E+03	3,5
D0	6	200	2,00E+03	3,3
D1	1	38	7,60E+02	2,9
D1	2	29	5,80E+02	2,8
D1	3	37	7,40E+02	2,9

MUESTRA REAL 2⁸

Tabla A2-7 Resultados de la muestra real 2 para los diversos métodos utilizados

Filtración en membrana				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D0	1	>100	2,00E+02	2,3
D1	2	>100	200	2,3
D1	3	>100	1000	3
D2	1	>100	1000	3
D2	2	>100	1000	3
D2	3	>100	1000	3
D3	1	219	2,19E+05	5,3
D3	2	170	1,70E+05	5,2
D3	3	179	1,79E+05	5,3
Siembra en superficie				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D0	1	>300	3,00E+03	3,5
D0	2	>300	3,00E+03	3,5
D0	3	>300	3,00E+03	3,5
D1	1	>300	3,00E+04	4,5
D1	2	>300	3,00E+04	4,5
D1	3	>300	3,00E+04	4,5
D2	1	196	1,96E+05	5,3
D2	2	235	2,35E+05	5,4
D2	3	177	1,77E+05	5,2
Siembra en masa				
Dilución	Réplica	Placa	UFC/mL	Unidades log
D0	1	>300	6,00E+02	2,8
D0	2	>300	3,00E+02	2,5
D0	3	>300	3,00E+02	2,5
D1	1	>300	3,00E+03	3,5
D1	2	>300	3,00E+03	3,5
D1	3	>300	3,00E+03	3,5
D2	1	>301	3,00E+04	4,5
D2	2	>302	3,00E+04	4,5
D2	3	>303	3,00E+04	4,5

⁸ De la Muestra real 1 se obtuvieron valores por debajo del límite de detección de cada método salvo para el caso del NMP (ver Tabla 4-2)

RESULTADOS DE COMPARATIVA DE METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se adjuntan los resultados complementarios al análisis estadístico realizado a las diferentes metodologías de análisis de *E.faecalis* en las muestras de fango fortificadas.

ENSAYO 1

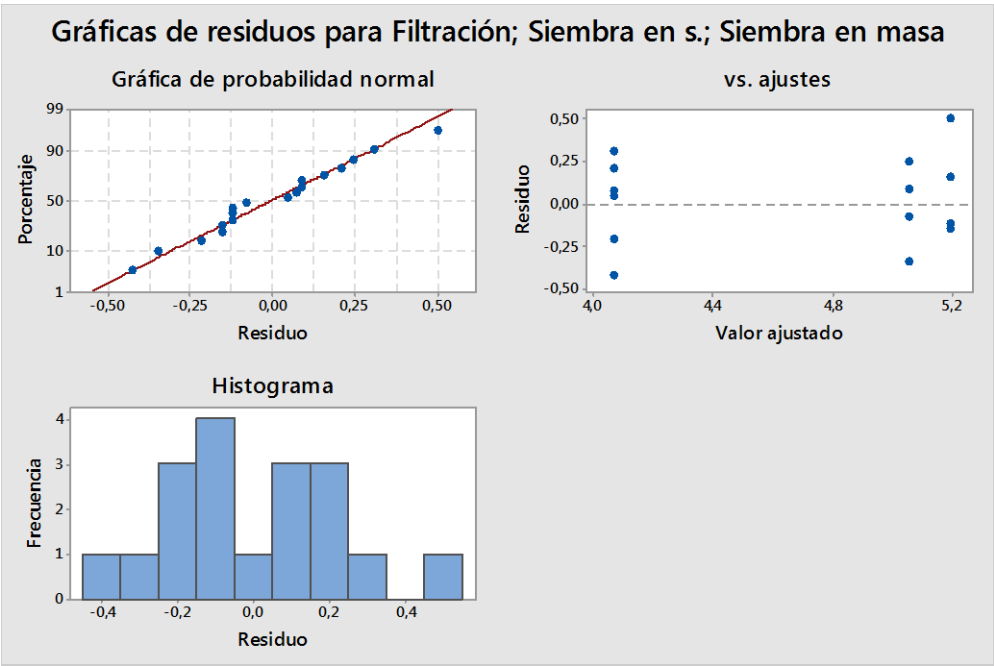


Figura A4-1. Análisis de residuos Ensayo 1

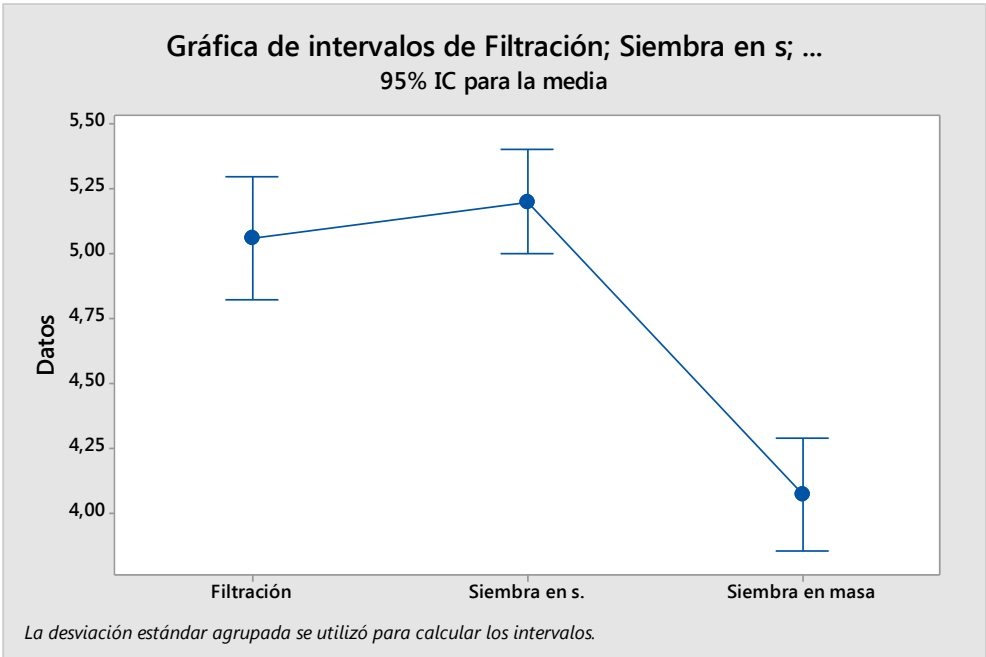


Figura A4-2. Gráfica de intervalos para los diferentes métodos Ensayo 1

Tabla A4-8. Resultados ANOVA cualitativo diferentes metodologías Ensayo 1

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	4,6208	2,31042	36,72	0,001
Error	15	0,9437	0,06292		
Total	17	5,5646			

S=0,2581 R-ajust=83,04%

ENSAYO 2

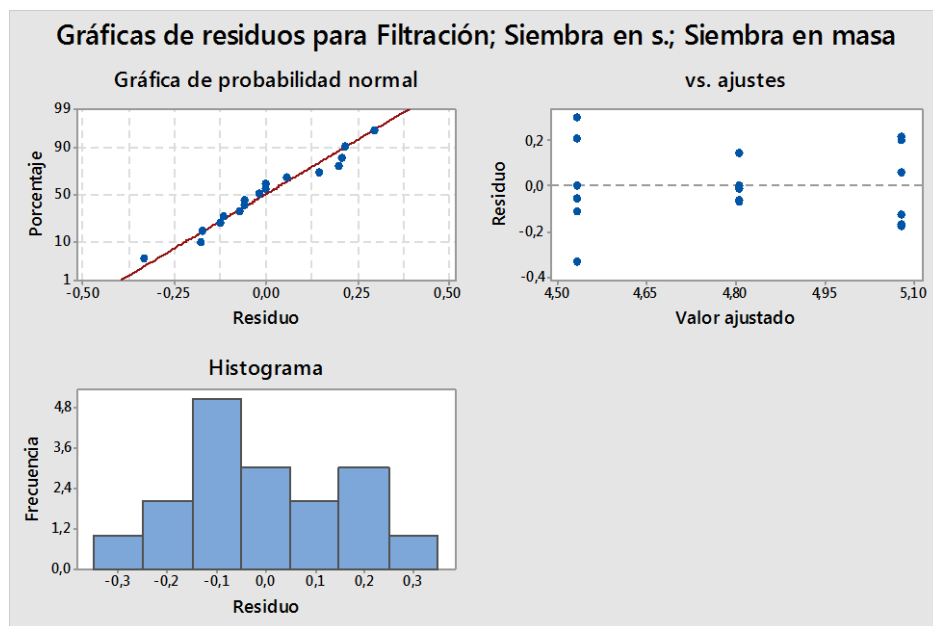


Figura A4-3. Análisis de residuos Ensayo 2

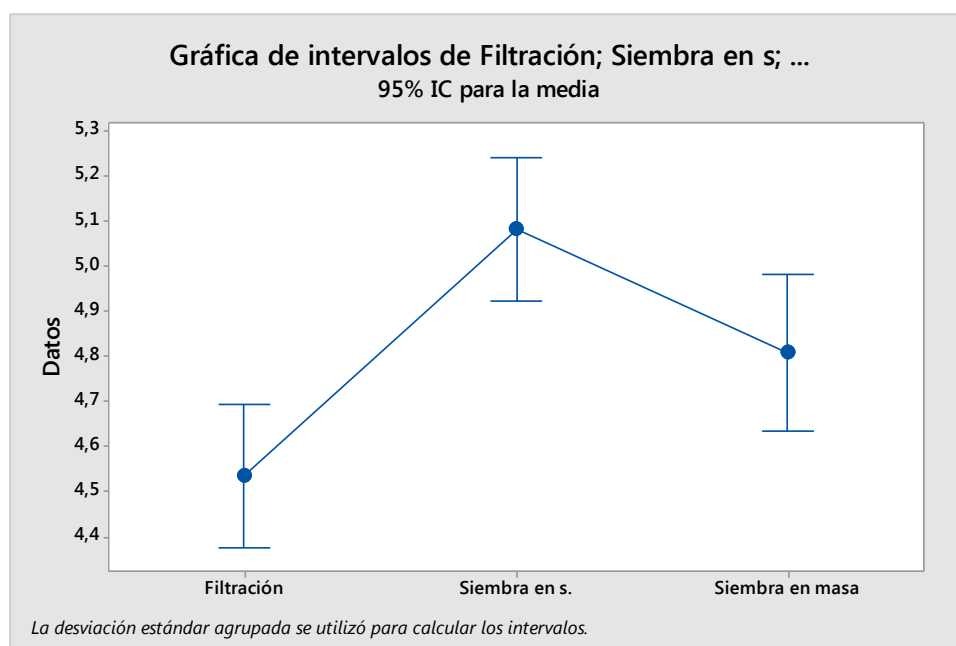


Figura A4-4. Gráfica de intervalos para los diferentes métodos Ensayo 2

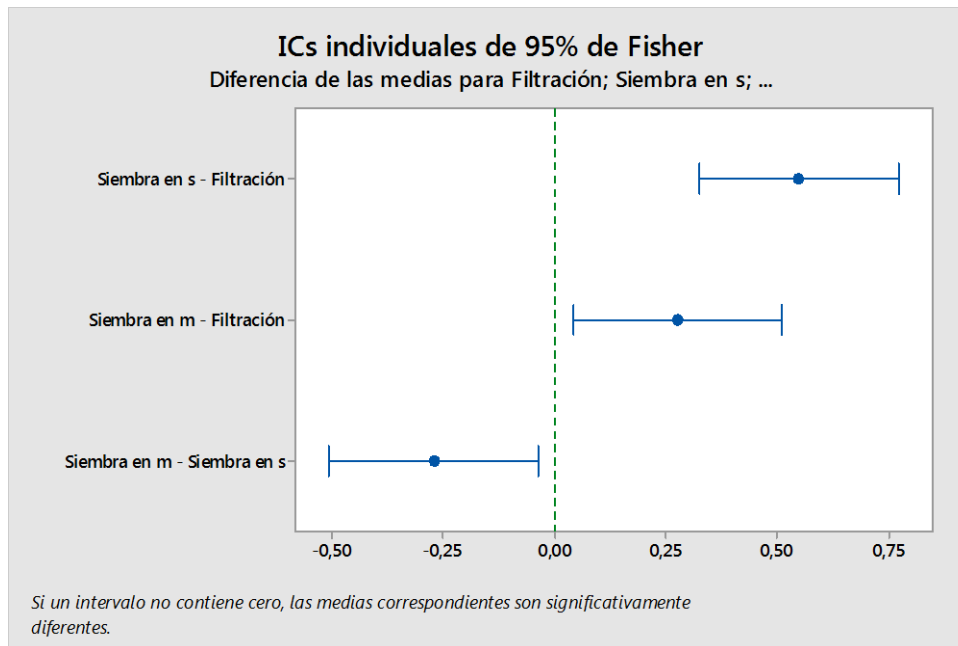


Figura A45. Diferencia entre medias para las diferentes metodologías Ensayo 2

Tabla A4-9 Resultados ANOVA cualitativo diferentes metodologías Ensayo 2

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0,8989	0,4496	13,73	0,001
Error	14	0,4584	0,03237		
Total	16	1,3537			

S=0,1809 R-ajust=66,23%

ENSAYO 3

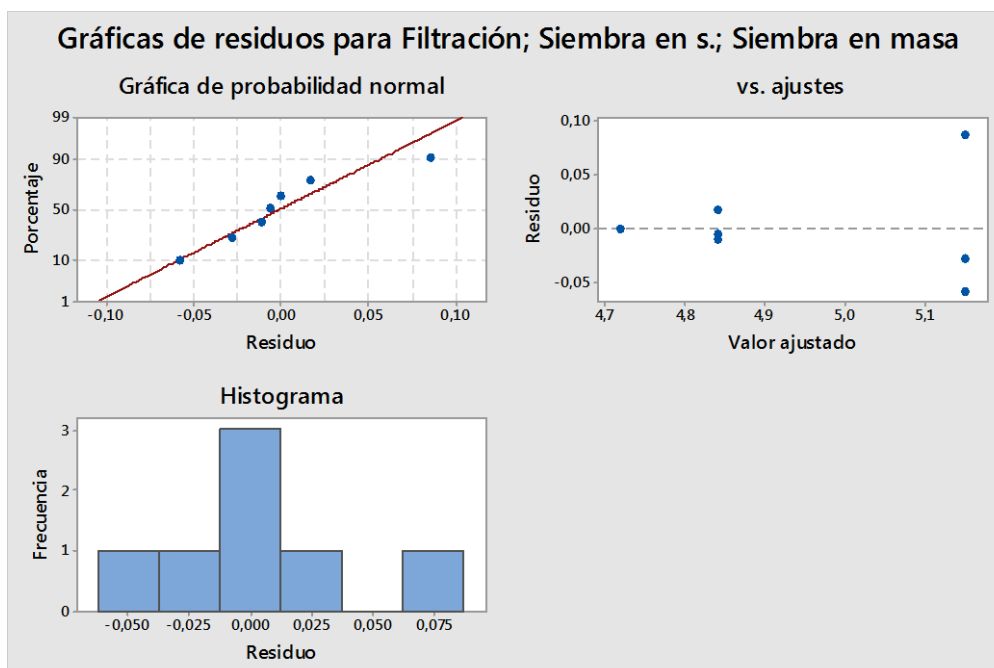


Figura A4-6. Análisis de residuos Ensayo 3

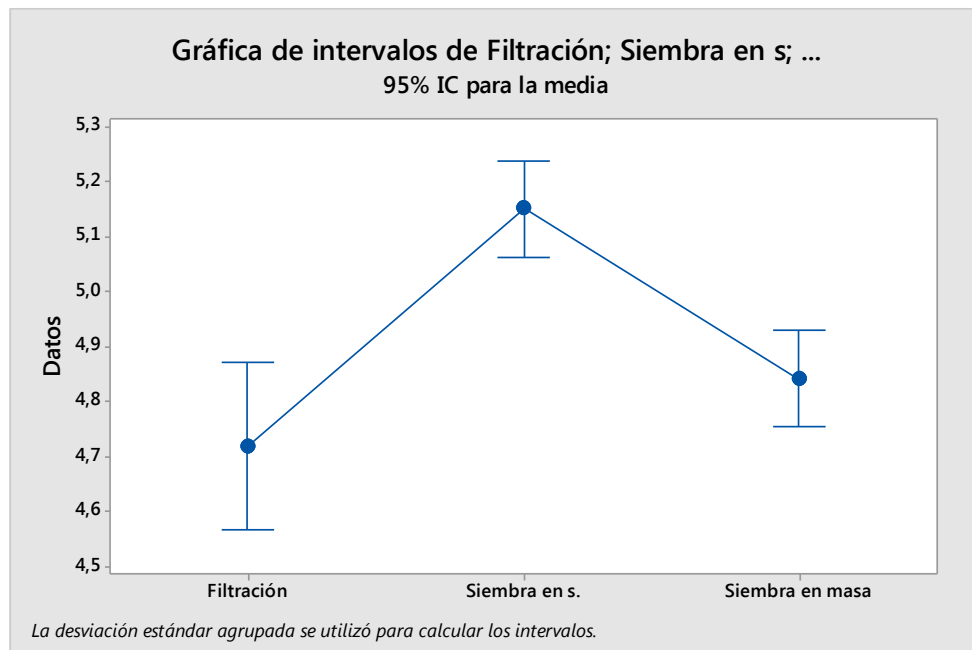


Figura A4-7. Gráfica de intervalos para los diferentes métodos Ensayo 3

Tabla A4-10 Resultados ANOVA cualitativo diferentes metodologías Ensayo 3

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0,20891	0,1049	34,77	0,003
Error	4	0,01207	0,003017		
Total	6	0,2218			

S=0,0549 R-ajust=94,56%

ENSAYO 4

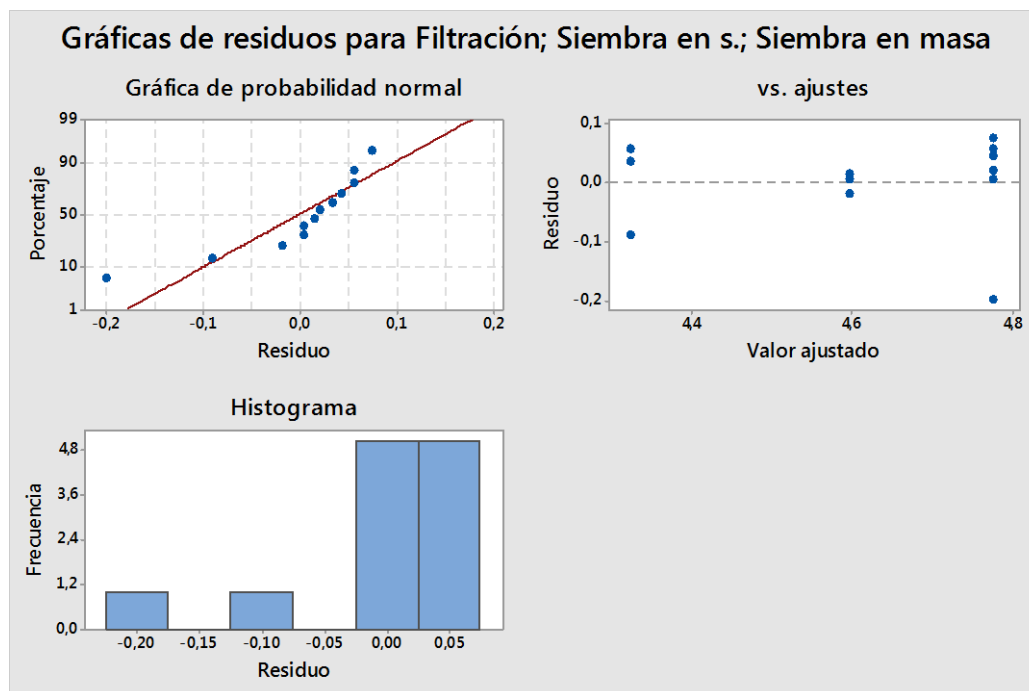


Figura A4-8. Análisis de residuos Ensayo 4

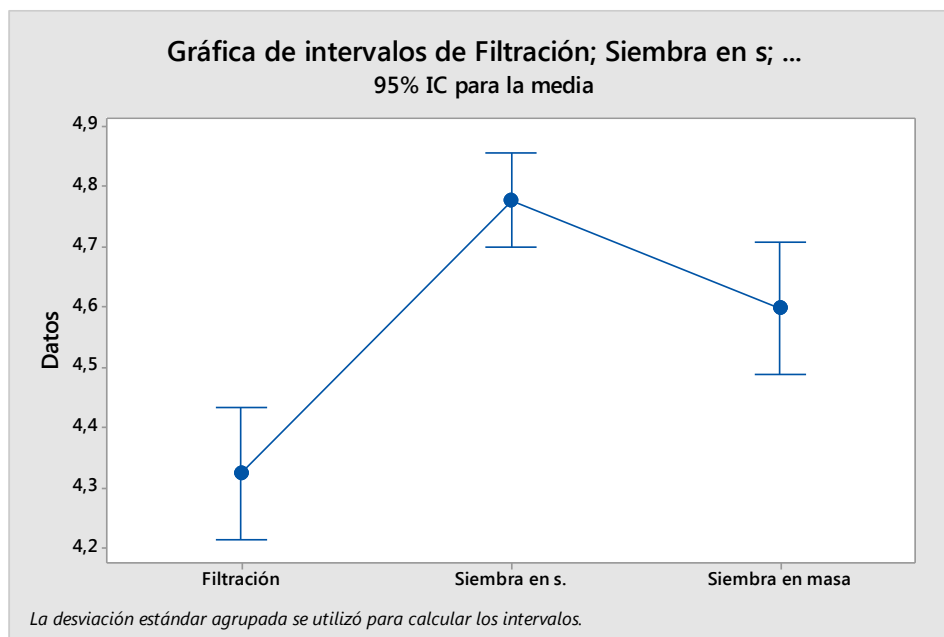


Figura A4-9. Gráfica de intervalos para los diferentes métodos Ensayo 4

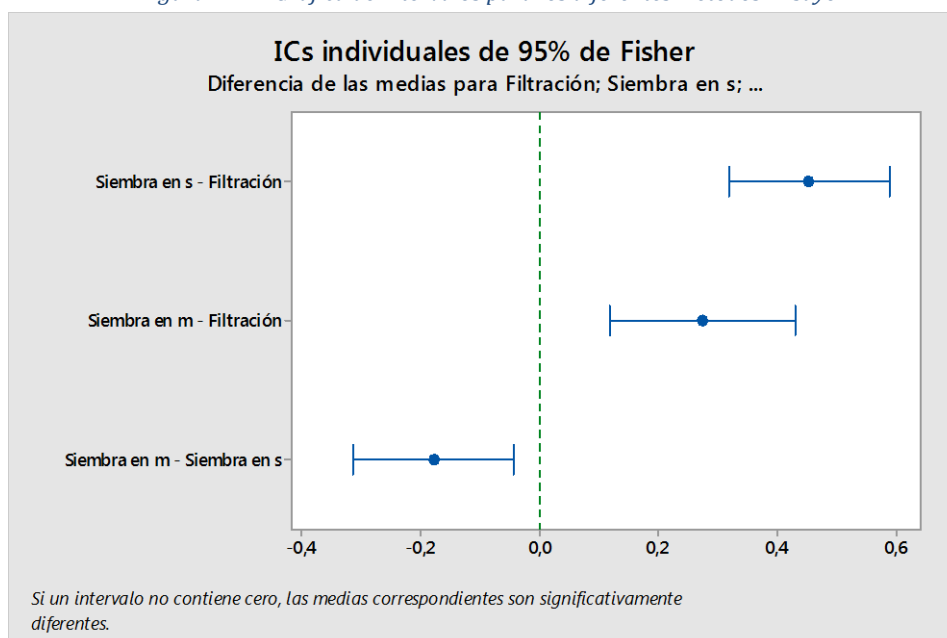


Figura A4-10. Diferencia entre medias para las diferentes metodologías Ensayo 4

TablaA4-11. Resultados ANOVA cualitativo diferentes metodologías Ensayo 4

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0,4119	0,20509	29,05	0,001
Error	9	0,06384	0,007090		
Total	11	0,47565			

S=0,0841 R-ajust=86,59%

ENSAYO 5

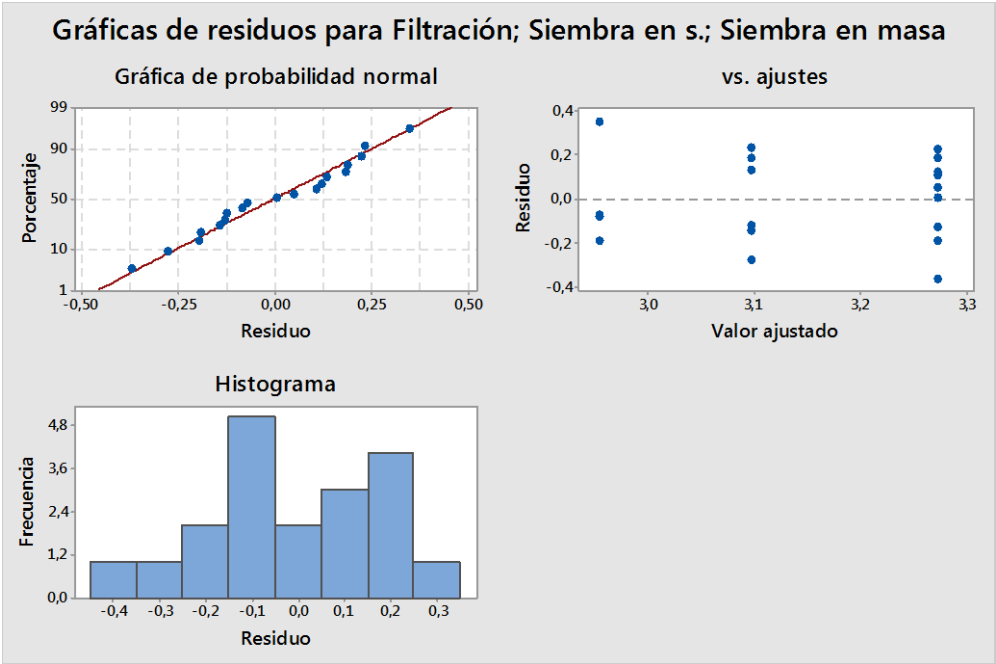


Figura A4-11. Análisis de residuos Ensayo 5

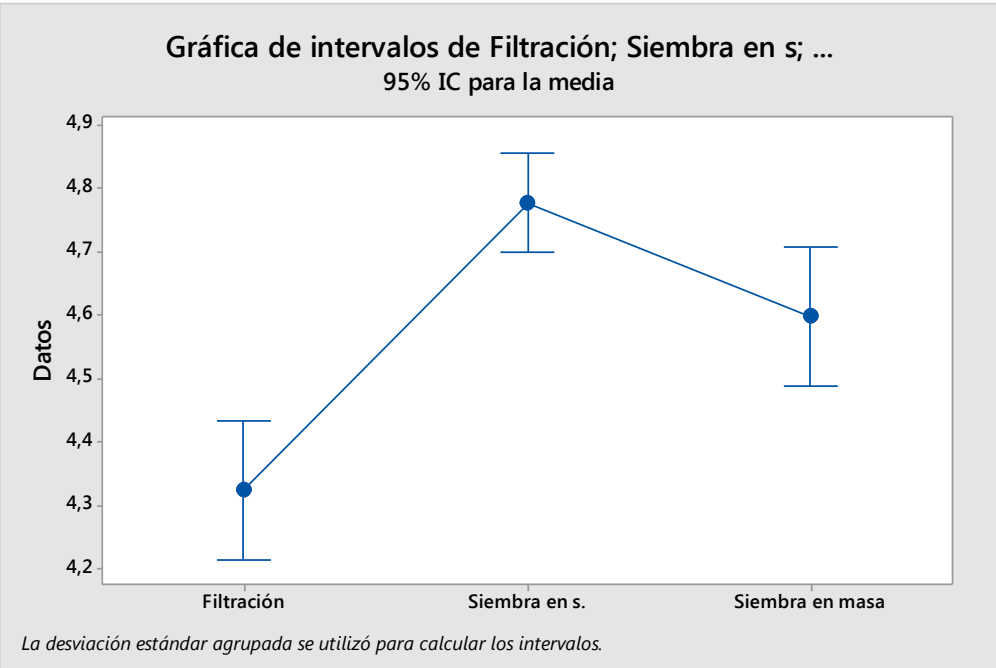


Figura A4-12. Gráfica de intervalos para los diferentes métodos Ensayo 5

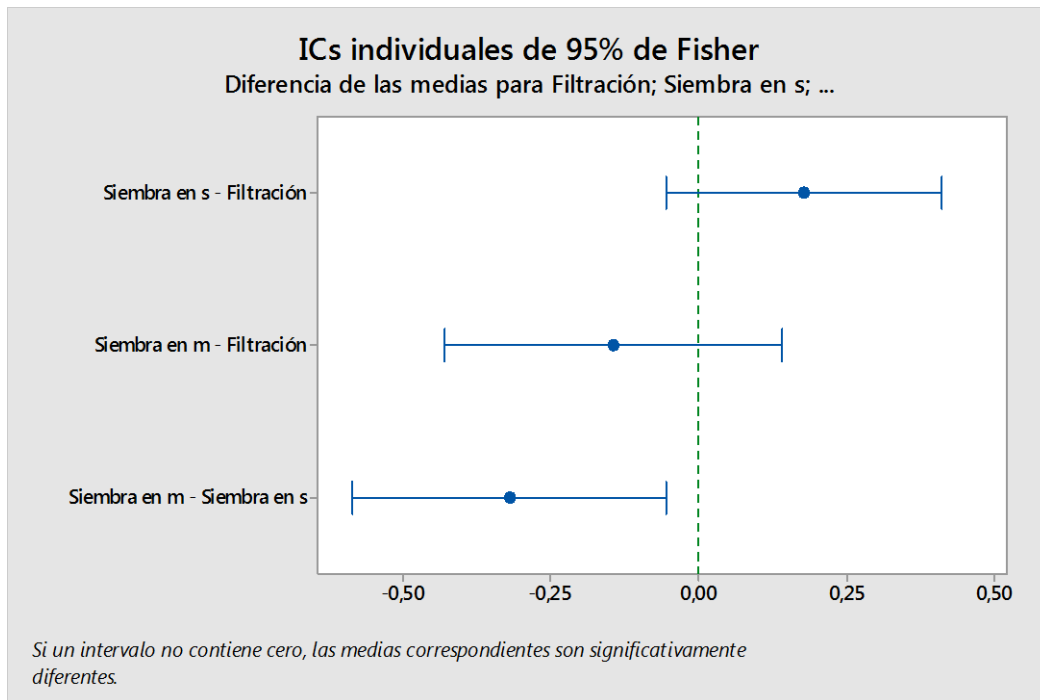


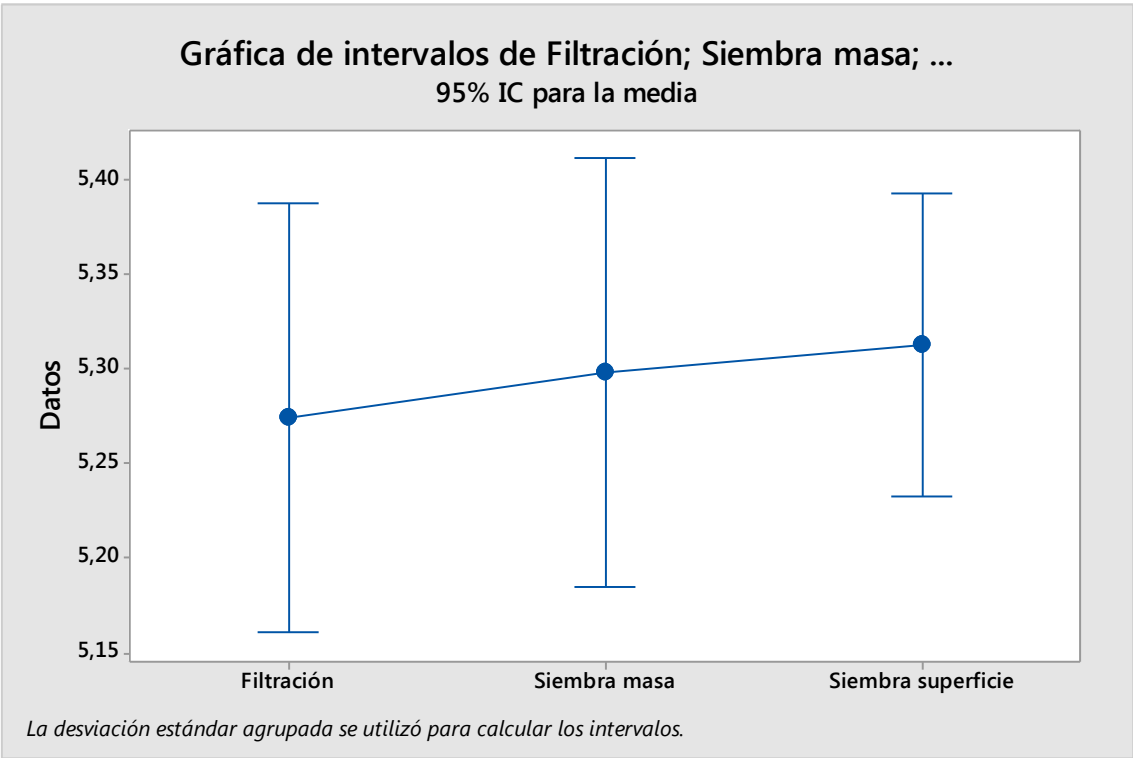
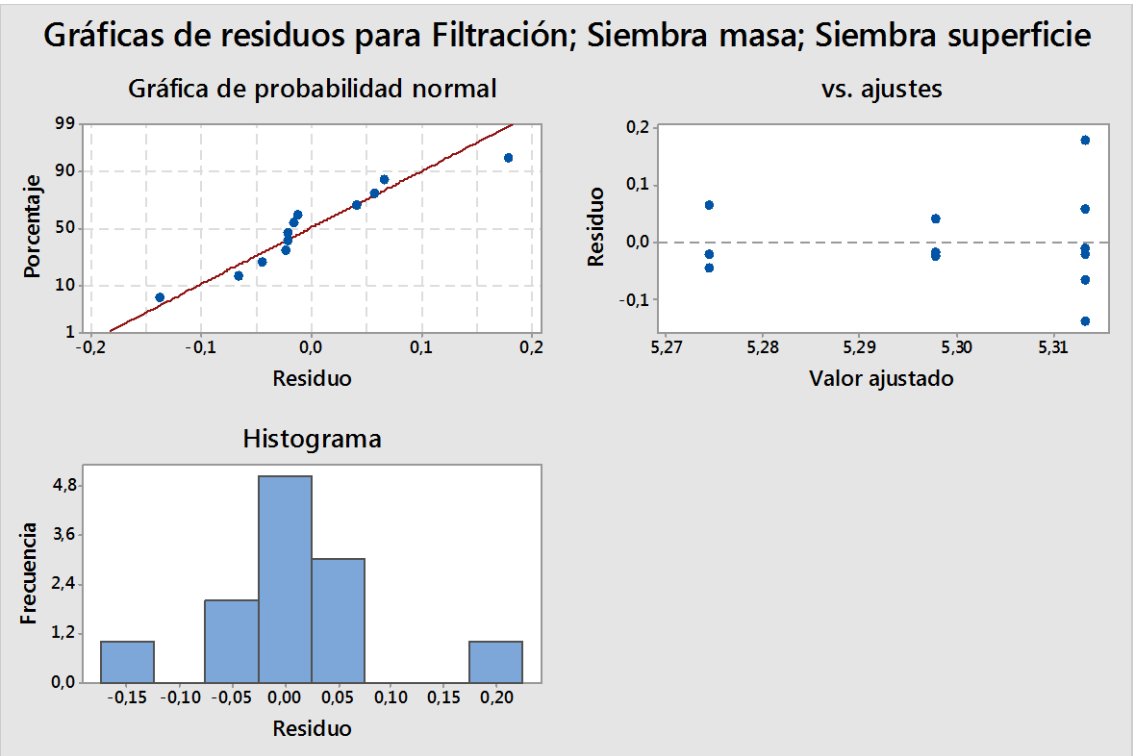
Figura A4-13. Diferencia entre medias para las diferentes metodologías Ensayo 5

TablaA4-12. Resultados ANOVA cualitativo diferentes metodologías Ensayo 5

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0,3081	0,15	3,55	0,053
Error	16	0,069	0,043		
Total	18	0,37			

S=0,208 R-ajust=75,44%

MUESTRA REAL 2



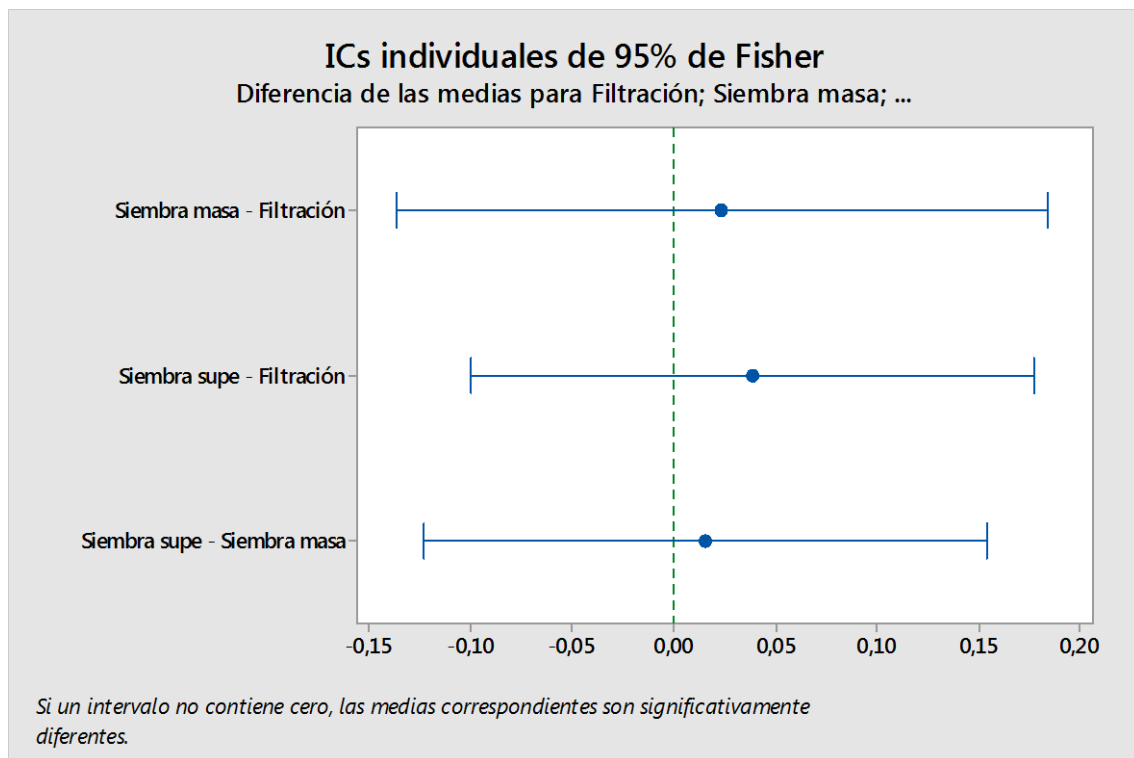


Figura A4-16. Diferencia entre medias para las diferentes metodologías muestra real 2

Tabla A4-13 Resultados ANOVA cualitativo diferentes metodologías muestra real 2

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0,003012	0,001506	0,20	0,823
Error	9	0,067891	0,00753		
Total	11	0,07083			

S=0,086 R-ajust=80,44%

ANÁLISIS DE VARIANZA DE RESULTADOS DE CADA MÉTODO

FILTRACIÓN

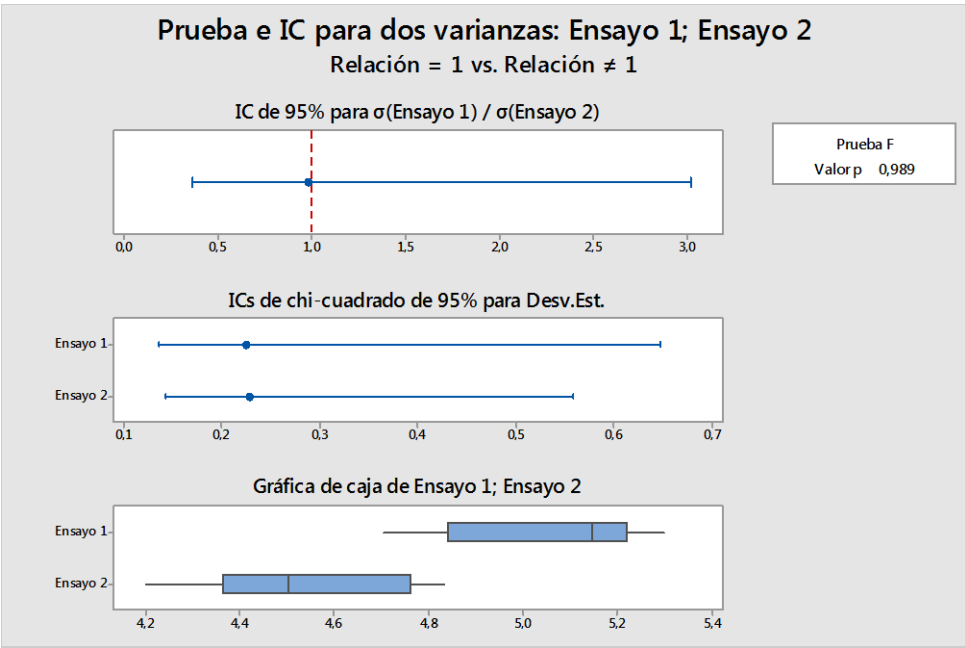


Figura A4-17. Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 1 y 2 filtración

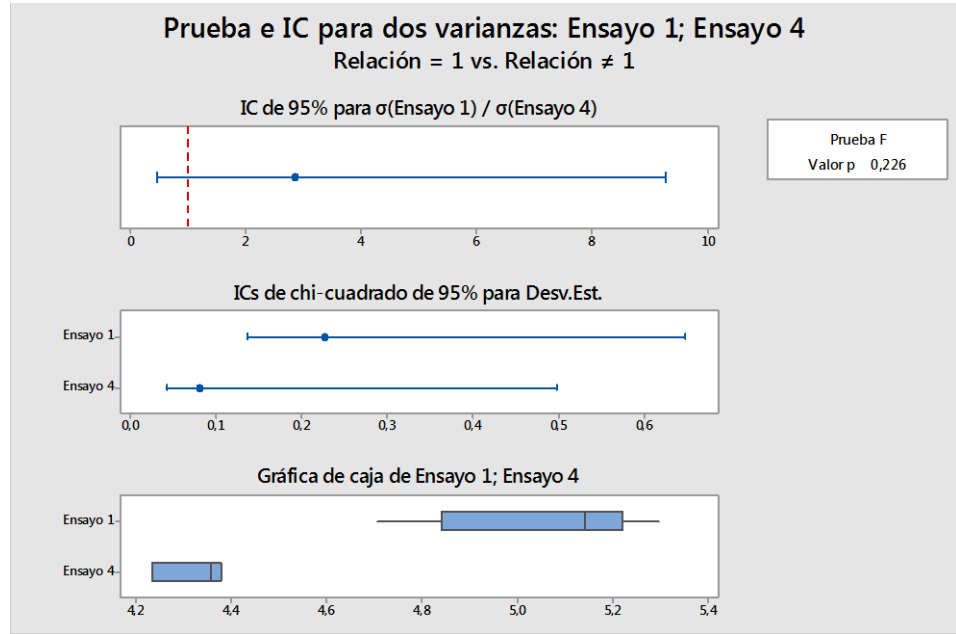


Figura A4-18. Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 1 y 4 filtración

SIEMBRA EN MASA

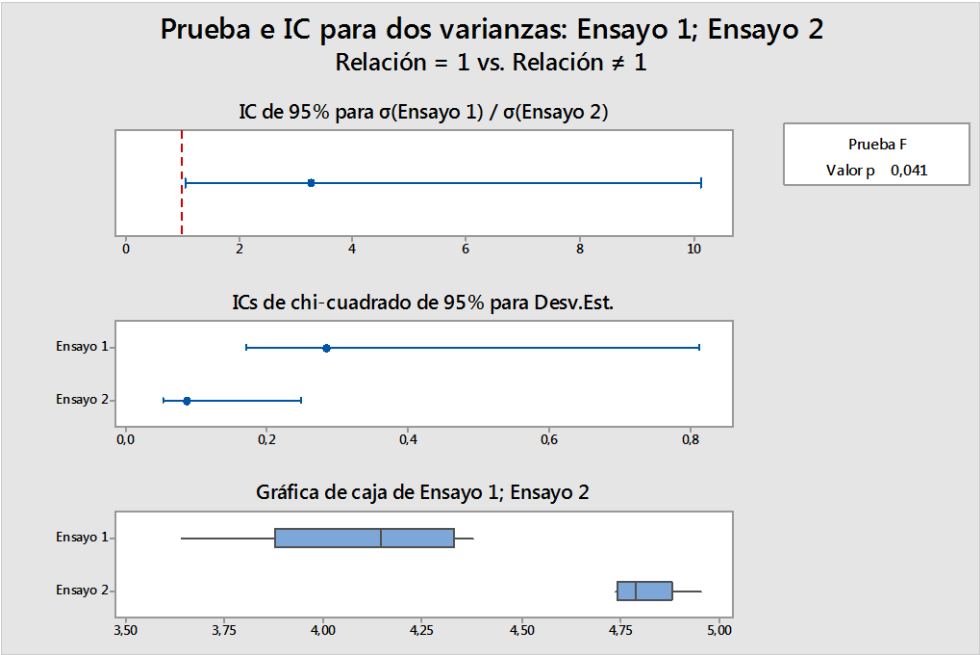


Figura A4 -19 Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 1 y 2 siembra en masa

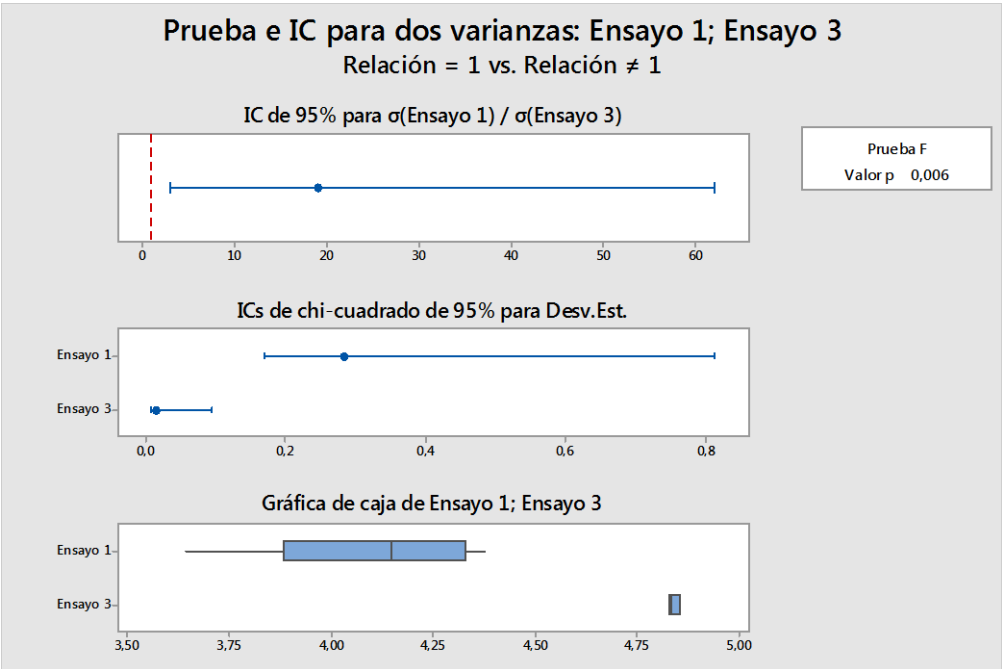


Figura A4-11. Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 1 y 3 siembra en masa

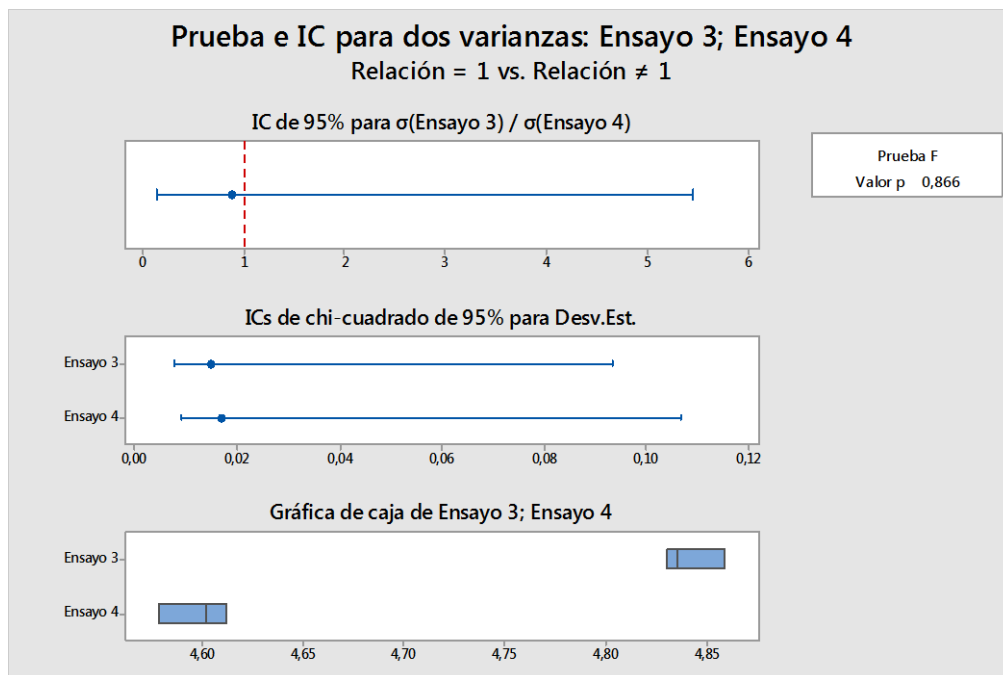


Figura A4-21 Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 3 y 4 siembra en masa

SIEMBRA EN SUPERFICIE

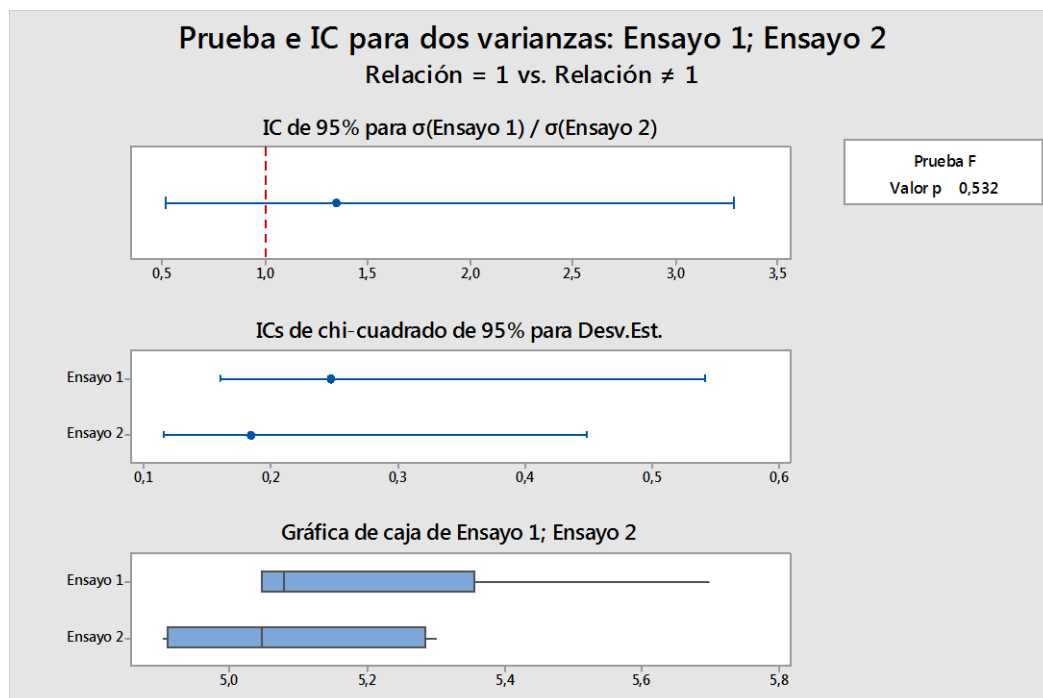


Figura A4-22. Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 1 y 2 siembra en superficie

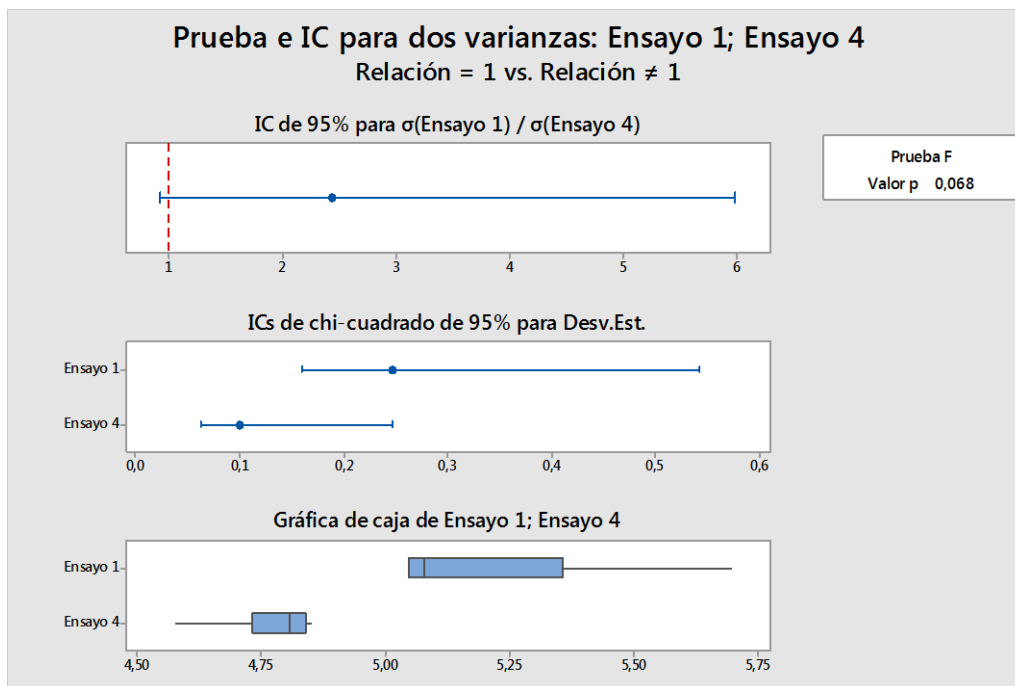


Figura A4-23. Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 1 y 4 siembra en superficie

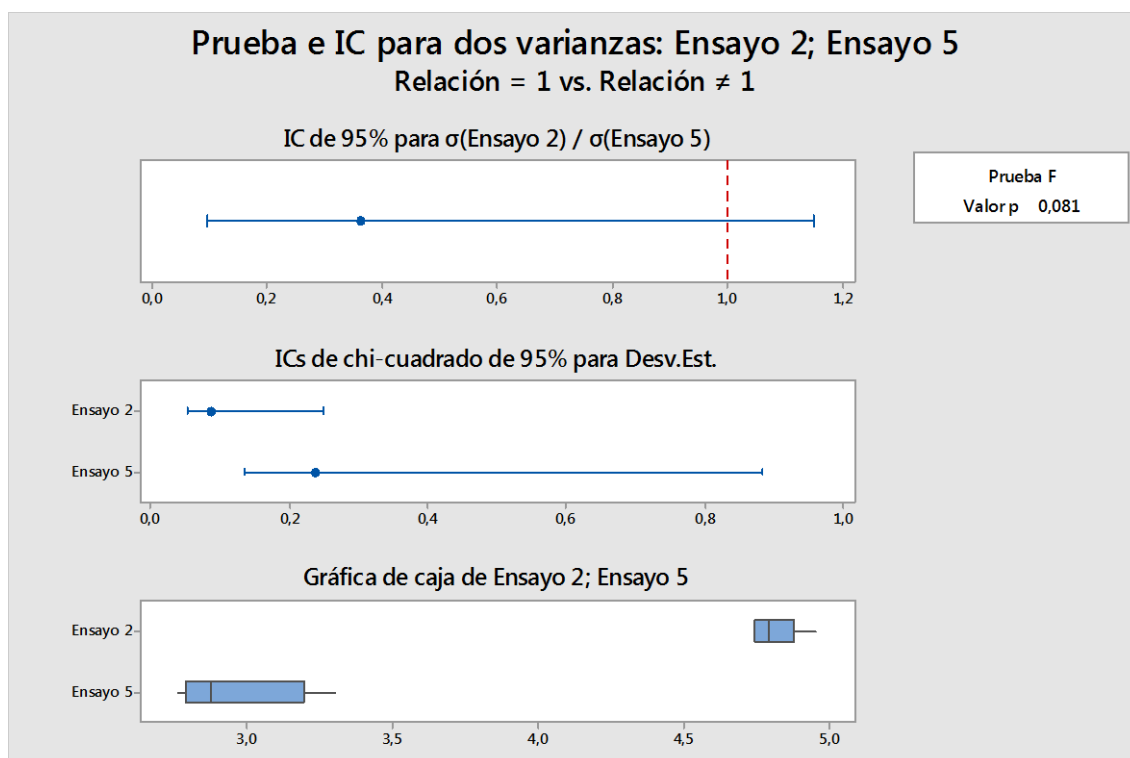


Figura A4-24 Intervalo confianza para desviaciones entre Ensayos 2 y 5 siembra en superficie

RESULTADOS ANÁLISIS METODOLOGÍA Y MEDIOS DE CULTIVO *E.coli*

En este apartado se muestran los resultados complementarios al apartado 4.2

Comparación resultados entre los diferentes medios de cultivo

Método de Filtración

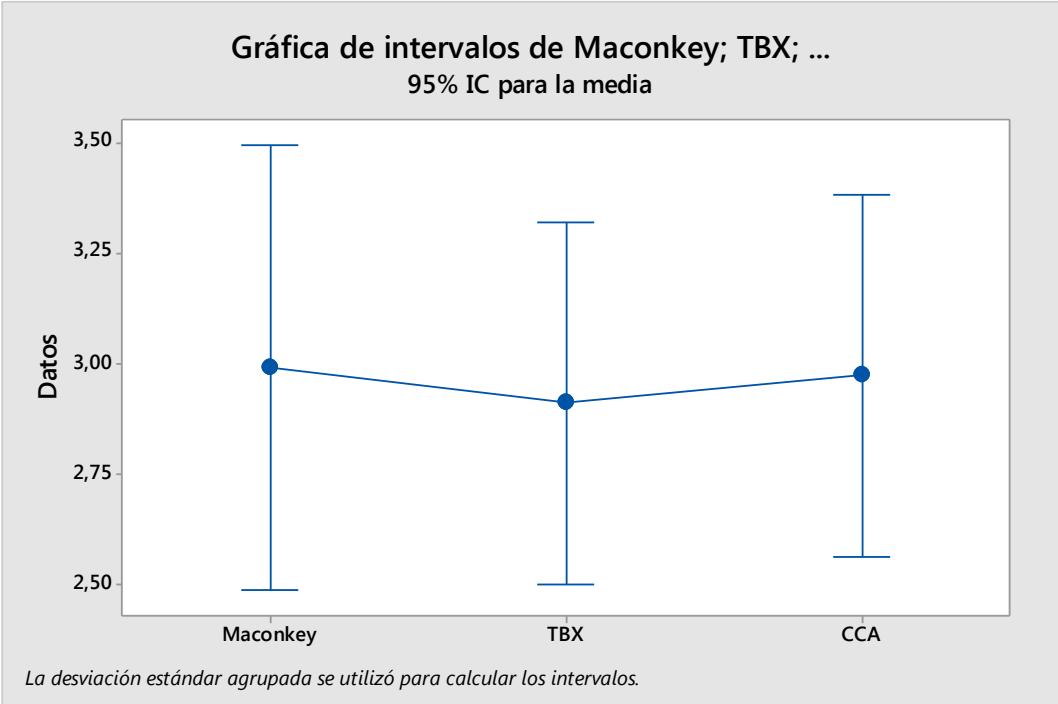


Figura A4-25 Gráfica de intervalos comparación medios de cultivo para Filtración

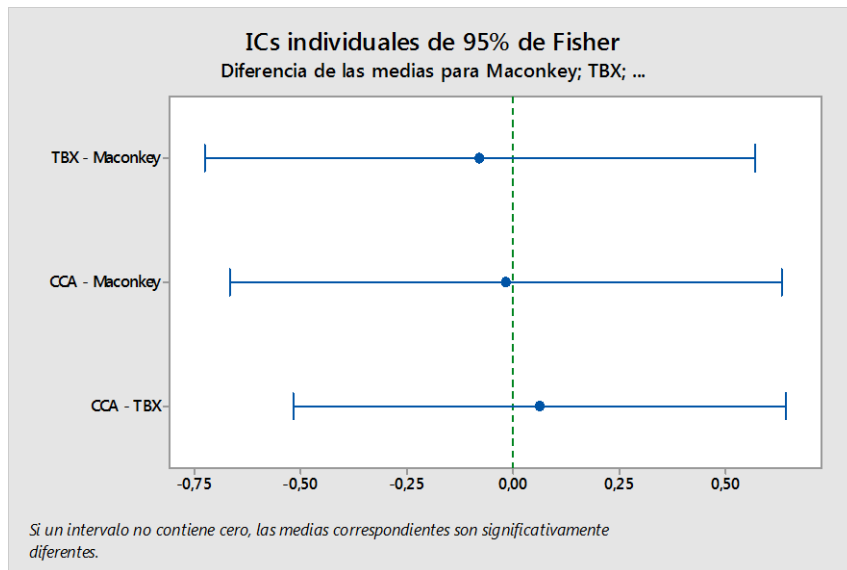


Figura A4-26. Comparación entre medias comparación medios de cultivo para Filtración

Tabla A4 -14. Resultados ANOVA cualitativo comparación medios de cultivo para Filtración

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0,009338	0,00466	0,09	0,942
Error	5	0,3831	0,0766		
Total	7	0,3924			

Método de Siembra en masa

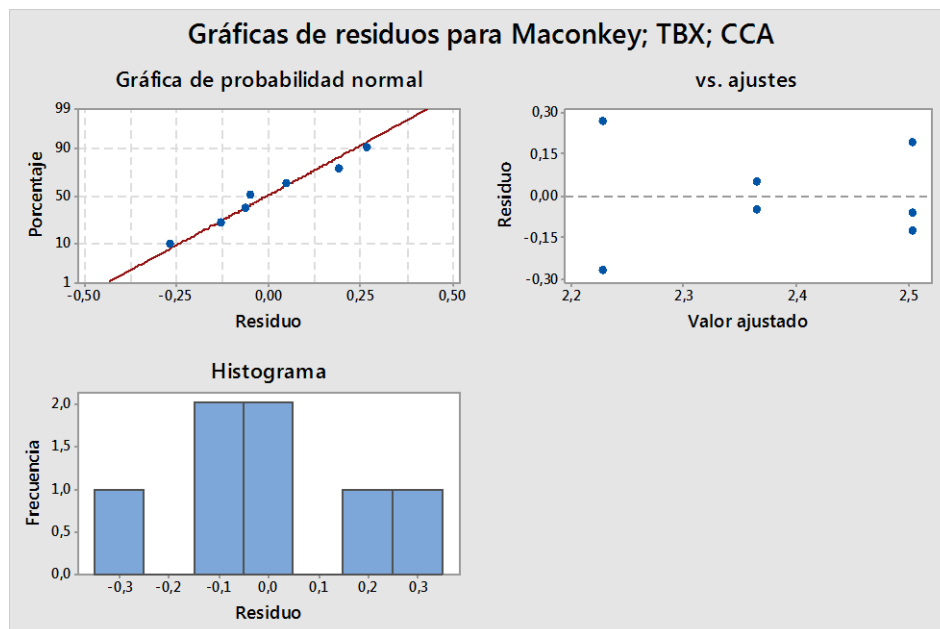


Figura A4-27 Análisis de los residuos comparación medios de cultivo para Siembra en masa

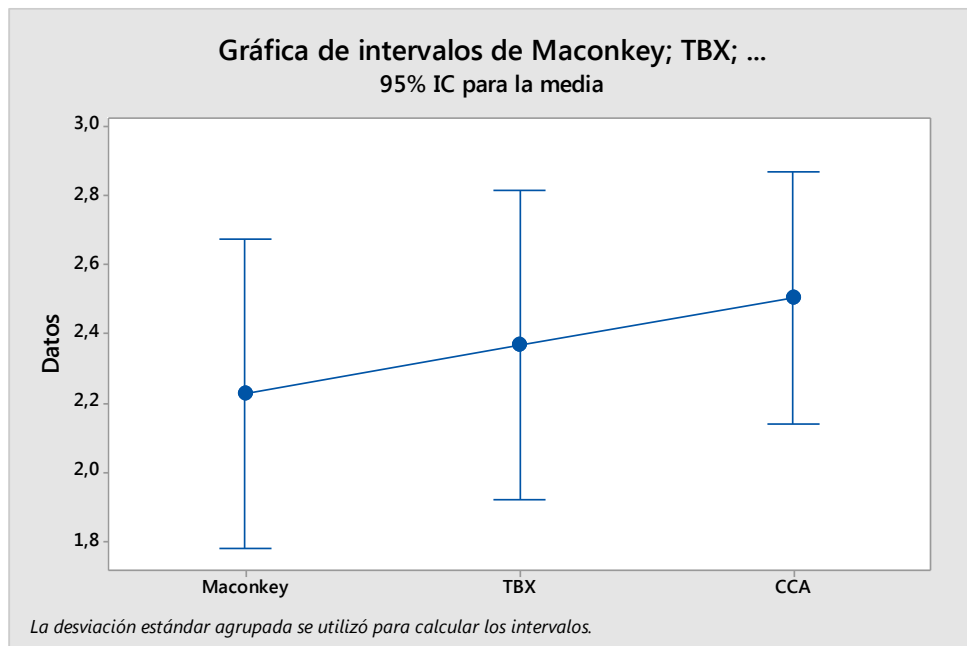


Figura A4-28 Gráfica de intervalos comparación medios de cultivo para Siembra en masa

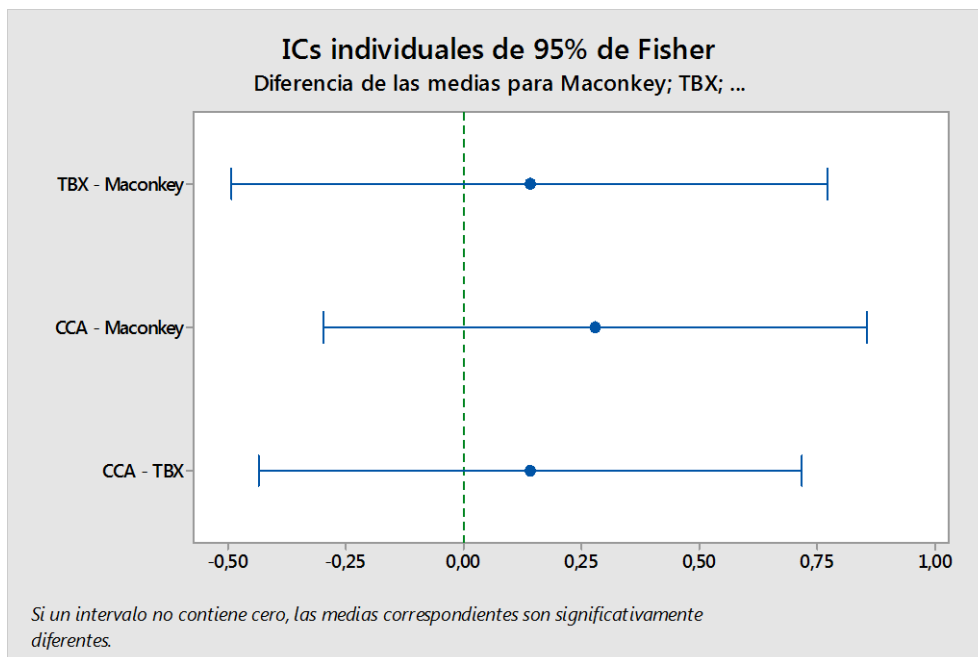


Figura A4-29 Comparación entre medias comparación medios de cultivo para Siembra en masa

Tabla A4-15 Resultados ANOVA cualitativo comparación medios de cultivo para Siembra en masa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0,009251	0,004626	0,89	0,478
Error	4	0,2070	0,05176		
Total	6	0,29954			

Método de Siembra en superficie

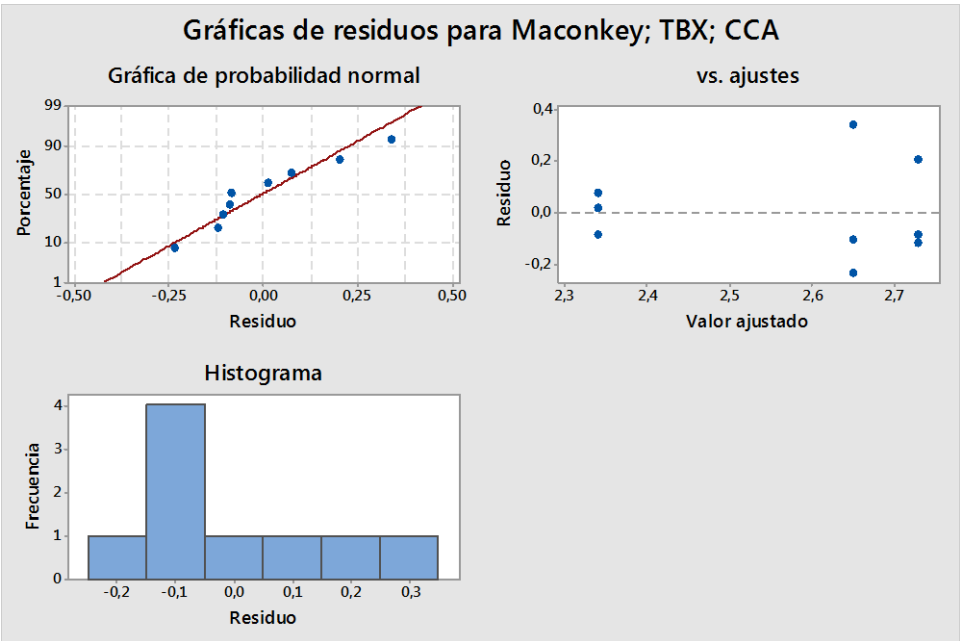


Figura A4-30. Análisis de los residuos comparación medios de cultivo para Siembra en superficie

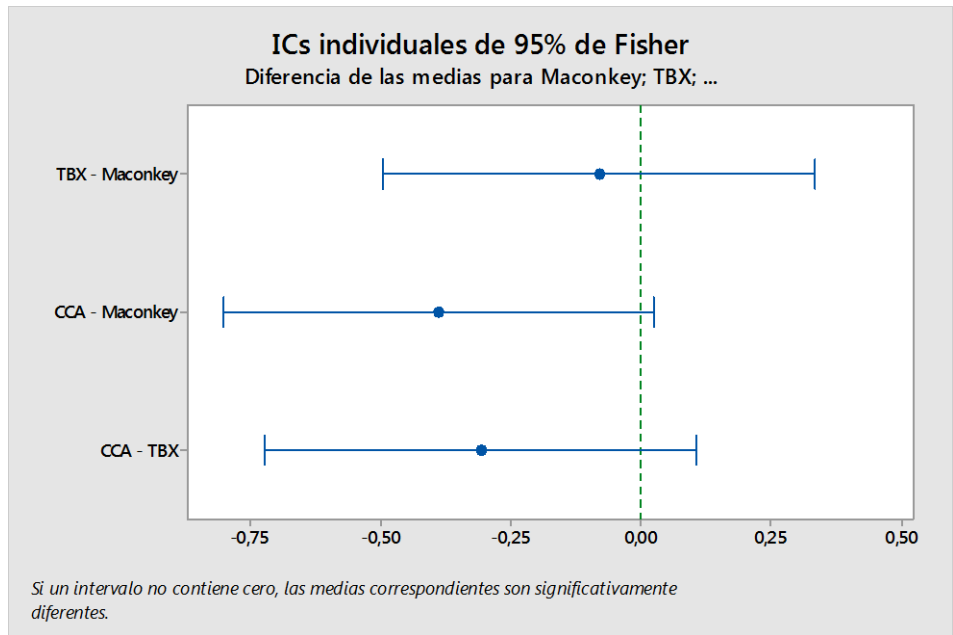


Figura A4-31 Gráfica de intervalos comparación medios de cultivo para Siembra en superficie

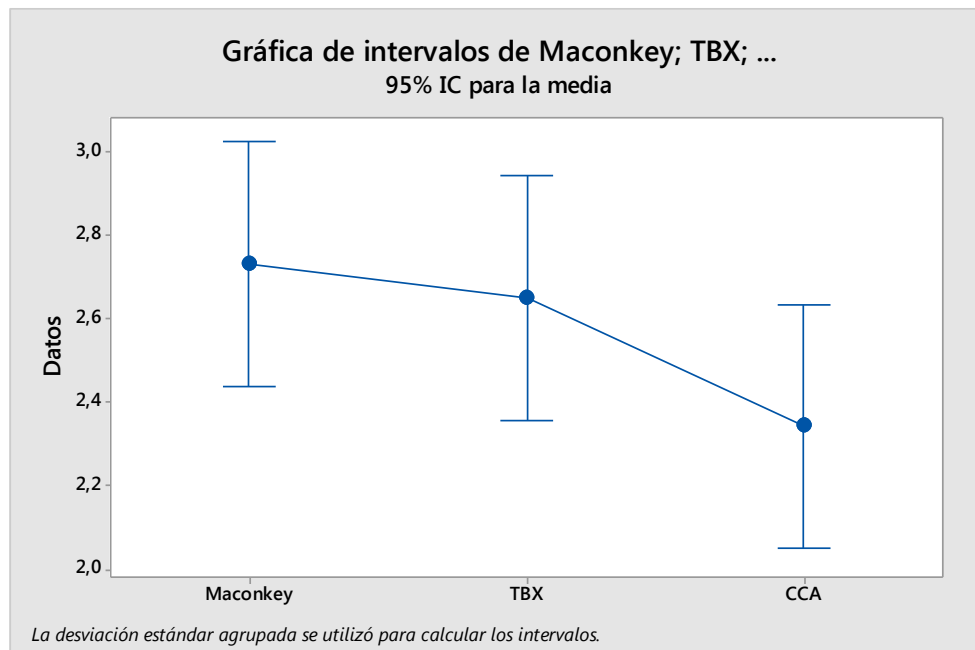


Figura A4-32 Comparación entre medias comparación medios de cultivo para Siembra en superficie

Tabla A4-16 Resultados ANOVA cualitativo comparación medios de cultivo para Siembra en superficie

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0,2530	0,1265	2,94	0,129
Error	6	0,2585	0,043		
Total	8	0,5116			

Comparación entre métodos analíticos

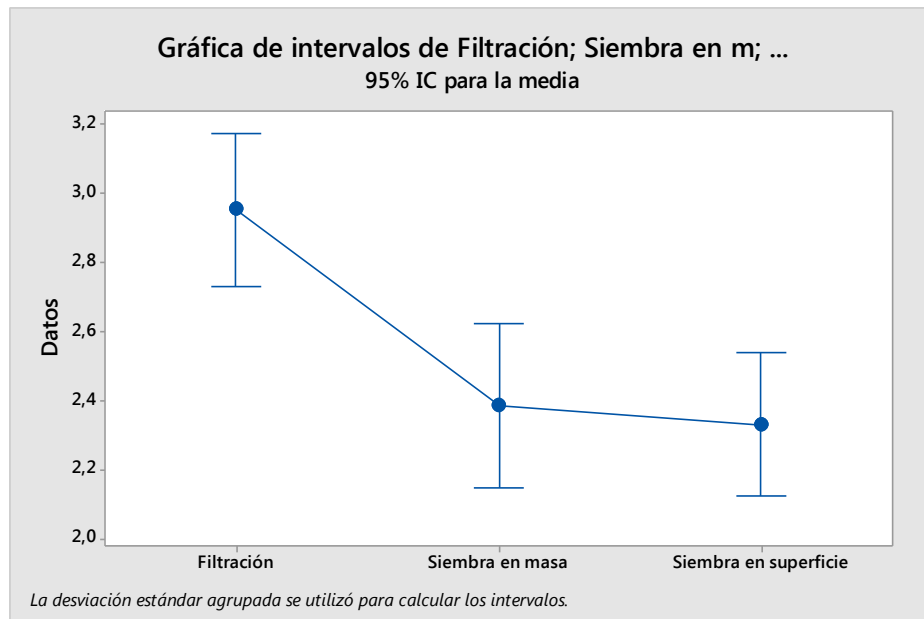


Figura A4-33 Gráfica de intervalos comparación métodos analíticos

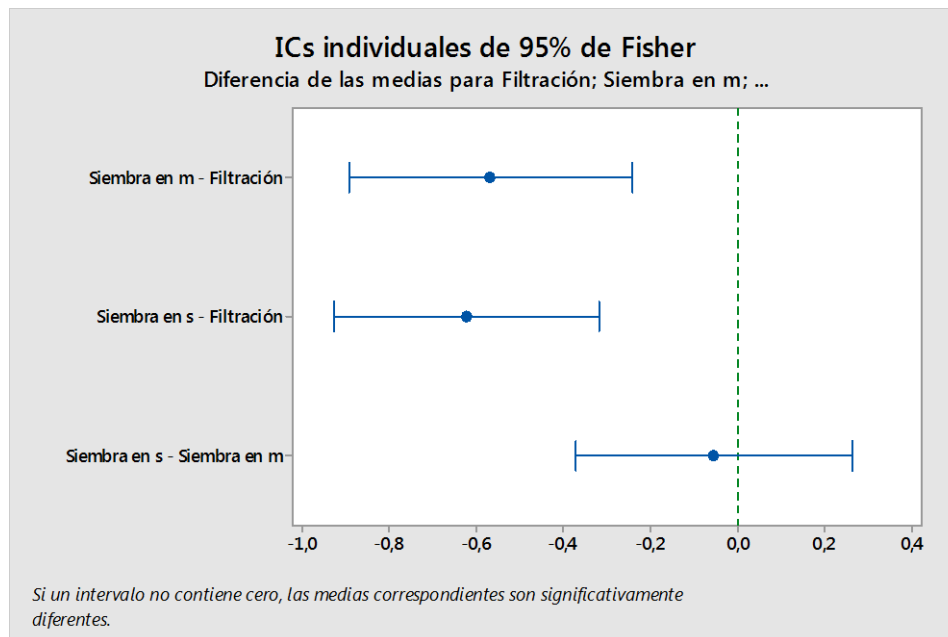


Figura A4-34 Comparación entre medias comparación métodos analíticos

Tabla A4-17 Resultados ANOVA cualitativo comparación métodos analíticos

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	1,93	0,9664	10,59	0,001
Error	21	1,91	0,09124		
Total	23	3,84			

Análisis de resultados de cada método

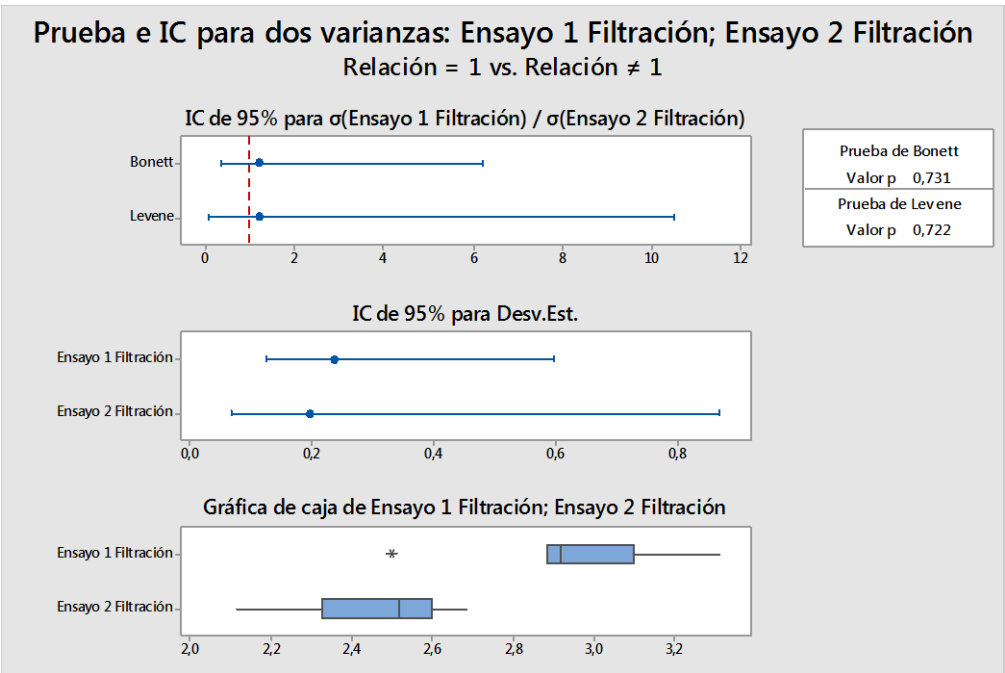


Figura A4-35. Intervalo de confianza de las desviaciones entre ensayos para filtración

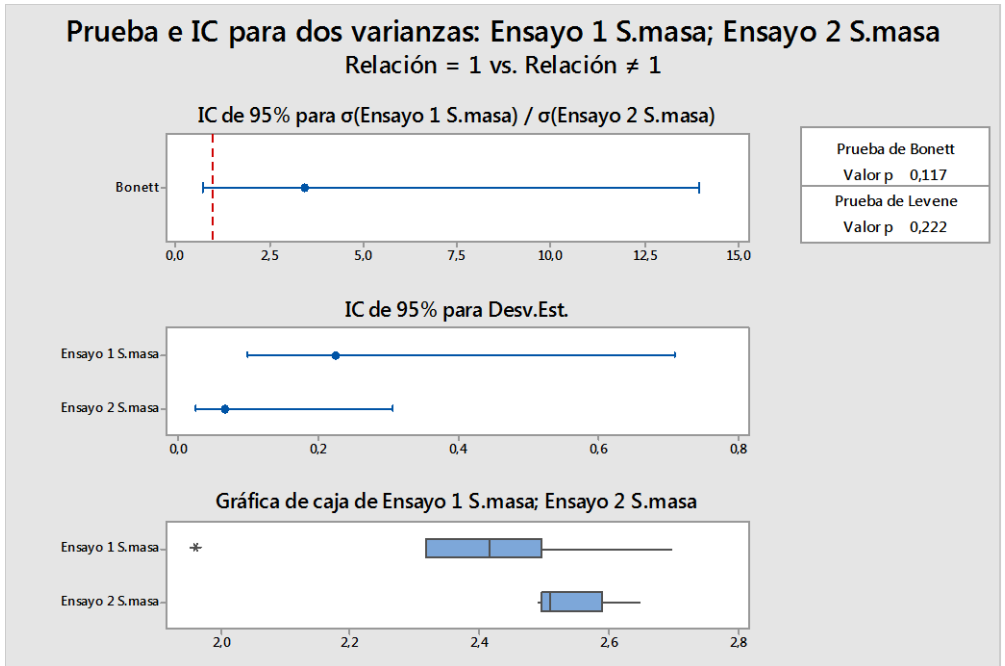


Figura A4-36 Intervalo de confianza de las desviaciones entre ensayos para siembra en masa

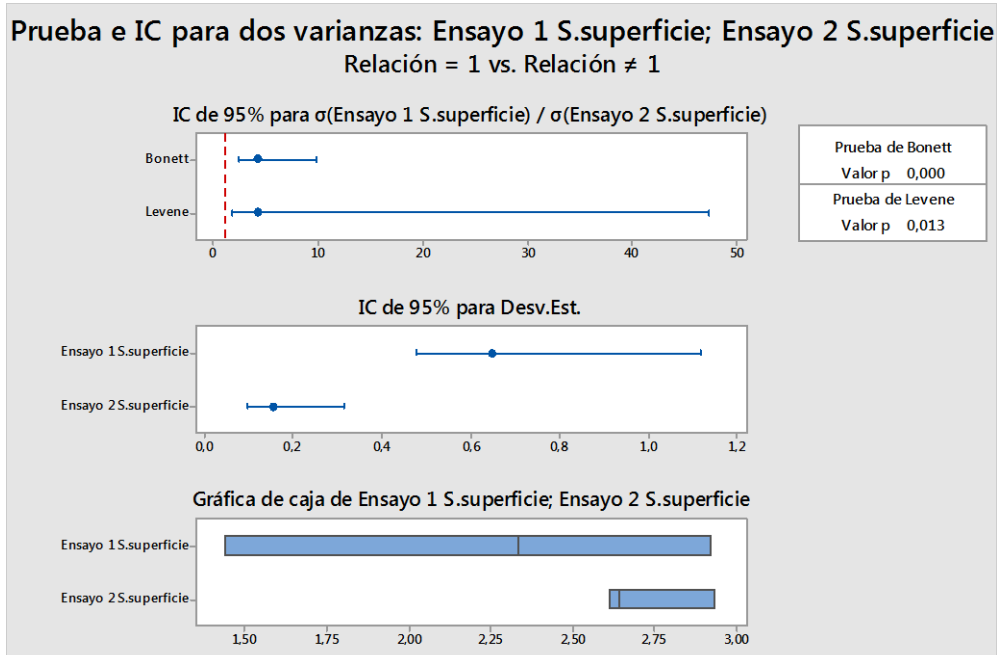


Figura A4-37. Intervalo de confianza de las desviaciones entre ensayos para siembra en superficie

RESULTADOS ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE VARIABLES INFLUYENTES EN EL DIAGNÓSTICO DE FANGOS HIGIENIZADOS

En este apartado se amplían los resultados comentados en el apartado 4.3.1

Análisis *E.faecalis*

Tratamiento mesófilo

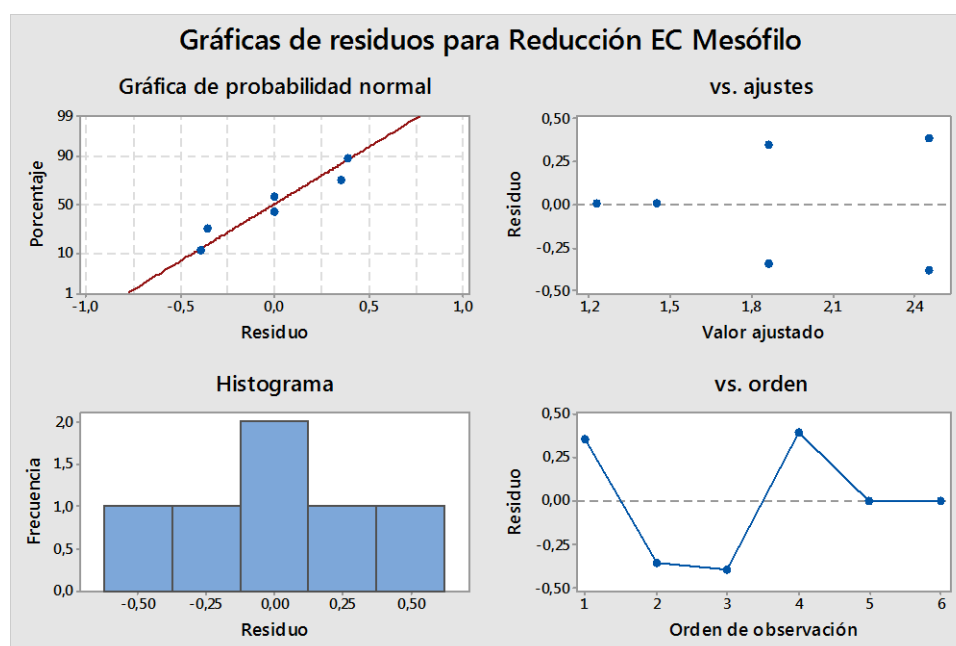


Figura A4-38. Análisis de los residuos comparación TRH tratamiento mesófilo

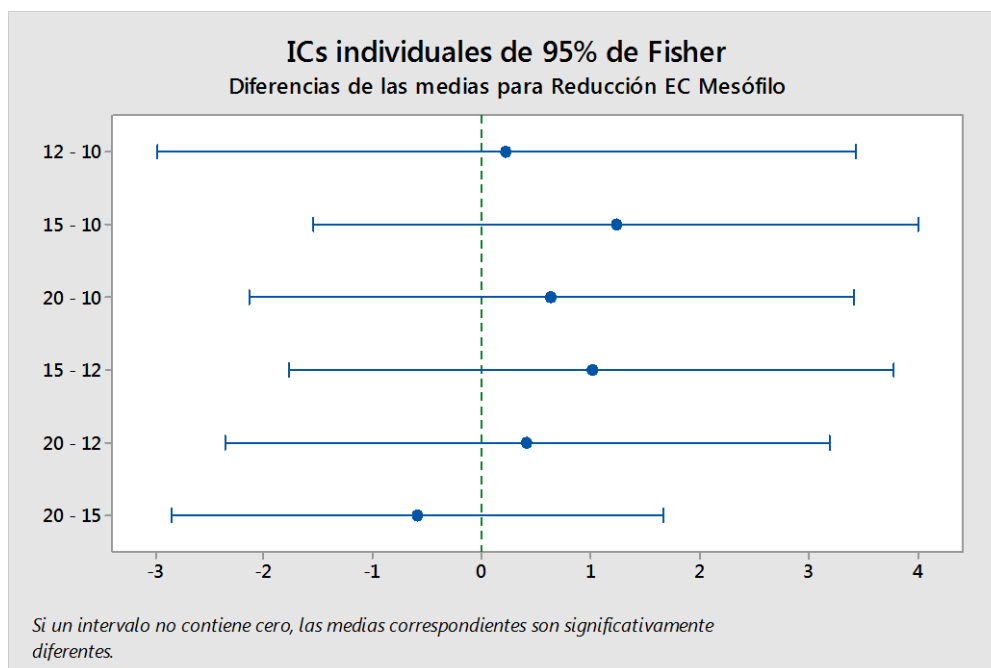


Figura A4-39 Comparación entre medias comparación TRH tratamiento mesófilo

Tabla A4-18 Resultados ANOVA cuantitativo TRH para tratamiento mesófilo

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	3,65	1,218	1,08	0,452
Error	4	4,999	1,125		
Total	7	8,153			

Tratamiento termófilo

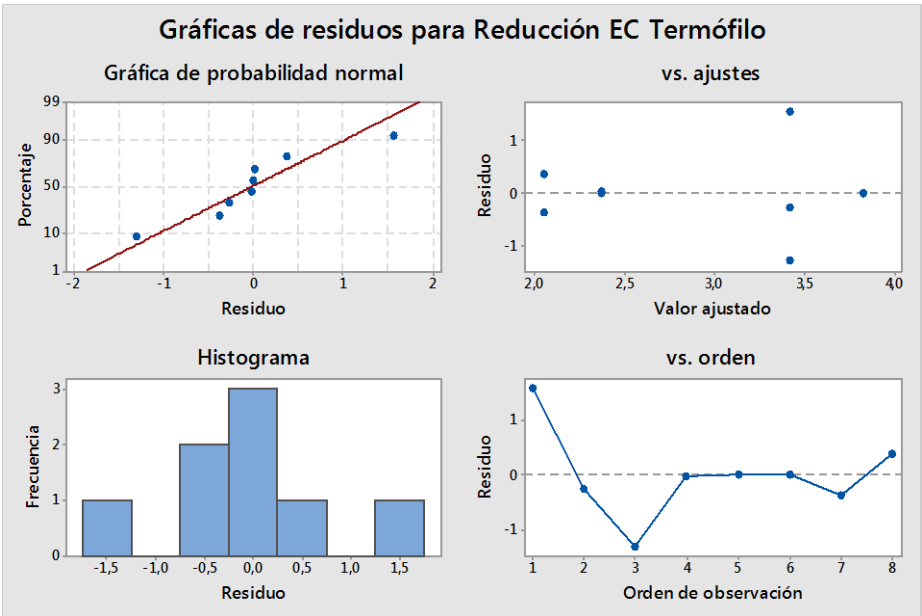


Figura A4-40. Análisis de los residuos comparación TRH tratamiento termófilo

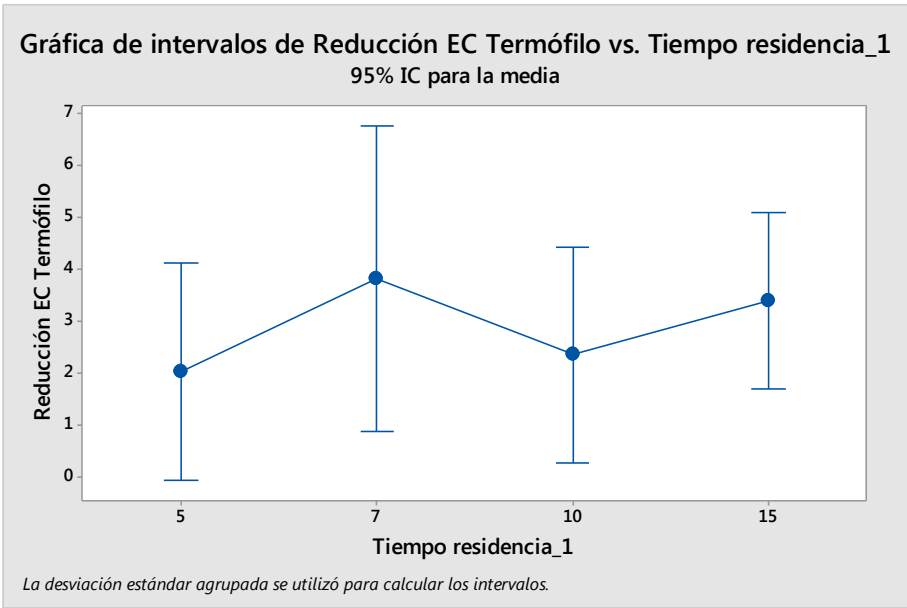


Figura A4-41 Gráfica de intervalos comparación TRH tratamiento termófilo

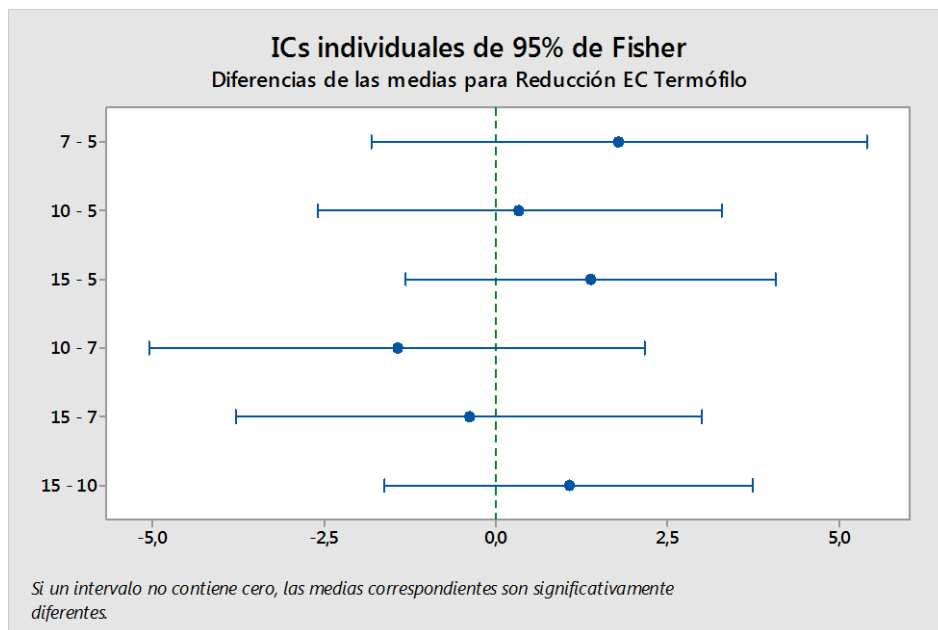


Figura A4-42 Comparación entre medias comparación TRH tratamiento termófilo

Tabla A4-19 Resultados ANOVA cuantitativo TRH para tratamiento termófilo

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	1,27	0,4235	1,53	0,419
Error	2	0,55	27,69		
Total	5	1,82			

Tratamiento ATAD

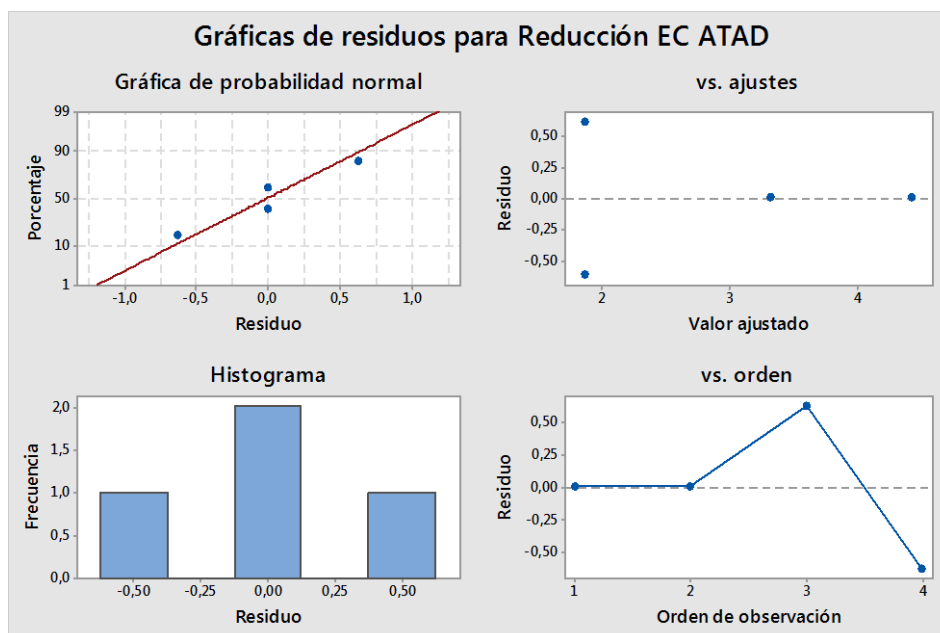


Figura A4-43. Análisis de los residuos comparación TRH tratamiento ATAD

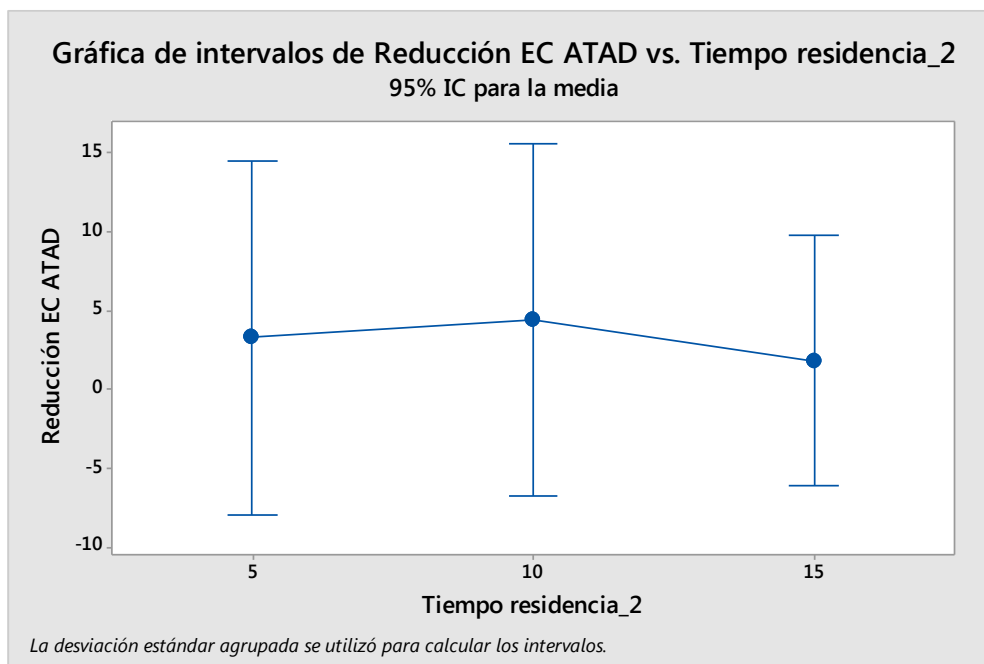


Figura A4-44 Gráfica de intervalos comparación TRH tratamiento ATAD

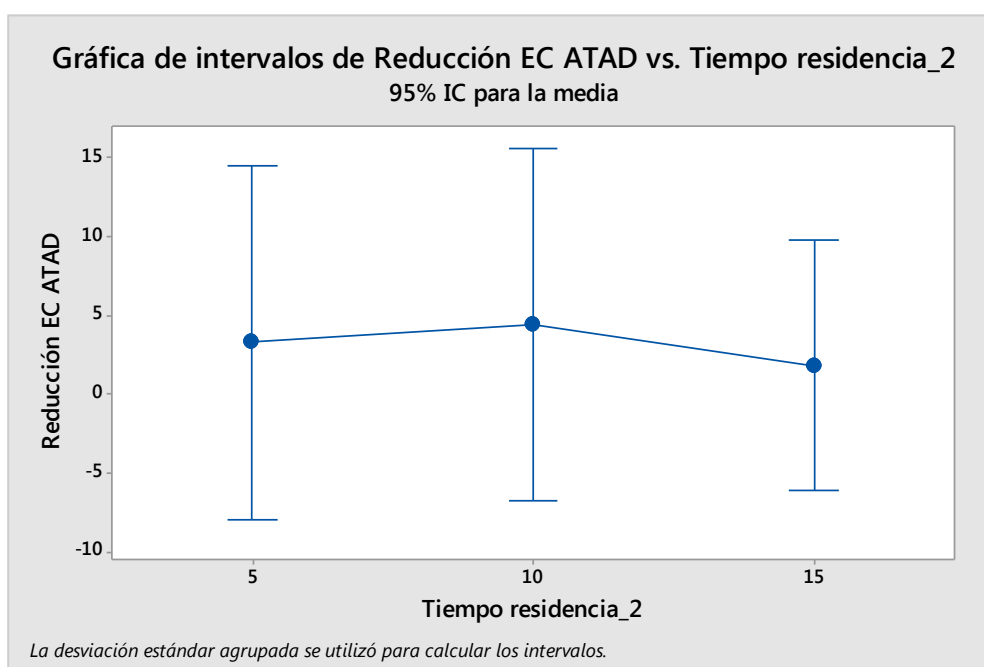


Figura A4-45 Comparación entre medias comparación TRH tratamiento ATAD

Tabla A4-20 Resultados ANOVA cuantitativo TRH para tratamiento ATAD

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	4,64	2,32	2,97	0,379
Error	1	0,78	0,789		
Total	3	5,42			

Tabla A4-21. Resultados ANOVA cualitativo Reducción de *E.faecalis* por tratamientos

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	7,6458	3,8229	33,71	0,001
Error	5	0,5670	0,1134		
Total	7	8,2129			

Tratamiento y TRH para *E.coli*

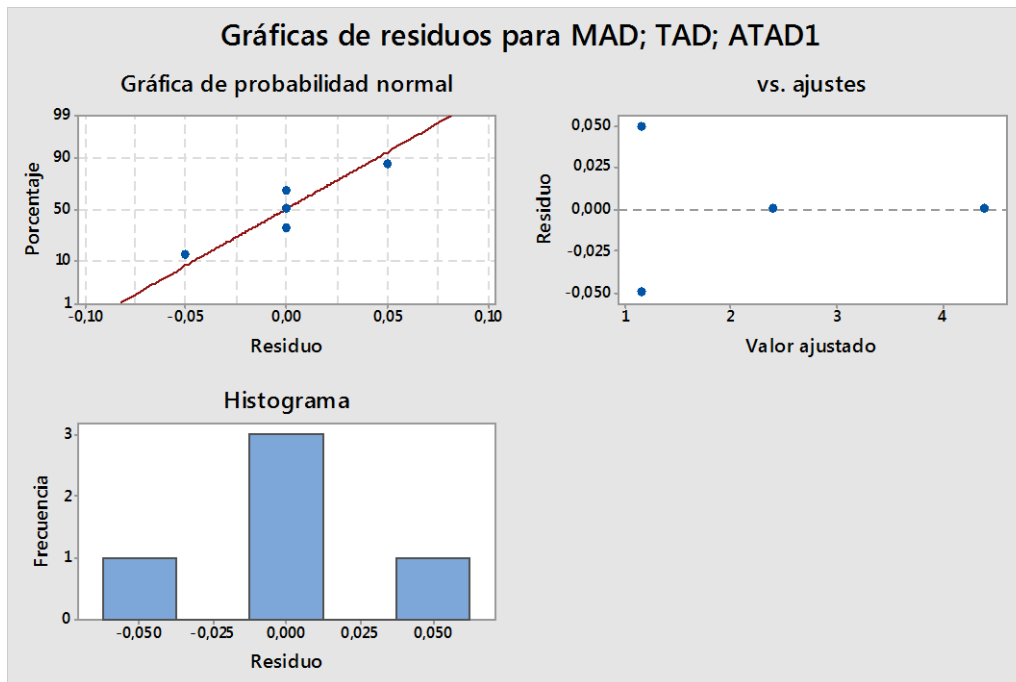


Figura A4-46 Análisis de los residuos comparación tratamientos para *E.coli*

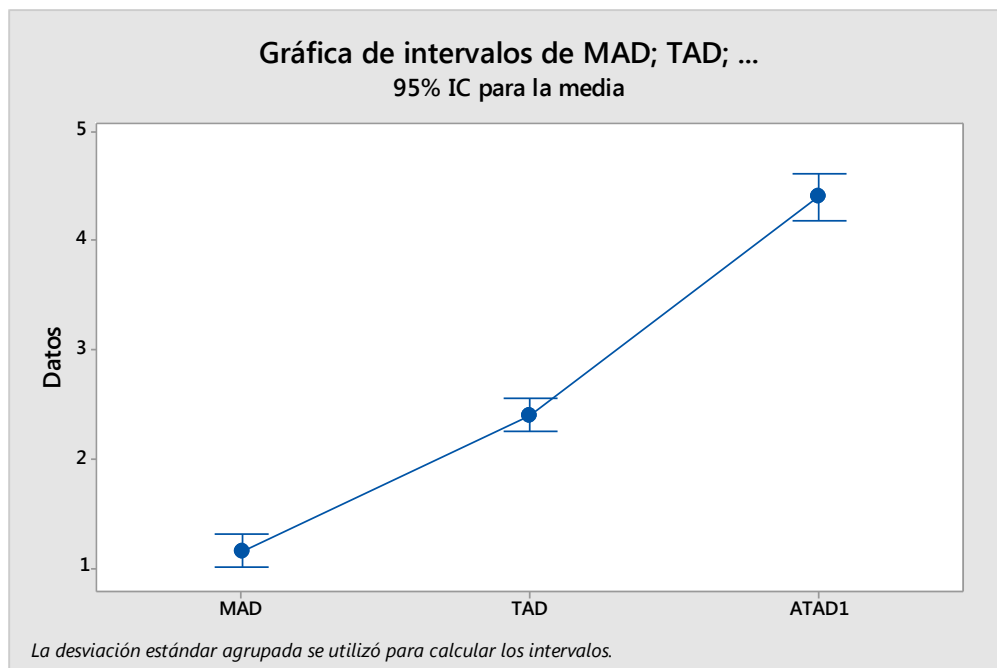


Figura A4-47 Gráfica de intervalos comparación tratamientos para *E.coli*

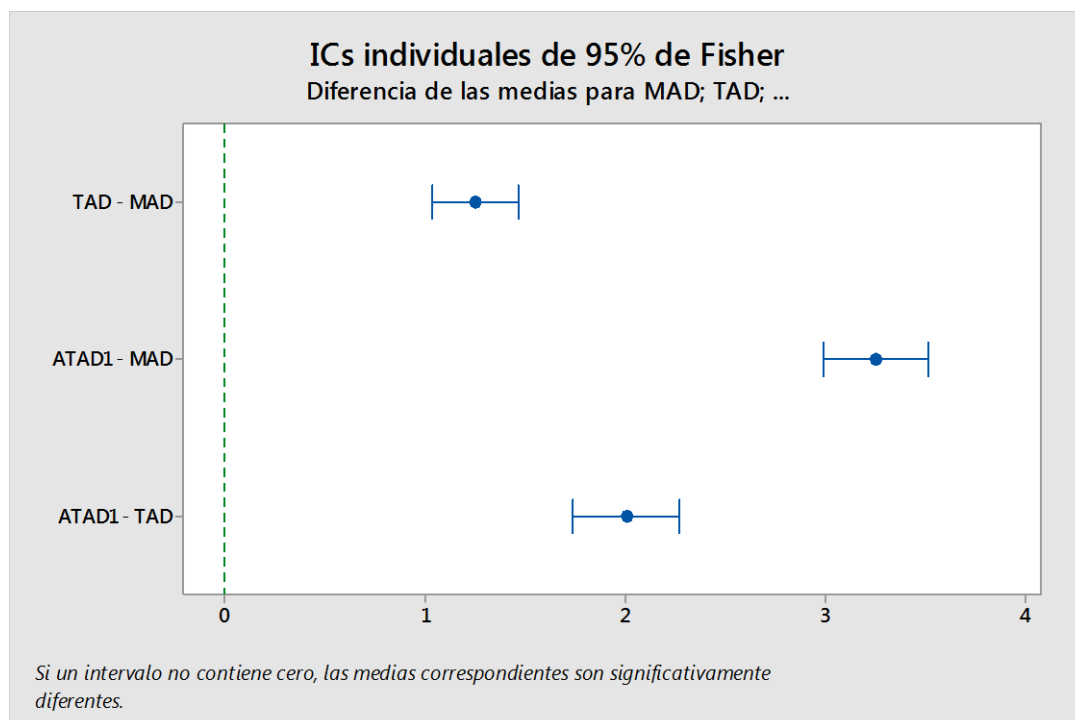


Figura A4-48 Comparación entre medias comparación tratamientos para *E.coli*

Tabla A4-22 Resultados ANOVA cualitativo tratamientos para *E.coli*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	7,07	3,53	1415	0,001
Error	2	0,005	0,0025		
Total	4	7,08			

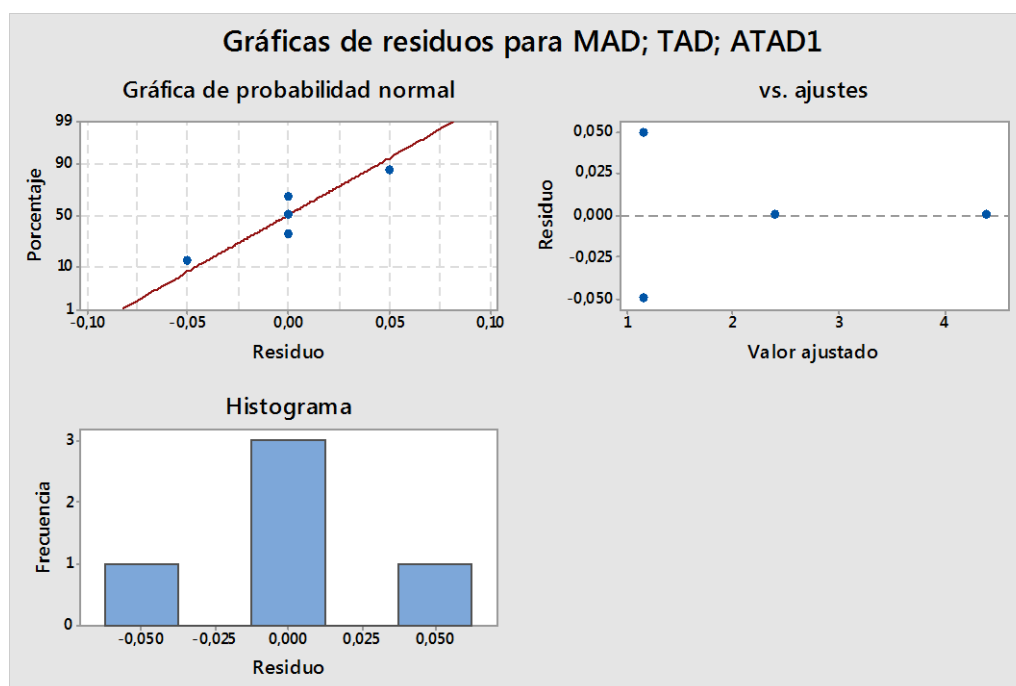


Figura A4-49 Análisis de los residuos comparación tratamientos para *E.coli*

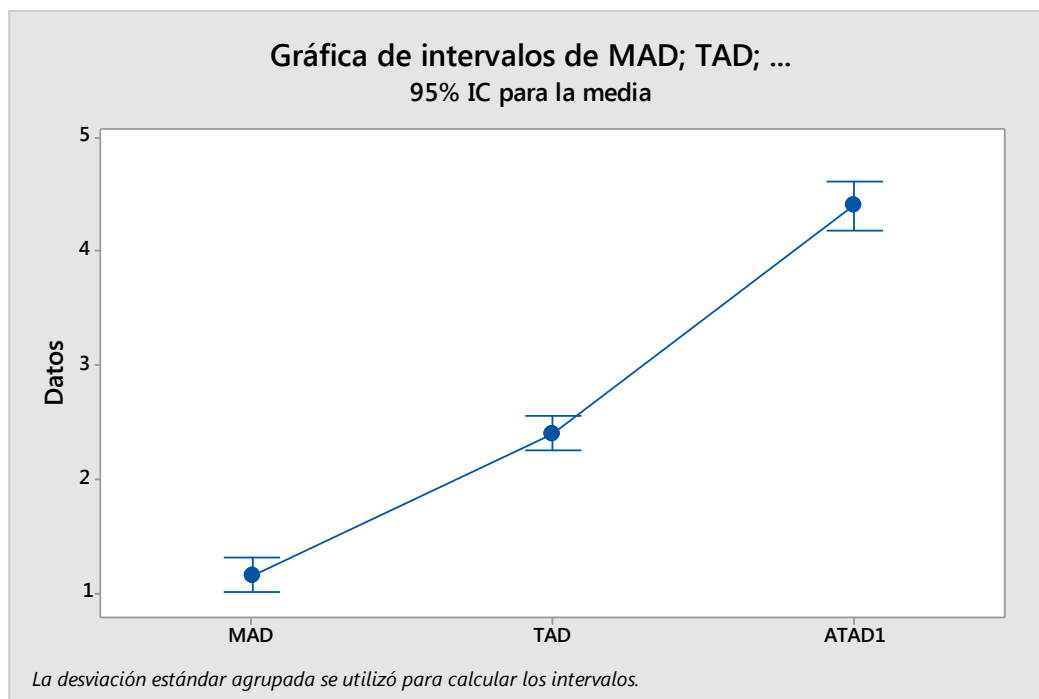


Figura A4-50 Gráfica de intervalos comparación tratamientos para *E.coli*

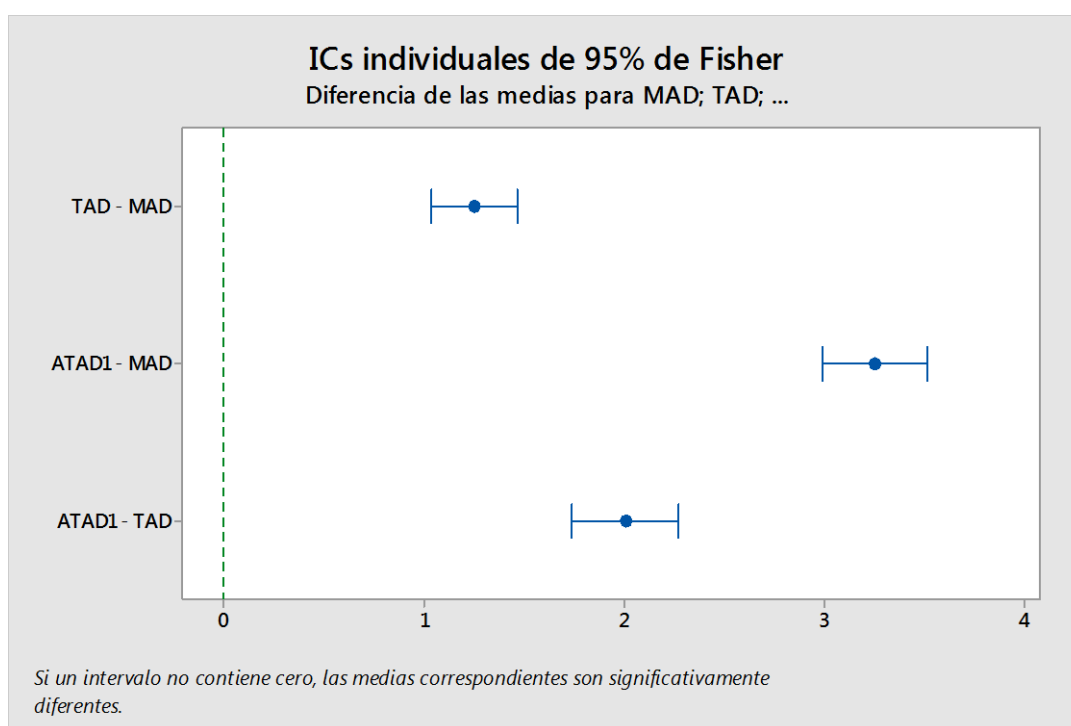


Figura A4-51 Comparación entre medias comparación tratamientos para *E.coli*

Tratamiento mesófilo

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	4,64	2,32	2,97	0,379
Error	1	0,78	0,789		
Total	3	5,42			

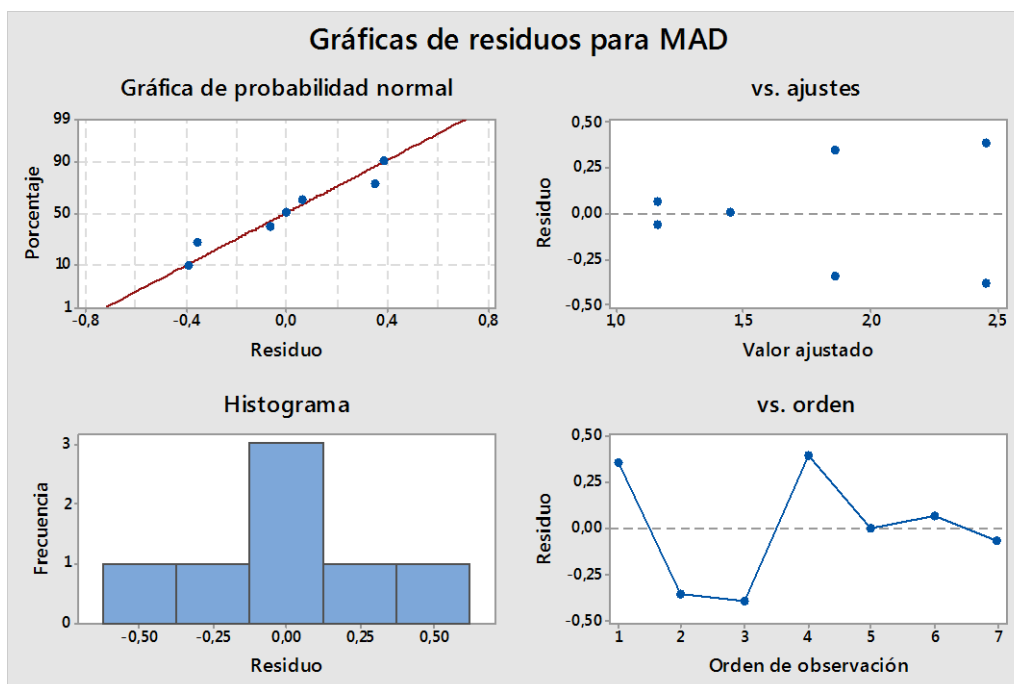


Figura A4-52. Análisis de los residuos comparación TRH tratamiento mesófilo *E.coli*

Tabla A4-23 Resultados ANOVA cualitativo tratamientos para *E.coli*

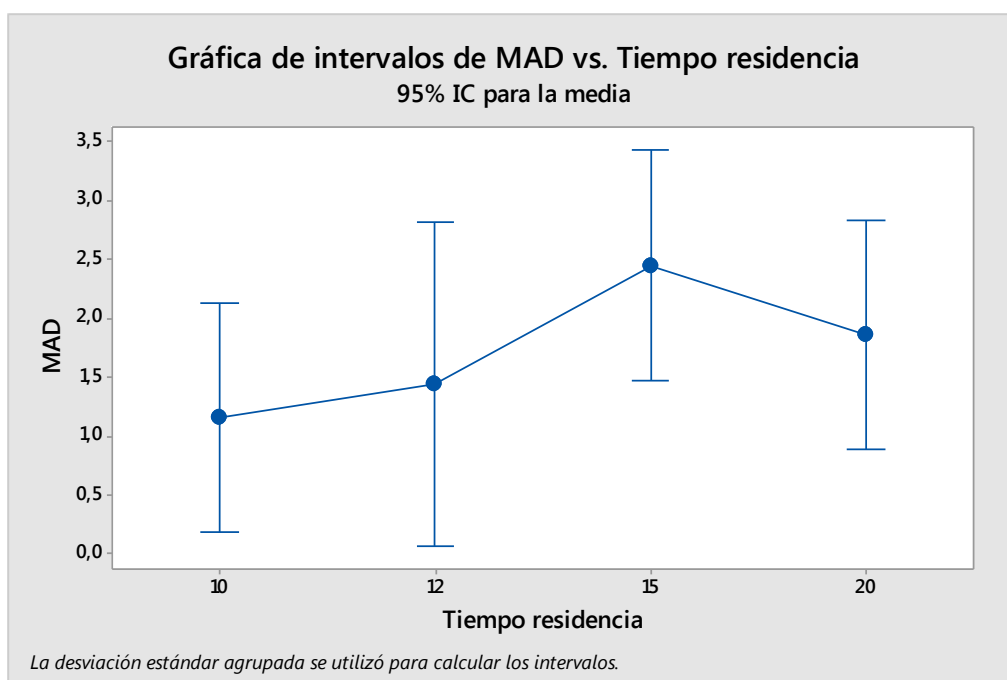


Figura A4-53 Gráfica de intervalos comparación TRH tratamiento mesófilo *E.coli*

Tratamiento termófilo

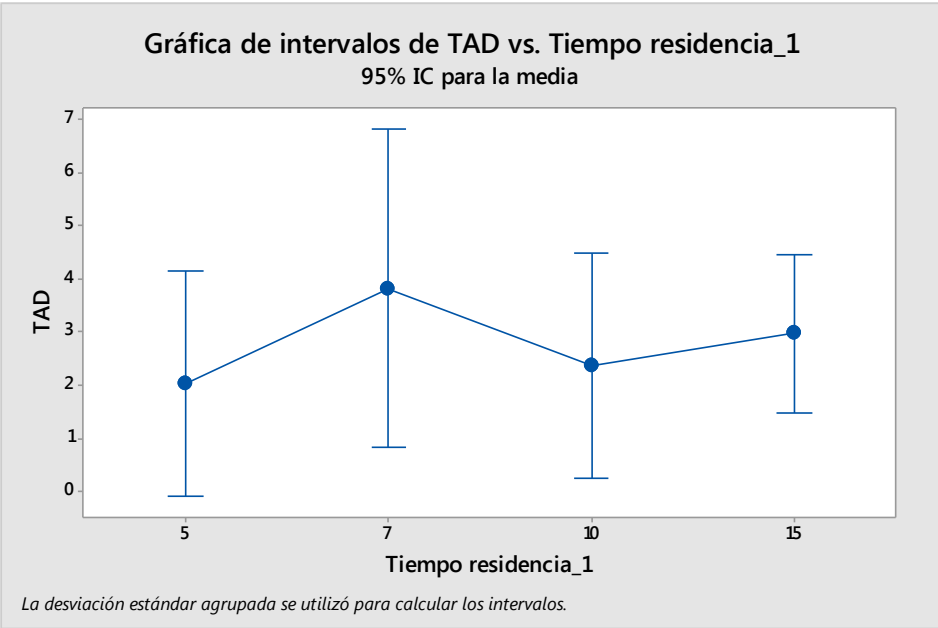


Figura A4-54 Gráfica de intervalos comparación TRH tratamiento termófilo E.coli

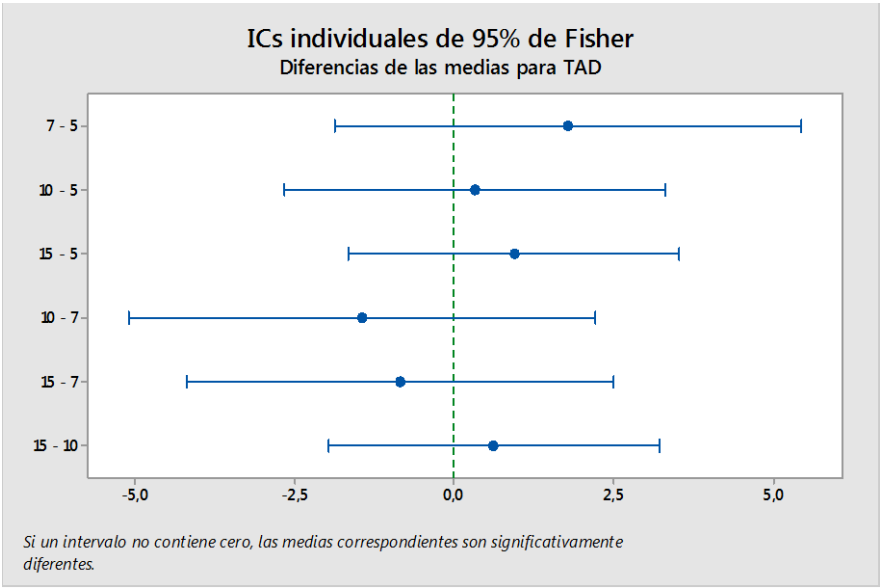


Figura A4-55Comparación entre medias comparación TRH tratamiento termófilo E.coli

Tabla A4-24 Resultados ANOVA cuantitativo TRH para tratamiento mesófilo E.coli

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	1,79	0,5981	3,19	0,183
Error	3	0,5326	0,8754		
Total	6	2,36			

Tratamiento ATAD

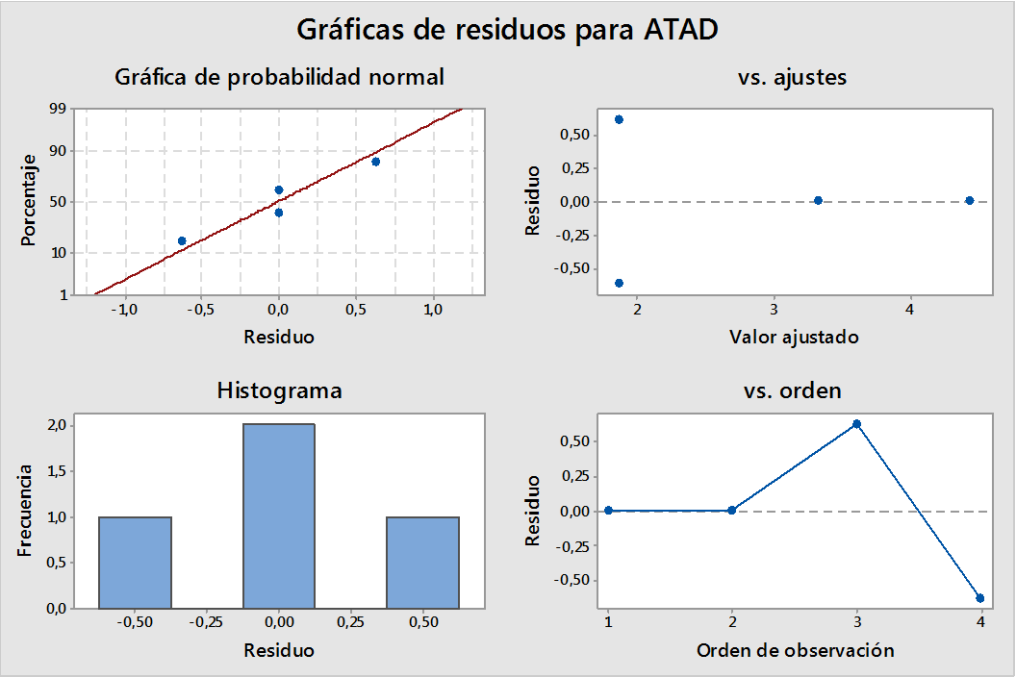


Figura A4-56 Análisis de los residuos comparación TRH tratamiento ATAD E.coli

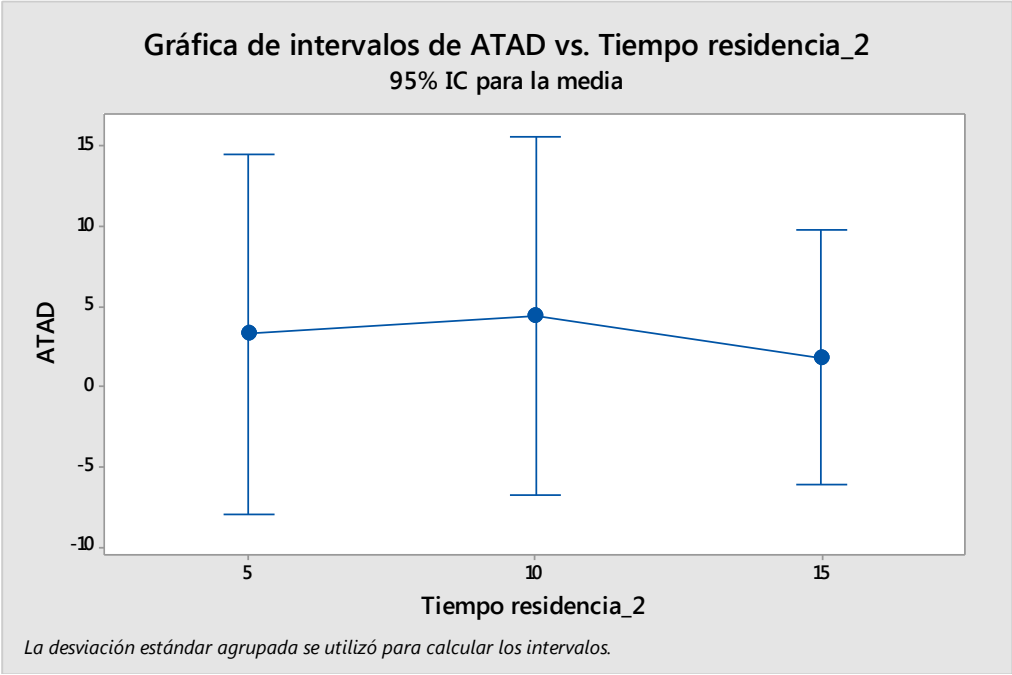


Figura A4-57 Gráfica de intervalos comparación TRH tratamiento ATAD E.coli

Tabla A4-25 Resultados ANOVA cuantitativo TRH para tratamiento termófilo E.coli

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	1,69	0,578	3,52	0,185
Error	3	0,5126	0,8653		
Total	6	2,2026			

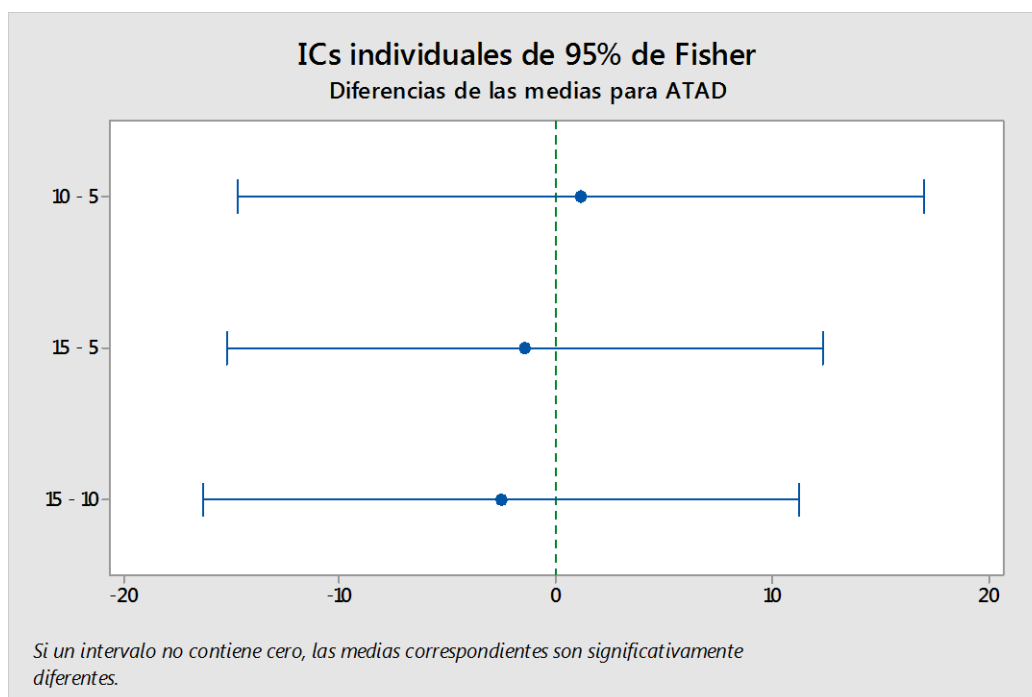


Figura A4-58 Comparación entre medias comparación TRH tratamiento ATAD E.coli

Tabla A4-26 Resultados ANOVA cuantitativo TRH para tratamiento ATAD E.coli

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	4,64	2,32	2,97	0,379
Error	1	0,78	0,789		
Total	3	5,42			

Coliformes totales

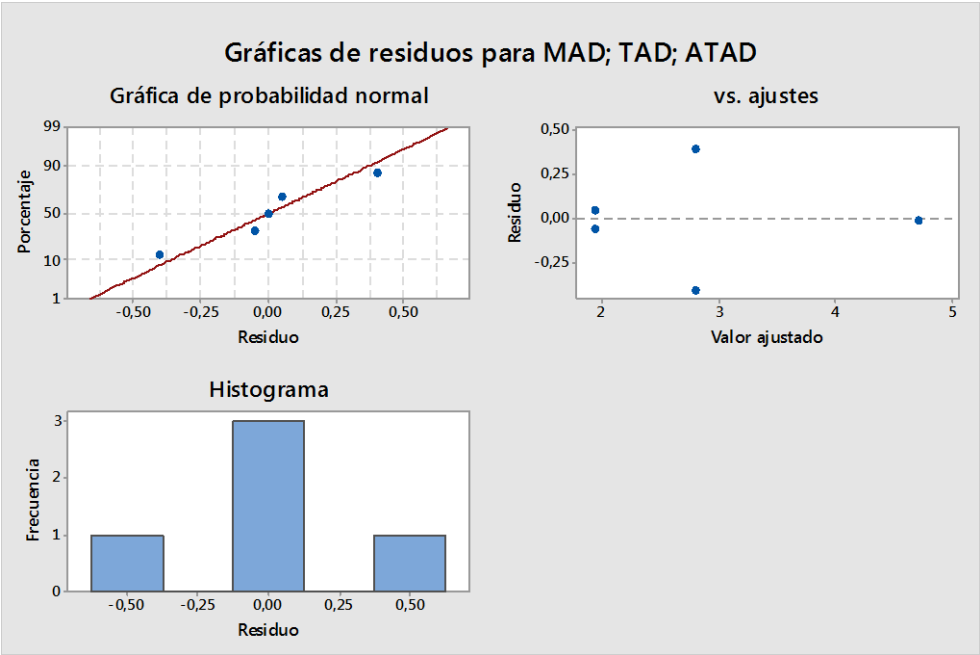


Figura A4-59 Análisis de los residuos comparación tratamientos Coliformes totales

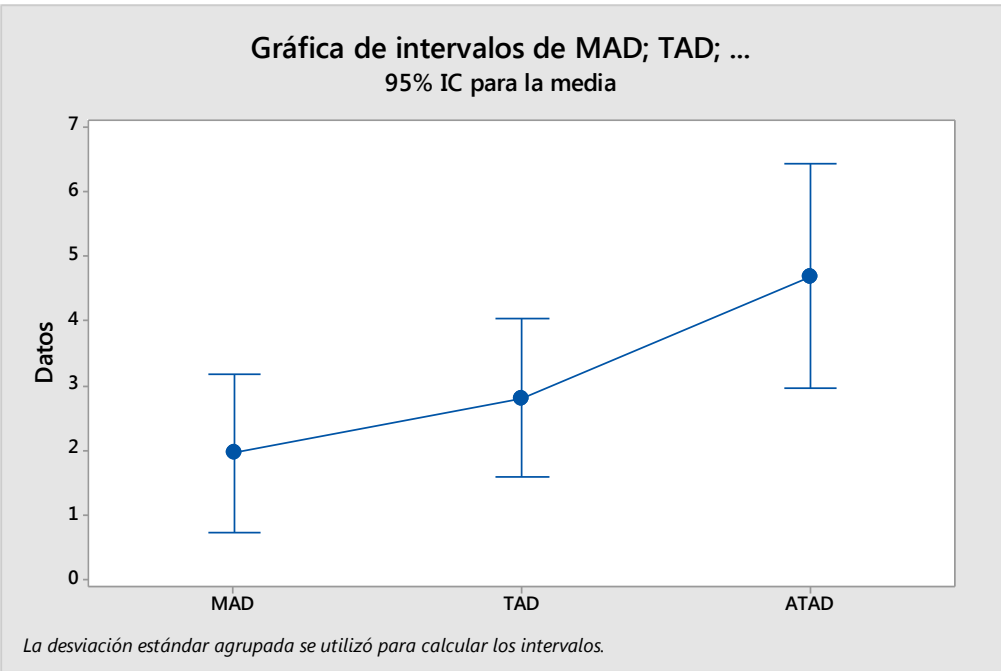


Figura A4-60 Gráfica intervalos comparación tratamientos Coliformes totales

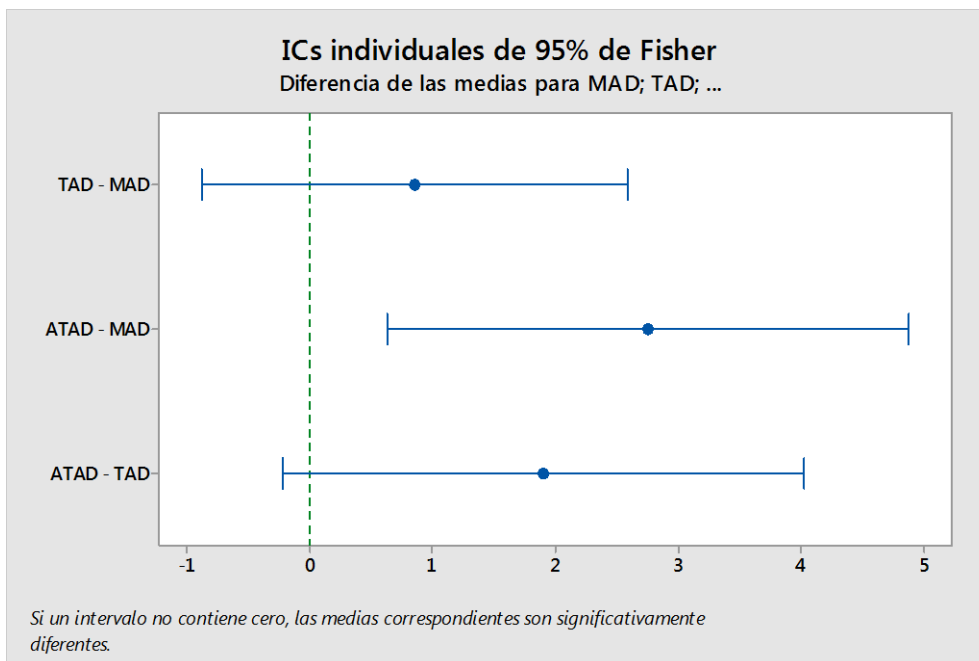


Figura A4-61 Comparación de medias comparación tratamientos Coliformes totales

Tabla A4-27 Resultados ANOVA cualitativo o tratamientos Coliformes totales

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	5,03	2,52	15,53	0,060
Error	2	0,3250	0,1625		
Total	4	5,3720			

S.aureus

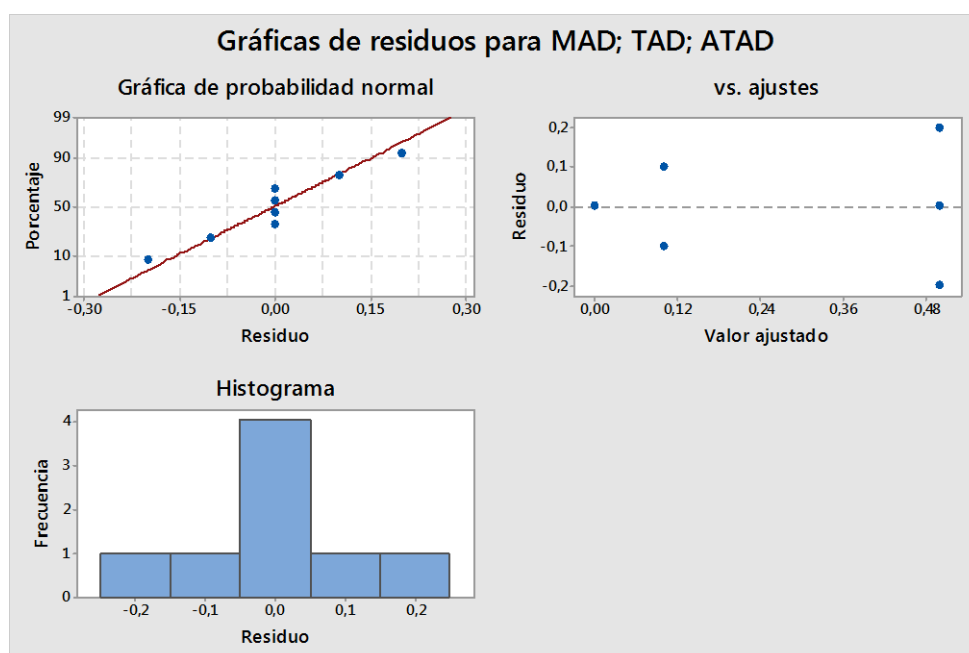


Figura A4-62 Análisis de los residuos comparación tratamientos *S.aureus*

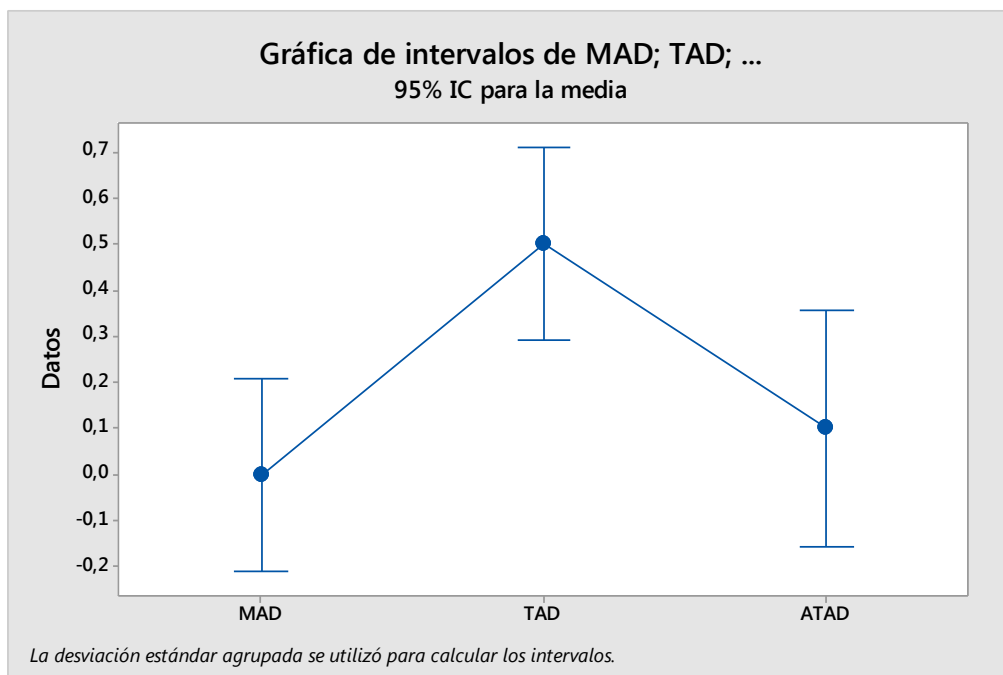


Figura A4-63 Gráfica intervalos comparación tratamientos *S.aureus*

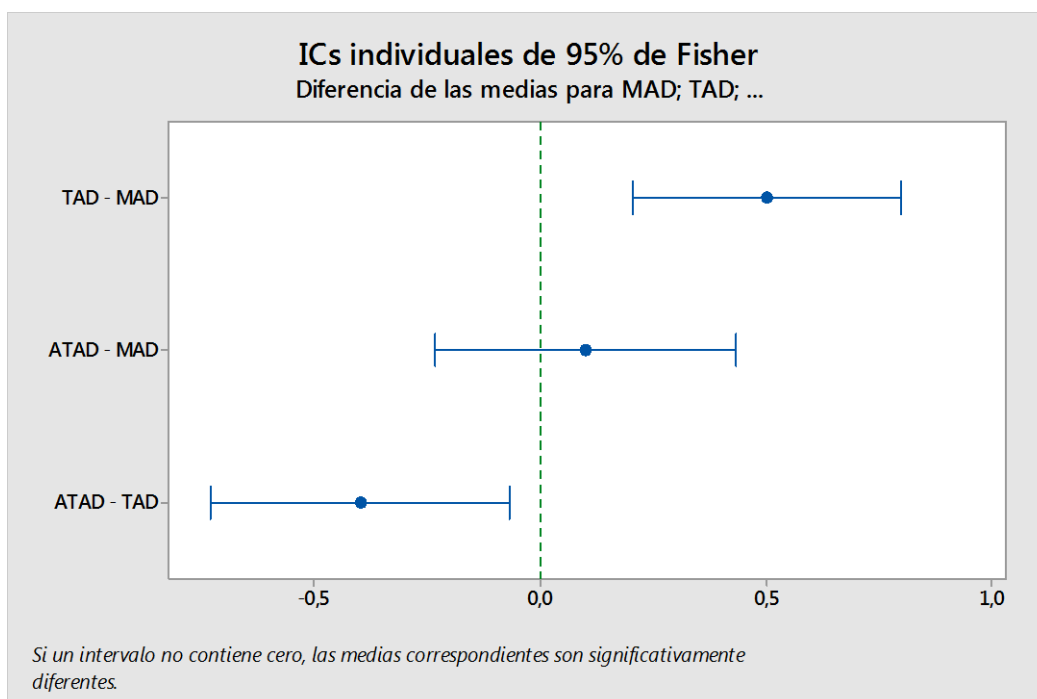


Figura A4-64 Comparación de medias comparación tratamientos *S.aureus*

Tabla A4-28 Resultados ANOVA cualitativo o tratamientos *S.aureus*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0,4087	0,204	10,22	0,017
Error	5	0,100	0,02		
Total	7	0,5087			

Resultados parámetros físico químicos

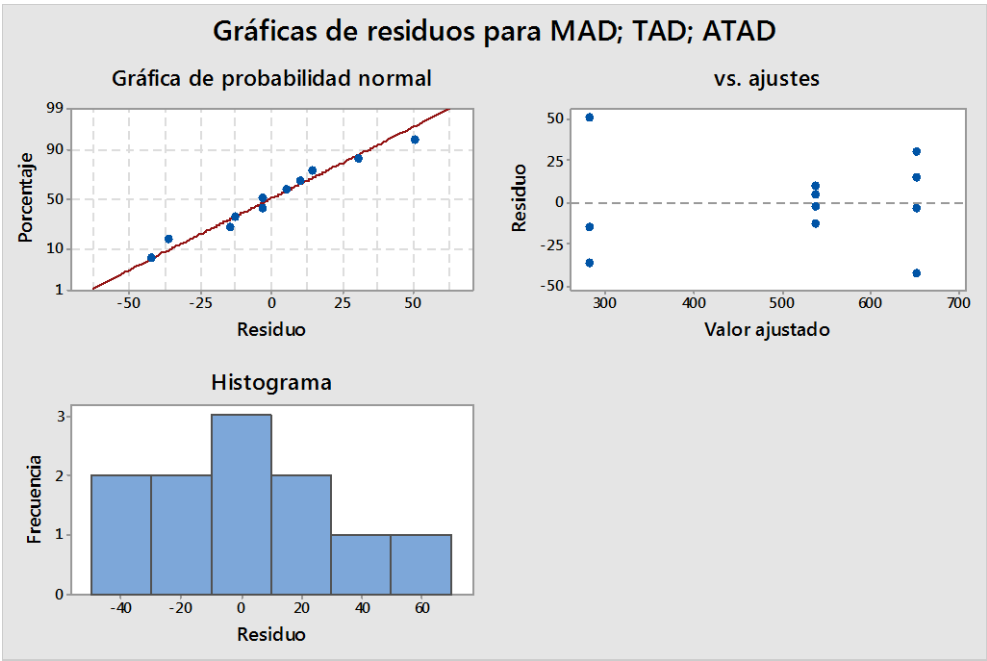


Figura A4-65 Análisis de los residuos comparación tratamientos Amonio

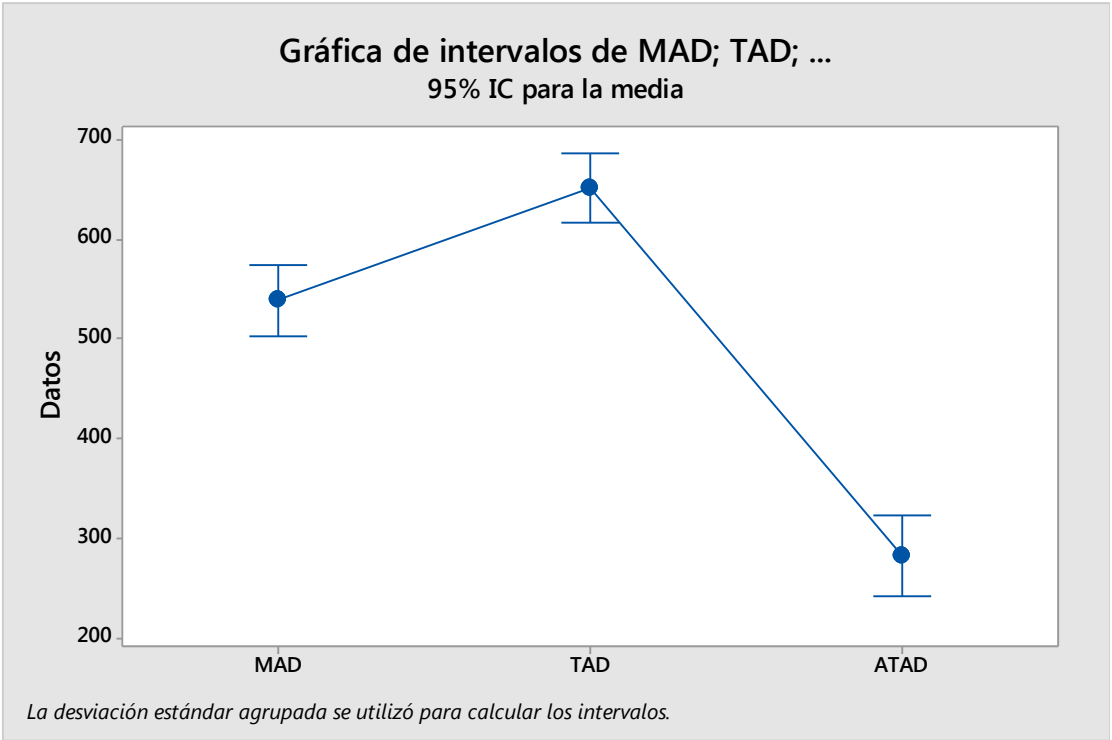


Figura A4-66 Gráfica intervalos comparación tratamientos Amonio

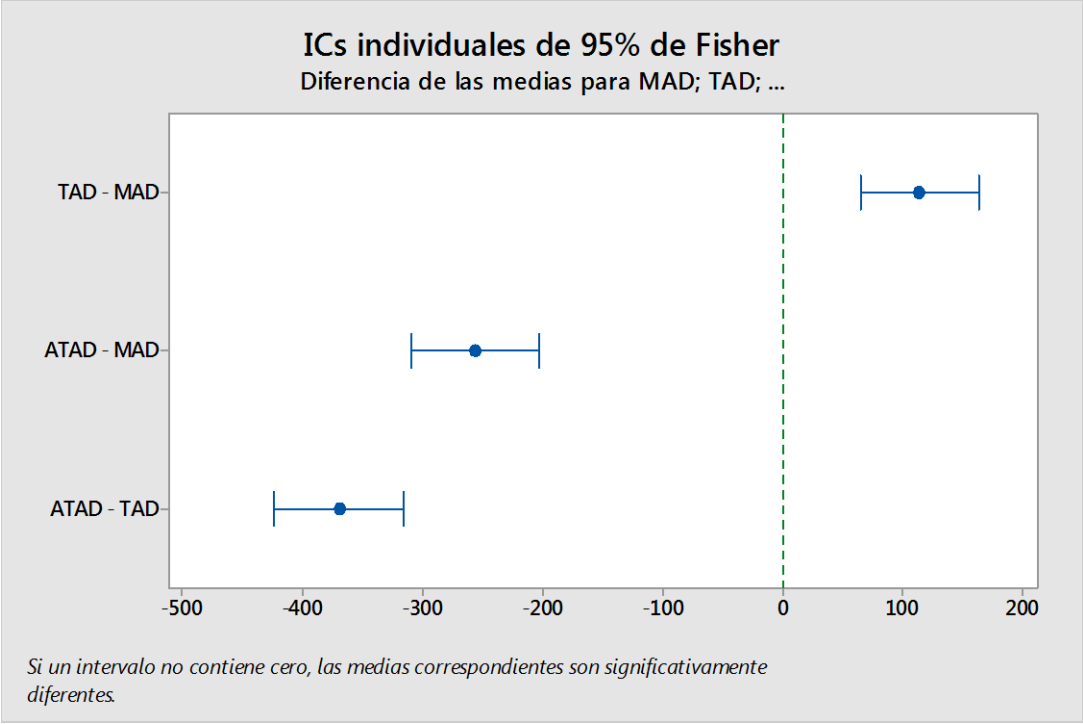


Figura A4-67 Comparación de medias comparación tratamientos Amono

Tabla A4-29 Resultados ANOVA cualitativo o tratamientos Amonio

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	239743	118971	130,4	0,001
Error	8	7354	919		
Total	10	247087			

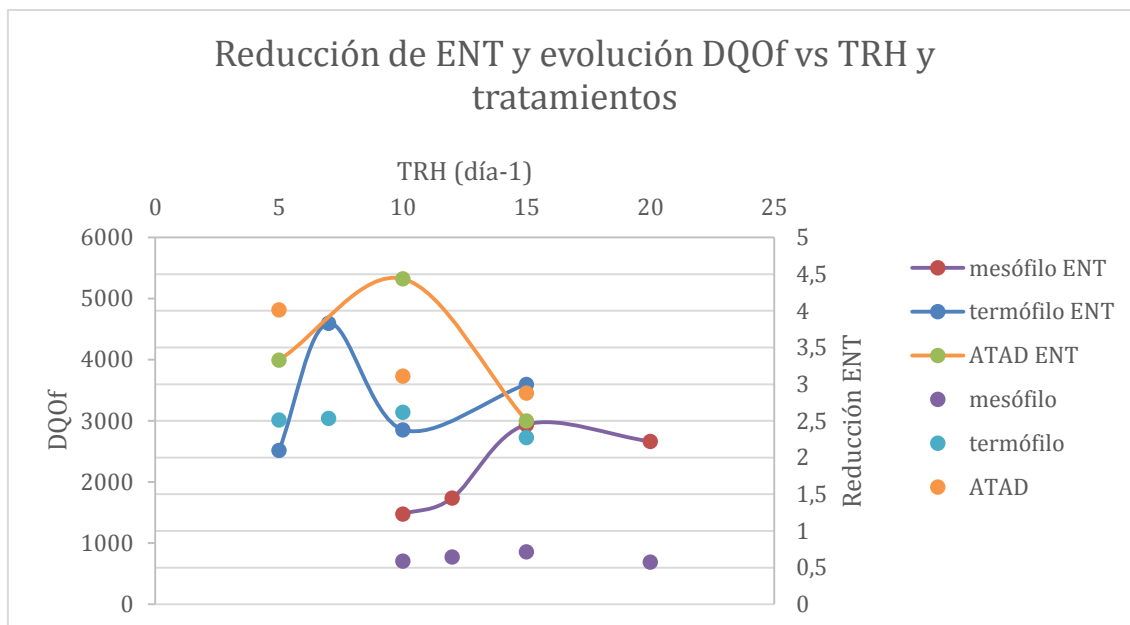


Figura A4-68 Evolución de DQOf y reducción de *E. faecalis* para TRH y diferentes tratamientos

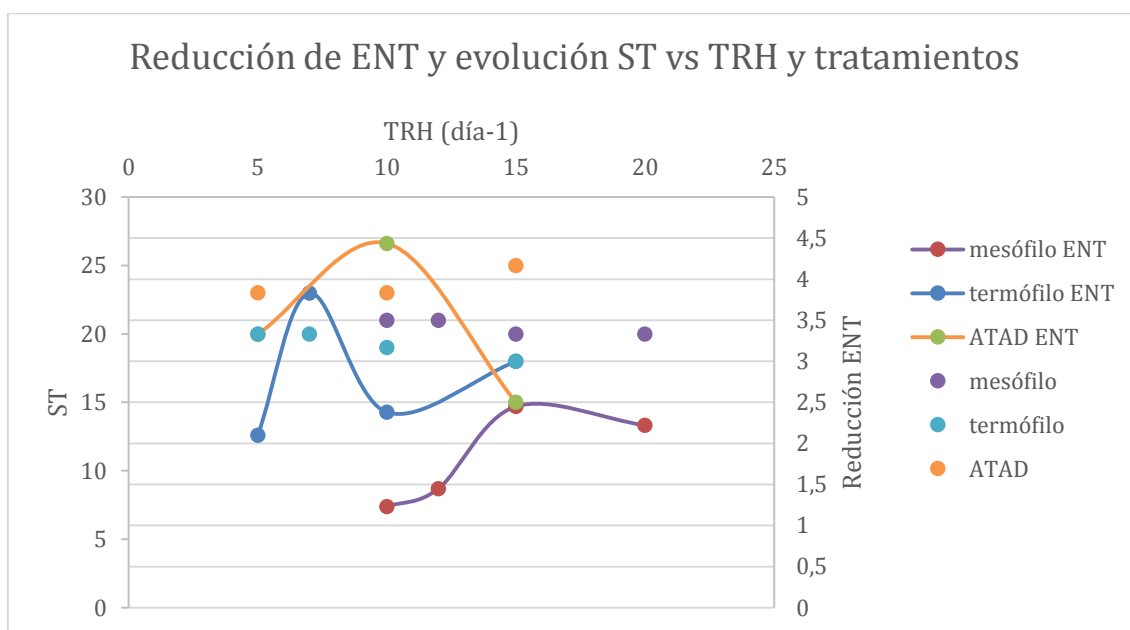


Figura A4-69 Evolución de ST y reducción de *E. faecalis* para TRH y diferentes tratamientos

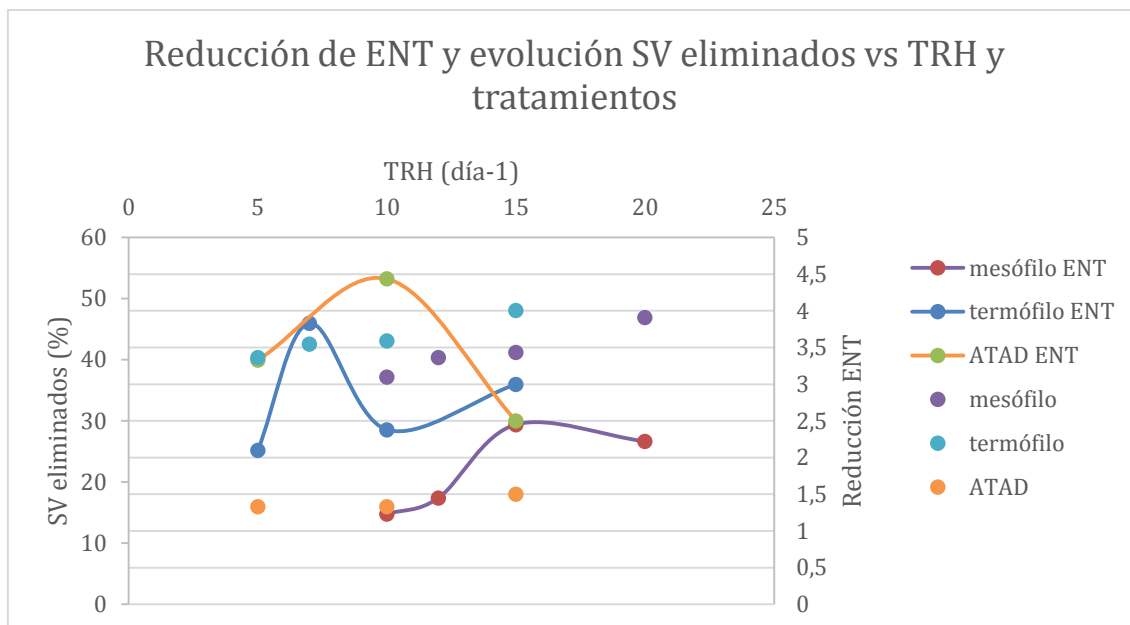


Figura A4-70 Evolución de SV eliminados y reducción de *E. faecalis* para TRH y diferentes tratamientos

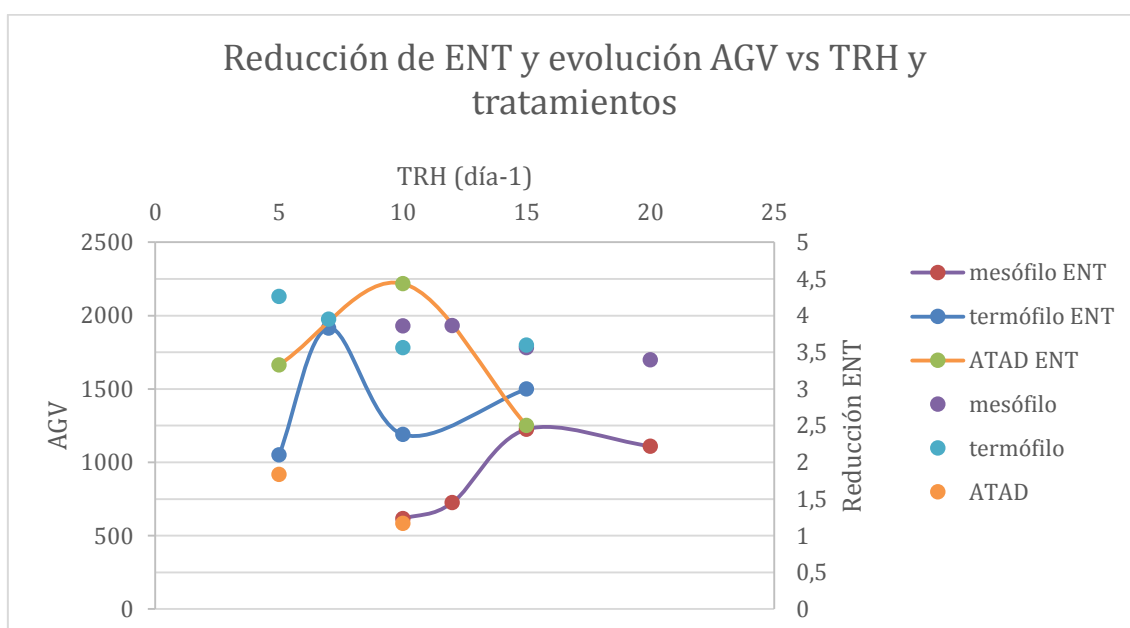


Figura A4-71 Evolución de AGV o y reducción de *E. faecalis* para TRH y diferentes tratamientos