

## **ANEXOS**

Anexo I: Microbiología de las aguas.....	1
Anexo II: Estaciones depuradoras de aguas residuales .....	7
Anexo III: Criterios de calidad en aguas regeneradas .....	9
Anexo IV: Resultados y metodología analítica .....	13
Anexo V: Metodología de la microbiología.....	17
Anexo VI: Equipos.....	23
Anexo VII: Caracterización microbiológica de las EDARs estudiadas.....	29
Anexo VIII: Análisis de variables.....	49



## Anexo I: Microbiología de las aguas

Las características biológicas y microbiológicas del agua vienen regidas por la población de microorganismos acuáticos que alberga y que afectan de un modo muy importante a su calidad. Algunos de estos microorganismos pueden dañar de forma más o menos grave la salud humana, tanto por sí mismos como mediante la producción de toxinas durante su ciclo vital, dando lugar a las denominadas enfermedades de transmisión hídrica. Éstas tienen una incidencia especialmente acusada en los países en vías de desarrollo, e incluso cada vez más frecuentemente en los desarrollados. En los países en vías de desarrollo se estima que el 80% de las enfermedades y más de un tercio de las muertes están asociadas a la utilización y consumo de aguas contaminadas [Guimares et al., 2001].

Las enfermedades de transmisión hídrica componen un grupo importante de enfermedades que suelen aparecer en brotes epidémicos, algunos de ellos de graves consecuencias para amplios grupos poblacionales, y cuya común particularidad es que se transmiten a través de aguas contaminadas por distintos agentes biológicos (microorganismos patógenos) y se manifiestan por cuadros importantes de diarreas agudas.

La forma más peligrosa de contaminación de agua es la que se produce, a través de la transmisión fecal-oral, mediante la cual un microorganismo patógeno eliminado en las heces humanas o de animales contamina el medio acuático y luego es ingerido.

En términos globales se estima que las enfermedades transmitidas por el agua son responsables de más de 2 millones de muertes anuales, en especial en niños menores de 5 años. Esto equivale a un choque de 20 aviones por día y representa un 15% de todas las muertes en el grupo de edad mencionado [Tortora et al., 1993].

Los microorganismos patógenos se transmiten sobre todo por la ingestión del agua que los contenga, aunque también se pueden transmitir por contacto con personas o animales infectados, o por exposición a aerosoles ricos en estos patógenos.

Por otro lado, el contenido microbiológico de un agua puede afectar al desarrollo posterior de olores y sabores en esa agua, incluso después de su correcta potabilización.

Los microorganismos más numerosos que pueden albergar las diferentes masas de agua existentes en nuestro planeta se pueden clasificar en bacterias, protozoos y virus.

### **Bacterias**

Las bacterias son microorganismos procariotas, en general de menor tamaño que los organismos eucariotas, pero mayores que los virus. En función de la naturaleza y tipo de pared celular se pueden agrupar en tres grandes divisiones: *micoplasmas*, que no sintetizan una pared celular y sólo tienen membrana celular; *bacterias Gram-positivas*, que sintetizan una pared celular de una capa; *bacterias Gram-negativas*, que poseen una pared celular con al menos dos capas estructuralmente distintas.

Los *micoplasmas* son organismos deformables y frágiles, debido a la ausencia de pared celular. Suelen ser contaminantes habituales de cultivos de tejidos, además de haberse encontrado en otros medios libres (aguas). Sus células pueden ser redondeadas o alargadas e irregulares, o bien filamentosas. Pueden ser móviles o inmóviles. Son los microorganismos más pequeños observables al microscopio óptico.

Las bacterias *Gram-positivas* pueden ser aerobias o anaerobias. También se pueden diferenciar según la forma que presentan: pueden ser esféricas (cocos) o alargadas (bacilos). En algunos casos forman endosporas resistentes al calor, la radiación y los agentes tóxicos. Por otro lado, muchas bacterias *Gram-positivas* unicelulares pueden ser inmóviles o bien móviles mediante flagelos.

Las bacterias *Gram-negativas* son un grupo muy diverso de microorganismos, algunos de los cuales tienen flagelos para moverse, en diferente número y morfología, bien insertados en una zona determinada de la superficie celular (flagelación polar) o distribuidos por toda la pared celular (flagelación perítrica).

Para clasificar las bacterias en *Gram-positivas* y *Gram-negativas*, se usa un tipo de tinción especial, la tinción de Gram, que sirve para poner de manifiesto la estructura de la pared celular del individuo.

La tinción de Gram fue desarrollada por el bacteriólogo danés Hans Christian Gram en 1884 y es uno de los procedimientos de tinción más útiles porque permite clasificar las bacterias en dos grandes grupos: *Gram-positivas* y *Gram-negativas*. El procedimiento completo llevado a cabo en la realización de una tinción de Gram puede observarse en la figura I.1, así como los cambios de color producidos en las bacterias según su clasificación.

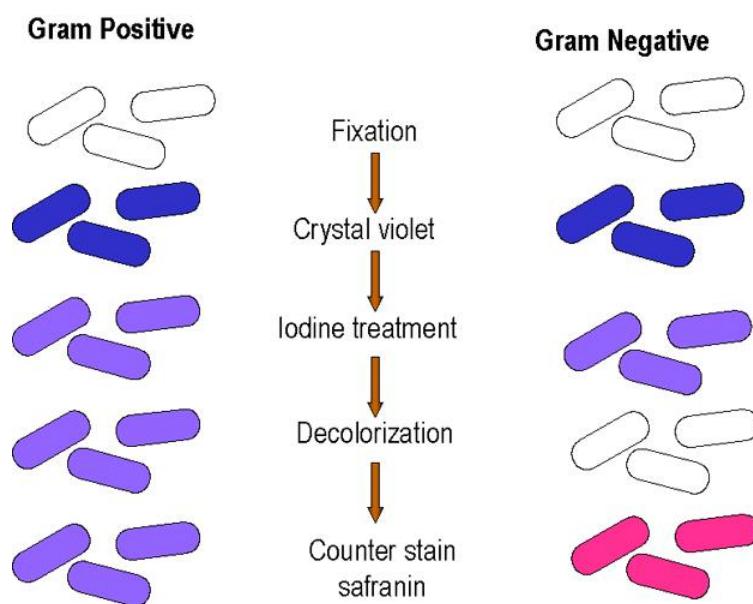


Figura I.1: Procedimiento y cambios de color en la tinción de Gram

En primer lugar se realiza un frotis de un cultivo de las bacterias a estudiar en un porta. Cuando la muestra está seca se prosigue con la tinción. El primer colorante usado es el denominado colorante primario, violeta de genciana, el cual imparte su color a todas las células. Tras un minuto, se lava el porta con agua destilada y se añade yodo. Este compuesto da a todas las bacterias un color violeta oscuro. Tras otro minuto, se vuelve a lavar el porta y se añade un agente decolorante el cual únicamente elimina el color violeta de las células *Gram-negativas*. Este decolorante puede ser alcohol o una mezcla alcohol-acetona. En este punto de la tinción, las bacterias *Gram-positivas* siguen siendo violetas mientras que las *Gram-negativas* son incoloras y por consiguiente son invisibles al microscopio. Por último, se elimina el alcohol con agua y se añade safranina, un colorante denominado de contraste. Se lava el porta y se seca. El motivo de la adición de este último colorante es conseguir que las bacterias *Gram-negativas* sean visibles al microscopio, tomando un tono rosado. Las bacterias *Gram-positivas* por su parte conservarán el color violeta que ya tenían (figura I.2).

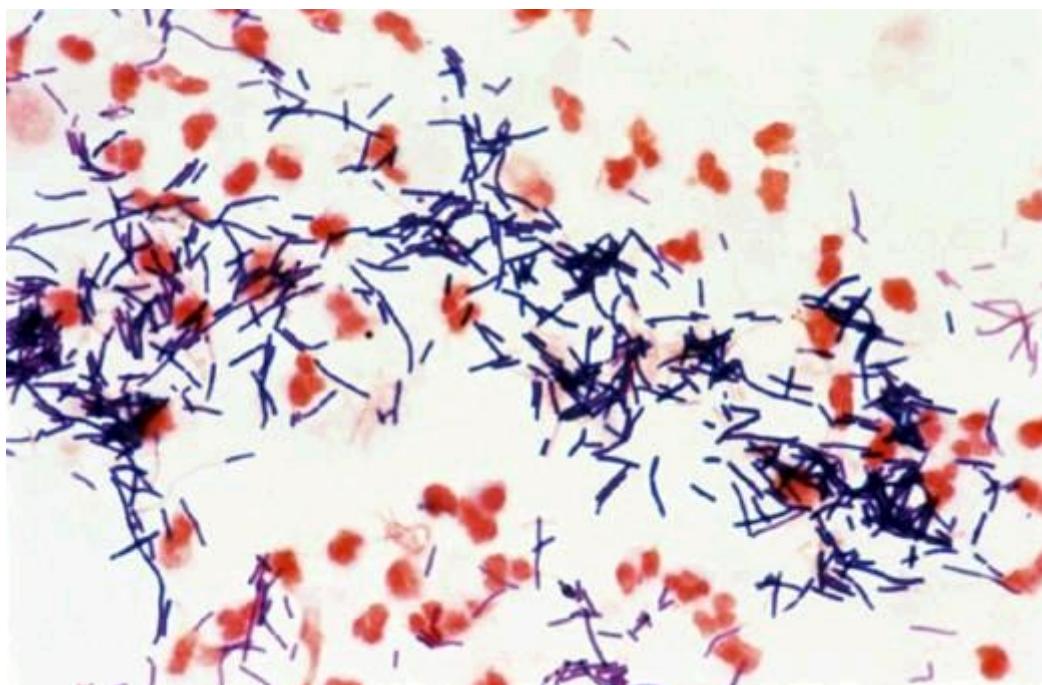


Figura I.2: Tinción de Gram

La diferencia principal de los dos tipos de bacterias es que las *Gram-negativas* se decoloran con alcohol, mientras que las *Gram-positivas* no lo hacen. Esto se debe a que en las bacterias *Gram-positivas* la red de peptidoglucanos (disacáridos y aminoácidos) origina varias capas superpuestas, es gruesa y homogénea y no hay membrana externa; mientras que en las bacterias *Gram-negativas* hay una única capa de peptiglucanos sobre la que se dispone una membrana externa constituida por una capa de fosfolípidos y otra de glicolípidos, asociados a polisacáridos, que se proyectan hacia el exterior. Por tanto, al ser la capa de peptiglucanos más delgada en las bacterias *Gram-negativas*, el complejo de gran tamaño formado por el violeta de genciana y el yodo (complejo CV-I) se elimina sin problemas ya que el alcohol altera la capa externa de lipopolisacáridos.

## **Protozoos**

Se trata de un grupo variado de células eucariotas, típicamente móviles y no fotosintéticas. Se pueden considerar cuatro grupos principales de protozoos: flagelados, flagelados ameboides, ciliados y parásitos. Este último grupo tiene especial incidencia en patogenicidad de aguas destinadas al consumo humano. Dos ejemplos importantes son *Cryptosordium parvum* y *Giardia lamblia*.

## **Virus**

Microorganismos acelulares ubicados en la frontera entre la vida y el mundo inorgánico (materia inerte). No son capaces de vivir ni reproducirse si no es parasitando células a las que ocasiona su destrucción. Están compuestos por el virión (integrado por ácido nucleico ADN o ARN) y una cápside proteica. Su tamaño es extremadamente pequeño, oscilando entre las 20 milímicras y las 300 milímicras. Su descubrimiento se puso de manifiesto dado que eran tan pequeños que atravesaban los filtros que retenían las bacterias.

Los virus se clasifican atendiendo al tipo de ácido nucleico que los conforma y a su morfología, la cual responde a tres formas principales: simetría icosaédrica, helicoidal y compleja.

Muchas especies de virus se transmiten vía aguas naturales, ríos, arroyos, lagos y embalses. En concreto, los virus acuáticos suelen ser parásitos de organismos superiores, de organismos o microorganismos típicamente encontrados en aguas.

A diferencia de las bacterias, los virus son siempre nocivos y provocan enfermedades a todo organismo al que atacan. Enfermedades tan comunes como la gripe, el catarro, el sarampión o la viruela, son debidas a virus.

## **Indicadores microbiológicos de contaminación fecal**

### ***Escherichia coli***

Pertenece al grupo de los coliformes que se definen como bacterias aeróbicas o anaeróbicas facultativas, *Gram-negativas*, que no crean endosporas, con forma de bacilo y que fermentan la lactosa formando gas a las 48 horas de ser cultivadas en caldo lactosado a 35°C.

Es uno de los habitantes más comunes del tracto intestinal humano y animal, y el más estudiado en microbiología. De hecho, la concentración de esta bacteria en las heces de origen humano y animal es muy elevada, del orden de 10<sup>9</sup> por gramo (OMS, 1995). Esta bacteria es una herramienta importante en la investigación biológica básica. En 1895 se propuso una prueba *E.coli* para determinar la potabilidad del agua de bebida [Gesche et al., 2003].

No suele ser un organismo patógeno pero puede causar infecciones urinarias y ciertas cepas segregan enterotoxinas que producen diarreas y en ocasiones enfermedades muy graves transmitidas por los alimentos.

## ***Clostridium perfringens***

El género *Clostridium* se define como bacteria *Gram-positiva*, de forma bacilar y anaerobia estricta, aunque puede resistir concentraciones más o menos fuertes de oxígeno. Todos los *Clostridium* forman un esporo, circular u oval, a menudo deformante. El hecho de formar esporos es lo que les confiere una mayor resistencia ante las condiciones adversas del medio, como la resistencia al calor y a varias sustancias químicas. Pueden ser móviles (debido a la presencia de cilios períticos) o inmóviles.

Las enfermedades relacionadas con esta bacteria son el tétanos, el botulismo y la gangrena gaseosa. Estas bacterias también son causa frecuente de diarrea transmitida por los alimentos.

## ***Enterococcus sp.***

El género *Enterococcus* está formado por bacterias esféricas u ovoides (cocos), que se encuentran aisladas, formando pares (diplococos) o cadenas cortas. Son *Gram-positivos*, no formadores de esporos, catalasa negativos e inmóviles, y tienen complejos y variables requerimientos nutricionales. Son organismos facultativos anaerobios, por lo que sobreviven bien en ausencia de oxígeno.

Son causantes en la mayoría de los casos de infecciones endógenas, entre ellas, infección del tracto urinario, endocarditis infecciosa, diverticulitis, meningitis, bacteremias e infecciones intrahospitalarias asociadas a procedimientos como instalación de catéteres vasculares, urinarios y neuroquirúrgicos entre otros.

En cuanto al género *Enterococcus* como indicador de contaminación fecal, se ha demostrado que es un indicador muy útil debido a su gran abundancia en las heces y a su gran capacidad de supervivencia en el medio. La posibilidad de indicar la fuente de contaminación mediante la identificación de estas especies ha llevado a debate si los Enterococos deberían ser considerados indicadores de contaminación fecal más fiables que *E.coli* [Meier et al., 1997].

Finalmente, los resultados indican que realmente son un indicador más estable que *E.coli* y que los coliformes fecales. Además son un indicador conservador bajo condiciones de agua salobre [Jin et al., 2005].



## Anexo II: Estaciones depuradoras de aguas residuales

Como ya se explicó en el capítulo 2, una estación depuradora de aguas residuales tiene como objetivo tratar aguas residuales de forma que tras ese tratamiento las aguas se adecúen a la normativa de vertidos aplicable, en este caso la Directiva 91/271/CEE. Las etapas que constituyen un tratamiento de este tipo son las siguientes:

1. *Entrada y elevación de agua bruta*: El proceso de depuración se inicia con la captación y entrada de agua bruta procedente de la red de saneamiento. El agua llega al pozo de gruesos donde los materiales más pesados decantan en el fondo y los más voluminosos quedan retenidos.
2. *Desbaste*: A continuación, se somete el agua bruta a un proceso de desbaste para la eliminación de sólidos “gruesos” y “finos”, los cuales serán vertidos en cintas transportadoras y depositados finalmente en contenedores para su posterior traslado al vertedero.
3. *Desarenado, Desengrasado y Elevación*: El agua residual procedente del desbaste es sometida a un proceso para la eliminación de las arenas y grasas que transporta. Las arenas, debido a su mayor peso, sedimentan en el fondo. Las grasas ascienden a la superficie por flotación, ayudadas por el burbujeo de aire que generan soplantes y que distribuyen difusores sumergidos.
4. *Decantación primaria*: En esta fase se separan la mayor parte de sólidos sedimentables y de material flotante que no pudieron ser eliminados en etapas anteriores. Mediante una decantación física natural de los sólidos en suspensión y una flotación, también natural, de las partículas menos densas. Los sólidos se depositan en el fondo, mientras que las partículas se retiran mediante rasquetas giratorias en superficie. El agua decantada se vierte en un canal que la conduce hacia el tratamiento biológico.
5. Una vez eliminada la mayor parte de los sólidos sedimentables, el agua es llevada hasta los reactores biológicos para ser sometida a un proceso que persigue fundamentalmente la degradación de la materia orgánica por la acción de una serie de microorganismos.

Los reactores biológicos disponen de tres zonas diferenciadas:

- **Zona Aerobia**: es un selector biológico que permite el aumento del número de bacterias desfosfatantes con respecto a las demás.
  - **Zona Anóxica**: en ella se produce la degradación del resto de materia nitrogenada, que en la fase aeróbica transformó los compuestos amoniacales en nitritos y nitratos y que vuelve por la recirculación.
  - **Zona Aireada**: en esta zona se produce la degradación de la materia orgánica carbonatada.
6. *Decantador secundario*: En la última fase de la depuración se separa el agua tratada del fango biológico formado en el tratamiento anterior. El proceso se lleva a cabo en los

decantadores secundarios donde el fango se deposita en el fondo y el agua depurada se evaca por los vertederos para desembocar en los ríos o mares con las garantías de calidad exigidas.

## Anexo III: Criterios de calidad en aguas regeneradas

Los criterios de calidad para la reutilización de las aguas según sus usos de acuerdo con el RD 1620/2007 son los siguientes:

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES <sup>1</sup>	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
<b>1.- USOS URBANOS</b>					
CALIDAD 1.1: RESIDENCIAL <sup>2</sup> a) Riego de jardines privados. <sup>3</sup> b) Descarga de aparatos sanitarios. <sup>3</sup>	1 huevo/10 L	0 (UFC <sup>4</sup> /100 mL)	10 mg/L	2 UNT <sup>5</sup>	OTROS CONTAMINANTES <sup>6</sup> contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas <sup>7</sup> deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <sup>8</sup> <i>Legionella spp.</i> 100 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización)
CALIDAD 1.2: SERVICIOS a) Riego de zonas verdes urbanas (parques, campos deportivos y similares). <sup>9</sup> b) Baldeo de calles. <sup>9</sup> c) Sistemas contra incendios. <sup>9</sup> d) Lavado industrial de vehículos. <sup>9</sup>	1 huevo/10 L	200 UFC/100 mL	20 mg/L	10 UNT	

<sup>1</sup> Considerar en todos los grupos de calidad al menos los géneros: *Ancylostoma*, *Trichuris* y *Ascaris*.

<sup>2</sup> Deben someterse a controles que aseguren el correcto mantenimiento de las instalaciones.

<sup>3</sup> Su autorización estará condicionada a la obligatoriedad de la presencia doble circuito señalizado en todos sus tramos hasta el punto de uso.

<sup>4</sup> Unidades Formadoras de Colonias.

<sup>5</sup> Unidades Nefelométricas de Turbiedad.

<sup>6</sup> ver el Anexo II del RD 849/1986, de 11 de abril.

<sup>7</sup> ver Anexo IV del RD 907/2007, de 6 de julio.

<sup>8</sup> Norma de calidad ambiental ver el artículo 245.5.a del RD 849/1986, de 11 de abril, modificado por el RD 606/2003 de 23 de mayo.

<sup>9</sup> Cuando exista un uso con posibilidad de aerosolización del agua, es imprescindible seguir las condiciones de uso que señale, para cada caso, la autoridad sanitaria, sin las cuales, esos usos no serán autorizados

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
<b>2.- USOS AGRÍCOLAS<sup>1</sup></b>					
CALIDAD 2.1 <sup>2</sup> a) Riego de cultivos con sistema de aplicación del agua que permita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles para alimentación humana en fresco.	1 huevo/10 L	100 UFC/100 mL  Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases <sup>3</sup> con los siguientes valores: n = 10 m = 100 UFC/100 mL M = 1.000 UFC/100 mL c = 3	20 mg/L	10 UNT	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido de aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Legionella spp.</i> 1.000 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización) Es obligatorio llevar a cabo la detección de patógenos Presencia/Ausencia ( <i>Salmonella</i> , etc.) cuando se repita habitualmente que c=3 para M=1.000

<sup>1</sup> Características del agua regenerada que requieren información adicional: Conductividad: 3,0 dS/m ; Relación de Adsorción de Sodio (RAS): 6 meq/L; Boro: 0,5 mg/L; Arsénico: 0,1 mg/L; Berilio: 0,1 mg/L; Cadmio: 0,01 mg/L; Cobalto: 0,05 mg/L; Cromo: 0,1 mg/L; Cobre: 0,2 mg/L; Manganese: 0,2 mg/L; Molibdeno: 0,01 mg/L; Níquel: 0,2 mg/L; Selenio: 0,02 mg/L; Vanadio: 0,1 mg/L.. Para el cálculo de RAS se utilizará la fórmula:

$$\text{RAS (meq / L)} = \frac{[\text{Na}]}{\sqrt{\frac{[\text{Ca}]}{2} + \frac{[\text{Mg}]}{2}}}$$

<sup>2</sup> Cuando exista un uso con posibilidad de aerosolización del agua, es imprescindible seguir las condiciones de uso que señale, para cada caso, la autoridad sanitaria, sin las cuales, esos usos no serán autorizados

<sup>3</sup> Siendo n: nº de unidades de la muestra; m: valor límite admisible para el recuento de bacterias; M: valor máximo permitido para el recuento de bacterias; c: número máximo de unidades de muestra cuyo número de bacterias se sitúa entre m y M.

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
CALIDAD 2.2  a) Riego de productos para consumo humano con sistema de aplicación de agua que no evita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles, pero el consumo no es en fresco sino con un tratamiento industrial posterior. b) Riego de pastos para consumo de animales productores de leche o carne. c) Acuicultura.	1 huevo/10 L	1.000 UFC/100 mL  Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases <sup>1</sup> con los siguientes valores: n = 10 m = 1.000 UFC/100 mL M = 10.000 UFC/100 mL c = 3	35 mg/L	No se fija límite	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Taenia saginata</i> y <i>Taenia solium</i> : 1 huevo/L (si se riegan pastos para consumo de animales productores de carne) Es obligatorio llevar a cabo detección de patógenos Presencia/Ausencia ( <i>Salmonella</i> , etc.) cuando se repita habitualmente que c=3 para M=10.000
CALIDAD 2.3  a) Riego localizado de cultivos leñosos que impida el contacto del agua regenerada con los frutos consumidos en la alimentación humana. b) Riego de cultivos de flores ornamentales, viveros, invernaderos sin contacto directo del agua regenerada con las producciones. c) Riego de cultivos industriales no alimentarios, viveros, forrajes ensilados, cereales y semillas oleaginosas.	1 huevo/10 L	10.000 UFC/100 mL	35 mg/L	No se fija límite	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Legionella spp.</i> 100 UFC/L

<sup>1</sup> Siendo n: nº de unidades de la muestra; m: valor límite admisible para el recuento de bacterias; M: valor máximo permitido para el recuento de bacterias; c: número máximo de unidades de muestra cuyo número de bacterias se sitúa entre m y M.

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
<b>3.- USOS INDUSTRIALES</b>					
CALIDAD 3.1 <sup>1</sup>  a) Aguas de proceso y limpieza excepto en la industria alimentaria. b) Otros usos industriales.	No se fija límite	10.000 UFC/100 mL	35 mg/L	15 UNT	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Legionella spp.</i> : 100 UFC/L
c) Aguas de proceso y limpieza para uso en la industria alimentaria	1 huevo/10 L	1.000 UFC/100 mL  Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases <sup>2</sup> con los siguientes valores: n = 10 m = 1.000 UFC/100 mL M = 10.000 UFC/100 mL c = 3	35 mg/L	No se fija límite	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Legionella spp.</i> : 100 UFC/L Es obligatorio llevar a cabo detección de patógenos Presencia/Ausencia ( <i>Salmonella</i> , etc.) cuando se repita habitualmente que c=3 para M=10.000
CALIDAD 3.2  a) Torres de refrigeración y condensadores evaporativos.	1 huevo/10 L	Ausencia UFC/100 mL	5 mg/L	1 UNT	<i>Legionella spp.</i> : Ausencia UFC/L Para su autorización se requerirá: - La aprobación, por la autoridad sanitaria, del Programa específico de control de las instalaciones contemplado en el Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionellosis. - Uso exclusivamente industrial y en localizaciones que no estén ubicadas en zonas urbanas ni cerca de lugares con actividad pública o comercial.

<sup>1</sup> Cuando exista un uso con posibilidad de aerosolización del agua, es imprescindible seguir las condiciones de uso que señale, para cada caso, la autoridad sanitaria, sin las cuales, esos usos no serán autorizados

<sup>2</sup> Siendo n: nº de unidades de la muestra; m: valor límite admisible para el recuento de bacterias; M: valor máximo permitido para el recuento de bacterias; c: número máximo de unidades de muestra cuyo número de bacterias se sitúa entre m y M.

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
<b>4.- USOS RECREATIVOS</b>					
CALIDAD 4.1 <sup>1</sup> a) Riego de campos de golf.	1 huevo/10 L	200 UFC/100 mL	20 mg/L	10 UNT	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. Si el riego se aplica directamente a la zona del suelo (goteo, microaspersión) se fijan los criterios del grupo de Calidad 2.3 <i>Legionella spp.</i> 100 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización)
CALIDAD 4.2 a) Estanques, masas de agua y caudales circulantes ornamentales, en los que está impedido el acceso del público al agua.	No se fija límite	10.000 UFC/100 mL	35 mg/L	No se fija límite	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. P <sub>T</sub> : 2 mg P/L (en agua estancada)

<sup>1</sup> Cuando exista un uso con posibilidad de aerosolización del agua, es imprescindible seguir las condiciones de uso que señale, para cada caso, la autoridad sanitaria, sin las cuales, esos usos no serán autorizados.

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
<b>5.- USOS AMBIENTALES</b>					
CALIDAD 5.1 a) Recarga de acuíferos por percolación localizada a través del terreno.	No se fija límite	1.000 UFC/100 mL	35 mg/L	No se fija límite	N <sub>T</sub> <sup>1</sup> : 10 mg N/L NO <sub>3</sub> : 25 mg NO <sub>3</sub> /L
CALIDAD 5.2 a) Recarga de acuíferos por inyección directa.	1 huevo/10 L	0 UFC/100 mL	10 mg/L	2 UNT	Art. 257 a 259 del RD 849/1986
CALIDAD 5.3 a) Riego de bosques, zonas verdes y de otro tipo no accesibles al público. b) Silvicultura.	No se fija límite	No se fija límite	35 mg/L	No se fija límite	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs.
CALIDAD 5.4 a) Otros usos ambientales (mantenimiento de humedales, caudales mínimos y similares).	La calidad mínima requerida se estudiará caso por caso				

<sup>1</sup> Nitrógeno total, suma del nitrógeno inorgánico y orgánico presente en la muestra



## Anexo IV: Resultados y metodología analítica

Experimento	pH <sub>0</sub>	pH	Conductividad <sub>0</sub>	Conductividad	DQO <sub>0</sub>	DQO	turbidez <sub>0</sub>	turbidez	SS <sub>0</sub>	SS
1	5,77	5,76	524,00	542,00	0,00	0,00	20,88	25,68	6,00	5,50
2	5,13	5,50	570,33	595,67	0,00	0,00	15,80	17,10	6,00	6,67
3	5,27	6,54	901,00	936,67	45,00	15,33	56,27	38,53	11,00	8,33
4	5,17	5,84	418,00	455,00	27,10	7,00	37,41	34,74	7,67	7,00
5	5,13	5,83	596,50	622,00	51,00	8,00	21,40	21,67	4,00	5,50
6	5,39	6,11	448,25	477,50	51,17	49,60	49,09	55,20	6,25	9,50
7	5,09	6,37	633,00	768,33	57,50	72,50	26,43	75,00	3,00	10,00
8	5,24	6,13	480,33	488,00	43,00	26,00	21,95	17,32	5,00	5,33
9	5,52	6,48	820,50	826,50	62,03	46,35	31,71	35,58	7,00	7,25
10	4,99	5,88	404,50	404,50	4,00	4,00	29,28	27,33	7,00	6,50
11	5,46	6,53	465,00	470,67	48,63	43,73	51,07	45,74	6,67	8,00
12	5,37	7,12	708,00	719,00	24,00	52,00	124,50	97,00	14,50	9,00

Tabla a: Parámetros físico-químicos para los experimentos a pH en torno a 5.

Experimento	pH <sub>0</sub>	pH	Conductividad <sub>0</sub>	Conductividad	DQO <sub>0</sub>	DQO	turbidez <sub>0</sub>	turbidez	SS <sub>0</sub>	SS
1	8,03	8,31	935	1094	60	59	91	176	5	19
2	8,94	8,13	600	967	53	50	88	80	9	9
3	8,94	8,03	600	872	33	23	88	86	11	8
4	6,96	7,96	371	352	ND	ND	31,43	67	12	12
5	7,08	7,19	498	497	98	70	54	49	11	11
6	8,85	7,72	756	934	52	46	120	116	11	14
7	7,19	7,76	637	646	ND	ND	116	110	35	22
8	9,11	8,23	663	728	26	24	93	80	12	9
9	8,48	8,08	767	824	21	10	88	82	8	9
10	7,31	7,91	374	364	ND	ND	45	69	13	16
11	8,86	7,71	642	733	ND	ND	93	72	8	9
12	7,49	7,62	356	348	ND	ND	34,02	80	13	12

Tabla b: Parámetros físico-químicos para los experimentos a pH natural.

## **pH y temperatura**

El pH es la medida del grado de acidez o alcalinidad de un medio acuoso y se define como  $-\log[H^+]$ . Para la determinación del pH se utiliza un pH-metro marca CRISON, modelo GLP. La metodología empleada se basa en el método 4500-HB del *Standard Methods* (APHA, 2005). Antes de la realización de la medida, el aparato debe ser calibrado. Para ello, se utiliza disoluciones tampón de pH 7,00 y 4,01 de la marca CRISON. La temperatura se mide con la sonda de temperatura de este mismo instrumento.

## **Conductividad**

La conductividad es la expresión numérica de la capacidad del agua de transportar la corriente eléctrica. Esta media indica la cantidad total de iones en el agua. La determinación se realiza mediante un conductímetro de la marca CRISON, modelo Basic 30 (rango 0.01-19999  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , error  $\leq 0.02 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), según la Norma UNE-EN 27888 (AENOR, 1994). Previamente a la medida de la conductividad, el conductímetro se calibra utilizando disolución tampón de 1413  $\mu\text{S cm}^{-1}$ .

## **Demandा Química de Oxígeno (DQO)**

La DQO se define como la cantidad de oxígeno ( $\text{mg O}_2/\text{L}$ ) consumido por las especies reductoras presentes en el agua, mediante oxidantes químicos, sin intervención de los organismos vivos. La medida corresponde a una estimación de las materias oxidables presentes en el agua, cualquiera que sea su origen, orgánico o mineral.

Para la realización de la medida se utiliza un fotómetro Multi- parámetro de HANNA, modelo HI 83099. El instrumento contiene una lámpara de tungsteno controlada por microprocesador y filtros ópticos de banda estrecha especiales que permiten realizar lecturas extremadamente precisas y repetibles. El método se basa en la adaptación del método 410.4 EPA (EPA, 1993).

## **Turbidez**

Se entiende como turbidez a la propiedad óptica de una muestra de dispersar o absorber la luz en lugar de transmitirla en línea recta. En otros términos, se define como la reducción de la transparencia de un líquido originada por la presencia de materias sin disolver. Para medir este parámetro se utiliza un turbidímetro Hanna LP 2000 (error  $\leq 0.2 \text{ NTU}$ ), según la norma ISO 7027 (AENOR, 1999). Previamente a la medida, es necesario calibrar el instrumento con agua destilada. Los resultados se expresan en unidades nefelométricas de turbidez (NTU).

## **Sólidos en Suspensión**

La determinación de los sólidos en suspensión se realiza con un fotómetro multiparamétrico Hach Lange DR 2800 según el método estándar 2540 D (APHA, 2005).

La bibliografía consultada en la metodología:

- Environmental Protection Agency.
  - Method 410.4: *Chemical Oxygen Demand (COD)*.
- Standard methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA-AWWA-WPCF. Edición 20.
  - Method 2540-D: *Determination of suspended solids. Gravimetric Method.*
  - Method 4500 H-B: *Determination of pH. Electrometric method.*
- UNE-EN ISO 7027: Water Quality-*Determination of turbidity* (1999).
- UNE-EN ISO 7888: *Determinación de conductividad por el método electrométrico* (1985).
- UNE-EN ISO 8199: *Calidad de agua. Guía general para el análisis microbiológico mediante la enumeración de microorganismos en un medio de cultivo* (2005).



## Anexo V: Metodología de la microbiología

### Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un material nutritivo artificial preparado para el crecimiento de microorganismos en un laboratorio. Algunas de las bacterias pueden crecer bien en casi cualquier medio de cultivo; otras requieren medios especiales.

A la hora de cultivar una bacteria determinada el medio de cultivo tiene que satisfacer una serie de criterios. Debe contener los nutrientes adecuados para la bacteria específica que se desea desarrollar. También debe contener humedad suficiente, un pH ajustado y una concentración conveniente de oxígeno. El medio en el que se siembra debe ser estéril, es decir, en un principio no debe tener bacterias viables, de modo que el cultivo tenga sólo las bacterias que se agreguen al medio. Por último, el medio de cultivo sembrado debe incubarse a la temperatura adecuada.

Se dispone de una amplia variedad de medios de cultivo para el crecimiento de bacterias en el laboratorio. Casi todos esos medios están deshidratados y sólo precisan el agregado de agua y un proceso de esterilización [Tortora et al., 1993].

Cuando se desea que las bacterias se desarrolleen sobre un medio sólido se agrega un agente solidificante como el agar. Es un polisacárido complejo proveniente de un alga marina. Posee algunas propiedades muy importantes que lo convierten en valioso para la microbiología. Pocos microorganismos pueden degradarlo, de modo que permanece en estado sólido. Se licúa a una temperatura de alrededor de 100°C. Para el uso en laboratorio se mantiene en baños de agua a 50°C.

En el estudio llevado a cabo se han utilizado tres tipos de medios de cultivo diferentes, por un lado se utiliza agar nutritivo que permite el crecimiento de cualquier tipo de bacteria y por otro lado se han utilizado agares selectivos tanto para *E.coli* como para *Enterococcus sp..*

### **Agar nutritivo**

Este tipo de agar se utiliza para obtener grandes números de colonias de un determinado tipo de bacteria, a partir de las cuales se procederá a fortificar o dopar las muestras de agua con las que se va a trabajar. Su composición es la que aparece en la tabla V.1.

Tabla V.1: Composición del agar nutritivo

Ingrediente	Cantidad (gramos/litro)
<b>Peptona (proteína parcialmente digerida)</b>	5,0
<b>Extracto de carne</b>	3,0
<b>Cloruro de sodio</b>	8,0
<b>Agar</b>	15,0

Para preparar este agar se añaden 23 gramos del agar deshidratado por cada litro de agua destilada. Se lleva a ebullición y tras esto se esteriliza mediante el autoclave. Después se vierte la cantidad adecuada en las placas Petri dispuestas para el posterior cultivo de bacterias. Se han de incubar entre 24 y 48 horas a una temperatura de  $35^{\circ}\text{C} \pm 2,0\ ^{\circ}\text{C}$ .

### ***Agar MacConkey***

Este agar es selectivo de *E.coli* y por lo tanto tiene inhibido el crecimiento de otras bacterias. La composición de este agar es la que figura en la tabla V.2.

Tabla V.2: Composición del agar MacConkey

Ingrediente	Cantidad (gramos/litro)
<b>Peptona</b>	20,000
<b>Lactosa</b>	10,000
<b>Sales biliares</b>	1,500
<b>Cloruro de sodio</b>	5,000
<b>Rojo neutro</b>	0,030
<b>Violeta cristal</b>	0,001
<b>Agar</b>	15,000

Para preparar este medio de cultivo es preciso diluir 51,5 gramos del medio deshidratado en un litro de agua y llevarlo a ebullición. Tras someterlo al proceso de esterilización en el autoclave se vierte el medio fundido en placas Petri y una vez solidificado se conservan en la nevera hasta su utilización.

### **Agar Slanetz&Bartley**

Al igual que el medio anterior, se trata de un medio selectivo, aunque en este caso es selectivo para *Enterococcus sp.*. Su composición es la mostrada en la tabla V.3.

Tabla V.3: Composición del agar Slanetz&Bartley

Ingrediente	Cantidad (gramos/ litro)
<b>Triptosa</b>	20,0
<b>Extracto de levadura</b>	5,0
<b>Glucosa</b>	2,0
<b>Hidrogenofosfato de dipotasio</b>	4,0
<b>Azida de sodio</b>	0,4
<b>Agar</b>	12,0

Para preparar este medio de cultivo, se han de disolver 43,4 gramos de medio deshidratado por cada litro de agua, y llevarlo a ebullición. Tras esterilizarlo con el autoclave, se ha de añadir 10 mL de solución TTC por cada litro de agar preparado cuando éste se encuentre a una temperatura de unos 50ºC. A continuación, se vierte el medio fundido en las placas Petri y se deja solidificar. Su conservación hasta su uso se lleva a cabo en la nevera.

### **Métodos de siembra**

En el presente proyecto se han utilizado dos métodos de siembra distintos. Por un lado se han realizado siembras en superficie, y por otro, se ha utilizado el método de filtración en membrana.

#### **Método de siembra en superficie**

Este método de siembra se utiliza tanto en el caso de agar nutritivo, como cuando se espera una alta concentración de bacterias suspendidas en el agua tratada y por tanto se han de realizar diluciones seriadas como se explica en el siguiente epígrafe.

En el caso del agar nutritivo hablaremos de dos formas de siembra dependiendo de cómo se realice la distribución de la cepa madre sobre la placa. Podemos hablar de siembra por agotamiento (figura V.1) o de siembra en estría (figura V.2).

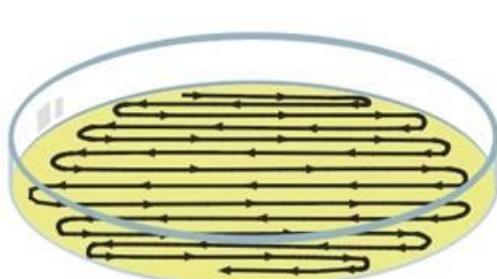


Figura V.1: Siembra por agotamiento



Figura V.2: Siembra en estría

Para los otros dos tipos de agar, cuando hablamos de siembra en superficie, nos referiremos a una siembra consistente en extender con ayuda de un asa de Drigalski estéril una cantidad determinada de muestra sobre la superficie del medio solidificado contenido en una placa Petri de 90 mm de diámetro.

### Método de la dilución seriada

Pese a que la legislación vigente (Real Decreto 140/2003) recomienda un volumen de filtración de 100 mL, en muchos casos esto no es posible. La gran variabilidad de concentraciones de bacterias que presentan las muestras hace necesario trabajar con cantidades más pequeñas e incluso con diluciones que permitan un recuento adecuado puesto que en el método de filtración de membrana sólo serán válidas las placas que contengan entre 15 y 150 colonias, mientras que en el caso de siembra en superficie, este número puede variar entre 30 y 300. Esta técnica se conoce como dilución seriada. La figura V.3 muestra cómo proceder con esta técnica.

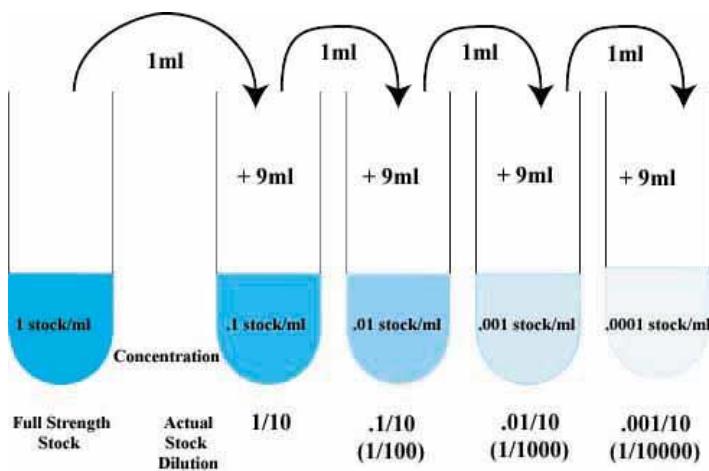


Figura V.3: Técnica de la dilución seriada

## Método de filtración en membrana

Este método es un método normalizado que se utiliza cuando las concentraciones esperadas de bacterias son pequeñas. Se utiliza un equipo para filtración en membrana (Millipore) y filtros de membrana estériles de 0,45µm de tamaño nominal de poro (Millipore). Se filtra un volumen de muestra adecuado, y se coloca el filtro de membrana en el medio selectivo.

La norma que rige este método de filtración es la UNE-EN ISO 9308-1 para *E.coli* y la UNE-EN ISO 7899-2 en el caso de Enterococos.

## Fortificación de muestras

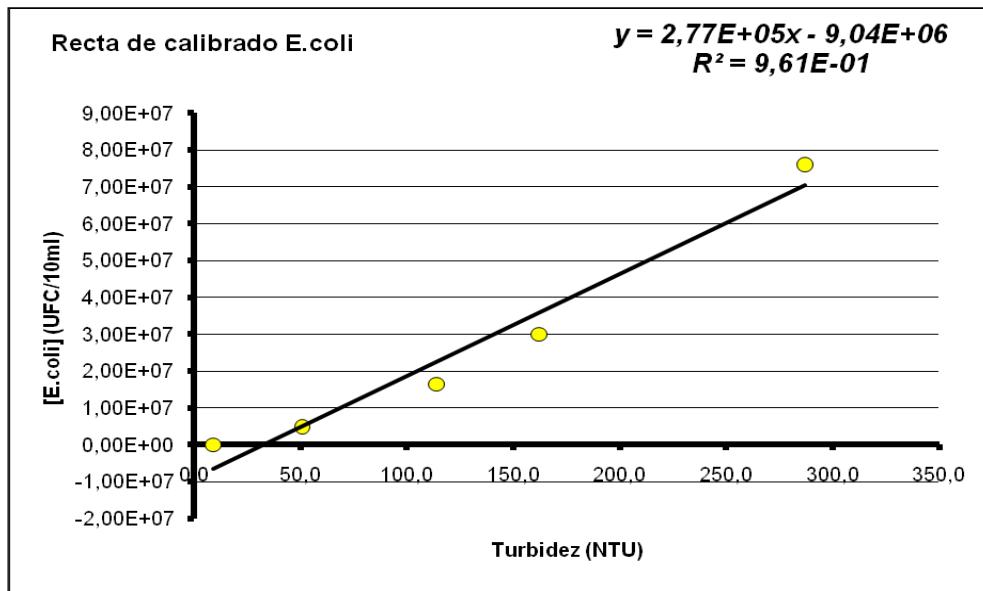
Para observar mejor el efecto de los tratamientos sobre la concentración bacteriana es preciso tener concentraciones elevadas de bacterias, del orden de  $10^7$  o  $10^8$  unidades formadoras de colonias por cada 100 mL de muestra. Dado que por el proceso de conservación al que se somete al agua a tratar existe una ligera pérdida de población bacteriana, es preciso aumentar de forma artificial la cantidad de bacterias presentes. A este proceso de dopaje, se le llama fortificación.

La concentración de bacterias que tendremos está directamente relacionada con la turbidez o absorbancia que presenta un vial que contiene 5 mL de una disolución de NaCl al 0,9% por cada litro de agua a contaminar cuando a él se transfieren las colonias de bacterias desde la placa de agar nutritivo. Estas relaciones quedan reflejadas en la tabla V.4 [Ibarz, 2008] y la figura V.3, para Enterococos y *E.coli* respectivamente.

Tabla V.4: Correspondencia entre la concentración de Enterococos y la absorbancia

Absorbancia	Log[Enterococos]	[Enterococos] (UFC/ 100mL)
<b>1.575</b>	9	$\approx 10^{10}$
<b>0.834</b>	8	$\approx 10^9$
<b>0.758</b>	7	$\approx 10^8$
<b>0.752</b>	6	$\approx 10^7$
<b>0.752</b>	5	$\approx 10^6$
<b>0.750</b>	4	$\approx 10^5$
<b>0.749</b>	3	$\approx 10^4$

Figura V.3: Correspondencia entre la concentración de E.coli y la absorbancia



### Reproducibilidad de resultados

En las tablas V.5 y V.6, se muestran los resultados obtenidos tras el recuento de 8 experimentos diferentes tanto para Enterococos como para *E.coli*, así como los parámetros estadísticos asociados a estos experimentos.

Tablas V.5 y V.6: Parámetros estadísticos para las bacterias estudiadas.

nº	UFC	UFC/100ml	Log (100ml)
1	408	$4,08 \cdot 10^5$	5,61
2	359	$3,59 \cdot 10^5$	5,56
3	412	$4,12 \cdot 10^5$	5,61
4	331	$3,31 \cdot 10^5$	5,52
5	405	$4,05 \cdot 10^5$	5,61
6	385	$3,85 \cdot 10^5$	5,59
7	397	$3,97 \cdot 10^5$	5,60
8	392	$3,92 \cdot 10^5$	5,59
$\bar{X}$		$3,86 \cdot 10^5$	5,59
$\sigma$	27,86	$2,79 \cdot 10^4$	$3,26 \cdot 10^{-2}$
CV(%)	7,22	<u>7,22</u>	0,58

nº	UFC	UFC/100ml	Log (100ml)
1	355	$7,10 \cdot 10^5$	5,85
2	332	$6,64 \cdot 10^5$	5,82
3	317	$6,34 \cdot 10^5$	5,80
4	377	$7,54 \cdot 10^5$	5,88
5	524	$5,24 \cdot 10^5$	5,72
6	571	$5,71 \cdot 10^5$	5,76
7	560	$5,60 \cdot 10^5$	5,75
8	788	$7,88 \cdot 10^5$	5,90
$\bar{X}$		$6,51 \cdot 10^5$	5,81
$\sigma$	163,08	$9,57 \cdot 10^4$	$6,42 \cdot 10^{-2}$
CV(%)	34,12	<u>14,71</u>	1,10

## Anexo VI: Equipos.

### Cámara solar

Como fuente de radiación UV/VIS se utiliza una cámara solar ATLAS SUNTEST CPS+/XLS+. Esta cámara es un instrumento equipado con una lámpara de xenón utilizado para iluminación y envejecimiento de materiales que puede emplearse como simulador de luz solar natural y que además incluye sistema de agitación, filtro de cuarzo de filtración e irradiación UV, luz visible, control de temperatura, etc. Para su manejo, cuenta con un sistema de medición y regulación de la intensidad de irradiación programable. La irradiación del equipo oscila entre  $250$  y  $785 \text{ W m}^{-2}$  con una longitud de onda de  $300$  a  $800 \text{ nm}$ . En la figura 6.4 se muestra la cámara solar utilizada y en la tabla 6.1 se muestran las características técnicas de esta cámara solar. Se utiliza un filtro de “vidrio de ventana” de manera que se irradian las muestras con una longitud de onda de  $320$  a  $800 \text{ nm}$ , de forma que se simula la radiación solar que alcanza la superficie terrestre y además se limitan las longitudes de onda a aquellas que no son letales para las células. En la figura VI.2 se presentan los espectros de absorción de la lámpara de xenón utilizada en la cámara solar.



Figura VI.1: Cámara solar Atlas Suntest CPS+/XLS+

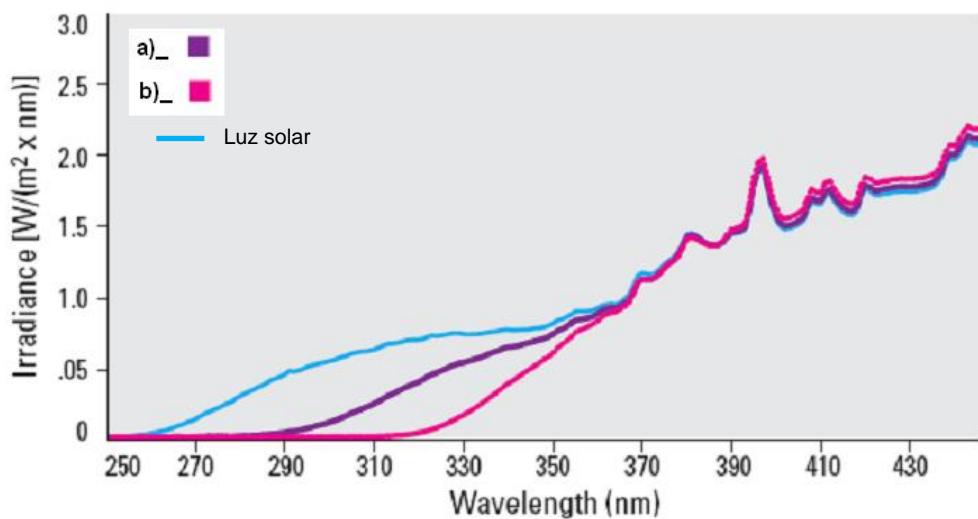


Figura VI.2 Radiometría de la luz solar y la lámpara de xenón con y sin filtro de ventana  
a) Sin filtro de ventana. b) Con filtro de “vidrio de ventana”

*Tabla VI.1. Características técnicas de la cámara solar Atlas Suntest CPS+/XLS+*

<b>Tensión de la red</b>	
<b>Conexión de la cámara</b>	200 V – 240 V ± 10%, 50/60 Hz
<b>Conexión del sistema de inundación</b>	200 V – 240 V ± 10%, 50/60 Hz
<b>Conexión del grupo frigorífico</b>	230 V/50 Hz
<b>Consumo nominal</b>	
<b>Sin sistema de inundación</b>	2.1 KVA
<b>Potencia de la lámpara de xenon</b>	Máximo 1.5 KW
<b>Intensidad de la corriente del equipo</b>	Máximo 4.5 A
<b>Intensidad de inundación</b>	Máximo 8 A
<b>Consumo nominal del refrigerador</b>	2.2 KW
<b>Características radiotécnicas</b>	
<b>Distancia entre eje de la lámpara y nivel de muestras</b>	230 mm
<b>Superficie destinada a la muestra</b>	500 cm <sup>2</sup>
<b>Temperatura estándar de cuerpo negro a nivel de muestras</b>	Hasta 100 °C ± 10%
<b>Intensidad de radiación regulable de forma continua para la gama de longitudes de onda por debajo de los 800 nm en el sistema de filtros máximo UV</b>	250 W m <sup>-2</sup> – 765 W m <sup>-2</sup> ± 10%

### ***Equipo de filtración por membranas***

En los casos en los que se precisa realizar la siembra por filtración, se recurre a un equipo compuesto por una rampa de filtración con la cual se filtra a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 45 µm utilizando un embudo estéril (Figura I.2).



Figura VI.3: Equipo de filtración por membrana

En primer lugar, se procede a la limpieza de la rampa de filtración que puede llevarse a cabo mediante el uso de alcohol o con la aplicación directa de una llama, con lo que se logrará tener condiciones estériles para trabajar. Una vez limpio, se sitúa un filtro de membrana sobre la rampa de filtración y a continuación se coloca el embudo estéril. Ahora ya está preparado para verter la muestra a filtrar en el embudo, la cual se hará pasar a través del filtro haciendo vacío (Figura I.4)



Figura VI.4: Filtración

Cuando toda la muestra ha pasado a través del filtro de membrana, se desecha el filtro y con ayuda de unas pinzas previamente esterilizadas, se toma el filtro de membrana teniendo precaución de no cogerlo por la zona atravesada por el filtrado, y se deposita sobre una placa Petri preparada para el crecimiento de los microorganismos de interés.

## **Estufas de cultivo**

Las estufas de cultivo utilizadas son de la marca J.P Selecta modelo Incudigit (Figura VI.5). Se caracterizan por ser estufas a convección natural pudiendo regularse la temperatura así como el tiempo, siendo la lectura de ambos parámetros digital. La resolución es de 0,1°C.

Las temperaturas pueden regularse entre +5°C hasta +80°C, siendo la estabilidad alcanzada de  $\pm 0,5^\circ\text{C}$  y la homogeneidad de  $\pm 2\%$  a la temperatura de trabajo. Por su parte el error de consigna cometido será de un  $\pm 2\%$  a la temperatura de trabajo.

Al tratarse de una estufa para cultivo bacteriológico, posee una puerta interior de cristal templado que favorece la estabilidad de la temperatura en la estufa, evitando oscilaciones que podrían afectar a los cultivos.



Figura VI.5: Estufa de cultivo Incudigit

## **Autoclave**

El autoclave corresponde al modelo Presoclave II perteneciente a la empresa J.P Selecta. Se trata de un autoclave vertical con una capacidad de 50 litros, y un rango de trabajo de entre 115°C y 134°C (0,62-2 bar). La rutina de trabajo seguida por este aparato es la que se muestra en la figura VI.6.

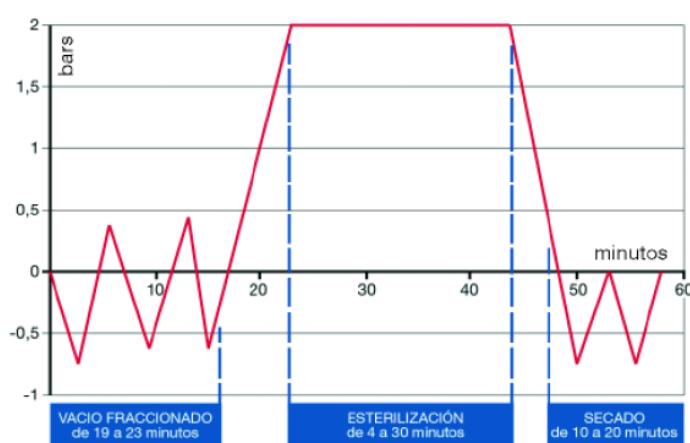


Figura VI.6: Método de operación del autoclave

## ***Microscopio óptico***

El microscopio óptico utilizado en las pruebas de confirmación bacteriológicas como la tinción de Gram es de la marca Zeiss y corresponde al modelo Axiostar Plus. Este microscopio se caracteriza por usar una lámpara de 20 W para la iluminación y tener tubos binoculares de 10 aumentos. Los objetivos utilizados son de 10, 40 y 100(inmersión en aceite) aumentos. (Figura VI.6)



## ***Cabina de flujo laminar***



Figura VI.7: Cabina de flujo laminar

Se trata de una cabina de flujo laminar vertical con filtro absoluto HEPA H-14 con una eficacia mínima del 99,995% para partículas de 0,3 mm y superior en el resto de tamaños tanto superiores como inferiores. Asegura la fiabilidad de los ensayos creando un ambiente estéril de Clase ISO 5 (antigua Clase100) en pureza de aire, garantizando la descontaminación después de cada trabajo gracias a la acción de una lámpara germicida UV. Todo ello en cumplimiento con las actuales normas: EN-1822, DIN-24184, US St-209, ISO-14644, UNE-EN-ISO 90001:2000.

La aplicación de este tipo de equipo está recomendada para las siguientes actividades:

- Análisis clínicos
- Laboratorios de industrias lácteas, cárnicas y alimentarias en general
- Laboratorios farmacéuticos y de investigación
- Trasvase de medicamentos en servicio de farmacia
- Hematología
- Análisis microscópico
- Fabricación y montaje de dispositivos electrónicos
- Cultivo de tejidos
- Llenado de antibióticos y de fármacos inyectables (excepto citostáticos)



## Anexo VII: Caracterización microbiológica de las EDARs estudiadas

### VII.1 EDAR nº1

#### VII.1.1 Descripción de la planta

- *Ubicación:* Sur-Este de la Comunidad Foral de Navarra.
- *Población censada:* 4.758 habitantes
- *Río receptor de vertidos:* La EDAR vierte a un canal abierto que recorre 2 km hasta su vertido al río Ebro.
- *Habitantes equivalentes:* 15.869 habitantes
- *Caudal de diseño:* 1.500 m<sup>3</sup>/día
- *Caudal tratado:* 2.129 m<sup>3</sup>/día
- *Carga de diseño:* 528 kg DBO<sub>5</sub>/día
- *Carga tratamiento:* 2.820 kgDBO<sub>5</sub>/día

A esta depuradora llegan vertidos de empresas de manipulación de alimentos y de conservas, que en época de campaña prácticamente duplican la carga que vierten.



Figura VII.1: Planta depuradora nº1 (Fuente: SITNA)

#### Descripción del proceso

El agua llega a través de los colectores a la planta depuradora. Tras ser homogeneizado en una balsa, el tratamiento consiste en la separación de sólidos de tamaño grande y medio

mediante tamices que hacen a su vez y provisionalmente de desarenador-desengrasador. Después el agua pasa a un decantador primario con un tiempo de retención de 3-6 horas. Los fangos decantados son retirados para su posterior tratamiento.

El agua de salida del decantador pasa al reactor biológico de un filtro percolador con lechos de plástico ordenados al azar. En la decantación secundaria los lodos se recirculan al decantador primario y el agua pasa a un sistema de lagunaje, constituido por 4 lagunas en serie.

Tres de las lagunas son de 2,5 m de profundidad. Se eliminan restos de materia orgánica y se lleva a cabo también la eliminación de agentes patógenos debido a la radiación solar. El tiempo de residencia suele ser de unos 25 días. En algunas ocasiones dejan de estar operativas alguna de las balsas (por mantenimiento o limpieza).

Los fangos de la salida del decantador primario son dirigidos a un digestor y tratados con el sistema ATAD (digestión aerobia termófila autosostenida) y después son secados mediante centrífugas.

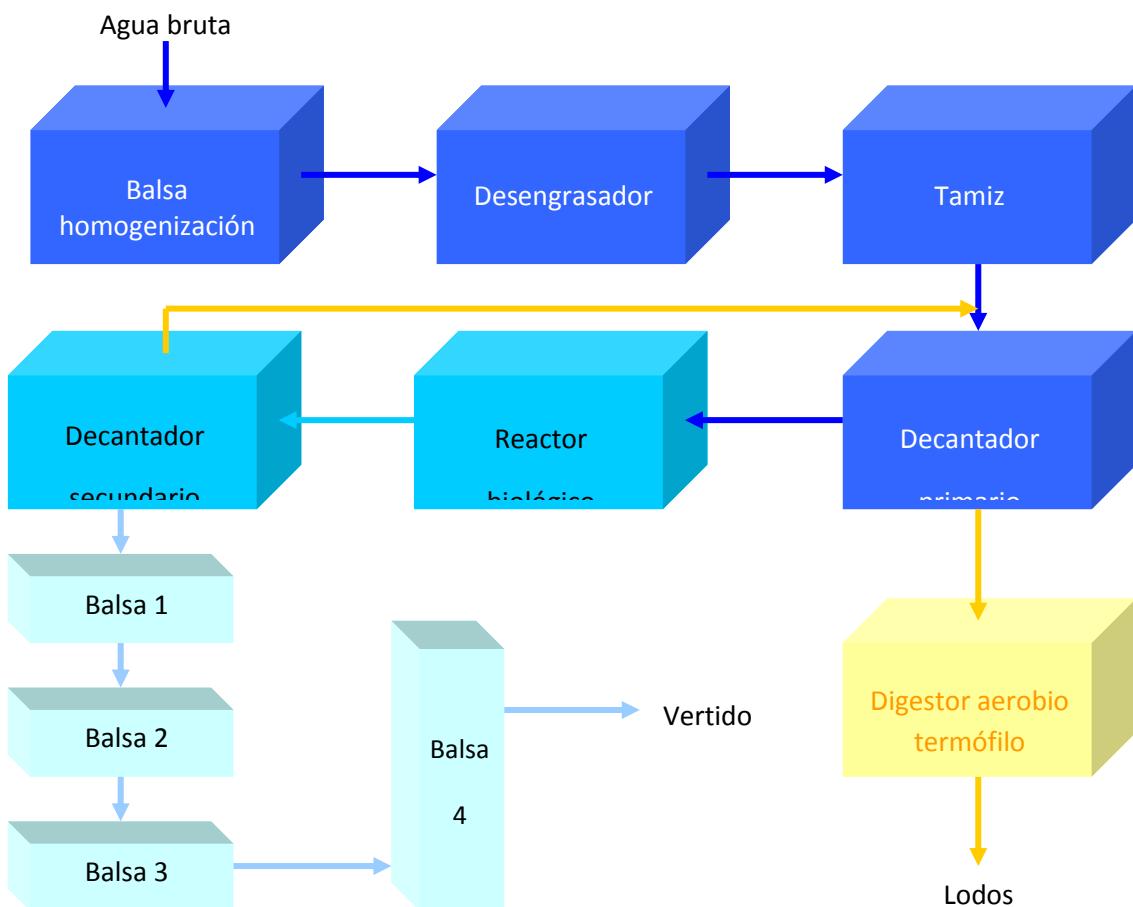
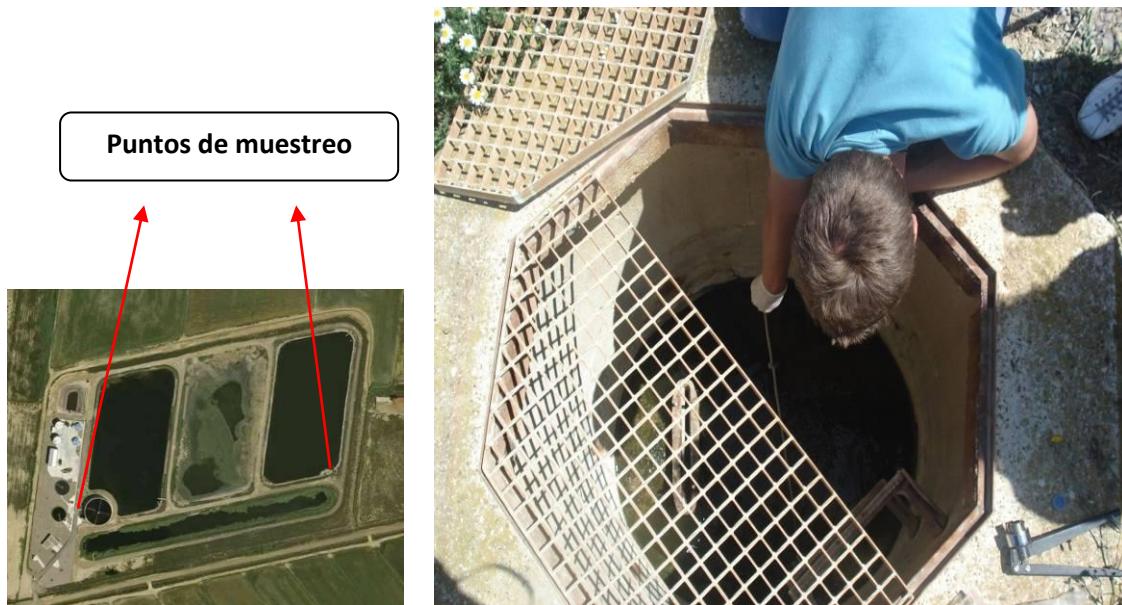


Figura VII.2: Diagrama de bloques de la depuradora nº1

**VII.1.2 Toma de muestras**

Las muestras fueron recogidas el 19/05/09 en diferentes puntos de la planta, a la salida del reactor biológico y al final de la 3<sup>a</sup> laguna, desde la cual se realizaba el vertido final, tal y como puede verse en las figuras VII.3 y VII.4.



Figuras VII.3 y VII.4: Puntos de la toma de muestras en la EDAR nº1

### VII.1.3 Resultados microbiológicos e interpretación

La tabla VII.1 presenta los resultados obtenidos en el análisis bacteriológico. En líneas generales los resultados obtenidos tras la realización de los correspondientes análisis microbiológicos son los esperados para el agua de salida de una estación depuradora de aguas residuales, en primer lugar por la ausencia de tratamientos terciarios de desinfección específicos y en segundo lugar por el origen fecal y humano de las especies estudiadas.

Tabla VII.1.- Resultados del análisis bacteriológico en la EDAR nº1

	<i>Decantador</i> (UFC/100ml)	<i>Laguna</i> (UFC/100ml)
<i>Escherichia coli</i>	$7,250 \cdot 10^6$	$3,050 \cdot 10^5$
<i>Enterococcus faecalis</i>	$3,200 \cdot 10^5$	<1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$3,850 \cdot 10^5$	$1,160 \cdot 10^5$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$3,200 \cdot 10^5$	$5,300 \cdot 10^3$
<b>Anaerobias totales</b>	$1,300 \cdot 10^7$	$8,900 \cdot 10^5$
<i>Clostridium perfringens</i>	<1	<1
<b>Contaminación total</b>	$1,015 \cdot 10^8$	$5,248 \cdot 10^5$
<i>Salmonella</i>	0	0
<i>Legionella</i>	0	0

La tabla VII.1 muestra los diferentes tipos de bacterias encontrados en las aguas de salida del decantador y de la laguna de la depuradora de Arguedas-Valtierra. Se observa la presencia de microorganismos de origen fecal como son *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, así como *Staphylococcus aureus*, bacterias presentes en las mucosas y en la piel de humanos, mamíferos y aves. La concentración de las bacterias anteriormente mencionadas están en consonancia con otros estudios consultados (Yates y Gerba, 1998), (Drakopoulou et al., 2009). No se detectaron colonias de *Salmonella* y *Legionella*, ni tampoco esporos de *Clostridium perfringens*. Por otro lado, se puede apreciar una desinfección entre el decantador y la laguna debido al efecto de la radiación solar que actúa sobre el agua en este punto del tratamiento. Esta desinfección oscila entre 1 y 5 unidades logarítmicas que coincide con lo expuesto en la bibliografía (Mara y Cairncross, 1989). Es especialmente notable la desaparición de *Enterococcus faecalis* que tras el paso por la laguna se hallan en una cantidad inferior al límite de detección. También es importante destacar que la cantidad de *Clostridium perfringens* tanto en el decantador como en la laguna es menor también que dicho límite de detección.

## VII.2 EDAR nº2

### VII.2.1 Descripción de la planta

- *Ubicación:* Sur de la Comunidad Foral de Navarra.
- *Población censada:* 34.717 habitantes
- *Río receptor de vertidos:* Río Ebro, vertiente Mediterránea.
- *Habitantes equivalentes:* 46.237 habitantes
- *Caudal de diseño:* 20.416 m<sup>3</sup>/día
- *Caudal tratado:* 16.734 m<sup>3</sup>/día
- *Carga de diseño:* 6.879 kg DBO<sub>5</sub>/día
- *Carga tratamiento:* 5.522 kgDBO<sub>5</sub>/día

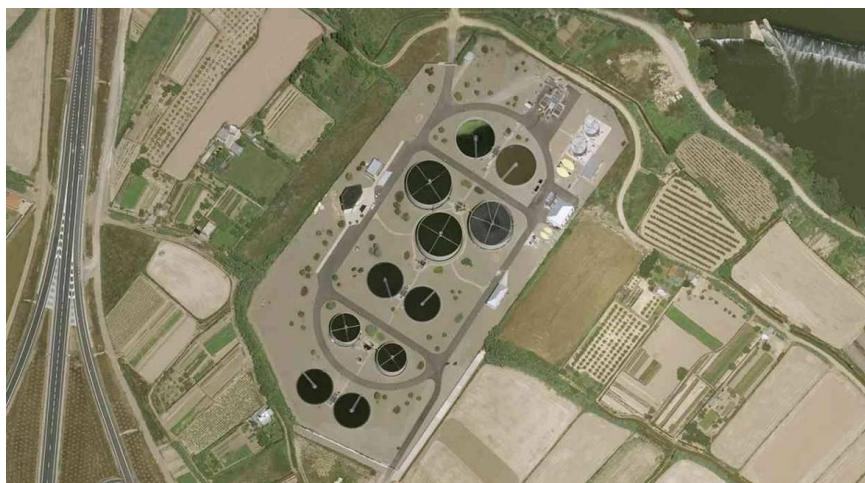


Figura VII.5: Planta depuradora nº2. (Fuente: SITNA)

### Descripción del proceso

El agua recogida llega a través de un sistema de colectores a la depuradora y es sometida a un pretratamiento que consiste en la separación de los sólidos gruesos a través de unas placas deflectoras o tamices. Posteriormente, se procede al desarenado y desengrasado que consiste en la extracción de las partículas minerales y la eliminación de las grasas, aceites y en general, los flotantes. A continuación, el agua obtenida pasa a un decantador primario cuya finalidad es disminuir la cantidad de materia en suspensión. Tras dicha eliminación de materia, se procede al tratamiento biológico mediante lechos bacterianos. Finalmente, por decantación secundaria se separa el fango biológico del agua clarificada que se vierte directamente al río Ebro.

Los lodos obtenidos en los diferentes decantadores secundarios son sometidos a un tratamiento de digestión aerobia (ATAD) y un posterior espesamiento y centrifuga. El fango final es trasladado y utilizado en la agricultura.

El origen de estas aguas residuales, además de ser urbano, proviene de industrias cercanas a la población. Éstas son en su mayoría industrias químicas, textiles y mecánicas.

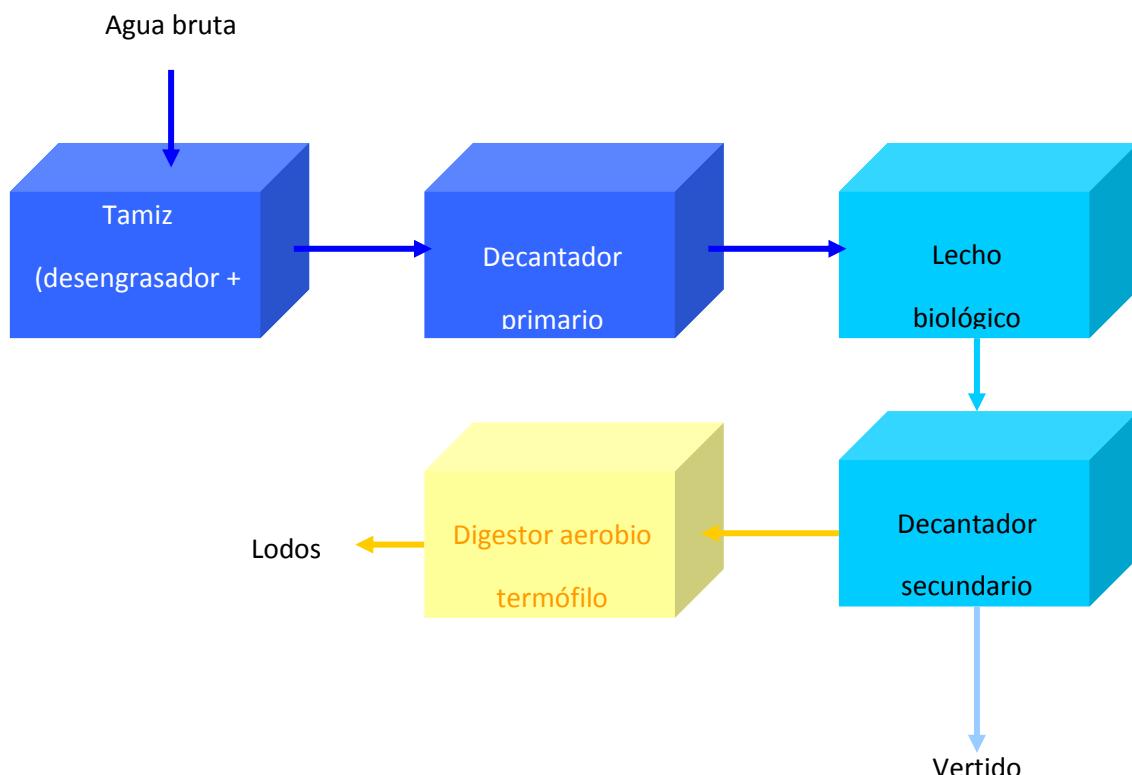


Figura VII.6: Diagrama de bloques de la depuradora nº2

### VII.2.2. Toma de muestras

La muestra de agua fue recogida el 26/05/09 a las 12:45 a la salida del decantador secundario. A pesar de la existencia en la planta de una segunda fase de tratamiento secundario consistente en filtros percoladores y decantación secundaria, en el momento de la toma de muestra, ésta estaba cerrada.



Figura VII.7. Punto de muestreo

### VII.2.3. Resultados microbiológicos e interpretación

Tabla VII.2.- Resultados del análisis bacteriológico en la EDAR nº2

UFC/100ml	
<i>Escherichia coli</i>	$7,350 \cdot 10^5$
<i>Enterococcus faecalis</i>	$5,800 \cdot 10^4$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$1,600 \cdot 10^5$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$2,000 \cdot 10^4$
Anaerobias totales	$8,050 \cdot 10^5$
<i>Clostridium perfringens</i>	$1,640 \cdot 10^3$
Contaminación total	$3,500 \cdot 10^6$
<i>Salmonella</i>	0
<i>Legionella</i>	0

En la tabla VII.2 se pueden observar como los valores de concentración de los diferentes tipos de bacterias analizadas están en consonancia con otros estudios consultados (Yates y Gerba, 1998), (Drakopoulou et al., 2009). Las bacterias estudiadas tienen principalmente origen fecal, este es el caso de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Clostridium perfringens*, pero también se encontraron *Staphylococcus aureus*, procedentes de mucosas y en la piel de humanos, mamíferos y aves. Por otro lado, no se detectaron colonias de *Salmonella* y *Legionella* en las aguas de salida de la instalación.

### VII.3. EDAR nº3

#### VII.3.1. Descripción de la planta

- *Ubicación:* Sur de la Comunidad Foral de Navarra.
- *Población censada:* 1.184 habitantes
- *Río receptor de vertidos:* Río Queiles, vertiente Mediterránea.
- *Habitantes equivalentes:* 3.453 habitantes
- *Caudal de diseño:* 308 m<sup>3</sup>/día
- *Caudal tratado:* 361 m<sup>3</sup>/día
- *Carga de diseño:* 110 kg DBO<sub>5</sub>/día
- *Carga tratamiento:* 149 kgDBO<sub>5</sub>/día



Figura VII.8: Planta depuradora nº3. (Fuente: SITNA)

#### Descripción del proceso

Las aguas brutas que llegan a la planta pasan, en primer lugar, a través de un tamiz donde se eliminan los gruesos. Posteriormente, el agua llega al decantador primario para eliminar la materia en suspensión presente. Tras este tratamiento primario, las aguas llegan al reactor biológico el cual posee un lecho bacteriano mixto de piedra y plástico, donde se lleva a cabo el tratamiento biológico para reducir considerablemente la carga orgánica del agua.

Tras este tratamiento, se afina la reducción de la materia en suspensión en un decantador secundario. Tras todos estos procesos, se lleva a cabo un tratamiento terciario consistente en cuatro balsas (5-6 días de tiempo de residencia) cuya función es degradar la materia orgánica todavía presente en las aguas, completando el efecto desinfectante con la radiación solar.

En la planta, existe también un tratamiento paralelo de los lodos obtenidos a lo largo del proceso, es decir, los procedentes del decantador primario y secundario. Estos lodos son espesados y trasladados posteriormente fuera de la planta para sus correspondientes usos.

El municipio cuenta con un polígono industrial, con una superficie de 13.744 m<sup>2</sup> donde, entre las industrias instaladas, destacan principalmente las de carpintería, talleres mecánicos, elaboración de conservas vegetales y bodegas vinícolas.

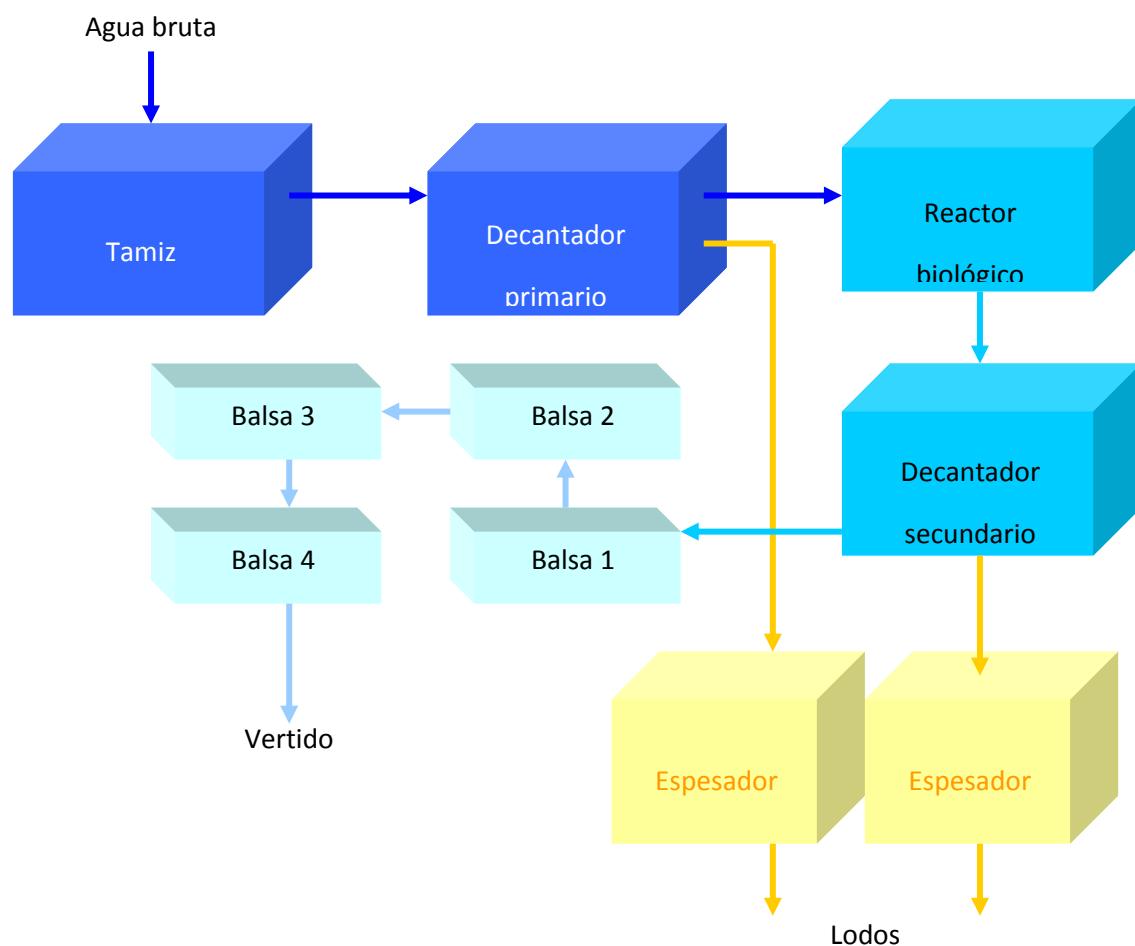


Figura VII.9: Diagrama de bloques de la EDAR nº3.

### VII.3.2. Toma de muestras

Las muestras de agua fueron recogidas el 02/06/09 a las 12:45 a la salida del decantador secundario y en la balsa nº4, antes de su vertido final.



Figura VII.10: Punto de muestreo

### VII.3.3. Resultados microbiológicos e interpretación

Tabla VII.3- Resultados del análisis bacteriológico en la EDAR nº3

	<i>Decantador</i> (UFC/100ml)	<i>Laguna 4</i> (UFC/100ml)
<i>Escherichia coli</i>	$8,300 \cdot 10^4$	$6,000 \cdot 10^2$
<i>Enterococcus faecalis</i>	$4,900 \cdot 10^4$	$1,200 \cdot 10^1$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2,900 \cdot 10^4$	$1,600 \cdot 10^4$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$7,500 \cdot 10^3$	$2,200 \cdot 10^4$
Anaerobias totales	$2,300 \cdot 10^5$	$1,400 \cdot 10^4$
<i>Clostridium perfringens</i>	$2,700 \cdot 10^2$	$5,400 \cdot 10^1$
Contaminación total	$6,300 \cdot 10^4$	$1,696 \cdot 10^5$
<i>Salmonella</i>	0	0
<i>Legionella</i>	0	0

La tabla VII.3 muestra los diferentes tipos de bacterias encontrados en las aguas de salida del decantador y de la laguna de la depuradora de Monteagudo. Se observa la presencia de microorganismos de origen fecal como son *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y formas esporuladas de *Clostridium perfringens*, así como

*Staphylococcus aureus*, bacterias presentes en las mucosas y en la piel de humanos, mamíferos y aves. La concentración de las bacterias anteriormente mencionadas están en consonancia con otros estudios consultados (Yates y Gerba, 1998), (Drakopoulou et al., 2009). No se detectaron colonias de *Salmonella* y *Legionella*.

En el caso de la EDAR nº3 también se aprecia desinfección entre el decantador y la salida de la laguna. Esta desinfección es ocasionada por el efecto de la radiación solar sobre el agua durante su tratamiento en la laguna. En esta ocasión la desinfección alcanzada varía entre 1 y 3 unidades logarítmicas, de nuevo dentro de los márgenes establecidos por (Mara y Cairncross, 1989).

## VII.4. EDAR nº4

### VII.4.1. Descripción de la planta

- *Ubicación:* Sur de la Comunidad Foral de Navarra.
- *Población censada:* 3.361 habitantes
- *Río receptor de vertidos:* Río Huecha, vertiente Mediterránea.
- *Habitantes equivalentes:* 4.376 habitantes
- *Caudal de diseño:* 1.800 m<sup>3</sup>/día
- *Caudal tratado:* 983 m<sup>3</sup>/día
- *Carga de diseño:* 336 kg DBO<sub>5</sub>/día
- *Carga tratamiento:* 195 kgDBO<sub>5</sub>/día



Figura VII.11: Planta depuradora nº4.

(Fuente: SITNA)

### Descripción del proceso

El agua que llega a la depuradora es bombeada hasta el tamiz que a su vez ejerce de desarenador-desengrasador. A continuación pasa a un reactor biológico anóxico con agitación, el cual elimina parcialmente el nitrógeno y fósforo. Posteriormente se introduce el agua en una balsa con fangos activos aireado a través de tres turbinas. Posteriormente el agua pasa al decantador secundario donde se separan los fangos que se llevan a un espesador. Los fangos se deshidratan en eras de secado y son recogidos por un gestor.

Este cuarto emplazamiento es un pueblo principalmente agrícola sin otro tipo de industria que pueda afectar a la depuradora. El río Huecha no presenta excesivo caudal y las aportaciones de la depuradora son importantes.

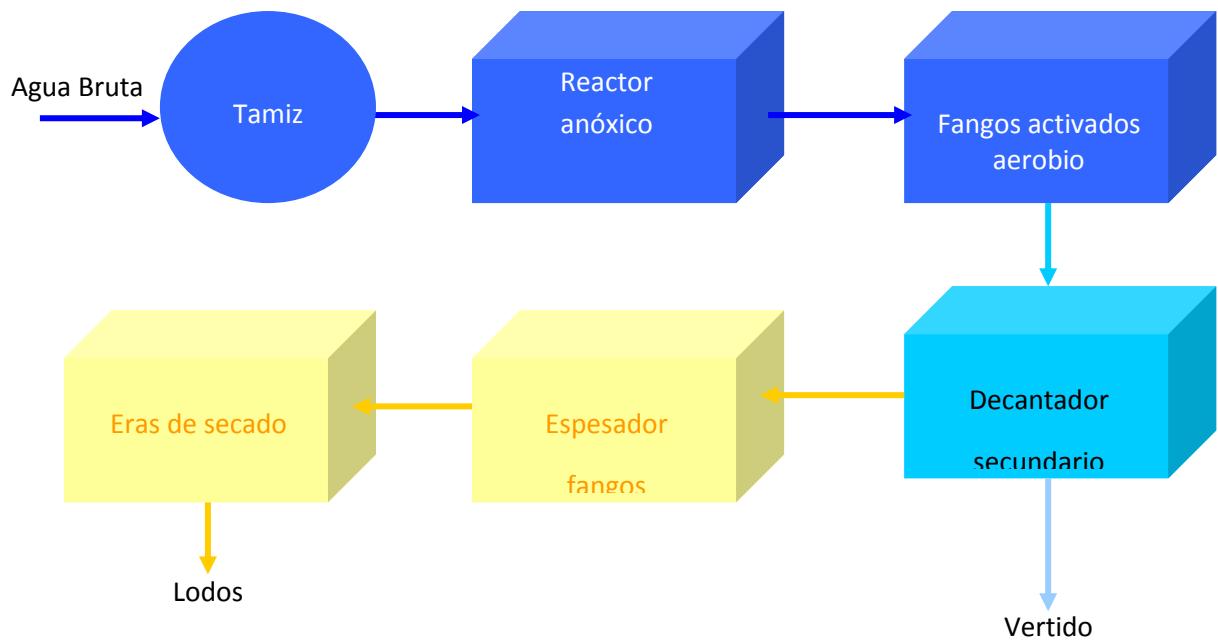


Figura VII.12: Diagrama de bloques de la EDAR nº4

**VII.4.2. Toma de muestras**

La muestra de agua fue recogida el 02/06/09 a las 12:45 a la salida del decantador secundario.



Figura VII.13. Punto de muestreo

#### VII.4.3. Resultados bacteriológicos e interpretación

Tabla VII.4.- Resultados del análisis bacteriológico en la EDAR nº4

	UFC/100ml
<i>Escherichia coli</i>	$1,360 \cdot 10^5$
<i>Enterococcus faecalis</i>	$3,100 \cdot 10^5$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2,300 \cdot 10^4$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1,070 \cdot 10^5$
Anaerobias totales	$1,260 \cdot 10^5$
<i>Clostridium perfringens</i>	$1,400 \cdot 10^3$
Contaminación total	$4,120 \cdot 10^5$
<i>Salmonella</i>	0
<i>Legionella</i>	0

En la tabla VII.4 se pueden observar como los valores de concentración de los diferentes tipos de bacterias analizadas están en consonancia con otros estudios consultados (Yates y Gerba, 1998), (Drakopoulou et al., 2009). Las bacterias estudiadas tienen principalmente origen fecal, este es el caso de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Clostridium perfringens*, pero también se encontraron *Staphylococcus aureus*, procedentes de mucosas y en la piel de humanos, mamíferos y aves. Por otro lado, no se detectaron colonias de *Salmonella* y *Legionella* en las aguas de salida de la instalación.

## VII.5. EDAR nº5

### VII.5.1. Descripción de la planta

- *Ubicación:* Centro de la Comunidad Foral de Navarra.
- *Población censada:* 13.890 habitantes
- *Río receptor de vertidos:* Río Cidacos, vertiente Mediterránea.
- *Habitantes equivalentes:* 27.154 habitantes
- *Caudal de diseño:* 4.633m<sup>3</sup>/día
- *Caudal tratado:* 3.400 m<sup>3</sup>/día
- *Carga de diseño:* 1.357 kg DBO<sub>5</sub>/día
- *Carga tratamiento:* 958 kgDBO<sub>5</sub>/día



Figura VII.14: Planta depuradora nº5. (Fuente: SITNA)

### Descripción del proceso

Una vez el agua bruta llega a la planta, se somete al pretratamiento. Este consiste en un tamiz para eliminar gruesos, una bomba que eleva el agua hasta el desengrasador que también funciona como desarenador. Además esta etapa, cuenta con un reactor auxiliar que se utiliza cuando existen puntas de caudal. Finalmente se encuentra el decantador primario, donde decantan parte de los sólidos.

El tratamiento secundario consiste en dos reactores biológicos y un decantador secundario. En el primero, el vertido pasa a una gran balsa en la que se busca la anoxia. Esta modificación se incluyó en mayo de 2009 para la desnitrificación del vertido. En el fondo de esta balsa hay dos agitadores lento, con objeto de no airear, pero si evitar la decantación sólidos. El tiempo de residencia aparente suele ser el algo superior que el del reactor aeróbico. La segunda parte de la degradación se lleva a cabo en un reactor aeróbico en dos etapas en serie, en cuyo interior hay un relleno de plástico en el cual queda fijada la biomasa.

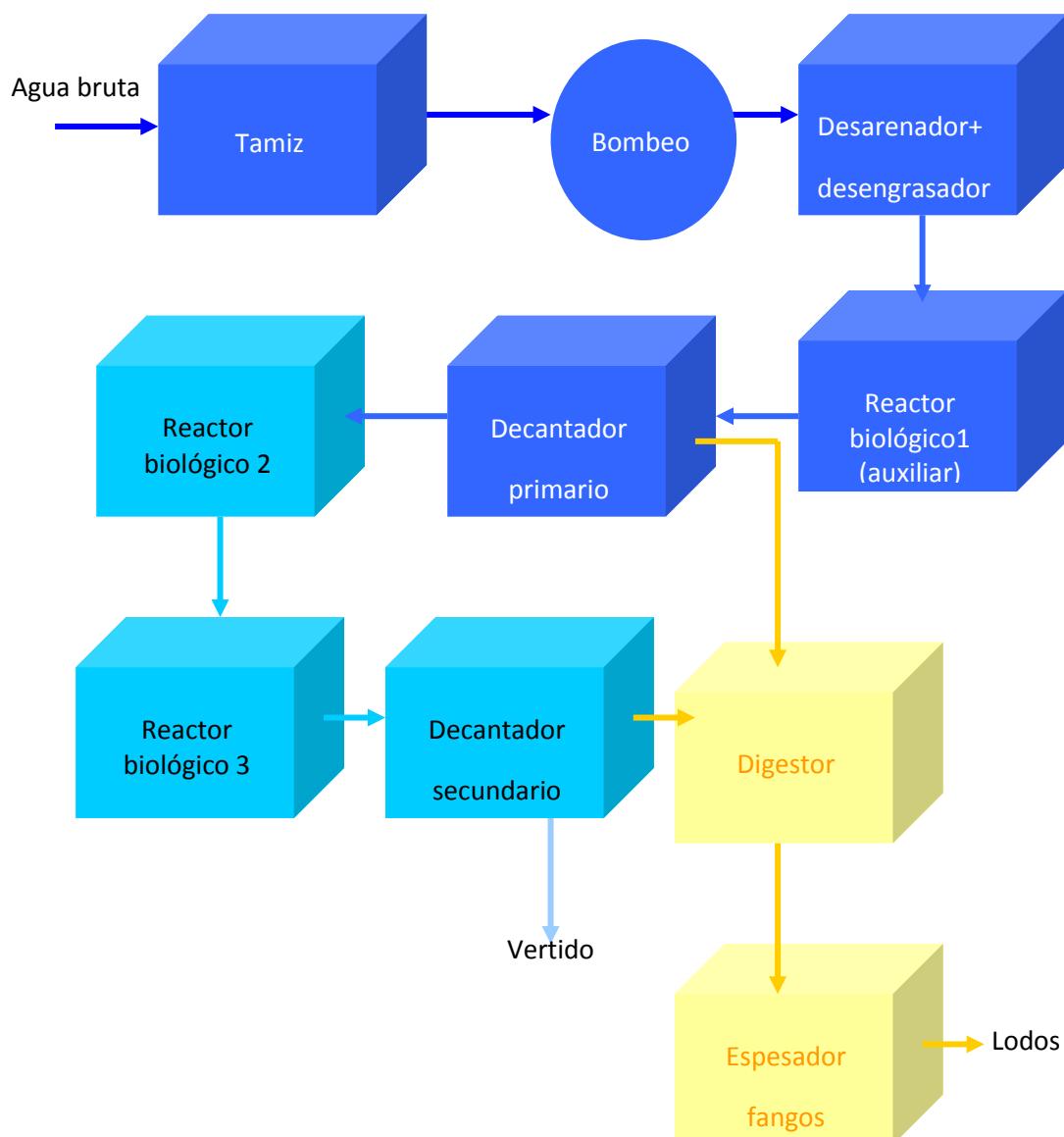


Figura VII.15: Diagrama de bloques EDAR nº5.

La planta cuenta con una línea de fangos que recoge los fangos procedentes de los dos decantadores y los lleva a un digestor anaerobio y posteriormente a un espesador de donde son recogidos por el sistema de gestión adecuado.

Las empresas de la zona son principalmente vinícolas lo que conlleva a unos mayores vertidos en época de vendimia. El río Cidacos es uno de los más sensibles de Navarra en lo que a impacto ambiental se refiere porque en verano apenas tiene caudal. El agua depurada constituye el mayor aporte de caudal, por lo que sus condiciones deben ser óptimas.

**VII.5.2. Toma de muestras**

La muestra de agua fue recogida el 16/06/09 a las 11:45 a la salida del decantador secundario.



Figura VII.16: Punto de muestreo

**VII.5.3. Resultados bacteriológicos e interpretación**

Tabla VII.5.- Resultados del análisis bacteriológico en la EDAR nº5

<b><i>UFC/100ml</i></b>	
<i>Escherichia coli</i>	$1,900 \cdot 10^5$
<i>Enterococcus faecalis</i>	$7,200 \cdot 10^4$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2,770 \cdot 10^4$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$3,300 \cdot 10^4$
<b>Anaerobias totales</b>	$1,300 \cdot 10^5$
<i>Clostridium perfringens</i>	$8,400 \cdot 10^2$
<b>Contaminación total</b>	$8,100 \cdot 10^5$
<i>Salmonella</i>	0
<i>Legionella</i>	0

En la tabla VII.5 se pueden observar como los valores de concentración de los diferentes tipos de bacterias analizadas están en consonancia con otros estudios consultados (Yates y Gerba, 1998), (Drakopoulou et al., 2009). Las bacterias estudiadas tienen principalmente origen fecal, este es el caso de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Clostridium perfringens*, pero también se encontraron *Staphylococcus aureus*, procedentes de mucosas y en la piel de humanos, mamíferos y aves. Por otro lado, no se detectaron colonias de *Salmonella* y *Legionella* en las aguas de salida de la instalación.

## Anexo VIII: Análisis de variables

El análisis y presentación de los resultados mediante Minitab® se realiza según tres tipos de representaciones:

- *Diagrama de Pareto*, el cual muestra de una forma gráfica la significación estadística y la magnitud de las variables y sus interacciones. Los diagramas de Pareto están basados en el denominado “Principio de Pareto”, según el cual en todo grupo de elementos o factores que contribuyen a un mismo efecto, unos pocos son los responsables de la mayor parte de dicho efecto. El eje X representa el valor absoluto del efecto estandarizado y la línea se dibuja en función del nivel de significación, de manera que, cualquier efecto que la sobrepase es significativo estadísticamente.
- *Diagrama del efecto de cada variable* sobre el factor de respuesta. Éste representa la media del factor de respuesta obtenido para cada una de las variables y para cada uno de los niveles seleccionados. La pendiente de la recta obtenida para cada variable refleja la influencia de dicha variable sobre el factor respuesta. A mayor pendiente, mayor influencia de la variable sobre ese factor respuesta. Cada uno de los puntos dibujados representa la media de todos los experimentos en los que la variable a la que representa ha tomado un nivel determinado (alto o bajo). La línea horizontal negra representa la media total de todos los experimentos.
- *Diagrama de interacciones dobles*. La interacción entre variables ocurre cuando el cambio en la respuesta del nivel bajo al alto de una de los variables no es el mismo que el cambio en la respuesta a los dos mismos niveles de la segunda variable, de manera que cuanto más paralelas son las líneas de la gráfica, menos significativa es la interacción entre las variables que se representan. Por el contrario, las líneas que se cruzan o tienden a cruzarse indican la existencia de interacción entre las variables.