

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

***“TRATAMIENTOS HIDROTÉRMICOS PARA LA
REVALORIZACIÓN DE LODOS DE INDUSTRIA
ALIMENTARIA: OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS E
HIDRATOS DE CARBONO”***

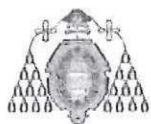
TRABAJO FIN DE MASTER

POR

MANUEL GARCÍA SAN MIGUEL

JULIO, 2016





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Sergio Collado Alonso (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D. **Manuel García San Miguel** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 10ª promoción curso 2015-2016.

Oviedo, 11 de julio de 2016

D. Sergio Collado Alonso(Tutor)

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

ÍNDICE

Resumen.....	I
Abstract.....	II
Índice de figuras.....	III
Índice de imágenes.....	V
Índice de tablas	VI
1. Introducción.....	1
2. Materiales y métodos	5
2.1 Lodo inicial: origen y características	5
2.2 Desarrollo de HT y OH.....	5
2.2.1 Operación	5
2.2.2 Toma de muestras.....	8
2.2.3 Determinación del tiempo óptimo de tratamiento.....	8
2.3 Métodos de separación de proteínas	8
2.3.1 Precipitación con acetona.....	9
2.3.2 Precipitación con TCA	9
2.3.3 Precipitación con sulfato amónico	9
2.3.4 Precipitación por pH.....	9
2.3.5 Separación con resina.....	9
2.4 Métodos analíticos	10
2.4.1 Análisis del color.....	10
2.4.2 Medida del pH.....	11
2.4.3 Medida de la carga orgánica.....	11
2.4.4 Medida de sólidos.....	12
2.4.5 Medida de la concentración de proteínas y ácidos húmicos	13
2.4.6 Medida de la concentración de carbohidratos	14

2.4.7	Medida de la concentración de ácidos urónicos.....	14
2.4.8	Medida de la concentración de ADN.....	15
2.4.9	Medida de la concentración de carbono.....	15
2.4.10	Análisis de tamaños.....	16
3.	Resultados y discusión.....	17
3.1	Evolución de las características generales del lodo.....	17
3.1.1	pH.....	17
3.1.2	DQO.....	18
3.1.3	Sólidos.....	19
3.1.4	Color.....	22
3.1.5	Carbono soluble.....	23
3.2	Productos solubles generados.....	24
3.2.1	Proteínas.....	24
3.2.2	Ácidos húmicos.....	25
3.2.3	Carbohidratos.....	26
3.2.4	Ácidos urónicos.....	27
3.2.5	ADN.....	28
3.2.6	Tamaños.....	29
3.2.7	Determinación del tiempo óptimo.....	31
3.3	Evaluación de técnicas de separación de proteínas.....	32
4.	Conclusiones.....	43
5.	Referencias bibliográficas.....	45

RESUMEN

Los lodos de depuradora presentan una problemática intrínseca a sus características fisicoquímicas que dificulta su gestión. Actualmente, existen varias formas de gestión, como son la digestión anaerobia o el vertido. Sin embargo, estas técnicas comprometen el balance económico del sistema de tratamiento de aguas. Por ello, existen investigaciones sobre nuevos métodos de tratamiento de lodos, como son los tratamientos hidrotérmicos.

En este trabajo, se estudió el uso de la hidrólisis térmica y la oxidación húmeda como tratamientos para un lodo secundario espesado de una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR). Se analizó la evolución de las características generales del lodo (pH, DQO, sólidos, color y carbono soluble), así como los distintos compuestos solubilizados a partir del lodo: proteínas, ácidos húmicos, carbohidratos, ácidos urónicos y ADN. Estos compuestos tienen valor comercial, y tres de ellos están en altas concentraciones en el lodo: proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos. Se buscó el tiempo de tratamiento en el que la concentración de proteínas es mayor (0,24 mg/g SV en OH y 0,22 mg/g SV en HT) y se aplicaron diferentes métodos de purificación con el fin de obtener proteína lo más pura posible, ya que presenta un alto valor añadido, encontrando que el sulfato amónico es el método que mejores resultados proporciona para separar proteínas de ácidos húmicos y de carbohidratos, en cuanto a recuperación y resolución.

ABSTRACT

Activated sludge show many problems derived from their physicochemical characteristics that compromise their management. Currently, there are various ways of management, such as anaerobic digestion or landfilling. However, these techniques compromise economic balance of the wastewater treatment system. For this reason, there are several studies about new methods for the treatment of activated sludge, such as hydrothermal treatments.

In this work, thermal hydrolysis and wet oxidation were studied as treatments for a thickened secondary sludge from a Wastewater Treatment Plant (WWTP). The evolution of sludge's general characteristics was analysed (pH, COD, solids, colour and soluble carbon), as well as other solubilized compounds which are part of the sludge: proteins, humic acids, carbohydrates, uronic acids and DNA. These compounds have commercial value, and three of them are present in high concentrations in the sludge: proteins, humic acids and carbohydrates. The time when protein concentration is the highest was determined (0,24 mg/g VS in WO and 0,22 mg/g VS in TH) and different purification methods were applied in order to obtain pure protein, because of its high added value, finding out that ammonium sulphate was the method that showed the best results for isolating proteins from humic acids and carbohydrates, attending to performance and resolution.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del procedimiento seguido para la temporalización de la toma de muestras	Pág. 8
Figura 2. Estructura de la tirosina y de una sal sódica de ácido húmico	Pág. 13
Figura 3. Evolución del pH durante la HT y la OH.....	Pág. 17
Figura 4. Evolución de la DQOt durante la HT y la OH.....	Pág. 18
Figura 5. Evolución de la DQOs durante la HT y la OH	Pág. 19
Figura 6. Evolución de ST y SV durante la HT y la OH.....	Pág. 20
Figura 7. Evolución del IVF durante la HT y la OH.....	Pág. 21
Figura 8. Desarrollo del color durante la HT y la OH.....	Pág. 22
Figura 9. Evolución de la concentración de COT y CI durante la HT y la OH	Pág. 23
Figura 10. Evolución de la concentración de proteínas durante la HT y la OH.....	Pág. 24
Figura 11. Evolución de la concentración de AH durante la HT y la OH.....	Pág. 25
Figura 12. Evolución de la concentración de carbohidratos durante la HT y la OH	Pág. 26
Figura 13. Evolución de la concentración de ácidos urónicos durante la HT y la OH	Pág. 27
Figura 14. Evolución de la concentración de ADN durante la HT y la OH.....	Pág. 28
Figura 15. Evolución de las concentraciones de moléculas de tamaño comprendido entre 549 kDa y 151 kDa durante la HT y la OH.....	Pág. 29
Figura 16. Evolución de las concentraciones de moléculas de tamaño comprendido entre 151 kDa y 35 kDa durante la HT y la OH.....	Pág. 29
Figura 17. Evolución de las concentraciones de moléculas de tamaño comprendido entre 35 kDa y 13 kDa durante la HT y la OH.....	Pág. 30
Figura 18. Selección del tiempo óptimo para HT y OH.....	Pág. 31
Figura 19. Porcentajes medios de proteínas, AH y carbohidratos en el precipitado de cada método de extracción.....	Pág. 34

Figura 20. Comparación del factor de separación entre proteínas y ácidos húmicos en cada método para OH y HT	Pág. 38
Figura 21. Comparación del factor de separación entre proteínas y carbohidratos en cada método para OH y HT	Pág. 38
Figura 22. Porcentajes medios no retenidos por la resina, con la desviación representada por las barras de error	Pág. 40

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Diagrama de flujo del equipo	Pág. 6
Imagen 2a, 2b y 2c. Fotografías de las partes del reactor	Pág. 7
Imagen 3. pHmetro usado en todo el trabajo	Pág. 11
Imagen 4. Fotografía de las diferentes coloraciones en el análisis de la DQO	Pág. 11
Imagen 5. Equipos utilizados para la medida de la DQO.....	Pág. 12
Imagen 6. Fotografías del análisis de proteínas (izda.) y ácidos húmicos.....	Pág. 13
Imagen 7. Fotografía de un análisis de carbohidratos	Pág. 14
Imagen 8. Fotografía de los tubos usados para la recta de calibrado del análisis de ácidos urónicos	Pág. 14
Imagen 9. Fotografía de los tubos de un análisis de ADN	Pág. 15
Imagen 10. Equipo utilizado para el análisis de COT y CI	Pág. 15
Imagen 11. Equipo de HPLC utilizado.....	Pág. 16
Imagen 12. Volumen ocupado por el lodo en cada muestra tras 30 minutos de sedimentación en HT	Pág. 21
Imagen 13. Volumen ocupado por el lodo en cada muestra tras 30 minutos de sedimentación en OH.....	Pág. 22
Imagen 14. Tubos con sobrenadante de OH e HT.....	Pág. 23
Imagen 15. Fotografía de un sobrenadante de HT en buen estado y uno tras 2 meses en cámara a 5°C.....	Pág. 33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones iniciales del lodo usado en el experimento.....	Pág. 5
Tabla 2. Valores de los principales parámetros analizados en el tiempo óptimo de HT y OH	Pág. 32
Tabla 3. Parámetros del lodo nuevo empleado en las extracciones.....	Pág. 34
Tabla 4. Porcentajes y desviaciones de recuperación en precipitado de proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos para cada método; y factores de separación de proteínas respecto a ácidos húmicos y carbohidratos	Pág. 35
Tabla 5. Porcentajes y desviaciones de recuperación en precipitado de proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos para cada método; y factores de separación de proteínas respecto a ácidos húmicos y carbohidratos	Pág. 40

1. INTRODUCCIÓN

La generación de residuos es inherente a la existencia de vida pues, todos los seres vivos, para mantenerse así, vivos, utilizan una serie de moléculas, transformándolas en otras que ya no necesitan y expulsan. Por ejemplo, los humanos transforman mediante la respiración el oxígeno del aire en dióxido de carbono, siendo éste el residuo; o los alimentos, a los que se les extrae la mayoría de los nutrientes que contienen, mientras que el resto, junto con productos de las reacciones, conforman las heces, siendo éstas un residuo de la alimentación.

Si se extrapola la cantidad de residuos que produce un individuo a una población, se obtienen cantidades muy elevadas. De forma natural, los ecosistemas son capaces de transformar los residuos, lo que permite su entrada de nuevo en los ciclos biogeoquímicos correspondientes, transformándolos en nutrientes para otros seres vivos que los usarán y generarán, de nuevo, residuos a partir de ellos. Sin embargo, esta capacidad de asimilación natural es limitada, por lo que cantidades demasiado elevadas no pueden ser transformadas y acaban dañando el ecosistema. Es por ello que se han desarrollado sistemas antropogénicos que permiten tratar los residuos de poblaciones, emulando y potenciando los procesos naturales que suceden en los ecosistemas.

Quizás el mayor desarrollo se ha logrado en el tratamiento de aguas. Tanto las poblaciones humanas como las industrias utilizan gran cantidad de agua, que resultará contaminada, tanto por las actividades cotidianas diarias como por la actividad industrial. Dentro de las industrias, el sector que más agua utiliza y, por tanto, contamina, es el sector alimentario. Esta contaminación puede ser de muy diferente naturaleza, causada por compuestos solubles, insolubles, partículas de diferente tamaño... lo que determinará el tipo de tratamiento de depuración al que se someterá. A nivel industrial, el sistema de tratamiento más extendido es el conocido como tratamiento con fangos activos o lodos activos. Este tratamiento va encaminado a reducir la carga orgánica biodegradable del agua mediante el uso de comunidades microbianas que se alimenten de la misma. Es un tratamiento efectivo y barato, logrando reducciones de hasta el 95%. Sin embargo, y siguiendo con lo comentado hasta ahora, esto también genera nuevos residuos a su vez. En este caso se trata de la generación de grandes volúmenes de lodos purgados del sistema y constituidos por las propias bacterias y también otros componentes adsorbidos en el

flóculo. Como residuo, deben tratarse, deben estabilizarse y acondicionarse, reduciendo así la presencia de posibles patógenos, eliminando compuestos volátiles nocivos y reduciendo su potencial putrefacción.

El abanico de tecnologías disponibles para la gestión de los lodos es muy amplio, pero los tratamientos más comunes hoy en día son también biológicos. La idea es que comunidades microbianas utilicen el lodo como alimento para sobrevivir, a través de dos vías posibles:

- **Digestión aerobia.** Se trabaja en condiciones aerobias y en la fase de muerte de la curva de crecimiento microbiano. De este modo, se reduce el volumen del lodo, pero el remanente es difícil de deshidratar para su gestión posterior.
- **Digestión anaerobia.** En este caso, se utilizan microorganismos anaerobios que degradarán el lodo. La ventaja de este proceso es que se produce metano, que puede utilizarse para generar energía, lo que permite revalorizar el residuo. Sin embargo, la principal limitación de esta técnica es que es considerablemente lenta, particularmente en las primeras etapas de hidrólisis de los sólidos.

Actualmente, las investigaciones sobre el tratamiento de lodos se están centrando en procesos hidrotermales, es decir, aquellos en los que los lodos se tratan a altas temperaturas y presiones, con el fin de reducir el volumen, destruir células e hidrolizar moléculas. Dentro de las técnicas hidrotermales se emplean dos principalmente:

- **Oxidación húmeda (OH).** Además de altas temperaturas y presiones para hidrolizar el lodo, se incluye aire, oxígeno puro o cualquier oxidante, de modo que, al mismo tiempo que la hidrólisis, se produce la oxidación parcial de los compuestos presentes, con la consiguiente reducción de la DQO. Manipulando las condiciones, se puede usar para obtener componentes de alto valor añadido.
- **Hidrólisis térmica (HT).** En este caso, las altas temperaturas y presiones son las únicas que actuarán, ya que el aire se desplaza con un gas inerte, por ejemplo, con nitrógeno, por lo que predominarán los mecanismos de hidrólisis frente a los de oxidación.

Dadas las características de cada una de las técnicas, sus objetivos son distintos. Las técnicas oxidativas reducen la carga contaminante por sí solas, mientras que las técnicas no oxidativas buscan pretratar el lodo para aumentar el rendimiento de otras técnicas

posteriores, principalmente de la digestión anaerobia. Esto se consigue gracias a que las células presentes en el lodo se lisan, liberando el citoplasma, de modo que las moléculas solubles presentes tras el proceso son de mayor biodegradabilidad que la célula completa. Se ha comprobado que alimentar un digestor anaerobio con un lodo tratado de este modo incrementa la generación de metano entre un 20% y un 50%, dependiendo de las condiciones empleadas (Hii, Baroutian, Parthasarathy, Gapes y Eshtiaghi, 2014).

Las técnicas hidrotermales son, por tanto, métodos prometedores de tratamiento de lodos, pero están en vías de optimización, como ya se ha comentado. Si bien existen bastantes trabajos en la bibliografía relacionados con la aplicación de estas técnicas a lodos, todos están enfocados a evaluar el efecto de distintas variables de operación (temperatura, presión, catalizadores...) sobre los grados de solubilización y mineralización y/o sobre el potencial bioquímico de metano del efluente obtenido. Aún existe un gran desconocimiento sobre los mecanismos involucrados y la identificación y caracterización de los productos obtenidos (Hii, Parthasarathy, Baroutian, Gapes y Eshtiaghi, 2013).

Esta información puede resultar de gran utilidad por dos razones. En primer lugar, la naturaleza y composición de los productos van a marcar en gran medida el manejo y tratamiento posterior del efluente generado. Aspectos como la reología, la biodegradabilidad o la filtrabilidad, que van a depender de las características de los biopolímeros generados durante el tratamiento térmico, van a su vez a condicionar los sistemas de bombeo, de digestión anaerobia o de limpieza de membranas empleados para depurar el efluente generado, entre otros (Judd, 2010).

Además, todo ello abre un nuevo enfoque en la gestión de lodos, basado en la posible separación y revalorización de estos productos. Hay que tener en cuenta que los procesos hidrotérmicos, debido a sus condiciones de operación severas, son costosos, por lo que la recuperación de componentes es un aspecto más que interesante a la hora de abaratarlos. Por ejemplo, las proteínas podrían utilizarse como base para adhesivos o biofertilizantes, e incluso como pienso para animales (Hwang, Zhang, Seo, Lee y Jahng, 2008); los ácidos húmicos (AH) se usan ya como biosurfactantes y fertilizantes (Salati, Papa y Adani, 2011); mientras que los carbohidratos podrían utilizarse como sustrato para fermentaciones (Tekin, Karagöz y Bektaş, 2014). Dado que los lodos activos están formados por un 61% de proteínas y un 11% de carbohidratos (Chen, Jiang, Yuan, Zhou

y Gu, 2007), parece obvio que estas dos biomoléculas han de ser los primeros productos cuya separación y revalorización sea estudiada.

Por todo lo anterior, el **objetivo** del presente Trabajo Fin de Máster es evaluar las técnicas hidrotérmicas (OH y HT) como sistemas de gestión y revalorización de lodos, mediante la recuperación de concentrados proteicos y carbohidratos. Concretamente, el trabajo ha sido desarrollado siguiendo los siguientes objetivos:

- Establecer el efecto que OH y HT tendrán sobre la posterior gestión del lodo tras el tratamiento (solubilización, mineralización, color y sedimentabilidad).
- Caracterizar los principales productos solubles generados por OH y HT y determinar el tiempo óptimo de tratamiento para la máxima concentración de éstos en el medio.
- A partir de los hidrolizados generados por OH y HT, evaluar diferentes técnicas de separación de proteínas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para poder lograr los objetivos propuestos es necesario seguir la metodología que se explicará a continuación y contar con los materiales adecuados, indicados también en lo siguiente. Todos los experimentos se llevaron a cabo en el Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo, así como en la Planta Piloto José Coca, de la misma facultad.

2.1 LODO INICIAL: ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS

El lodo usado en los experimentos es un lodo secundario espesado por flotación y proviene de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de Baña, en Mieres (Asturias).

En primer lugar, se debe caracterizar el lodo, ya que se trata de un material muy variable. El lodo usado contaba con:

Tabla 1. Condiciones iniciales del lodo usado en el experimento. () concentraciones en el sobrenadante.*

pH (t)	DQOt (mg O ₂ /l)	DQOs (mg O ₂ /l)	Sólidos			
			ST (g/l)	SV (g/l)	SF (g/l)	IVF (ml/g)
6,54 (16,2 °C)	37478,41	2996,55	31,9	25,5	6,5	31,33
Proteínas* (mg/l)	Ác. húmicos* (mg/l)	Carbohidratos* (mg/l)	Ác. urónicos* (mg/l)	ADN* (mg/l)	Carbono soluble	
					COT (mg/l)	CI (mg/l)
128,79	362,33	77,17	22,46	20,90	373,2	126,8

2.2 DESARROLLO DE HT Y OH

2.2.1 Operación

Para llevar a cabo los procesos de HT y OH se utilizó un reactor PARR 4520 de un litro de capacidad, equipado con un agitador de turbina de seis palas. El gas se suministró humidificado, para lo que se empleó un tanque de acero de dos litros lleno con agua de la red pública hasta un 70% de su capacidad. Para mantener la temperatura y el flujo de gas se usó un controlador PID. Para regular la presión se usó una válvula situada al final de

la línea de gas. Como medida de seguridad, el reactor se llenó hasta un 70% de su capacidad, aproximadamente. Los gases empleados fueron nitrógeno puro de AirLiquide y oxígeno puro, también de AirLiquide. A continuación, se muestra un esquema del sistema:

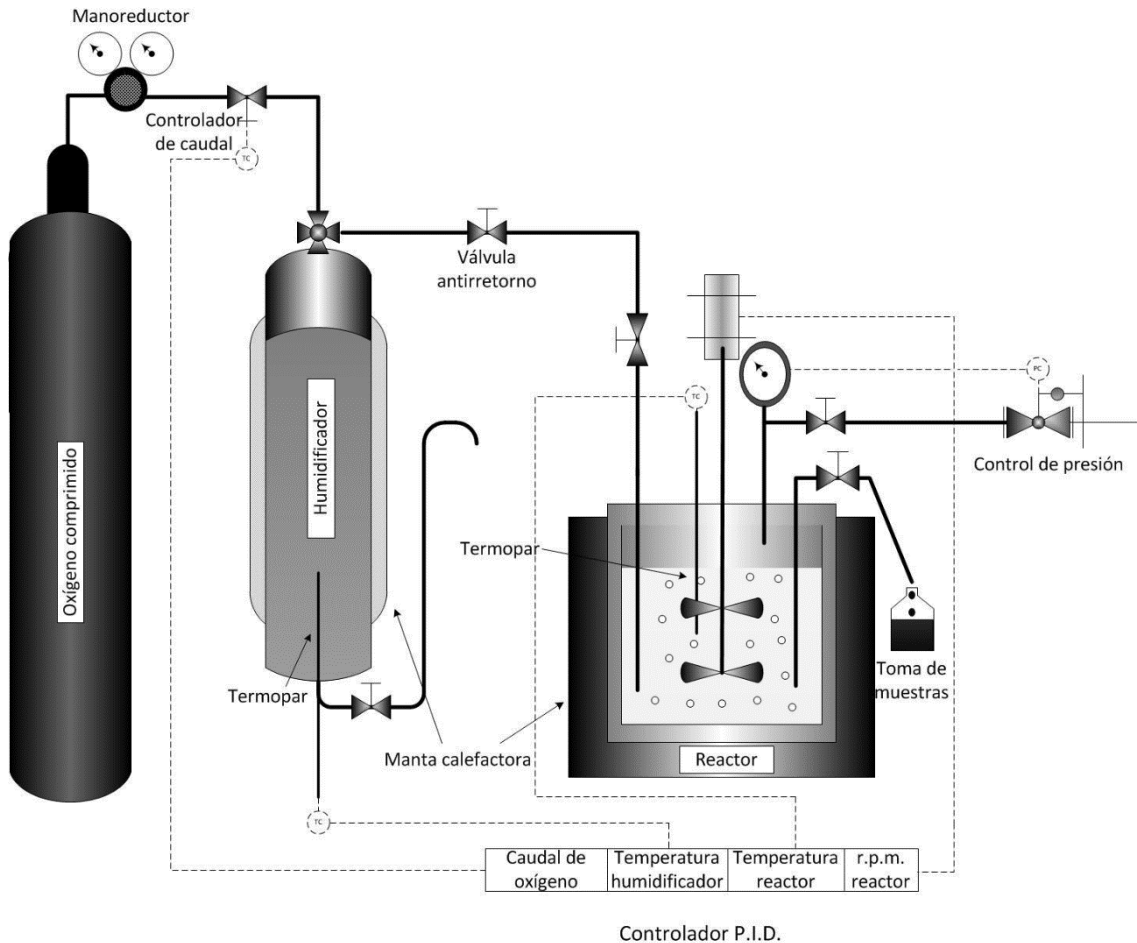


Imagen 1. Diagrama de flujo del equipo.

Las condiciones experimentales fueron:

- **Temperatura.** 160 °C para ambos experimentos. Aunque en la bibliografía consultada se habla de distintas temperaturas para HT y OH (más altas para OH), se utilizó la misma en ambas técnicas para poder comparar los resultados.
- **Presión.** 40 bar para ambos tratamientos. En este caso, la bibliografía también establece diferencias, pero, de nuevo, se ha empleado la misma para poder establecer una comparación.

- **Flujo de gas.** 1200 ml/min tanto para el nitrógeno empleado en HT como para el oxígeno de la OH.



Imagen 2a, 2b y 2c. Fotografías de las partes del reactor (2a, izda.), del controlador PID con los selectores de temperatura, flujo de gas y de velocidad de agitación (2b, dcha.) y del reactor montado y humidificador (2c, abajo).

El inicio de ambos experimentos comienza arrancando el reactor y seleccionando las condiciones de operación en el controlador. El flujo de gas serán los 1200 ml/min indicados, pero la temperatura (tanto del reactor como del humidificador) se fijará en 100 °C en una primera fase, para evitar un calentamiento repentino del lodo, y pasados unos 45 minutos, que es cuando se alcanzan los 100 °C aproximadamente, se eleva a 160 °C, que ya es la temperatura de reacción. La presión se comprobó constantemente para asegurar que se mantenía en 40 bar.

2.2.2 Toma de muestras

En ambos experimentos se tomaron muestras periódicamente, a fin de comprobar cómo evoluciona el lodo a lo largo del tratamiento hidrotérmico. En la siguiente figura se muestra la secuencia seguida para la toma de muestras:

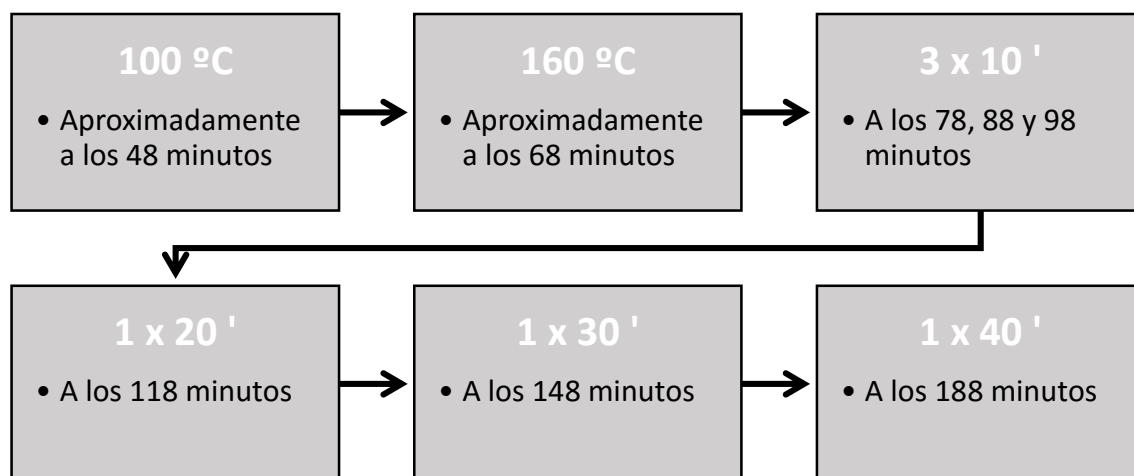


Figura 1. Esquema del procedimiento seguido para la temporalización de la toma de muestras.

Una vez realizados los análisis de sólidos, la DQO total y el índice volumétrico, las muestras se centrifugan durante 20 minutos a una velocidad de 10000 g y a una temperatura de 5 °C (Kubota 6500). Se separa el sobrenadante, que será lo que se emplee para realizar el resto de los análisis.

2.2.3 Determinación del tiempo óptimo de tratamiento

A pesar de que hay gran cantidad de biomoléculas de interés en un lodo, sólo hay tres tipos en concentraciones susceptibles de generar suficiente interés como para separarlas y purificarlas: proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos. Este trabajo se centra en la obtención de las proteínas, de modo que se seleccionará como óptimo el tiempo en el que la concentración de proteínas solubles sea máxima.

2.3 MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

El objetivo del trabajo es la obtención de proteínas y carbohidratos a partir de lodos. Estos compuestos están presentes en los lodos activos, pero suelen formar parte de las bacterias que componen el lodo o estar retenidos en su citoplasma. Como se explicó anteriormente, tanto OH como HT lisan las células e hidrolizan moléculas, lo que permite solubilizar en mayor o menor medida las proteínas y los carbohidratos.

Se ensayaron las técnicas de separación de proteínas más comunes a nivel industrial (salvo filtración con membranas) sobre el sobrenadante obtenido por centrifugación a partir del efluente generado tras el correspondiente tiempo óptimo de tratamiento del lodo. A continuación, se explican brevemente los protocolos de separación empleados.

2.3.1 Precipitación con acetona

Se usó acetona pura a -20 °C de Sigma-Aldrich, a razón de tres volúmenes de acetona por volumen de muestra. Se dejó precipitar durante dos horas a -20 °C y se centrifugó a 4 °C, 10000 rpm durante 10 minutos (CINVESTAV, 2008).

2.3.2 Precipitación con TCA

Siguiendo los experimentos de Oliveira, Marques y Azeredo (1999), se usó una concentración del 20% de ácido tricloroacético (TCA) en la muestra, dejándolo precipitar a 4 °C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 4 °C y 10000 rpm, durante 10 minutos.

2.3.3 Precipitación con sulfato amónico

La concentración de sulfato amónico ((NH₄)₂SO₄) usada fue cercana a la saturación, de 0,6 g/ml, siendo 0,74 g/ml el punto de saturación. Este método se basa en el conocido fenómeno *salting out*, es decir, la adición de un compuesto (generalmente una sal) que compite por el agua con el resto de solutos.

2.3.4 Precipitación por pH

Pervaiz (2012) indica en su tesis que el mayor rendimiento en precipitación de proteínas de lodos se obtiene con un pH=3. En cualquier caso, y debido a la variabilidad que presentan los lodos, se probaron también valores de pH de 4,5 y 5,5. Además, se probó pH=2, ya que es el punto isoelectrico de los ácidos húmicos, así como un pH alcalino (pH=9), para ampliar el abanico, aunque no se espera que ninguno de los compuestos precipite en este valor, ya que se encuentra alejado de sus puntos isoelectricos.

2.3.5 Separación con resina

Se usó una resina de polimetilmetacrilato, la Supelite DAX-8 de Supelco. Este compuesto es altamente hidrofóbico, por lo que se espera que retenga moléculas

hidrofóbicas, como son los ácidos húmicos. De este modo, en la muestra deberían quedar proteínas y carbohidratos mayoritariamente.

Se probaron diferentes cantidades de resina: 5% (p/v), 10% (p/v) y 20% (p/v). Las dos primeras concentraciones corresponden a las empleadas en los estudios de Schriewer, Wehlmann y Wuertz (2011). El motivo de usar también un 20% de resina es que las otras proporciones se utilizaron para concentraciones conocidas y muy bajas de ácidos húmicos.

La muestra se puso en contacto con la resina en tubos de ensayo de plástico, y se mantuvo en agitación durante una hora. Transcurrido el tiempo, se filtró con papel de filtro común para separar la resina del líquido claro. Dicho líquido fue el que se sometió a los análisis posteriores.

Aunque en la bibliografía consultada se ajusta inicialmente el pH a un valor de 2 para trabajar con este tipo de resinas (Thurman y Malcolm (1981); Peuravuori, Pihlaja y Välimäki (1997) y Peuravuori, Ingman, Pihlaja y Koivikko (2001)), en este caso dicho ajuste de pH no se realizó, ya que se sabe que a pH = 2 una parte de proteínas y AH precipitan, lo que puede llevar a resultados y conclusiones erróneos sobre el método (ver *Apartado 3.3*).

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.4.1 Análisis del color

Se midió la absorbancia en un rango de longitudes de onda desde los 190 nm hasta los 1100 nm. Esto permite determinar el color de las muestras y sus cambios durante el proceso. Para ello se empleó un espectrofotómetro (PG Instruments Ltd., T80 UV/VIS). En este estudio se mide el Coeficiente de Absorción Espectral (CAE) a tres longitudes de onda diferentes: 436 nm, 525 nm y 620 nm. Con los datos obtenidos se calcula el Número de Color (NC), según la ecuación siguiente (Tizaoui, Bouselmi, Mansouri y Ghrabi (2007), citado en Urrea, Collado, Laca y Díaz (2012)):

$$NC = \frac{CAE_{436}^2 + CAE_{525}^2 + CAE_{620}^2}{CAE_{436} + CAE_{525} + CAE_{620}}$$

2.4.2 Medida del pH

Se midió el pH de los sobrenadantes de la centrifugación de cada muestra utilizando un pH metro Crison Basic 20+, como el de la imagen siguiente:



Imagen 3. pHmetro usado en todo el trabajo.

2.4.3 Medida de la carga orgánica

Se midió empleando el método de la Demanda Química de Oxígeno (DQO a partir de ahora). Este método se basa en la oxidación de las moléculas orgánicas presentes en la muestra mediante un compuesto oxidante fuerte, midiendo la cantidad de oxígeno requerida para ello en función del dicromato potásico consumido. La reacción tiene lugar a 150 °C en un digestor (imagen 5) durante 2 horas. El valor de la DQO se expresa como concentración de oxígeno en mg/l o partes por millón (ppm), que será mayor cuanto mayor sea la carga orgánica. Dicha concentración se determina por espectrofotometría a 600 nm, ya que la muestra adquiere una tonalidad verde según aumenta el valor de la DQO, siendo amarillo anaranjado a concentraciones bajas. En la siguiente imagen se pueden ver los diferentes colores:



Imagen 4. Fotografía de las diferentes coloraciones posibles en el análisis de la DQO.

Se realizaron dos tipos de medidas de la DQO:

- **DQO total (DQOt).** Se mide la DQO de la muestra completa.

- **DQO soluble (DQOs).** Se mide la DQO del sobrenadante de la muestra centrifugada.

En la siguiente imagen se pueden ver los equipos utilizados en el análisis de la DQO:



Imagen 5. Equipos utilizados para la medida de la DQO: a la izquierda se encuentra el digestor, y a la derecha el espectrofotómetro utilizado.

2.4.4 Medida de sólidos

También es un parámetro de caracterización de los lodos, pues indica la cantidad de sólidos de los mismos, y por tanto la carga contaminante.

Se hicieron 4 tipos de medidas:

- **Índice volumétrico de fangos (IVF).** Indica el volumen en ml que ocupa un gramo de lodo. Para realizar esta medida, se tomaron 12 ml de lodo en un tubo aforado, y se midió el volumen de lodo sedimentado tras 30 minutos. El IVF se define como este volumen dividido entre los gramos de sólidos totales en la muestra.
- **Sólidos totales (ST).** Representa los gramos de sólidos por unidad de volumen de muestra. Se obtiene por pesada de un volumen de muestra secada en estufa a 105 °C hasta peso constante.
- **Sólidos fijos (SF).** Son los sólidos remanentes tras la calcinación a 550 °C de los sólidos totales. Se atribuyen a compuestos inorgánicos.
- **Sólidos volátiles (SV).** Corresponden a la fracción volátil de los sólidos del lodo. Son principalmente compuestos orgánicos que pasan a estado gas rápidamente. Su análisis se realizó calcinando la muestra en una mufla a 550

°C, y es la diferencia de peso entre los sólidos totales y los sólidos fijos, puesto que se habrán desprendido de la muestra en forma de CO₂.

2.4.5 Medida de la concentración de proteínas y ácidos húmicos

Ambos compuestos se determinaron de forma conjunta mediante el método de Lowry, Rosebrough, Farr y Randall (1951), debido a las interferencias en la medida que causan entre ellos (Frølund, Griebel y Nielsen, 1995). De forma resumida, el método se basa en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu, que pasa de amarillo a azulado en presencia de compuestos fenólicos como los presentes en los residuos de tirosina de las proteínas, que se despliegan al unirse el Cu²⁺ al enlace peptídico y actuando el Cu²⁺ en exceso como catalizador. Ya que los ácidos húmicos también presentan grupos fenólicos en su estructura, es de esperar que interfieran en la medida, por lo que se realiza paralelamente el mismo ensayo, pero sin Cu²⁺, de modo que los grupos fenólicos de las proteínas no participan en la reacción, al no desplegarse las proteínas.

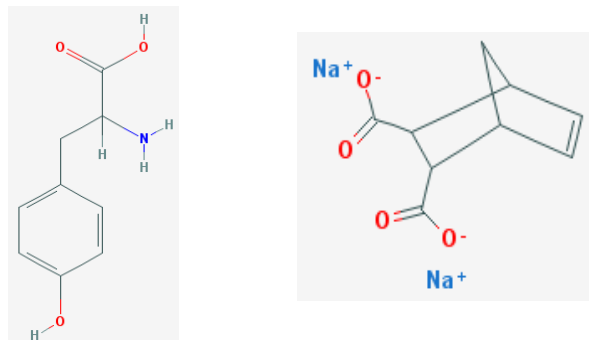


Figura 2. Estructura de un residuo de tirosina (izda.) y una sal sódica de ácido húmico (dcha.). Fuente: PubChem (National Center for Biotechnology Information, 2016).

Se mide la absorbancia de las muestras de proteínas (absorbancia total) y ácidos húmicos (absorbancia ciega) a 580 nm, aplicando dos ecuaciones para obtener los valores de absorbancia de cada molécula, ya sin interferencias. Las rectas de calibrado correspondientes se realizaron con albúmina sérica bovina (BSA) y una mezcla de ácidos húmicos como patrones para cada caso. A continuación, se muestran imágenes de los análisis realizados:

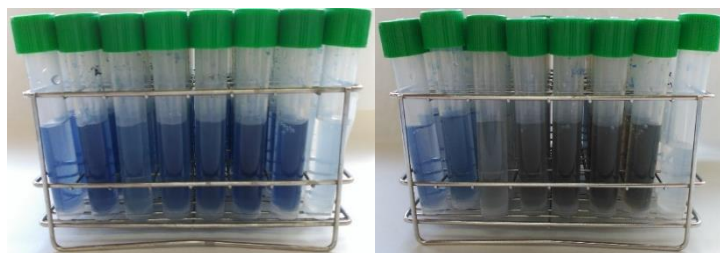


Imagen 6. Fotografías del análisis de proteínas (izda.) y ácidos húmicos (dcha.).

2.4.6 Medida de la concentración de carbohidratos

Se realizó siguiendo el método del fenol – ácido sulfúrico de Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers y Smith (1956), por el que los azúcares reductores en presencia de ácido sulfúrico concentrado forman furfurales, que en medio ácido se protonan formando un carbocatión que reacciona con el fenol, generando a su vez un compuesto resonante que absorbe a 492 nm. Se utilizó D-glucosa monohidrato como patrón. A continuación, se muestra una imagen de un análisis de carbohidratos:



Imagen 7. Fotografía de un análisis de carbohidratos.

2.4.7 Medida de la concentración de ácidos urónicos

Se midió siguiendo el método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen (1973), por el que los mucopolisacáridos ácidos (como los ácidos urónicos) se hidrolizan y transforman en derivados furfurilos, que forman con el meta-hidroxidifenil un compuesto rosado, que absorbe a 520 nm. El patrón utilizado fue ácido glucurónico. La siguiente imagen muestra un análisis de ácidos urónicos:

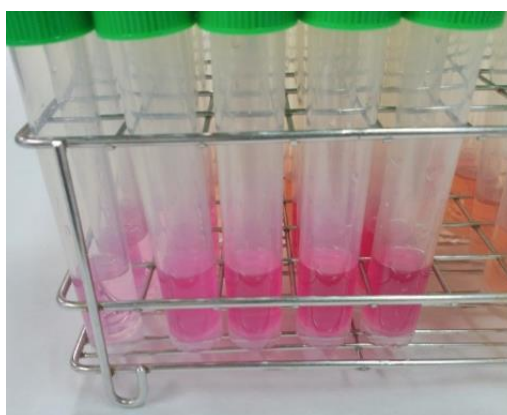


Imagen 8. Fotografía de los tubos usados para la recta de calibrado del análisis de ácidos urónicos.

2.4.8 Medida de la concentración de ADN

El método de Burton (1956) fue el empleado para medir la concentración de ADN en las muestras, empleando HClO_4 , difenilamina y acetaldehído. Se utilizó como patrón para el calibrado ADN de timo de ternera (*calf-thymus*). La siguiente imagen es un ejemplo de un análisis de ADN realizado:



Imagen 9. Fotografía de los tubos empleados en uno de los análisis de ADN realizados, con la coloración que adquieren antes de determinar las concentraciones por espectrofotometría.

2.4.9 Medida de la concentración de carbono

Se midió tanto la concentración de carbono orgánico total (COT) como la de carbono inorgánico (CI), usando para ello un equipo Shimadzu TOC-V CSH, que se muestra en la siguiente imagen:



Imagen 10. Equipo utilizado para el análisis de COT y CI.

2.4.10 Análisis de tamaños

Se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) por exclusión de tamaños, a fin de conocer los tamaños de las moléculas presentes en las muestras. En este tipo de cromatografía las moléculas de mayor tamaño eluyen primero, ya que las más pequeñas atraviesan los poros de la fase estacionaria, tomando para ello más tiempo. Los datos se tomaron por absorbancia a 280 nm. El calibrado se realizó con una mezcla de proteínas con tamaños comprendidos entre 15 kDa y 600 kDa de Sigma-Aldrich. El equipo utilizado fue un *Agilent Technologies 1200 series*, el cual se puede ver en la



siguiente imagen:

Imagen 11. Equipo de HPLC utilizado.

Se analizaron las áreas de tres intervalos de tamaños, obtenidos a partir de los tiempos de elución de la disolución de calibrado, con una cota superior en 11,7 min. Dicha cota se estableció debido a que, a partir de ese tiempo, la elución puede verse afectada por interacciones de las moléculas con la fase estacionaria de la columna no relacionadas con la exclusión por tamaños, enturbiando el resultado del proceso. Los intervalos a considerar son:

- Moléculas con tamaños comprendidos entre 550 kDa y 150 kDa (entre 5,45 min y 7,6 min).
- Moléculas que eluyen entre los 7,6 min y los 10,02 min, y que por tanto tienen un tamaño comprendido entre 150 kDa y 35 kDa.
- Moléculas de entre 35 kDa y 10 kDa (10,02 min a 11,7 min)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EVOLUCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL LODO

En los siguientes apartados se muestra y compara el efecto de la OH y la HT sobre las propiedades fisicoquímicas del lodo. Estas propiedades determinarán en gran medida el tratamiento posterior del efluente, en caso de que se opte por una técnica posterior de eliminación de la carga orgánica, en lugar de una de revalorización.

3.1.1 pH

La figura 3 muestra la evolución del pH durante el experimento:

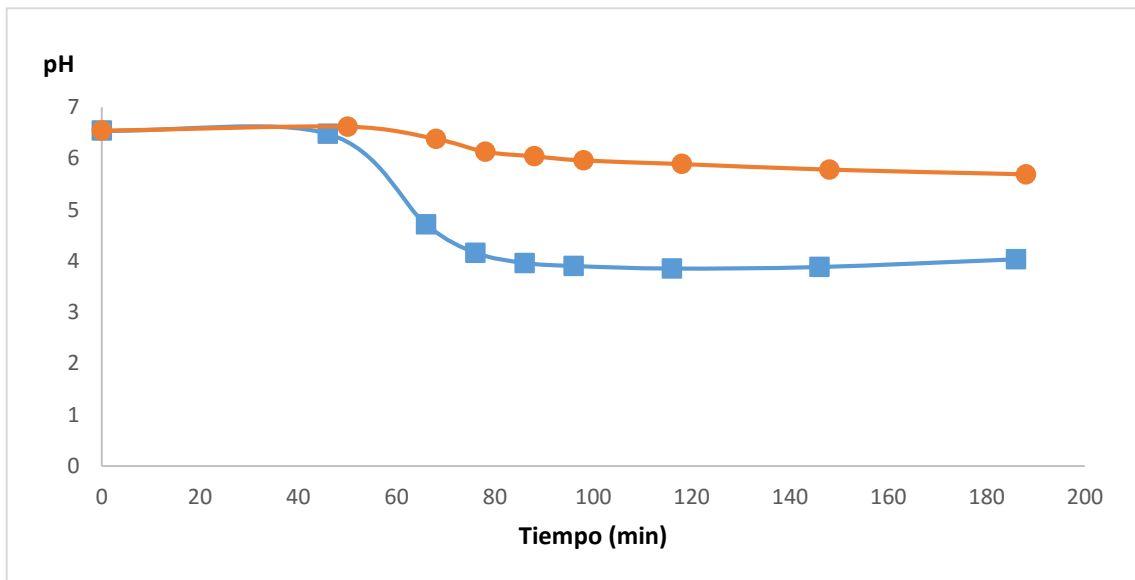


Figura 3. Evolución del pH durante la HT (—●—) y la OH (—■—).

El pH en la HT comienza a disminuir a medida que se alcanzan los 160 °C (60 minutos), punto a partir del cual desciende hasta un pH final de 5,7; debido a la liberación de moléculas intracelulares como pequeños ácidos orgánicos.

En el caso de la OH, el descenso es más acusado, ya que predominan las reacciones de oxidación hasta ácidos carboxílicos de bajo peso molecular y también se liberan compuestos intracelulares ácidos: ADN, ácidos húmicos, intermediarios metabólicos, etc. El hecho de que se mantenga constante se debe a que las condiciones de reacción no permiten una oxidación total hasta CO₂ (Urrea et al., 2014).

3.1.2 DQO

La carga orgánica del lodo en forma de DQOt es la que se muestra a continuación:

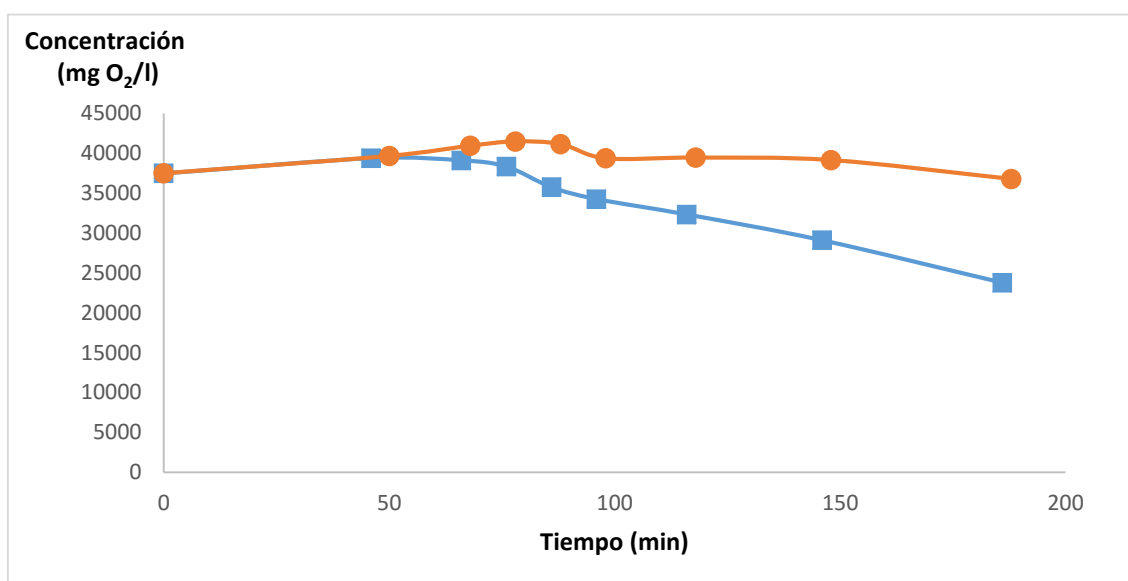


Figura 4. Evolución de la DQOt durante la HT (—●—) y la OH (—■—).

La DQOt es un parámetro que se espera se mantenga constante durante la HT, ya que no se está oxidando ninguna molécula, tan sólo hidrolizando algunas. Esto es lo que se puede apreciar en la figura 4. El ligero incremento que se aprecia cercano a los 100 minutos de experimento se debe a errores experimentales o de medida, ya que la DQOt no debería aumentar nunca; mientras que el ligero descenso posterior se debe a los procesos de hidrólisis, que pueden reducir la oxidabilidad de algunas moléculas.

Tal y como cabría esperar, a medida que avanza la OH, la DQOt va disminuyendo, debido a que los compuestos presentes comienzan a hidrolizarse y oxidarse, dando lugar a CO₂ y H₂O como productos finales. La reducción de la DQOt fue de un 36%, similar al resultado obtenido por Urrea et al. (2014), aunque en ese caso la presión fue mayor (60 bar frente a los 40 bar del presente trabajo).

A diferencia de la DQOt, la DQOs sufre un gran aumento, pasando de 3000 mg O₂/l a 17500 mg O₂/l aproximadamente, debido a que con la HT lo que se consigue es hidrolizar el lodo, solubilizando los compuestos y haciéndolos más biodegradables. Esto es lo que muestra la figura 5. En los últimos minutos, la DQOs tiende a estabilizarse, puesto que todos los compuestos estarían ya en la fase líquida.

Sin embargo, en la OH, debido a las reacciones de oxidación, el aumento de la DQOs provocado por la hidrólisis se ve frenado tras alcanzar el máximo, ya que la oxidación va

transformando los compuestos en dióxido de carbono y agua (el estado más oxidado posible). Como se puede observar en la figura 5, el valor máximo de DQOs se da a los 90 minutos aproximadamente (21900 mg O₂/l), para finalmente reducirse hasta 17000 mg O₂/l.

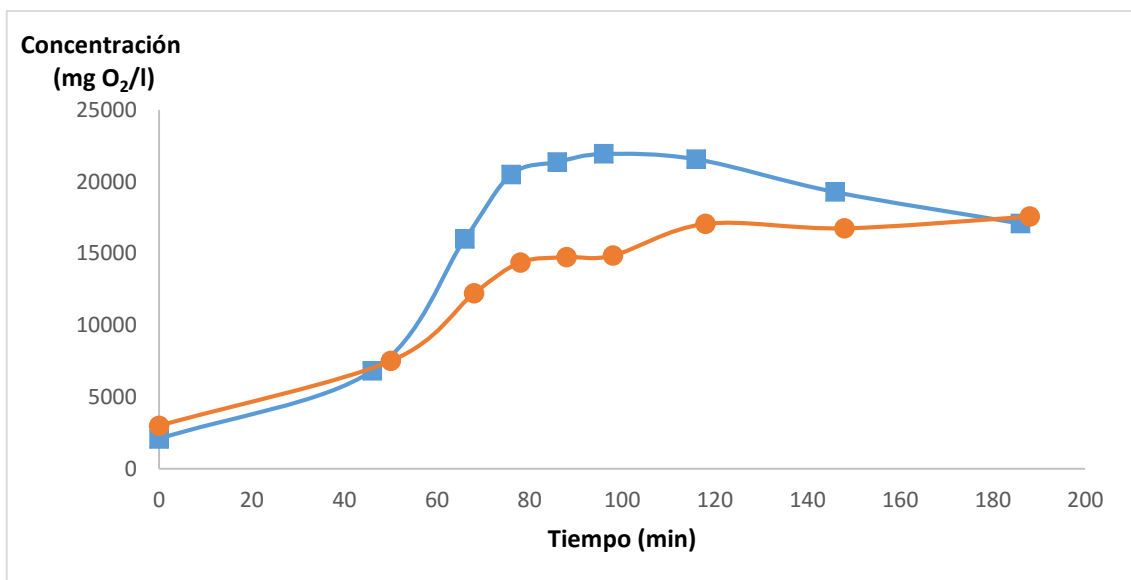


Figura 5. Evolución de la DQOs durante la HT (—●—) y la OH (—■—).

Del análisis de la DQOs se puede obtener un parámetro de gran interés: el porcentaje de solubilización. Con este valor, se indica la fracción de compuestos que pasa a la fase líquida del efluente del proceso y que, por tanto, va a ser susceptible de ser recuperada o tratada posteriormente. En este caso el porcentaje de solubilización obtenido se calcula resolviendo la ecuación siguiente:

$$\% \text{ solubilización} = \frac{(DQO_{t_o} - DQO_{s_o}) - (DQO_{t_f} - DQO_{s_f})}{(DQO_{t_o} - DQO_{s_o})} \times 100$$

donde el subíndice *o* indica el valor inicial y el subíndice *f* hace referencia al valor al final del experimento.

Se obtuvo un porcentaje de solubilización del 44% para la HT y del 81% para la OH, lo que indica que las reacciones de oxidación combinadas con las de hidrólisis conducen a una mayor solubilización (casi el doble) que las de hidrólisis por sí solas, y, además, producen la solubilización más rápidamente.

3.1.3 Sólidos

Los análisis de ST y SV mostraron los siguientes resultados:

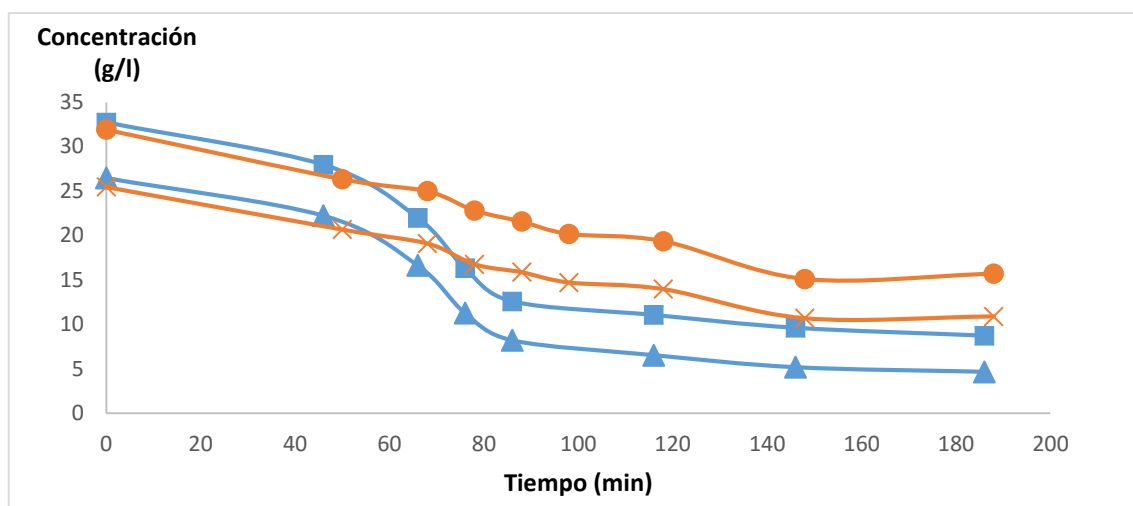


Figura 6. Evolución de ST y SV durante la HT (—●—; —×— respectivamente) y la OH (—■—; —▲— respectivamente).

En la figura 6 se puede observar que tanto los ST como los SV disminuyen a medida que la HT avanza, hasta reducirse en un 57% los SV. Esto se debe a que, como se ha comentado, los compuestos se van hidrolizando y solubilizando, por lo que pasan a la fase acuosa.

Los ST y SV presentan un comportamiento similar en la OH al de la HT: se reducen según avanza el proceso hasta estabilizarse finalmente. En este caso, el porcentaje de reducción de los SV fue de un 82%. La explicación de nuevo es la misma que para HT: las moléculas se van hidrolizando y solubilizando, así como pasando a fase gas, lo que explica la disminución en SV, y, por ende, en ST.

En el caso de los SF, se trata de sólidos no hidrolizables ni volátiles como sales binarias (SiO_2) o terciarias (CaCO_3), por lo que su concentración permanece constante durante todo el proceso, tanto para HT como para OH. Esto puede observarse de manera intuitiva en la figura 6, ya que los SF son la diferencia entre ST y SV, la cual permanece constante durante todo el proceso.

Como cabría esperar a partir de las medidas de DQO explicadas anteriormente, la OH brindó porcentajes de reducción de sólidos volátiles mucho mayores que la HT, debido a la naturaleza más agresiva de la técnica, pues además de las reacciones de hidrólisis también hay oxidación de moléculas.

El IVF es otro parámetro indicador del estado del fango y es muy interesante a la hora de la gestión del lodo (ya sea crudo o tratado). Interesa que el IVF sea bajo, ya que cuanto más bajo sea, mejor sedimentabilidad presentará el lodo, lo que se traduce en una separación menos costosa de los sólidos, y por tanto en menores costes de operación.

El IVF mostró el siguiente comportamiento en los procesos realizados:

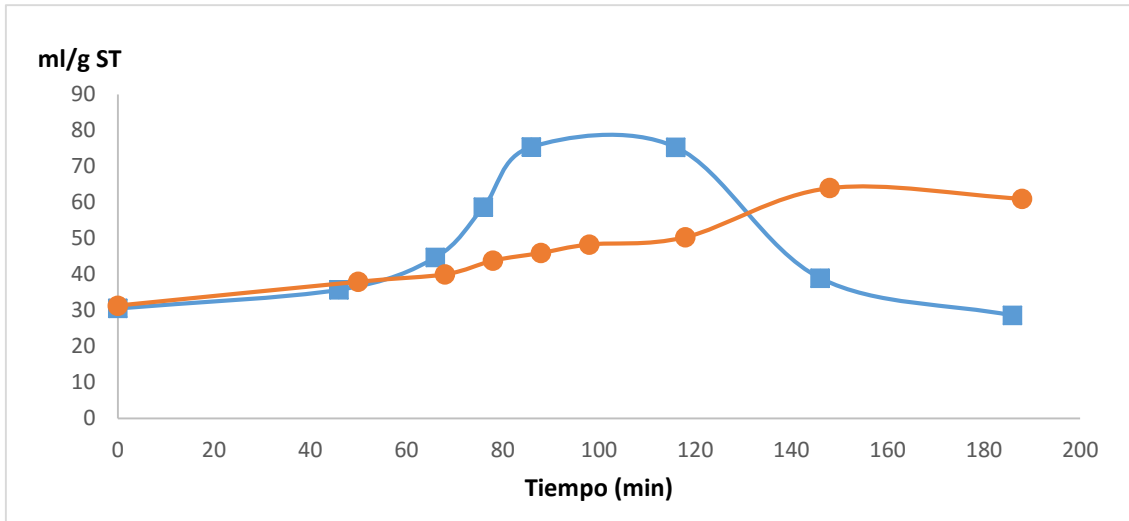


Figura 7. Evolución del IVF durante la HT (●) y la OH (■).

Se puede apreciar que el volumen que ocupa un gramo de fango va aumentando a medida que avanza la HT hasta duplicarse. Esto se debe a que las reacciones de hidrólisis liberan polímeros a la fase líquida, lo que aumenta la viscosidad y afecta a la sedimentación, haciendo que esta sea una *sedimentación difusa*. En la siguiente imagen se puede observar la sedimentación de cada muestra y su correspondencia con la figura 7:

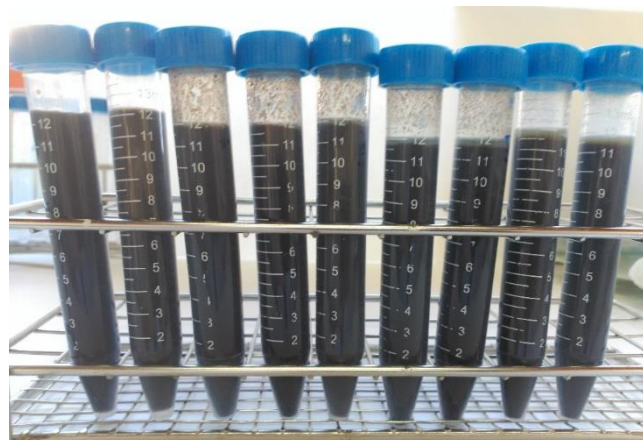


Imagen 12. Volumen ocupado por el lodo en cada muestra (inicial, y en tiempos crecientes de izquierda a derecha) tras 30 minutos de sedimentación

Las variaciones en el caso de la OH se corresponden con un aumento inicial del volumen, seguido de una rápida reducción debida a la oxidación de moléculas. El aumento inicial se justifica del mismo modo que en la HT, mientras que la reducción posterior se debe a que esos polímeros liberados se van oxidando y se va reduciendo su tamaño, lo que hace que el medio sea menos viscoso, facilitando, por tanto, la sedimentación. En la siguiente imagen se puede observar cómo cambia la sedimentación con el tiempo de reacción:

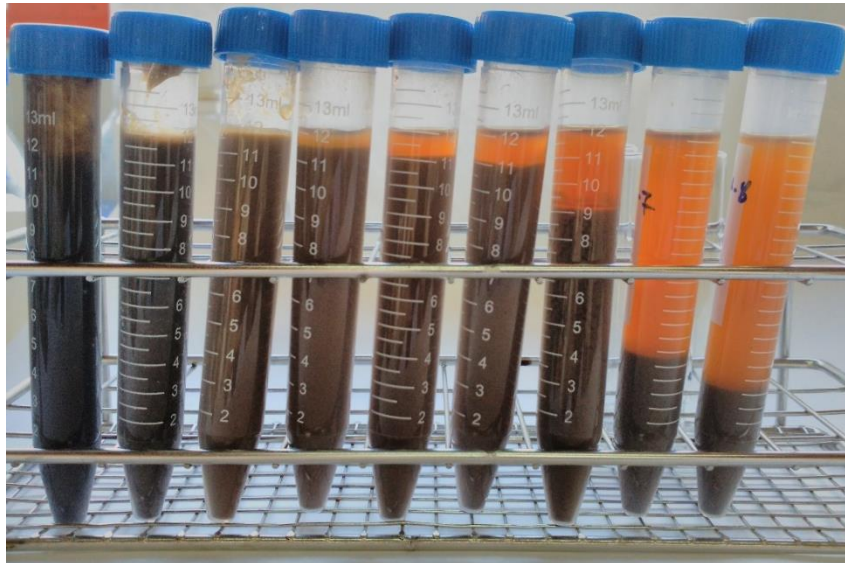


Imagen 13. Volumen ocupado por el lodo en cada muestra (inicial, y en tiempos crecientes de izquierda a derecha) tras 30 minutos de sedimentación.

3.1.4 Color

Los cambios que sufre el color, medido según lo indicado en el apartado 2.4.1 se muestran a continuación:

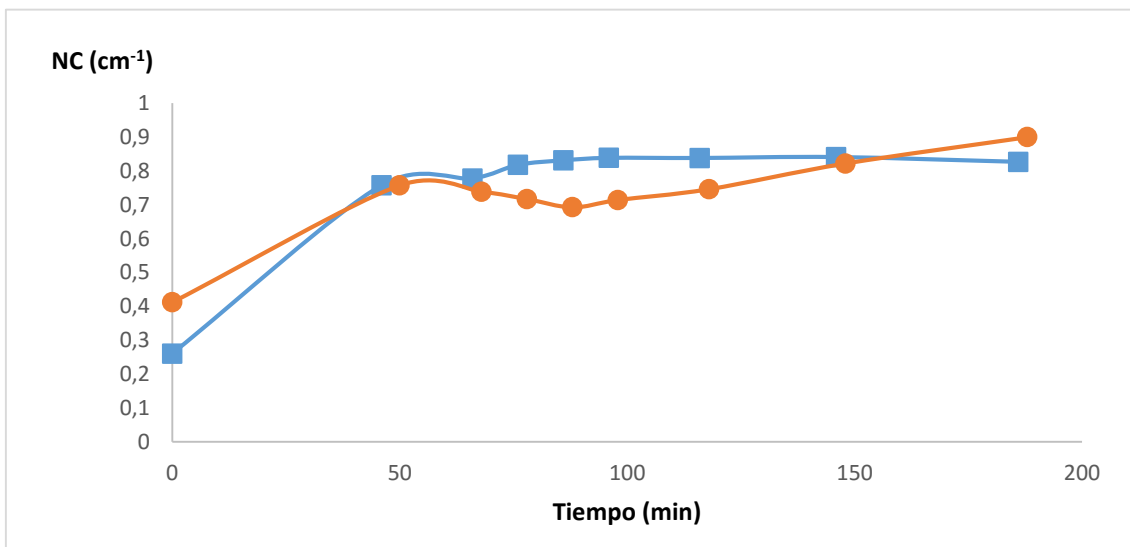


Figura 8. Desarrollo del color durante la HT (—●—) y la OH (—■—).

El sobrenadante de la HT presenta un color marrón característico (imagen 14), y como se observa en la figura 8, su intensidad crece a lo largo del experimento.

El color de la muestra de OH es marrón anaranjado (imagen 14), alcanzando su máximo de intensidad cuando se alcanzan las condiciones de reacción (160 °C), para mantenerse constante hasta el final del experimento.

El NC es ligeramente mayor en HT que en OH, ya que las reacciones de oxidación destruyen compuestos cromógenos como los ácidos húmicos.

En la siguiente imagen queda patente la diferencia entre los colores que generan los tratamientos aplicados:



Imagen 14. Tubos con sobrenadante de OH a la izquierda e HT a la derecha. La diferencia en el color evidencia la diferencia entre ambos tratamientos.

3.1.5 Carbono soluble

Los cambios en la concentración de COT y CI se muestran en la siguiente gráfica:

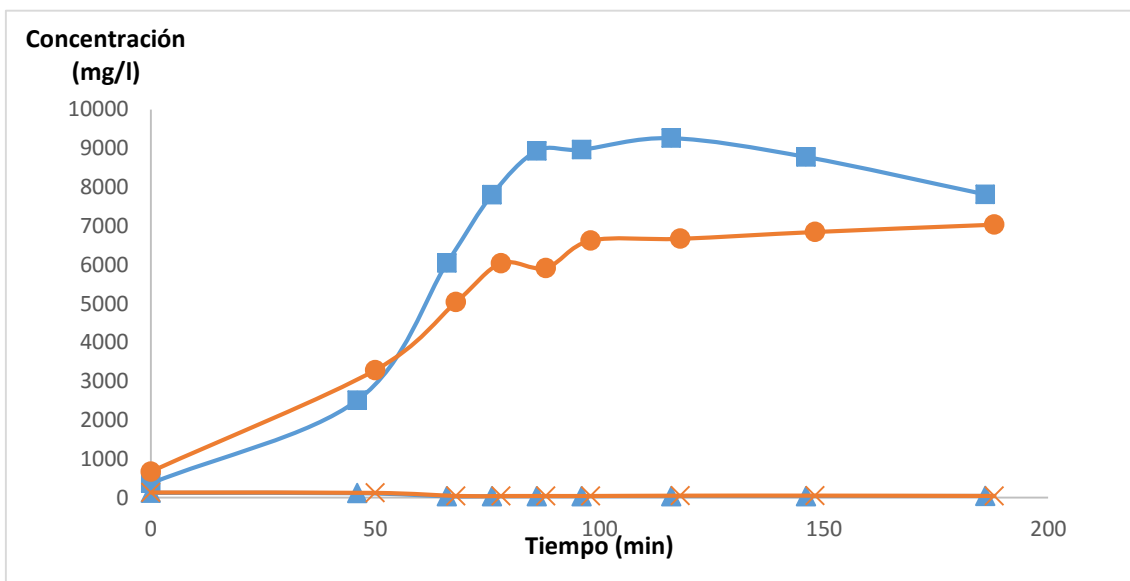


Figura 9. Evolución de la concentración de COT y CI durante la HT (—●—; —×— respectivamente) y la OH (—■—; —▲— respectivamente).

El COT en HT aumenta inicialmente para luego estabilizarse debido a que se liberan moléculas orgánicas del interior celular produciendo ese aumento, y debido a que no se hidrolizan, se mantiene estable (el ligero aumento se debe a que se siguen liberando moléculas orgánicas, aunque a menor velocidad). En cuanto al CI, disminuye inicialmente debido a que se pierde CO₂ disuelto, pero se estabiliza debido a que la temperatura no es suficiente como para romper los bicarbonatos.

En OH el COT asciende inicialmente al romperse las células y liberarse compuestos orgánicos hasta llegar a un máximo, a partir del cual disminuye debido a la oxidación de estas moléculas. La explicación para el comportamiento del CI es similar a la de HT.

La OH permite alcanzar un valor de concentración de COT mayor que HT (9261 mg/l frente a 7035 mg/l) y en menor tiempo, puesto que en HT se alcanza al final del experimento.

3.2 PRODUCTOS SOLUBLES GENERADOS

En este apartado se analizan las principales biomoléculas solubilizadas durante la OH y la HT. Esta información se empleará para determinar el tiempo óptimo de tratamiento hidrotérmico que permita una mayor concentración de biocompuestos solubles en el medio (principalmente proteínas).

3.2.1 Proteínas

La figura 10 muestra la concentración de proteínas solubles durante los dos tratamientos aplicados:

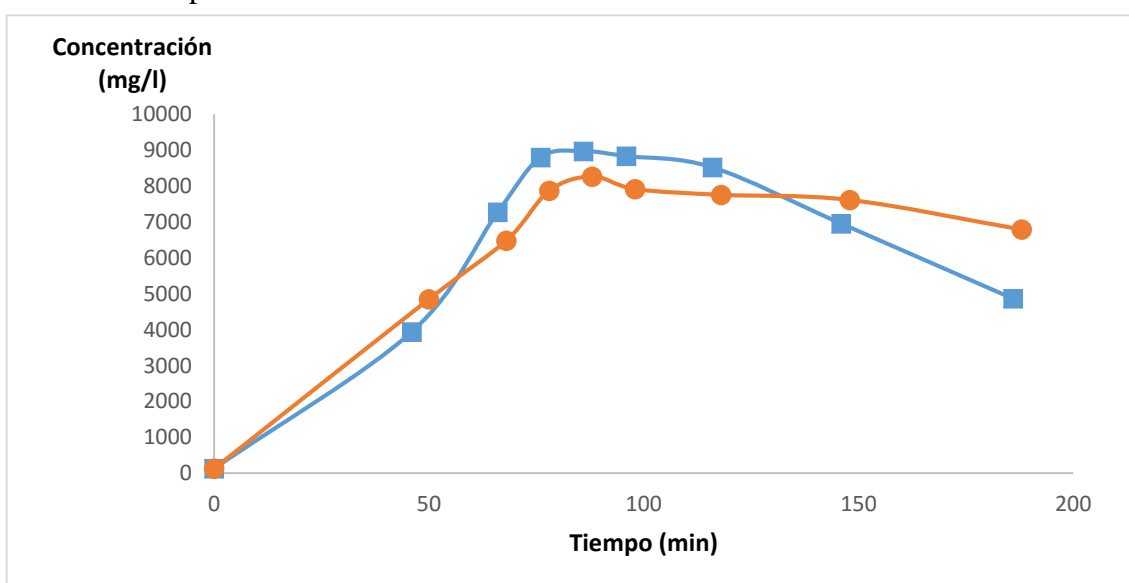


Figura 10. Evolución de la concentración de proteínas durante la HT (—○—) y la OH (—■—).

La concentración de proteínas durante el experimento de HT se incrementa notablemente durante los primeros minutos de reacción, alcanzando un máximo de concentración de 8250 ppm a los 88 minutos de experimento. A partir de dicho punto se mantiene estable, rondando las 7000 ppm. Esto se debe a que las proteínas son componentes intracelulares en gran medida, por lo que según aumenta la temperatura y presión y se van lisando las células, las proteínas se van liberando al medio. El hecho de que su concentración se mantenga más o menos constante una vez alcanzada la máxima concentración se debe a las características de la HT, es decir, que las proteínas no se degradan en valores apreciables con esta técnica.

En la OH, se produce un comportamiento similar a la HT: un incremento inicial hasta alcanzar el máximo de concentración a los 86 minutos (8976 mg/l). La diferencia con la HT se da a partir de este punto, pues tras alcanzar el máximo la concentración disminuye debido a las reacciones de oxidación que destruyen parte de las proteínas presentes, lo que disminuye su concentración hasta un valor final cercano a la mitad del máximo (4800 mg/l).

La OH presenta rendimientos mayores que la HT, ya que el máximo de proteínas es mayor y se alcanza con mayor rapidez, lo que puede deberse a la combinación de hidrólisis y oxidación.

3.2.2 Ácidos húmicos

La figura 11 muestra la evolución de la concentración de los ácidos húmicos durante ambos tratamientos:

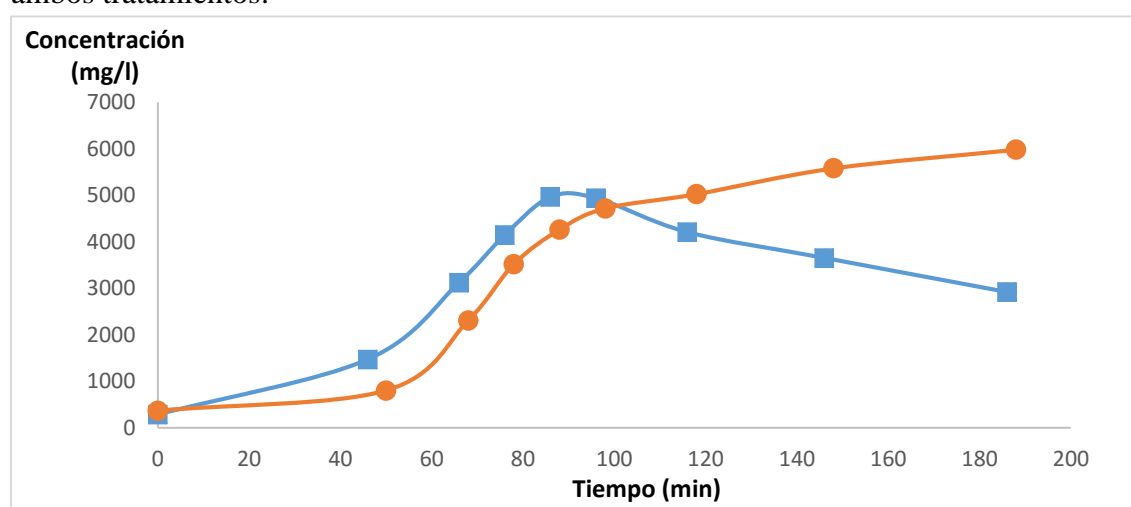


Figura 11. Evolución de la concentración de AH durante la HT (●) y la OH (■).

En la HT, los ácidos húmicos siguen la misma tendencia que las proteínas: aumentan rápidamente hasta poco después de alcanzar la temperatura de reacción, donde la velocidad de solubilización disminuye notablemente hasta llegar finalmente a 6000 mg/l de ácidos húmicos.

El comportamiento de los ácidos húmicos durante la OH sigue la tendencia de otras biomoléculas y parámetros medidos: la concentración aumenta en los primeros minutos del proceso hasta alcanzar un máximo, en este caso de 4960 mg/l, para disminuir hasta el valor final, 2916 mg/l. Esta disminución es causada por las reacciones de oxidación que destruyen los ácidos húmicos que hay en el medio.

De nuevo puede observarse que la concentración máxima se consigue antes con la OH, pero en este caso dicha concentración es mayor para la HT, ya que aumenta durante todo el proceso.

3.2.3 Carbohidratos

El comportamiento de la concentración de carbohidratos durante los tratamientos hidrotérmicos queda patente en la figura 12:

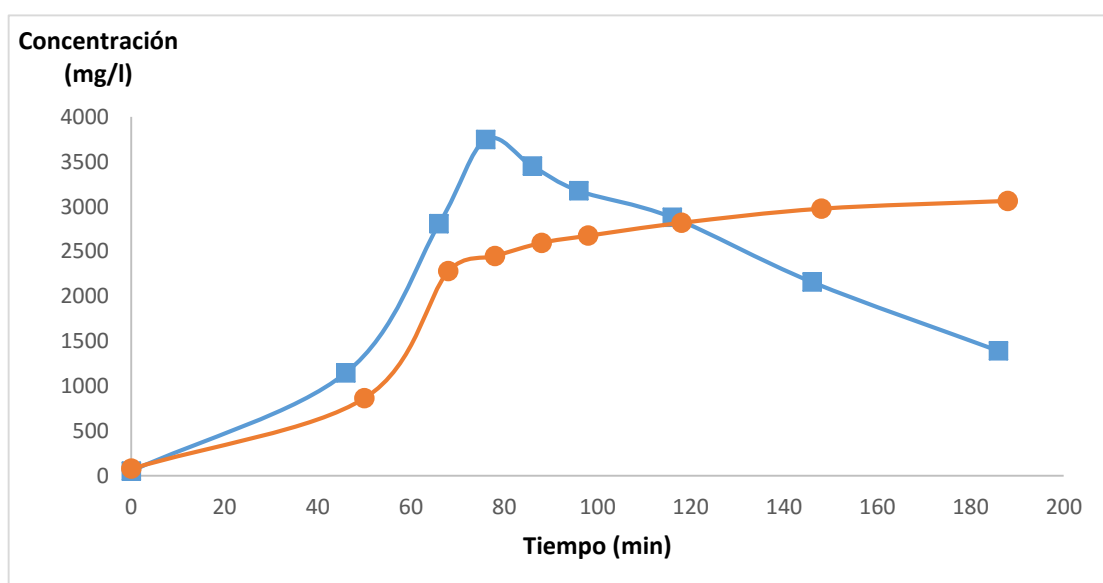


Figura 12. Evolución de la concentración de carbohidratos durante la HT (—●—) y la OH (—■—).

Los cambios en la concentración de carbohidratos durante la HT siguen la tendencia de proteínas y ácidos húmicos. Esto puede explicarse también del mismo modo. Se obtuvo una concentración final ligeramente superior a 3000 mg/l.

Esta similitud entre carbohidratos y otras biomoléculas en el tratamiento de HT también se puede encontrar durante la OH: se alcanza un máximo de concentración de

3746 mg/l, a partir del cual las reacciones de oxidación degradan los carbohidratos, hasta una concentración final de 1391 mg/l.

La OH proporciona una concentración máxima de carbohidratos mayor que la HT, y además se alcanza mucho antes en OH, pues en HT se da al final del experimento.

3.2.4 Ácidos urónicos

La evolución en la concentración de los ácidos urónicos se muestra en la figura 13, y puede explicarse del mismo modo que el resto de compuestos analizados.

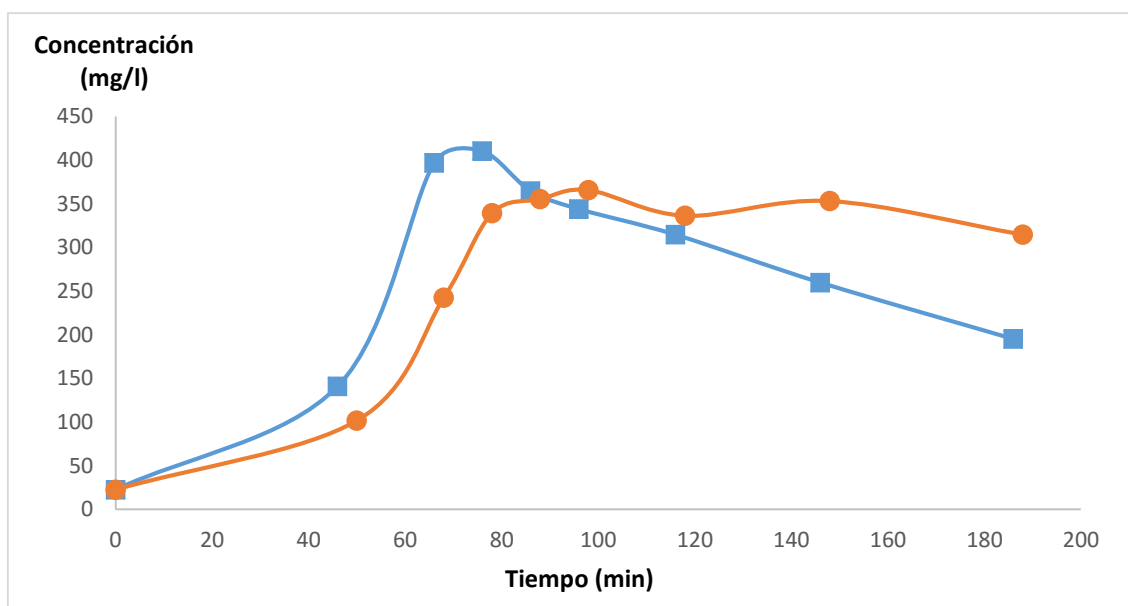


Figura 13. Evolución de la concentración de ácidos urónicos durante la HT (—●—) y la OH (—■—).

Los ácidos urónicos son componentes minoritarios, ya que la concentración final obtenida es muy inferior a la de proteínas, ácidos húmicos o carbohidratos. Concretamente, se obtuvieron 365 mg/l con HT, y 410 mg/l con OH. Sin embargo, valor máximo en HT permanece prácticamente estable hasta finalizar el proceso, mientras que en OH desciende debido a la oxidación, hasta un valor final de 195 mg/l.

La OH permite alcanzar una mayor concentración que la HT, y además en un tiempo menor.

3.2.5 ADN

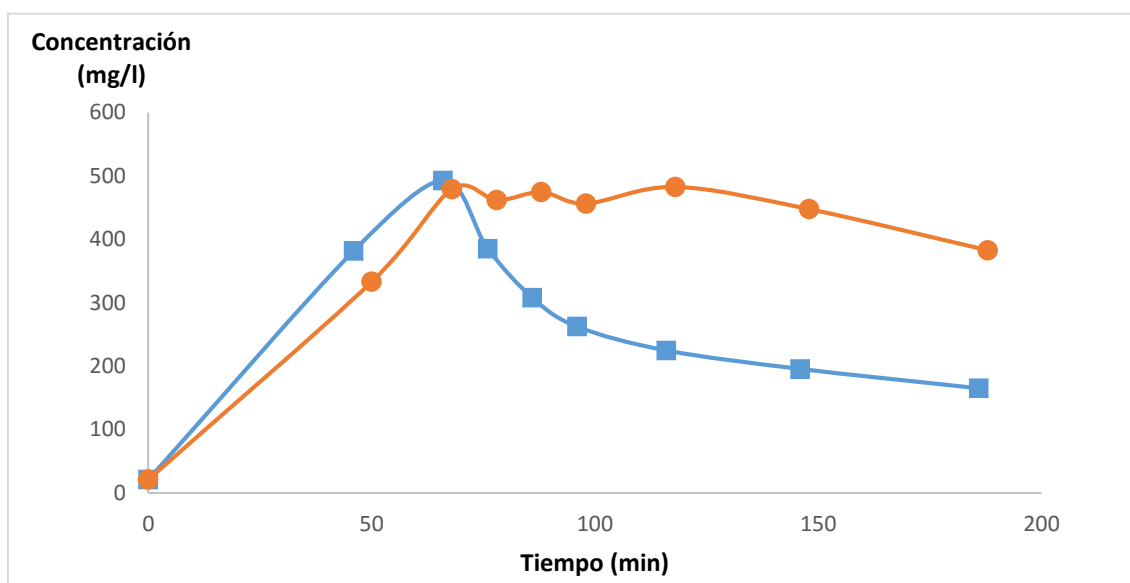


Figura 14. Evolución de la concentración de ADN durante la HT (—●—) y la OH (—■—).

La concentración de ADN debería aumentar con el tiempo, ya que es un material mayoritariamente intracelular, por lo que su concentración debería sufrir un aumento rápido inicialmente hasta alcanzar un nivel máximo debido a la lisis celular, a partir del cual debe mantenerse relativamente constante, puesto que cada vez quedarán menos células que puedan romperse liberando el ADN. En los últimos minutos se puede esperar una disminución de la concentración debido a las reacciones de hidrólisis que tienen lugar. Esto es, en efecto, lo que se observa en la figura 14 para la HT, donde la concentración de ADN alcanza su máximo en 479 mg/l y finalmente se reduce hasta 382 mg/l.

En OH cabría esperar un comportamiento similar, pero hay que tener en cuenta que las reacciones de oxidación destruirán las moléculas de ADN en los minutos finales del proceso. Este comportamiento se aprecia en la figura 14, donde se ve un punto de concentración máxima de 479 mg/l y una concentración final de 165 mg/l.

En este caso las concentraciones máximas logradas son similares para OH y HT (479 mg/l), ya que el ADN es intracelular y en ambos casos se lisan todas las células, además se usó el mismo lodo, por lo que es el resultado que cabría esperar. Se puede destacar que esta concentración máxima también se alcanza en el mismo tiempo de reacción aproximadamente.

3.2.6 Tamaños

A continuación, se muestra la evolución de los diferentes intervalos de tamaños considerados en el apartado 2.4.10 para HT y OH:

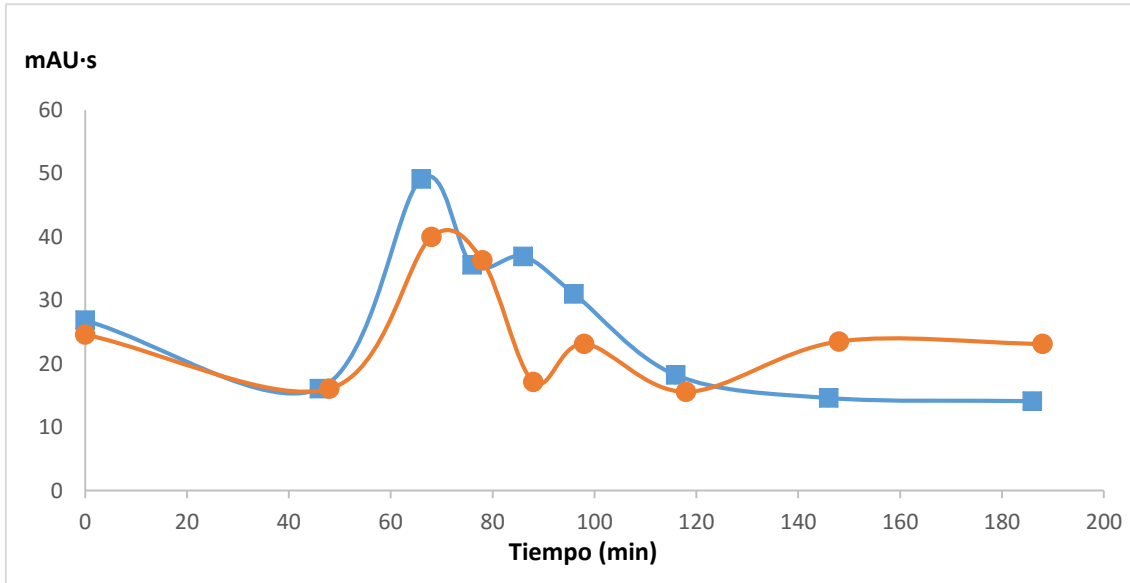


Figura 15. Evolución de las concentraciones de moléculas de tamaño comprendido entre 549 kDa y 151 kDa durante la HT (—●—) y la OH (—■—).

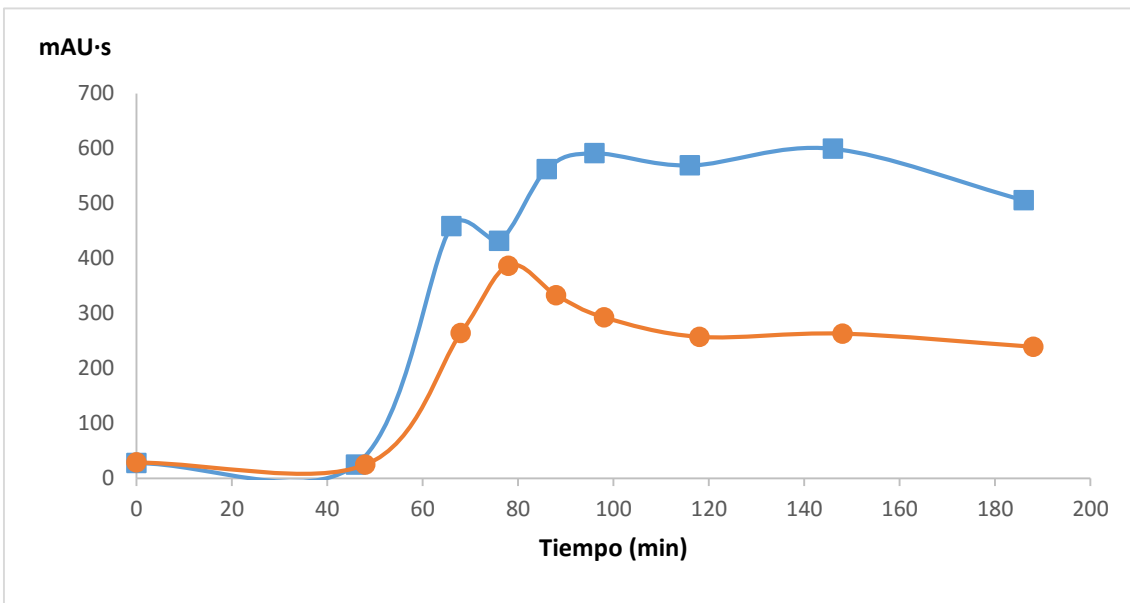


Figura 16. Evolución de las concentraciones de moléculas de tamaño comprendido entre 151 kDa y 35 kDa durante la HT (—●—) y la OH (—■—).

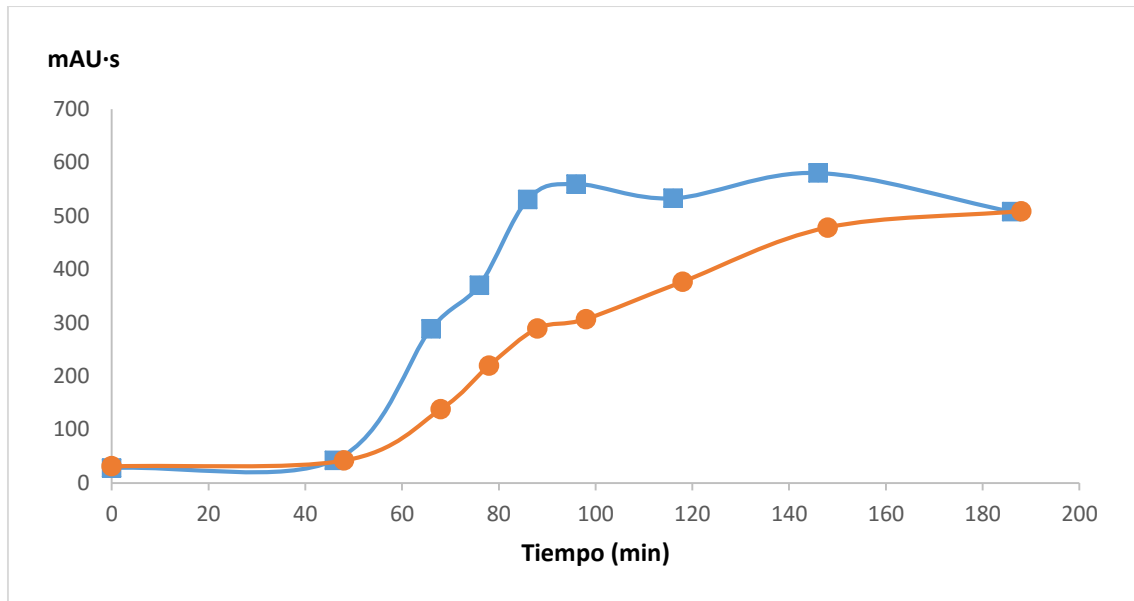


Figura 17. Evolución de las concentraciones de moléculas de tamaño comprendido entre 35 kDa y 13 kDa durante la HT (—●—) y la OH (—■—).

Al avanzar la HT, como se ha comentado, las moléculas solubilizadas se van hidrolizando debido a la temperatura y la alta presión, por lo que su tamaño se reduce. En los gráficos anteriores se puede apreciar que las moléculas de mayor tamaño aumentan ligeramente a los 60 minutos aproximadamente, lo que se debe a la lisis de células que libera las grandes proteínas intracelulares. En este punto también aumentan las moléculas de tamaños medios y más pequeños, debido al mismo motivo. Sin embargo, a partir de este punto (recordar que es en el que se alcanza la temperatura de reacción, 160 °C), la cantidad de moléculas de mayor tamaño disminuye, debido a que comienzan a hidrolizarse. Esto justifica el aumento de las moléculas de tamaño intermedio y las de menor tamaño. La concentración de éstas últimas sigue en aumento hasta el final del experimento, si bien la concentración de las de tamaño intermedio disminuye, debido a que las reacciones de hidrólisis las transforman también en moléculas de pequeño tamaño.

Al igual que en HT, en OH la concentración de moléculas de mayor tamaño sufre un ligero aumento hacia los 60 minutos de experimento (160 °C), debido a la lisis celular y liberación del contenido citoplasmático. A partir de este punto, la concentración disminuye debido a la hidrólisis y a la oxidación. La concentración de moléculas de tamaño medio y pequeño también aumenta en este punto, en parte por la liberación de los citoplasmas, pero también a consecuencia de la ruptura de las moléculas más grandes.

Las diferencias existentes en el comportamiento de las moléculas (sobre todo de tamaño medio) entre OH y HT se debe a que en la OH, debido precisamente a la presencia de oxígeno, se oxidan algunos residuos como fenilalanina y triptófano, con lo que la fenilalanina se transforma en tirosina (Biondi, Ambrosio, Liebgott, Cardounel, Bettini, Tritto y Zweier (2006); Zhang, Huang, Yao, Ke, Zhang, y Lu (2014)). Esta oxidación lleva a un cambio en la cadena lateral del aminoácido, lo que afecta a todas sus propiedades, incluida la absorbancia (Devlin, 2004).

3.2.7 Determinación del tiempo óptimo

Siguiendo el criterio establecido en el apartado 2.2.3, se seleccionará como óptimo el punto en el que la concentración de proteínas sea mayor. Esto se muestra en la siguiente figura:

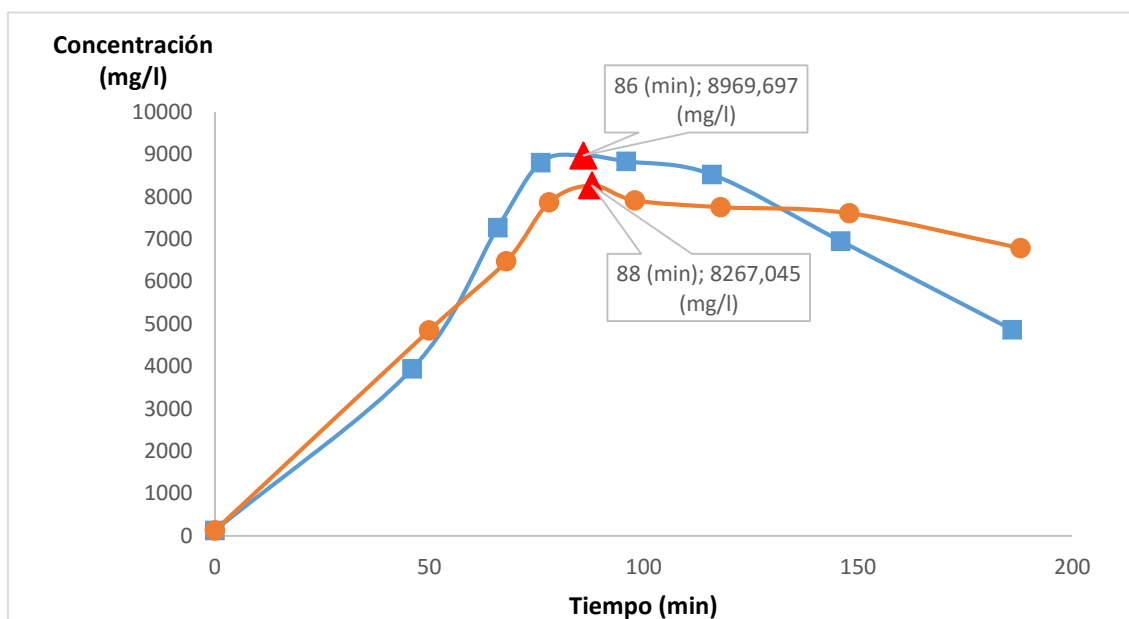


Figura 18. Selección del tiempo óptimo para HT (—●—) y OH (—■—).

La figura 18 muestra que el óptimo de la HT se encuentra 20 minutos después de haber alcanzado los 160 °C, es decir, 88 minutos después del inicio del proceso; mientras que el óptimo para OH se alcanza tras 86 minutos de proceso, lo que también equivale a 20 minutos después de haber alcanzado la temperatura de reacción.

En la tabla siguiente se muestra el valor de los principales parámetros analizados en el punto óptimo:

Tabla 2. Valores de los principales parámetros analizados en el tiempo óptimo de HT y OH.

Parámetro		HT	OH
		Valor	Valor
Tiempo óptimo		88 min	86 min
pH (t)		6,04 (16,2 °C)	3,96 (20,7 °C)
DQO	DQO_t/DQO_{t_0}	1,10	0,95
	DQO_s/DQO_{s_0}	4,92	10,27
Sólidos	ST	32,43% reduct.	61,51% reduct.
	SV	37,64% reduct.	69,00% reduct.
	SF	11,87% reduct.	29,77% reduct.
	IVF/IVF ₀	1,47	2,47
Proteínas		0,22 mg/g SV	0,24 mg/g SV
Ác. húmicos		0,11 mg/g SV	0,13 mg/g SV
Carbohidratos		0,07 mg/g SV	0,09 mg/g SV
Ác. urónicos		0,01 mg/g SV	0,01 mg/g SV
ADN		0,01 mg/g SV	0,01 mg/g SV
Carbono soluble	COT/COT_0	1,25	3,42
	CI	$1,61 \cdot 10^{-5}$ mg/g SV	$1,32 \cdot 10^{-5}$ mg/g SV

3.3 EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

Para comprobar la eficacia de los diferentes métodos de separación de proteínas propuestos, se analizaron las concentraciones de proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos en el sobrenadante, previamente centrifugado, antes y después de realizar cada uno de los protocolos explicados en el apartado 2.4. Antes de pasar a presentar los resultados, se debe mencionar que éstos se expresarán como porcentajes de proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos en precipitado o en sobrenadante. Las medidas se hicieron por triplicado, para presentar la media y su desviación típica.

Se observó también que, si el tiempo entre la obtención del solubilizado por tratamiento hidrotérmico y la aplicación del protocolo de extracción era elevado, éste se deterioraba considerablemente, probablemente debido a reacciones de descomposición de los biopolímeros y al crecimiento microbiano. Así, la conservación de los

sobrenadantes obtenidos por tratamiento hidrotérmico en cámara a 5 °C durante 2 meses (debido a la realización de las prácticas externas) supuso reducciones del 33% en la concentración de proteínas, y, sorprendentemente, un aumento en la concentración de ácidos húmicos (pasando de 4790 ppm a 5650 ppm en el caso de la muestra de OH) y también en la de carbohidratos (aumentó hasta 4000 ppm desde las 3350 ppm iniciales en la muestra de OH). En el caso de las muestras de HT la variación en la concentración de las moléculas estudiadas fue menos acusada. Previendo lo que podía pasar con las muestras, se congeló parte de las mismas. Sin embargo, también hubo problemas, pues al descongelar se observó una pequeña reducción en la concentración de proteínas (cerca del 12%) y en la de AH, pero ligeros incrementos en la de carbohidratos. En ambos casos (conservación a 5 °C y congelación) apareció un precipitado en el fondo de los recipientes, que bien podría deberse al crecimiento de algún tipo de microorganismo, como se puede apreciar en la siguiente fotografía:

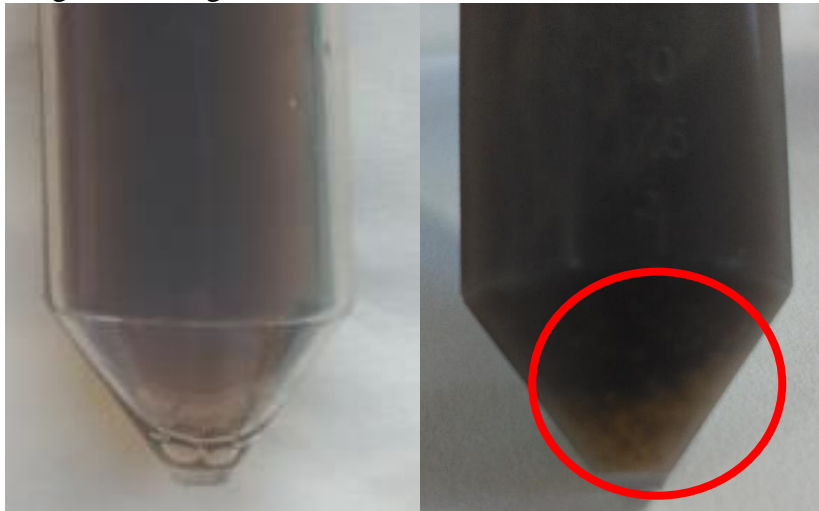


Imagen 15. Fotografía de un sobrenadante de HT en buen estado (izda.) y uno tras 2 meses en cámara a 5°C (el círculo rojo indica el precipitado observado).

Esto hizo necesario realizar de nuevo los tratamientos hidrotérmicos para generar los sobrenadantes, lo que conllevó recoger un nuevo lote de lodos espesados en la EDAR. Por lo tanto, las muestras utilizadas para las extracciones corresponden a lodos diferentes a los que han generado los resultados presentados hasta ahora (apartados 3.1 y 3.2).

La tabla 3 recoge la caracterización de los lodos a partir de los cuales se generó el sobrenadante para los protocolos de separación:

Tabla 3. Parámetros del lodo nuevo empleado en las extracciones. (*) concentraciones en el sobrenadante.

pH (t)	DQOt (mg O ₂ /l)	DQOs (mg O ₂ /l)	Sólidos			
			ST (g/l)	SV (g/l)	SF (g/l)	IVF (g/ml)
6,54 (16,2 °C)	37478,41	2996,55	31,9	25,5	6,5	31,33
Proteínas* (mg/l)	Ác. húmicos* (mg/l)	Carbohidratos* (mg/l)	Ác. urónicos* (mg/l)	ADN* (mg/l)	Carbono soluble	
					COT (mg/l)	CI (mg/l)
128,79	362,33	77,17	22,46	20,90	674	137,5

Los resultados de las extracciones se muestran a continuación, en forma de histograma y como tabla, en la que además se indican los factores de separación:

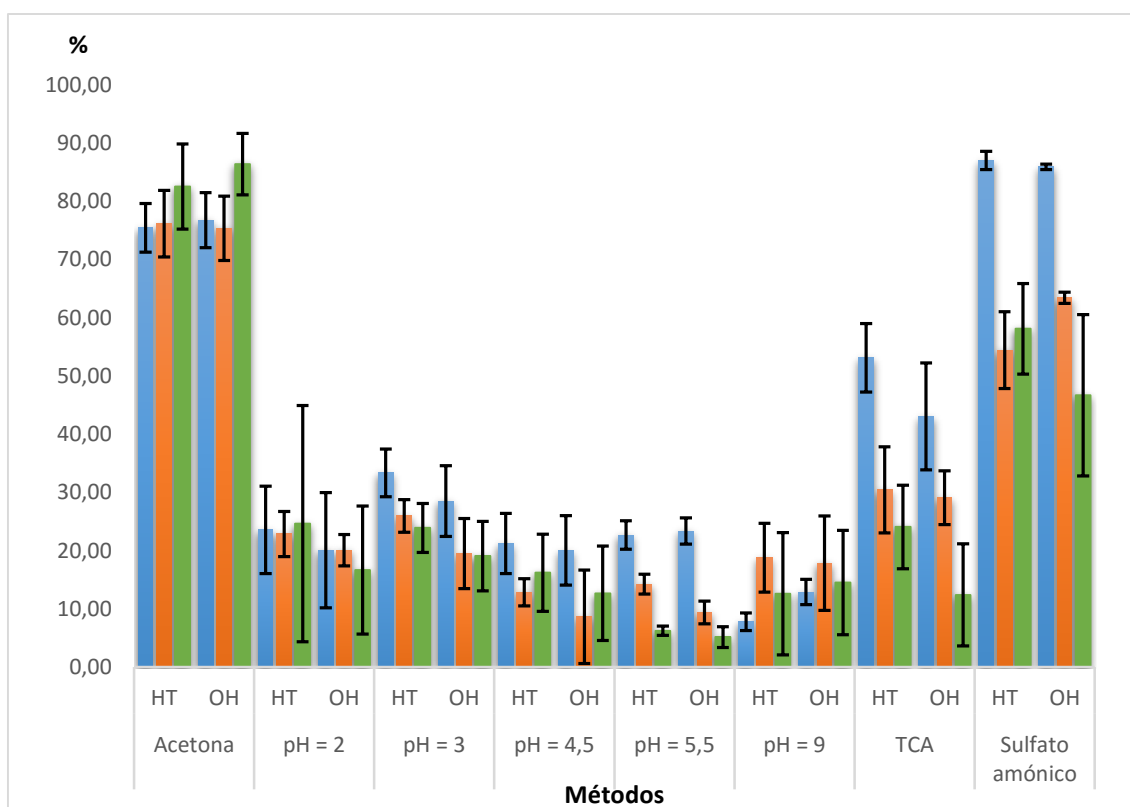


Figura 19. Porcentajes medios de proteínas (■), AH (■) y carbohidratos (■) en el precipitado de cada método de extracción. También se muestra la desviación en cada caso (barras de error).

Tabla 4. Porcentajes y desviaciones de recuperación en precipitado de proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos para cada método; y factores de separación de proteínas respecto a ácidos húmicos y carbohidratos.

Método		Proteínas		Ácidos húmicos		Carbohidratos		$\alpha_{\text{prot./AH}}$	$\alpha_{\text{prot./carb.}}$
		% recup.	σ	% recup.	σ	% recup.	σ		
Acetona	HT	75,44	4,19	76,13	5,73	82,51	7,31	0,96	0,65
	OH	76,75	4,71	75,36	5,51	86,39	5,28	1,08	0,52
pH = 2	HT	23,58	7,49	22,86	3,89	24,63	20,29	1,04	0,94
	OH	20,07	9,87	20,09	2,70	16,65	11,00	1,00	1,26
pH = 3	HT	33,36	4,08	25,95	2,79	23,91	4,20	1,43	1,59
	OH	28,49	6,07	19,49	6,00	19,06	5,95	1,64	1,69
pH = 4,5	HT	21,23	5,17	12,86	2,34	16,20	6,63	1,83	1,39
	OH	20,04	5,98	8,63	8,02	12,66	8,11	2,65	1,73
pH = 5,5	HT	22,68	2,43	14,24	1,69	6,24	0,79	1,77	4,41
	OH	23,38	2,25	9,39	1,95	5,15	1,78	2,95	5,62
pH = 9	HT	7,78	1,50	18,77	5,91	12,59	10,49	0,36	0,59
	OH	12,89	2,19	17,85	8,12	14,50	8,97	0,68	0,87
TCA	HT	53,10	5,88	30,44	7,38	24,07	7,16	2,59	3,57
	OH	43,06	9,17	29,08	4,62	12,40	8,77	1,84	5,34
Sulfato amónico	HT	87,00	1,55	54,44	6,61	58,10	7,77	5,60	4,83
	OH	85,90	0,49	63,41	0,97	46,70	13,85	3,52	6,95

Como se puede observar en la tabla, los resultados obtenidos son muy dispares, incluso para una misma técnica. Los mejores rendimientos de recuperación de proteínas se obtuvieron con acetona, ácido tricloroacético (TCA) y sulfato amónico, con porcentajes del 75% y 76%, 53% y 43%; y 87% y 86% para HT y OH respectivamente; mientras que los ajustes de pH brindaron rendimientos bajos, siendo el pH=3 el mejor de ellos, con un 33% de recuperación para HT y un 28% para OH. Estos resultados difieren en gran medida de los que obtuvieron Oliveira et al. (1999) al usar TCA como agente precipitante, ya que consiguieron rendimientos superiores al 90% de proteínas precipitadas, partiendo de un biofilm de *Pseudomonas fluorescens*.

Sin embargo, las técnicas que logran una mayor precipitación de proteínas, también causan la precipitación de los ácidos húmicos: la acetona precipita el mismo porcentaje

de ácidos húmicos que de proteínas, si bien el TCA y el sulfato amónico precipitan un 30% y 29% y un 54% y 63% de ácidos húmicos para HT y OH respectivamente. Los métodos de pH son los que menores porcentajes de ácidos húmicos precipitan, siendo el de pH=5,5 el que más AH deja en disolución (precipita un 14% en HT y un 9% en OH); y pH=3 el que peores resultados ofrece, precipitando un 25% en HT y un 19% en OH.

En cuanto a los carbohidratos, los resultados obtenidos son similares a los de ácidos húmicos. Los métodos que menos carbohidratos precipitan son los de ajuste de pH, siendo pH=5,5 el mejor en este aspecto, puesto que precipita un 6% en HT y un 5% en OH. En este caso, el TCA también aparece como un buen método, pues únicamente precipita un 24% para HT y un 12% para OH de los carbohidratos. La acetona y el sulfato amónico se presentan como los peores métodos, pues precipitan un alto porcentaje de carbohidratos: la acetona hace que el 82% en HT y el 86% en OH de los carbohidratos precipiten, y el sulfato amónico causa la precipitación del 58% en HT y el 46% en OH.

Esta poca selectividad o resolución para la separación se puede comprobar mediante el *factor de separación* (α), que se obtiene dividiendo las concentraciones de las dos biomoléculas entre sí y haciendo la relación entre precipitado y sobrenadante, como se indica a continuación:

$$\alpha_{i,j} = \frac{\left(\frac{C_i}{C_j}\right)_{\text{precipitado}}}{\left(\frac{C_i}{C_j}\right)_{\text{sobrenadante}}}$$

La resolución de esta ecuación puede devolver tres tipos de soluciones:

- $\alpha \approx 1$. Indica que no hay buena separación, es decir, que las concentraciones en sobrenadante y precipitado son similares.
- $\alpha > 1$. Si α es mucho mayor que 1, hay buena separación del componente i, es decir, habrá precipitado mucho más i que j.
- $\alpha < 1$. Si α es mucho menor que 1, indica que j ha precipitado más que i, por lo que la separación es buena.

Asumiendo que el componente i sean las proteínas y a tenor de lo explicado, en este trabajo interesan, valores de α mucho mayores de 1 (precipitación mayoritaria de las proteínas frente al compuesto j soluble) o muy próximos a cero (precipitación mayoritaria del compuesto j frente a las proteínas, principalmente solubles).

El sulfato amónico, a pesar de que precipita aproximadamente la mitad de los ácidos húmicos, sí que presenta una buena separación, con un α de 5,6 para HT y 3,52 para OH, presentándose como la alternativa más interesante para separar proteínas, puesto que el factor de separación entre proteínas y carbohidratos es de 4,83 en HT y 6,95 en OH.

En cambio, el ajuste a pH=2 no ofrece una buena resolución en la separación de proteínas y ácidos húmicos, puesto que el valor de α obtenido es prácticamente 1, lo que también se puede extrapolar a la separación de proteínas y carbohidratos, si bien en la muestra de OH la separación entre proteínas y carbohidratos es evidente ($\alpha = 1,26$).

Si el valor de pH es 3, la separación es buena, pues para las muestras de HT y OH, y tanto para separar las proteínas de los ácidos húmicos, como para separarlas de los carbohidratos, se obtuvo un valor del factor superior a 1,4. Un resultado muy similar se obtuvo con pH=4,5; si bien los valores de α son ligeramente más altos, llegando a ser 2,65 para separar proteínas y ácidos húmicos en el efluente de la OH.

La acetona no es buen método para separar proteínas de ácidos húmicos, pues los precipita prácticamente por igual ($\alpha \approx 1$ tanto para HT como para OH). Sin embargo, la separación de proteínas y carbohidratos es más clara, pues se obtuvieron valores del factor de separación de 0,65 para HT y 0,52 para OH, lo que indica que precipita mejor los carbohidratos que las proteínas.

El ajuste de pH a 5,5 ofrece una mayor selectividad para las proteínas, ya que el valor de α es, en todos los casos, muy superior a 1, lo que indica que precipita mucho mejor las proteínas que las otras biomoléculas consideradas.

Al ajustar el pH a 9, se obtiene también una buena selectividad, pero en este caso, esta selectividad es la contraria a la del método anterior, pues el valor del factor de separación es inferior a 1, lo que indica que precipita más ácidos húmicos y más carbohidratos que proteínas.

Dada la diferencia entre la HT y la OH, se podría pensar que el propio tratamiento aplicado influya en el proceso de precipitación. Estas diferencias se pueden comprobar en los siguientes gráficos de dispersión:

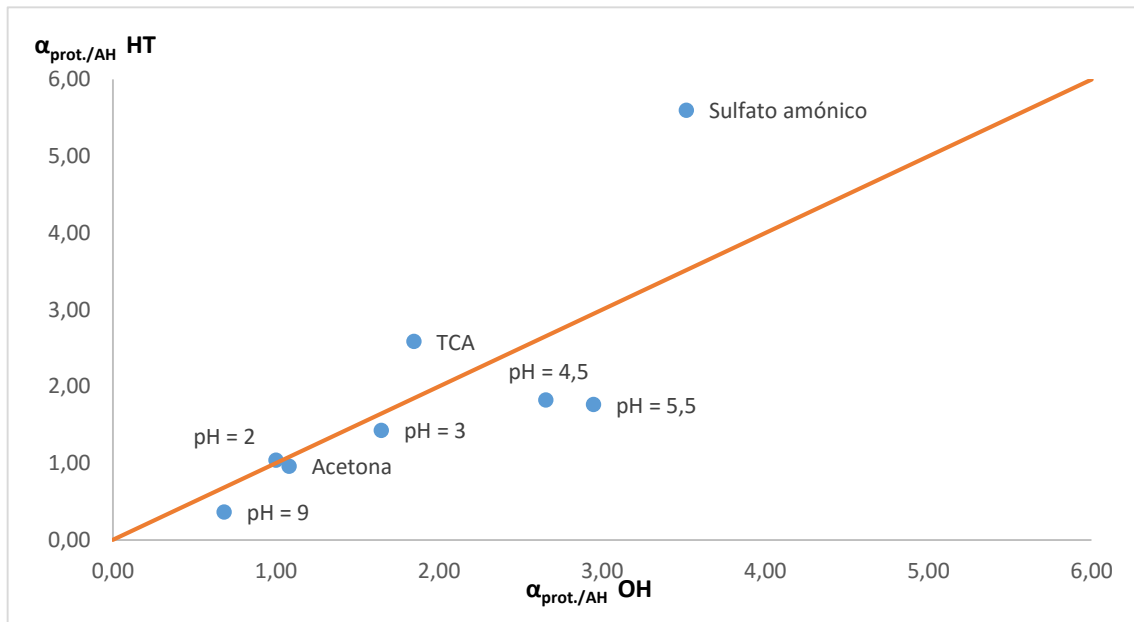


Figura 20. Comparación del factor de separación entre proteínas y ácidos húmicos en cada método para OH (eje X) y HT (eje Y).

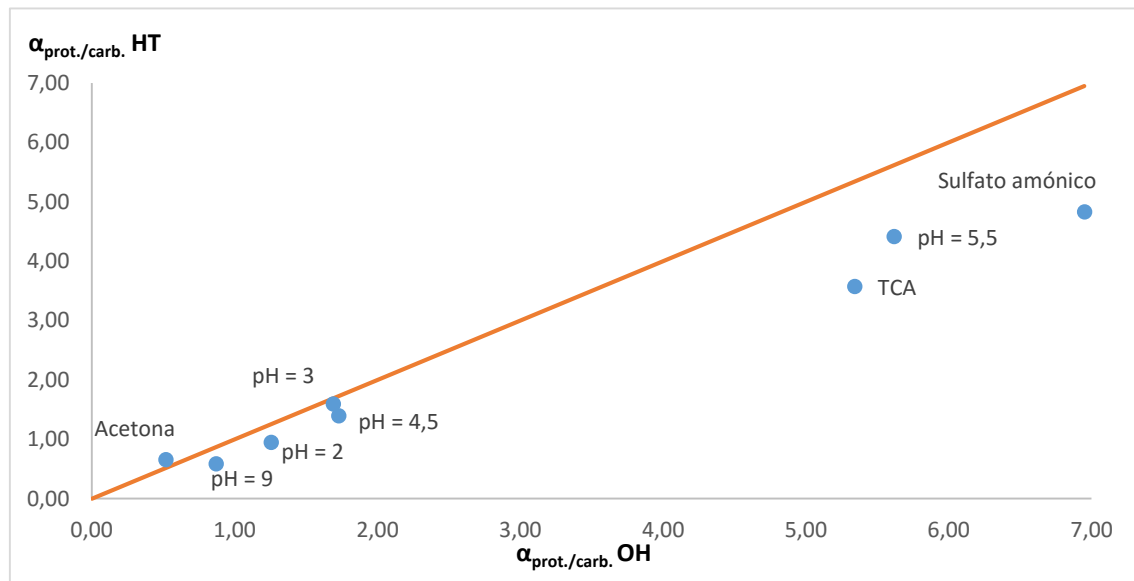


Figura 21. Comparación del factor de separación entre proteínas y carbohidratos en cada método para OH (eje X) y HT (eje Y).

A la hora de analizar los gráficos de dispersión anteriores, se debe tener en cuenta que los puntos que queden en la zona superior a la función $y = x$ (línea naranja) indican que el método de separación es más selectivo cuando se aplica sobre el efluente de HT que sobre el de OH, mientras que, si están en la zona inferior, la separación es más eficaz para el efluente de OH que para el de HT.

Teniendo en cuenta la explicación anterior, en la figura 20 se observa que, en general, los métodos aplicados en la muestra de OH ofrecen una mayor selectividad en cuanto a la separación de proteínas de ácidos húmicos. Esto también puede apreciarse en la figura 21, para la separación de proteínas de carbohidratos. Realizando un análisis más exhaustivo, el uso de acetona como agente precipitante es más eficiente en OH para separar proteínas de ácidos húmicos, mientras que al aplicarlo a HT se separan mejor las proteínas de los carbohidratos; si bien los valores del factor de separación en ambos casos son muy cercanos a 1, por lo que la acetona no es una buena técnica de separación.

Al ajustar el pH a valores de 3; 4,5; 5,5 y 9 en las muestras de OH se obtiene una mejor separación de las proteínas de ácidos húmicos y de carbohidratos que si se ajusta la muestra de HT a esos valores de pH. Para el ajuste de pH a 3 y 4,5 no se obtuvo un buen factor de separación, ya que fue cercano a 1; mientras que para pH=5,5 ambos factores de separación fueron buenos.

Con pH=2, se obtuvo un grado semejante de separación de proteínas y ácidos húmicos para HT y OH, mientras que las proteínas y los carbohidratos se separaron mejor en el efluente de OH. Sin embargo, debe recordarse que la separación de proteínas y ácidos húmicos en este caso no es buena, pues el factor de separación es prácticamente 1.

La adición de un 20% de ácido tricloroacético a la muestra de HT produce mejor separación de proteínas y ácidos húmicos que en la muestra de OH. Sin embargo, ocurre lo contrario para la separación de proteínas y carbohidratos, ya que funciona mejor en la muestra de OH. Tanto para separar proteínas de ácidos húmicos como para separarlas de carbohidratos, el uso de TCA es una buena alternativa, ya que los factores de separación obtenidos fueron bastante superiores a 1, llegando a ser de 5,34 y 3,47 en el caso de la separación de proteínas y carbohidratos.

Un comportamiento similar al que causa el TCA es el que presenta el sulfato amónico, ya que también muestra mejores rendimientos en HT para separar proteínas de ácidos húmicos; y los resultados son mejores en OH para separar las proteínas de los carbohidratos. En este método, los factores de separación para ambos componentes fueron los más altos de todos los que se obtuvieron.

Aunque en algunos de los métodos utilizados se consiguieron buenos porcentajes de precipitación y separación, la idea es obtener los componentes en la forma más pura

posible, por lo que se buscó un método diferente para la separación. Este método fue el uso de una resina hidrofóbica (apartado 2.3.5), aplicado únicamente a la muestra de OH, ya que la muestra de HT mostró contaminación, lo que afectó a los biocomponentes que se iban a analizar, como ya había ocurrido con las primeras muestras, si bien en esta ocasión el crecimiento de hongos fue claramente visible.

Los resultados obtenidos tras el uso de la resina se muestran a continuación:

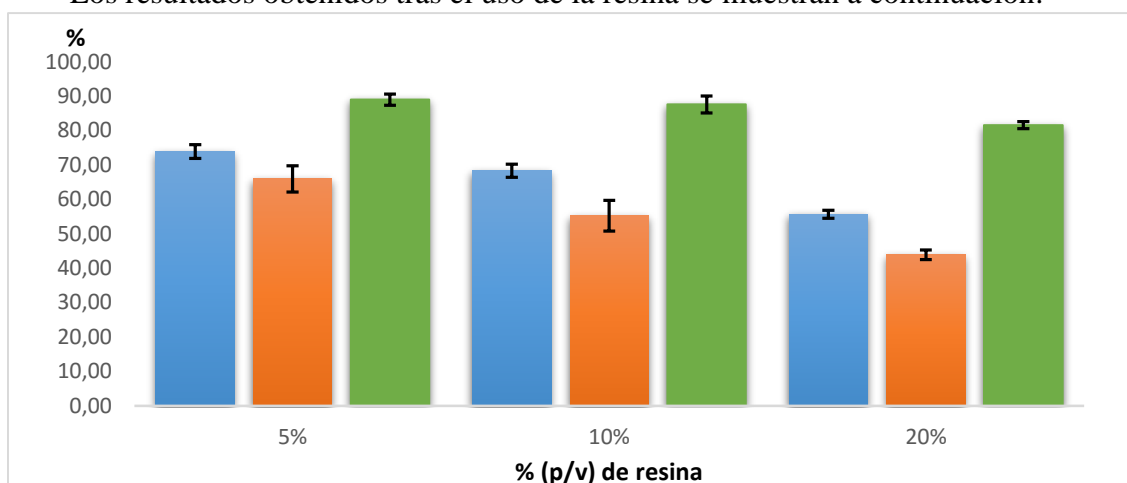


Figura 22. Porcentajes medios no retenidos por la resina, con la desviación representada por las barras de error.

Tabla 5. Porcentajes y desviaciones de retención por la resina de proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos para cada concentración; y factores de separación de proteínas respecto a ácidos húmicos y carbohidratos.

Método	Proteína		Ácidos húmicos		Carbohidratos		$\alpha_{\text{prot./AH}}$	$\alpha_{\text{prot./carb.}}$
	% recup.	σ	% recup.	σ	% recup.	σ		
5%	26,09	2,00	34,05	3,78	11,02	1,66	0,68	2,85
10%	31,71	1,93	44,72	4,46	12,40	2,47	0,57	3,28
20%	44,34	1,14	56,12	1,43	18,42	1,00	0,62	3,53

La figura 22 muestra que, efectivamente, la resina es capaz de retener ácidos húmicos, más de un 56% si se usa un 20% de resina. Sin embargo, también retiene un gran porcentaje de proteínas (aproximadamente un 44%). Como era de esperar, si la cantidad de resina disminuye, se retienen menos ácidos húmicos, y también menos proteínas. También se puede observar que no afecta en gran medida a los carbohidratos, aunque a la concentración más elevada, se retiene casi un 20% de los carbohidratos.

Para analizar los resultados de la tabla 5, se debe tener en cuenta que en este caso los porcentajes de recuperación corresponden al porcentaje que retiene la resina. Por

tanto, interesa que el factor de separación de proteínas y ácidos húmicos sea, como en los métodos anteriores, mayor o menor que 1, y que el de proteínas y carbohidratos también lo sea.

Teniendo esto en cuenta, todas las concentraciones de resina son capaces de separar proteínas y ácidos húmicos, si bien la eficiencia no es todo lo alta que se desearía. Los valores obtenidos rondan $\alpha = 0,6$ para las tres concentraciones ensayadas, lo que indica que se retienen más ácidos húmicos que proteínas. En la tabla 5 también se puede ver que los factores de separación de proteínas y carbohidratos son relativamente altos (cerca de e incluso superiores a 3), lo que indica que se separan eficientemente proteínas y carbohidratos. A pesar de que la resina separa las biomoléculas, aún queda una alta concentración de ácidos húmicos en disolución, y se pierde bastante proteína.

Aunque como se comentó en el apartado 2.3.5 la resina retiene moléculas hidrofóbicas, se ve que no se retienen todos los ácidos húmicos, y sí retiene cantidades significativas de proteínas y carbohidratos. Una posible explicación es que, al oxidarse, los ácidos húmicos adquieran grupos funcionales nuevos (grupos carbonilo, carboxilo, alcohol...) que disminuyan su hidrofobicidad. Las proteínas, al ser sometidas durante un largo período de tiempo a una temperatura elevada se habrán desnaturalizado con total seguridad, de modo que su zona hidrófoba (que queda en el interior en su estructura nativa) quede más expuesta, por lo que la resina es capaz de retenerlas. El hecho de que se retengan también carbohidratos, que son altamente polares, puede deberse a que formen parte de glucoproteínas, y que éstas queden retenidas en la resina, ya que el porcentaje de carbohidratos retenidos aumenta a medida que lo hace el de proteínas.

4. CONCLUSIONES

La hidrólisis térmica y la oxidación húmeda son dos técnicas perfectamente válidas para la gestión de lodos de depuradora. Como tratamiento último presenta ciertas ventajas la OH, pues permite una reducción del volumen del lodo, mejora su sedimentabilidad y disminuye su DQO. La HT es más adecuada para tratamientos posteriores como la digestión anaerobia, pues disminuye la concentración de sólidos sin oxidar las moléculas que actuarán como sustrato.

Sin embargo, los tratamientos convencionales no suponen una ventaja que asegure a la EDAR un buen balance económico. Es por ello que, los tratamientos hidrotérmicos con una duración controlada en torno a 90 minutos para la OH y HT, permiten obtener altas concentraciones de proteínas, de 0,24 mg/g SV y 0,22 mg/g SV respectivamente. Otras biomoléculas que pueden encontrarse en alta concentración son los ácidos húmicos y los carbohidratos. Los primeros, si el lodo se somete a OH, también presentan un máximo de concentración en el mismo tiempo de tratamiento que las proteínas, alcanzando concentraciones de 0,13 mg/g SV. En el caso de recurrir a la HT, la concentración de ácidos húmicos obtenida en el tiempo óptimo fue de 0,11 mg/g SV. La concentración de carbohidratos obtenida en dicho tiempo fue también alta, de 0,09 mg/g SV en OH y 0,07 mg/g SV en HT.

De todos los métodos de separación de proteínas ensayados, los que mejores rendimientos brindaron, teniendo en cuenta que lo buscado es purificar las proteínas, fueron: la precipitación con sulfato amónico, tanto tras la aplicación de HT como de OH, seguido de la adición de un 20% de ácido tricloroacético (sobre todo si se recurre a HT) y el ajuste del pH del efluente a un valor de 5,5 (principalmente tras la OH). Se consideraron estos tres métodos como los mejores, ya que son los que precipitan proteínas de forma más selectiva frente a ácidos húmicos y carbohidratos. Todos los métodos permitieron una mejor separación entre proteínas y carbohidratos que entre proteínas y ácidos húmicos. Debido a ello, se buscó separar primero los ácidos húmicos de las otras biomoléculas, para luego intentar purificar las proteínas por uno de los tres métodos anteriormente comentados. Con este fin, se recurrió al uso de una resina hidrofóbica, puesto que los ácidos húmicos son de naturaleza mayoritariamente apolar, mientras que proteínas y carbohidratos son polares.

De nuevo, los resultados no fueron los esperados, pues la resina retuvo tanto ácidos húmicos como proteínas. La explicación para estos malos resultados se debe al tratamiento de OH, que modifica los ácidos húmicos haciéndolos más polares y desnaturaliza las proteínas haciéndolas más hidrofóbicas.

La conclusión principal que se desprende de todo el trabajo es que los tratamientos hidrotérmicos son una alternativa con gran potencial para la recuperación de biomoléculas como proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos, que presentan un gran interés industrial, si bien los métodos de separación de las mismas deben ser analizados con mayor profundidad para mejorar los resultados obtenidos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Biondi, R., Ambrosio, G., Liebgott, T., Cardounel, A. J., Bettini, M., Tritto, I., y Zweier, J. L. (2006). Hydroxylation of D-phenylalanine as a novel approach to detect hydroxyl radicals: application to cardiac pathophysiology. *Cardiovascular research*, 71(2), 322-330.
- Blumenkrantz, N., y Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry*, 54(2), 484-489.
- Burton, K. (1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochemical journal*, 62(2), 315.
- Chen, Y., Jiang, S., Yuan, H., Zhou, Q., y Gu, G. (2007). Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Research*, 41(3), 683-689.
- CINVESTAV (2008). Métodos de precipitación para limpieza de proteínas. Unidad de Genómica, Proteómica y Metabólica. México, D.F.
- Devlin, T. M. (2004). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. Barcelona: Reverté.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P., y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Frølund, B., Griebe, T., y Nielsen, P. H. (1995). Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(4), 755-761.
- Hii, K., Baroutian, S., Parthasarathy, R., Gapes, D. J., y Eshtiaghi, N. (2014). A review of wet air oxidation and thermal hydrolysis technologies in sludge treatment. *Bioresource technology*, 155, 289-299.
- Hii, K., Parthasarathy, R., Baroutian, S., Gapes, D. J., y Eshtiaghi, N. (2013). Hydrothermal processing of Sludge-A review. *Chemeca 2013: Challenging Tomorrow*, 491.
- Hwang, J., Zhang, L., Seo, S., Lee, Y. W., y Jahng, D. (2008). Protein recovery from excess sludge for its use as animal feed. *Bioresource technology*, 99(18), 8949-8954.

Judd, S. (2010). *The MBR book: principles and applications of membrane bioreactors for water and wastewater treatment*. Oxford: Elsevier.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.

National Center for Biotechnology Information. (06 de 06 de 2016). PubChem. Obtenido de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Oliveira, R., Marques, F., y Azeredo, J. (1999). Purification of polysaccharides from a biofilm matrix by selective precipitation of proteins. *Biotechnology techniques*, 13(6), 391-393.

Pervaiz, M. (2012). Protein recovery from secondary paper sludge and its potential use as wood adhesive (Tesis Doctoral, Universidad de Toronto).

Peuravuori, J., Ingman, P., Pihlaja, K., y Koivikko, R. (2001). Comparisons of sorption of aquatic humic matter by DAX-8 and XAD-8 resins from solid-state ¹³ C NMR spectroscopy's point of view. *Talanta*, 55(4), 733-742.

Peuravuori, J., Pihlaja, K., y Välimäki, N. (1997). Isolation and characterization of natural organic matter from lake water: two different adsorption chromatographic methods. *Environment international*, 23(4), 453-464.

Salati, S., Papa, G., y Adani, F. (2011). Perspective on the use of humic acids from biomass as natural surfactants for industrial applications. *Biotechnology advances*, 29(6), 913-922.

Schriewer, A., Wehlmann, A., y Wuertz, S. (2011). Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. *Journal of microbiological methods*, 85(1), 16-21.

Tekin, K., Karagöz, S., y Bektaş, S. (2014). A review of hydrothermal biomass processing. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 40, 673-687.

Thurman, E. M., y Malcolm, R. L. (1981). Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environmental Science & Technology*, 15(4), 463-466.

Tizaoui, C., Bouselmi, L., Mansouri, L., y Ghrabi, A., (2007). Landfill leachate treatment with ozone and ozone/hydrogen peroxide systems. *Journal of Hard Materials*. 140, 316-324.

Urrea, J. L., Collado, S., Laca, A., y Díaz, M. (2014). Wet oxidation of activated sludge: Transformations and mechanisms. *Journal of environmental management*, 146, 251-259.

Zhang, J., Huang, Q., Yao, G., Ke, Z., Zhang, H., y Lu, Y. (2014). SERS study of transformation of phenylalanine to tyrosine under particle irradiation. *Journal of Molecular Structure*, 1072, 195-202.