



## Trabajo Fin de Grado

Evaluación de metodologías para el análisis de *Salmonella* spp. en distintas matrices acuosas y estudio de su resistencia en la depuración de aguas residuales urbanas.

Methodology evaluation of *Salmonella* spp. in different watery matrices and study of their resistance against urban water treatment.

Autor/es

Cristina Baile Pérez

Director/es

Natividad Miguel Salcedo

Grado en Ciencias Ambientales  
Escuela Politécnica Superior de Huesca  
2017



## AGRADECIMIENTOS

Estas líneas van dedicadas a todos aquellos que en mayor o en menor medida han contribuido a la realización de este Trabajo de Fin de Grado.

En primer lugar, quiero darle las gracias a Nati por darme la oportunidad de hacer un trabajo que realmente me gusta. Por su colaboración, atención y esfuerzo durante la realización de este proyecto.

A Andrea y Silvia, del grupo de investigación de Calidad y Tratamiento de Aguas del área de Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza, por ayudarme, guiarme, y enseñarme tantas cosas.

A todos los compañeros que me han acompañado y ayudado a lo largo del grado de Ciencias Ambientales, en especial a mi amiga Beatriz Llorente, que lleva conmigo tantísimos años.

A toda mi familia, sin la cual no hubiera podido llegar hasta aquí, sobre todo a mis padres y mi hermano por su esfuerzo, apoyo y ayuda eternos. Os lo debo todo. Os quiero.

A mis amigos por ayudarme, darme ánimos, estar siempre a mi lado y decirme que yo puedo.

Y por último a Víctor, gracias por ser mi todo en todo momento. Te quiero.

## ÍNDICE

Portada

Índice

Resumen/Abstract

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	12
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1 <i>Salmonella</i> spp. Definición, nomenclatura y características. ....	14
2.2 <i>Salmonella</i> spp. en el medio ambiente y riesgo asociado.....	16
2.3 <i>Salmonella</i> spp. en aguas residuales y depuradas.....	18
2.4 Metodologías de análisis de <i>Salmonella</i> spp. ....	20
3. EVALUACIÓN DE METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE <i>Salmonella</i> spp.....	24
3.1 Materiales y métodos. ....	24
3.1.1. Metodología básica y elección de variables para el desarrollo del método de análisis de <i>Salmonella</i> spp.....	24
3.1.2. Inventario y preparación de materiales y reactivos. ....	25
3.1.3. Preparación de medios de cultivo. ....	27
3.1.4. Ensayo con cepa de <i>Salmonella</i> spp. ....	28
3.1.5. Ensayo con diferentes tipos de aguas. ....	31
3.1.5.1. Ensayo con agua potable. ....	31
3.1.5.2. Ensayo con agua superficial. ....	31
3.1.5.3. Ensayo con agua residual. ....	32
3.1.5.4. Ensayo con agua depurada. ....	32
3.2. Resultados y discusión.....	34
3.2.1. Ensayo con cepa de <i>Salmonella</i> spp. ....	35
3.2.2. Ensayo con diferentes tipos de aguas.....	36
3.2.2.1. Ensayo con agua potable. ....	36
3.2.2.2. Ensayo con agua superficial. ....	36
3.2.2.3. Ensayo con agua residual. ....	37
3.2.2.4. Ensayo con agua depurada. ....	37

4. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE <i>Salmonella</i> spp. A DISTINTOS TRATAMIENTOS DE DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES.....	40
4.1. Materiales y métodos.....	40
4.1.1. Descripción de las depuradoras.....	40
4.1.1.1. Depuradora de Tudela.....	40
4.1.1.2. Depuradora de Valtierra. ....	43
4.1.2. Metodología de la toma de muestras. ....	46
4.1.3. Procedimiento experimental.....	46
4.2. Resultados y discusión.....	48
4.2.1. Ensayos con agua de la depuradora de Tudela (entrada y salida). ....	50
4.2.2. Ensayos con agua de la depuradora de Valtierra (entrada y salida).....	50
5. CONCLUSIONES.....	52
6. BIBLIOGRAFÍA.....	54
7. ANEXO.....	59

# ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resultados de las pruebas bioquímicas para <i>Salmonella</i> spp. ....	16
<b>Tabla 2.</b> Bacterias habituales en aguas residuales. ....	20
<b>Tabla 3.</b> Resultados de <i>Salmonella</i> spp. en diferentes medios y caldos de cultivo para su aislamiento y confirmación mediante prueba bioquímicas.....	23
<b>Tabla 4.</b> Materiales necesarios para el análisis de <i>Salmonella</i> spp. ....	25
<b>Tabla 5.</b> Reactivos necesarios para el análisis de <i>Salmonella</i> spp. ....	25
<b>Tabla 6.</b> Relación entre etapas y materiales y reactivos. ....	26
<b>Tabla 7.</b> Resultados de los ensayos realizados a las diferentes muestras.....	34
<b>Tabla 8.</b> Resultados obtenidos en los ensayos realizados en las dos depuradoras.....	48

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Salmonella</i> Typhi.....	14
<b>Figura 2.</b> Colonias típicas de <i>Salmonella</i> . ....	23
<b>Figura 3.</b> Autoclave .....	27
<b>Figura 4.</b> Metodología utilizada para el análisis de la cepa de <i>Salmonella</i> spp.....	30
<b>Figura 5.</b> Metodología utilizada para el análisis de <i>Salmonella</i> spp. en las diferentes matrices acuosas. ....	33
<b>Figura 6.</b> Placa de Petri de agar XLD con colonias características de <i>Salmonella</i> spp. (Ensayo con cepa de <i>Salmonella</i> spp.). ....	34
<b>Figura 7.</b> Placa de Petri de agar SS con colonias características de <i>Salmonella</i> spp. (Ensayo con agua superficial). ....	34
<b>Figura 8.</b> Placa de Petri de agar cromogénico con colonias características de <i>Salmonella</i> spp. (Ensayo con agua residual).....	35
<b>Figura 9.</b> Tubos de ensayo de Müller-Kauffmann sembrados del agua de peptona tras incubación (Ensayo con agua depurada).....	35
<b>Figura 10.</b> Vista aérea de la EDAR de Tudela.....	40
<b>Figura 11.</b> Etapas de la EDAR de Tudela.....	42
<b>Figura 12.</b> Vista aérea de la EDAR de Valtierra. ....	43
<b>Figura 13.</b> Etapas de la EDAR de Valtierra. ....	45
<b>Figura 14.</b> Botes con agua de entrada y salida de la depuradora respectivamente.....	46
<b>Figura 15.</b> Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. (colonias negras) provenientes del agua de entrada a la depuradora de Tudela. ....	48

<b>Figura 16.</b> Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. (colonias moradas) provenientes del agua de salida de la depuradora de Tudela. ....	48
<b>Figura 17.</b> Test de aglutinación positivo para <i>Salmonella</i> spp. para el agua de entrada (1, 2 y 3) y salida (4, 5 y 6) de la depuradora de Tudela. ....	49
<b>Figura 18.</b> Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. (colonias negras) provenientes del agua de entrada a la depuradora de Valtierra. ....	49
<b>Figura 19.</b> Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. (colonias moradas) provenientes del agua de salida de la depuradora de Valtierra. ....	49
<b>Figura 20.</b> Test de aglutinación positivo para <i>Salmonella</i> spp. para el agua de entrada (4, 5 y 6) y negativo para la salida (1, 2 y 3) de la depuradora de Valtierra. ....	50
<b>Figura 21.</b> Campana de flujo laminar. ....	59
<b>Figura 22.</b> Rampa de filtración y mechero Bunsen. ....	59
<b>Figura 23.</b> Tubos con caldo de cultivo Müller-Kauffmann. ....	59
<b>Figura 24.</b> Tubos con caldo de cultivo Rappaport-Vassiliadis. ....	60
<b>Figura 25.</b> Placa de Petri con agar selectivo XLD. ....	60
<b>Figura 26.</b> Placa de Petri con agar selectivo SS. ....	60
<b>Figura 27.</b> Placa de Petri con agar selectivo cromogénico. ....	60
<b>Figura 28.</b> Test de aglutinación para confirmar la presencia de <i>Salmonella</i> spp. ....	61
<b>Figura 29.</b> Comparación de tubos de Müller-Kauffmann con cepa de <i>Salmonella</i> spp. y sin ella. ....	62
<b>Figura 30.</b> Comparación de tubos con Rappaport-Vassiliadis con cepa de <i>Salmonella</i> spp. y sin ella. ....	62
<b>Figura 31.</b> Placa de Petri de agar XLD con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. ....	62
<b>Figura 32.</b> Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. ....	63
<b>Figura 33.</b> Placa de Petri de agar nutritivo con colonias. ....	63
<b>Figura 34.</b> Placa de Petri de agar XLD con colonias características de <i>E. coli</i> . ....	64
<b>Figura 35.</b> Placa de Petri de agar SS con colonias características de <i>E. coli</i> . ....	64
<b>Figura 36.</b> Placa de Petri de agar cromogénico con colonias características de <i>E. coli</i> . ....	64
<b>Figura 37.</b> Bote de 500 ml con agua superficial. ....	65
<b>Figura 38.</b> Anaclín con 100 ml de agua de peptona y con los filtros utilizados en la filtración del agua superficial. ....	65
<b>Figura 39.</b> Tubos de ensayo de Rappaport-Vassiliadis sembrados del agua de peptona. ....	65
<b>Figura 40.</b> Placa de Petri de agar XLD con una colonia típica de <i>Salmonella</i> spp. (colonía negra). ....	66
<b>Figura 41.</b> Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. ....	66

<b>Figura 42.</b> Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. (colonias moradas) .....	66
<b>Figura 43.</b> Placa de Petri de agar nutritivo con colonias provenientes de los agares SS y cromogénico .....	67
<b>Figura 44.</b> Bote de 500 ml con agua de entrada a la depuradora (agua residual) .....	67
<b>Figura 45.</b> Anaclín con 100 ml de agua de peptona y los filtros utilizados en la filtración del agua residual .....	67
<b>Figura 46.</b> Tubos de ensayo con Müller-Kauffmann y Rappaport-Vassiliadis sembrados del agua de peptona .....	68
<b>Figura 47.</b> Placa de Petri de agar XLD con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. ....	68
<b>Figura 48.</b> Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. ....	68
<b>Figura 49.</b> Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. ....	69
<b>Figura 50.</b> Placa de Petri de agar nutritivo con colonias provenientes del agar XLD. ....	69
<b>Figura 51.</b> Bote de 500 ml con agua de la salida de la depuradora (agua depurada).....	70
<b>Figura 52.</b> Anaclín con 100 ml de agua de peptona y los filtros utilizados en la filtración del agua depurada.....	70
<b>Figura 53.</b> Tubos de ensayo con Müller-Kauffmann sembrados del agua de peptona.....	70
<b>Figura 54.</b> Placa de Petri de agar XLD con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. (colonias negras). ....	71
<b>Figura 55.</b> Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. ....	71
<b>Figura 56.</b> Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. (colonias moradas) .....	71
<b>Figura 57.</b> Placa de Petri de agar nutritivo con colonias provenientes del agar SS. ....	72
<b>Figura 58.</b> Anaclín con 100 ml de agua de peptona con los filtros utilizados en la filtración del agua de entrada a la depuradora de Tudela.....	73
<b>Figura 59.</b> Anaclín con 100 ml de agua de peptona con los filtros utilizados en la filtración del agua de salida de la depuradora de Tudela. ....	73
<b>Figura 60.</b> Tubos de ensayo con Müller-Kauffmann y Rappaport-Vassiliadis sembrados del agua de peptona. ....	74
<b>Figura 61.</b> Placa de Petri de agar XLD con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. provenientes del agua de la salida de la depuradora de Tudela. ....	74
<b>Figura 62.</b> Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. provenientes del agua de entrada a la depuradora de Tudela. ....	74
<b>Figura 63.</b> Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. provenientes del agua de salida de la depuradora de Tudela. ....	75
<b>Figura 64.</b> Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. (colonias moradas) provenientes del agua de entrada a la depuradora de Tudela. ....	75

<b>Figura 65.</b> Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. provenientes del agua de salida de la depuradora de Tudela. ....	75
<b>Figura 66.</b> Placa de Petri de agar nutritivo con colonias provenientes del agar XLD de la entrada a la depuradora de Tudela. ....	76
<b>Figura 67.</b> Placas de Petri de agar nutritivo con colonias provenientes del agar XLD de la salida de la depuradora de Tudela. ....	76
<b>Figura 68.</b> Test de aglutinación positivo para <i>Salmonella</i> spp. para el agua de entrada (1, 2 y 3) y salida (4, 5 y 6) de la depuradora de Tudela. ....	76
<b>Figura 69.</b> Anacín con 100 ml de agua de peptona con los filtros utilizados en la filtración del agua de entrada a la depuradora de Valtierra. ....	77
<b>Figura 70.</b> Anacín con 100 ml de agua de peptona con los filtros utilizados en la filtración del agua de salida de la depuradora de Valtierra. ....	77
<b>Figura 71.</b> Tubos de ensayo con Müller-Kauffmann y Rappaport-Vassiliadis sembrados del agua de peptona. ....	77
<b>Figura 72.</b> Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. provenientes del agua de entrada a la depuradora de Valtierra. ....	78
<b>Figura 73.</b> Placa de Petri con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. provenientes del agua de salida de la depuradora de Valtierra. ....	78
<b>Figura 74.</b> Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. provenientes del agua de entrada a la depuradora de Valtierra. ....	78
<b>Figura 75.</b> Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp. provenientes del agua de salida de la depuradora de Valtierra. ....	79
<b>Figura 76.</b> Placa de Petri de agar nutritivo con colonias provenientes de los agares XLD, SS y cromogénico de la entrada a la depuradora de Valtierra. ....	79
<b>Figura 77.</b> Placa de Petri de agar nutritivo con colonias provenientes de los agares XLD, SS y cromogénico de la salida de la depuradora de Valtierra. ....	79
<b>Figura 78.</b> Test de aglutinación positivo para <i>Salmonella</i> spp. para el agua de entrada (4, 5 y 6) y negativo para la salida (1, 2 y 3) de la depuradora de Valtierra. ....	80

## RESUMEN

*Salmonella* spp. es una enterobacteria de gran importancia tanto para el ser humano como para los animales, debido a los problemas y enfermedades que puede causar en el tracto gastrointestinal, siendo las más importantes y frecuentes, la gastroenteritis, las toxiinfecciones alimentarias y la fiebre tifoparatífica, según el género.

Para el análisis de *Salmonella* spp. en aguas existen diversas metodologías convencionales basadas en una serie de etapas; aunque el análisis de esta bacteria es muy limitado, ya que se encuentra en concentraciones muy bajas, difíciles de detectar y es muy sensible a cualquier cambio en las condiciones ambientales.

En el presente trabajo se pretende desarrollar de un método de análisis eficaz y fiable para el estudio de la presencia/ausencia de *Salmonella* spp., para distintos tipos de matrices acuosas (agua potable, agua superficial, agua residual y agua depurada). Al mismo tiempo se realiza una comparación de diferentes procesos de depuración de diferentes instalaciones de depuración de aguas residuales urbanas, concretamente las de Tudela y Valtierra (Navarra), que vierten sus aguas al río Ebro, para ver la resistencia de esta bacteria a diferentes tratamientos de depuración.

Para el estudio se han realizado varios ensayos microbiológicos en el laboratorio del grupo de investigación de Calidad y Tratamiento de Aguas del área de Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza, en el que se ha desarrollado el método más adecuado para la detección de *Salmonella* spp. en las matrices acuosas anteriormente citadas. El método elegido consiste en varias fases o etapas: filtración de la muestra, preenriquecimiento en agua de peptona tamponada, enriquecimiento en caldos de cultivo selectivos, siembra y aislamiento en agares selectivos, siembra en agar no selectivo, y confirmación mediante test de aglutinación.

Los resultados obtenidos con el método elegido han resultado positivos, detectándose la presencia de *Salmonella* spp. para los tipos de matriz acuosa analizada, excepto para el agua potable, siendo los medios de cultivo más eficaces el XLD para los ensayos realizados con cepa de *Salmonella* spp., y los agares SS y cromogénico para las muestras de agua superficial, residual y depurada.

En cuanto a las diferencias entre los tratamientos aplicados a las aguas residuales en las depuradoras, en el caso de la instalación de Tudela, se trata de una depuradora con las siguientes fases: pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento de fangos. Los resultados para los análisis realizados en esta instalación muestran presencia de *Salmonella* spp. tanto en el agua de entrada como en la de salida

de la depuradora. En cambio, en el caso de la instalación de Valtierra, además de las fases que posee la depuradora de Tudela, ésta cuenta con un tratamiento terciario mediante lagunas. En este caso solamente se detecta *Salmonella* spp. en el agua de entrada. Con estos resultados podemos llegar a la conclusión de que estas diferencias en los resultados pueden deberse al tratamiento terciario existente en la depuradora de Valtierra, que resulta eficaz para la reducción de la bacteria objeto de estudio.

**Palabras clave:** *Salmonella* spp., depuradora, metodología analítica, medios de cultivo, microbiología de aguas.

## ABSTRACT

*Salmonella* spp. is an enterobacteriaceae of great importance to both mankind and animals, because of the troubles and diseases that it can cause to the digestive tract, being stomach flu, food poisoning and paratyphoid fever the most important and frequent ones, depending on the gender.

To analyze *Salmonella* spp. in water, there are different conventional methods based on a series of stages; although the analysis of this bacterium is very limited, given that it finds itself in very low concentrations, too hard to detect and really sensible to any change of environmental conditions.

This essay is intended to develop a more efficient and trustworthy analysis method to study the presence/absence of *Salmonella* spp., for different watery matrices (drinking water, surface water, waste water, purified water). At the same time, we compare different purification processes in different urban waste water purification plants, Tudela and Valtierra (Navarra) to be more precise, that pour their water into Ebro River, to check the bacterium's resistance against different purification treatments.

For this study, we have made several microbiological essays at the Water Quality and Treatment Laboratory of the Zaragoza University Enviroment Technologies area, where they have developed the most adequate method to detect *Salmonella* spp. in the aforementioned watery matrices. The chosen method consists of several phases or stages: sample filtration, pre-enrichment of the sample, buffer solution pre-enrichment, selective broth enrichment, spreading and streaking isolated colonies over selective agar, spreading over non-selective agar, and confirmation through agglutination test.

The obtained results with the chosen method have been positive, detecting the presence of *Salmonella* spp. in every watery matrix except drinking water, being XLD agar the most efficient to detect the *Salmonella* spp. strain and SS agar and chromogenic for surface, waste and purified water.

As for the differences between the treatments used on waste water in purifier plants, Tudela's plant has the following stages: pre-treatment, primary treatment, secondary treatment and mud treatment. The accomplished analysis results in this plant show the presence of *Salmonella* spp. in both entrance water and the exit of the purifier plant. On the other hand, in Valtierra's plant, besides the stages that Tudela's plant has, this one also has a tertiary treatment through aerated lagoons. In this case we only detected *Salmonella* spp. in the entrance water. With these results we can conclude that

the differences between results might exist because of Valtierra's plant tertiary treatment, which results more efficient in reducing the bacterium we are studying.

**Keywords:** *Salmonella* spp., purifier plant, analytic methodology, broth, water microbiology.

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Entre los factores contaminantes del medio ambiente que afectan sobre todo a las aguas superficiales se encuentra la contaminación bacteriana. La *Salmonella* spp. es uno de los microorganismos patógenos más extendidos y con mayor afección en la población.

Las bacterias del género *Salmonella* están ampliamente distribuidas en la naturaleza, y se encuentran como comensales y patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en sus hospedadores, considerándose como la principal enterobacteria de importancia en salud pública (Selbitz et al. 1995). Por ello es necesaria la obtención de un protocolo de análisis de presencia de esta bacteria en aguas superficiales y de consumo.

En las aguas fecales se encuentra *Salmonella* spp. de manera bastante sistemática, por tanto, es muy probable su presencia en los medios naturales que reciben aguas residuales.

Los métodos de análisis microbiológicos existentes para la detección de *Salmonella* spp. no van encaminados a la cuantificación de esta bacteria, se consideran técnicas cuyo resultado se expresa cualitativamente, determinando su presencia o ausencia en diferentes matrices para un volumen de muestra. En general, la detección se basa en el empleo de medios de cultivo selectivos y posterior caracterización de las colonias mediante pruebas bioquímicas y/o serológicas.

Para el análisis de *Salmonella* spp. existen distintas metodologías, como las normas ISO 19250:2010, ISO 6579:2002 e ISO 6579:2009, con diferentes etapas, entre las que se encuentran la filtración de la muestra, un preenriquecimiento, enriquecimiento, siembra en agar selectivo y no selectivo y confirmación mediante test de aglutinación. El análisis de *Salmonella* spp. mediante las metodologías existentes suele ser limitado ya que esta bacteria es muy sensible a los cambios y condiciones ambientales, y se encuentra en concentraciones muy bajas, a menudo difíciles de detectar, en ocasiones de forma dañada.

Por este motivo, este TFG tiene como **objetivos generales** el desarrollar un método sencillo y fiable para el análisis en laboratorio de *Salmonella* spp. en diferentes matrices acuosas, así como comparar el efecto que tienen distintos tratamientos de depuración de aguas residuales urbanas en la resistencia de *Salmonella* spp. en las aguas.

Para desarrollar estos objetivos generales es necesario llevar a cabo los siguientes **objetivos específicos**:

- Establecer un método de filtración adecuado para cada tipo de matriz acuosa (agua superficial, agua residual, agua depurada y agua potable).
- Comparar y seleccionar los medios de cultivo adecuados para la detección de la bacteria objeto de estudio en las diferentes matrices acuosas.
- Establecer una secuencia de etapas adecuada para la obtención de un resultado fiable en la etapa final de la metodología analítica, que es el test de aglutinación.
- Estudiar la resistencia de la *Salmonella* spp. tras la depuración de aguas residuales urbanas con diferentes tratamientos en instalaciones reales.

Para llevar a cabo estos objetivos, toda la experimentación es realizada en el laboratorio de microbiología del grupo de investigación de Calidad y Tratamiento de Aguas del área de Tecnologías del Medio Ambiente (perteneciente al Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón), en el campus Río Ebro de la Universidad de Zaragoza.

Las muestras analizadas de aguas residuales y depuradas provienen de la entrada y la salida de las depuradoras de Tudela y Valtierra-Arguedas, Navarra, que vierten al río Ebro, para lo que se cuenta con la colaboración de la empresa Navarra de Infraestructuras Locales, S.A. (NILSA), una sociedad pública del Gobierno de Navarra, perteneciente a la Corporación Pública Empresarial de Navarra (CPEN), cuya misión es la depuración de las aguas residuales, la gestión de los residuos urbanos y la colaboración en el abastecimiento.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Salmonella* spp. Definición, nomenclatura y características.

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos Gram negativos de 0.7-1.5 x 2-5  $\mu\text{m}$ , anaerobios facultativos, no formadores de esporas, generalmente móviles por flagelos perítricos como se muestra en la figura 1. Las colonias generalmente tienen de 2-4 mm de diámetro (Bergery, 2010).



Figura 1: *Salmonella* Typhi.  
Fuente: CDC, 2014.

La mayoría de los serotipos de *Salmonella* crecen en un rango de temperatura que va desde 5°C a 47°C, con una temperatura óptima de 35°C-37°C. El pH de crecimiento oscila entre 4-9 con un óptimo entre 6.5 y 7.5. Se caracterizan por ser de amplia distribución, altamente patógenos y de difícil aislamiento, con más de 2500 serotipos identificados en el actual sistema de Kauffmann-White (González et al., 2014).

El primer aislamiento de microorganismos del grupo *Salmonella* fue realizado en 1884 por Gaffky (1850- 1918) y en el año 1886 el género *Salmonella* fue descrito por el epidemiólogo y patólogo estadounidense Theobald Smith (1859-1934), logrando aislar la bacteria en cerdos con cólera, aunque el organismo recibe su nombre en honor a su jefe, el norteamericano y patólogo veterinario Daniel Elmer Salmon (1850-1914), administrador del programa de investigación del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Fresquet, 2002).

A lo largo de la historia, el género *Salmonella* ha sido clasificado de diversas maneras debido a su compleja nomenclatura y taxonomía. Ante esta controversia, científicos de todo el mundo han ido utilizando diferentes. En 1930, Kauffman y White establecieron una clasificación serológica para las cepas aisladas, basada en los antígenos flagelares H, que permiten el movimiento y antígenos somáticos O, sin movimiento. Desde entonces la taxonomía del género *Salmonella* ha ido variando a lo largo del tiempo. Las primeras identificaciones de cepas de este género fueron clasificadas en tres especies: *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella*

*enteritidis*, siendo la última especie la que contaba con la mayoría de los serotipos. Posteriormente, otra nomenclatura utilizada reconocía la existencia de dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella choleraesuis*, donde esta última se dividía en 6 subespecies, pero al haber un serotipo *choleraesuis* se decidió cambiar el nombre de la especie por el de *Salmonella enterica* (Flores, 2003).

Los métodos moleculares basados en la hibridación demostraron que el género *Salmonella* estaba constituido por dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Esta última está compuesta por 6 subespecies: *Salmonella enterica* subesp. *enterica*, *Salmonella enterica* subesp. *salamae*, *Salmonella enterica* subesp. *arizonae*, *Salmonella enterica* subesp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* subesp. *houtenae* y *Salmonella enterica* subesp. *indica* (Calvete et al., 2015).

Este sistema de clasificación es el utilizado por la Organización mundial de la Salud (OMS) y el Centro para el Control de Enfermedades (CDC).

Dado que las serovariedades no tienen nivel taxonómico de especie, sus nombres, escapan al dominio del “Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana”, por ello no deben escribirse en cursiva y la letra inicial va con mayúscula, de la siguiente manera: *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, o *S. enterica* serovar Typhimurium o *S. ser. Typhimurium* o *S. Typhimurium* (Lopardo et al., 2016).

Con importancia clínico-epidemiológica, las más de 2500 serovariedades de *Salmonella* pueden agruparse en tres divisiones ecológicas (Melara Cruz y Salazar Artigas, 2012):

- *Salmonella* spp. adaptadas a vivir en el ser humano como *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* y *C*.
- *Salmonella* spp. adaptadas a hospedadores no humanos, que circunstancialmente pueden producir infección en el hombre, como *S. dublin* y *S. choleraesuis*.
- *Salmonella* spp. sin preferencia por ningún huésped, incluye 1800 serovariedades, y son las principales causantes de la salmonelosis.

Algunas de las propiedades bioquímicas de la *Salmonella* spp. son las siguientes (Tabla 1): Fermentan glucosa con producción de ácido y gas (excepto *S. Typhi*); también fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-mannosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa y D-dulcita; son oxidasa negativo, catalasa positivo, indol y Voges-Proskauer (VP) negativo, rojo de metilo y citrato de Simmons positivo, urea negativo y producen H.S.

Tabla 1: Resultados de las pruebas bioquímicas para *Salmonella* spp.  
 Fuente: Elaboración propia.

Pruebas Bioquímicas	<i>Salmonella</i> spp.
Glucosa	+
Lactosa	-
Catalasa	+
Oxidasa	-
Sacarosa	-
$\beta$ -galactosidasa	-
Urea	-
Indol	-
Voges-Proskauer	-
H <sub>2</sub> S	+
Lisina-descarboxilasa	+
Rojo de metilo	+
Citrato y TSI	+
Xilosa	-

## 2.2 *Salmonella* spp. en el medio ambiente y riesgo asociado.

Es un agente zoonótico de distribución universal reconocido como uno de los principales responsables de casos y brotes de infecciones alimentarias debido, entre otras razones, a las prácticas intensivas en producción animal (incluida la acuicultura) y a la globalización del comercio de alimentos (D'Aoust, 1994).

El microorganismo es transmitido por carnes, huevos, vegetales, y en el ambiente, pudiendo estar presente en la materia fecal excretada por animales infectados, que contaminan agua y suelos (Hernández et al., 2011).

La salmonelosis es una infección bacteriana que generalmente afecta el tracto intestinal y ocasionalmente origina septicemia, infecciones localizadas y secuelas. Constituye una de las causas más comunes de gastroenteritis en el hombre y produce cientos de casos cada año (Comité científico de seguridad agroalimentaria de la CAE, 2008).

La mayoría de los casos ocurren durante los meses del verano y en ocasiones pueden presentarse brotes epidémicos, especialmente en escuelas, guarderías, restaurantes y residencias de ancianos. El período de incubación es por lo general de 8 a 72 horas, a veces inferior (6 horas) y otras superior (hasta 5 días), dependiendo de la cantidad de células ingeridas, de la virulencia de la cepa, de la edad del individuo, y de su estado inmunológico. Afecta a todos los grupos de edad, pero con mayor incidencia a mayores de 60 años y menores de 5, que son los grupos más vulnerables. Asimismo, son especialmente sensibles los enfermos de cáncer, diabéticos, portadores del VIH y otros grupos de riesgo. El cuadro clínico consiste en: cefalea, náuseas, vómitos, diarrea (a

veces sanguinolenta y con mucus), dolor abdominal, escalofríos y fiebre. El dolor abdominal es severo y la deshidratación no es infrecuente en niños y ancianos. La diarrea dura entre dos y cinco días y el proceso suele autolimitarse aunque puede derivar en septicemia y secuelas (Comité científico de seguridad agroalimentaria de la CAE, 2008).

Un estudio llevado a cabo en los Estados Unidos de América (Hope et al., 2002) ha estimado que, en ese país, se producen al año 661633 casos de salmonelosis. De ellos, el 94% se recupera sin atención médica, el 5% sí la requiere, el 0,5 % precisa hospitalización y el 0,05% muere.

Estos microorganismos colonizan principalmente el intestino, si bien algunos pueden hallarse en el torrente circulatorio y los órganos internos de los invertebrados. Puede aislarse de agua de bebida no tratada, aguas superficiales, aguas costeras y alimentos. La mayor parte de las salmonelas tienen un amplio rango de hospedadores (Comité científico de seguridad agroalimentaria de la CAE, 2008).

La *Salmonella* spp. es una bacteria muy sensible a los cambios. Algunos de los factores ambientales que afectan a su crecimiento y supervivencia son (Comité científico de seguridad agroalimentaria de la CAE, 2008):

- Temperatura: No se multiplican a temperaturas inferiores a 7°C, reduciéndose significativamente el crecimiento por debajo de los 15°C. La temperatura máxima es 49,5°C y la óptima está entre 35–37°C. Existen datos de crecimiento a temperaturas por debajo de 7°C, en casos de algún serotipo.

Prevalece largos periodos de tiempo en alimentos refrigerados y congelados. Por ejemplo, se ha comprobado su viabilidad durante más de 10 semanas en mantequilla a temperaturas de entre –23°C y 25°C. Puede sobrevivir 28 días en vegetales refrigerados. Como todas las bacterias Gram negativas, es sensible al calor, aunque su termorresistencia aumenta al disminuir la actividad de agua (aw). También se ha comprobado que ésta es mayor cuando se expone a tratamientos térmicos sub-letales.

- pH: Se considera que el valor mínimo para su presencia es de 3,9, siendo óptimo un valor entre 6,5–7,5 y el máximo de 9,5. Deben considerarse otros factores que afectan al como la temperatura, el tipo de ácido utilizado, la presencia de nitritos y otros conservantes. Hay que destacar también la capacidad de adaptación de algunas cepas a los medios ácidos.
- Concentración de oxígeno, N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>: Puede crecer tanto en ambientes aerobios (con presencia de oxígeno) como anaerobios (ausencia de oxígeno). Por otro

lado, el crecimiento en presencia de  $N_2$  es escasamente inferior al observado en presencia de aire, y crece a 8-11°C en presencia de un 20–50% de  $CO_2$ .

- Actividad de agua: Los alimentos con una aw <0,93 no permiten el crecimiento de *Salmonella*, aunque puede sobrevivir largos periodos de tiempo en condiciones de baja aw. Su presencia se inhibe por concentraciones de 3-4% de NaCl, pero la tolerancia a la sal aumenta en el rango 10-30°C.

La supervivencia en medios con baja aw es una característica de estos microorganismos. Por ejemplo, pueden sobrevivir en chocolate (aw 0,3 – 0,5) durante meses. En estas condiciones, puede aumentar considerablemente su resistencia al calor (Comité científico de seguridad agroalimentaria de la CAE, 2008).

### 2.3 *Salmonella* spp. en aguas residuales y depuradas.

Una herramienta básica de protección medioambiental es la adecuada gestión de los residuos y vertidos. Un ejemplo de esta última es el tratamiento de las aguas residuales urbanas o industriales. Los contaminantes que transportan las aguas residuales pueden ser de tipo químico (iones metálicos, compuestos de azufre, compuestos nitrogenados, aldehídos, acetonas y ácidos) y de tipo biológico (microorganismos), y hallarse en forma sólida, líquida o gaseosa. La adecuada gestión de las instalaciones de recogida y tratamiento de aguas residuales, además de la protección del medio ambiente, ha desarrollado una creciente preocupación por la protección de los trabajadores de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) frente a los riesgos de exposición a agentes biológicos (Constans et al., 1998).

La Directiva 91/271/CEE, sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas, establece límites de vertido para la reducción de la contaminación presente relativa a la materia orgánica biodegradable, sólidos y nutrientes en las EDARs pero no para la eliminación de sustancias peligrosas y microorganismos. Estos contaminantes pueden introducirse en el medio ambiente a través del efluente de las plantas de tratamiento, contaminando las aguas en los cauces receptores, en los que deben cumplirse las normas de calidad ambiental establecidas (Real Decreto 817/2015, RD 1341/2007). Por otro lado, esos contaminantes también pueden limitar la reutilización de las aguas depuradas, que deben cumplir con lo establecido en el RD 1620/2007 (López et al., 2016).

Una estación depuradora comprende varias etapas o procesos colocados en serie. Paralelamente al tratamiento de depuración, se controlan la calidad de los efluentes de la EDAR, así como los parámetros de funcionamiento (Constans et al., 1998).

En general la depuración de las aguas residuales consta de las siguientes etapas o procesos (Constans et al., 1998):

- Llegada del influente: canal de llegada y recogida de las aguas residuales a la estación depuradora y bombeo.
- Pretratamiento: consiste en una sucesión de etapas físicas y mecánicas destinadas a separar las aguas de las materias voluminosas; después de esta fase sólo permanecen las partículas con un diámetro inferior a 200 mm. También tiene lugar la separación de grasas.
- Decantación primaria: Afecta a las partículas de diámetro superior a 100 mm. Las materias decantadas obtenidas por separación del efluente constituyen los lodos primarios. También se lleva a cabo la eliminación de la polución coloidal y del fósforo.
- Tratamiento biológico: Consiste básicamente en una degradación de los compuestos orgánicos presentes en el efluente por microorganismos que se alimentan de la materia orgánica disuelta (lodos activados, lecho bacteriano, biofiltro). En algunos casos se incluyen dispositivos de aireación, que permiten a las bacterias aerobias utilizadas incrementar su metabolismo y, en consecuencia, su acción.
- Decantación secundaria: Permite la separación de los lodos secundarios formados tras el tratamiento biológico.
- Tratamiento de lodos: El tratamiento de lodos es una instalación fundamental de la estación depuradora. Su objetivo es reducir la masa orgánica y el volumen de los lodos primarios y secundarios recogidos tras las dos etapas de decantación. En general comprende dos fases: en primer lugar, se procede a reducir la masa orgánica mediante estabilización por digestión aerobia o anaerobia, pasteurización o estabilización química; a continuación, se reduce el volumen de los lodos: por prensado, por deshidratación, o por secado térmico.

Las aguas residuales constituyen no sólo un vector para numerosos microorganismos, sino que además pueden ser un medio de proliferación para muchos de ellos. El riesgo de contaminación biológica dependerá de que el microorganismo esté presente en las aguas residuales en cantidades significativas, de que sobreviva dentro

del entorno conservando su poder infeccioso, así como de los diferentes grados de exposición (Constans et al., 1998).

En la tabla 2 se muestran las bacterias patógenas más comunes que se encuentran en aguas residuales.

Tabla 2: Bacterias habituales en aguas residuales.

Fuente: Elaboración propia.

BACTERIAS	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Leptospira interrogans</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Legionella</i> spp.
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Shigella</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Clostridium tetani</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>Actinomyces</i>	

La Directiva 91/271/CEE no establece criterios de calidad en relación a la presencia de *Salmonella* spp. en cuanto a la calidad de las aguas, ni de ningún organismo. Sin embargo, el RD 1620/2007 sobre la reutilización de las aguas depuradas sí que establece unos límites para este patógeno en función del uso.

En concreto en el Real Decreto se contemplan 5 usos diferentes para la reutilización del agua (urbanos, agrícolas, industriales, recreativos y ambientales), siendo necesario determinar *Salmonella* spp. para algunos de ellos, como es el caso del uso urbano residencial y servicios, o para uso ambiental como el mantenimiento de humedales o caudales mínimos entre otros (Morén, 2010).

## 2.4 Metodologías de análisis de *Salmonella* spp.

El análisis de *Salmonella* spp. mediante las metodologías existentes es limitado, ya que esta bacteria es muy sensible a las condiciones ambientales y su detección puede verse afectada. Para su análisis existen distintas metodologías convencionales, como las normas ISO 19250:2010, ISO 6579:2002 e ISO 6579:2009, con diferentes etapas, entre las que se encuentran la filtración de la muestra, un preenriquecimiento, un enriquecimiento, siembra en agar selectivo y no selectivo y confirmación mediante test de aglutinación.

En concreto las etapas consisten en:

- Filtración de la muestra: Se realiza para concentrar los microorganismos presentes, ya que la *Salmonella* spp. se encuentra en concentraciones muy bajas y es a menudo difícil de detectar. La filtración se lleva a cabo mediante filtros de

membrana de nitrocelulosa de 0,45µm de diámetro de poro, ya que ese tamaño de poro no permite el paso de las bacterias (Forbes et al, 1998; Farmer, 2003).

- Preenriquecimiento: Tiene como finalidad la revitalización o reactivación de los microorganismos que se hayan visto afectados por las diferentes condiciones de tratamientos o condiciones ambientales, permitiendo que las células bacterianas comiencen el proceso de multiplicación normal sin estar expuestas a sustancias inhibidoras o selectivas que pueden perjudicar el crecimiento de estas bacterias "debilitadas". Se realiza en caldo peptonado bufferado o lactosado al 0,2%, para incrementar la recuperación de especies de *Salmonella* deterioradas por factores como técnicas de elaboración, preservación, presión osmótica alta, cambios de pH, etc. (Luna, 1991; Hurtado, 2001)
- Enriquecimiento: Se realiza en caldos de enriquecimiento selectivo, los cuales estimulan el crecimiento de formas compatibles con *Salmonella* spp. e inhiben el desarrollo de bacterias intestinales y coliformes. Entre los caldos mayormente usados para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* spp. se encuentran: Caldo selenito, caldo Rappaport-Vassiliadis y caldo tetratiónato (Müller-Kauffmann) (Forbes et al, 1998; Farmer, 2003).
- Aislamiento mediante medios de cultivo selectivos y diferenciales: Los medios selectivos son aquellos que permiten seleccionar ciertos microorganismos deteniendo el desarrollo de otros; esto se logra con el agregado de sustancias inhibidoras como antibióticos, ciertos colorantes, sales biliares, etc. Algunos de estos medios selectivos en el análisis de *Salmonella* spp. son el agar eosina azul de metíleno (EMB), agar MacConkey (McK), agar desoxicolato y agar cromogénico.

Los medios diferenciales son aquellos que permiten diferenciar bioquímicamente las bacterias por su actividad metabólica. Poseen un sustrato sobre el cual actúa o no la bacteria, y esa actividad se revela por variación del pH del medio o por alguna actividad enzimática que modifica su aspecto. Permiten la observación de colonias características propias de la bacteria (Stanchi, 2007). Los medios diferenciales más utilizados son: Agar Hektoen entérico, agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar *Salmonella-Sigella* (SS), agar verde brillante, agar bismuto sulfito (Forbes et al, 1998; Farmer, 2003). Como se puede observar en la figura 2, las colonias típicas de *Salmonella* spp. son rosadas, pudiendo presentar o no un centro negro debido a la producción de ácido sulfídrico ( $H_2S$ ) en agar

XLD y verdosas o verde azuladas con o sin centro negro en el agar Hektoen. En algunos casos son completamente negras.

- Confirmación: En la identificación final de *Salmonella* spp. las colonias sospechosas observadas en el medio de cultivo diferencial se someten a pruebas de reacción bioquímica o de aglutinación con el fin de confirmar la presencia de la bacteria. En general para la confirmación de *Salmonella* spp. entre las pruebas bioquímicas se incluyen la de producción de indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, Citrato, TSI (agar hierro triple azúcar), hidrólisis de la urea, decarboxilación de lisina, arginina y ornitina, hidrólisis de gelatina, fermentación de glucosa con producción de ácido y gas, fermentación de sacarosa, lactosa, manitol, dulcitol, salicina, adonitol, inositol, sorbitol, arabinosa, rafinosa, maltosa, xilosa, trehalosa, celobiosa, eritritol, hidrólisis de esculina, fermentación de melibiosa, de arabinol, de glicerol, utilización de acetato, lipasa, ADNasa, transformación nitrato-nitrito, oxidasa y fermentación de manosa (Forbes et al, 1998; Farmer, 2003). Simultáneamente, se puede llevar a cabo en medios como el agar triple hierro (TSI) y el agar lisina hierro (LIA). Pruebas como urea, de producción de indol, crecimiento en caldo KCN, fermentación de dulcitol o la utilización del malonato de sodio también sirven como pruebas bioquímicas complementarias (González et al., 2014). En la tabla 3 se muestran los resultados de *Salmonella* spp. que se obtienen en los diferentes medios.

Una alternativa a las pruebas bioquímicas son los test de confirmación. Tienen la ventaja de ser más rápidos. La prueba permite confirmar la presencia de *Salmonella* spp. Se considera resultado positivo si se da aglutinación de las partículas de látex en un máximo de 2 minutos y la no aglutinación en el Látex Control, lo que indica la presencia de *Salmonella* spp.

También existen otras metodologías que necesitan mucho más tiempo para la obtención de resultados, como son las técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Rodríguez y Barrera, 2004).

La PCR es una reacción enzimática in vitro que amplifica miles de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para que transcurra esto, la reacción utiliza la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN de las células (Tamay de Dios et al., 2013).

Esta enzima trabaja a altas temperaturas y se la conoce como taq polimerasa. Esta técnica simula lo que pasaría en la célula cuando se sintetiza el ADN, es por eso

que suele mezclarse en el tubo la enzima, el ADN blanco del organismo que se quiere sintetizar, los oligonucleótidos (primers o cebadores), dinucleótidos y a su vez mantener las condiciones necesarias para la taq polimerasa (pH, MgCl<sub>2</sub>, KCl) (Espinosa, 2007).

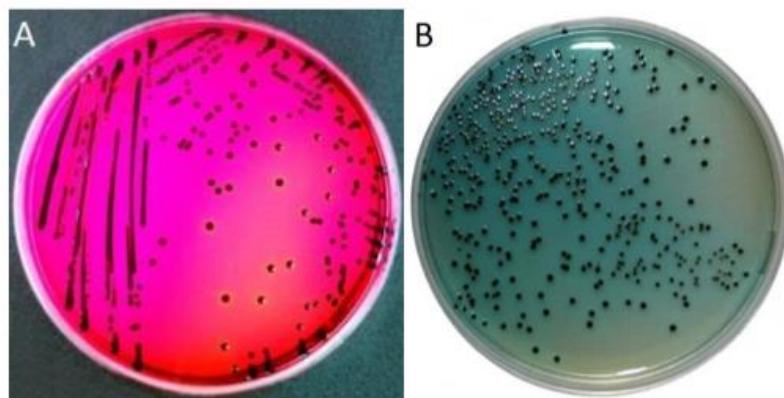


Figura 2: Colonias típicas de *Salmonella*.

A) Aislamiento en agar XLD B) Aislamiento en agar Hektoen.

Fuente: A) Department of Veterinary Disease Biology, University of Copenhagen, 2011 y B) EO Labs, 2015.

Tabla 3: Resultados de *Salmonella* spp. en diferentes medios y caldos de cultivo para su aislamiento y confirmación mediante prueba bioquímicas.

Fuente: Elaboración propia.

Medios	Reacción de <i>Salmonella</i> spp.
<b>Agua de peptona</b>	Turbidez y gas
<b>Rappaport Vassiliadis</b>	Turbidez y cambio de color a blanquecino
<b>Müller Kauffmann</b>	Cambio de color a blanquecino
<b>Agar XLD</b>	Colonias rojas con centro negro
<b>Agar SS</b>	Colonias incoloras con centro negro (ojo de pez)
<b>Agar cromogénico</b>	Colonias púrpuras
<b>Agar MacConkey</b>	Colonias incoloras, transparentes
<b>Agar Hektoen</b>	Colonias verdeazuladas con o sin centro negro
<b>Agar verde brillante</b>	Colonias rojas, rosadas o incoloras con halo rojo
<b>Agar nutritivo</b>	Colonias blancas
<b>Kligler</b>	Fondo amarillo, slant rojo
<b>Lisina-descarboxilasa</b>	Púrpura
<b>Hierro lisina (LIA)</b>	Fondo rojo, slant rojo
<b>Clark y Lubs rojo de metilo</b>	Rojo
<b>Voges Proskauer</b>	Amarillo
<b>Citrato de Simmons</b>	Cambio de color a azul
<b>TSI</b>	Fondo amarillo, slant rojo, formación de gas
<b>Indol</b>	Anillo amarillo pardo
<b>SIM</b>	Púrpura con turbidez

### 3. EVALUACIÓN DE METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE *Salmonella spp.*

#### 3.1 Materiales y métodos.

##### 3.1.1. Metodología básica y elección de variables para el desarrollo del método de análisis de *Salmonella spp.*

Para el análisis de *Salmonella spp.* en aguas existen diferentes metodologías estándar, como la norma ISO 19250:2010, según la cual se debe realizar un preenriquecimiento en agua de peptona tamponada de la muestra a analizar, seguido de un enriquecimiento en un agar selectivo para *Salmonella spp.*, una siembra en placa en agar selectivo, seguido de una siembra de las colonias en agar no selectivo (agar nutritivo), para finalmente realizar una identificación mediante diferentes pruebas bioquímicas.

Otro método, descrito en la norma ISO 6579:2002, consiste en realizar un preenriquecimiento en agua de peptona tamponada, un enriquecimiento en diferentes medios de cultivo selectivos (Rappaport-Vassiliadis y Müller-Kauffmann) y una siembra en agares selectivos (XLD y cromogénico) para *Salmonella spp.*

Finalmente, según la norma ISO 6579:2009, se debe realizar un enriquecimiento en un medio selectivo, seguido de una siembra en agar selectivo y finalmente la realización de un test de aglutinación para su confirmación.

La elección de las etapas para llevar a cabo el análisis de *Salmonella spp.* de este TFG se basa en la metodología anteriormente descrita. Por ello las etapas a considerar son:

- Filtración de la muestra.
- Preenriquecimiento en agua de peptona tamponada.
- Enriquecimiento en diferentes medios de cultivo selectivos: Müller-Kauffmann y Rappaport-Vassiliadis.
- Siembra en agares selectivos: agares XLD, SS y cromogénico.
- Siembra en agar no selectivo: agar nutritivo.
- Realización de un test de aglutinación para su comprobación.

El procedimiento experimental para llevar a cabo cada etapa se describe en los apartados 3.1.4 y 3.1.5.

### 3.1.2. Inventario y preparación de materiales y reactivos.

Los materiales necesarios para las diferentes etapas del procedimiento experimental para el análisis de *Salmonella* spp. son los mostrados en la tabla 4.

Tabla 4: Materiales necesarios para el análisis de *Salmonella* spp.

Fuente: Elaboración propia.

MATERIALES	
Rampa de filtración	Campana de flujo laminar
Embudos	Guantes
Anaclines	Gradilla
Filtros de 0,45 µm	Frascos de vidrio de 500 y 1000 ml
Kitasatos	Imanes
Vasos de precipitados	Placa imantada
Probetas	Placas de Petri
Pinzas	Placas calentadoras
Mechero Bunsen	Micropipetas
Erlenmeyers	Puntas
Estufas de incubación	Tubos de ensayo
Autoclave	

Tabla 5: Reactivos necesarios para el análisis de *Salmonella* spp.

Fuente: Elaboración propia.

REACTIVOS	
Agua destilada	Agar XLD
Agua de peptona tamponada	Agar cromogénico
Medio de cultivo Müller-Kuffmann	Agar nutritivo
Medio de cultivo Rappaport Vassiliadis	Salmonella latex test
Agar SS	

Los materiales que se utilizan en cada etapa de la metodología vienen señalados en la tabla 6.

Tabla 6: Relación entre etapas y materiales y reactivos.  
Fuente: Elaboración propia.

MATERIALES Y REACTIVOS	ETAPAS					
	Preparación de medios de cultivo	Filtración y preenriquecimiento	Enriquecimiento	Siembra en agares selectivos	Siembra en agar no selectivo	Confirmación
Rampa de filtración		X				
Embudos		X				
Anaclines		X				
Filtros		X				
Kitasatos		X				
Vasos de precipitados		X				
Probetas	X	X				
Pinzas		X				
Mejero Bunsen	X	X	X	X	X	X
Agua de peptona tamponada	X	X				
Estufas		X	X	X	X	
Micropipetas	X		X			
Puntas de pipeta	X		X			
Tubos de ensayo			X			
Gradilla			X			
Autoclave	X	X	X	X	X	X
Campana de flujo laminar		X	X	X	X	X
Guantes	X	X	X	X	X	X
Frascos de vidrio de 500 y 1000 ml	X					
Erlenmeyers	X					
Placas calentadoras	X					
Imanes	X	X				
Placa magnética agitadora		X				
Placas de Petri	X			X	X	X
Agua destilada	X					
Medio de cultivo Müller-Kuffmann	X		X			
Medio de cultivo Rappaport Vassiliadis	X		X			
Agar SS	X			X		
Agar XLD	X			X		
Agar cromogénico	X			X		
Agar nutritivo	X				X	
Salmonella Latex test						X

El procedimiento para la preparación de los medios de cultivo se describe en el apartado 3.1.3.

Algunos materiales son autoclavados previamente para que sean estériles. Estos materiales son: material de vidrio (probetas, kitasatos, frascos, erlenmeyers, vasos de precipitados y tubos de ensayo), filtros, agua de peptona tamponada, embudos, imanes. Por otro lado, todo el material utilizado y que haya estado en contacto con la muestra analizada (“sucio”) y que pueda contener alguna bacteria (placas de Petri sembradas, tubos de ensayo sembrados, anaclines sembrados, material de vidrio, etc) se autoclava también antes de fregar el material o tirarlo a la basura para eliminar la contaminación presente. La figura 3 muestra una imagen del autoclave utilizado.



Figura 3: Autoclave

### 3.1.3. Preparación de medios de cultivo.

A continuación, se describe la preparación de los medios de cultivo utilizados para el análisis de *Salmonella* spp.:

- Agua de Peptona tamponada → Para su preparación se disuelven 20 gramos de peptona (marca Scharlau) en polvo en 1 L de agua destilada en un frasco. Se agita hasta su disolución y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se guarda en la nevera hasta su uso.
- Agar Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) → Se disuelven 56,68 gramos de agar (marca Scharlau) en polvo en 1 L de agua destilada en un matraz erlenmeyer. Se calienta con agitación constante hasta su disolución completa. Se vierte inmediatamente en placas de Petri en ambiente estéril, y una vez solidificadas se guardan en la nevera hasta su uso.
- Agar Salmonella-Shigella (SS) → Se disuelven 60,1 gramos de agar (marca Scharlau) en polvo en 1 L de agua destilada en un matraz erlenmeyer. Se calienta

hasta ebullición con agitación constante hasta su disolución. Se enfría hasta los 50°C en baño maría, se vierte en placas de Petri en ambiente estéril, y se guardan en la nevera hasta su uso.

- Agar Cromogénico Salmonella Plus base → Se disuelven 32,8 gramos de agar (marca CROMagar) en polvo en 1 L de agua destilada y se añaden 6 ml/L de suplemento (CHROMagar Salmonella Plus Supplement) en un matraz erlenmeyer. Se calienta con agitación constante hasta su total disolución, se vierte en placas de Petri en ambiente estéril, y se guardan en la nevera hasta su uso.
- Agar nutritivo → Se disuelve 28 gramos del agar (Scharlau) en polvo en 1 L de agua destilada en un frasco. Se calienta hasta ebullición con agitación constante hasta su total disolución. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se enfría en baño maría, se vierte en placas de Petri y se guardan en la nevera hasta su uso.
- Agar Müller-Kauffmann → Se disuelven 106,8 g de agar (Scharlau) en polvo en 1 L de agua destilada. Se calienta hasta ebullición. Se esteriliza a 121°C, 20 minutos (o mejor mantener a 100°C durante 2 minutos y no autoclavar). Se enfría y se guarda en la nevera hasta su uso.
- Rappaport-Vassiliadis → El medio de cultivo se encuentra ya preparado de forma comercial en tubos de ensayo con 9 ml (marca Scharlau).

### 3.1.4. Ensayo con cepa de *Salmonella* spp.

Se realizan ensayos para la determinación de *Salmonella* spp. mediante la metodología descrita en el apartado 3.1.1. a partir de cepas de *Salmonella* spp. certificadas y que pertenecen al laboratorio del equipo de Calidad y Tratamiento de Aguas. Los resultados obtenidos en cada ensayo se contrastan con los obtenidos en un laboratorio externo acreditado para esas muestras.

La muestra inicial se prepara a partir de 100 µl del eppendorf que contiene la cepa. Se trabajará siempre en la campana de flujo laminar y al lado de una llama de mechero para evitar cualquier tipo de contaminación. Este ensayo se llevó a cabo por duplicado para la comprobación de la eficacia del método de análisis elegido.

## **1- Preenriquecimiento**

Se toman 100  $\mu$ l de la cepa de *Salmonella* spp. con ayuda de una micropipeta estéril y se disuelve en tubos de ensayo con 10 ml de agua de peptona tamponada. Se agitan para homogeneizar y se incuban en la estufa a 37°C durante 24 horas.

## **2- Enriquecimiento selectivo**

Pasadas las 24 horas, se siembra 1 ml de caldo de preenriquecimiento en tubos de ensayo con 9 ml de medio selectivo Müller-Kauffmann con una micropipeta estéril, se agitan y se incuban en la estufa a 37°C durante 24 horas.

Paralelamente se siembra 1 ml del caldo de preenriquecimiento en tubos de ensayo con 9 ml de Rappaport Vassiliadis, se agitan y se incuban en la estufa a 41°C durante 24 horas.

## **3- Siembra en agares selectivos**

Se realiza una siembra por duplicado en agar XLD, agar SS y agar cromogénico de cada tubo de Müller-Kauffmann y Rappaport-Vassiliadis con un asa de siembra esterilizada y se incuban en la estufa a 37°C durante 24 horas.

## **4- Siembra y aislamiento en agar no selectivo**

Se resiembra de las placas de la etapa 3 en el caso de presuntas colonias de *Salmonella* spp. una placa de agar nutritivo y se incuba en la estufa a 37°C durante 24 horas.

## **5- Confirmación**

Se realiza el test de aglutinación a las colonias que han crecido en el agar nutritivo para confirmar la presencia de *Salmonella* spp.

Esta metodología está representada mediante un esquema en la figura 4.

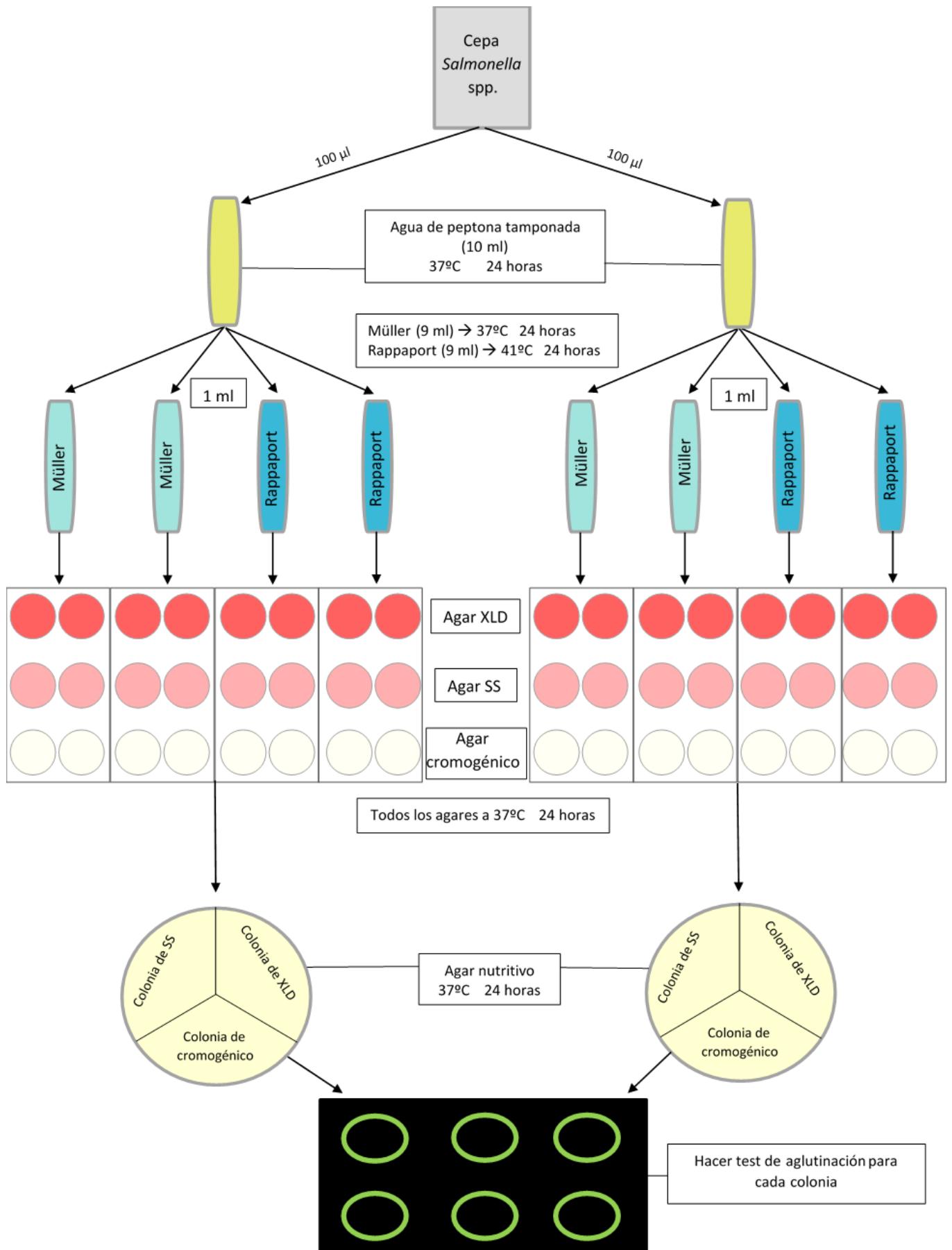


Figura 4: Metodología utilizada para el análisis de la cepa de *Salmonella* spp.

Fuente: Elaboración propia.

### **3.1.5. Ensayo con diferentes tipos de aguas.**

Los siguientes métodos se basan en el análisis de 200 ml de la muestra por duplicado. Además, se trabajará siempre en la campana de flujo laminar y al lado de la llama para evitar cualquier tipo de contaminación.

#### **3.1.5.1. Ensayo con agua potable.**

Para este análisis se recogió agua de red, en concreto, del laboratorio de microbiología del grupo de investigación de Calidad y Tratamiento de Aguas del área de Tecnologías del Medio Ambiente, en el campus Río Ebro de la Universidad de Zaragoza.

#### **Filtración de la muestra**

Se toma con un vaso de precipitados estéril agua del grifo y con ayuda de la rampa de filtración y utilizando filtros de 0,45 µm, se filtran 200 ml de muestra por duplicado.

Las etapas de preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, siembra en agares selectivos, siembra en agar no selectivo y confirmación, se realizan del mismo modo que en el ensayo con cepa de *Salmonella* spp. (apartado 3.1.4.).

#### **3.1.5.2. Ensayo con agua superficial.**

Para la realización de este ensayo se tomó una muestra simple de agua del río Ebro en las inmediaciones del recinto de la Expo de la ciudad de Zaragoza.

#### **Filtración de la muestra**

Para filtrar esta muestra, debido a la elevada concentración de sólidos, se ha requerido la utilización de varios filtros de diferente diámetro de poro, esterilizados previamente. Utilizando la rampa de filtración y mediante una filtración en serie (empezando con filtros de tejido/no tejido y acabando con filtros de 0,45 µm), se filtran 200 ml de muestra por duplicado.

Las etapas de preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, siembra en agares selectivos, siembra en agar no selectivo y confirmación, se realizan del mismo modo que en el ensayo con cepa de *Salmonella* spp. (apartado 3.1.4.).

### **3.1.5.3. Ensayo con agua residual.**

Para la realización de este ensayo se tomó una muestra compuesta de agua de la entrada a la depuradora de Tudela, Navarra, que vierte al río Ebro, y para lo que se ha contado con la colaboración de la empresa NILSA.

Todas las etapas de este proceso se realizan del mismo modo que en el ensayo con agua superficial (apartado 3.1.5.2.).

### **3.1.5.4. Ensayo con agua depurada.**

Para la realización de este ensayo se tomó una muestra compuesta de agua de la salida de la depuradora de Tudela, Navarra, que vierte al río Ebro, y para lo que se ha contado con la colaboración de la empresa NILSA.

Todas las etapas de este proceso se realizan del mismo modo que en el ensayo con agua superficial (apartado 3.1.5.2.).

Todas las metodologías descritas anteriormente quedan representadas con un esquema en la figura 5.

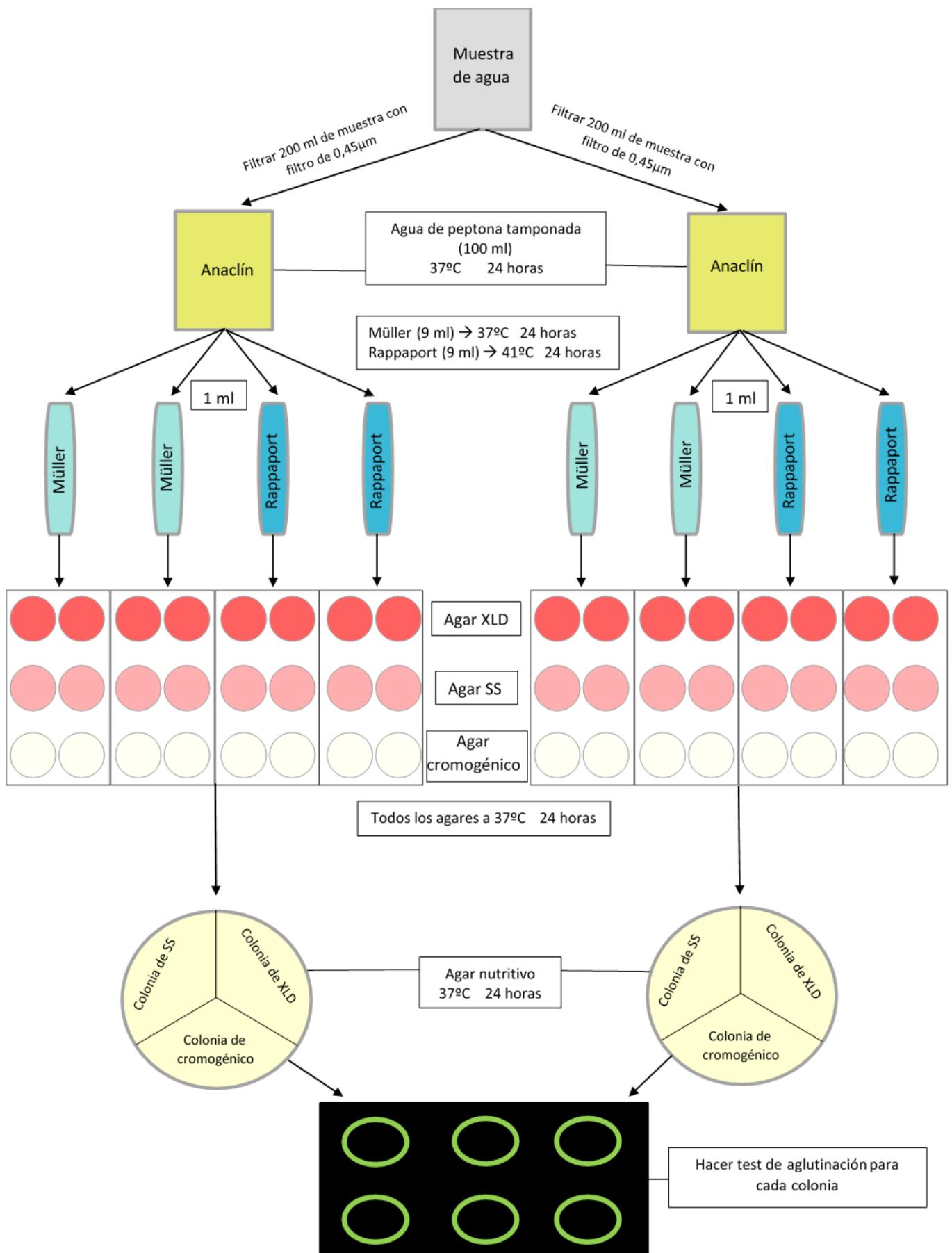


Figura 5: Metodología utilizada para el análisis de *Salmonella* spp. en las diferentes matrices acuosas.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.2. Resultados y discusión.

A continuación, en la tabla 7, se muestra un resumen de los resultados obtenidos en los análisis de presencia/ausencia de *Salmonella* spp. para un determinado volumen, realizados a las diferentes muestras acuosas y contrastados con los obtenidos en el laboratorio externo para corroborar la fiabilidad de la metodología utilizada en cada caso.

Tabla 7: Resultados de los ensayos realizados a las diferentes muestras.  
Fuente: Elaboración propia.

TIPO DE MUESTRA	RESULTADO
<b>Cepa</b>	Presencia de <i>Salmonella</i> spp. en 10 ml
<b>Agua potable</b>	Ausencia de <i>Salmonella</i> spp. en 200 ml
<b>Agua superficial</b>	Presencia de <i>Salmonella</i> spp. en 200 ml
<b>Agua residual</b>	Presencia de <i>Salmonella</i> spp. en 200 ml
<b>Agua depurada</b>	Presencia de <i>Salmonella</i> spp. en 200 ml

Algunas imágenes de los resultados obtenidos en los ensayos se muestran en las figuras 6, 7, 8 y 9.



Figura 6: Placa de Petri de agar XLD con colonias características de *Salmonella* spp. (Ensayo con cepa de *Salmonella* spp.).



Figura 7: Placa de Petri de agar SS con colonias características de *Salmonella* spp. (Ensayo con agua superficial).

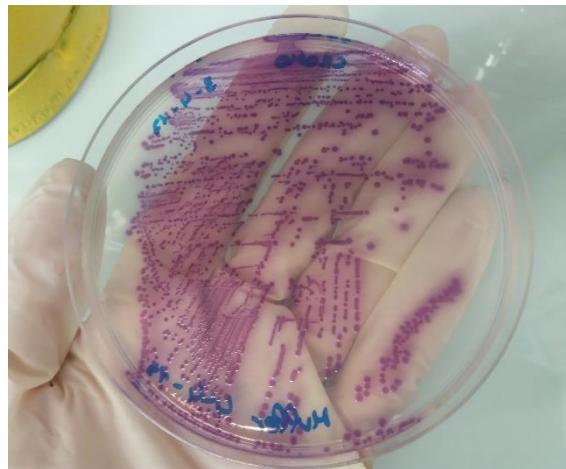


Figura 8: Placa de Petri de agar cromogénico con colonias características de *Salmonella* spp. (Ensayo con agua residual).

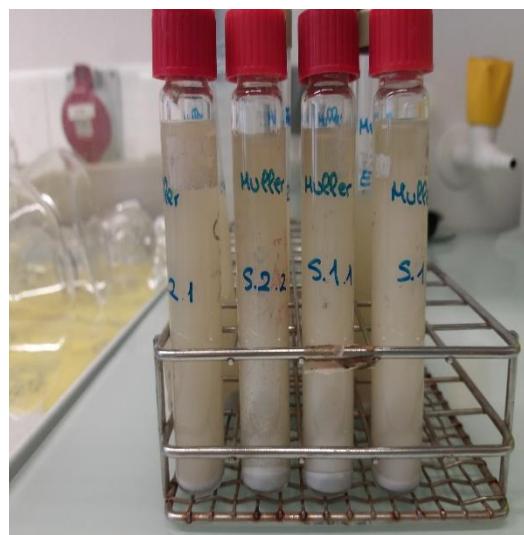


Figura 9: Tubos de ensayo de Müller-Kauffmann sembrados del agua de peptona tras incubación (Ensayo con agua depurada).

En el Anexo se pueden observar más imágenes de los resultados obtenidos en cada una de las etapas de todos los ensayos realizados.

### 3.2.1. Ensayo con cepa de *Salmonella* spp.

Los ensayos realizados con la cepa de *Salmonella* spp. dieron todos resultados positivos tras hacer el test de aglutinación a las colonias en agar nutritivo.

En todas las etapas del análisis se observa una presunta presencia de *Salmonella* spp., ya que los medios de cultivo muestran resultados característicos de esta bacteria.

Tanto el agua de peptona como el Müller-Kauffmann y el Rappaport-Vassiliadis ganaron turbidez, y estos dos últimos tornaron además a un color blanquecino.

En los agares selectivos utilizados, los resultados más claros y determinantes fueron los obtenidos con el agar XLD, en el cual se podían observar sin problemas colonias con el centro negro características de colonias presuntivas de *Salmonella* spp. Por tanto, la metodología propuesta para este análisis es: preenriquecimiento en agua de peptona tamponada, enriquecimiento en medios selectivos (tanto Müller-Kauffmann como Rappaport-Vassiliadis), siembra en agar selectivo (XLD), siembra en agar no selectivo (agar nutritivo) y confirmación mediante test de aglutinación.

### **3.2.2. Ensayo con diferentes tipos de aguas.**

#### **3.2.2.1. Ensayo con agua potable.**

Los resultados obtenidos en este ensayo fueron, negativos para *Salmonella* spp.

En el agua de peptona tamponada, el Müller-Kauffmann y el Rappaport-Vassiliadis no se apreciaron cambios tras la incubación en la estufa.

Las colonias obtenidas en los agares selectivos no se corresponden a las características de *Salmonella* spp., ya que en el agar XLD se observaron colonias amarillas con centro amarillo, en el agar SS se obtuvieron colonias rojas con centro rojo, y en el agar cromogénico se crecieron colonias azules verdosas (como puede observarse en la página 63 del Anexo); todas ellas se corresponden a las colonias típicas de *Escherichia coli*, la presencia de esta bacteria puede ser debido a la contaminación de la muestra, o a una potabilización insuficiente.

La metodología propuesta para el análisis de este tipo de muestra es: filtración, preenriquecimiento en agua de peptona tamponada, enriquecimiento en medios selectivos (tanto Müller-Kauffmann como Rappaport-Vassiliadis), siembra en agar selectivo (cromogénico).

#### **3.2.2.2. Ensayo con agua superficial.**

Es necesario realizar una filtración en serie dadas las características de la muestra.

Los filtros que se utilizan y el orden son: Tejido/no tejido, 43-48  $\mu\text{m}$ , 20-25  $\mu\text{m}$ , 8  $\mu\text{m}$ , 2-4  $\mu\text{m}$ , 0,7  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

Tras la realización del test de aglutinación se obtuvo presencia de *Salmonella* spp. en el agua superficial.

En todas las etapas del proceso los caldo y medios de cultivo mostraron los resultados propios y características de la *Salmonella* spp. tras su incubación.

La metodología propuesta para este análisis es: filtración en serie de la muestra, preenriquecimiento en agua de peptona tamponada, enriquecimiento en medios selectivos (tanto Müller-Kauffmann como Rappaport-Vassiliadis), siembra en agar selectivo (cromogénico o agar SS), siembra en agar no selectivo (agar nutritivo) y confirmación mediante test.

### **3.2.2.3. Ensayo con agua residual.**

Debido a la concentración de sólidos presentes en la muestra es necesaria la realización de una filtración en serie.

Los filtros que se utilizan y el orden son: Tejido/no tejido, 43-48  $\mu\text{m}$ , 20-25  $\mu\text{m}$ , 8  $\mu\text{m}$ , 2-4  $\mu\text{m}$ , 0,7  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$ .

Los resultados obtenidos al analizar las aguas residuales procedentes de la entrada a la depuradora de Tudela fueron positivos para *Salmonella* spp.

Este ensayo fue el que obtuvo unos resultados más destacados y significativos. En todas las etapas del análisis se observaron los resultados característicos de *Salmonella* spp., tanto en Müller-Kauffmann como en el Rappaport-Vassiliadis se observó una turbidez mucho mayor que en los ensayos anteriores.

En las placas de agar XLD, SS y agar cromogénico crecieron colonias claras de *Salmonella* spp., y en el test de comprobación se produjo aglutinación al instante.

La metodología propuesta para este análisis es: filtración en serie de la muestra, preenriquecimiento en agua de peptona tamponada, enriquecimiento en medios selectivos (tanto Müller-Kauffmann como Rappaport-Vassiliadis), siembra en agar selectivo (cromogénico o agar SS), siembra y aislamiento en agar no selectivo (agar nutritivo) y confirmación mediante test de aglutinación.

### **3.2.2.4. Ensayo con agua depurada.**

Es necesario realizar una filtración en serie debido a las características de la muestra.

Los filtros que se utilizan y el orden son: Tejido/no tejido, 43-48  $\mu\text{m}$ , 20-25  $\mu\text{m}$ , 8  $\mu\text{m}$ , 2-4  $\mu\text{m}$ , 0,7  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$ .

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados en el agua depurada (aguas de salida de la depuradora de Tudela) son positivos a *Salmonella* spp.

En todas las etapas se pudieron observar los resultados característicos de la *Salmonella* spp. Los resultados más destacados o evidentes se obtuvieron en las placas de agar SS y agar cromogénico.

La metodología propuesta para este análisis es: filtración en serie de la muestra, preenriquecimiento en agua de peptona tamponada, enriquecimiento en medios selectivos (tanto Müller-Kauffmann como Rappaport-Vassiliadis), siembra en agar selectivo (cromogénico o agar SS), siembra y aislamiento en agar no selectivo (agar nutritivo) y confirmación mediante test de aglutinación.

En relación a los resultados obtenidos en el análisis de *Salmonella* spp. en las diferentes muestras analizadas; con el ensayo del análisis de la cepa se quería verificar que la metodología elegida para el análisis de *Salmonella* spp. es adecuada, y se confirma, ya que todos los ensayos realizados resultaron positivos.

En cuanto a los ensayos realizados al agua potable, salieron todos negativos, lo cual es lógico, ya que al ser agua de consumo tiene que estar correctamente tratada y debe cumplir con los parámetros establecidos de acuerdo con la normativa (RD 140/2003).

Entre los resultados de presencia de *Salmonella* spp. en las diferentes matrices, los más claros se vieron en los ensayos realizados con muestra de agua residual, hecho esperable, dado su origen industrial, fecal o urbano.

Una diferencia entre el ensayo realizado con la cepa de *Salmonella* spp. y los realizados a las diferentes matrices acuosas es que en el caso del análisis a la cepa los resultados más evidentes de presencia se obtuvieron con el agar XLD, mientras que en los análisis realizados a las matrices acuosas fueron los realizados con el agar SS y el agar cromogénico.

Esto puede deberse a que el agar XLD es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento y la diferenciación de patógenos entéricos Gram negativos (*Salmonella* y *Shigella*) y es adecuado especialmente para el aislamiento de la especie *Shigella*. En cambio, el agar SS y el agar cromogénico son medios de cultivo selectivos y de diferenciación para el aislamiento de bacilos entéricos patógenos, en especial los pertenecientes al género *Salmonella*.

Otro estudio (Patil y Parhad, 1986) comparó los resultados de los medios Rappaport-Vassiliadis y Müller-Kauffmann entre otros como medios de enriquecimiento para apoyar el crecimiento de *Salmonella* spp, ya sea sola o en presencia de otros

organismos competidores en muestras de agua. También se investigó su capacidad de apoyar el crecimiento de salmonellas estresadas a partir del agua. Se observó que el medio Rappaport-Vassiliadis era más inhibidor para los organismos competidores que Müller-Kauffmann. Inhibió fuertemente el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii* y *Proteus vulgaris*, aunque no de *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, a los que inhibe mucho mejor el medio Müller-Kauffmann.

Estudios realizados por otros autores (Moriñigo et al., 1986) afirman que el medio Rappaport-Vassiliadis es el mejor para la recuperación y enumeración de *Salmonella* spp. para las muestras de aguas naturales. Sin embargo en nuestros ensayos no se ha visto diferencias entre los resultados obtenidos en los medios Müller-Kauffmann y Rappaport-Vassiliadis.

## 4. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE *Salmonella* spp. A DISTINTOS TRATAMIENTOS DE DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES URBANAS.

### 4.1. Materiales y métodos.

#### 4.1.1. Descripción de las depuradoras.

##### 4.1.1.1. Depuradora de Tudela.

Se encuentra situada a 3 km de Tudela en la margen derecha del Río Ebro. En la carretera nacional NA-134, km 2. En la figura 10 se puede observar la EDAR con vista aérea.



Figura 10: Vista aérea de la EDAR de Tudela.  
Fuente: Google Maps.

La EDAR de Tudela, está compuesta por dos líneas de tratamiento: la línea de tratamiento de aguas y la línea de tratamiento de fangos. La línea de aguas, con un caudal medio de entrada de 850 m<sup>3</sup> /h, está compuesta por las siguientes etapas (Gómez, 2007):

- Sistema de bombeo del agua bruta.
- Pretratamiento (reja, tamiz, deserenado-desengrasado): dispone de una reja de gruesos que deja pasar únicamente aquellas partículas en suspensión de menos de 20 mm de grosor. En esta etapa se eliminan las partículas en suspensión mayores a 3 mm y las arenas. Está compuesta

por un tamizado con tres tamices y un desarenado formado por dos desarenadores de flujo horizontal.

- Decantación primaria: formado por dos decantadores circulares, con rascadores superficiales y de fondo para la extracción de flotantes y decantados respectivamente. Los sólidos flotantes son bombeados hasta un desengrasador y los decantados, denominados fango primario, a la línea de tratamiento de fango. En esta etapa se elimina materia en suspensión y coloidal.
- Tratamiento secundario o biológico: en esta etapa se eliminaría la materia orgánica disuelta, la materia coloidal biodegradable junto con nutrientes como nitrógeno y fósforo. Está formada por tres reactores biológicos circulares de lecho bacteriano en una primera etapa, dos decantadores circulares intermedios, seguidos de dos reactores biológicos circulares de lecho bacteriano en una segunda etapa y dos decantadores circulares finales.

El lecho bacteriano, también llamado filtro percolador, es el tratamiento más utilizado en Navarra, dados sus excelentes rendimientos. La línea de agua cuenta con una o dos etapas de filtros, según el nivel de tratamiento requerido, que en su interior contienen relleno plástico o pétreo al que se adhieren las bacterias que se alimentan de la carga contaminante, y, por tanto, la eliminan del agua. Este es un tratamiento biológico secundario que consiste en inyectar aire en el agua residual, que circula a gran velocidad. La mayor concentración de oxígeno en el agua permite que proliferen y se desarrollen las bacterias que se alimentan de la carga contaminante, por lo que la depuración es más eficaz (NILSA, 2006).

La segunda línea consiste en el tratamiento de fangos por digestión aerobia seguida de una etapa de centrifugación. Los fangos de la salida del decantador primario son dirigidos a un digestor y tratados con el sistema ATAD (Digestión aerobia termófila autosostenida). Después son secados mediante centrífugas obteniendo así fango deshidratado, manejable y fácil de transportar.

La EDAR de Tudela recibe aguas de origen doméstico e industrial asimilables a urbanas. El cauce receptor es el río Ebro. La población censada es de 38970 habitantes y la carga tratada es de 82500 habitantes equivalentes. El caudal medio de las aguas residuales es de 19997 m<sup>3</sup>/día, siendo su caudal de diseño de 22150 m<sup>3</sup>/día (Cisneros, 2015).

En la figura 11 se muestra un esquema de las diferentes etapas de la depuradora de Tudela.

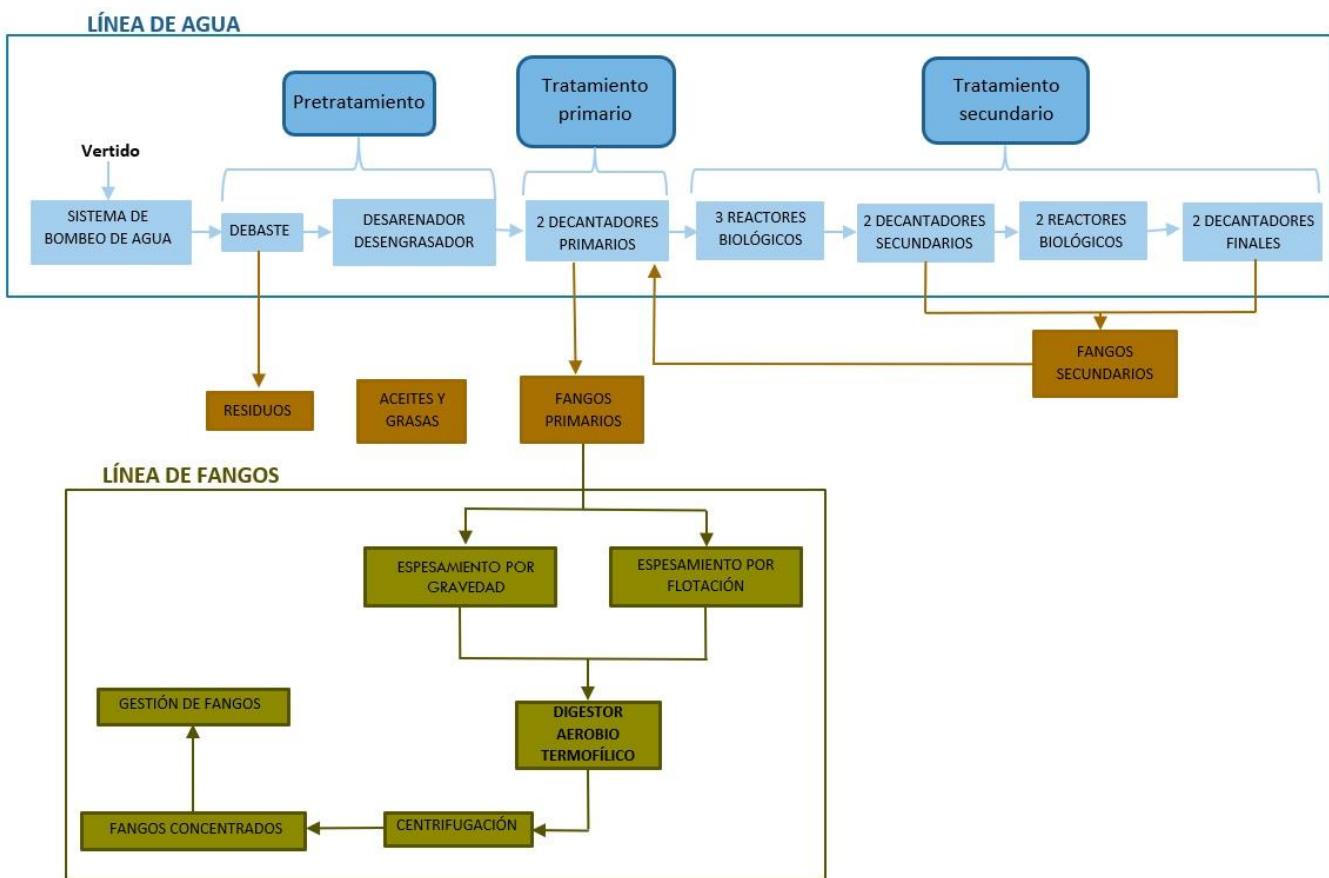


Figura 11: Etapas de la EDAR de Tudela.

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.1.1.2. Depuradora de Valtierra.

Las instalaciones de la depuradora se encuentran en el término de El Raso, a 4 kilómetros del casco urbano de Arguedas, en dirección a Tudela, y la planta tiene una superficie de 60.000 metros cuadrados (Ubago, 2007). En la figura 12 se puede apreciar la vista aérea de esta EDAR.



Figura 12: Vista aérea de la EDAR de Valtierra.  
Fuente: Google Maps.

Se construyó en 1992 y se remodeló en 2007. La intervención consistió en una adecuación general de la planta y la mejora de la depuración biológica y la línea de tratamiento de fangos (Ubago, 2007).

La EDAR de Valtierra está compuesta por dos líneas de tratamiento: la línea de tratamiento de aguas y la línea de tratamiento de fangos. La línea de aguas está compuesta por las siguientes etapas (Cisneros, 2015):

- Sistema de bombeo de agua y homogeneización: el agua llega a través de los colectores a la planta depuradora. Una vez allí, el caudal, y por tanto la carga contaminante, quedan regulados mediante una balsa de homogeneización con el fin de amortiguar los posibles altibajos.
- Pretratamiento: formado por tamices, para eliminar sólidos, y por un desarenador-desengrasador para eliminar grasas y arenas.

- Tratamiento primario: el agua pasa a un decantador primario con un tiempo de retención de 3 a 6 horas. Los fangos decantados son retirados para su posterior tratamiento.
- Tratamiento secundario: El agua de salida del decantador pasa al reactor biológico de lecho bacteriano, también conocidos como lechos bacterianos. Dichos filtros son de plástico y es en ellos donde proliferan las bacterias que degradan la materia orgánica. En la decantación secundaria los lodos se recirculan al decantador primario.
- Tratamiento terciario: Consiste en un tratamiento por lagunaje el cual está formado por 3 lagunas en serie de 2,5 m de profundidad. El tiempo de residencia es de unos 25 días. No todas están siempre operativas debido a labores de mantenimiento o limpieza. De este modo el agua ya está en condiciones de ser vertida a la cuenca del Ebro.

Por otro lado, los fangos de la salida del decantador primario son dirigidos a un digestor y tratados con el sistema ATAD (Digestión aerobia termófila autosostenida). Despues son secados mediante centrífugas obteniendo así fango deshidratado, manejable y fácil de transportar (Cisneros, 2015).

La planta da servicio a cerca de 5000 habitantes y tiene una carga contaminante equivalente al que pueden producir 13833 personas si se tiene en cuenta el tejido industrial. Soporta un caudal medio de 1296 m<sup>3</sup>/día, aunque sus dimensiones admiten un máximo de casi seis veces esta capacidad (Ubago, 2007).

En la figura 13 se muestran las diferentes etapas de la depuradora de Valtierra.

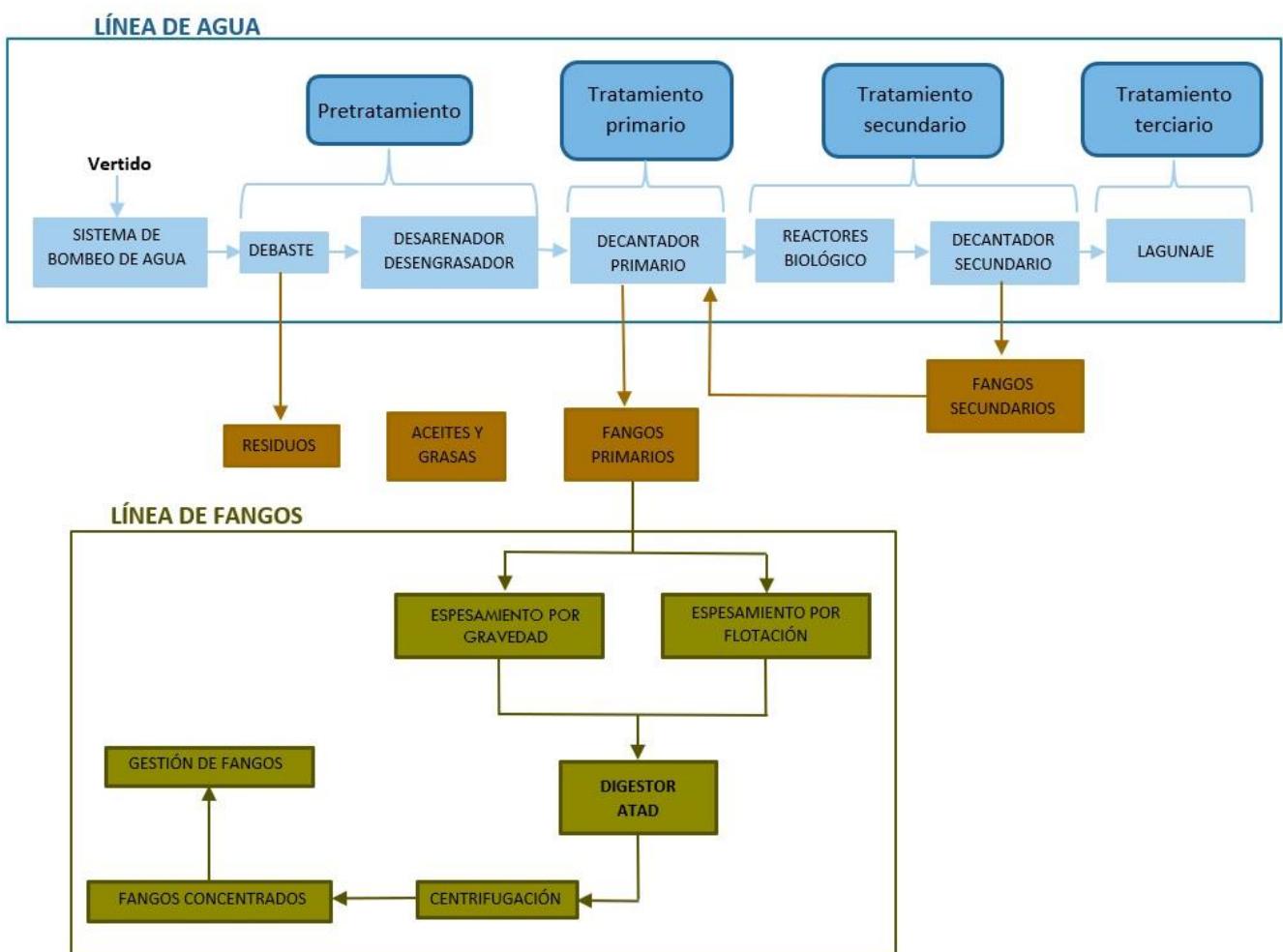


Figura 13: Etapas de la EDAR de Valtierra.  
Fuente: Elaboración propia.

#### 4.1.2. Metodología de la toma de muestras.

Todas las muestras recogidas son muestras compuestas, es decir, una combinación de muestras individuales tomadas en momentos diferentes del día (por la mañana, al mediodía y por la tarde), para que sus resultados fueran más fiables y representativos.

Cada muestra se recogió en botes estériles de 500 ml (como se muestran en la figura 14).



Figura 14: Botes con agua de entrada y salida de la depuradora respectivamente.

De la depuradora de Tudela se recogieron entre los meses de marzo y mayo un total de 10 muestras entre la entrada y la salida de la depuradora.

En el caso de la depuradora de Valtierra, se recogieron un total de 6 muestras entre la entrada y la salida de la depuradora entre los meses de abril y mayo.

#### 4.1.3. Procedimiento experimental.

La metodología llevada a cabo para el análisis de *Salmonella* spp. en las aguas residuales y depuradas ambas depuradoras es la elegida anteriormente para los casos de aguas residuales y depuradas (apartados 3.2.2.3. y 3.2.2.4.) con los medios de cultivo que han mostrado ser más eficaces en la detección de esta bacteria en aguas de este tipo.

##### 1- Filtración de la muestra

Utilizando la rampa de filtración y mediante una filtración en serie (empezando con filtros de tejido/no tejido y acabando con filtros de 0,45 µm), se filtran 200 ml de muestra por duplicado.

## **2- Preenriquecimiento**

Se introducen los filtros utilizados en sus respectivos anaclines con 100 ml de agua de peptona tamponada, se agitan y se incuban en la estufa a 37°C durante 24 horas.

## **3- Enriquecimiento selectivo**

Pasadas las 24 horas, se siembra 1 ml del caldo de preenriquecimiento en tubos de ensayo con 9 ml de medio selectivo Müller-Kauffmann con una micropipeta estéril, se agitan y se incuban en la estufa a 37°C durante 24 horas.

Paralelamente se siembra 1 ml del caldo de preenriquecimiento en tubos de ensayo con 9 ml de Rappaport Vassiliadis, se agitan y se incuban en la estufa a 41°C durante 24 horas.

## **4- Siembra en agares selectivos**

Se realiza una resiembra por duplicado en agar SS y agar cromogénico de cada tubo de Müller-Kauffmann y Rappaport-Vassiliadis con un asa de siembra esterilizada y se incuban en la estufa a 37°C durante 24 horas.

## **5- Siembra en agar no selectivo**

Se siembra de las placas que hayan obtenido colonias posibles de *Salmonella* spp., una colonia a una placa de agar nutritivo y se incuba en la estufa a 37°C durante 24 horas.

## **6- Confirmación**

Se realiza el test a las colonias que hayan crecido en el agar nutritivo para confirmar la presencia de *Salmonella* spp.

## 4.2. Resultados y discusión.

A continuación, en la tabla 8, se muestra un resumen de los resultados obtenidos en los análisis de *Salmonella* spp. realizados a la entrada y salida de ambas depuradoras y contrastados con los obtenidos en el laboratorio externo para corroborar la fiabilidad de la metodología utilizada en cada caso.

Tabla 8: Resultados obtenidos en los ensayos realizados en las dos depuradoras.  
Fuente: Elaboración propia.

MUESTRA		RESULTADO
Depuradora de Tudela	Entrada	Presencia de <i>Salmonella</i> spp. en 200 ml
	Salida	Presencia de <i>Salmonella</i> spp. en 200 ml
Depuradora de Valtierra	Entrada	Presencia de <i>Salmonella</i> spp. en 200 ml
	Salida	Ausencia de <i>Salmonella</i> spp. en 200 ml

Algunas imágenes de los resultados obtenidos en cada ensayo son las siguientes.



Figura 15: Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de *Salmonella* spp. (colonias negras) provenientes del agua de entrada a la depuradora de Tudela.



Figura 16: Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de *Salmonella* spp. (colonias moradas) provenientes del agua de salida de la depuradora de Tudela.

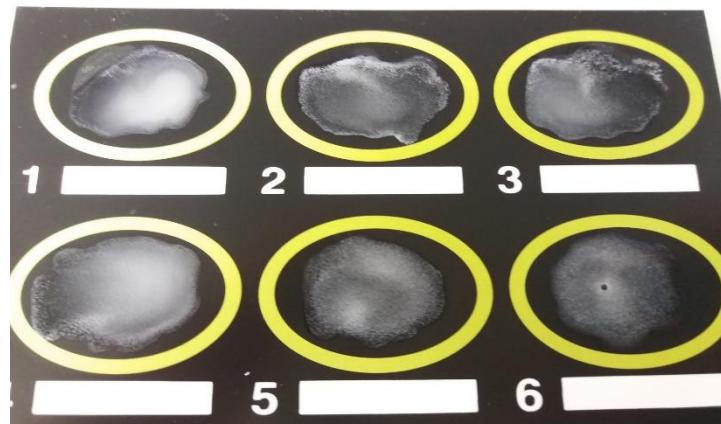


Figura 17: Test de aglutinación positivo para *Salmonella* spp. para el agua de entrada (1, 2 y 3) y salida (4, 5 y 6) de la depuradora de Tudela.

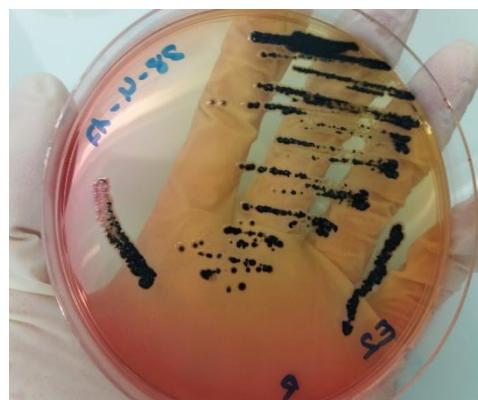


Figura 18: Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de *Salmonella* spp. (colonias negras) provenientes del agua de entrada a la depuradora de Valtierra.

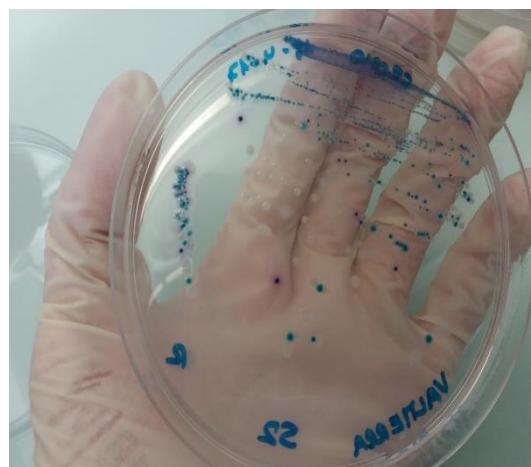


Figura 19: Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de *Salmonella* spp. (colonias moradas) provenientes del agua de salida de la depuradora de Valtierra.

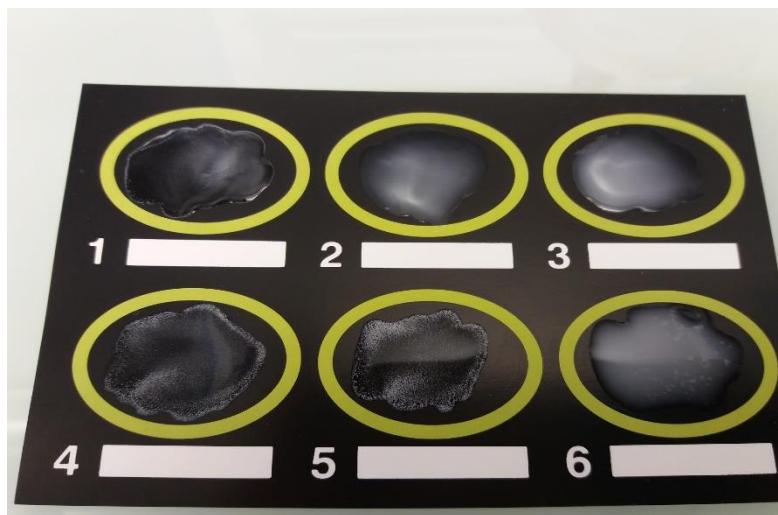


Figura 20: Test de aglutinación positivo para *Salmonella* spp. para el agua de entrada (4, 5 y 6) y negativo para la salida (1, 2 y 3) de la depuradora de Valtierra.

En el Anexo se pueden observar más imágenes de los resultados obtenidos en cada una de las etapas de todos los ensayos realizados.

#### 4.2.1. Ensayos con agua de la depuradora de Tudela (entrada y salida).

Todos los resultados obtenidos en los análisis realizados tanto a la entrada (agua residual) como a la salida (agua depurada) de la depuradora de Tudela han dado positivo para *Salmonella* spp.

Los resultados más claros se consiguieron con las muestras de la entrada a la depuradora, obteniendo colonias claras de *Salmonella* spp. en todos los medios de cultivo utilizados, lo que puede ser debido a la presencia de una mayor concentración de esta bacteria.

#### 4.2.2. Ensayos con agua de la depuradora de Valtierra (entrada y salida).

Los resultados obtenidos en los análisis realizados a las aguas de la depuradora de Valtierra son distintos a los obtenidos en las muestras de la depuradora de Tudela, ya que en ésta se han conseguido resultados positivos para *Salmonella* spp. (presencia en 200 ml de muestra) a la entrada de la depuradora (agua residual), pero negativos (ausencia de *Salmonella* spp. en 200 ml de muestra) para el agua analizada a la salida de la depuradora (agua depurada).

Los resultados en los medios de cultivo fueron similares. Tanto a la entrada como a la salida, las colonias obtenidas eran presuntas colonias de *Salmonella* spp., pero al realizar el test de confirmación, en las colonias de la entrada a la depuradora se observó aglutinación (resultado positivo), y en cambio al hacerlo con las colonias aisladas en el

agar nutritivo a partir de la muestra de agua de la salida de la depuradora no se produjo aglutinación (resultado negativo).

Esta diferencia de resultados entre las depuradoras de Tudela y Valtierra puede deberse a que la primera sólo tiene tratamiento secundario para eliminar los agentes biológicos presentes en el agua. Sin embargo, la depuradora de Valtierra además de tener el mismo tratamiento secundario posee también un tratamiento terciario, el cual consiste en tres lagunas donde se almacena el agua, después de someterse al tratamiento secundario. Estos resultados coinciden con lo publicado por otros autores (Koivunen et al., 2003) que detectan *Salmonella* spp. en aguas depuradas con tratamientos convencionales y suponen un riesgo para la salud pública.

Otros autores (Odjadjare y Olaniran, 2015) afirman que el tratamiento terciario del efluente final de aguas residuales en las EDARs fue lo que redujo el número de bacterias *Salmonella* spp. en el punto de descarga, pero que no los eliminó por completo. Esto indica que los efluentes de aguas residuales tratadas que se descargan de estas plantas de tratamiento son una fuente de contaminación de las aguas superficiales receptoras con este patógeno. Los autores recomiendan la vigilancia constante de los procesos de tratamiento y del efluente final y la mejora de las infraestructuras de tratamiento de aguas residuales.

Otro estudio realizado a las mismas plantas de tratamiento de aguas residuales municipales que las que se estudiaron en este TFG obtuvo resultados similares, detectando presencia de *Salmonella* spp. en la depuradora de Tudela, y revelando que el uso de lagunas naturales como tratamiento terciario en Valtierra produce un importante efecto de desinfección en sus aguas, y que por tanto supone una mejor depuración a nivel microbiológico (Mosteo et al., 2013).

De los resultados del estudio cuantitativo de *Salmonella*. spp llevado a cabo por Howard et al. (2004) se concluye que el tratamiento convencional de aguas residuales con decantación primaria y el tratamiento biológico aeróbico no es suficiente para la desinfección de aguas residuales.

## 5. CONCLUSIONES.

### Conclusiones relativas a la evaluación de metodologías para el análisis de *Salmonella* spp. en aguas.

- La metodología más adecuada para el análisis de *Salmonella* spp. en aguas depende de la matriz acuosa en la que se encuentra.
- Para obtener unos resultados claros en el test de aglutinación que permite confirmar la presencia de *Salmonella* spp., es necesario realizar todas las etapas del ensayo (filtración de la muestra, preenriquecimiento en agua de peptona tamponada, enriquecimiento en medios de cultivo selectivos, siembra en agares selectivos y siembra y aislamiento en agar no selectivo) para obtener unos resultados claros y fiables.
- Es necesaria la realización de una filtración en serie para las muestras de agua superficial, residual y depurada. Siendo la secuencia de filtros según el tamaño de su diámetro de poro la siguiente: Tejido/no tejido, 43-48 µm, 20-25 µm, 8 µm, 2-4 µm, 0,7 µm y 0,45 µm.
- El medio de cultivo selectivo que mejores resultados muestran en los ensayos realizados con la cepa es el agar XLD, mientras que para los ensayos realizados a las diferentes matrices acuosas han sido el agar SS y el agar cromogénico con los que se han conseguido unos resultados más claros. Los medios de cultivo Müller-Kauffmann y Rappaport-Vassiliadis conllevan unos resultados similares en todos los ensayos realizados.
- La metodología escogida para el análisis en el laboratorio de *Salmonella* spp. en las diferentes matrices acuosas es fiable y adecuada, ya que estos resultados fueron contrastados con los obtenidos en el laboratorio externo. Se obtuvieron unos resultados positivos en presencia de *Salmonella* spp. en todas las muestras (cepa, agua superficial, agua residual y agua depurada) excepto para el ensayo realizado con agua potable.

## Conclusiones relativas al estudio de resistencia de *Salmonella* spp. en la depuración de aguas residuales urbanas.

- En las aguas tanto de entrada como de salida a la depuradora de Tudela hay presencia de *Salmonella* spp., lo que indica que los tratamientos de esta instalación no eliminan este patógeno, mientras que en las muestras de agua de la depuradora de Valtierra solo hay presencia de *Salmonella* spp. en las aguas de entrada a la depuradora, por lo tanto, esta última sí que parece reducir la contaminación presente.
- El tratamiento secundario en la depuración de aguas residuales urbanas no es suficiente para la eliminación de todos los microorganismos patógenos, como la *Salmonella* spp., presentes en el agua. Por otro lado, el tratamiento terciario mediante lagunaje puede ser el motivo de su eliminación.
- La carga microbiana que presentan las aguas residuales urbanas se consigue reducir en cierto grado a lo largo de los diferentes procesos que tienen lugar en la EDAR de Tudela, especialmente durante la etapa de tratamiento biológico. Sin embargo, el agua residual depurada todavía obtiene resultados positivos en presencia de *Salmonella* spp. Por tanto, para obtener un agua de una calidad adecuada que permita su reutilización libre de riesgos sanitarios, es necesario aplicar tratamientos adicionales que reduzcan la carga microbiológica del efluente.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2010). Popoff and Le Minor. Vol 2, Editorial Board, p. 786.

Calvete, C., Colello, R., Etcheverría, A. I. (2015). *Detección y caracterización de Salmonella spp. en la cadena productiva porcina*. Universidad Nacional del centro de la provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Buenos Aires.

Centers for Disease Control and prevention, CDC. (2014). *Salmonella data now at your fingertips*.

Recuperado de: <http://www.cdc.gov/media/releases/2014/p0326-salmonella-data.html>

Cisneros, L. (2015). *Evolución de contaminantes físico-químicos y microbiológicos durante el proceso de depuración de aguas residuales urbanas*. Escuela Politécnica Superior de Huesca. Universidad de Zaragoza.

Comité científico de seguridad agroalimentaria de la CAE. (2008). *Evaluación del riesgo asociado a la presencia de los serovares zoonóticos de Salmonella en huevo fresco producido en la CAE*.

Constans, A., Alonso, R. M., Martí, M. C. (1998). *NTP 473: Estaciones depuradoras de aguas residuales: riesgo biológico*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. España. Recuperado de: [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/401a500/ntp\\_473.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/401a500/ntp_473.pdf)

D'Aoust, J.Y. (1994). *Salmonella and the international food trade*. *International Journal of Food Microbiology*. Vol 24.

Department of Veterinary Disease Biology. (2011). University of Copenhagen. Recuperado de: <https://www.gbif.org/publisher/a9e1c0c6-efd6-40b8-b03e-8919483704c2>

Directiva 91/271/CEE. Sobre el Tratamiento de las Aguas Residuales Urbanas, del 21 de mayo de 1991.

Recuperado de: [http://noticias.juridicas.com/base\\_datos/Admin/dir1991-271-ce.html](http://noticias.juridicas.com/base_datos/Admin/dir1991-271-ce.html)

E&O Laboratories Ltd (EO Labs). (2015). Recuperado de: <http://www.eolabs.com/>

Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. In Eguiarte, L., Souza, V., Aguirre, X., (ed.), *Ecología molecular*. Cap 17. Instituto Nacional de Ecología. México.

Etcheverría, A. I. (2015). Detección y caracterización de *Salmonella* spp. en la cadena productiva porcina.

Farmer, J. J. (2003). *Enterobacteriaceae: Introduction and Identification*. En: MURRAY, P., BARON, E., JORGENSEN, M., YOLLUN, R., (Eds). (2003). *Manual of Clinical Microbiology*. Vol 1. 8<sup>th</sup> ed. ASM Press. Washington, D.C.

Flores L. (2003). *Caracterización fenotípica y genotípica de estirpes de Salmonella choleraesuis aisladas de ambientes marinos* (Tesis doctoral). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima (Perú).

Forbes, B., Sahm, D., Weissfield, A. (1998). *Bailey & Schott's Diagnostic Microbiology*. 10<sup>th</sup> ed. Mosby, Inc. USA.

Fresquet, J. (2002). Daniel Elmer Salmon (1850-1914). *Historia de la Medicina*. Instituto de Historia de la Ciencia y Documentación, Universidad de Valencia-CSIC. Recuperado de: <http://www.historiadelamedicina.org/salmon.html>

Gómez Muñoz, J. (2007): *Digestión Aerobia Termófila Autosostenida (ATAD) de fangos. Estudio Experimental a escala real y Modelización Matemática del Reactor*. Campus Tecnológico de la Universidad de Navarra. San Sebastián

González, J., Pereira, N., Soto, Z., Hernández, E., Villarreal, J. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Revista Científica Salud Uninorte*. Vol 30. N°1. Recuperado de:

<http://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/article/viewArticle/5458/5594>

Hernández, V., Cárdenas, A., Rincón, S., Suárez, M. C., (2011). *Aislamiento e identificación de Salmonella spp. en carne fresca de origen porcino*.

Hope, B. K., Baker, A. R., Edel, E. D., Hogue, A. T., Schlosser, W. D., Whiting, R., McDowell, R. M., Morales, R. A. (2002). An overview of the *Salmonella Enteritidis* risk assessment for shell eggs and egg products. *Risk Analysis*, 22(2), 203-218.

Howard, I., Espigares, E., Lardelli, P., Martin, J. L., Espigares, M. (2004). Evaluation of microbiological and physicochemical indicators for wastewater treatment. *Environmental Toxicology*, 19(3), 241-249.

Hurtado, F. (2001). *Obtención de un hidrolizado proteico utilizando excedentes de la industria pesquera y agrícola*. Ingeniero de Alimentos. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción. Guayaquil (Ecuador).

Koivunen, J., Siitonen, A. and Heinonen-Tanski, H. (2003). *Elimination of enteric bacteria in biological-chemical wastewater treatment and tertiary filtration units*.

Mosteo R, Ormad MP, Goñi, P, Rodríguez-Chueca J, García A, Clavel A. (2013). *Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): water reuse possibilities*. *Water Sci Technol*.

Lopardo, H. A., Predari, S., Vay, C. (2016). Bacterias de importancia clínica. *Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología*. Vol 1. Recuperado de: <http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>

López, A., Mosteo, R., Gómez, J., Lasheras, A. M., Goñi, P., & Ormad, M. P. (2016). Evolución de bacterias patógenas en el tratamiento de aguas residuales urbanas. *Aguasresiduales.info*.

Recuperado de: <http://www.aguasresiduales.info/revista/articulos/evolucion-de-las-bacterias-patogenas-a-su-paso-por-los-diferentes-procesos-de-la-edar>

Luna, G. (1991). *Manual Operativo de Análisis Microbiológicos para Alimentos*. Primera Edición. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá (Colombia).

Melara Cruz, S.L., Salazar Artiga, B.G. (2012). *Determinación de la multiresistencia a los antimicrobianos de *Salmonella* spp. aislada a partir de muestras de chorizos comercializados en mercados de Santa Tecla*.

Recuperado de: [http://ri.ues.edu.sv/2279/1/AISLAMIENTO\\_DE\\_SALMONELLA\\_AC..pdf](http://ri.ues.edu.sv/2279/1/AISLAMIENTO_DE_SALMONELLA_AC..pdf)

Morén, M., (2010). *Guía para la Aplicación del R.D. 1620/2007 por el que se establece el Régimen Jurídico de la Reutilización de las Aguas Depuradas*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural Marino. Gobierno de España. Recuperado de:  
[http://www.mapama.gob.es/es/agua/publicaciones/GUIA\\_RD\\_1620\\_2007\\_tcm7-178027.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/agua/publicaciones/GUIA_RD_1620_2007_tcm7-178027.pdf)

Moriñigo, M. A., Borrego, J. J., Romero, P. (1986) Comparative study of different methods for detection and enumeration of *Salmonella* spp. in natural waters. *Journal of Applied Microbiology*, 61(2), 169-176.

NILSA. (2006). *Memoria 2006 NILSA*. Pamplona (Navarra). Recuperado de:  
<http://memorias.nilsa.com/archivo-memorias/pdf/memoria-nilsa-2006.pdf>

Odjadjare, E. C., Olaniran, A. O. (2015). Prevalence of antimicrobial resistant and virulent *Salmonella* spp. In treated effluent and receiving aquatic milieu of wastewater treatment plants in durban, south africa. *International journal of environmental research and public health*.

Patil, M. D., Parhad, N. M. (1986). Growth of salmonellas in different enrichment media. *Journal of Applied Microbiology*, 61(1), 19-24.

Rodríguez, I. P., Barrera, H. A. (2004). *La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención*. Ciencia UANL. Vol 7. Nº 3.

Selbitz, H. J, Sinell, H. J, Sziegoleit, A. (1995). Das Salmonellen-Problem: Salmonellen als Erreger von Tierseuchen und Zoonosen.

Stanchi, O. (2007). *Microbiología Veterinaria*. Primera Edición. Editorial Intermedica. Buenos Aires (Argentina).

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Investigación en discapacidad. Vol 2. México.

Ubago, J., (2007). La depuradora de Arguedas y Valtierra entrará en funcionamiento en marzo. *Diario de Navarra*. p. 32.

## 7. ANEXO.

### Materiales.



Figura 21: Campana de flujo laminar.



Figura 22: Rampa de filtración y mechero Bunsen.



Figura 23: Tubos con caldo de cultivo Müller-Kauffmann.



Figura 24: Tubos con caldo de cultivo Rappaport-Vassiliadis.

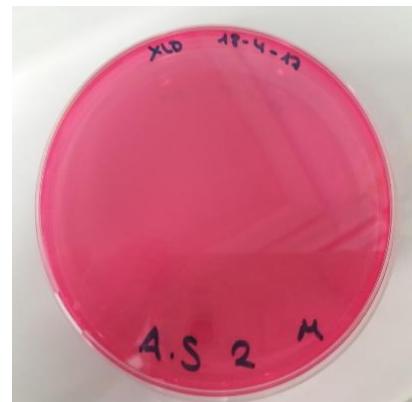


Figura 25: Placa de Petri con agar selectivo XLD.

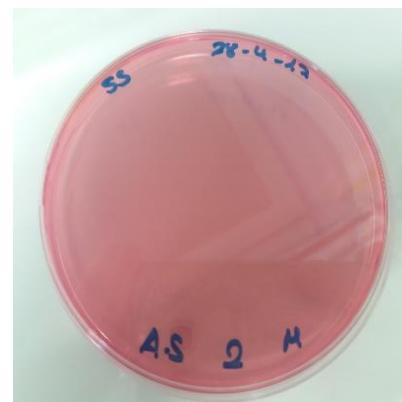


Figura 26: Placa de Petri con agar selectivo SS.

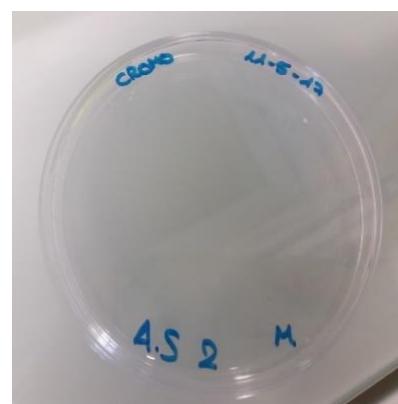


Figura 27: Placa de Petri con agar selectivo cromogénico.



Figura 28: Test de aglutinación para confirmar la presencia de *Salmonella* spp.

## Ensayo con cepa de *Salmonella* spp.

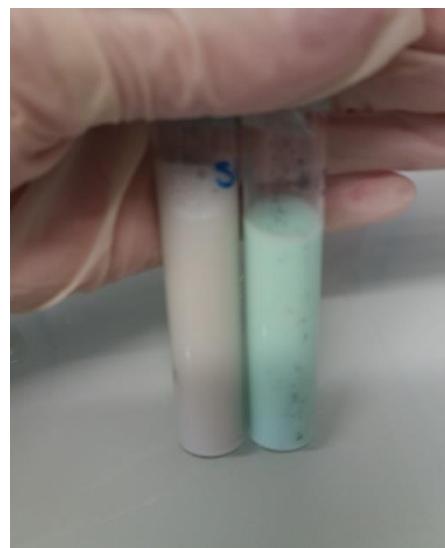


Figura 29: Comparación de tubos de Müller-Kauffmann con cepa de *Salmonella* spp. y sin ella.



Figura 30: Comparación de tubos con Rappaport-Vassiliadis con cepa de *Salmonella* spp. y sin ella.



Figura 31: Placa de Petri de agar XLD con colonias típicas de *Salmonella* spp.

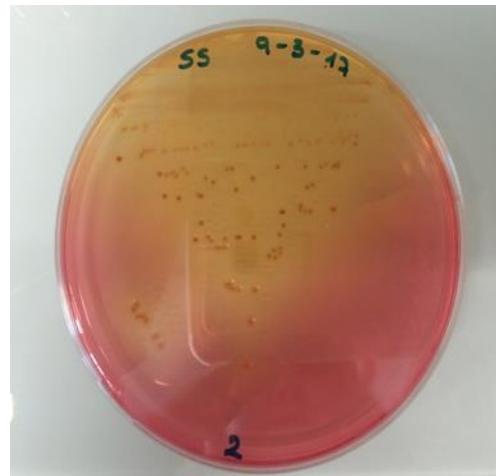


Figura 32: Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de *Salmonella* spp.

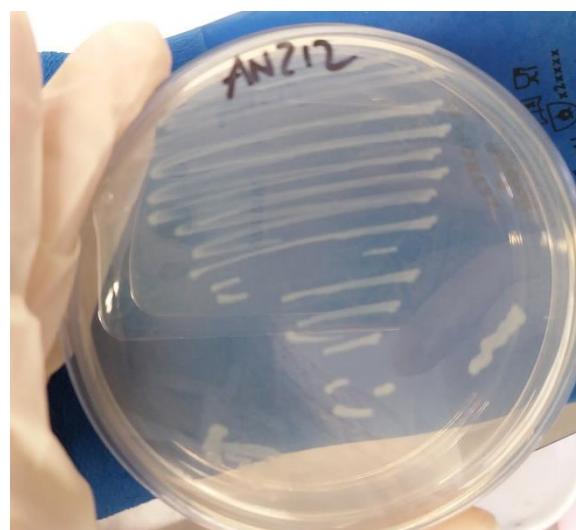


Figura 33: Placa de Petri de agar nutritivo con colonias.

## Ensayo con diferentes tipos de aguas.

### Ensayo con agua potable.

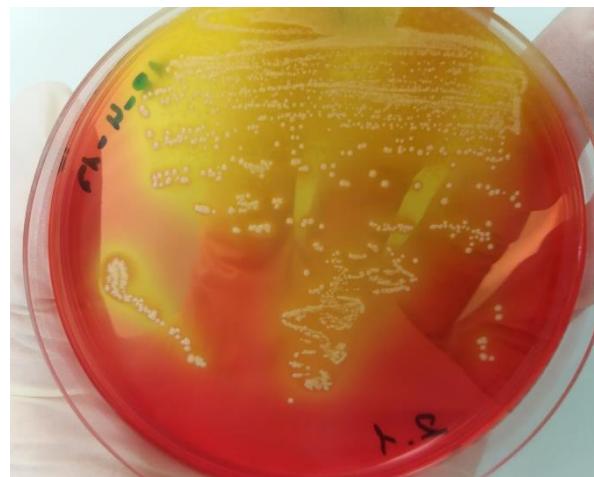


Figura 34: Placa de Petri de agar XLD con colonias características de *E. coli*.



Figura 35: Placa de Petri de agar SS con colonias características de *E. coli*.

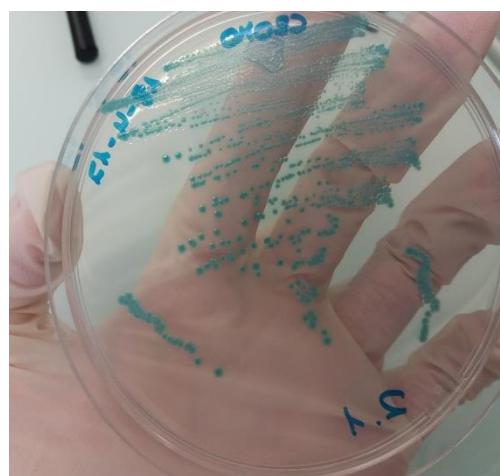


Figura 36: Placa de Petri de agar cromogénico con colonias características de *E. coli*.

### Ensayo con agua superficial.



Figura 37: Bote de 500 ml con agua superficial.

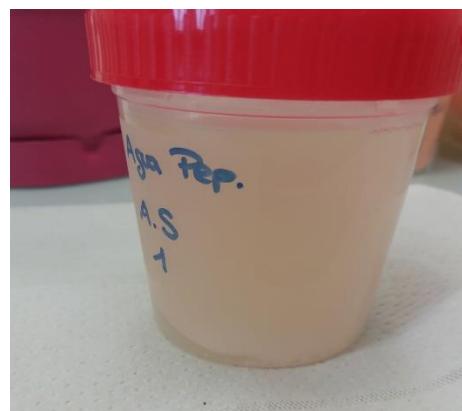


Figura 38: Anaclín con 100 ml de agua de peptona y con los filtros utilizados en la filtración del agua superficial.



Figura 39: Tubos de ensayo de Rappaport-Vassiliadis sembrados del agua de peptona.



Figura 40: Placa de Petri de agar XLD con una colonia típica de *Salmonella* spp. (colonia negra).



Figura 41: Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de *Salmonella* spp.



Figura 42: Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de *Salmonella* spp. (colonias moradas).

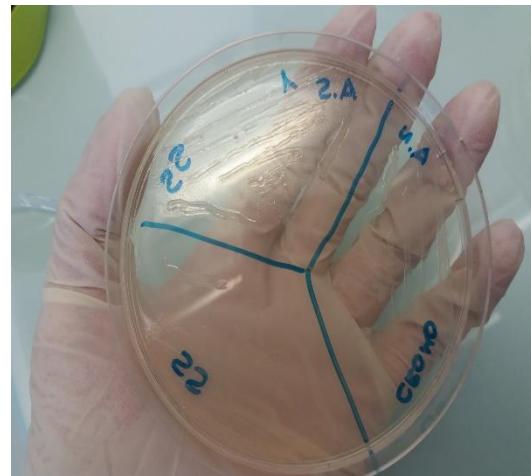


Figura 43: Placa de Petri de agar nutritivo con colonias provenientes de los agares SS y cromogénico.

#### Ensayo con agua residual.



Figura 44: Bote de 500 ml con agua de entrada a la depuradora (agua residual).

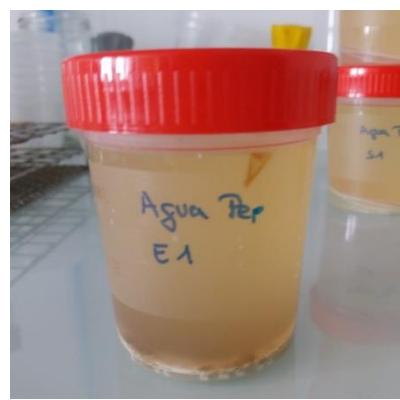


Figura 45: Anaclín con 100 ml de agua de peptona y los filtros utilizados en la filtración del agua residual.



Figura 46: Tubos de ensayo con Müller-Kauffmann y Rappaport-Vassiliadis sembrados del agua de peptona.



Figura 47: Placa de Petri de agar XLD con colonias típicas de *Salmonella* spp.

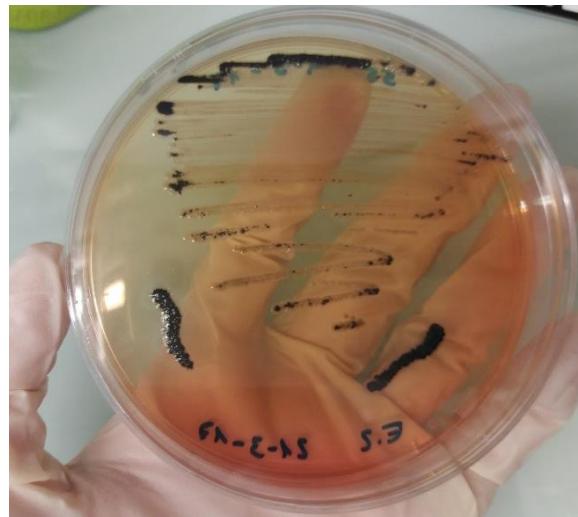


Figura 48: Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de *Salmonella* spp.

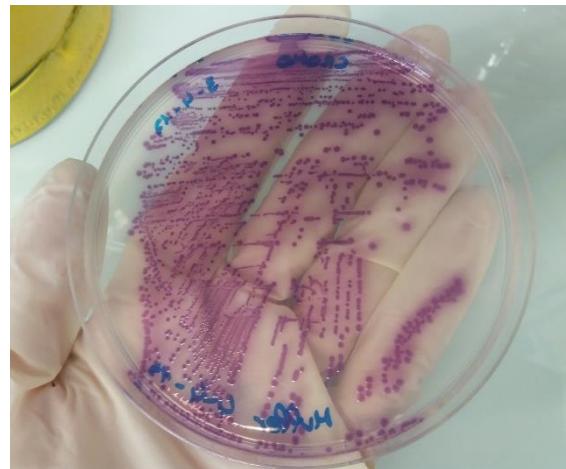


Figura 49: Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de *Salmonella* spp.



Figura 50: Placa de Petri de agar nutritivo con colonias provenientes del agar XLD.

### Ensayo con agua depurada.



Figura 51: Bote de 500 ml con agua de la salida de la depuradora (agua depurada).



Figura 52: Anaclín con 100 ml de agua de peptona y los filtros utilizados en la filtración del agua depurada.

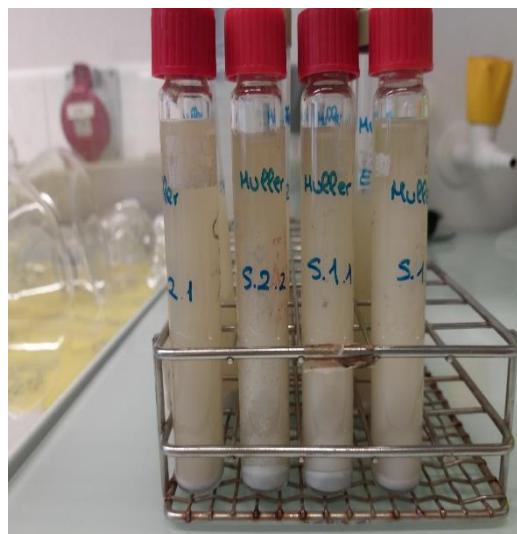


Figura 53: Tubos de ensayo con Müller-Kauffmann sembrados del agua de peptona.

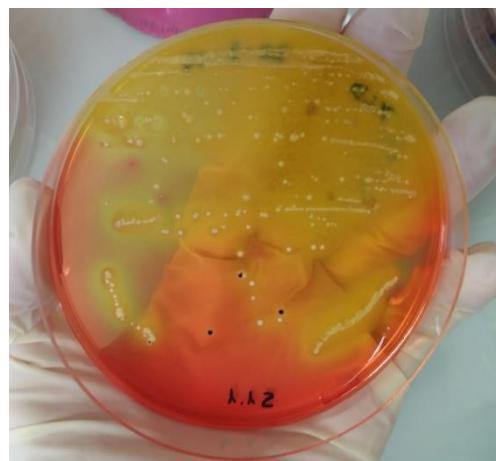


Figura 54: Placa de Petri de agar XLD con colonias típicas de *Salmonella* spp. (colonias negras).



Figura 55: Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de *Salmonella* spp.

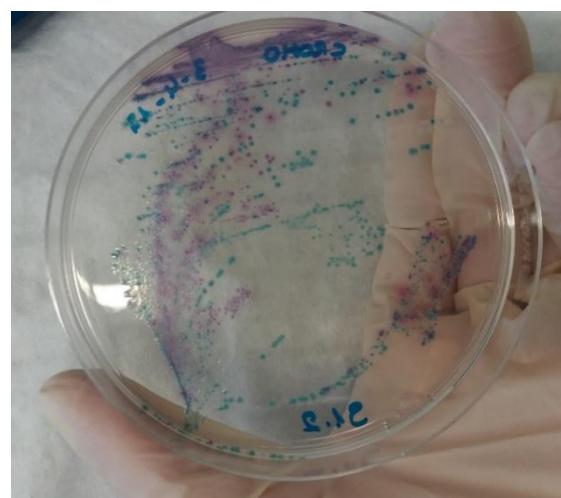


Figura 56: Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de *Salmonella* spp. (colonias moradas).

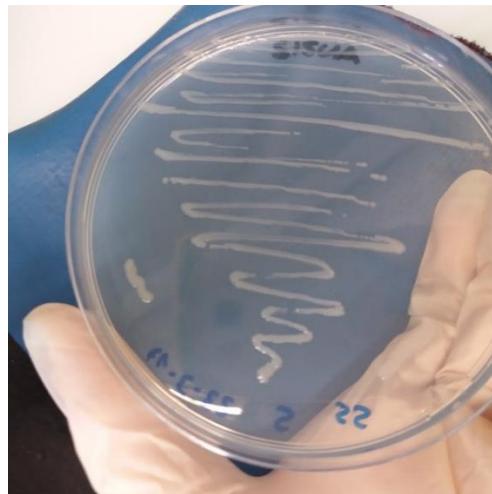


Figura 57: Placa de Petri de agar nutritivo con colonias provenientes del agar SS.

## Comparación entre depuradoras.

Ensayos con agua de la depuradora de Tudela (entrada y salida).



Figura 58: Anaclín con 100 ml de agua de peptona con los filtros utilizados en la filtración del agua de entrada a la depuradora de Tudela.

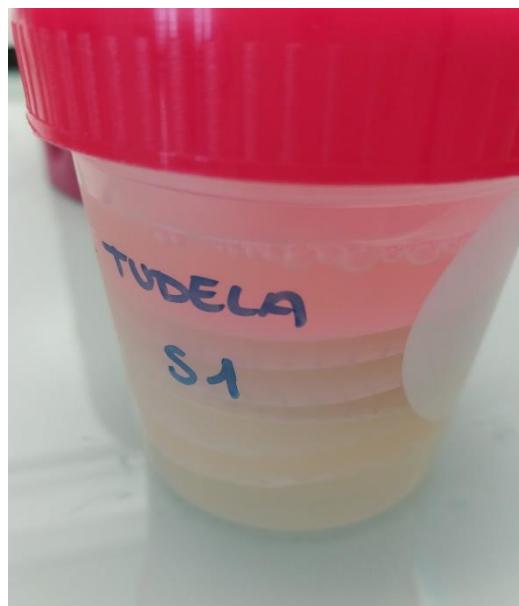


Figura 59: Anaclín con 100 ml de agua de peptona con los filtros utilizados en la filtración del agua de salida de la depuradora de Tudela.



Figura 60: Tubos de ensayo con Müller-Kauffmann y Rappaport-Vassiliadis sembrados del agua de peptona.



Figura 61: Placa de Petri de agar XLD con colonias típicas de *Salmonella* spp. provenientes del agua de la salida de la depuradora de Tudela.

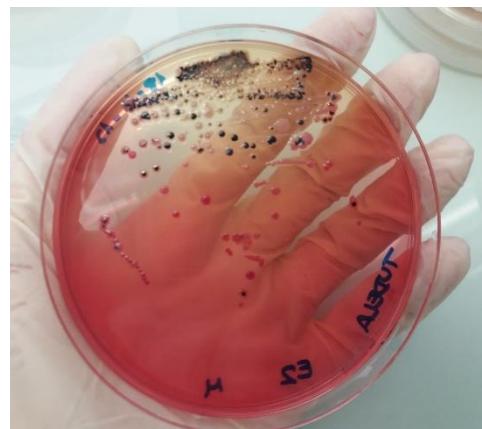


Figura 62: Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de *Salmonella* spp. provenientes del agua de entrada a la depuradora de Tudela.

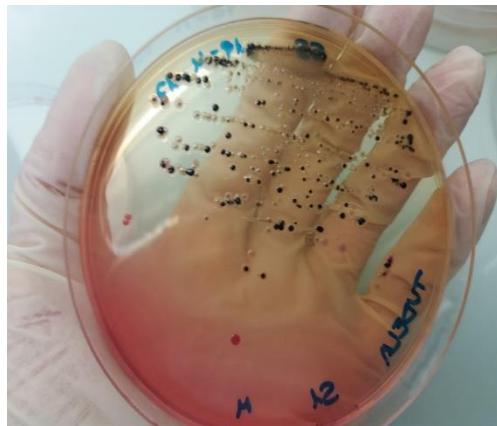


Figura 63: Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de *Salmonella* spp. provenientes del agua de salida de la depuradora de Tudela.

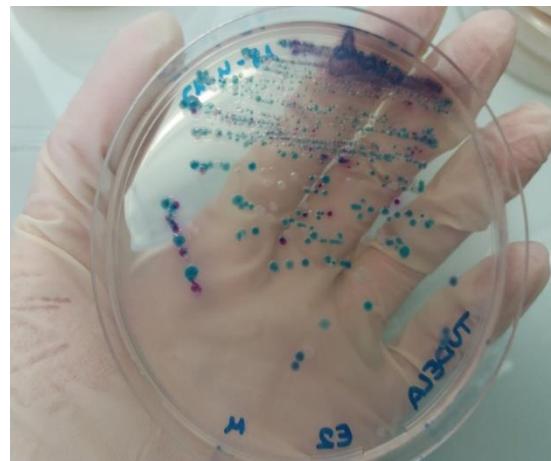


Figura 64: Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de *Salmonella* spp. (colonias moradas) provenientes del agua de entrada a la depuradora de Tudela.



Figura 65: Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de *Salmonella* spp. provenientes del agua de salida de la depuradora de Tudela.



Figura 66: Placa de Petri de agar nutritivo con colonias provenientes del agar XLD de la entrada a la depuradora de Tudela.



Figura 67: Placas de Petri de agar nutritivo con colonias provenientes del agar XLD de la salida de la depuradora de Tudela.



Figura 68: Test de aglutinación positivo para *Salmonella* spp. para el agua de entrada (1, 2 y 3) y salida (4, 5 y 6) de la depuradora de Tudela.

### Ensayos con agua de la depuradora de Valtierra (entrada y salida).

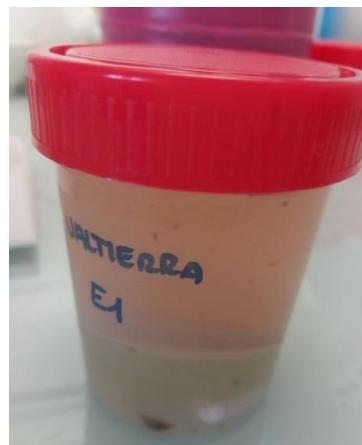


Figura 69: Anaclín con 100 ml de agua de peptona con los filtros utilizados en la filtración del agua de entrada a la depuradora de Valtierra.



Figura 70: Anaclín con 100 ml de agua de peptona con los filtros utilizados en la filtración del agua de salida de la depuradora de Valtierra.

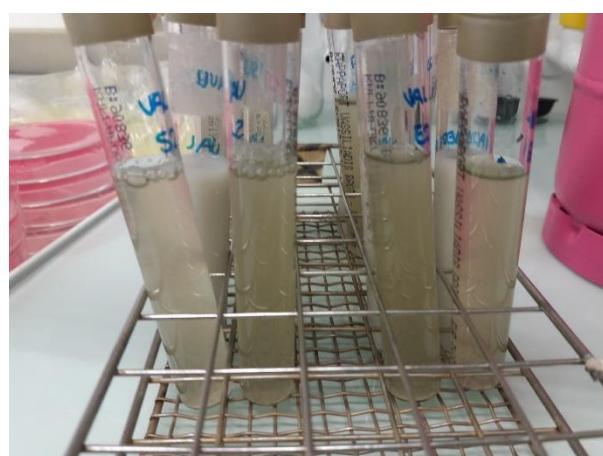


Figura 71: Tubos de ensayo con Müller-Kauffmann y Rappaport-Vassiliadis sembrados del agua de peptona.

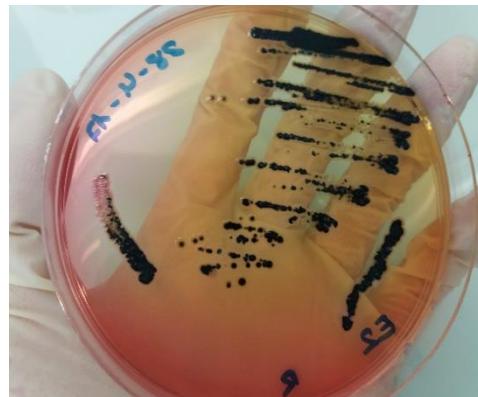


Figura 72: Placa de Petri de agar SS con colonias típicas de *Salmonella* spp. provenientes del agua de entrada a la depuradora de Valtierra.

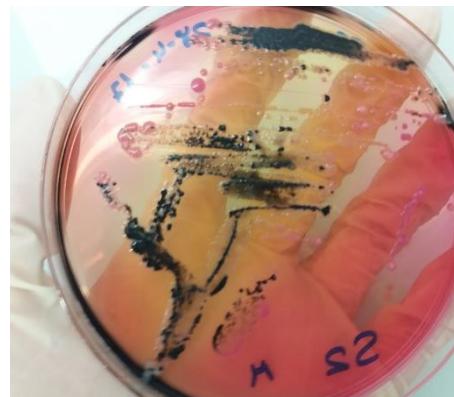


Figura 73: Placa de Petri con colonias típicas de *Salmonella* spp. provenientes del agua de salida de la depuradora de Valtierra.

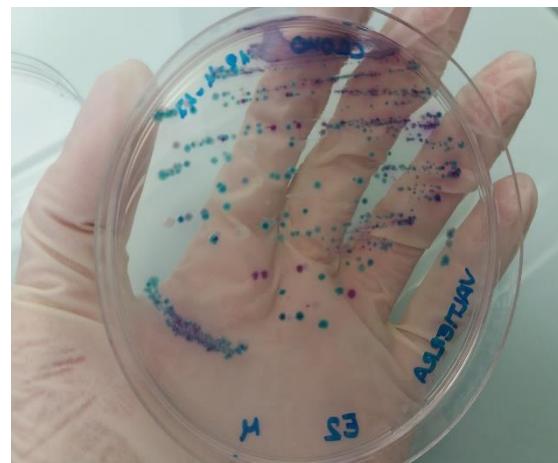


Figura 74: Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de *Salmonella* spp. provenientes del agua de entrada a la depuradora de Valtierra.

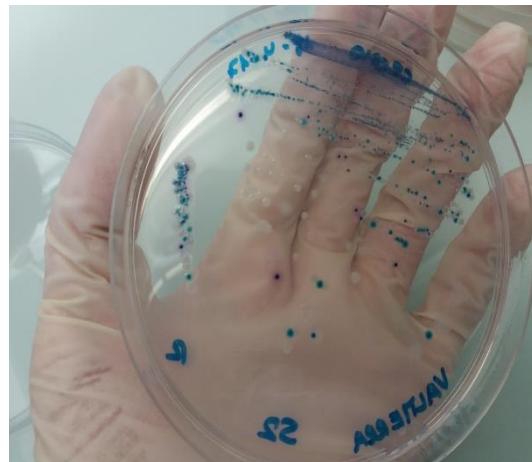


Figura 75: Placa de Petri de agar cromogénico con colonias típicas de *Salmonella* spp. provenientes del agua de salida de la depuradora de Valtierra.



Figura 76: Placa de Petri de agar nutritivo con colonias provenientes de los agares XLD, SS y cromogénico de la entrada a la depuradora de Valtierra.



Figura 77: Placa de Petri de agar nutritivo con colonias provenientes de los agares XLD, SS y cromogénico de la salida de la depuradora de Valtierra.

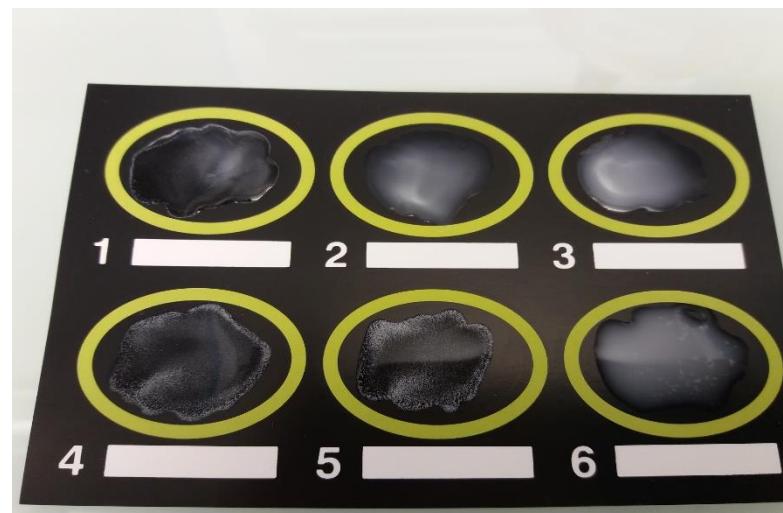


Figura 78: Test de aglutinación positivo para *Salmonella* spp. para el agua de entrada (4, 5 y 6) y negativo para la salida (1, 2 y 3) de la depuradora de Valtierra.