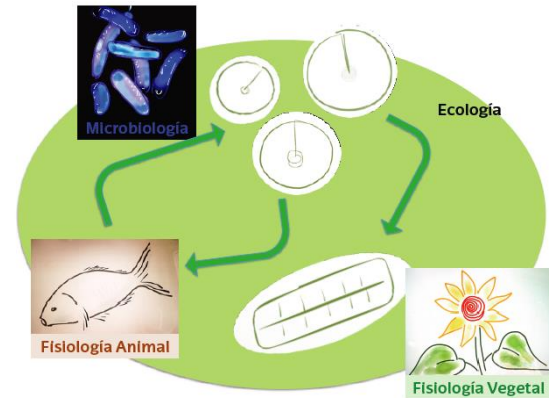


Evaluación del Impacto ambiental (EIA) de la localización de una estación depuradora de aguas residuales

Tema 3. Autodepuración. Recuperación de los cauces tras el vertido. Ensayos microbiológicos

Inés

ina



Tema 3

Autodepuración. Recuperación de los cauces tras el vertido.

Ensayos microbiológicos

1. Problemática de las aguas residuales

1.1. Origen

1.2. Composición

1.3. Alteraciones de los cauces receptores

2. Autodepuración

3. Parámetros de calidad de las aguas.

3.1. Indicadores

3.2. Indicadores fisico-químicos

3.3. Indicadores microbianos

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 1.1. Origen.
- 1.2. Composición.
- 1.3. Alteraciones de los cauces receptores.

ACTIVIDAD HUMANA

1. Desagües de caseríos

Residuos de animales y personas (excrementos y efluentes líquidos)

Animales: Mayor concentración residuos orgánicos

Microorganismos fecales y materia orgánica

Importantes en arroyos de poco caudal

2. Ciudades y pueblos: alcantarillado

Aguas residuales urbanas (aguas negras o aguas residuales)



- 1. Problemática de las aguas residuales.**
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 1.1. Origen.**
- 1.2. Composición.
- 1.3. Alteraciones de los cauces receptores.

LEGISLACIÓN: NORMATIVA ESTRICTA

1. 2000 personas-equivalentes

Colectores

Vertido a estuarios: Tratamiento secundario

2. 10.000 personas-equivalentes

Colectores y tratamiento secundario

- 1. Problemática de las aguas residuales.**
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 1.1. Origen.**
- 1.2. Composición.
- 1.3. Alteraciones de los cauces receptores.

TIPOS DE AGUAS RESIDUALES (muy distintos)

1. Residuales urbanas (sewage)

2. Residuales industriales

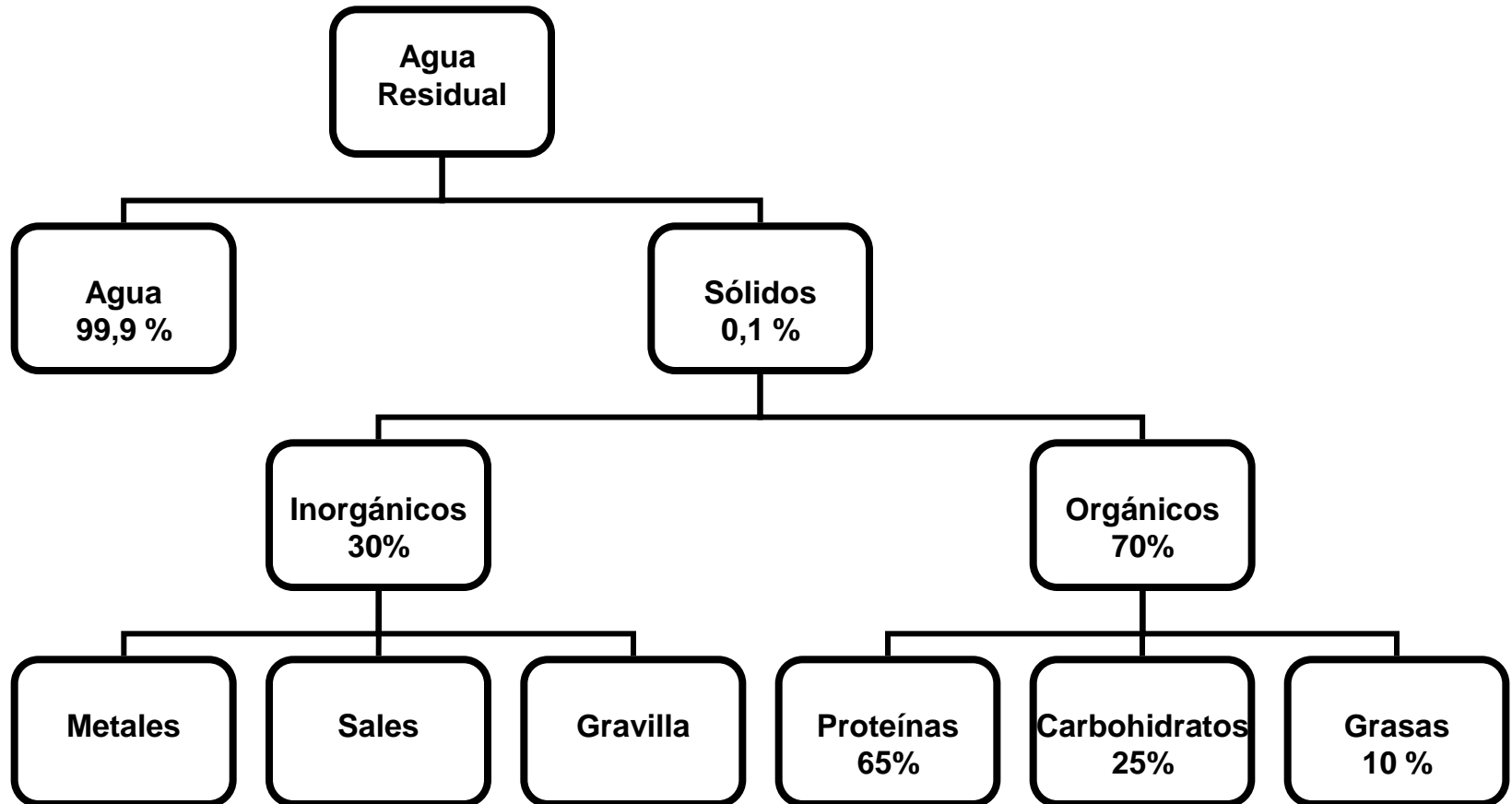
Cada industria un tipo de agua residual (muy heterogéneas)

3. Residuales agricultura

Mas concentradas que las aguas residuales urbanas

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 1.1. Origen.
- 1.2. Composición.
- 1.3. Alteraciones de los cauces receptores.



- 1. Problemática de las aguas residuales.**
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 1.1. Origen.
- 1.2. Composición.
- 1.3. Alteraciones de los cauces receptores.

TIPOS DE AGUAS RESIDUALES (muy distintos)

1. Residuales urbanas (sewage)

2. Residuales industriales

Cada industria un tipo de agua residual (muy heterogéneas)

3. Residuales agricultura

Mas concentradas que las aguas residuales urbanas

- 1. Problemática de las aguas residuales.**
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 1.1. Origen.
- 1.2. Composición.
- 1.3. Alteraciones de los cauces receptores.

AGUAS RESIDUALES DE PAISES DESARROLLADOS

1. Normalmente muy diluidas

99,9% agua

< 0,1% sólidos secos

2. Plantas depuradoras

Diseñadas para tratar grandes volúmenes de agua

Traslado fácil a plantas

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 1.1. Origen.
- 1.2. Composición.
- 1.3. Alteraciones de los cauces receptores.

CONTENIDO EN MATERIA ORGÁNICA DE LAS AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS

1. Azúcares: Descomposición de alcoholes, ácidos y CO₂.

Compuestos de difícil degradación: Celulosa,....

2. Urea y proteínas: Urea rápidamente se descompone y genera amonio.

Proteínas so la principal fuente de N y de olores a putrefacción y color negro.

Producción H₂S en ausencia de oxígeno.

3. Grasas: Difícil descomposición, forman películas. Interferencia en la actividad biológica

4. Agentes tensoactivos: Disminuye la tensión superficial.

Productos limpieza producen espumas (interfase aire-agua)

5. Fenoles: Origen industrial.

Sabores, reacción con cloro

6. Herbicidas, pesticidas,

7. Contaminantes emergentes: hormonas, antibióticos, drogas, etc.



- 1. Problemática de las aguas residuales.**
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 1.1. Origen.
- 1.2. Composición.
- 1.3. Alteraciones de los cauces receptores.

AGUAS RESIDUALES URBANAS

Composición y concentración:

1. Por un lado: Constante

Todas las aguas residuales urbanas se parecen en su composición

2. Por otro: Variable

Temporal: Hora del día, Día de la semana, Mes del año

Pluviosidad

Variaciones en el sistema alcantarillado



- 1. Problemática de las aguas residuales.**
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 1.1. Origen.
- 1.2. Composición.
- 1.3. Alteraciones de los cauces receptores.

AGUAS RESIDUALES URBANAS

Volumen. Depende de:

- 1. N° de habitantes**
- 2. Costumbres**
- 3. Nivel de vida (mayor nivel de vida mayor consumo de agua)**
- 4. Estaciones del año**
- 5. Clima de la zona**



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 1.1. Origen.
- 1.2. Composición.
- 1.3. Alteraciones de los cauces receptores.

ALTERACIONES POR VERTIDO

Características fisico-químicas

Color/turbidez

Temperatura

Tensión superficial

Materia orgánica

Sustancias nuevas (tóxicos)

pH

O₂ disuelto

Salinidad



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 1.1. Origen.
- 1.2. Composición.
- 1.3. Alteraciones de los cauces receptores.

ALTERACIONES POR VERTIDO

Características microbiológicas

Importancia del aporte de bacterias

1. Contaminación microbiana
2. Papel fundamental en el tratamiento aguas residuales

Cada persona aporta:

10^{11} coliformes / día

Otros microorganismos

Microorganismos patógenos (riesgo salud pública)



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

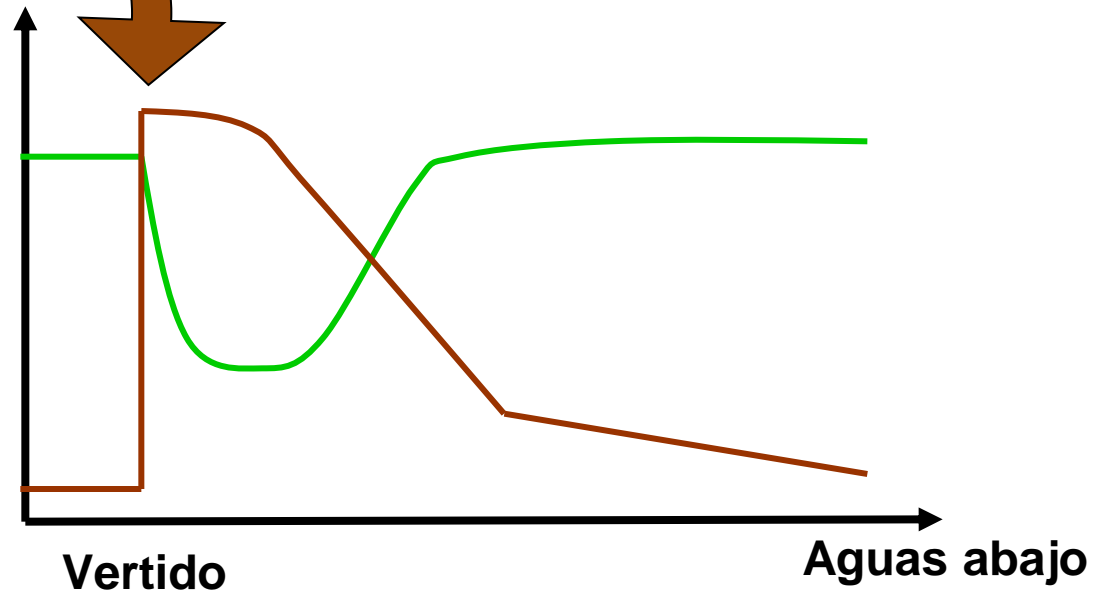
CONCEPTO DE AUTODEPURACIÓN

Suma de todos los procesos que devuelven un cuerpo de agua contaminado a su estado normal.

RESPUESTA HOMEOSTÁTICA

El sistema reacciona con el objetivo de recuperar las condiciones previas a la entrada del vertido.

1. Problemática de las aguas residuales.
2. **Autodepuración.**
3. Parámetros de calidad de las aguas.



Oxígeno

Materia orgánica
DBO
Bacterias fecales



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

PROCESOS DE AUTODEPURACIÓN

1. Sedimentación
2. Reacciones químicas y bioquímicas en agua y sedimento
3. Intercambio de gases con la atmosfera: entrada de O_2 , salidas de CO_2 y N_2
4. **Autodepuraciones biológicas:** Conjunto de reacciones que causan cambios en los compuestos del agua (contaminantes) debido a la actividad de los organismos vivos (microorganismos). Metabolismo microbiano.
5. **Autodepuraciones bacterianas:** Depuración/Eliminación de todos los tipos de bacterias, especialmente las de origen fecal.



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. **Parámetros de calidad de las aguas.**

- 3.1. Indicadores.**
- 3.2. Indicadores físico-químicos.
- 3.3. Indicadores microbianos.

PARÁMETROS QUE PERMITEN DETERMINAR LA CALIDAD DE LAS AGUAS

1. Relación extensa. Inaplicable.
2. Desarrollo del concepto de indicador.

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. **Parámetros de calidad de las aguas.**

- 3.1. Indicadores.**
- 3.2. Indicadores físico-químicos.
- 3.3. Indicadores microbianos.

CONCEPTO DE INDICADOR

1. Absolutamente imposible de analizar cada una de las alteraciones (cuantitativa y cualitativamente)
2. Racional y útil utilizar Indicadores
3. Elección: aquellos parámetros que se verán alterados en un agua polucionada

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores fisico-químicos.**
- 3.3. Indicadores microbianos.

INDICADORES FISICO-QUÍMICOS

De acuerdo con la legislación:

1. Muchas características fisico-químicas que deben ser analizadas.
2. Diferentes métodos de detección descritos.

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. **Parámetros de calidad de las aguas.**

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos.**
- 3.3. Indicadores microbianos.

http://www.magrama.gob.es/es/costas/legislacion/normativa_nacional.aspx

<http://ocw.uc3m.es/ingenieria-quimica/ingenieria-ambiental/otros-recursos-1/OR-F-001.pdf>

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos.**
- 3.3. Indicadores microbianos.

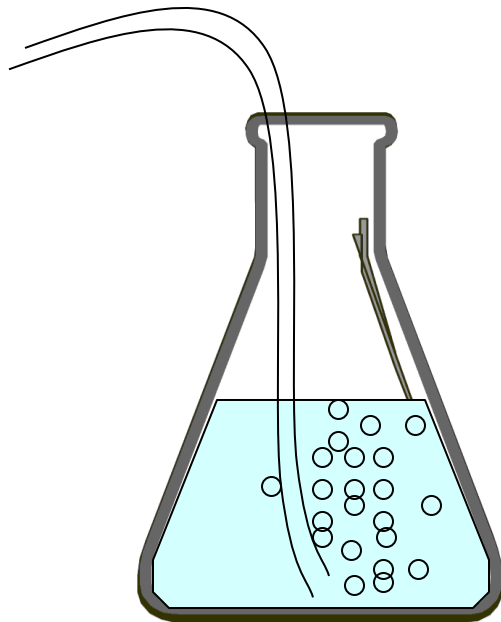
DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO – BOD)

Cantidad de oxígeno disuelto consumido por los microorganismos para la oxidación bioquímica de materia orgánica e inorgánica.

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos.
- 3.3. Indicadores microbianos.

DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO – BOD)



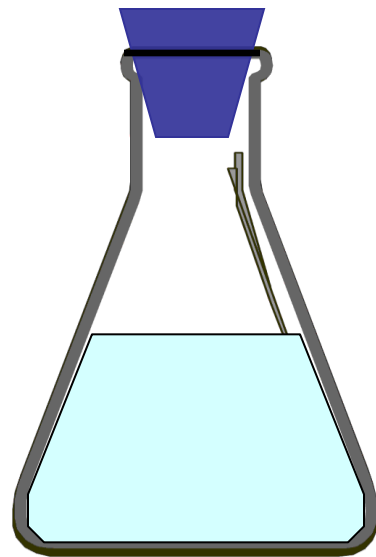
Muestra

**Burbujeo de O_2 (hasta saturación)
(T^a influye)**

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos.
- 3.3. Indicadores microbianos.

DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO – BOD)



Muestra

Medida O_2 disuelto t_0 control)

X mg O_2 / l

Cerrar botella e Incubación:

- $t = 5$ días
- Oscuridad
- T^a constante ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$)

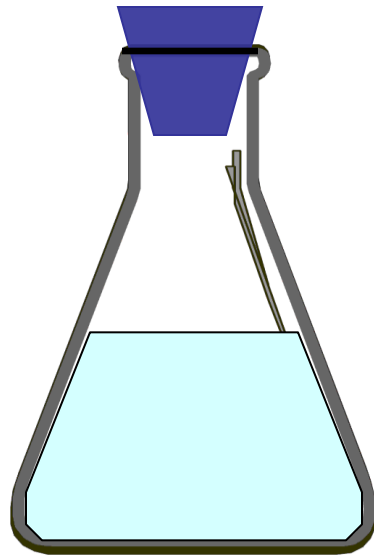
Medida O_2 disuelto t_5 días

Y mg O_2 / l

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos.
- 3.3. Indicadores microbianos.

DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO – BOD)



Muestra

Demanda Bioquímica de O₂

$$\boxed{X} - \boxed{Y} \quad \text{mg O}_2 / \text{l}$$

0 - 5 días

$\boxed{\text{DBO}_5}$

Situaciones puntuales

DBO_{21}

Actividad de quimiolitotrofas



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

EJEMPLOS DE MICROORGANISMOS INTESTINALES

Especie o grupo	Ocurrencia (% de individuos)	Log densidad (por g)
Bacterias aerobias		
Cocos G +		
<i>Staphylococcus coagulasa</i> .	31-59	2-4
<i>Staphylococcus coagulasa</i> +	10-93	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	0-16	<1-5
<i>Enterococcus</i>	74-76	3-6
<i>Enterococcus faecalis</i>	100	5-6
Bacilos G +		
<i>Corynebacterium aeobias</i>	6.21	-
Bacilos G -		
Coliformes totales	87-100	7-9
<i>Escherichia coli</i>	87-100	7-9
Coliformes fecales	96-100	7-9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.15	3-5
Bacterias anaerobias o microaerofilas		
Bacilos G +		
<i>Bifidobacterium</i> .		8-9
<i>Clostridium perfringens</i>	13-35	6-7
<i>Lactobacilli</i>	66	7-10
Virus entéricos		
Poliovirus	0-70	0-7
Adenovirus	0-77	-
Hongos		
<i>Candida albicans</i>	14-31	<1-4
Protozoos		
<i>Entamoeba coli</i>	3-31	-
<i>Giardia lamblia</i>	3-15	-

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL

Coliformes fecales, *Escherichia coli*

Enterococos intestinales

Clostridium perfringens

Colifagos

Bacteroides

Enterovirus

...

OTROS INDICADORES

Pseudomonas aeruginosa ...

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

PERSONAS ENFERMAS: FUENTE DE PATÓGENOS

Salmonella

Shigella

Leptospira

Escherichia coli enteropatógena

Francisella

Vibrio (*V. cholerae*)

Mycobacterium (*M. tuberculosis*)

Virus entéricos humanos

Quistes de *Entamoeba histolytica*

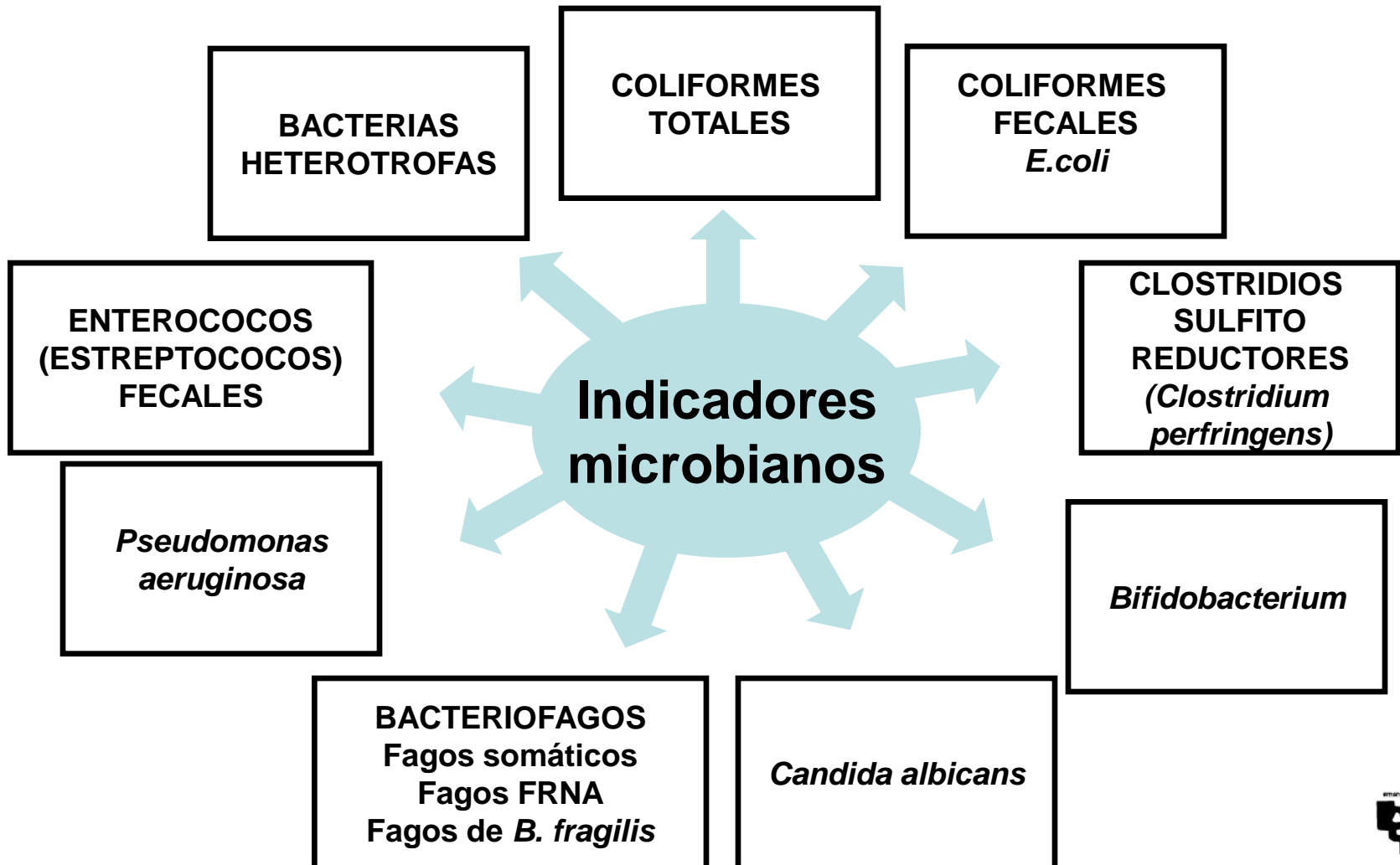
Gusanos parásitos

.....



- 1. Problemática de las aguas residuales.
- 2. Autodepuración.
- 3. Parámetros de calidad de las aguas.

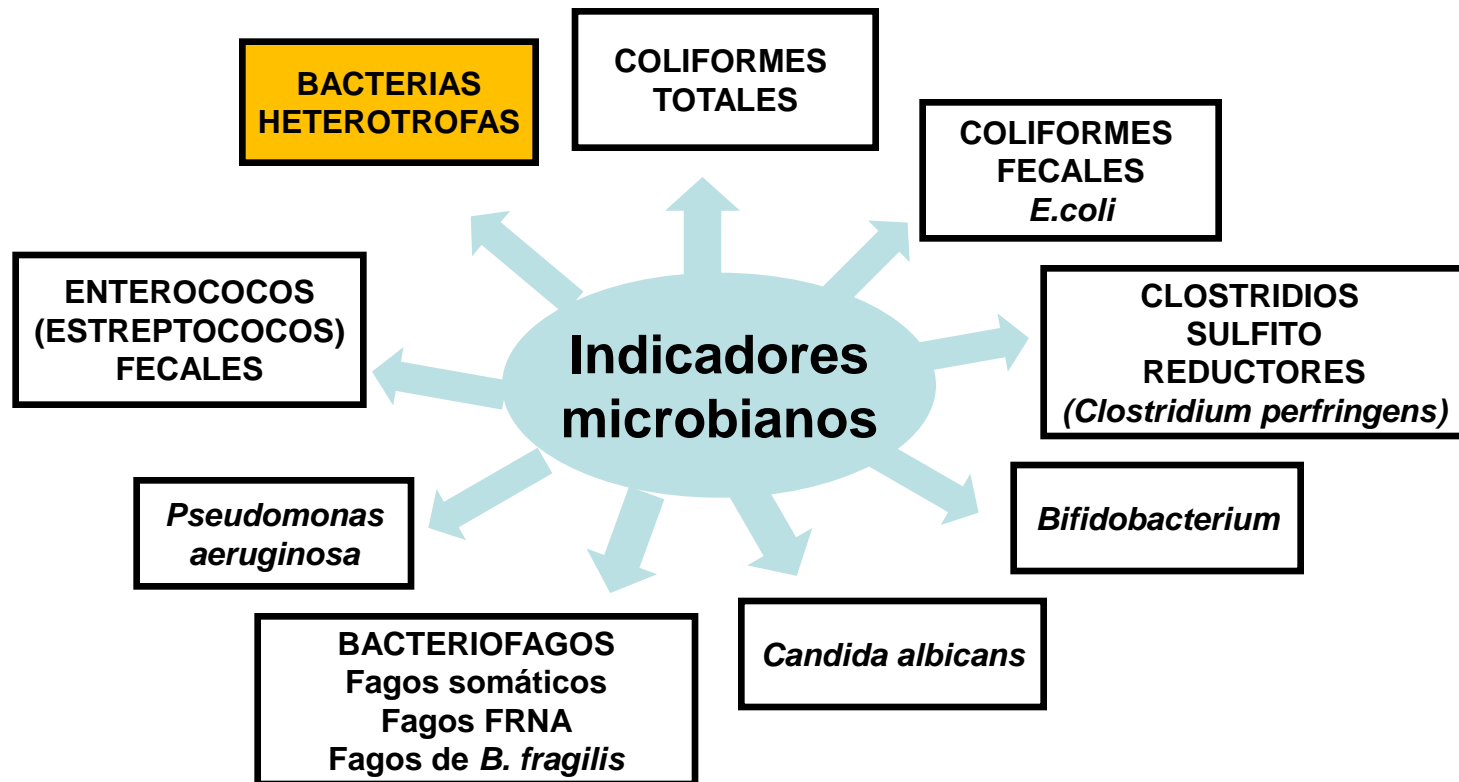
- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 6222:1999: Recuento de colonias por siembra en medio de cultivo de agar nutritivo. (ISO 6222:1999)



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 6222:1999

TIPO DE MUESTRAS

Aguas destinadas a consumo humano

Procesos de tratamiento del agua potable

Aguas de suministradas en recipientes cerrados

Aguas minerales naturales

Aplicación general todos los tipos de agua

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 6222:1999

DEFINICIONES

Microorganismos cultivables: Todas las bacterias aerobias, levaduras o mohos capaces de formar colonias en el medio específico y en las condiciones de ensayo descritas posteriormente.

22 °C y a 37°C

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 6222:1999

MEDIO DE CULTIVO: AGAR EXTRACTO DE LEVADURA

Triptona (peptona de caseína,...)	6,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Agar	15 g
Agua	1 l
pH	7,2 ± 0,2
Distribución en tubos	15-20 ml
Esterilización	121 ± 3 °C, 15 min

Uso: fundir los tubos, enfriar hasta $45 \pm 1^\circ\text{C}$ y mantener en baño de agua

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 6222:1999

PROCEDIMIENTO

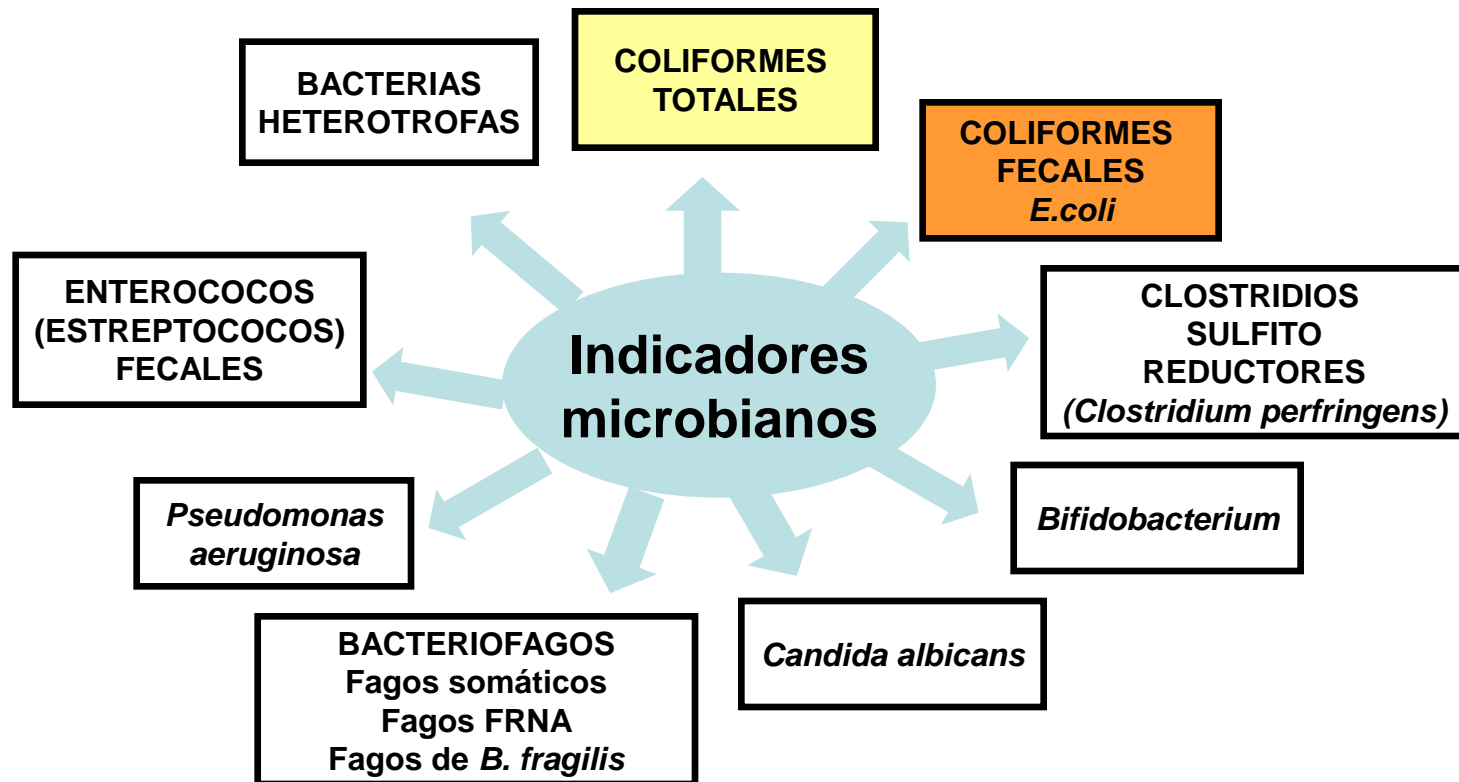
1. Preparar la muestra y las diluciones adecuadas (agua de peptona como diluyente)
2. Siembra en profundidad:
 - Muestra: 1-2 ml en placa vacía.
 - Añadir 15-20 ml de medio fundido.
 - Agitación suave y dejar solidificar
3. Una placa por temperatura, al menos.
4. Incubación:
 - Primera serie de placas: $36 (\pm 2) ^\circ\text{C}$, 44 (± 4) h
 - Segunda serie de placas: $22 (\pm 2) ^\circ\text{C}$, 68 (± 4) h
5. Recuento inmediato de colonias en cada placa (30-300 ufc).
6. Cálculo de Unidades Formadoras de Colonia/ml (UFC/ml).



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 9308-1:2001: Parte 1: Método de filtración en membrana. (ISO 9308-1:2000).



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 9308-1:2001: Parte 1

TIPO DE MUESTRAS

Aguas de consumo humano

MÉTODOS

Método estándar

Método rápido (detección < 24h)

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 9308-1:2001: Parte 1. Método estándar.

DEFINICIONES

1. Bacterias lactosa positivas: Bacterias capaces de formar colonias en condiciones aerobias a $36 (\pm 3) ^\circ\text{C}$ en un medio de cultivo lactosa selectivo y diferencial, con producción de ácido en $21 (\pm 3)$ h.

2. Bacterias coliformes: Bacterias lactosa positivas que son oxidasa negativas.

3. *Escherichia coli*: Bacterias coliformes que forman indol a partir de triptófano en $21 (\pm 3)$ h a en $44,0 (\pm 0,5) ^\circ\text{C}$.



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 9308-1:2001: Parte 1. Método estándar.

MEDIO DE CULTIVO: Agar de lactosa TTC con heptadecilsulfato de sodio

Medio base

- Lactosa 20 g
 - Peptona 10 g
 - Extracto de levadura 6 g
 - Extracto de carne 5 g
 - Azul de bromotimol 0,05 g
 - Agar 15 g
 - Agua destilada 1.000 ml
- pH a 7,2, esterilizar (121 °C, 15 min)

Solución TTC

- Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) 0,05 g
 - Agua destilada 100 ml
- Esterilizar (filtración 0,2 µm)

Solución de heptadecilsulfato de sodio

- Heptadecilsulfato de sodio 0,2 g
 - Agua destilada 100 ml
- Esterilizar (121 °C, 15 min)

Medio completo

- Medio base 100 ml
- Solución de TTC 5 ml
- Solución de heptadecilsulfato de sodio

5 ml

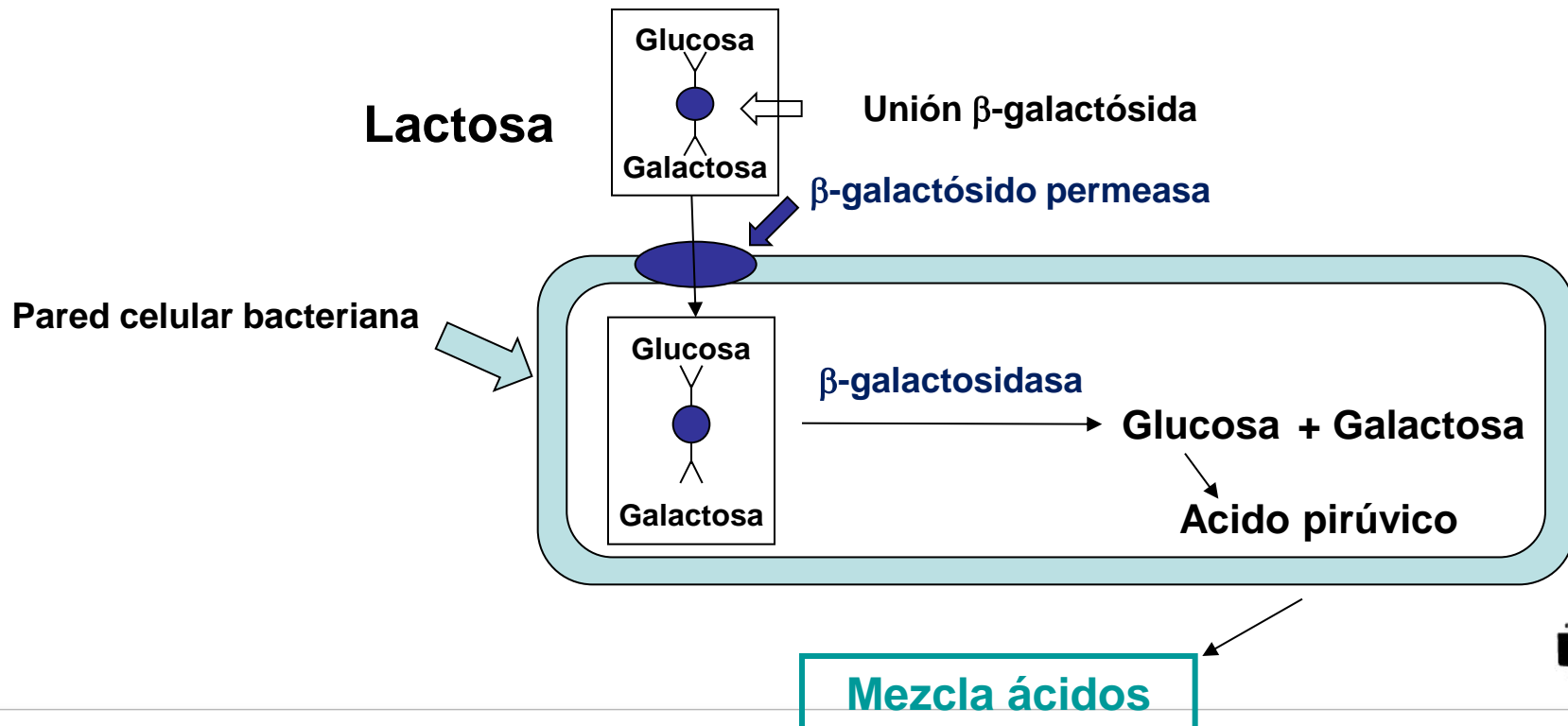


1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 9308-1:2001: Parte 1. Método estándar.

BASE BIOQUÍMICA: Fermentación de lactosa con producción de ácidos



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 9308-1:2001: Parte 1.

TIPO DE MUESTRAS

Aguas de consumo humano

MÉTODOS

Método estándar

Método rápido (detección < 24h)

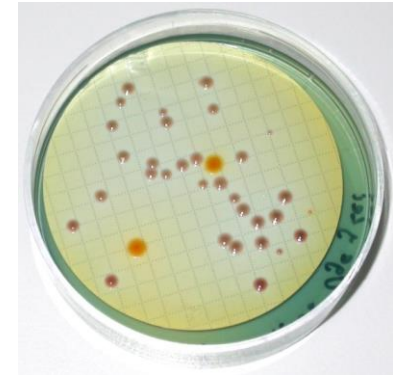
1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 9308-1:2001: Parte 1. Método estándar.

BACTERIAS LACTOSA POSITIVAS

- **Azul de bromotimol:** $\text{pH} < 6 = \text{amarillo}$
 $\text{pH} > 7,6 = \text{azul}$
- **Formación de un halo amarillo:** Examen colonias sobre la membrana y de los halos en la capa de agar subyacente a la membrana.
- **Recuento de aquellas colonias** que presentan halo amarillo.



Medio poco selectivo

- Detección de bacterias dañadas
- Crecimiento bacterias microbiota bacteriana general (aguas no desinfectadas)



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 9308-1:2001: Parte 1. Método estándar.

PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN

Oxidasa: - (coliformes)

Producción de indol: + (*E. coli*)

Nº colonias (mínimo 10 representativas)

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 9308-1:2001: Parte 1. Método estándar.

PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN. Coliformes. Oxidasa

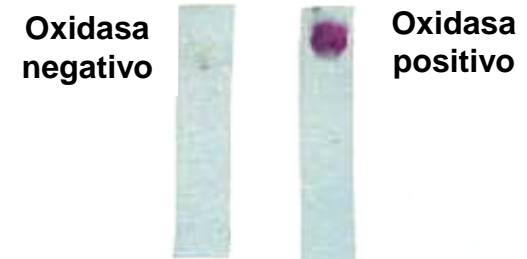
1. Crecer en Agar no selectivo: Agar triptonado de soja (TSA)

Peptona de caseína	15,0 g
Peptona de soja	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 L
pH 7,2. Esterilizar (121°C, 15 min)	

2. Incubar a 36 (\pm 2) °C durante 21 (\pm 2) h

3. Determinar presencia de citocromo c oxidasa.

Adición de reactivo: Hidrocloruro de tetrametil-p-fenilendiamina (Aceptor artificial de electrones) que al oxidarse rinde azul de indofenol.



Indicador
Incoloro → color purpura, azul

Coliformes: oxidasa -
Require: control + / control -



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 9308-1:2001: Parte 1. Método estándar.

PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN.

Escherichia coli. Indol.

1. Caldo de cultivo de triptófano. Distribuir

3 ml / tubo de ensayo

Peptona de caseína 10,0 g

L-triptófano 1,0 g

Cloruro de sodio 5,0 g

Agua destilada 1 L

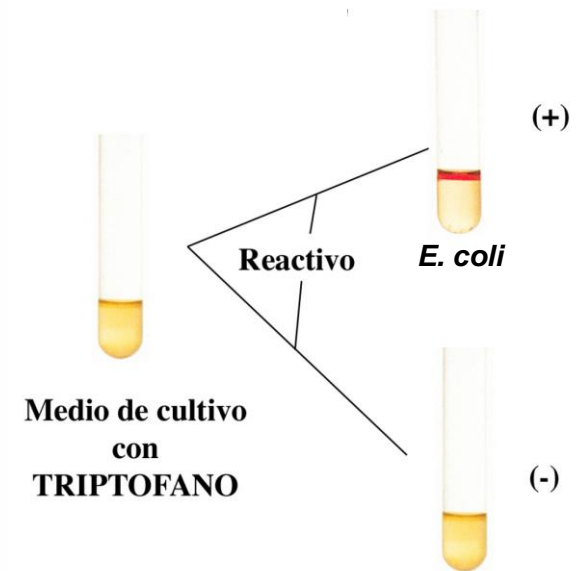
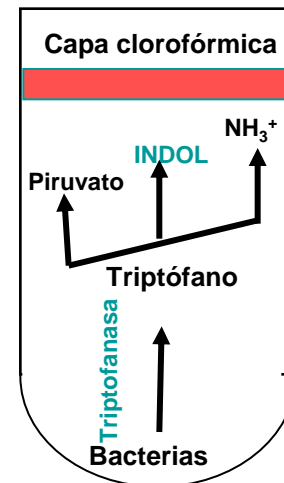
pH 7,5. Esterilizar (121°C, 15 min)

2. Incubar a 44,0 (± 0,5)°C durante 21 (± 3)

h

3. Añadir reactivo de Ehrlich o de Kovacs

(p-dimetilaminobenzaldehído)



Klebsiella pneumoniae
Enterobacter aerogenes

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 9308-1:2001: Parte 1. Ensayo rápido.

DEFINICIÓN de *Escherichia coli*

Bacterias resistentes a la bilis y que, además, producen indol a partir de triptófano en 21 (\pm 3) h a 44,0 (\pm 0,5) $^{\circ}$ C.

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 9308-1:2001: Parte 1. Ensayo rápido.

PROCEDIMIENTO

1. Tras la filtración, colocar la membrana sobre agar TSA.
2. Incubar a $36 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante 4 - 5 h.
3. Colocar la membrana sobre medio Agar triptonado de sales biliares (TBA).

Triptona 20,0 g

Sales biliales 1,5 g

Agar 15,0 g

Agua destilada 1 L

pH 7,2. Esterilizar (121°C , 15 min)

Repartir en placas (espesor > 5 mm)

4. Incubación $44,0 (\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ durante 19-20 h.
5. Trasladar la membrana sobre papel de filtro saturado en reactivo de indol.
6. Irradiar con luz UV: 10-30 minutos.
7. Colonias de color rojo: *Escherichia coli*.



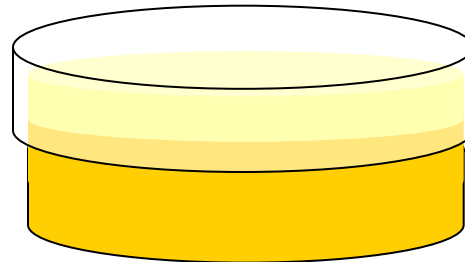
1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 9308-1:2001: Parte 1. Ensayo rápido.

PROCEDIMIENTO

1. Tras la filtración, colocar la membrana sobre agar TSA/TBA.



Agar TSA (1 mm)

Agar TBA (> 5 mm)

2. Incubar a $36 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante 4 - 5 h.
3. Incubación $44,0 (\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ durante 19-20 h.
4. Realizar la prueba de indol.
5. Colonias de color rojo: *Escherichia coli*.

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

MÉTODO ALTERNATIVO. Orden SCO/778/2009 de 17 de Marzo.

Método de detección y recuento de bacterias coliformes y de *Escherichia coli* en aguas de consumo por filtración de membrana utilizando agar cromogénico para coliformes (ACC) (Chromocult Coliform Agar).

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

MÉTODO ALTERNATIVO

DEFINICIONES

1. **Bacteria coliforme:** Miembro de la familia Enterobacteriaceae que expresa el enzima β -D-galactosidasa.
2. ***Escherichia coli*:** Miembro de la familia Enterobacteriaceae que expresa los enzimas β -D-galactosidasa y β -D-glucuronidasa.

Actividad β -D-glucuronidasa: Gen *nidA*

- Funcional en 97% de cepas de *E. coli*
- Algunas cepas de *Salmonella* y *Shigella* presentan gen funcional. En cualquier caso, no interfiere: se rechazará.



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

MÉTODO ALTERNATIVO.

MEDIO DE CULTIVO: Agar cromogénico para coliformes (ACC)

Medio base

- Peptona 3,0 g
- Cloruro sódico (NaCl) 5,0 g
- Dihidrogenofosfato sódico (NaH₂PO₄) 2,2 g
- Hidrogenofosfato disódico (Na₂HPO₄) 2,7 g
- Triptófano 1,0 g
- Piruvato sódico 1,0 g
- **Tergitol® 7** 0,15 g
- Sorbitol 1,0 g
- **Mezcla cromogénica (0.4 g)**
 - **Salmon-GAL - X-Glucuronico** 0.2 g (cada)
- Agar 10 g
- Agua destilada 1 L

pH final 6,8 ± 0,2

Disolver con baño maría o vapor fluente con agitación. No esterilizar en autoclave ni sobrecalentar.

No es necesario añadir las soluciones siguientes si no hay microbiota acompañante abundante

Solución de vancomicina

- Vancomicina HCl 5 mg/5 ml agua destilada

Solución de cefsulodina:

- Cefsulodina (Sal sódica) 5 mg/5 ml agua destilada

Esterilizar por filtración (0,2 µm)

Medio completo:

- Medio base 1 L
- Solución de vancomicina 5 ml
- Solución de cefsulodina 5 ml

Fundir medio base y a 45-50°C añadir asépticamente las soluciones de vancomicina y de cefsulodina. Homogeneizar (evitar burbujas) y repartir en placas de Petri.



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

MÉTODO ALTERNATIVO.

SUSTRATOS CROMOGENICOS

Sustrato Salmon-Gal: Actividad β -D-Galactosidasa
Hidrólisis produce colonia salmón o rojo
Coliformes

Sustrato X-Glucurónico: Actividad β -D-Glucuronidasa
Hidrólisis produce colonia azul

PROCEDIMIENTO

1. Filtrar 100 ml de muestra (diámetro de poro: 0,45 μ m)
2. Colocar sobre placa con ACC
3. Incubar 21 (\pm 3) h a 36 (\pm 2) °C.

Si al cabo de 18 h: colonias rojas o incoloras, prolongar hasta las 24 h
(posibles reacciones tardías) .



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

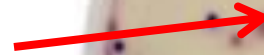
MÉTODO ALTERNATIVO

RESULTADOS

Bacterias coliformes (no *E. coli*):

β -galactosidasa +

β -glucuronidasa - (rosa a rojo)



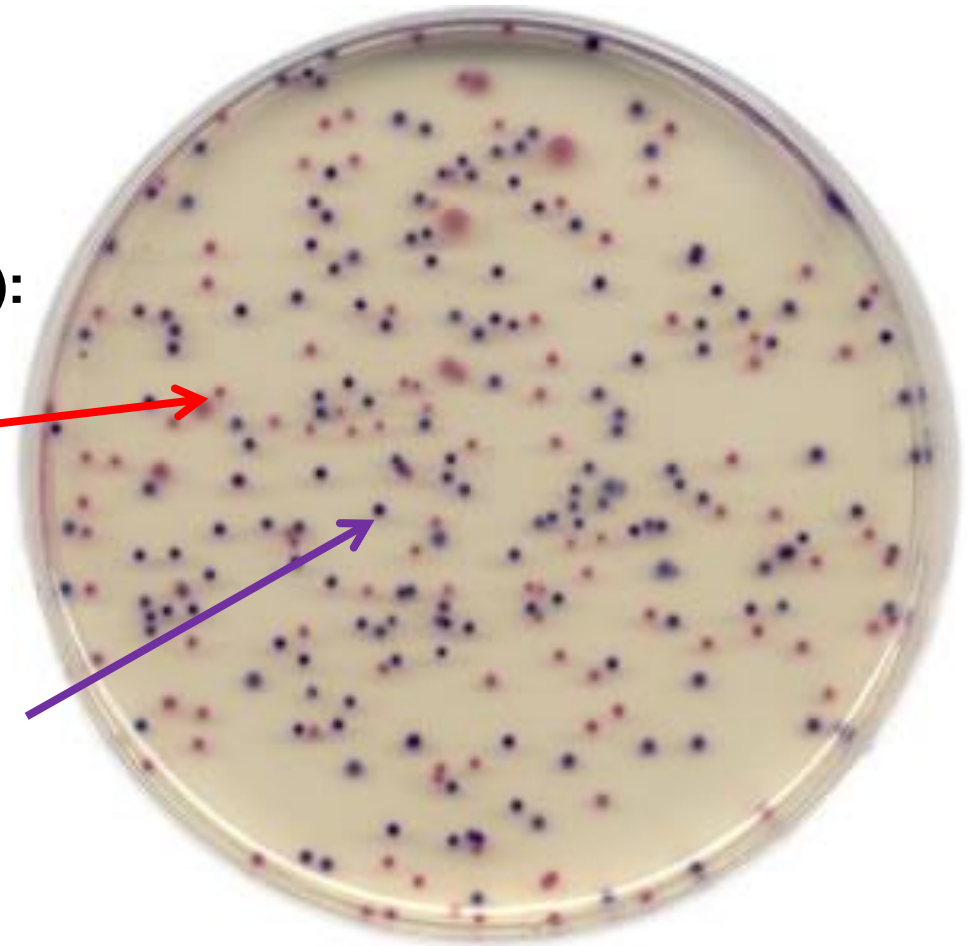
***E. coli*:**

β -galactosidasa +

β -glucuronidasa + (azul a violeta)



Coliformes totales: Suma de las dos



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 9308-3:1999

UNE-EN ISO 9308-3/AC:2000

Parte 3: Método miniaturizado (Número Más Probable) para la detección y recuento de *E. coli* en aguas superficiales y aguas residuales (ISO 9308-3:1998).

TIPO DE MUESTRAS

1. Aguas superficiales y residuales (particularmente con abundante cantidad de materias en suspensión).
2. No adecuada para aguas potables o aguas con valores $< (15 / 100 \text{ ml})$.



- 1. Problemática de las aguas residuales.
- 2. Autodepuración.
- 3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

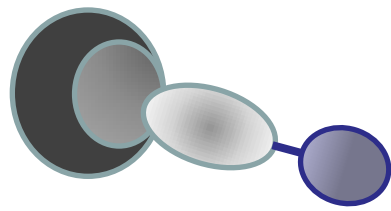
UNE-EN ISO 9308-3:1999

UNE-EN ISO 9308-3/AC:2000

SUSTRATOS FLUORESCENTES

Determinación de actividad β -D-glucuronidasa: 4-metilumbelliferil β -D-glucurónido (MUG) = fluorogénico

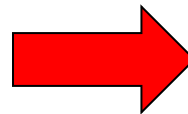
Escherichia coli



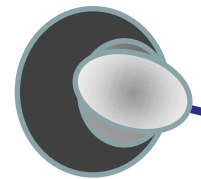
MUG
4-metilumbeliferil

β -glucuronidasasa

β -D-glucurónido



Escherichia coli



4-metilumbeliferona



β -glucuronidasasa:

β -D-glucurónido



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 9308-3:1999

UNE-EN ISO 9308-3/AC:2000

DEFINICIONES

Escherichia coli (*E. coli*): Microorganismo positivo para β -D-glucuronidasa, capaz de crecer en condiciones aerobias a 44°C en medio líquido especificado que contiene 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronido (MUG).



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 9308-3:1999

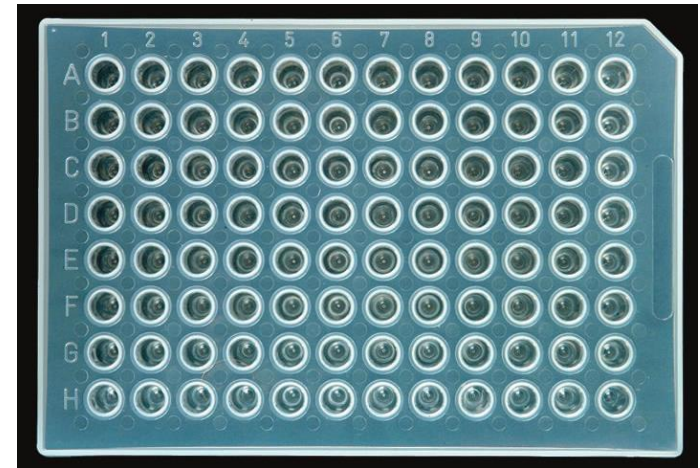
UNE-EN ISO 9308-3/AC:2000

PROCEDIMIENTO

Medio MUG/EC

Triptona	40 g
Salicina	1 g
Triton X100	1 g
MUG	100 mg
Agua desmineralizada (destilada)	1 L
pH 6,9 ± 0,2. Esterilizar (filtración 0,2 µm)	

Resultados: Emisión de fluorescencia



**Distribución en microplacas 96 pocillos
100 µl/pocillo y deshidratar**

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 9308-3:1999

UNE-EN ISO 9308-3/AC:2000

PROCEDIMIENTO

Origen muestra	Nº diluciones	Nº pocillos /dilución	Limites bacterias/100 ml
Aguas de baño	2	64 pocillos a 1/2 32 pocillos a 1/20	15 a 3,5 10 ⁴
Aguas superficiales	4	24 pocillos de: 1/2, 1/20, 1/200 y 1/2.000	40 a 3,2 10 ⁶
Aguas residuales y de plantas depuradoras	6	16 pocillo a 1/2 hasta 16 pocillos a 1/200.000	60 a 6,7 10 ⁸

Nº de diluciones depende del grado de contaminación a analizar



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 9308-3:1999

UNE-EN ISO 9308-3/AC:2000

PROCEDIMIENTO

Diluyente especial

- Sal marina sintética 22,5 g
 - Solución azul de bromotimol (opcional) 10 ml
 - Agua desmineralizada o destilada 1.000 ml
- Esterilización (121 ± 3 °C, 15-20 min)

Diluciones

1. Aguas dulces y salobres (residuales) con salinidad < 30 g/kg. Diluciones con diluyente especial.
2. Agua de mar con salinidad ≥ 30 mg/kg. Dilución inicial con agua desmineralizada o destilada estéril y siguientes tubos con diluyente especial.



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 9308-3:1999

UNE-EN ISO 9308-3/AC:2000

PROCEDIMIENTO

1. Sembrar 200 ml/pocillo de cada dilución
2. Cubrir con banda adhesiva estéril desechable para evitar deshidratación y contaminación.
3. Incubar a $44 (\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ de 36 h a 72 h.
4. Lectura bajo luz UV (366 nm):
Escherichia coli: Hidrólisis de MUG = fluorescencia azul (+)

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 9308-3:1999/UNE-EN ISO 9308-3/AC:2000

CÁLCULO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

Siembra: 3 o más diluciones:

- 1/2 **24 positivos** de 24
- 1/20 **18 positivos** de 24
- 1/200 **5 positivos** de 24
- 1/2000 **1 positivos** de 24

Número 3 dígitos característico: **18/5/1**

CN/NC/CZ			MPN/NPP	LO/LI/UG	UP/LS/OG
18/24	4/24	0/24	14.33	9.14	22.47
18/24	4/24	1/24	15.08	9.65	23.58
18/24	4/24	2/24	15.85	10.16	24.73
18/24	4/24	3/24	16.63	10.68	25.9
18/24	4/24	4/24	17.42	11.2	27.09
18/24	5/24	0/24	15.14	9.68	23.66
18/24	5/24	1/24	15.91	10.2	24.81
18/24	5/24	2/24	16.69	10.72	25.99

Calculo estadístico: NMP/100 ml
(programa informático o Tabla del NMP)

18/5/1 → MPN = 15,91 bacteria/1ml.

MPN/100 ml = 15.910 bacteria/100ml.
(LO = 10.200; UP = 24.810)

NOTA

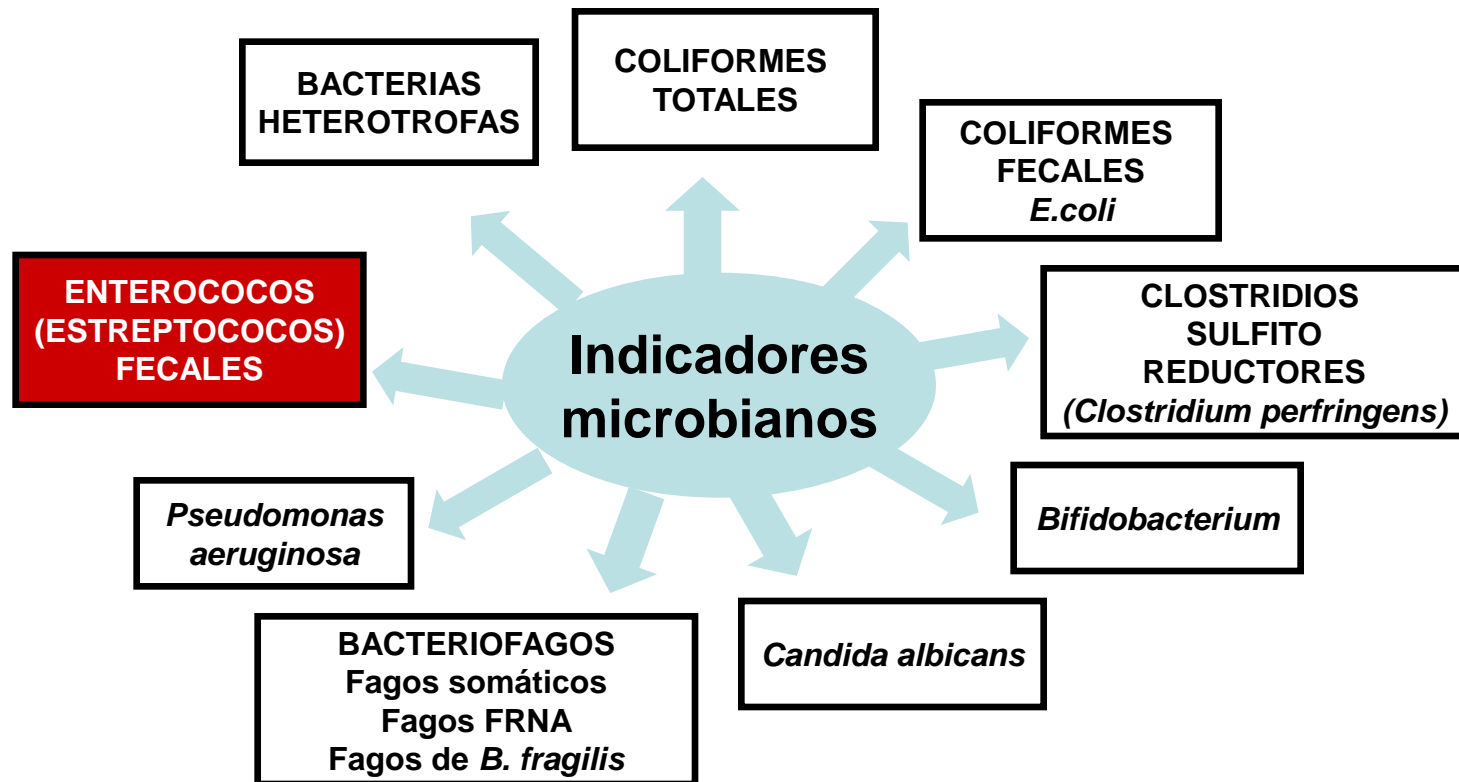
Último número: 0 cuando sea posible



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 7899-2:2001. Parte 2: Método de filtración de membrana. (ISO 7899-2:2000).



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 7899-2:2001. Parte 2: Método de filtración de membrana. (ISO 7899-2:2000).

TIPO DE MUESTRAS

- Aguas potables
- Aguas de piscinas
- Aguas limpias y desinfectadas

DEFINICIÓN

Enterococos intestinales: Microorganismos capaces de reducir el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) a formazán y de hidrolizar la esculina a 44°C sobre los medios especificados en esta norma.



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 7899-2:2001. Parte 2: Método de filtración de membrana. (ISO 7899-2:2000).

MEDIO DE CULTIVO: Medio Slanetz y Bartley

Medio base		Solución TTC	
Triptosa	20,0 g	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC)	1,0 g
Extracto de levadura	5,0 g	Agua destilada	100 ml
Glucosa	2,0 g	Esterilizar (filtración 0,2 µm)	
K ₂ HPO ₄	4,0 g		
Azida de sodio	0,4 g		
Agar	15 g		
Agua destilada	1 L		

Medio completo	
Medio base	1 L
Solución de TTC	10 ml



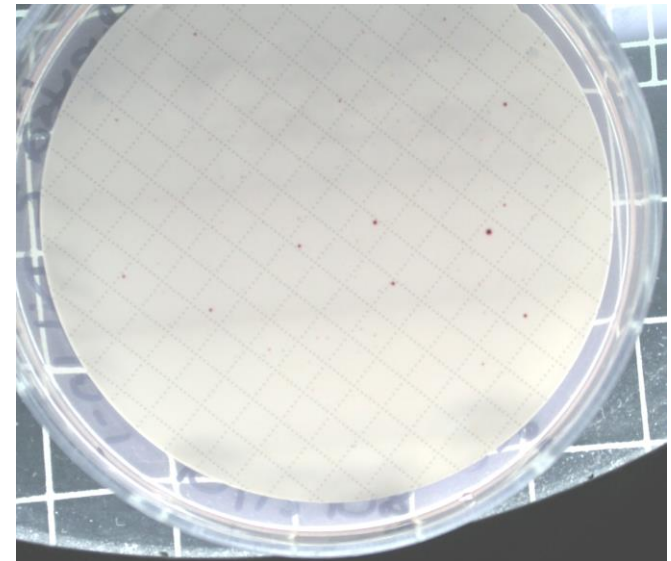
1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 7899-2:2001. Parte 2: Método de filtración de membrana. (ISO 7899-2:2000).

PROCEDIMIENTO

1. Filtrar a través de filtros de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro.
2. Colocar el filtro en una placa con medio.
3. Incubar a $36 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ durante $44 (\pm 4)$ h.
4. Colonias típicas: Color rojo, marrón y rosado en el centro o en toda la colonia.
5. Confirmación en medio de agar biliar de esculina-azida.



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 7899-2:2001. Parte 2: Método de filtración de membrana. (ISO 7899-2:2000).

MEDIO DE CULTIVO: Agar biliar de esculina-azida.

Triptona	17,0 g
Peptona	3,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Bilis de buey deshidratada	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Esculina	1,0 g
Citrato de hierro (III) y amonio	0,5 g
Azida de sodio	0,15 g
Agar	15 g
Agua	1 L
pH 7,1	
Esterilizar 121 °C ± 3 °C	

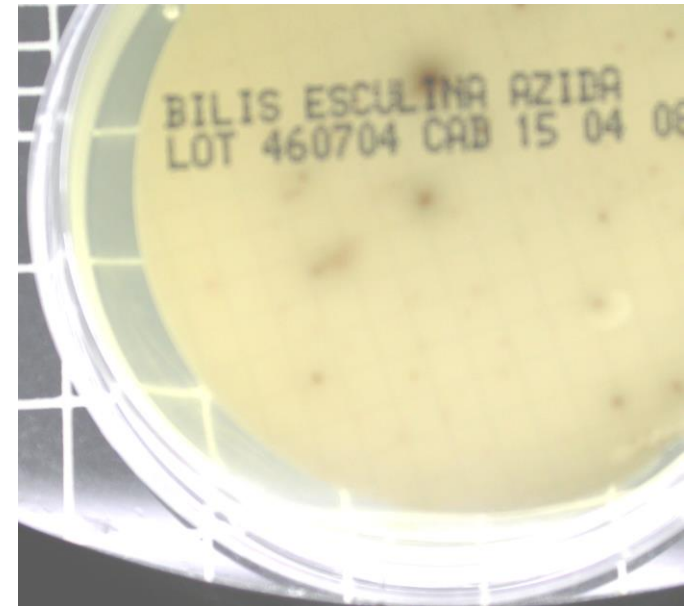
1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 7899-2:2001. Parte 2: Método de filtración de membrana. (ISO 7899-2:2000).

PROCEDIMIENTO. Confirmación.

1. Transferir los filtros sobre agar biliar de esculina-azida.
2. Incubar $44 (\pm 0,5) ^\circ\text{C}$, 2h.
3. Colonias típicas: Color marrón a negro en el medio circundante.



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 7899-2:2001. Parte 2: Método de filtración de membrana. (ISO 7899-2:2000).

TIPO DE MUESTRAS

1. Aguas superficiales y residuales (particularmente con abundante cantidad de materias en suspensión).
2. No adecuada para aguas potables o aguas con valores $< (15 / 100 \text{ ml})$.

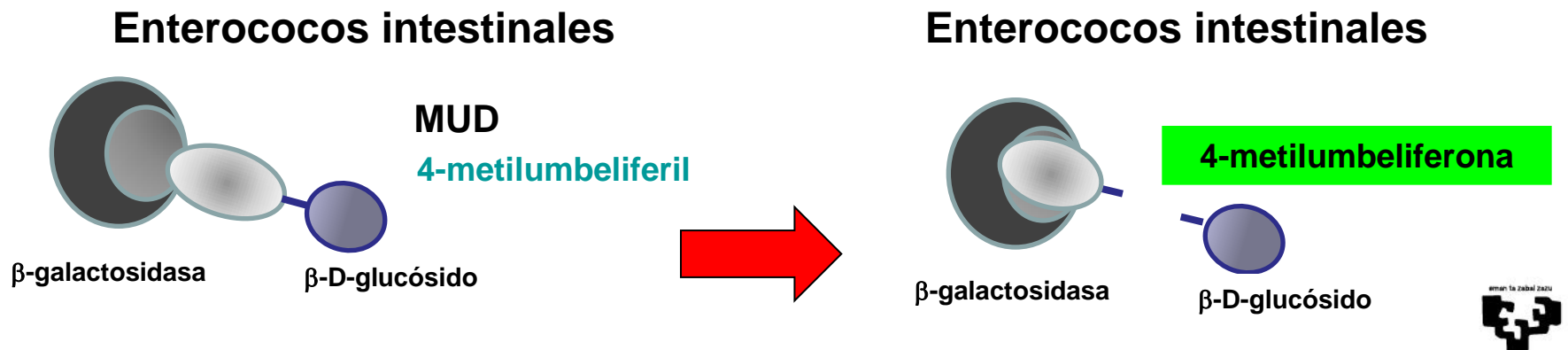
1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 7899-2:2001

SUSTRATOS FLUORESCENTES

Determinación de actividad β -D-galactosidasa: 4-metilumbeliferil β -D-glucósido (MUD) = fluorogénico



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 7899-2:2001. Parte 2: Método de filtración de membrana. (ISO 7899-2:2000).

DEFINICIONES

Enterococos intestinales: Microorganismos capaces de crecer en condiciones aerobias a 44°C y de hidrolizar el 4-metilumbelliferil- β -D-glucosido (MUD), en presencia de acetato de talio, ácido nalidíxico y cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), en el medio líquido especificado.

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..

UNE-EN ISO 7899-2:2001.

PROCEDIMIENTO

Medio MUD/SF (Mezclar A+B+C+D)

Solución A

Triptosa	40 g
KH_2PO_4	10 g
D(+)-galactosa	2 g
Tween 80	1,5 g
Agua desmineralizada (destilada)	900 ml

Solución B

NaHCO_3	4 g
Ácido nalidixico	250 mg
Agua desmineralizada (destilada)	50 ml

Solución C

Acetato de talio	2 g
TTC	0,1 g
Agua desmineralizada (destilada)	50 ml

Solución D

MUD	150 mg
N,N-dimetilformamida	2 ml

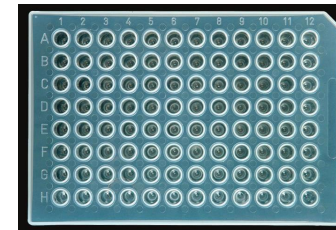
pH $7,5 \pm 0,2$

Esterilizar (filtración $0,2 \mu\text{m}$)

1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 7899-2:2001.



Distribución en microplacas 96 pocillos
100 µl/pocillo y deshidratar

PROCEDIMIENTO

Origen muestra	Nº diluciones	Nº pocillos /dilución	Limites bacterias/100 ml
Aguas de baño	2	64 pocillos a 1/2 32 pocillos a 1/20	15 a 3,5 10 ⁴
Aguas superficiales	4	24 pocillos de: 1/2, 1/20, 1/200 y 1/2.000	40 a 3,2 10 ⁶
Aguas residuales y de plantas depuradoras	6	16 pocillo a 1/2 hasta 16 pocillos a 1/200.000	60 a 6,7 10 ⁸

Nº de diluciones depende del grado de contaminación a analizar



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..**

UNE-EN ISO 7899-2:2001.

PROCEDIMIENTO

1. Sembrar 200 μ l/pocillo de cada dilución
2. Cubrir con banda adhesiva estéril desechable para evitar deshidratación y contaminación.
3. Incubar a 44 (\pm 0,5) $^{\circ}$ C de 36 h a 72 h.
4. Lectura bajo luz UV (366 nm):

Enterococos intestinales: Hidrólisis de MUD = fluorescencia azul (+)



1. Problemática de las aguas residuales.
2. Autodepuración.
3. Parámetros de calidad de las aguas.

- 3.1. Indicadores.
- 3.2. Indicadores físico-químicos..
- 3.3. Indicadores microbianos..

UNE-EN ISO 7899-2:2001.

CÁLCULO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

Siembra: 3 o más diluciones:

- 1/2 **24 positivos** de 24
- 1/20 **18 positivos** de 24
- 1/200 **5 positivos** de 24
- 1/2000 **1 positivos** de 24

Número 3 dígitos característico: **18/5/1**

CN/NC/CZ			MPN/NPP	LO/LI/JG	UP/LS/OG
18/24	4/24	0/24	14.33	9.14	22.47
18/24	4/24	1/24	15.08	9.65	23.58
18/24	4/24	2/24	15.85	10.16	24.73
18/24	4/24	3/24	16.63	10.68	25.9
18/24	4/24	4/24	17.42	11.2	27.09
18/24	5/24	0/24	15.14	9.68	23.66
18/24	5/24	1/24	15.91	10.2	24.81
18/24	5/24	2/24	16.69	10.72	25.99

Calculo estadístico: NMP/100 ml
(programa informático o Tabla del NMP)

18/5/1 → MPN = 15,91 bacteria/1ml.

MPN/100 ml = 15.910 bacteria/100ml.
(LO = 10.200; UP = 24.810)

NOTA

Último número: 0 cuando sea posible



INFORMACIÓN ADICIONAL

Métodos de enumeración de microorganismos

<http://ocw.ehu.es/course/view.php?id=48> [consulta el 13 de Abril de 2015].

<http://ocw.ehu.es/course/view.php?id=297> [consulta el 13 de Abril de 2015].