



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

Caracterización de efluentes de Estaciones Depuradoras  
de Aguas Residuales de Navarra para su posible  
reutilización.

Characterisation of effluents from Wastewater Treatment  
Plants in Navarra for their possible reuse.

Autor

David Abián Sánchez

Directoras

Sindy Dayana Jojoa Sierra

M<sup>a</sup> Pilar Goñi Cepero

Ponente

M<sup>a</sup> Peña Ormad Melero

Grado en Ingeniería Química

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

2022/2023

# Agradecimientos

Deseo agradecer encarecidamente a todas aquellas personas que han hecho posible este Trabajo Fin de Grado, porque ha sido una experiencia enriquecedora; no solo a nivel profesional, sino también personal de la que siempre guardaré un estupendo recuerdo. Por eso quiero dar gracias a...

... a la Dra. M<sup>a</sup> Peña Ormad, por depositar en mí su confianza, sus consejos y hacer todo esto posible formando un equipazo de investigación para este TFG.

... a Andrea López, por su ayuda y apoyo durante los muestreos, por sus conocimientos, simpatía y cercanía. En definitiva gracias por hacer esto posible de la mano de NILSA, incluyéndome en este proyecto.

... a Sindy Dayana, por su dirección en la realización de este Trabajo Fin de Grado, por su dedicación, por su optimismo y confianza.

... a la Dra. M<sup>a</sup> Pilar Goñi, por su dedicación y ayuda a lo largo de este TFG, por sus conocimientos, por su confianza, por su disposición y su tiempo. En definitiva, gracias por introducirme en el mundo de la microbiología.

... a la técnico Patricia Chueca por estar siempre dispuesta a ayudar, por su dedicación, optimismo y confianza.

... al Dr. Antonio Clavel por sus conocimientos y experiencia.

... a Encarna Rubio por su ayuda y disposición en la realización del análisis estadístico.

... a toda mi familia, en especial a mi novia, Irene, y a mi hermano, Álex, por todo su apoyo y sus ánimos a lo largo de este período.

... a todos mis amigos, en especial a Antonio, Raúl y Víctor por comprender mi ritmo de vida y en definitiva mi falta de tiempo para ellos, apoyándome y animándome en todo momento.

A todos vosotros, por aguantarme, quererme y por hacer esto posible, mil gracias.

*A mi madre MariCarmen y a mi Padre Máximo.*

## **Glosario**

AENOR: Asociación Española de Normalización y Certificación

CT: Coiformes Totales

DBO<sub>5</sub>: Demanda Biológica de Oxígeno

DQO<sub>5</sub>: Demanda Química de Oxígeno

EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales

EN: Norma Europea

ISO: International Standard Organization

NILSA: Navarra Infraestructuras Locales S.A.

NTU: Unidades Nefelométricas de turbidez

O<sub>2</sub>: Oxígeno

Q (N): Caudal Nominal

SM: Standard Methods

SS: Sólidos en Suspensión

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UNE: Norma Española

# Índice

Resumen / Abstract.....	7
1. Introducción.....	8
2. Objetivos .....	11
2.1. General.....	11
2.2. Concretos .....	11
3. Metodología.....	11
3.1. Ubicación espacial del estudio.....	11
3.2. Análisis de aguas (físico-químico) y recogida de datos.....	12
3.3. Análisis microbiológico de aguas .....	12
3.3.1. Cuantificación de Bacterias.....	12
3.3.2. Detección, conteo e identificación de Nematodos.....	14
3.4. Análisis Estadísticos .....	17
3.5. Ensayos para la mejora de la calidad de las aguas.....	17
4. Resultados.....	19
4.1. Parámetros físico-químicos.....	19
4.2. Análisis microbiológico. Recuento de bacterias. ....	19
4.3. Reducciones en cada tratamiento. ....	21
4.4. Análisis de huevos de nematodos. Microscopía.....	21
4.5. Identificación molecular de huevos de nematodos patógenos.....	22
4.6. Asociaciones entre los parámetros estudiados .....	24
4.7. Ensayos para la mejora de la calidad de las aguas.....	26
5. Discusión .....	28
5.1. Comparación EDARs en términos físico-químicos. ....	28
5.2. Comparación EDARs según la carga microbiológica que reciben:.....	28
5.3. Comparación de los procesos de tratamiento de aguas residuales. ....	29
5.3.1. Depuradora 1 .....	29

5.3.2. Depuradora 2.....	30
5.3.3. Depuradora 3.....	30
5.3.4. Depuradora 4.....	31
5.3.5. Depuradora 5.....	31
5.3.6. Depuradora 6.....	31
5.3.7. Depuradora 7.....	32
5.3.8. Depuradora 8.....	32
5.4. Huevos de nematodos.....	33
5.5. Discusión del análisis Estadístico.....	35
Asociación parámetros y presencia de huevos de gusanos. ....	35
5.6. Selección EDAR 1 en el ensayo de mejora del agua.....	35
6. Conclusiones.....	36
7. Bibliografía.....	37
ANEXO 1. Base de datos. Recopilación principales datos y cálculos obtenidos experimentalmente.....	40
ANEXO 2. Protocolo esquemático de extracción de ADN total mediante el mini kit comercial (Stool DNA Isolation, FavorPrep, Biotech Corp).....	40
ANEXO 3. Protocolo esquemático de extracción y purificación de ADN de geles de agarosa mediante el uso del kit SPEDDTOOLS PCR CLEAN-UP (Biotools B&M Labs S.A.).....	42
ANEXO 4 Contaminantes presentes en un agua residual y sus posibles efectos sobre las aguas receptoras (Dewisme, 1997; Matia et al., 1999).....	43
ANEXO 5 Calidad del agua asociada a los distintos usos para su reutilización (Fuente RD 1620/2007).....	44

## Índice de figuras

Figura 1. Esquema del método de diluciones sucesivas .....	13
Figura 2. Tamaño relativo de los huevos de helmintos.. .....	22
Figura 3. Secuencia D3-SSR. <i>Passalurus ambiguus</i> .....	23
Figura 5. Secuencia D8.2-SSF. <i>Strongyloides stercoralis</i> .....	23
Figura 8. Asociación entre E.coli (salida) - Tecnología de tratamiento.....	25
Figura 9. Siembra en superficie de diluciones sucesivas del agua bruta (salida EDAR 1).....	27
Figura 10. Siembra en superficie tras regeneración mediante CFD+ Filtración+UV.....	27
Figura 11. Siembra en superficie tras el regeneración mediante UV. ....	27
Figura 12. Siembra en superficie tras regeneración mediante CLORACIÓN.....	27

## Índice de tablas

Tabla 1. Características de cada EDAR estudiada. ....	11
Tabla 2. Protocolos de PCR utilizados. ....	16
Tabla 3. Parámetros físico-químicos de cada muestra (entrada y salida de cada EDAR).. .....	19
Tabla 4. Determinación del contenido bacteriano de todas las muestras.. .....	20
Tabla 5. Reducción de distintos parámetros tras el proceso de tratamiento.....	21
Tabla 6. Valores físico-químicos del agua bruta a regenerar.....	26
Tabla 7. Resultados físico-químicos y microbiológicos tras regeneración.....	27
Tabla 8. Calidad y tipo de uso asociado para la reutilización del agua. ....	29

## Resumen

La complicada gestión hídrica que acompaña a los fenómenos climáticos extremos que se dan en la actualidad, aconseja el aprovechamiento de las aguas depuradas. El reúso en función de la calidad del agua, se encuentran regulados en el RD 1620/2007 y en (EU) 2020/741 del parlamento europeo y del consejo de 25 mayo de 2020. El objetivo de este trabajo es determinar la eficacia de los tratamientos de agua residual y determinar el potencial de reutilización de los efluentes considerando la legislación vigente y se alinea con el ODS 6.

El trabajo se desarrolla en 8 EDARs de la Comunidad Foral de Navarra, España, de las que se toma muestras de agua. Los sólidos en suspensión, coliformes y *E. coli* se determinaron siguiendo procedimientos estándar y los nematodos por visualización en fresco y flotación con posterior microscopía. La aplicación de procesos de mejora de la calidad de las aguas se ha realizado a escala de laboratorio, concluyendo con su posterior dimensionado a escala real.

Los resultados muestran que el agua de salida de las depuradoras cumple requisitos para su reutilización con distintos fines, a excepción de las depuradoras 1, 3 y 7. La calidad del agua de salida está más relacionada con la carga microbiológica de entrada que con el proceso de depuración utilizado. Como conclusión del trabajo, parece conveniente añadir un proceso adicional para la regeneración de las aguas de salida de las EDARs.

## Abstract

The complicated water management that accompanies the extreme climatic phenomena that currently occur makes it advisable to make use of treated water. Reuse, depending on water quality, is regulated in RD 1620/2007 and in (EU) 2020/741 of the European Parliament and of the Council of 25 May 2020. The objective of this work is to determine the effectiveness of wastewater treatment and determine the potential for reuse of effluents considering the current legislation and aligns with SDG6.

The work is carried out in 8 WWTPs in the Community of Navarra, Spain, from which water samples are taken. Suspended solids, coliforms and *E. coli* were determined following standard procedures and nematodes were determined by fresh visualisation and flotation with subsequent microscopy. The application of water quality improvement processes has been carried out at laboratory scale, concluding with subsequent sizing at full scale.

The results show that the water leaving the treatment plants meets the requirements for reuse for different purposes, with the exception of plants 1, 3 and 7. The quality of the output water is more related to the input microbiological load than to the treatment process used. As a conclusion of the work, it seems advisable to add an additional process for the regeneration of wastewater leaving the WWTPs.

# 1. Introducción

Como bien es sabido, el agua es un recurso indispensable para la vida humana, animal y vegetal, así como para la economía y la regulación del clima. No obstante, las sequías y por lo tanto la escasez de agua, es un fenómeno cada vez más frecuente y generalizado. La población se enfrenta a lo que Grey y Sadoff (2007) denominaron “una crisis de la seguridad del agua”, considerando la disponibilidad y cantidad de agua de calidad aceptable para la salud, para el adecuado mantenimiento de los ecosistemas, y para el sostenimiento de la producción y la economía. Por tanto, garantizar el abastecimiento de agua sin generar algún riesgo en la salud pública es un reto global. De hecho, se ha establecido recientemente como eje central de uno de los diecisiete Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), que hacen parte del plan mundial para lograr un futuro mejor y más sostenible para todos. Así pues, con el ODS 6, se pretende “garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y el saneamiento para todos”. Este objetivo está intrínsecamente relacionado con el propósito de este trabajo; que evalúa, entre otras medidas, la calidad de los efluentes de Estaciones de Depuración de Aguas Residuales (EDAR) en relación a su reutilización.

El ciclo urbano del agua se divide en varias fases, el abastecimiento, que inicia con la captación del agua. En segunda instancia el agua es potabilizada, almacenada y distribuida para pasar al usuario (doméstico o industrial). Una vez es utilizada se depura y es devuelta a su cauce natural. No obstante, en el nuevo paradigma centrado en la economía circular, se incluye la etapa de la reutilización, en la que el agua depurada se puede aprovechar para nuevos y diferentes usos (Fundación Aquae, 2013).

Dentro de esta última fase, cabe destacar la importancia de las EDAR, puesto que en ellas se desarrollan tratamientos al agua que minimizan el impacto una vez es devuelta al cauce receptor. Según Ulloa, (1996), los tratamientos de las aguas residuales incluyen procesos físico-químicos y biológicos y comprenden 5 fases principales: pretratamiento en el que se filtran los componentes más gruesos; tratamiento primario, en el que se eliminan los sólidos flotantes o en suspensión; tratamiento secundario, en el que se elimina la materia orgánica; tratamiento terciario, importante para la eliminación de agentes patógenos y sólidos en suspensión y por último, la línea de fangos, en el que se tratan los lodos obtenidos como subproducto para su eliminación o reutilización.

En cuanto a los tipos de tratamientos secundarios del agua cabe destacar el lecho bacteriano, fangos activados y el lecho biológico móvil aireado, los cuales carecen de procesos químicos, imitando así, la depuración natural del río (NILSA, 2017). El primero de ellos, consiste en tratar el agua residual en uno o dos filtros, que en su interior contienen relleno que sirve de soporte para los microorganismos que se alimentan de la carga contaminante. Por su parte, los fangos activados, en el que se inyecta aire al agua residual con el objetivo aumentar el oxígeno y favorecer la proliferación de

bacterias que se alimentan de la carga contaminante. Por último, el lecho biológico móvil aireado, MBBR, por sus siglas en inglés, consiste en degradar la materia orgánica por la actuación de las bacterias aeróbicas. Como tratamiento terciario, complementario a estos citados, se resalta el lagunaje, el cual radica en la utilización de lagunas artificiales en las que permanece el agua tras haber sido tratada en el sistema de depuración. La materia orgánica es degradada mediante la actividad de las bacterias y las algas del medio. Sin embargo, la depuración del agua no garantiza la eliminación completa de los contaminantes, por lo que en las aguas de salida pueden aparecer patógenos como virus, bacterias y protozoos; cloro residual, metales pesados, pH lejano del neutro, sólidos en suspensión, etc. y todo ello puede derivar en problemas para la salud vegetal, animal y humana, dependiendo de los usos que se le den a estas aguas (Pérez, 2005). De ahí que su reuso esté regulado en función de sus características y el riesgo asociado a ellas.

La normativa vigente (RD1620/2007) clasifica la calidad de las aguas de salida de las EDARs en función al número de huevos de nematodos, *Escherichia coli*, sólidos en suspensión y turbidez cuyo valor máximo admisible se pueden observar en el propio RD o en el Anexo 5 (tabla elaborada a partir del Real Decreto). Además, la presencia de los huevos de nematodos y *Escherichia coli*, aporta información acerca de una posible contaminación fecal de las aguas. Con estos límites, se pretende evitar posibles enfermedades. Según Ingerson y Reid (2011), la infección por la bacteria *Escherichia coli* puede causar náuseas, vómitos, mareos y fiebre, pero además esta bacteria se determina como indicadora de la presencia otros microorganismos patógenos que pueden causar enfermedad en el hombre y los animales cuando sus concentraciones son altas. Así, podríamos esperar encontrar en las aguas patógenos oportunistas de origen ambiental, como *Pseudomonas*, *Legionella* o *Mycobacterium*, y otros patógenos como *Salmonella*, *Yersinia*, etc. No obstante, como su determinación individualizada no es posible, se utiliza la determinación de coliformes totales y *E. coli* como indicadores de contaminación microbiológica de las aguas

La presencia de huevos de nematodos en las aguas de salida puede ser indicadora de contaminación fecal, ya que los huevos de nematodos intestinales salen con las heces y terminan formando parte de los vertidos que se tratan en las depuradoras. Dichos huevos pueden ser muy resistentes y permanecer viables durante mucho tiempo, y es por ello por lo que han pasado a formar parte de los parámetros de control para el reuso de agua. En los países no desarrollados o en vía de desarrollo, donde las enfermedades parasitarias causadas por nematodos son endémicas, su transmisión por vía hídrica es importante y causa miles de muertes todos los años, sobre todo en niños (World Health Organization, 2018a, 2011). En países desarrollados, estas enfermedades son menos habituales, siendo más frecuentes como enfermedades importadas (Carranza y col 2018). Los huevos de *Ascaris*, *Taenia*, de *Strongyloides* y de Uncinarias son los que causan mayor preocupación,

por causar enfermedades en el hombre y animales. A estos hay que sumar los nematodos de vida libre, que no constituyen ninguna preocupación sanitaria, ya que en su mayoría se alimentan de bacterias o materia orgánica y aportan por lo tanto un beneficio al proceso de depuración (Amoah y col, 2918). Algunos de ellos pueden parasitar las raíces de las plantas y constituyen una plaga en el campo. La mayor parte del daño que los nematodos causan a las plantas está relacionado con el proceso de la alimentación, disminuyendo la capacidad de las raíces para captar y transportar nutrientes, lo que se traduce en un debilitamiento general y en pérdidas en la producción (Talabera, 2003).

El grupo de Investigación en Agua y Salud Ambiental, desarrolla, en colaboración con Navarra de Infraestructuras Locales S. A. (NILSA), líneas de investigación en la optimización de procesos que permitan la reutilización de las aguas depuradas conforme lo establecido en las normativas vigentes, RD 1620/2007 y Regulación (EU) 2020/741 del parlamento europeo y del consejo de 25 mayo de 2020 (Requerimientos mínimos para la reutilización del agua). Este trabajo ha sido realizado en el marco del ACUERDO MARCO PARA LA ASISTENCIA EN PLANIFICACIÓN, CONTROL DE LA EVOLUCIÓN DE PROCESOS Y ANÁLISIS DE CALIDAD EN TRATAMIENTO DE AGUAS, FANGOS Y RESIDUOS (OTRI 2020/0312) financiado por NILSA, el "Proyect CPP2021-008749" financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por "European Union NextGenerationEU/PRTR", dentro del Grupo de Investigación de Referencia Agua y Salud Ambiental B43\_20R, financiado por el Gobierno de Aragón y cofinanciado por Feder 2014-2020 "Construyendo Europa desde Aragón". Es por ello que surge el interés de caracterizar el agua de entrada y salida de EDARs de la Comunidad Foral de Navarra, considerando el uso que aguas abajo de la desembocadura de los efluentes pueden tener. Así mismo, resulta una oportunidad para evaluar y comparar los tipos de procesos de depuración aplicados en cada EDAR y estudiar su influencia en la calidad de las aguas de salida del proceso. Variables como el caudal, el tipo de tratamiento secundario, la presencia de tratamiento terciario y la época del año han sido consideradas al seleccionar los puntos de muestreo. De esta forma, se generan y actualizan los datos recopilados por el grupo de investigación de la Universidad de Zaragoza Agua y Salud Ambiental en trabajos previos en conjunto con NILSA.

## 2. Objetivos

### 2.1. General

Determinar la eficacia de diferentes procesos de depuración de aguas para la eliminación de contaminación microbiológica, determinando el potencial de reutilización de los efluentes considerando la legislación vigente.

### 2.2. Concretos

-Determinar calidad y potencial de reutilización de efluentes de EDARs ubicadas en la comunidad Foral de Navarra teniendo en cuenta la legislación vigente.

-Determinar posibles asociaciones entre parámetros físico-químicos del agua, proceso de depuración empleado y presencia de huevos de nematodos.

-Proponer y evaluar alternativas de tratamiento que mejoren la calidad de los efluentes de EDARs según los requerimientos para el reúso.

## 3. Metodología

### 3.1. Ubicación espacial del estudio

Las aguas estudiadas proceden de 8 EDARs situadas en la zona sur-oriental de la Comunidad Foral de Navarra. Se seleccionaron estas EDARs considerando el tipo de población a la que sirve y los procesos de depuración empleados. Sus características se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de cada EDAR estudiada.

EDAR	Habitantes censados	Tamaño Depuradora (caudal diseño en m <sup>3</sup> /día)	Caudal Tratamiento (m <sup>3</sup> /día)	Carga Kg DBO <sub>5</sub> /día (diseño)	Carga kg DBO <sub>5</sub> /día (tratamiento)	Tipo de tratamiento
1	38969	22150	21160	6879	7766	Lecho bacteriano
2	4758	3500	2903	2450	2430	Lecho bacteriano y lagunaje natural
3	6190	2086	1860	885	863	Lecho bacteriano
4	3361	1800	536	336	136	Fangos activados
5	1184	750	776	575	944	Lecho bacteriano y lagunaje natural
6	9922	10400	5170	5000	3407	Lecho bacteriano
7	15907	8500	4720	2975	2775	Lecho bacteriano
8	13890	5555	4611	2050	1452	Lecho biológico móvil aireado

El trabajo experimental se desarrolló en tres lugares:

- Muestreos (recogida de muestras): en EDARS de la zona sur-oriental de la Comunidad Foral De Navarra durante dos campañas en función de dos estaciones climáticas (1: Invierno-primavera; 2: primavera-verano)
- Análisis microbiológico (recogida de datos): tuvo lugar en dos ubicaciones de la Universidad de Zaragoza:
  - Laboratorio del Grupo de Investigación Agua y Salud Ambiental Nivel de Bioseguridad 1 – EINA
  - Laboratorios de Biología Molecular y de Nivel de Bioseguridad 2 del Grupo de Investigación Agua y Salud Ambiental – Facultad de Medicina

### **3.2. Análisis de aguas (físico-químico) y recogida de datos**

Se determinaron los sólidos en suspensión (SS) según la norma UNE-EN 872; el pH, conductividad, turbidez, Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) fueron determinados en cada estación depuradora de aguas residuales (EDAR) por la empresa gestora de las EDAR evaluadas, quien facilitó los datos de las campañas realizadas.

### **3.3. Análisis microbiológico de aguas**

#### 3.3.1. Cuantificación de Bacterias

La determinación de bacterias coliformes totales se realizó siguiendo la norma UNE EN ISO 9308-1 (ISO and AENOR, 2014), diferenciando la determinación de *Escherichia coli* (Standard Methods 9215C. Eaton et al., 2005). En ambos casos se utiliza como medio de cultivo el Agar Cromogénico para Coliformes (Microinstant® (CCA), Scharlau, Barcelona, España).

Se utilizaron 2 procedimientos principales:

- Método de siembra en superficie para concentraciones bacterianas de más de tres unidades logarítmicas, que es de esperarse para afluentes de las plantas de tratamiento de agua. Puesto que de antemano no se conoce la concentración microbiológica de cada muestra, se realizan diluciones sucesivas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  de la muestra inicial en suero fisiológico estéril (0,9% NaCl) según la norma UNE-EN ISO 6887-1.

Se depositaron 50µL de cada muestra o dilución en placas de Agar CCA y se distribuyeron por la placa con asa de Drigalsky estériles.

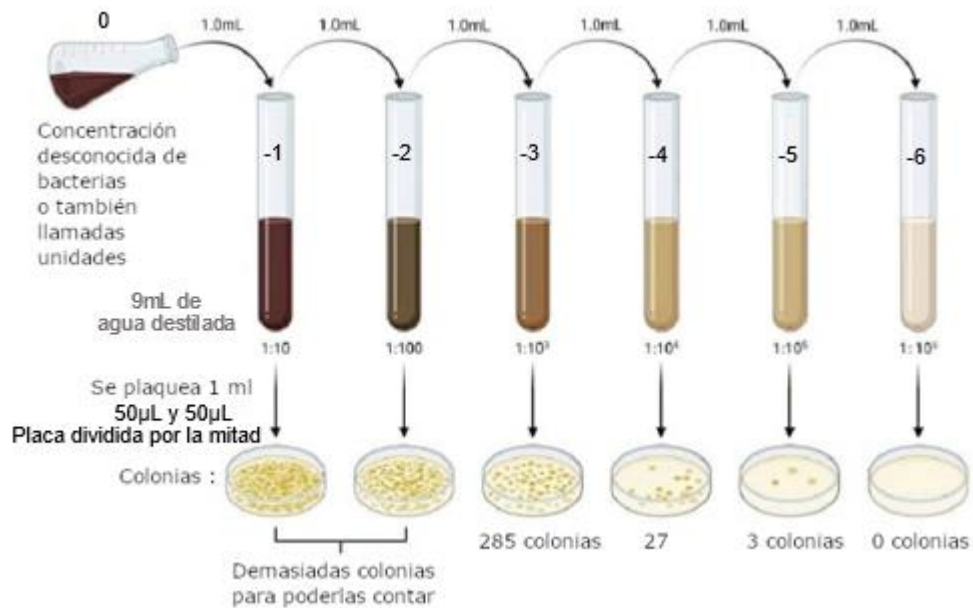


Figura 1. Esquema del método de diluciones sucesivas (adaptado de bacteriasactuaciencia)

- Método de filtración de membrana: Utilizada como complemento a las siembras para muestras de efluentes de plantas de tratamiento, debido a su posible baja concentración de las bacterias analizadas. Siguiendo el procedimiento detallado en la norma UNE-EN-ISO 9308-1 y haciendo uso de un equipo de filtración de membrana (Millipore®), se filtran 1 ó 10 mL de muestra (o de cada dilución) a través de un filtro de membrana estéril de tamaño nominal de poro 0,45µm (Millipore®). Los filtros son posteriormente depositados en una placa de Agar CCA.

Las placas se incuban a 37°C durante 24 horas para la determinación de coliformes y a 44°C para *E. coli*, según lo indicado en la norma UNE-EN-ISO 9308-1. Transcurridas las 24 horas, se procede al recuento de las colonias examinando las placas de Petri una a una en busca de reacción positiva a β-D-galactosidasa (color rosa-rojo correspondiente a bacterias coliformes presuntamente distintas de *E. coli*.) o a β-D-glucuronidasa (azul oscuro-violeta correspondiente a *E. coli*.). (UNE-EN-ISO 9308-1).

El resultado se expresa en Unidades Formadora de Colonias (UFC/ml) tanto para coliformes totales (CT) como para *Escherichia coli*.

### 3.3.2. Detección, conteo e identificación de Nematodos

La identificación de los huevos de helmintos presentes en las aguas residuales resulta imprescindible para saber si se cumple con las directrices marcadas sobre la calidad microbiológica de estas aguas. Esta identificación se realiza por criterios morfológicos y morfométricos, requiriéndose experiencia en el campo de parasitología.

Fueron usados 3 procedimientos para su determinación o recuento. Para todos los procedimientos se filtraron 5,0 L de muestra del agua de salida de las distintas EDAR con un sistema de filtración MILLIPORE®. Se realiza a través de filtros estériles MCE (Ésteres de celulosa) de diámetro nominal de poro 0,7 µm.

#### 1. Concentración y posterior visualización al microscopio en cámara Neubauer.

Los filtros se introducen en un tubo Falcon® y son lavados en 20-40 mL de suero fisiológico estéril, agitando con bolitas de vidrio en Vórtex para desprender el depósito de los filtros. La solución resultante se resuspende finalmente en 20mL (filtrado sin procesar).

Se continúa con una visualización directa al microscopio, para ello se depositan 10,0 µL de la anterior suspensión en la cámara Neubauer.

Para conservar las muestras para futuras visualizaciones puntuales, se realiza una fijación con formaldehído.

#### 2. Concentración, fijación, flotación y visualización al microscopio en cámara McMaster.

Partiendo del filtrado sin procesar anteriormente mencionado (muestras concentradas por filtración), se procede con el siguiente protocolo:

*Sedimentar:* Se toma 2,0 mL del filtrado anteriormente descrito y se centrifuga a 1000 G durante 15 min, desechando el sobrenadante.

*Suspender en tampón acético-acetato de pH 4,5:* Se añade al sedimento 1,0 mL de tampón (Ac/AcH) y se enrasa con acetato de etilo. Importante asegurarse de obtener un buen mezclado agitando con vórtex y se centrifuga (1000 G, 15 min). Al terminar el centrifugado se obtienen 3 fases visibles de forma muy clara. Los huevos de nematodos se encuentran en la capa inferior por lo que se desechan las otras 2 fases superiores dejando sólo el sedimento.

*Flotación del sedimento:* Tomando 20 µL del sedimento en un tubo Eppendorf se procede a su pesaje para posteriores cálculos. Luego, a esos 20 µL se adiciona 550 µL de sulfato de zinc y se inserta todo en la ranura de la cámara McMaster. Tras 5-10 min reposando en la cámara, para dar lugar a la flotación de los huevos, ya se puede realizar la microscopía óptica.

3. Una vez que se han identificado por observación al microscopio huevos de nematodos con objetivos 10x, 20x y 40x según necesidades, se realiza una PCR para intentar determinar la presencia de determinados nematodos patógenos: *Strongyloides*, *Ancylostoma* y *Toxocara*.

La detección de huevos de nematodos se completa con la identificación por técnicas moleculares de la presencia de ADN de nematodos patógenos para las 8 muestras correspondientes al agua de salida de cada EDAR.

#### 3.1. Extracción de ADN.

Se lleva a cabo haciendo uso de un kit comercial (Stool DNA Isolation, FavorPrep, Biotech Corp) siguiendo las indicaciones del fabricante (Anexo 2).

#### 3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para algunos parásitos fue necesaria la aplicación de la técnica conocida como PCR anidada. Este tipo de PCR consta de dos rondas de amplificación consecutivas, la primera con el ADN total extraído y una segunda a partir del producto amplificado en la primera. Cabe destacar la posibilidad de hibridación de los cebadores o “primers” empleados en alguna región determinada generando estelas de bandas inespecíficas (“smearing”). Esto es debido a que se trata de muestras de campo con una gran variedad de genomas. Además, a estos se le añade que, por lo general, la cantidad de ADN del organismo buscado en cuestión es muy baja en la muestra de análisis. Por todo ello la PCR anidada es de gran interés y utilidad.

La mezcla de reacción PCR, a parte del ADN a amplificar, los cebadores específicos y H<sub>2</sub>O, contiene diferentes cantidades de las siguientes soluciones stock:

- Solución MgCl<sub>2</sub> 50mM (BIOTOOLS, B&B Labs S.A)
- Tampón de reacción 10X (BIOTOOLS, B&B Labs S.A)
- Taq polimerasa 500U, 5U/ml (BIOTOOLS, B&B Labs S.A)
- dNTPs 100Mm con sales de tetrasodio (BIORON)

La PCR se desarrolla en las condiciones y con los programas que se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Protocolos de PCR utilizados.

Especie	Gen	Primers	Secuencia 5'→3'	Tamaño (pb)	Referencia
<i>Toxocara canis</i>	ITS-2	NC13	ATCGATGAAGAACGCAGC	520	Jacobs et al., 1997
<i>Toxocara cati</i>		NC2	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT		
<i>Toxocara leonina</i>					
<i>Ancylostoma caninum</i>	ITS-1	RTGHF1	CGTGCTAGTCTTCAGGACTTGG	545	Traub et al., 2004
<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	5.8SrRNA	RTABCR1	CGGGAATTGCTATAAGCAAGTGC		
<i>Strongyloides stercoralis</i>	ITS1rRNA	SS-FO	ATCCTTCCAATCGCTGTTGT	750	Nilforoushan et al., 2007
		SS-RO	TTTCGTGATGGGCTAATTCC		
		SS-FI	GTAACAAGGTTTTTCGTAGGTGA	680	
		SS-RI	ATTTAGTTTCTTTTCCTCCGCTT		

### 3.3. Electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% en tampón TBE 0,5X (Tris-base 0,44M, EDTA 12,5M, ácido bórico 0,44M, pH 8) es el procedimiento usado para verificar y analizar la presencia de las secuencias de ADN previamente amplificadas.

Para la preparación de los geles de agarosa se adicionó Bromuro de Etidio a una concentración final en rango de 200-500 ng/mL.

El primer pocillo se cargó con 5 µl de una referencia o marcador de peso molecular ( $\lambda$ PstI) con azul de bromofenol y el resto de pocillos se cargaron con 10µl de cada producto amplificado, al que se añadió azul de bromofenol. La migración de las muestras se realizó en torno a 90-95mV, una vez migraron, se colocó el gel en el transiluminador de luz ultravioleta que incide con una longitud de onda de 312nm (ECX-20.M, VILBER LORMART, Francia).

### 3.4. Purificación y secuenciación del ADN.

Para la secuenciación de los productos de PCR obtenidos, se repitieron las PCRs para obtener mayor cantidad. Con un bisturí se seccionó cada una de las bandas de interés de forma individual y haciendo uso del kit SPEDDTOOLS PCR CLEAN-UP (Biotools B&M Labs S.A.), siguiendo el protocolo adjuntado por el fabricante se llevó a cabo la purificación (Anexo 3). Las muestras purificadas fueron enviadas al Servicio de Secuenciación del SAI (Servicio general de apoyo a la investigación) de la Universidad de Zaragoza, donde fueron secuenciadas en ambas direcciones.

#### 3.4.1. Análisis de las secuencias.

En primer lugar, con el programa BioEdit, se analizó la calidad de las secuencias, resolviendo nucleótidos degenerados. En segundo lugar, haciendo uso de la herramienta BLAST del National Center of Biotechnology Information (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#>) se fueron evaluando secuencia a secuencia si se correspondían a *Strongyloides*, *Ancylostoma* o *Toxocara*.

#### 3.4. Análisis Estadísticos

Para evaluar la interrelación de todos los parámetros estudiados se ha realizado un análisis estadístico con el programa informático SSPS v26.0. Mediante la determinación de un coeficiente no paramétrico (Rho de Spearman), el cual determina si hay una distribución no normal. Se consideró estadísticamente significativo cuando  $p < 0,05$ .

#### 3.5. Ensayos para la mejora de la calidad de las aguas

Se propuso evaluar alternativas de tratamiento que mejoren la calidad del agua analizada, para ello se eligió el agua de salida de la EDAR 1, considerando la población a la que sirve y su caudal.

En primer lugar, se realizó una caracterización físico-química del efluente: Demanda de cloro (CD), Sólidos en suspensión (SS), pH, turbidez y conductividad. Posteriormente se hizo una caracterización microbiológica, determinando bacterias coliformes y *Escherichia coli*

Posteriormente se procedió a realizar ensayos a escala de laboratorio usando tres de las técnicas más habituales en el tratamiento de agua (la cloración, coagulación-floculación-decantación (CFD) y aplicación de luz UV), tras los cuales se repitieron los análisis físico-químicos y microbiológicos, de tal forma que fuese posible comparar la caracterización del efluente con la del agua ya tratada.

- Cloración: Se adicionó lejía comercial acorde a la demanda de cloro calculada a 500 mL del efluente. Posteriormente se agitó con una varilla y dejó reposar 30min.
- CFD: A otros 500 mL del efluente se le adicionó 10mL de sulfato de aluminio (2500 mg/L), NaOH 0.1 N hasta conseguir un pH 8.5. Posteriormente en el equipo de "Jar-Test" (Cole-Parmer® Stuart sw6 flocculator) se agitó a 100 rpm durante 3 min. Seguidamente, se añadió 0,8 mL de polielectrolito y se agitó nuevamente a 40 rpm durante 10 min. Este ensayo se complementó *in-situ* usando filtro de arena.
- Aplicación de luz UV. 300 mL de la muestra bruta, 300 mL de la muestra obtenida del ensayo CFD y otros 300 mL resultantes del ensayo CFD y Filtración se sometieron a radiación UV

durante 5 min.

Finalmente se realizó la cloración de todas las muestras resultantes, añadiendo el hipoclorito sódico correspondiente a la demanda de cloro de cada muestra.

Con la finalidad de escalar este ensayo de laboratorio a una situación real, se hizo uso del programa informático WCedep para diseñar una instalación real de CFD.

## 4. Resultados

### 4.1. Parámetros físico-químicos

La tabla 3 muestra los resultados obtenidos en las medidas de pH, turbidez, Sólidos en Suspensión (SS) y conductividad (Conduc.).

Tabla 3. Parámetros físico-químicos de cada muestra (entrada y salida de cada EDAR). N/D: no determinado.

EDAR	Tipo de agua	Campaña 1 Invierno-Primavera				Campaña 2 Primavera-Verano			
		SS (mg/L)	Turbidez (NTU)	Conduc. (μS/cm)	pH	SS (mg/L)	Turbidez (NTU)	Conduc. (μS/cm)	pH
1	1	290		2.306	7,4	188,5		2.235	7,5
	2	80	7,70	2.232	7,8	20,5	4,6	2.247	7,9
2	1	59,5		1.270	6,6	123,5		1.199	7,3
	2	19	15,60	2.115	7,7	3,5	17,10	1.283	7,8
3	1	67		1.582	7,3	161		1.504	7,1
	2	36	N/D	1.500	7,2	30,5	8,30	1.560	7,3
4	1	70		1.713	7,6	792		1.611	7,4
	2	1,5	9,00	1.753	7,5	4,5	9,60	1.285	7,2
5	1	317,5		2.612	6,3	1030		1.524	7,0
	2	24,5	N/D	2.348	8,2	13,5	23,70	1.556	8,1
6	1	130		3.164	6,9	55,5		3.046	7,0
	2	20	7,70	2.878	7,7	3,5	13,00	2.867	8,0
7	1	410		2.137	7,1	104,5		1.437	7,2
	2	0	9,10	1.373	7,5	39	N/D	1.389	7,8
8	1	33,5		1.867	6,9	103		N/D	N/D
	2	22,5	N/D	1.366	7,4	29	N/D	N/D	N/D

\*Tipo de agua. 1: entrada; 2: salida.

### 4.2. Análisis microbiológico. Recuento de bacterias.

En la tabla 4 se muestran las concentraciones de *E. coli* y coliformes totales expresadas en UFC/mL.

Tabla 4. Determinación del contenido bacteriano de todas las muestras. \*Tipo de agua 1: entrada; 2 salida.

EDAR	Tipo de agua	Campaña 1 (Invierno-Primavera)			Campaña (Primavera-Verano)		
		CT (UFC/mL)	Coliformes (UFC/mL)	<i>E. coli</i> (UFC/mL)	CT (UFC/mL)	Coliformes (UFC/mL)	<i>E. coli</i> (UFC/mL)
1	1	1,2x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>6</sup> ±1x10 <sup>6</sup>	1,4x10 <sup>4</sup> ±1,7x10 <sup>4</sup>	3,2x10 <sup>6</sup>	2,8x10 <sup>6</sup> ±3,7x10 <sup>5</sup>	3,9x10 <sup>5</sup> ±3,5x10 <sup>4</sup>
	2	1,7x10 <sup>4</sup>	1,7x10 <sup>4</sup> ±2,9x10 <sup>4</sup>	0	8,5x10 <sup>4</sup>	8,5x10 <sup>4</sup> ±9,3x10 <sup>4</sup>	0
2	1	5,1x10 <sup>5</sup>	5,1x10 <sup>5</sup> ±2,6x10 <sup>5</sup>	2,5x10 <sup>3</sup> ±3,0x10 <sup>3</sup>	3,9x10 <sup>6</sup>	3,8x10 <sup>6</sup> ±2,4x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>5</sup> ±8,4x10 <sup>4</sup>
	2	7,4	7,3 ±4,6	1,5x10 <sup>-1</sup> ±2,1x10 <sup>-1</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>4</sup> ±4,1x10 <sup>3</sup>	0
3	1	2,3x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup> ±5,1x10 <sup>4</sup>	3,5x10 <sup>4</sup> ±7,5x10 <sup>3</sup>	5,3x10 <sup>6</sup>	4,7x10 <sup>6</sup> ±2,8x10 <sup>6</sup>	6,8x10 <sup>5</sup> ±4,1x10 <sup>5</sup>
	2	1,3x10 <sup>2</sup>	1,2x10 <sup>2</sup>	1,3x10 <sup>1</sup>	1,6x10 <sup>4</sup>	1,6x10 <sup>4</sup> ±1,5x10 <sup>4</sup>	3,7x10 <sup>1</sup> ±8,0x10 <sup>1</sup>
4	1	3,8x10 <sup>7</sup>	3,5x10 <sup>7</sup> ±2,6x10 <sup>7</sup>	2,3x10 <sup>6</sup> ±9,3x10 <sup>5</sup>	4,2x10 <sup>7</sup>	3,9x10 <sup>7</sup> ±3,0x10 <sup>7</sup>	2,9x10 <sup>6</sup> ±1,0x10 <sup>6</sup>
	2	2,0x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup> ±1,9x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>2</sup> ±1,0x10 <sup>3</sup>	2,5x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup> ±2,8x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>2</sup> ±1,0x10 <sup>3</sup>
5	1	7,0x10 <sup>4</sup>	6,5x10 <sup>4</sup> ±7,9x10 <sup>4</sup>	5,0x10 <sup>3</sup> ±1,0x10 <sup>4</sup>	9,0x10 <sup>4</sup>	8,5x10 <sup>4</sup> ±1,0x10 <sup>5</sup>	5,0x10 <sup>3</sup> ±1,0x10 <sup>4</sup>
	2	1,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup> ±1,2x10 <sup>3</sup>	0	1,5x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup> ±1,9x10 <sup>3</sup>	0
6	1	2,8x10 <sup>5</sup>	2,7x10 <sup>5</sup> ±1,0x10 <sup>5</sup>	5,0x10 <sup>3</sup> ±8,4x10 <sup>3</sup>	2,5x10 <sup>7</sup>	2,5x10 <sup>7</sup> ±7,6x10 <sup>6</sup>	5,2x10 <sup>5</sup> ±6,1x10 <sup>5</sup>
	2	1,9x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>4</sup> ±1,4x10 <sup>4</sup>	6,7x10 <sup>2</sup> ±8,4x10 <sup>2</sup>	6,6x10 <sup>5</sup>	6,6x10 <sup>5</sup> ±4,8x10 <sup>5</sup>	1,6x10 <sup>3</sup> ±1,5x10 <sup>3</sup>
7	1	1,4x10 <sup>6</sup>	1,4x10 <sup>6</sup> ±7,7x10 <sup>5</sup>	3,1x10 <sup>4</sup> ±4,6x10 <sup>4</sup>	5,1x10 <sup>6</sup>	4,7x10 <sup>6</sup> ±2,2x10 <sup>6</sup>	3,6x10 <sup>5</sup> ±6,0x10 <sup>4</sup>
	2	1,5x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup> ±3,4x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>1</sup> ±3,5x10 <sup>1</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	3,8x10 <sup>4</sup> ±1,5x10 <sup>4</sup>	8,8x10 <sup>3</sup> ±6,8x10 <sup>3</sup>
8	1	6,0x10 <sup>4</sup>	5,6x10 <sup>4</sup> ±7,8x10 <sup>4</sup>	4,1x10 <sup>3</sup> ±6,7x10 <sup>3</sup>	4,3x10 <sup>6</sup>	3,6x10 <sup>6</sup> ±2,0x10 <sup>6</sup>	7,1x10 <sup>5</sup> ±2,5x10 <sup>5</sup>
	2	7,5x10 <sup>1</sup>	7,5x10 <sup>1</sup> ±1,5x10 <sup>2</sup>	0	1,3x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>4</sup> ±8,0x10 <sup>3</sup>	3,3x10 <sup>2</sup> ±2,6x10 <sup>2</sup>

### 4.3. Reducciones en cada tratamiento.

La reducción obtenida por el tratamiento para las variables estudiadas (entrada vs salida de cada una de las EDARs), se muestra en la tabla 5, donde la reducción (Reduc.) de los SS es la resultante de restar entrada-salida; mientras que la reducción de Coliformes Totales (CT) y *E. coli* se determinó en unidades logarítmicas, que permiten su comparación con otros estudios y simplifica la comparación de los diferentes tratamientos (Ud. Log).

Tabla 5. Reducción de distintos parámetros tras el proceso de tratamiento de las aguas residuales.

EDAR	Tecnología de tratamiento	Campaña	Reduc. SS (mg/L)	Reduc. CT (Ud. Log)	Reduc. <i>E. coli</i> (Ud. Log)	Reduc. DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	Reduc. DBO (mg O <sub>2</sub> /L)	Q(N) (m <sup>3</sup> /día)
1	Lecho bacteriano	1	210,00	1,84	Total (4,14)	415,40	190,23	17.839
1	Lecho bacteriano	2	168,00	1,57	Total (5,59)	298,49	169,85	24.734
2	Lecho bacteriano y lagunaje natural	1	40,50	4,84	4,22	661,11	460,25	2.783
2	Lecho bacteriano y lagunaje natural	2	120,00	2,40	Total (4,17)	484,05	220,91	5.220
3	Lecho bacteriano	1	31,00	3,24	3,42	870,19	481,58	1.510
3	Lecho bacteriano	2	130,50	2,53	4,27	538,25	322,78	1.480
4	Fangos activados	1	68,50	4,27	3,67	177,12	74,12	826
4	Fangos activados	2	787,50	4,23	3,76	247,36	99,28	767
5	Lecho bacteriano y lagunaje natural	1	293,00	1,85	Total (4,93)	1726,57	975,30	523
5	Lecho bacteriano y lagunaje natural	2	1016,50	1,78	Total (3,17)	1005,04	504,17	495
6	Lecho bacteriano	1	110,00	1,17	0,87	921,03	N/D	5.605
6	Lecho bacteriano	2	52,00	1,58	2,52	633,75	N/D	5.918
7	Lecho bacteriano	1	410,00	2,97	3,32	609,60	N/D	3.750
7	Lecho bacteriano	2	65,50	2,03	1,62	311,74	N/D	5.163
8	Lecho biológico móvil aireado	1	11,00	2,91	Total (6,55)	792,85	273,08	5.614
8	Lecho biológico móvil aireado	2	74,00	2,53	3,33	N/D	N/D	N/D

### 4.4. Análisis de huevos de nematodos. Microscopía.

El recuento de huevos de helmintos obtenido como resultado del examen parasitológico mediante observación por microscopía de todas las muestras en cámara Neubauer y en cámara Mc Master se recoge en el Anexo 1 (Base de datos).

Los huevos de helmintos fueron encontrados en 12/16 muestras (75%) siguiendo la metodología para la visualización en cámara Neubauer. Sin embargo, siguiendo el procedimiento para la visualización en cámara Mc. Master se hallaron huevos de helmintos en 1/16 casos (6,25%). Además, entre las diversas muestras, gracias a su gran variedad, se pudo observar la presencia de gusanos adultos (EDAR 1), gusanos teñidos de verde debido a la campaña del guisante (EDAR 2), larvas de mosquito, vorticelas y otros microorganismos indicadores de la calidad del agua.

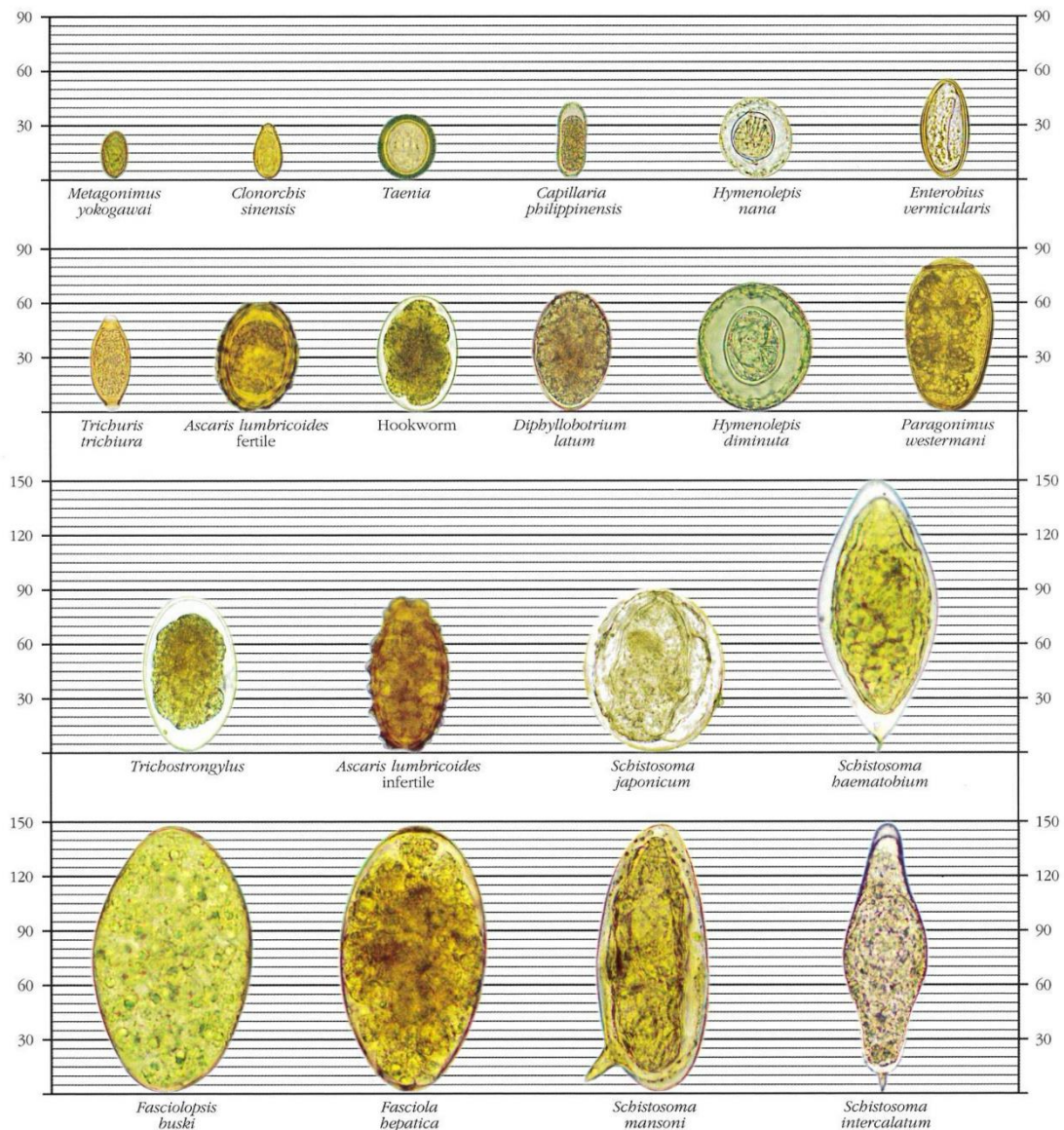


Figura 2. Tamaño relativo de los huevos de helmintos. Imagen extraída del Atlas de Parasitología Humana (Ash & Orihel, 1980).

#### 4.5. Identificación molecular de huevos de nematodos patógenos

Ante la observación de huevos de nematodos, 8 muestras fueron sometidas a PCR para la identificación de nematodos patógenos de los géneros *Strongyloides*, *Toxocara* y *Ancylostoma*

En 3 de ellas se obtuvieron bandas en la electroforesis (muestras D3, D4 y 8.2), de 750pb, 750pb y 500pb respectivamente (figura 6). Tanto las que correspondían a los tamaños esperados como a otros tamaños fueron secuenciadas. Todas las bandas excepto 2, correspondieron a hibridaciones inespecíficas, no identificando por lo tanto nematodos de los géneros buscados.

La secuencia obtenida para la banda de la muestra 3 correspondiente a la depuradora 6 (campaña 1) con la PCR para *Strongyloides stercoralis* presento un 84% de homología con la secuencia MG310151.1 de *Passalurus ambiguus* (nematodo intestinal de conejos según (Gutierrez Galindo, 2015).

```

Query 5      TWAGCTCAGCGGGTAGCCTTACCTGATTTGAGATCAAA 42
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 1489   TAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATCTGAGGTCAAA 1452
  
```

Figura 3. Secuencia D3-SSR. *Passalurus ambiguus*.

La secuencia obtenida para la misma PCR para la muestra D8.2 correspondiente a la depuradora 5 (campaña 2) presentó un 83% de homología con la secuencia con número de registro EF464552.1 de *Passalurus ambiguss* y con un 93% de homología con la secuencia LL999048.1 *Strongyloides stercoralis*.

```

Query 164   CAAAACCTTTAACAATGGATCTCTTGGCTCTTGCAACGATGAARAACGCAGTGAAATGCG 223
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 1551   CAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCG 1610

Query 224   AAACGTAATGCGATTTGCASCATCTGKGAGTCATCGAGTCTTTGAACGCACTTGGCACC 282
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 1611   ATACGTAATGCGAATTGCAGCTTCCGTGAAGCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC 1669
  
```

Figura 4. Secuencia D8.2-SSF. *Passalurus ambiguus*.

```

Query 150   ATTATTAATAAACAAAACCTTTTAACAA 178
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 853875 ATTATTAATAATAAACAAAATTTTAACAA 853847
  
```

Figura 5. Secuencia D8.2-SSF. *Strongyloides stercoralis*.

No obstante, las secuencias obtenidas no alcanzaron la longitud suficiente para su registro en el GenBank.

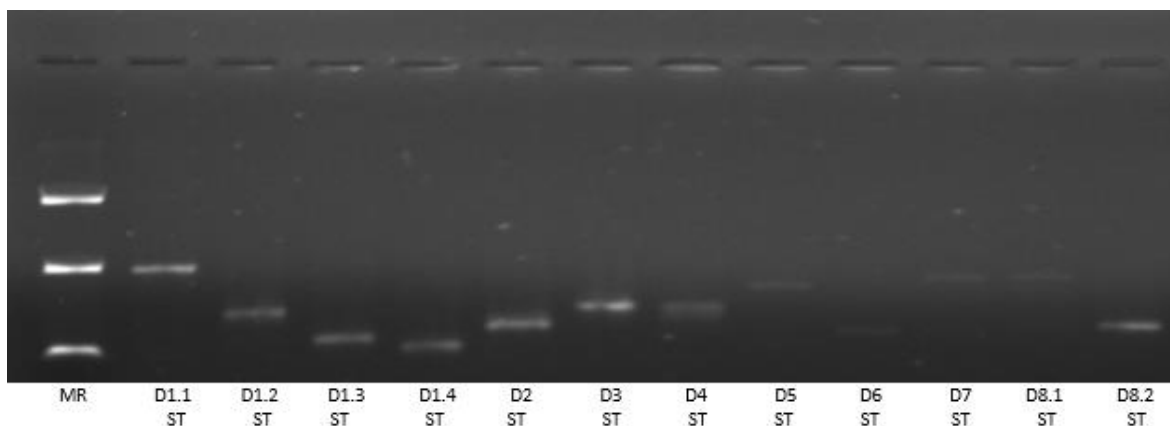


Figura 6. Gel de electroforesis. Resultados tras la primera electroforesis de *Strongyloides*.

#### 4.6. Asociaciones entre los parámetros estudiados

La relación entre sólidos en suspensión y población atendida por la depuradora (habitantes censados) se ha estudiado mediante la determinación de un coeficiente no paramétrico, la Rho de Spearman, al tratarse de una distribución no normal. El coeficiente de correlación fue bajo ( $\rho = -0,154$ ) no significativo ( $p = 0,569$ ), mostrando que no existe relación entre los sólidos en suspensión y los habitantes censados. No parece encontrarse relacionados los SS con el caudal de agua de entrada ( $\rho = -0,154$ ;  $p = 0,569$ ) o de salida ( $\rho = 0,228$ ;  $p = 0,396$ ). Tampoco se encuentran diferencias significativas entre campañas ni a la entrada ( $p = 0,505$ ), ni a la salida ( $p = 0,959$ ), ni en función de la tecnología utilizada ( $p = 0,266$ ).

*E. coli* (entrada)-habitantes censados. El coeficiente de correlación fue bajo ( $\rho = 0,018$ ) no significativo ( $p = 0,948$ ), mostrando que no existe relación entre la *E. coli* de entrada y los habitantes censados.

*E. coli* (entrada)-DQO. El coeficiente de correlación fue moderado ( $\rho = -0,742$ ) significativo ( $p = 0,002$ ), mostrando que puede existir relación entre la *E. coli* de entrada y la DQO ( $\text{mg O}_2/\text{L}$ ).

*E. coli* (entrada)-DBO El coeficiente de correlación fue moderado ( $\rho = -0,679$ ) significativo ( $p = 0,022$ ), mostrando que puede existir relación entre la *E. coli* de entrada y la DBO ( $\text{mg O}_2/\text{L}$ ).

*E. coli*-turbidez. El coeficiente de correlación fue bajo ( $\rho = 0,100$ ) no significativo ( $p = 0,769$ ), mostrando que no existe relación entre la *E. coli* de entrada y turbidez.

*E. coli* (entrada) – campaña (estacionalidad). Existen diferencias significativas en la cantidad de *E. coli* ( $p = 0,027$ ); hay más cantidad en primavera-verano que en invierno-primavera. (Gráfica 1).

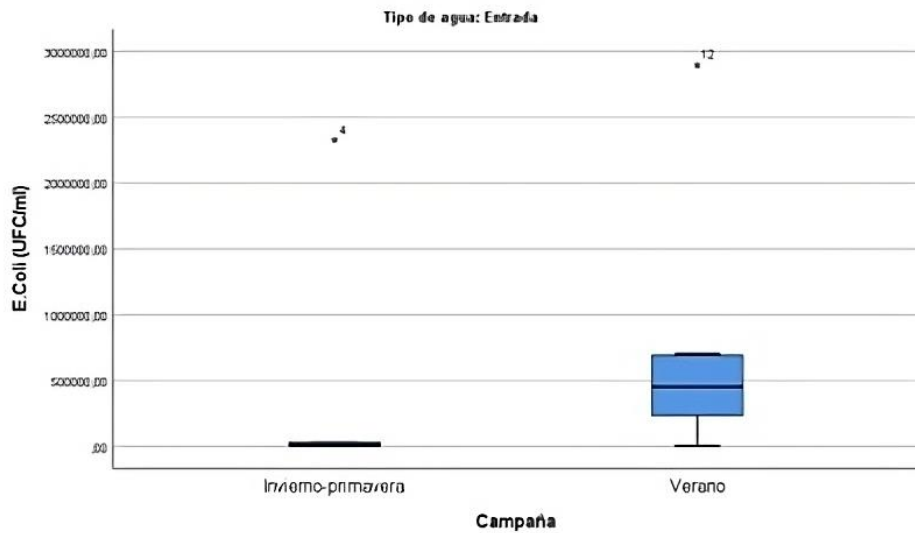


Figura 7. E.coli (entrada) - Campaña

Otra correlación importante es la no significación estadística de la relación de *E.coli* a la salida con la tecnología de tratamiento ( $p=0,138$ ). Se puede observar con la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes (Figura 8).

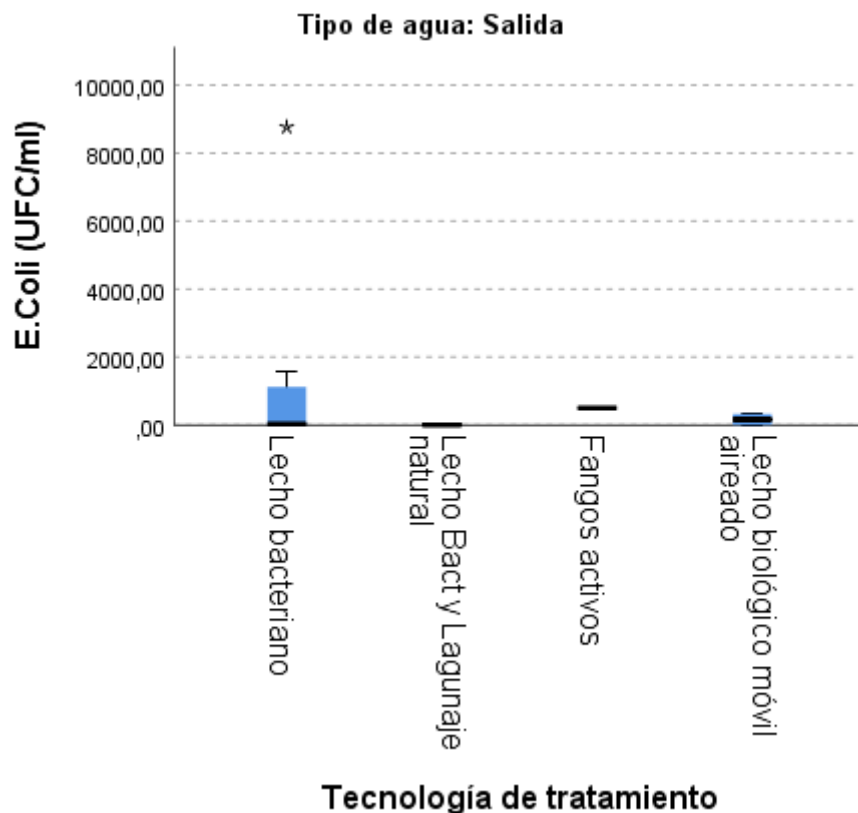


Figura 8. E.coli (salida) - Tecnología de tratamiento.

Coliformes y población censada. No parece encontrarse relacionados con los habitantes censados, ni los coliformes de entrada (Rho = -0,036; p=1), ni los de salida (Rho = -0,491; p=0,053 casi significativa).

Coliformes y caudal de tratamiento. En la entrada Rho = -0,089 relación baja, no significativa (p=1). Sin embargo en la salida sí que hay una relación baja/moderada (Rho = 0,598), significativa (p = 0,014).

Coliformes y DBO. En entrada existe una relación fuerte (Rho = -0,745), significativa (p=0,008) y negativa (conforme aumenta la DBO, disminuyen los coliformes totales). En salida Rho = -0,273 relación baja, no significativa (p=0,417) y negativa.

Coliformes y DQO. En entrada encontramos una relación fuerte (Rho = -0,825) significativa (p<0,001) y negativa (conforme aumenta la DQO disminuyen los coliformes totales). En salida Rho = 0,185 relación baja, no significativa (p=0,527) y positiva.

Coliformes y caudal. Solo encontramos relación moderada en la salida (Rho = 0,536), significativa (p=0,040) y positiva (Al aumentar el caudal, aumentan los coliformes de salida).

Coliformes y campaña. Con la Prueba U de Mann-Whitney se obtiene una relación significativa tanto en la entrada como en la salida (ambas p=0,038). La cantidad de coliformes es mayor en verano (tanto para la entrada como para la salida).

Nematodos – variables. No hay asociación de número de nematodos con ninguna de las variables estudiadas, salvo con la campaña (hay más en invierno que en verano).

#### 4.7. Ensayos para la mejora de la calidad de las aguas

Los valores físico-químicos de partida, correspondiente al agua bruta tomada del efluente de salida de la EDAR 1, se presentan en la tabla 6.

*Tabla 6. Valores físico-químicos del agua bruta a regenerar.*

Turbidez (NTU)	pH	Conductividad (mS/cm)	SS (mg/L)
6,98	7,48	2,09	284

En la figura 9 se muestran los resultados microbiológicos de partida (EDAR 1), mediante 4 diluciones sucesivas.

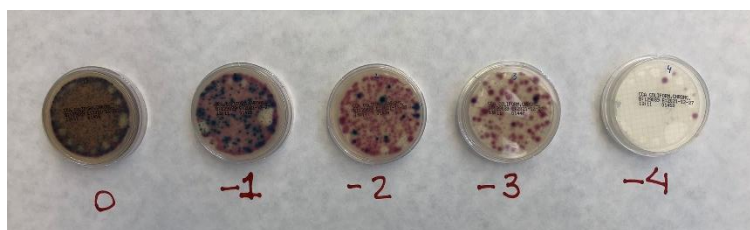


Figura 9. Siembra en superficie de diluciones sucesivas (hasta la 10<sup>-4</sup>) del agua bruta (salida EDAR 1).

En la tabla 7 se presentan los resultados físico-químicos (turbidez y color) y microbiológicos (*E. coli* y Coliformes) tras los diversos tratamientos de regeneración de aguas residuales depuradas. Para la realización de estos ensayos se tomó agua de salida de la EDAR 1.

Tabla 7. Resultados físico-químicos (turbidez y color) y microbiológicos (*E. coli* y Coliformes) tras los diversos tratamientos de regeneración de aguas residuales depuradas.

Tratamiento de regeneración	Turbidez (NTU)	pH	Color	Reducción microbiológica ( <i>E. coli</i> y Coliformes)
Cloración	4,59	8,4	No/agua clarificada	99%/(Desinfectada)
Coagulación- Floculación- Decantación (CFD)	3,7	8,4*	Sí	No Aplica
CFD + Filtración (con arena)	2,5	8,4	Sí	No Aplica
Ultravioleta (UV)	5,1	7,5	Sí	25% (no desinfectada)
CFD + Filtración + UV	2,5	8,4	Sí	99% (Desinfectada)
CFD + Filtración + UV + Cloración	2,4	8,4	No/agua clarificada	100%

Las figuras 10, 11 y 12 muestran los resultados del análisis microbiológico (siembra en superficie sobre agar CCA); se puede observar que CFD+Filtración+UV o Cloración son más eficaces que únicamente UV como tratamientos de regeneración.

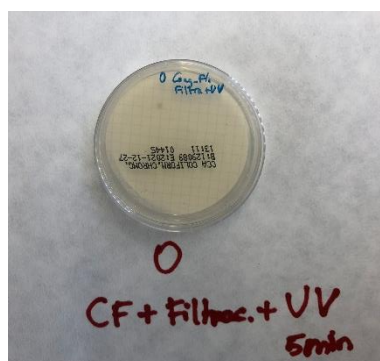


Figura 10. Siembra en superficie tras el tratamiento de regeneración del agua de salida procedente de la EDAR 1. CFD+ Filtración+ UV.

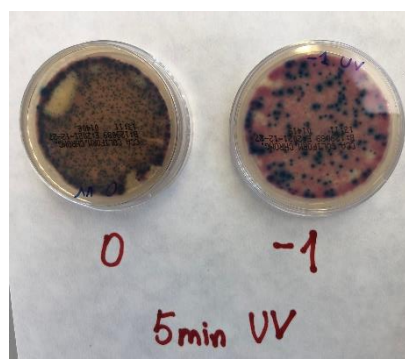


Figura 11. Siembra en superficie tras el tratamiento de regeneración del agua de salida procedente de la EDAR 1. UV.

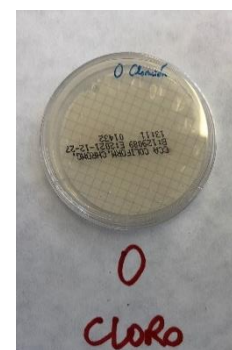


Figura 12. Siembra en superficie tras el tratamiento de regeneración del agua de salida procedente de la EDAR 1. CLORACIÓN.

Con el diseño de una instalación real de CFD, ejecutado con el programa WCedep se obtuvo que se requerirían 4 arquetas de coagulación de 22,01m x 3,14m x 4m (longitud x anchura x altura) seriadas, cada una de ellas por una arqueta de floculación de 49,22m x 7,03m x 4m. El caudal de diseño unitario es de 5538 m<sup>3</sup>/h el cual corresponde a una planta de CF de 22150 m<sup>3</sup>/h (caudal de diseño). Los tiempos de residencia de coagulación y floculación son de 3 min y 15 min respectivamente.

## 5. Discusión

### 5.1. Comparación EDARs en términos físico-químicos.

Como se puede observar en los resultados (tabla 3) existen diferencias apreciables en los parámetros medidos del agua de entrada en las EDARs analizadas. Las depuradoras en las que los parámetros estudiados muestran valores más elevados de contaminación son la 1, la 5 y la 7, siendo los más destacables los SS. A la hora de realizar el análisis de los resultados de reducción es importante considerar que de estas tres depuradoras, la que recibe mayor caudal es la 1, seguida de la 7 y finalmente de la 5.

Si se comparan las dos campañas realizadas por cada depuradora, se observa que también existen diferencias entre ellas, lo que indica que hay una influencia importante de las actividades humanas como: la dinámica poblacional, la cantidad de población total, o la época del año (sequías, lluvias). Estos están en línea con el concepto de vertido urbano, algunos autores ya lo han descrito anteriormente (Ministerio de Medio Ambiente Español, 2000).

De hecho, la influencia estacional es notable en algunas depuradoras. En las depuradoras 4 y 5 se puede observar como empeora notablemente la calidad del agua de entrada; principalmente debido a la coincidencia con campañas agrícolas.

### 5.2. Comparación EDARs según la carga microbiológica que reciben:

Las depuradoras que reciben más carga microbiológica, en orden descendente son la 4, 7, 1 y 3. Esto puede deberse al impacto de la agricultura intensiva (fertilización con heces de ganado) sobre el efluente receptor de la depuradora (Instituto de Investigación en Agricultura Ecológica, 2011).

Se evidencia una influencia estacional, pues la carga microbiológica de entrada de las EDARs aumenta notablemente en primavera-verano en casi todas las depuradoras, exceptuando la 4 y la 5 que notan un menor cambio. La época de primavera-verano coincide con la época de fertilización de los campos, por lo que es probable que nuevamente se pueda apreciar una influencia de las actividades humanas en la composición microbiológica de las aguas de entrada.

### 5.3. Comparación de los procesos de tratamiento de aguas residuales.

Considerando los tratamientos biológicos aplicados en cada instalación podría esperarse que las bacterias eliminaran la materia orgánica presente en los efluentes y a su vez se experimentara una estabilización de la microbiota en el propio lecho o reactor dónde se lleva a cabo el proceso. Por lo tanto, que la composición del agua de salida fuera más o menos estable para cada depuradora, independientemente de la composición del agua de entrada. No obstante, no se observa esta tendencia y por tanto se sugiere que la composición del agua de entrada sí que influye en la calidad del agua de salida (Fernández-Galiano et al., 1996) pues la composición del efluente puede afectar los reactores biológicos

El RD 1620/2007 establece los posibles usos del agua a su salida del proceso de depuración, según los valores obtenidos para varios parámetros. Los valores de los parámetros y los posibles usos de estas aguas se han establecido atendiendo a criterios sanitarios y se muestran en el anexo 5. Resumen de distintos tipos de usos en la tabla 8. Según esta tabla, se analizará y clasificará el agua de salida de cada depuradora.

Tabla 8. Calidad y tipo de uso asociado para la reutilización del agua (Adaptada de RD1620/2007).

Uso	1.-USO URBANO	2.-USO AGRARIO			3.-USO INDUSTRIAL		4.-USO RECREATIVO		5.-USO AMBIENTAL			
Calidad	1.1 y 1.2	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	4.1	4.2	5.1	5.2	5.3	5.4

#### 5.3.1. Depuradora 1

Para la campaña de invierno-primavera (Campaña 1) la depuradora 1, cuyo proceso de depuración es lecho bacteriano, erradicó *E. coli* (reducción de 4,14 unidades logarítmicas) y redujo en 210 (72%) unidades la concentración de SS (mg/L). Con estos resultados, la calidad del agua de salida no permite su reutilización debido a la presencia de una cantidad de SS (80 mg/L) que excede los límites máximos permitidos para todo tipo de reúso (35 mg/L).

En la campaña de primavera-verano (campaña 2), los resultados fueron ligeramente distintos en cuanto a la reducción de SS (reducción de 168 unidades, que equivalen a un 89% de reducción). A pesar de que la concentración de SS a la entrada fue menor que en la otra campaña y la reducción obtenida fue mayor, el agua de salida se puede utilizar para determinados usos agrícolas (2.2. y 2.3 del RD 1620/2007), para algún uso industrial (3.1), para uso recreativo (4.2) y para algún uso ambiental (5.1, 5.3).

En resumen, el agua de salida de esta depuradora se puede reutilizar para fines agrícolas

específicos, fines industriales y alguna modalidad de uso recreativa o incluso medioambiental.

### 5.3.2. Depuradora 2

Para la campaña 1, la depuradora 2 cuyo proceso de depuración es lecho bacteriano y lagunaje natural redujo el parámetro de *E. coli* 4,22 unidades logarítmicas y disminuyó 40,5 unidades la concentración de SS (mg/L) que corresponde a una reducción del 68%, entre otras reducciones como podemos observar en la tabla 5 del apartado de resultados.

En la campaña de primavera-verano (campaña 2), la reducción de *E. coli* fue total con 4,17 unidades logarítmicas y con respecto a la reducción de SS los resultados fueron mejores ya que se consiguió un 97% de reducción equivalente a reducir 120mg/L.

La gran diferencia entre campañas la encontramos en la presencia de sólidos en suspensión; notablemente mayor en la primera campaña. La reducción microbiológica en ambos casos es buena y la turbidez se podría mejorar con algún proceso añadido como CFD+Filtración para abrir las posibilidades de reúso mejorando la calidad. Así pues, la depuradora 2 (en ambas campañas) se clasificaría con una calidad 2.2, 2.3, 3.c, 4.2, 5.1 y 5.3 (Anexo 5). Por lo que, el agua de salida de esta depuradora se puede reutilizar para fines agrícolas específicos, fines industriales y alguna modalidad de uso recreativa o incluso medioambiental.

### 5.3.3. Depuradora 3

Para la campaña 1, la depuradora 3 cuyo proceso de depuración es lecho bacteriano redujo el parámetro de *E. coli* 3,42 (unidades logarítmicas) y disminuyó 31 unidades la concentración de SS (mg/L) que corresponde a una reducción del 46%, entre otras reducciones como podemos observar en la tabla 5 del apartado de resultados. En la campaña de primavera-verano (campaña 2), los resultados fueron mejores; ya que la reducción de *E. coli* fue de 4,27 unidades logarítmicas y con respecto a la reducción de SS se consiguió un 81% de reducción equivalente a reducir 130,5mg/L. Aunque finalmente la calidad de ambas campañas es muy similar debido a que la concentración de SS en la entrada de la primera campaña era mucho más baja; por lo que su peor reducción no es significativa.

La turbidez de la primera campaña no se determinó, pero tras analizar el resto de parámetros y suponiendo que estaría en el orden de magnitud de la segunda. Aunque al sobrepasar el límite permitido de 35mg/L de SS ya no tendría posible reúso si no se mejora su calidad. Por tanto, sólo podría clasificarse el agua de la depuradora 3 para la 2ª campaña, con las siguientes calidades: 2.2 y 2.3 (usos agrícolas específicos), 3.1 (uso industrial), 4.2, 5.1 y 5.3 (determinados usos recreativos y ambientales).

#### 5.3.4. Depuradora 4

Para la campaña 1, la depuradora 4, cuyo proceso de depuración es fangos activados, redujo el parámetro de *E. coli* en 3,67 unidades logarítmicas y disminuyó 68,5 (98%) unidades la concentración de SS (mg/L), entre otras reducciones mostradas en la tabla 5 del apartado de resultados. En la campaña de primavera-verano (campaña 2), los resultados fueron mejores; ya que la reducción de *E. coli* fue de 3,76 unidades logarítmicas y con respecto a la reducción de SS se consiguió un 99% de reducción, equivalente a reducir 787,5mg/L. Finalmente la calidad de ambas campañas es muy similar, destacando una menor concentración de SS en la primera campaña.

Las calidades y posibles reúsos correspondientes a la depuradora 4 para ambas campañas son: 1.2, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 4.1, 4.2, 5.1 y 5.3 según RD1620/2007. En resumen, el agua de salida de esta depuradora se puede reutilizar para fines urbanos, agrícolas, industriales, recreativos o incluso medioambientales. Con las limitaciones que podemos observar en el Anexo 5.

#### 5.3.5. Depuradora 5

Para la campaña 1, la Depuradora 5 cuyo proceso de depuración es lecho bacteriano y lagunaje natural redujo totalmente el parámetro de *E. coli* (4,93 unidades logarítmicas) y disminuyó 293 unidades la concentración de SS (mg/L) que corresponde a una reducción del 92%, entre otras reducciones como podemos observar en la tabla 5 del apartado de resultados. En la campaña de primavera-verano (campaña 2), los resultados fueron ligeramente mejores; ya que la reducción de *E. coli* fue total con 3,17 unidades logarítmicas. Respecto a la reducción de SS se consiguió un 99% de reducción equivalente a reducir 293mg/L.

La calidad de la segunda campaña se ve mermada por la aparición de 2 huevos de nematodos en la filtración de 5L de agua de salida, por lo que la clasificación resultante para ambas campañas se reduce sólo a determinados usos recreativos o ambientales: 4.2, 5.1 y 5.3 según RD1620/2007.

#### 5.3.6. Depuradora 6

Para la campaña 1, la depuradora 6 cuyo proceso de depuración es lecho bacteriano redujo el parámetro de *E. coli* 0,87 log y disminuyó 110 unidades la concentración de SS (mg/L) que corresponde a una reducción del 85%, entre otras reducciones como podemos observar en la tabla 5 del apartado de resultados. En la campaña de primavera-verano (campaña 2) la reducción de *E. coli* fue de 2,52 unidades logarítmicas y con respecto a la reducción de SS se consiguió un 94% de reducción equivalente a reducir 52mg/L.

Calidades y posibles reúsos según RD 1620/2007. Campaña 1: 1.2, 2.1 y 4.1 (uso urbano, agrícola o recreativo con ciertas particularidades contempladas en el RD) y para ambas campañas: 2.2, 2.3, y 4.2 (nuevos tipos de uso agrícolas y recreativos permitidos), 3.1, 5.1 y 5.3. (como novedad con respecto a la campaña 1, se abre el abanico de reutilización a tipos industriales y ambientales).

#### 5.3.7. Depuradora 7

Para la campaña de campaña 1, la depuradora 7 cuyo proceso de depuración es lecho bacteriano redujo el parámetro de *E. coli* 3,32 (unidades logarítmicas) y 410 unidades la concentración de SS (mg/L) que corresponde a una reducción del 100%, entre otras reducciones como podemos observar en la tabla 5 del apartado de resultados. En la campaña de primavera-verano (campaña 2) la reducción de *E. coli* fue de 1,62 unidades logarítmicas y con respecto a la reducción de SS se consiguió un 63% de reducción equivalente a reducir 65,5mg/L. La segunda campaña obtuvo peor calidad del agua de salida sobrepasando el límite de 35mg/L de SS por lo que no pudo destinarse para reúso.

Calidades y posibles reúsos para la campaña 1 según RD 1620/2007: 1.2, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 4.1, 4.2, 5.1, 5.3. En resumen, el agua de salida de esta depuradora para la 1ª campaña, se puede reutilizar para fines urbanos específicos, agrícolas, alguna modalidad de uso industrial, fines recreativos o incluso medioambientales.

#### 5.3.8. Depuradora 8

Para la campaña de campaña 1, la depuradora 8 cuyo proceso de depuración es lecho biológico móvil aireado redujo totalmente el parámetro de *E. coli* (6,55 unidades logarítmicas) y disminuyó 11 unidades la concentración de SS (mg/L) que corresponde a una reducción del 33%, entre otras reducciones como podemos observar en la tabla 5 del apartado de resultados. En la campaña de primavera-verano (campaña 2) la reducción de *E. coli* fue de 3,33 unidades logarítmicas y con respecto a la reducción de SS se consiguió un 72% de reducción equivalente a reducir 74mg/L.

La ventaja del lecho biológico móvil aireado es el aumento de la superficie de contacto en la que pueden fijarse los microorganismos gracias a ese relleno y por consiguiente el aumento de la capacidad de tratamiento. Mencionar también que es de bajo coste energético, ya que la aireación es por convección natural.

Calidades y posibles reúsos según RD 1620/2007 para ambas campañas: 2.2, 2.3, 3.1c, 4.2, 5.1 y 5.3. Lo que equivale a la posibilidad de reutilización para determinados fines agrícolas, industriales, recreativos y medioambientales.

El lecho bacteriano es un tratamiento muy robusto, ya que tiene un coste de operación y

mantenimiento muy bajo; sirve para eliminar materia orgánica pero no nutrientes y el gran inconveniente es que necesitan de bastante espacio (grandes dimensiones de diseño). Ofrece una reducción muy buena que ayuda a cumplir la legislación vigente manteniendo los parámetros dentro de rango.

Al lecho bacteriano se le suma un tipo de tratamiento terciario (lagunaje natural) añadiendo un matiz de desinfección extra y ayudando a laminar la salida. El principal inconveniente de las lagunas es el espacio necesario para instalarlas y que con el tiempo quizá sea necesaria una limpieza encareciendo el coste del tratamiento en sí. Normalmente esto último se evita con un buen dimensionado para que el fango se vaya degradando por sí solo sin necesidad de vaciado. Por todo ello, el lecho bacteriano y el lagunaje natural juntos ofrecen una reducción muy buena, pero la turbidez final tan elevada reduce las posibilidades de reúso convirtiéndose en el principal parámetro limitante.

Por otro lado, los fangos activados son un tratamiento que consume mucha energía, tienen un alto coste operacional y de mantenimiento pero eliminan materia orgánica y nutrientes además de ser más compactos. En definitiva, funciona muy bien, recordar que era la depuradora que más carga microbiológica recibía y aun así se consigue una reducción muy buena.

Los resultados parecen indicar que la eliminación de contaminantes microbiológicos no está relacionado con el tipo de tratamiento (dentro de los que se han sometido a estudio), sino que, tendría más influencia la carga microbiana de entrada a la depuradora. De hecho, las depuradora 1 (ambas campañas), la 2 (segunda campaña) y la 8 en la primera, reciben un caudal de entrada a tratar superior al diseño previsto, y en ellas se observa una menor reducción microbiológica y de sólidos en suspensión que en el resto de las depuradoras, teniendo en cuenta su tamaño. Además, el tener distinto rendimiento en ambas campañas refuerza más la hipótesis de que la eliminación de microorganismos es más dependiente del caudal de entrada (contaminación) que del proceso utilizado en sí.

#### **5.4. Huevos de nematodos.**

La determinación de huevos de nematodos por el método de flotación en sulfato de Zinc mostró que no se encontraban presentes formas compatibles con huevos de nematodos, excepto en la depuradora 5 en que se encontraron 2 huevos. Sin embargo, cuando se utiliza la fijación, seguida por observación y recuento en cámara de Neubauer, se encuentran formas parasitarias compatibles con huevos de nematodos en todas las depuradoras estudiadas. Dado que el cultivo de los gusanos resultó negativo, la diferencia entre las dos técnicas se podría achacar a la no viabilidad de los huevos, que probablemente cambiará su densidad, haciendo que no se determinen en el protocolo

de flotación. Hay que señalar no obstante, la observación de nematodos vivos en algunas muestras coincidiendo con campañas agrícolas, que tampoco crecieron en cultivos por lo que no parecen viables fuera de su entorno, y esto reduce las posibilidades de que se trate de nematodos patógenos para el hombre. Esta observación se ha visto apoyada por los resultados obtenidos por técnicas de biología molecular, ya que las secuencias obtenidas, aunque muy cortas, presentan homología con patógenos para el hombre y/o animales en 2 casos (D3 y D8.2). La escasa longitud de las secuencias se debe a que en realidad son hibridaciones inespecíficas obtenidas en reacciones de PCR, por lo que la homología obtenida es muy pequeña y no confirma con total seguridad la presencia de estos patógenos viables.

Lo que si representa un buen resultado es la no presencia de *Toxocara* y *Ancylostoma* en todas las depuradoras estudiadas y de *Strongyloides stercoralis* prácticamente en todas. Estos nematodos se han buscado por ser parásitos intestinales muy comunes en perros y gatos. Tampoco se ha observado presencia de huevos de cestodos (Tenias) ni trematodos, o del nematodo más frecuente en nuestro país, *Enterobius vermicularis*, que algunos autores han propuesto como posible indicador para la determinación de presencia de nematodos patógenos en las aguas y fagos depurados (Rudko y col, 2017).

La depuradora en la que aparecen más huevos de nematodos (mediante cámara Neubauer) fue la EDAR 3 con 130 huevos en la campaña 1; mientras que las EDARs 4, 5, 7 y 8 en la segunda campaña fueron las que menos huevos de nematodos (no se hallaron huevos). En estudios previos realizados en depuradoras de la misma zona se observaron huevos de nematodos en todas las depuradoras estudiadas, aunque la cantidad encontrada ha variado en los diferentes estudios realizados y en algunos puntos no se encontraron (Marín y col, 2011; Mosteo y col, 2013; Benito y col,). La metodología utilizada en estos estudios fue la observación al microscopio tras concentración de la muestra, lo que sería equivalente al estudio realizado en este estudio con cámara de Neubauer. En nuestra opinión la técnica que utiliza flotación con sulfato de Zinc y posterior recuento en cámara McMaster da una visión más fiable a la hora de considerar el reúso de las aguas depuradas. No obstante, el bajo número de huevos encontrados en las aguas debe de hacer sospechar de su presencia en los fangos de depuradora y la necesidad de llevar a cabo estudios a este respecto para garantizar su utilización sanitariamente segura, como ya han comentado otros autores (El Fels y col, 2018).

No se puede asociar el tratamiento con la presencia o ausencia de huevos ( $p=0,733$ ), aunque se ha descrito que tratamientos como lodos activos o lagunas aireadas son eficientes en la eliminación de huevos de nematodos (Ben Ayed et al., 2009, Reinoso et al., 2008, Sharafi et al., 2012. Estos son

los tratamientos utilizados en las depuradoras estudiadas lo que explicaría que haya una baja presencia de los mismos y no se encuentren diferencias entre estos tratamientos. Los nematodos de vida libre se alimentan de materia orgánica, bacterias, levaduras, hifas de hongos y de algas y que por lo tanto colaboran en el proceso de depuración con una gran eficiencia. Ya que algunos de ellos se alimentan de bacterias, mejoran incluso la calidad de las aguas (Lara, 2003).

### **5.5. Discusión del análisis Estadístico**

#### **Asociación parámetros y presencia de huevos de gusanos.**

En cuanto a los huevos de nematodos como se ha podido observar en los resultados del análisis estadístico, no hay relación alguna con el resto de parámetros, sólo cabe destacar la mayor presencia de los mismos en la época de invierno.

Con la cantidad de coliformes y *E.coli* ocurre lo contrario, en verano nos encontramos con más. Un hallazgo importante ha sido que la presencia de más o menos *E.coli* no guarda relación con la turbidez.

Aumentos del caudal a tratar se relaciona con un aumento de los coliformes totales a la salida.

### **5.6. Selección EDAR 1 en el ensayo de mejora del agua.**

La depuradora número 1 es la más indicada para la realización del ensayo, ya que sirve a una población grande, recibe aguas residenciales y es la de mayor interés de mejorar la calidad para todo tipo de reúso contemplado en el RD 1620/2007. Además es la depuradora en la que mayor cantidad de SS aparecen en la salida (campaña 1 con 80mg/L).

El tratamiento alternativo escogido para la mejora de la calidad del agua de salida de la depuradora es el de Coagulación Floculación Decantación con una posterior filtración y desinfección con UV (CFD+FILTRACIÓN+UV). Esta elección se debe a que es un método muy eficaz para eliminar sólidos en suspensión, clarificando el agua. Con la posterior filtración se garantiza la reducción de la turbidez ocasionada por los sólidos favoreciendo la desinfección con UV sin interferencias de los mismos (Salcedo, 2002).

En el proceso de coagulación-floculación se utilizan una serie de productos llamados coadyuvantes que favorecen la coagulación (neutralizando cargas y formando una masa gelatinosa que une partículas). Añadiendo otra serie de aditivos floculantes, y agitando suavemente, se consigue que se unan formando masas mayores que puedan sedimentar con más facilidad o puedan ser filtradas (M. I. Aguilar, 2002).

Para la depuradora 1 en la campaña 2 se obtuvo la siguiente clasificación de calidades: 2.2,

2.3, 3.1, 4.2, 5.1 y 5.3 mientras que la campaña 1 no pudo clasificarse por exceder el límite de 35mg/L de SS (80mg/L).

Una vez aplicado el tratamiento alternativo se consiguió añadir las siguientes calidades: 1.2, 2.1, 4.1 según el RD 1620/2007. La turbidez alcanzada fue de 2,5 NTU, por lo que aunque muy cerca, no se logró alcanzar las calidades: 1.1 (necesario 2 NTU como límite), 3.2 (exige 1 NTU como máximo), 5.2 (con un límite de 2 NTU).

## **6. Conclusiones**

1. El agua de salida de las diferentes depuradoras cumple requisitos para su reutilización con fines agrícolas específicos, industriales, recreativos y ambientales, a excepción de las depuradoras 1, 3 y 7 las dos primeras en la campaña 1 y la 7 en la 2. Las depuradoras 4, 6, y 7, añaden en la campaña 1, un uso urbano, más restrictivo que los anteriores.

2. No se encontró relación estadística entre los parámetros estudiados.

3. La técnica de flotación, seguida de recuento en cámara McMaster, proporciona mejores resultados que la concentración con formalina-acetato de etilo para el recuento de huevos de nematodos patógenos, confirmado por la ausencia demostrada por técnicas de Biología Molecular de estos géneros patógenos.

4. Se propone el tratamiento CFD+Filtración+UV, ya que elimina el principal problema para la clasificación de las aguas, que son los sólidos en suspensión, y añade la desinfección por UV, con efecto sinérgico entre ambas.

## 7. Bibliografía

1. Aguilar, M.I.; Sáez, J.; Lloréis, M.; Soler, A.; Ortuño, J.F. (2002) *Tratamiento físico- químico de aguas residuales. Coagulación-Floculación*. 1a edición. Ed. Universidad de Murcia, España.
2. Amoah, P. Reddy, R. Seidu, T.A. Stenström *Removal of helminth eggs by centralized and decentralized wastewater treatment plants in South Africa and Lesotho: health implications for direct and indirect exposure to the effluents*. Environ. Sci. Pollut. Res., 25 (2018), pp. 12883-12895, [10.1007/s11356-018-1503-7](https://doi.org/10.1007/s11356-018-1503-7)
3. Ben Ayed, J. Schijven, Z. Alouini, M. Jemli, S. Sabbahi. *Presence of parasitic protozoa and helminth in sewage and efficiency of sewage treatment in Tunisia*. Parasitol. Res., 105 (2009), pp. 393-406, [10.1007/s00436-009-1396-y](https://doi.org/10.1007/s00436-009-1396-y)
4. Benito M, Menacho C, Chueca P, Ormad MP, Goñi P.J EnvironManage. 2020 May 1;261:110268. *Seeking the reuse of effluents and sludge from conventional wastewater treatment plants: Analysis of the presence of intestinal protozoa and nematode eggs*. doi: 10.1016/j.jenvman.2020.110268.
5. Cacciò, Simone M., y Una Ryan. *Molecular Epidemiology of Giardiasis*. Molecular and Biochemical Parasitology 160, n.o 2 (agosto de 2008): 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.04.006>.
6. C. Carranza-Rodríguez, M. Escamilla-González, I. Fuentes-Corripio, M.-J. Perteguer-Prieto, T. Gárate-Ormaechea, J.-L. Pérez-Arellano. *Helmintosis y eosinofilia en España (1990-2015)*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clín., 36 (2018), pp. 120-136, [10.1016/j.eimc.2015.11.019](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.019)
7. El Fels L, El Hayany B, El Faiz A, Saadani M, Houari M, HafidiM. *Sludge nematodes, cestodes, and trematodes eggs variation from lagooning, activated sludge and infiltration-percolation wastewater treatment system under semi-arid climate*. EnvironSciPollut Res Int. 2019 Jan; 26(1):570-576. doi: 10.1007/s11356-018-3618-2. Epub 2018 Nov 8.
8. García, J; Alonso, V, Cruz, L. (2000). Metodología y técnicas para la investigación.
9. Gillespie, Thomas R., Ellis C. Greiner, y Colin A. Chapman. *Gastrointestinal Parasites of the Guenons of Western Uganda*. The Journal of Parasitology 90, n.o 6 (diciembre de 2004): 1356-60. <https://doi.org/10.1645/GE-311R>.
10. Gonzalez, R; Yill, M; Curiel, L. (2003). Metodología de la investigación científica para las ciencias técnicas. Universidad de matanzas. 186 p.
11. Gutiérrez, J.F. (2015). Enfermedades parasitarias más importantes del conejo: *Oxiuridosis*. Disponible en: [Cunicultura - Enfermedades parasitarias más importantes del conejo: Oxiuridosis \(Passalurosis\)](https://www.cunicultura.com/enfermedades-parasitarias-mas-importantes-del-conejo-oxiuridosis-passalurosis/)
12. Infoagro (2018). Nematodo dorado de la papa: *Globodera rostochiensis*. Disponible en: <https://mexico.infoagro.com/nematodo-dorado-de-la-papa-globodera-rostochiensis/>

13. Marín, I.; Goñi, P.; Lasheras, A.M.; Ormad, M.P. Efficiency of a Spanish wastewater treatment plant for removal potentially pathogens: *characterization of bacteria and protozoa along water and sludge treatment lines*. Ecol. Eng., 74 (2011), pp. 28-32, [10.1016/j.ecoleng.2014.09.027](https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.027)
14. Marín, R. (2003). *Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos*. Tratamiento y control de calidad de aguas. Ed. Díaz de santos. Madrid.
15. MITECO (1998). *Libro blanco del agua en España*. Documento de síntesis. Disponible en: [https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/planificacion-hidrologica/sintesis\\_tcm30-77435.pdf](https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/planificacion-hidrologica/sintesis_tcm30-77435.pdf)
16. Mosteo, R., Ormad, M.P., Goñi, P., Rodríguez-Chueca, A. García, A. Clavel. (2013). *Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): water reuse possibilities*. Water Sci. Technol., 68 , pp. 575-583, [10.2166/wst.2013.201](https://doi.org/10.2166/wst.2013.201)
17. Nilforoushan M. R., Mirhendi H., Rezaie S., Rezaian M., Meamar A. R. and Kia E. B. (2007) A DNA-based identification of *Strongyloides stercoralis* isolates from Iran. *Iranian Journal of Public Health* 36, 6–20
18. NILSA (2017). *Tratamientos. Saneamientos y depuración*. Disponible en: <https://www.nilsa.com/es/que-hacemos/saneamiento-y-depuracion/tratamientos/>
19. OMS (2004). *Guidelines for drinking water quality*. World Health Organization. Geneva.
20. Pérez, J. (2005). *Depuración y reutilización de aguas residuales para riego*. Estación experimental de Cajamar. Mejora de la eficiencia en el uso del agua para cultivos protegidos.
21. Ramón, A. et al., (2003). *La importancia de los nematodos de la vida libre*. Departamento El Hombre y su Ambiente. Disponible en: <http://www2.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n48ne/nematodo.pdf>
22. Reinoso, R, L.A. Torres, E. Bécares. *Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater*. Sci. Total Environ., 395 (2008), pp. 80-86, [10.1016/j.scitotenv.2008.02.039](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.039)
23. Reglamento (UE) 2020/741 del parlamento europeo y del consejo de 25 de mayo de 2020 relativo a los requisitos mínimos para la reutilización del agua.
24. Rudko SP, Ruecker NJ, Ashbolt NJ, Neumann NF, Hanington, PC. (2017). *Appl Environ Microbiol. Enterobius vermicularis as a Novel Surrogate for the Presence of Helminth Ova in Tertiary Wastewater Treatment Plants*. 17;83(11):e00547-17. doi: 10.1128/AEM.00547-17.
25. Saavedra, E., J. L. Pérez Arellano, M. M. Sánchez Martín, y A. Muro Álvarez. «Parasitosis de interés en nuestro medio: aspectos actuales de la toxocarosis humana». *Medicina Integral* 36, n.o 10 (1 de diciembre de 2000): 387-95. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-parasitosis-interes-nuestro-medio-aspectos-10022183>

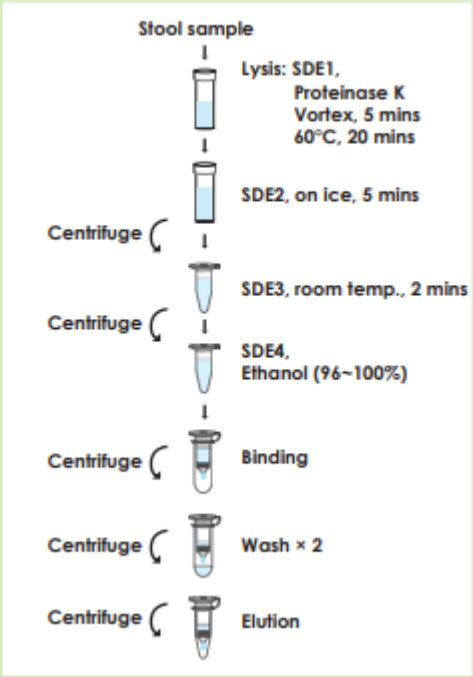
26. Salcedo, I., Andrades, J.A., Quiroga, J.M., Nebot, E. (2002). *Desinfección de aguas residuales urbanas mediante radiación ultravioleta: Aplicación en la EDAR de Jerez de la Frontera*. Tecnología del agua. Dossier 227 (agosto 2002): pp. 42-50, <https://lc.cx/o5gbSt>
27. Sharafi, K., Fazlzadehdavil, M., Pirsahab, M., Derayat, J., Hazrati, S. *The comparison of parasite eggs and protozoan cysts of urban raw wastewater and efficiency of various wastewater treatment systems to remove them*. Ecol. Eng., 44 (2012), pp. 244-248, [10.1016/j.ecoleng.2012.03.008](https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.03.008)
28. Talavera, M. (2003). *Manual de nematología agrícola*. Introducción al análisis y al control nematológico para agricultores y técnicos de agrupaciones de defensas vegetal. Conselleria d'Agricultura. Illes Balears. Enlace: <http://www.caib.es/sacmicrofront/archivopub.do?ctrl=CONTSP722ZI4569&id=4569>
29. Traub RJ, Robertson ID, Irwin P, Mencke N, Thompson RC. *Application of a species-specific PCR-RFLP to identify Ancylostoma eggs directly from canine faeces*. Veterinary Parasitology. Elsevier (septiembre 2004).
30. Ullate, A. (2020). *Caracterización molecular de parásitos intestinales en poblaciones de monos africanos*. Facultad de ciencias. Universidad de Zaragoza.
31. Ulloa, J: *El agua residual. Parámetros caracterizadores*. Madrid, Septiembre 1991.
32. World Health Organization Drinking-water, fact sheets (2018). Recuperado de: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>, visitado en mayo del 2023.
33. Zhu XQ, Jacobs DE, Chilton NB, Sani RA, Cheng NA, Gasser RB. *Molecular characterization of a Toxocara variant from cats in Kuala Lumpur, Malaysia*. Parasitology. (agosto 1998);117 (Pt 2):155-64.

# ANEXO 1. Base de datos. Recopilación principales datos y cálculos obtenidos experimentalmente.

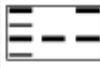





EDAR	Tipo de agua	Campaña	Sólidos en Suspensión (mg/L)	Coliformes Totales (UFC/ml)	Coliformes (UFC/ml)	E. Coli (UFC/ml)	Turbidez	Conductividad (µS/cm)	pH	DQO (mg O2/l)	DBO (mg O2/l)	Q(N) (m3/día)	Huevos Mc. Master	Huevos Neubauer
1	1	1	290	1,2E+06	1,2x10 <sup>6</sup> ±1x10 <sup>6</sup>	1,4E+04	7,70	2.306	7,4	488	199	17.839	0	22
1	2	1	80	1,7E+04	1,7E+04	0,0E+00	7,70	2.232	7,8	73	8	17.839	0	22
2	1	1	59,5	5,1E+05	5,1E+05	2,5E+03	15,60	1.270	6,6	767	480	2.783	0	40
2	2	1	19	7,4E+00	7,3E+00	1,5E+01	15,60	2.115	7,7	106	20	2.783	0	40
3	1	1	67	2,3E+05	2,0E+05	3,5E+04	N/D	1.582	7,3	912	485	1.510	0	130
3	2	1	36	1,3E+02	1,2E+02	1,3E+01	N/D	1.500	7,2	42	4	1.510	0	130
4	1	1	70	3,8E+07	3,5E+07	2,3E+06	9,00	1.713	7,6	239	89	826	0	43
4	2	1	1,5	2,0E+03	1,5E+03	5,0E+02	9,00	1.753	7,5	62	14	826	0	43
5	1	1	317,5	7,0E+04	6,5E+04	5,0E+03	N/D	2.612	6,3	1.823	991	523	0	31
5	2	1	24,5	1,0E+03	1,0E+03	0,0E+00	N/D	2.348	8,2	96	16	523	0	31
6	1	1	130	2,8E+05	2,7E+05	5,0E+03	7,70	3.164	6,9	1.009	N/D	5.605	0	15
6	2	1	20	1,9E+04	1,8E+04	6,7E+02	7,70	2.878	7,7	88	N/D	5.605	0	15
7	1	1	410	1,4E+06	1,4E+06	3,1E+04	9,10	2.137	7,1	704	N/D	3.750	0	11
7	2	1	0	1,5E+03	1,5E+03	1,5E+01	9,10	1.373	7,5	94	N/D	3.750	0	11
8	1	1	33,5	6,0E+04	5,6E+04	4,1E+03	N/D	1.867	6,9	832	290	5.614	0	15
8	2	1	22,5	7,5E+01	7,5E+01	0,0E+00	N/D	1.366	7,4	39	17	5.614	0	15
1	1	2	188,5	3,2E+06	2,8E+06	3,9E+05	4,6	2.235	7,5	387	188	24.734	0	15
1	2	2	20,5	8,5E+04	8,5E+04	0,0E+00	4,6	2.247	7,9	88	18	24.734	0	15
2	1	2	123,5	3,9E+06	3,8E+06	1,1E+05	17,10	1.199	7,3	541	235	5.220	0	22
2	2	2	3,5	1,5E+04	1,5E+04	0,0E+00	17,10	1.283	7,8	57	15	5.220	0	22
3	1	2	161	5,3E+06	4,7E+06	6,8E+05	8,30	1.504	7,1	588	334	1.480	0	4
3	2	2	30,5	1,6E+04	1,6E+04	3,7E+01	8,30	1.560	7,3	49	12	1.480	0	4
4	1	2	792	4,2E+07	3,9E+07	2,9E+06	9,60	1.611	7,4	293	109	767	0	0
4	2	2	4,5	2,5E+03	2,0E+03	5,0E+02	9,60	1.285	7,2	46	10	767	0	0
5	1	2	1030	9,0E+04	8,5E+04	5,0E+03	23,70	1.524	7,0	1.077	529	495	2	0
5	2	2	13,5	1,5E+03	1,5E+03	0,0E+00	23,70	1.556	8,1	72	25	495	2	0
6	1	2	55,5	2,5E+07	2,5E+07	5,2E+05	13,00	3.046	7,0	737	N/D	5.918	0	1
6	2	2	3,5	6,6E+05	6,6E+05	1,6E+03	13,00	2.867	8,0	103	N/D	5.918	0	1
7	1	2	104,5	5,1E+06	4,7E+06	3,6E+05	N/D	1.437	7,2	312	N/D	5.163	0	0
7	2	2	39	4,7E+04	3,8E+04	8,8E+03	N/D	1.389	7,8	N/D	N/D	5.163	0	0
8	1	2	103	4,3E+06	3,6E+06	7,1E+05	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0	0
8	2	2	29	1,3E+04	1,2E+04	3,3E+02	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0	0

**ANEXO 2. Protocolo esquemático de extracción de ADN total mediante el mini kit comercial (Stool DNA Isolation, FavorPrep, Biotech Corp).**

**Brief Procedure:**



## ANEXO 3. Protocolo esquemático de extracción y purificación de ADN de geles de agarosa mediante el uso del kit SPEDDTOOLS PCR CLEAN-UP (Biotools B&M Labs S.A.)

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p><b>CORTE DE LA BANDA</b></p> <p>Cortar la banda del gel utilizando un bisturí estéril e introducirla en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Minimizar al máximo el volumen de gel a incluir.</p> <p><b>No olvidar determinar el peso de la banda cortada</b></p> <p><b>Nota:</b> Minimizar el tiempo de exposición a los rayos UV.</p>		<b>CORTAR BANDA</b>
2	<p><b>LISIS DEL GEL</b></p> <p>Por cada <b>100 mg de gel</b> de agarosa &lt; 2% añadir <b>200 µL BUFFER B</b>.</p> <p><i>Si al mezclar la muestra con el Buffer B visualiza un cambio de color, corregir el pH de la mezcla (Sección 3.b)</i></p> <p>Incubar durante <b>5-10 min</b> a <b>50°C</b>. Vortexear cada 2-3 min hasta que el gel se disuelva completamente.</p> <p><b>Nota:</b> Para geles de agarosa &gt; 2%, duplicar el volumen de <b>BUFFER B</b>.</p>		<p><b>100 mg gel</b></p> <p>+</p> <p><b>200 µL BUFFER B</b></p> <p><b>50°C,</b> <b>5-10 min</b></p>
3	<p><b>UNIÓN DE ADN A LA COLUMNA</b></p> <p>Utilizar una Columna por muestra y colocarla en un Tubo Colector de 2 mL. Cargar cuidadosamente la muestra en la columna (hasta 700 µL).</p> <p>Centrifugar <b>30 seg</b> a <b>11,000 x g</b>. Desechar el filtrado y colocar la Columna nuevamente en su Tubo Colector.</p> <p><i>En caso necesario cargar en la columna el volumen de muestra residual y repetir la centrifugación de la columna.</i></p>		<p><b>CARGAR LA COLUMNA</b></p> <p><b>30 seg,</b> <b>11,000 x g</b></p>
4	<p><b>LAVADO DE LA MEMBRANA DE SILICA</b></p> <p>Añadir <b>700 µL de BUFFER T3</b>. Centrifugar <b>30 seg</b> a <b>11,000 x g</b>. Descartar el filtrado y colocar la Columna nuevamente en el Tubo Colector.</p> <p><b>Nota:</b> A fin de eliminar completamente las sales caotrópicas y mejorar la ratio <math>A_{260}/A_{230}</math> se recomienda repetir el lavado de la columna en las mismas condiciones.</p>		<p>+</p> <p><b>700 µL BUFFER T3</b></p> <p><b>30 seg,</b> <b>11,000 x g</b></p> <p><b>(1 ó 2 lavados)</b></p>
5	<p><b>SECADO DE LA MEMBRANA</b></p> <p>Centrifugar la columna <b>1 min</b> a <b>11,000 x g</b> a fin de eliminar los restos de Buffer T3 (evitar que la columna contacte con el filtrado).</p> <p><b>Nota:</b> Para la remoción completa del etanol incubar la columna a <b>70°C</b> durante 2-5 min.</p>		<p><b>1 min,</b> <b>11,000 x g</b></p>
6	<p><b>ELUCIÓN DEL ADN PURIFICADO</b></p> <p>Colocar la Columna en un tubo de 1.5 mL nuevo. Añadir <b>15-30 µL BUFFER E</b>. Dispensar el buffer directamente en la membrana de silica de la columna e incubar <b>1 min</b> a <b>temperatura ambiente</b>.</p> <p>Centrifugar <b>1 min</b> a <b>11,000 x g</b>. El eluido contiene el ADN purificado.</p> <p><b>Nota:</b> El rendimiento de fragmentos de ADN grandes (&gt;1000 bp) puede incrementarse con múltiples etapas de elución y precalentando el Buffer de Elución a <b>70 °C</b> e incubando la columna con el buffer durante 5 min (Sección 3.c).</p>		<p>+</p> <p><b>15-30 µL BUFFER E</b></p> <p><b>Incubar</b> <b>1 min a TA</b></p> <p><b>1 min,</b> <b>11,000 x g</b></p>

## ANEXO 4 Contaminantes presentes en un agua residual y sus posibles efectos sobre las aguas receptoras (Dewisme, 1997; Matia et al., 1999).

Contaminantes del agua	Impactos más significativos
Materia en suspensión	Aumento de la turbidez del agua (alteración de la fotosíntesis y reducción de la producción de oxígeno). Sedimentación, obstruyendo y cubriendo el lecho de los ríos.
Compuestos inorgánicos	Ecotoxicidad de algunos compuestos, como las sales de metales pesados. Reacciones con sustancias disueltas en el agua pasando a formar compuestos peligrosos.
Conductividad	Concentraciones elevadas de sales impiden la supervivencia de diversas especies vegetales y animales.
Nutrientes	Crecimiento anormal de algas y bacterias (aumento de la turbidez del agua). Eutrofización del agua.
Materia orgánica	Su descomposición puede provocar la disminución de la concentración del oxígeno disuelto en el agua hasta alcanzar condiciones sépticas. Eutrofización del agua. Emisión de metano en caso de aparición de procesos anaerobios.
Compuestos orgánicos tóxicos	Toxicidad para la vida acuática. Disminución de la concentración de oxígeno debido a los procesos de biodegradación. Producción, en el caso de líquidos no miscibles, de una película superficial que impide la aireación del agua.
Organismos patógenos (bacteria, virus y parásitos)	Inutilización del agua para uso humano. Contaminación de los organismos acuáticos que pueden llegar al hombre con la cadena alimenticia. Enfermedades de transmisión hídrica asociadas a la contaminación microbiológica del agua.
Contaminación térmica por descarga de aguas de refrigeración	Modificación de la solubilidad del oxígeno en el agua. Aceleración del metabolismo de la flora y la fauna acuáticas (eutrofización). Alteración de los ecosistemas acuáticos.

## ANEXO 5 Calidad del agua asociada a los distintos usos para su reutilización (Fuente RD 1620/2007).

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/100 mL)	10 mg/L	2 UNT <sup>5</sup>	OTROS CONTAMINANTES <sup>4</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	
<b>VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)</b>					
USO DEL AGUA PREVISTO	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
<b>2.- USOS AGRÍCOLAS<sup>1</sup></b>					
CALIDAD 2.1 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>1</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
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
<b>VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)</b>					
USO DEL AGUA PREVISTO	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 legionelosis. – Uso exclusivamente industrial y en localizaciones que no estén ubicadas en zonas urbanas ni cerca de lugares con actividad pública o comercial.

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)
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 Art. 257 a 259 del RD 849/1986
CALIDAD 5.2 a) Recarga de acuíferos por inyección directa	1 huevo/10 L	0 UFC/100 mL	10 mg/L	2 UNT	
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				