

Curso de Operario de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales

AGUASRESIDUALES.INFO

 aeopas

Asociación Española de Operadores
Públicos de Abastecimiento y Saneamiento



Modulo 14. Parte I.
Laboratorio, microscopia y
detección de problemas.

Elvira Reina Salguero
Asociación GBS



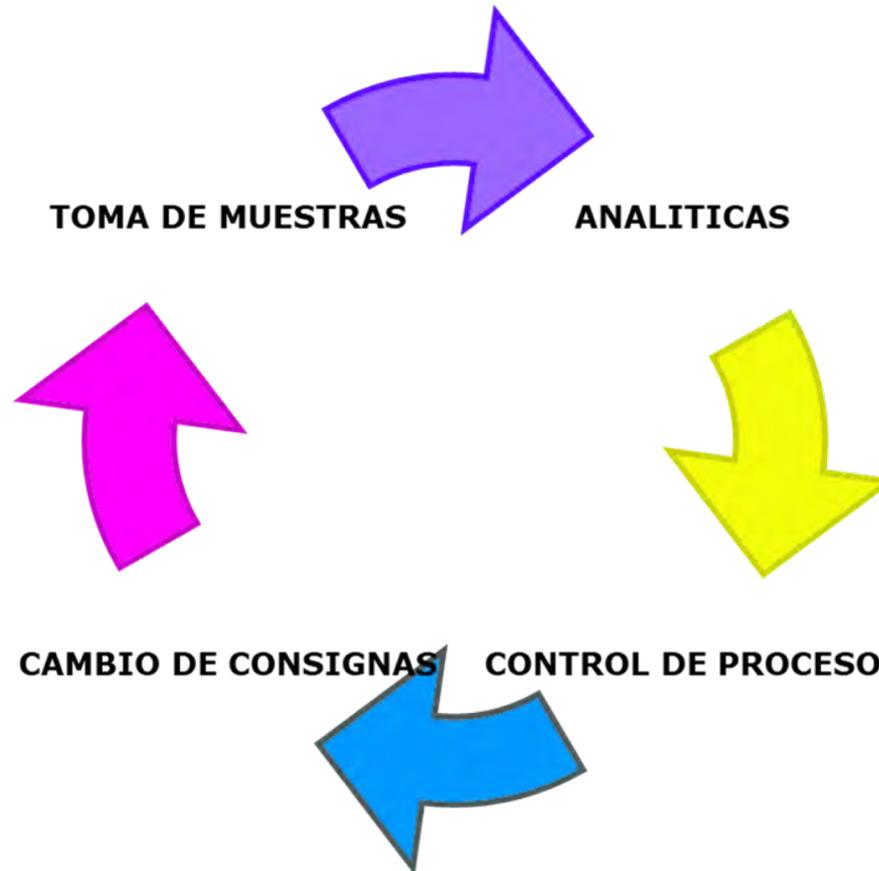
Modulo 14. Laboratorio, microscopia y detección de problemas

- 1. Muestreo
- 2. Analíticas línea de agua, fango, línea general de reboses y licor mezcla.
- 3. Procedimientos analíticos.

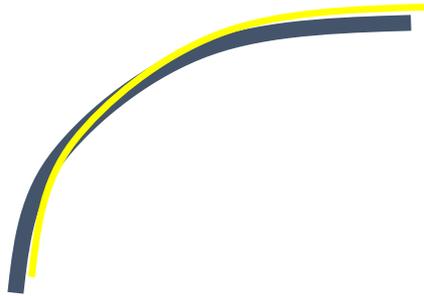


1. Muestreo

- Importancia de la toma de muestras.



COORDINACIÓN



E.D.A.R



MANTENIMIENTO Y
OPERARIOS



PROCESO



1. Muestreo

Muestreo: Acción que consiste en extraer una porción considerada como representativa de una masa de agua, fango activo o lodo con el propósito de examinar diversas características definidas

Tipos de muestra:

Muestra puntual: en un punto y en un instante.



Muestra compuesta: en un punto y varios instantes.



Muestra integrada: en distintos puntos y el mismo instante.



1. Muestreo

Consideraciones iniciales. Antes de realizar el muestreo debemos conocer.

- Objetivo del muestreo:

¿Qué vamos a determinar con este muestreo?.



Plan de muestreo más adecuado.



Valorar la idoneidad del punto de muestreo



Tiempo que durara esta campaña de muestreo

Ejemplo. Evolución de la carga contaminante en el agua de entrada a lo largo del día. ¿Muestra compuesta? ¿muestra puntual? ¿dónde muestreamos? ¿Cuánto tiempo? Otras consideraciones?

1. Muestreo

Consideraciones iniciales. Antes de realizar el muestreo debemos conocer.

- Naturaleza de la muestra o matriz de la muestra.

En la EDAR disponemos de varias matrices en función de la complejidad del tratamiento de la instalación a muestrear.

Podemos hablar de:



Matriz agua residual



Matriz lodo



Matriz gas

1. Muestreo

Consideraciones iniciales. Antes de realizar el muestreo debemos conocer.

Normas de carácter general.

- Tamaño de la muestra. Dependerá del tipo y cantidad de analíticas que realizar con la misma.

En algunas ocasiones será necesario dividir la muestra en alícuotas.



1. Muestreo

Consideraciones iniciales. Antes de realizar el muestreo debemos conocer.

Normas de carácter general.

- ENVASE. Dependerá del tipo de muestra y de los parámetros a determinar en la misma.

Parámetro	UNE EN ISO 5667-3 2019				STANDARD METHODS 1060 Collection and preservation of samples (2017) Published on line			
	Norma de referencia	Tipo envase	Condiciones almacenamiento	Tiempo de almacenamiento	Tipo envase	Condiciones almacenamiento	Tiempo de almacenamiento	
							Recomendado	Regulado
Conductividad	ISO 7888:1985	Plástico o vidrio salvo vidrio sódico	Preferible analizar las muestras in situ	1 d				
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5)		Plástico o vidrio	Mantener la muestra en la oscuridad o utilizar recipientes de color oscuro	1 d				
		Plástico	Congelar por debajo de -18°C Mantener la muestra en la oscuridad o utilizar recipientes de color oscuro	1mes (6 meses si DBO >50mg/L)	Plástico, vidrio, ² FP	Enfriar ≤6°C	6h	48h
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	ISO 15705:2002	Plástico o vidrio, ² PP	Acidificar a pH 1-2 con H ₂ SO ₄	6 meses	Plástico, vidrio, ² FP	Analizar lo antes posible o acidificar a pH <2 H ₂ SO ₄ , Enfriar ≤6°C	7d	28d
			Congelar por debajo de -18°C	6 meses				
Fósforo	ISO 15681-1 :2003	Plástico o vidrio borosilicatado		1 mes	Plástico, vidrio, ² FP	Acidificar a pH <2 H ₂ SO ₄ , Enfriar ≤6°C	28d	28d
	ISO 15681-2 :2003							
	ISO 11885:2007	Para conc normales ² PE-HD, ² PTFE	Acidificar a pH 1-2 con H ₂ SO ₄ o HNO ₃					
	ISO 17294-2:2003	Para conc bajas ² PFA, ² FEP						
	ISO 6878:2004	Preferiblemente vidrio y si no ² PE, ² PVC						
		Plásticos	Congelar por debajo de -18°C	6 meses				

1. Muestreo

Consideraciones iniciales. Antes de realizar el muestreo debemos conocer.

Normas de carácter general.

- ENVASE. Tipos.



1. Muestreo

Consideraciones iniciales. Antes de realizar el muestreo debemos conocer.

Normas de carácter general.

- Limpieza de envases y gradiente de suciedad.



Procedimiento básico de limpieza de material/envases.

- Aclarar con agua del grifo.
- Lavar manual o en lavavajillas con detergente adecuado a material de laboratorio, exento de fosfato.
- Aclarar con agua destilada.
- Secar en soportes adecuados o en estufa de secado y almacenar.

1. Muestreo

Consideraciones iniciales. Antes de realizar el muestreo debemos conocer.

Normas de carácter general.

- ETIQUETADO

Identificación:	_____
Análisis a realizar:	_____ _____
Fecha muestreo:	_____ Tipo de muestra: _____
Observaciones:	_____
Nro. de muestra: (Interno laal)	<input type="text"/>
	Escanea el código y accede al <i>historial</i> de informes en www.laal.com.uy
	

1. Muestreo

Consideraciones iniciales. Antes de realizar el muestreo debemos conocer.

- Conservación de la muestra y envío

PARAMETROS	ENVASES	CONSERVACIÓN
DBO5, Cloruros, Sulfatos, Nitratos, Nitritos, Cromo VI, Fósforo	Plástico o vidrio	Refrigeración
Amoniaco, Nitrógeno Kjeldahl, DQO	Plástico o vidrio	Acidificación con H ₂ SO ₄ a pH<2
AOX	Vidrio	Acidificación con HNO ₃ a pH<2
Metales	Plástico o vidrio	Acidificación a pH<2
Mercurio	Vidrio borosilicatado	Acidificación con HNO ₃ a pH<2 + K ₂ Cr ₂ O ₇
Parámetros orgánicos (plaguicidas, HPAs, VOCs, hidrocarburos, fenoles, etc.)	Vidrio borosilicatado	Refrigeración
Parámetros microbiológicos	Envase estéril	Refrigeración

UNE-EN ISO 5667 – Parte 3: Guía para la conservación y manipulación de muestras

1. Muestreo

Consideraciones iniciales. Antes de realizar el muestreo debemos conocer.

- Conservación de la muestra y envío



1. Muestreo

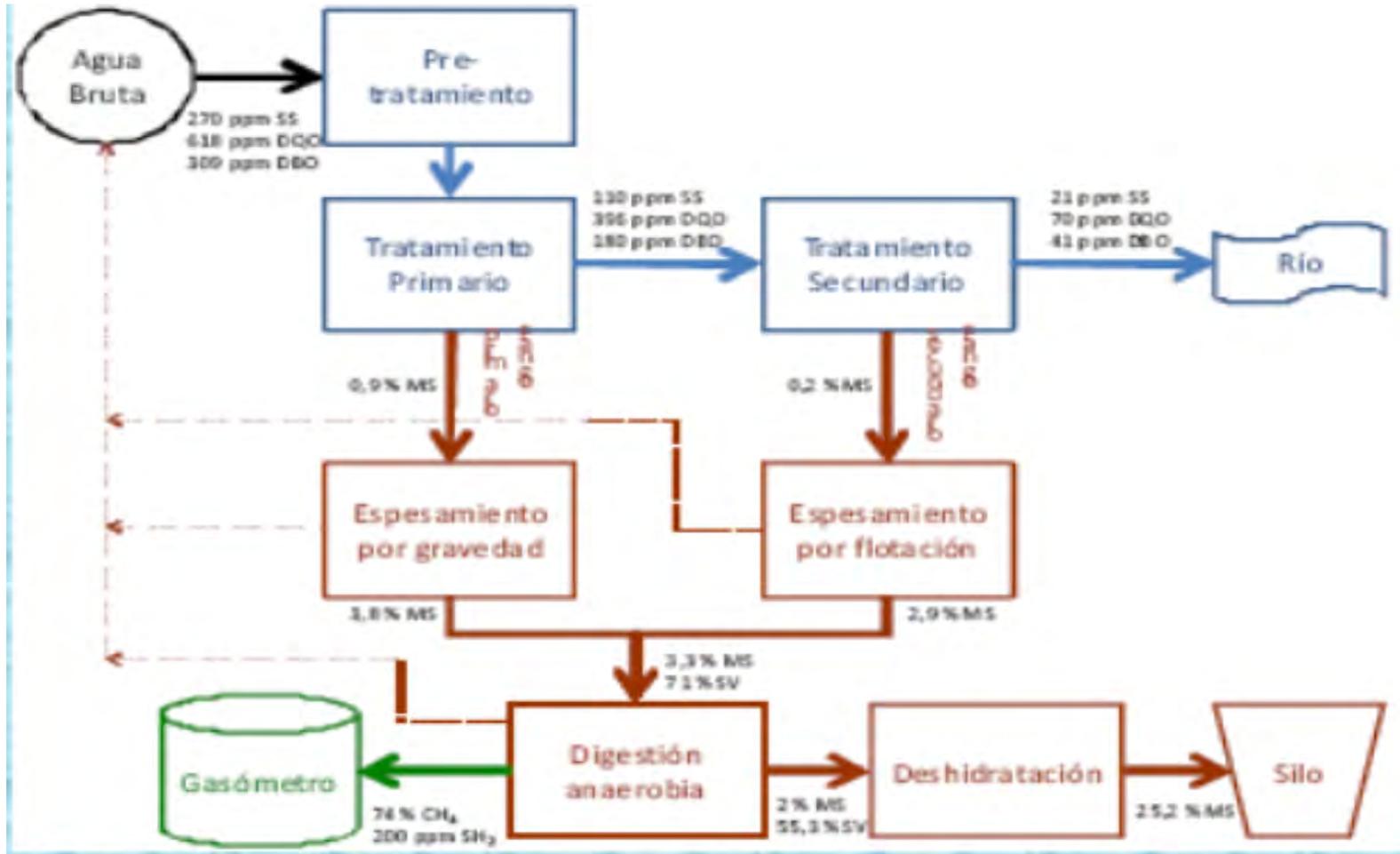
Las **precauciones** a tomar irán destinadas a:

1. Evitar accidentes por acceso al propio punto de muestro.
2. Tener en cuenta los peligros asociados a la propia muestra (aguas residuales, fangos, vertidos industriales...), por lo que se hace necesario el uso de Equipos de protección individual.



1. Muestreo

PUNTOS DE MUESTREO Y PROCEDIMIENTOS ESPECIFICOS PARA LA TOMA DE MUESTRA DICHS PUNTOS.



FORMACIÓN BÁSICA EN TOMA DE MUESTRAS Y DETECCIÓN DE VERTIDOS INDUSTRIALES.

Puntos de muestreo en planta

Línea de agua:



1. Muestreo

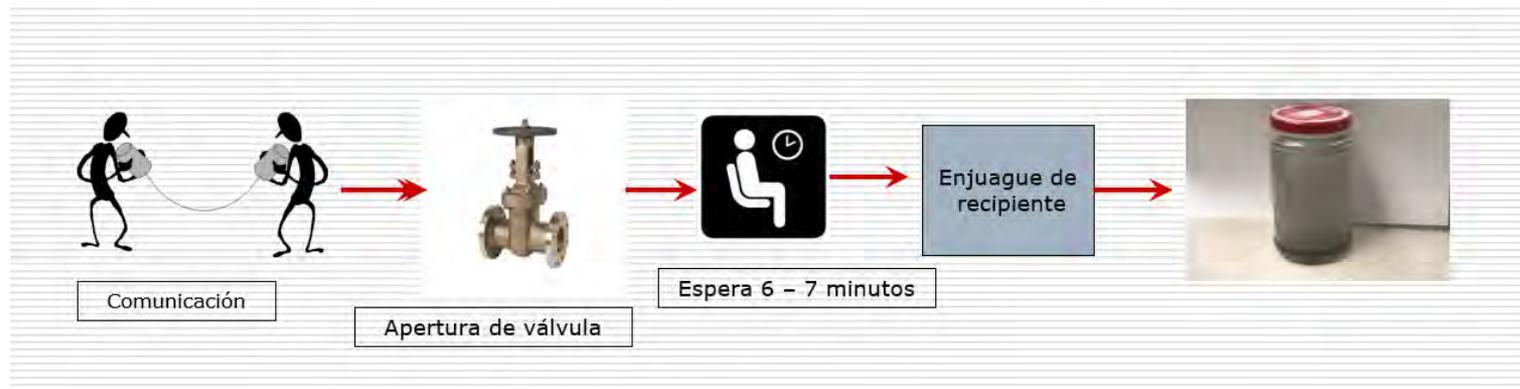


1. Muestreo

Línea de fangos:

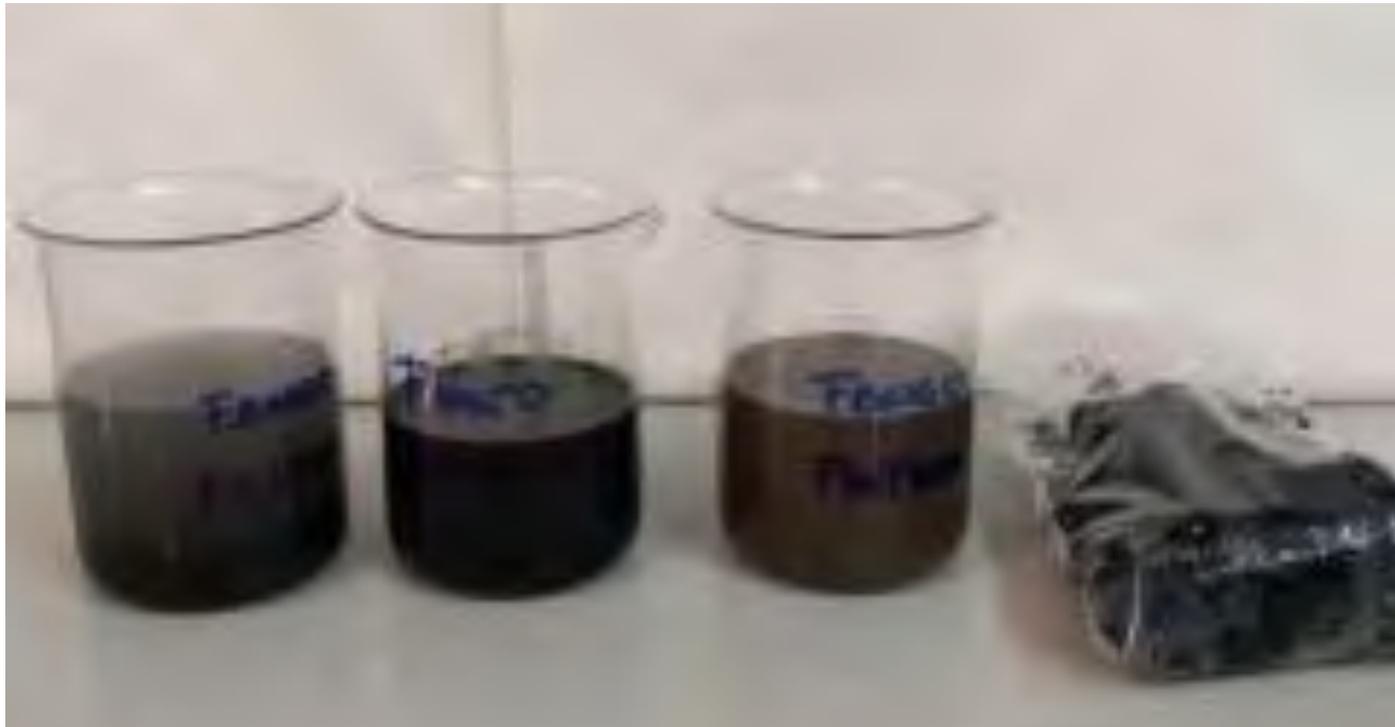
Procedimiento de toma de muestra.

El empleo de toma muestra automáticos da muchas incidencias debido al atasco de las conducciones de los equipos. Así que se plantea como opción a la toma de muestras compuesta mediante equipo automático, la toma de varias muestras puntuales y la composición manual.



1. Muestreo

Línea de fangos:



1. Muestreo

Muestreo de fango activo.

- Siempre al final de proceso biológico, en el caso de sistemas SBR al final de la fase de reacción y de forma previa a la decantación.
- Dejar cámara de aire en los envases de al menos 1/3 del volumen de recipiente, de forma que se permita la conservación de la biota existente



1. Muestreo

Muestreo de fango activo. Biopelícula

- Raspar la superficie determinada de biopelícula, entre 20-50 cm², y diluirla en 200 ml de agua residual filtrada. Asegúrese de que se toma la biopelícula completa, en todo su espesor.
- En sistema de filtros percoladores y CBR se tomará un recorte de tamaño definido de la biopelícula. En otro sistemas se rasparán las superficies de cada pieza en función del tamaño y densidad de la biopelícula.



1. Muestreo

Condiciones especiales de muestreo. Llegada a planta de vertidos industriales.



- Consecuencias de vertidos industriales
 - Afecciones físicas sobre colectores.
 - Obstrucciones en colectores
 - Presencia de sustancias nocivas y tóxicas
 - Incidencias negativas sobre personas.
 - Incidencias negativas sobre procesos posteriores.
 - Sobrecarga por contaminación.
 - Estacionalidad.
 - Exceso de sólidos.
 - pH muy elevado o muy bajo.
 - Vertidos no biodegradables.
 - Vertidos tóxicos.
 - Vertidos salinos

1. Muestreo



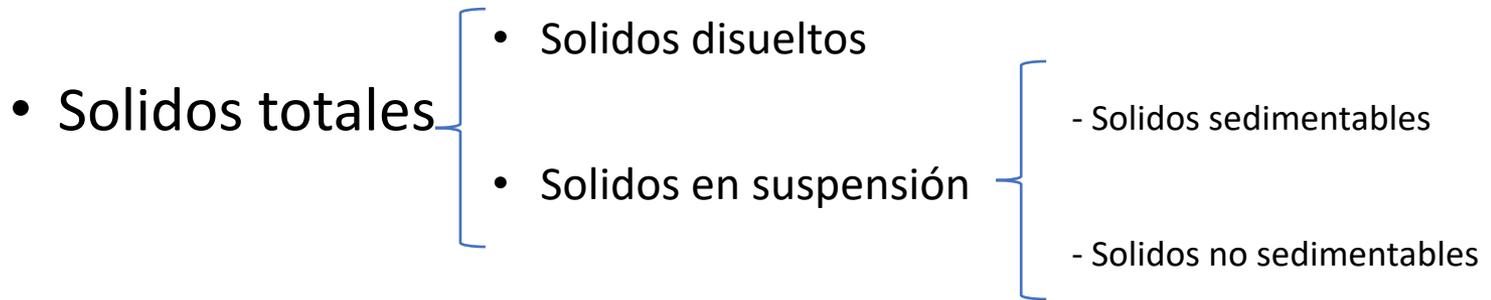
2. Analíticas línea de Aguas

Línea de Agua	Línea de fangos	Línea de reboses.	Licor mezcla
<ul style="list-style-type: none">• Sólidos en suspensión.• DQO• DBO₅• pH• Conductividad• Aceite y grasas.• Fósforo total• Nitrógeno total• Iones (nitrato, nitrito, nitrógeno amoniacal, ortofosfato,)• ...	<ul style="list-style-type: none">• MS• MV• DQO• pH• ...	<ul style="list-style-type: none">• S.S.• DQO• pH• ...	<ul style="list-style-type: none">• S.S• S.S.V• pH• V30• ...

3. Procedimientos analíticos.

Sólidos

- Determinación de sólidos.



3. Procedimiento analítico

Sólidos

- Sólidos totales. Es el residuo seco que queda de una muestra acuosa sometida a evaporación y posterior secado a temperatura definida (105 °C).



$$\text{Sólidos totales} \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = \frac{(\text{Peso capsula con residuo seco} - \text{Peso capsula limpia}) * 1000}{\text{volumen}}$$

3. Procedimiento analítico

Sólidos

- Sólidos en suspensión: residuo que queda retenido sobre un filtro estandarizado de fibra de vidrio, secado a temperatura definida, tras filtrar un volumen determinado de muestra.
- Observaciones:
 - Limitar el volumen de la muestra para que el residuo seco no supere los 200 mg.
 - Se desaconsejan tiempos de filtración muy prolongados.



$$\text{Sólidos en suspensión } \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = \frac{(\text{Filtro con residuo seco} - \text{Filtro limpio}) * 1000}{\text{volumen}}$$

3. Procedimiento analítico

Sólidos

- Sólidos sedimentables. *Fracción de sólidos en suspensión que decanta tras mantener la muestra en reposo durante una hora de tiempo en un recipiente de características definidas.*



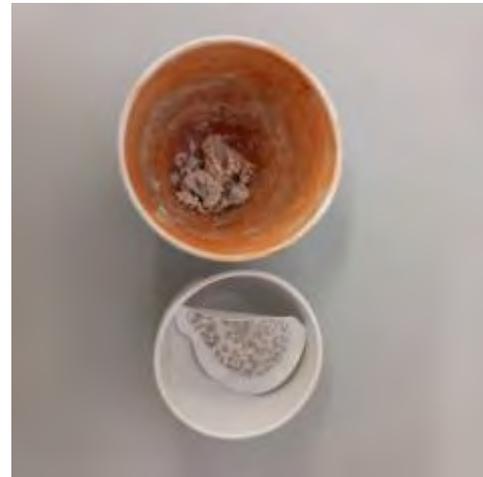
3. Procedimiento analítico

Sólidos

- Fracción volátil: es el termino aplicado a la fracción de sólidos totales, en suspensión o disueltos que se pierde en el proceso de calcinación de la muestra a una temperatura determinada durante un tiempo determinado (550 °C durante una hora)

*(Peso del crisol o filtro con residuo antes de la calcinación – Peso de crisol con residuos despues de calcinar) * 1000*

- Sólidos volátiles (mg/l) =
$$\frac{\text{Peso del crisol o filtro con residuo antes de la calcinación} - \text{Peso de crisol con residuos despues de calcinar} \times 1000}{\text{Volumen de muestra}}$$



3. Procedimiento analítico

Demanda química de oxígeno. DQO

- Se define como el contenido de materia orgánica disuelta o en suspensión que es susceptible de oxidarse por acción de un agente químico energético en condiciones definidas, se expresa en mg/l de oxígeno.

Las sustancias oxidables reaccionan con solución de ácido sulfúrico y dicromato potásico en presencia de sulfato de plata como catalizador. Se valora el cambio de color.

3. Procedimiento analítico

Demanda química de oxígeno. DQO

Antes: Digestión + titulación



Ahora: espectrofotometría



3. Procedimiento analítico

OTRAS DETERMINACIONES MEDIANTE EL EMPELO DE KIT



3. Procedimiento analítico

Demanda bioquímica de oxígeno. DBO

- Es la cantidad de oxígeno consumido por la acción de los microorganismos aerobios presentes en el agua residual para la degradación bioquímica de la materia orgánica y de algunos materiales inorgánicos. Se realiza en las siguientes condiciones:
 - Oscuridad
 - 20 °C
 - 5 días.

$$DBO_5 = \frac{O_2 \text{ inicial} - O_2 \text{ final}}{\text{Volumen de la muestra}} \times \text{volumen del frasco}$$

3. Procedimiento analítico

Demanda bioquímica de oxígeno. DBO

Método de dilución



Método de nanométrico



3. Procedimiento analítico

Conductividad eléctrica, pH y oxígeno disuelto. Método electroquímico

Conductividad:

Indica la capacidad de una solución para conducir la corriente eléctrica



pH:

expresa el grado de acidez o alcalinidad de una disolución acuosa. El pH está relacionado con la concentración iones de hidrógeno presentes en determinadas disoluciones.



Oxígeno disuelto

Se realiza con un electrodo selectivo, que está aislado con una membrana semipermeable al gas, el oxígeno disuelto difunde a través de la membrana hasta el sensor donde es reducido.





MUCHAS GRACIAS



+ INFORMACIÓN
info@aeopas.org
955 40 85 06



Curso de Operario de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales



MÓDULO 14

Laboratorio, microscopía y
detección de problemas

PARTE II

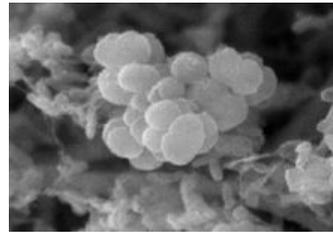
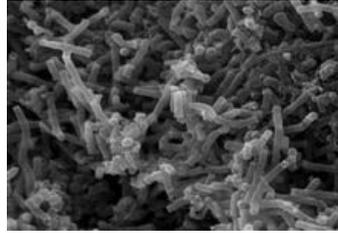
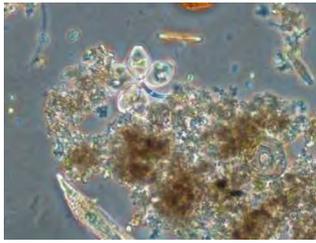
Eva Rodríguez. GBS



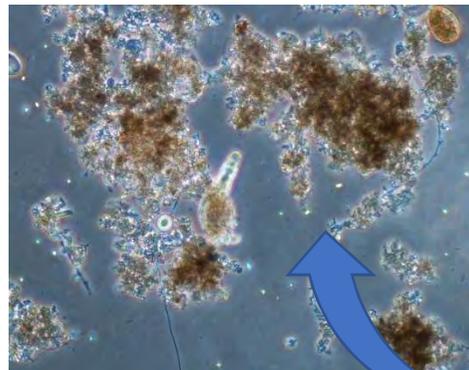
El proceso de depuración



Methanosaeta spp.

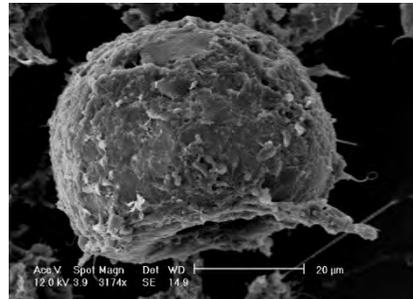
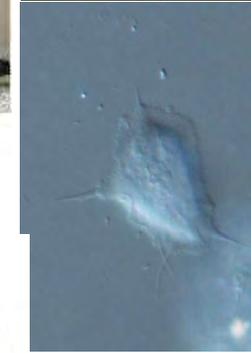
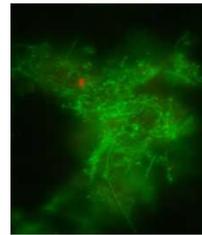
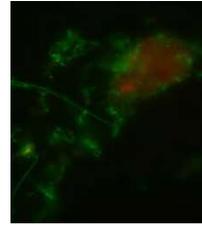


Methanosarcina spp.



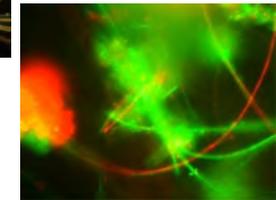
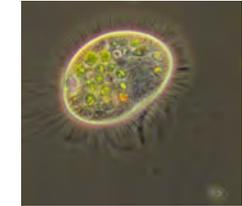
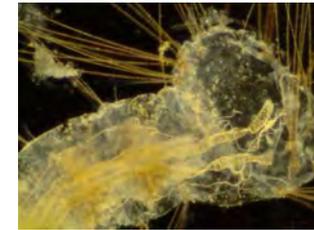
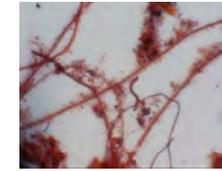
HERRAMIENTAS DE TRABAJO

ΛΕΓΓΑΜΕΝΑ ΔΕ ΤΡΑΒΑΛΟ



TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

- **Campo claro:** absorción o dispersión de la luz sobre los objetos de la muestra. Tinciones.
- **Contraste de fases:** En función de los índices de refracción sobre los objetos de la muestra. Halo
- **Campo oscuro:** Modificación del sistema de iluminación; la luz incide sobre la muestra sólo desde los lados. Fondo oscuro y organismo brillante
- **Microscopía de fluorescencia:** Para muestras capaces de emitir fluorescencia: autofluorescencia o fluorocromos.
- **Contraste de polarización:** luz polarizada
- **Contraste Interferencial de Normarski:** combina la luz polarizada con un principio similar al del contraste de fases: marcado efecto de relieve y a color.



OCULARES Y OBJETIVOS



- $\emptyset = \text{FN}/\text{objetivo (mm)}$; FN: ocular de 10, 18, 20 o 22

AUMENTO TOTAL: OCULAR*OBJETIVO

OBSERVACIÓN MUESTRAS

- homogeneizar muestra
- colocar 25 μ l muestra sobre portaobjetos limpio
- colocar cubreobjetos sobre la gota, apoyándolo primero de un lado y dejándolo caer suavemente, evitándose así la aparición de burbujas de aire.
- Enfoque con objetivo de 100x. Recuerde debe estar en Ph1, 400x ph2 y 1000x ph3
- realizar al menos dos replicas de cada muestra
- operar rápidamente con muestras "*In vivo*", ya que la muestra tiende a secarse rápidamente.
- Si se trabaja con tinciones se debe trabajar en campo claro.
- Si es necesario: con un poco de papel de filtro, realizar un poco de presión hasta conseguir disminuir la altura de la película de muestra (Solo para observaciones de más de 400x).



El color del fango activo

El clarificado obtenido

La concentración de sólidos que hay en el sistema

Los mL de fango obtenidos en la V30

DECANTACIÓN

CLARIFICADO

CANTIDAD DE BIOMASA

ÍNDICE DE FANGO: IF – CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

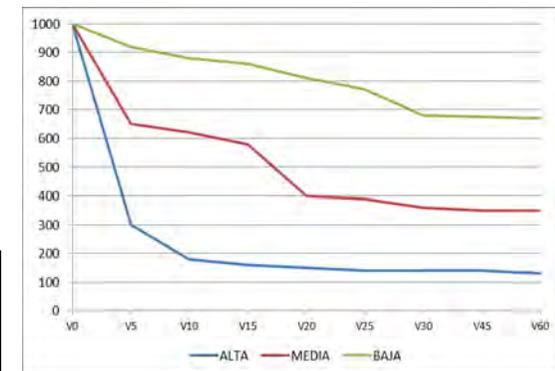
TURBIDEZ	ALTA: Visibilidad muy baja a traves de la probeta	0
	MEDIA	4,5
	BAJA: Visibilidad alta a traves de la probeta	9



FLOC EN SUSPENSIÓN	ALTA	0
	MEDIA	4,5
	BAJA	9



SEDIMENTABILIDAD	BAJA: V30 >500 mL	0
	MEDIA : V30 entre 301-499 mL	4,5
	ALTA: V30 <300 mL	9



OLOR	CORRECTO	3
	INCORRECTO	0

PROBLEMAS DE SEPTICIDAD, VERTIDOS...



De las V30 de la imagen cual de ellas darían una calidad de agua correcta

ALTA TURBIDEZ, FLOC
EN SUSPENSIÓN
MEDIO/ FANGO
ESPONJADO/ OLOR
INCORRECTO:
Macroscopía: 4,5

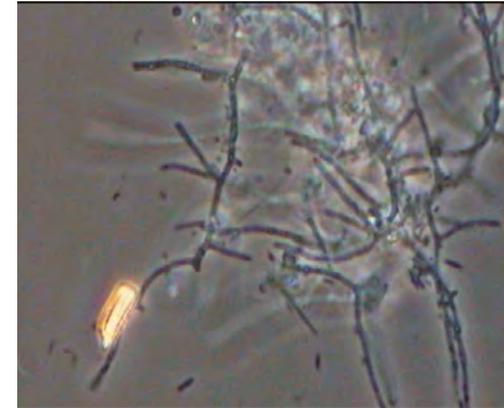
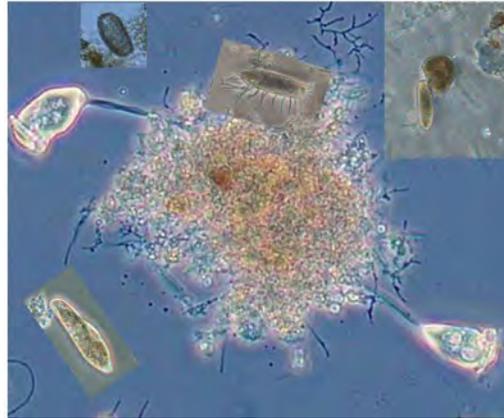
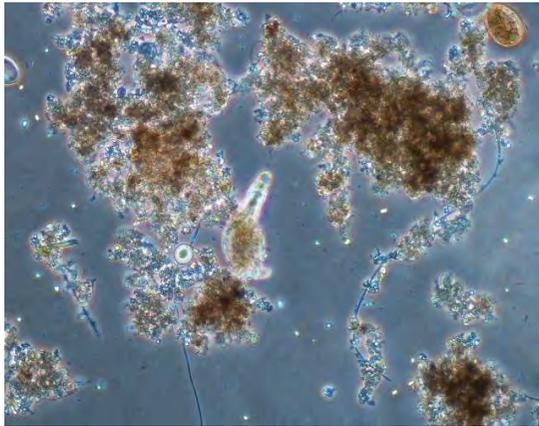
BAJA TURBIDEZ Y
FLOC EN
SUSPENSIÓN
MEDIO/ DECANT
MEDIA/ OLOR
CORRECTO:
**Macroscopía:
25,5**

BAJA TURBIDEZ Y
FLOC EN
SUSPENSIÓN
MEDIO/ DECANT
MALA/ OLOR
CORRECTO:
Macroscopía: 21

V30 PARTIDA
Macroscopía: 0

BAJA TURBIDEZ Y
FLOC EN SUSPENSIÓN
MEDIO/ DECANT
BAJA/ OLOR
CORRECTO:
Macroscopía: 30

EL FLÓCULO: ECOSISTEMA HETEROGÉNEO Y COMPLEJO



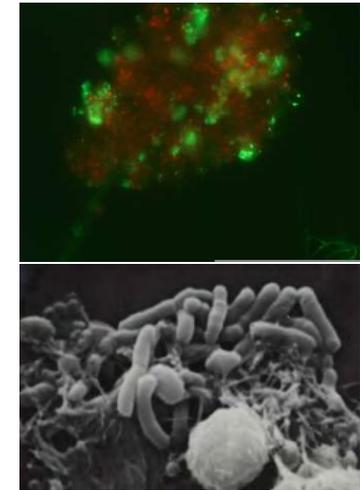
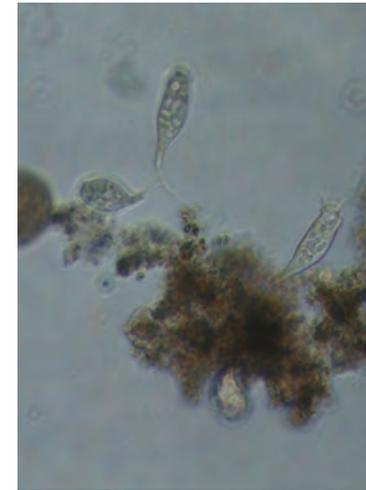
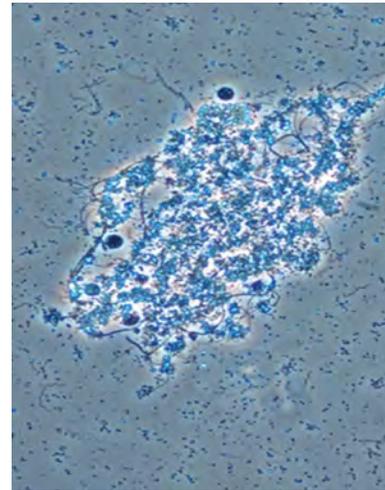
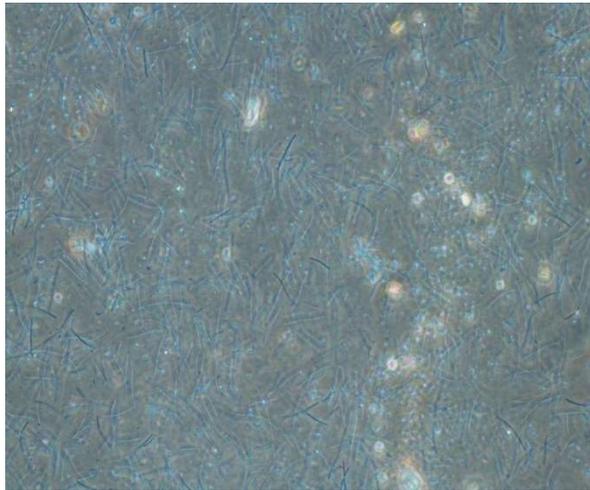
*Un flóculo correctamente formado debe tener una buena capacidad de **agregación** (Turbidez baja en el clarificado) y una buena capacidad de **separación de fases** (Fango que decanta y compacta correctamente)*

- DIVERSIDAD Y DENSIDAD
 - TAMAÑO
 - LUGAR DE DESARROLLO
 - COMPLEJIDAD DE NICHOS

ALTA TASA
CRECIMIENTO/CULTIVO
MIXTO/ADAPTACIÓN
BACTERIANA A
AMBIENTES
CAMBIANTES

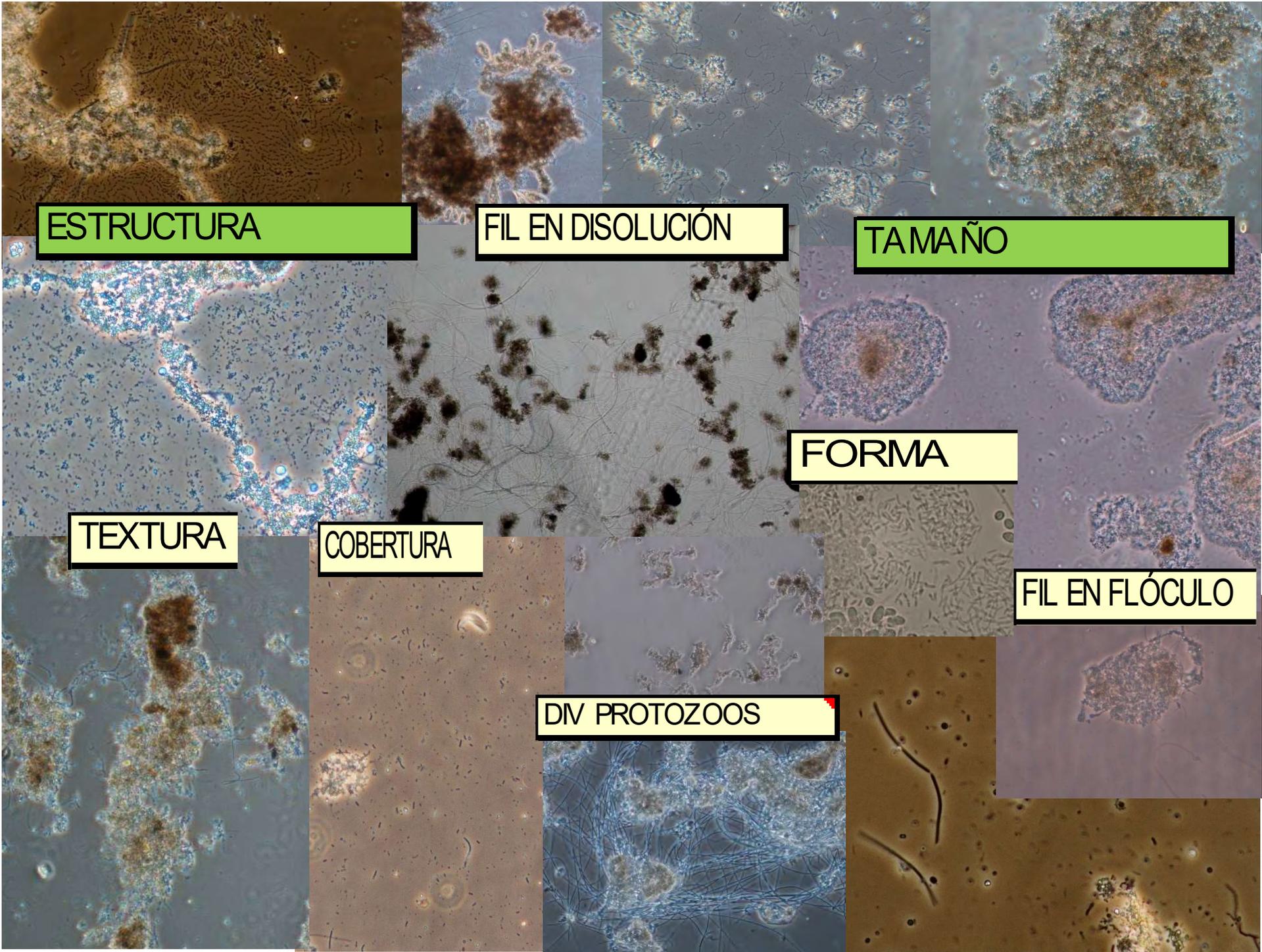
GRÁNULOS RESERVA
(PHB, POLIFOSFATOS,...)

RESISTENCIA A
PERIODOS DE
INANICIÓN



El flóculo es una **estructura heterogénea** compuesta de **agregados bacterianos** y otros organismos embebidos en una **matriz polimérica (EPS)** (Seviour y Nielsen, 2010; Tandoi et al., 2017), al que se le pide **capacidad de separación fases y de agregación.**





ESTRUCTURA

FIL EN DISOLUCIÓN

TAMAÑO

FORMA

TEXTURA

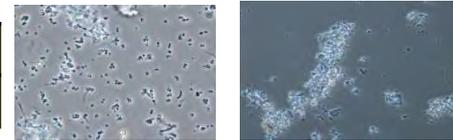
COBERTURA

FIL EN FLÓCULO

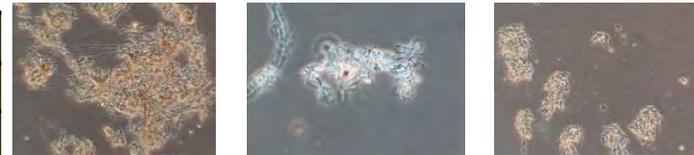
DIV PROTOZOOS

ÍNDICE DE FANGO: IF – CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

FORMA	REGULAR	4
	IRREGULAR	0



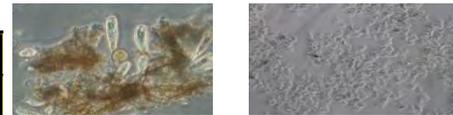
TAMAÑO	GRANDE: > 500 micras	4
	MEDIO: 150-500 micras (**)	7
	PEQUEÑO: < 150 micras	0



ESTRUCTURA	COMPACTA	18
	MEDIA	9
	ABIERTA	0



TEXTURA (por punción)	FUERTE	4
	DÉBIL	0



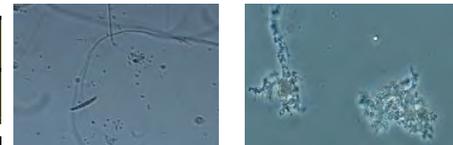
COBERTURA	<10 %	0
	10-50 % (**)	7
	>50 %	3,5



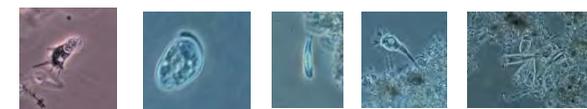
FIL EN FLÓCULO	>20 fil/flóc.	0
	5<*<20 fil/flóc. (**)	7
	<5 fil/flóc.	14



FIL EN DISOLUCIÓN	ALTA > categoría bacteriana 2	0
	BAJA < categoría bacteriana 2	3



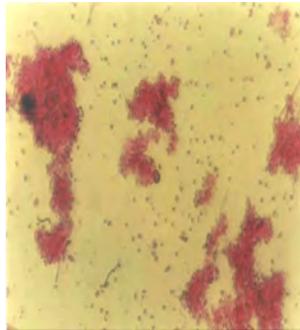
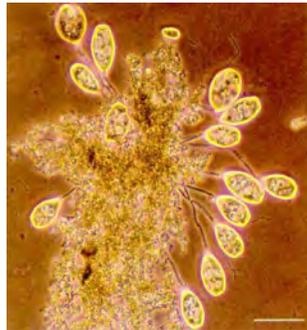
DIV PROTOZOOS	>7 SP	13
	4-7 SP (**)	7
	<4 SP	0



ÍNDICE DE FANGO: IF

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS		
Turbidez	Alta	0
	Media	4,5
	Baja	9
Flóculos en suspensión	Alta	0
	Media	4,5
	Baja	9
Sedimentabilidad	Alta	9
	Media	4,5
	Baja	0
Olor	Correcto	3
	Incorrecto	0

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS		
Forma	Regular	4
	Irregular	0
Tamaño	Grande	4
	Medio	7
	Pequeño	0
Estructura	Compacta	18
	Media	9
	Abierta	0
Textura	Fuerte	4
	Débil	0
Cobertura	< 10%	0
	10-50%	7
	>50%	3,5
Filamentos en flóculos	>20	0
	5-20	7
	<5	14
Filamentos en disolución	Alta	0
	Baja	3
Diversidad de Protozoos	<7 especies	13
	4-7 especies	7
	<4 especies	0



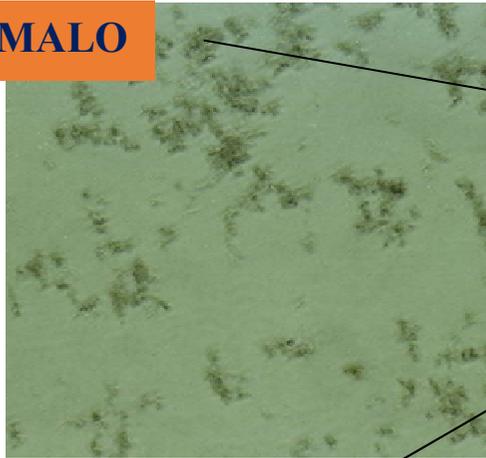
4

ÍNDICE DE FANGOS
0-19 pésimo
20-39 malo
40-59 regular
60-79 bueno
80-100 óptimo

8



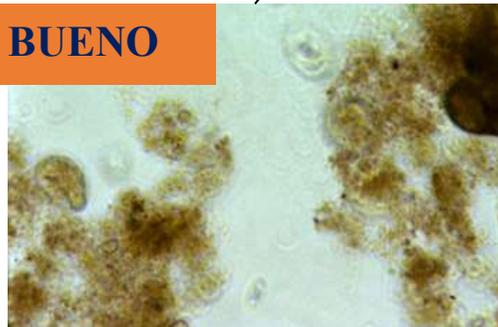
IF: MALO



IF: REGULAR



IF: BUENO



ÍNDICE DE FANGOS

- 0-19 pésimo
- 20-39 malo
- 40-59 regular
- 60-79 bueno
- 80-100 óptimo

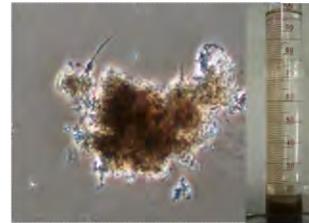
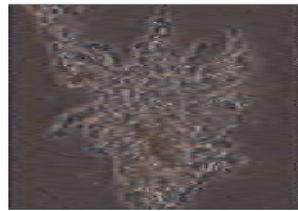
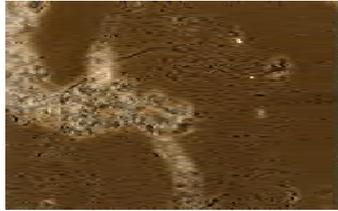
INDICE DE FANGO :

Estudio simplificado de la estructura flocular- Primera valoración biológica del fango activo

Histórico de calidad flocular

Detección precoz de alteraciones- Valoración preliminar de los rendimientos de depuración.

Apto para realizar por personal no cualificado. Rápido, comparable y de procedimiento sencillo.



FANGOS CONVENCIONALES
 -ASPECTO VARIABLE EN FUNCIÓN DEL PROCESO.
 - EN GENERAL EDADES DE FANGO BAJAS, MEDIAS
 - FLÓCULOS Y DIVERSIDADES DE PROTISTAS MEDIOS

NITRIFICACIÓN-DESNITRIFICACIÓN
 -BUEN CLARIFICADO EN OCASIONES ESPONJADO
 FLÓCULOS GRANDES Y ABIERTOS - CON DISTINTOS GRADOS DE OXIDACIÓN
 - ABUNDANCIA DE PEQUEÑOS FLAGELADOS, AMEBAS DESNUDAS Y COLONIAS NITRIFICANTES

AIREACIÓN PROLONGADA
 - FLÓCULOS DE TAMAÑO MEDIO-PEQUEÑO, COMPACTOS
 - BUEN CLARIFICADO CON POSIBLES MICROFLÓCULOS EN SUSPENSIÓN
 - RIESGOS DE PROCESOS ENDÓGENOS POR DEFICIENCIA DE CARGA ORGÁNICA

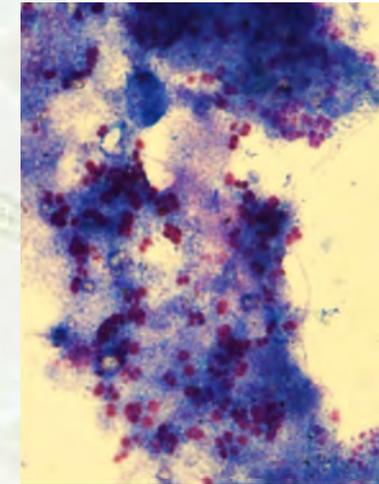
CASUÍSTICA:
 estudio de casos y situaciones específicas



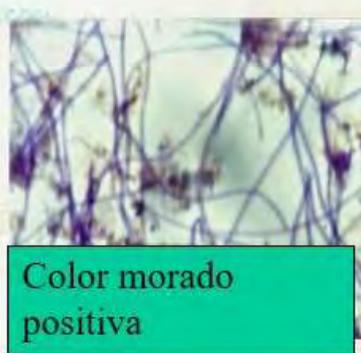
CAUSUALIDAD:
 relación entre causa y efecto.

TINCIONES

- **GRAM**



- **NEISSER**



- **PHB**



INFORME BIOLÓGICO

1.-Evaluación de la calidad de un fango biológico: niveles macroscópicos y microscópicos.

2.-Evaluación del desarrollo de bacterias filamentosas en un fango activo.

3.-Evaluación de la microfauna presente en el fango activado.

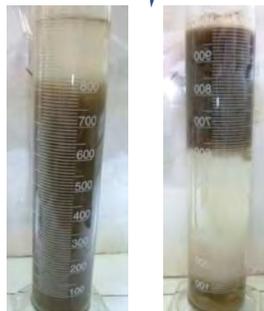
4.-Evaluación final del fango activado: conclusiones.

	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3
MACROSCOPIA	7,5	16,5	21
MICROSCOPIA	26	27	50
IF (CATEGORIA)	33,5 (MALO)	43,5 (REGULAR)	71 (BUENO)
CATEGORIA NUMÉRICA BACTERIANA	1	5	3
m/mL FILAMENTOS	214	3109	1197
ESPECIES BACTERIANA DOMINANTES	BACILLUS	1702	MICROTHRIX
ESPECIES BACTERIANAS SECUNDARIAS		021N/1863	HALISCO/021N
EFEECTO SOBRE EL SISTEMA	TURBIDEZ	DISGREGACIÓN	DISGREGACIÓN/PUENTES
GRUPO DOMINANTE	SESILES (EPISTYLIS)	VORTICELLAS	SEIL/TECM/REPT
Nº ESPECIES IDENTIFICADAS	3	17	17
DENSIDAD (EXP 6)	2,62	2,72	3,82
SBI (CLASE)	6 (CLASE 2)	9 (CLASE 1)	10 (CLASE 1)
H (CLASE)	1,15	2,39	3,24

CARACTERÍSTICAS
 AMBIENTALES
 CARACTERÍSTICAS
 DE DISEÑO
 CARACTERÍSTICAS
 OPERACIONALES
 PARÁMETROS
 FÍSICO-QUÍMICOS
 PARÁMETROS
 BIOLÓGICOS.



LA CLAVE ES EL
MANTENIMIENTO
DE LAS
INSTALACIONES Y
LA RÁPIDEZ EN LA
RESPUESTA

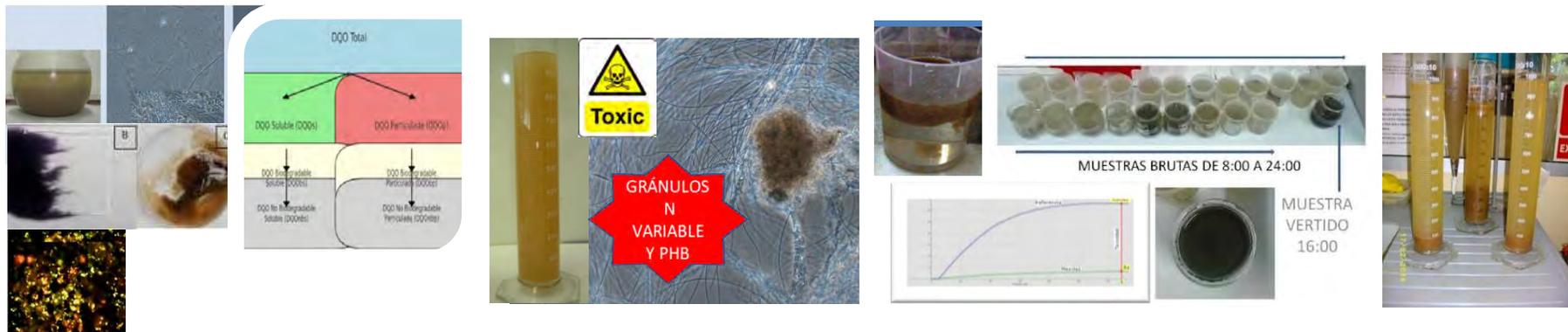


PROBLEMÁTICA DE OPERACIÓN

EFFECTOS	CAUSA DEL PROBLEMA	EFFECTO DEL PROBLEMA
<ul style="list-style-type: none"> • Bulking filamentoso 	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento excesivo de organismos filamentosos que se extienden desde los flóculos. 	<ul style="list-style-type: none"> • IVF alto, sobrenadante muy claro. • Concentración del Fango Activado Recirculado y del fango en exceso baja. • En casos severos hay pérdidas de fango con el efluente. • El proceso de manejo de los sólidos resulta sobrecargado hidráulicamente.
<ul style="list-style-type: none"> • Formación de espumas 	<ul style="list-style-type: none"> • Causado por sobrenadantes no biodegradables o la presencia de <i>Nocardioformes</i>. Y en algunas ocasiones de <i>Microthrix parvicella</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Grandes cantidades de sólidos del fango activado flotan formando espuma en la superficie de los elementos del tratamiento. • Las espumas de <i>Nocardioformes</i> y <i>Microthrix</i> son persistentes y difíciles de eliminar mecánicamente. Los sólidos pueden pasar al clarificador y al efluente o derramarse de los reactores biológicos
<ul style="list-style-type: none"> • Bulking Viscoso 	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento excesivo de la matriz de polímero exocelulares, desembocando a fango un aspecto gelatinoso. 	<ul style="list-style-type: none"> • La fase de concentración de sólidos en el decantador, se reduce. • En casos severos no hay separación de sólidos y se pierde fango con el efluente del clarificador secundario; En casos más leves suele aparecer nubes viscosas.
<ul style="list-style-type: none"> • Manto ascendente. 	<ul style="list-style-type: none"> • La desnitrificación en el clarificador secundario libera N_2 poco soluble que se adhiere a los flóculos de fango activado transportándolos a la superficie del clarificador. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se forma una nata de fango activado en la superficie del clarificador secundario.
<ul style="list-style-type: none"> • Flóculo en punta de alfiler "Pin - flocc" o "Pinpoint flocc". 	<ul style="list-style-type: none"> • Se forman pequeños flóculos pequeños, compactos, ligeros, con forma esférica. • Los mayores decantan rápidamente. Los menores decantan lentamente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Índice volumétrico del Fango (IVF) bajo y efluente turbio.
<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento disperso. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los microorganismos no forman flóculos, sino que están dispersos, formando sólo pequeños grupos o en células aisladas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Efluente turbio. No hay zona de sedimentación del fango.

PROBLEMÁTICA DE OPERACIÓN

ORIGEN	CAUSA DEL PROBLEMA	EFFECTO DEL PROBLEMA
Deficiencia o sobrecarga Orgánica	Incremento o disminución de la carga orgánica afluente. Variaciones en fracción de materia orgánica muy biodegradable y no biodegradable del efluente. DQO recalcitrante	Problemas de depuración en el efluente.
Sobrecarga Hidráulica	Incremento del caudal de agua a tratar.	Lavado de los reactores biológicos con la correspondiente pérdida de flóculo
Desequilibrio nutricional	Variaciones en afluente, reboses, ...	Alteraciones floculares
Toxicidad total, parcial o bioacumulativa	Entrada al sistema biológico de elementos no-biodegradables que afecten a la actividad bacteriana.	Suelen producir efectos desfloculación acompañada de una inactividad bacteriana que repercute en la calidad del efluente.
Limitaciones de diseño	-	-



CONTROLES BÁSICOS PARA OPERARIOS



SISTEMAS DE CONTROL RÁPIDO:

- V30: Alteraciones separación de fases y de agregación
- Med pH y conductividad
 - Control vertidos
- Medidas de amonio y nitratos para control sistemas N/DN
 - Ajustes NO₃ y NH₄
- Medidas ortofosfatos para controlar asimilación PAO
 - Falta asimilación, solubilizaciones

MICROBIOLOGÍA DEL AGUA REGENERADA

EL AGUA COMO MEDIO DE DESARROLLO DE DISTINTOS MICROORGANISMOS

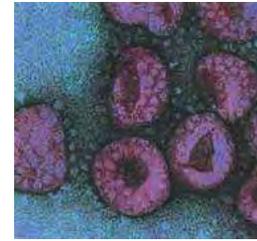
- PRINCIPAL FOCO DISPERSIÓN (Martín, 2007)- VEHICULO: AGENTES QUÍMICOS+ BIOLÓGICOS
- ALTA MORTALIDAD- OMS 2006
- LEGISLACIÓN
 - **RESIDUALES**: NTP 473: Estaciones depuradoras de aguas residuales: riesgo biológico
 - **AGUAS REGENERADAS**: RD 4/2023
- AGENTES BIOCONTAMINANTES: VIRUS, BACTERIAS, HONGOS, PROTISTAS Y METAZOOS



AGENTES BIOCONTAMINANTES

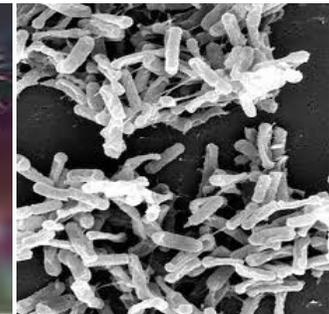
VIRUS

Influenzavirus, Enterovirus (Coxsackie A y B), Echovirus, Poliovirus, Virus de la hepatitis A, Rotavirus, Adenovirus, Reovirus, Parvovirus, Coronavirus...



BACTERIAS

Escherichia coli, Salmonella spp, Shigella spp, Vibrio cholerae, Mycobacterium tuberculosis, Bacillus anthracis, Actinomyces, Leptospira interrogans, Legionella spp, Yersinia enterocolitica, Pseudomonas aeruginosa, Clostridium tetani, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum...

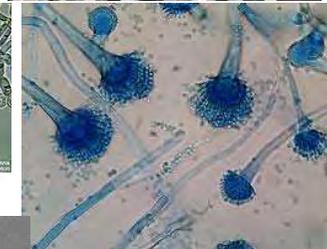


HONGOS

Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Aspergillus spp, Trichophyton spp, Pidermophyton spp...

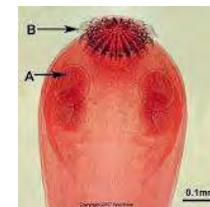
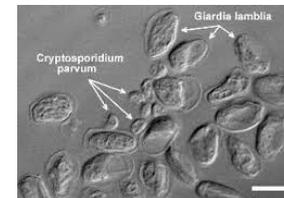


Candida albicans



PARÁSITOS

- Protozoos: *Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, Cryptosporidium sp. Balantidium coli*
- Helmintos:
 - CESTODOS: *Taenia saginata, Taenia solium, Hymenolepis sp.*
 - NEMATODOS: *Ascaris lumbricoide, Trichiurus trichiura, Ancylostoma sp, Toxoplasma sp....*
 - HOSPEDADORES ALTERNATIVOS: *Toxocara canis, Toxocara cati,*
 - ZOONOSIS EMERGENTES:

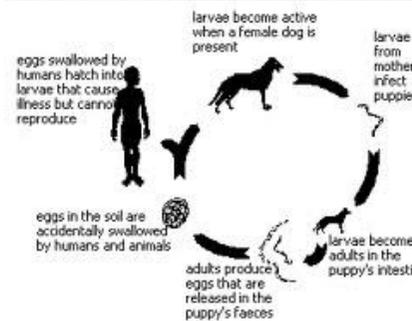


ZOONOSIS

Achatina fúlica



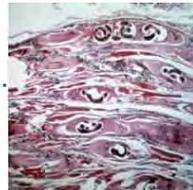
Toxócora canis.



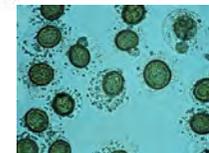
Momias Incas:
400 ac-800dc:
*Enterobius
vermicularis*
*Trichuris
trichuria*
*Trichinella
spiralis*



Toxócora canis.



Triquinosis (*Trichinella spiralis*)



Tenias-decreto

CONTROL RIEGO PASTOS

Riesgos de zoonosis emergentes. Cadena epidemiológica (parásito, hospedador y vehículo). Los huevos de *Toxócora canis*, son muy resistentes a factores ambientales, permanecen viables durante meses o años. La ingestión de huevos por niños de 18 meses a 3 años, pueden ocasionar cuadros clínicos como asma, anorexia...

DEFINICIONES BÁSICAS

- **PARÁMETROS A DETERMINAR:**
 - TIPO DE DATO (CUALITATIVO O CUANTITATIVO)
 - TIPO DE MATRIZ (PREPOTABLE, POTABLE, DEPURADA, REGENERADA)
 - EXPRESIÓN DE RESULTADOS (UNIDADES DE MEDIDAS; GENERALMENTE ESTABLECIDAS EN LAS ANEXOS LEGISLATIVOS, JUNTO CON LAS CIFRAS SIGNIFICATIVAS ADECUADAS).
- **TÉCNICAS Y FUNDAMENTOS DEL ENSAYO:** normas UNE, método definido en la legislación, Métodos estandarizados, métodos propios contrastados...
- **LÍMITES CUANTIFICACIÓN E INCERTIDUMBRE.**
- **PLAN DE MUESTREO:**
- **TIPO DE MUESTREO:** simples, compuestos o integrados
- **SISTEMA DE TOMA DE MUESTRA:**
 - TOMA MANUAL CON UN CUBO O BOTELLA LASTRADOS O NO
 - BOTELLAS CON CIERRE AUTOMÁTICO,
 - MUESTREADORES HORARIOS AUTOMÁTICOS...

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

- AISLAMIENTO Y RECuento DE AQUELLOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN LAS MUESTRAS
- CONTROL RIESGO CONTAMINACIÓN AMBIENTAL
- ASEGURAR REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS: G-ENAC-04: **GUIA PARA LA ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS QUE REALIZAN ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS**

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD-
VÁLIDEZ INSTALACIONES

LEGISLACIÓN

R.D. 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas RD 4/2023

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

ORGANIZACIÓN LABORATORIOS

- ZONA RECEPCIÓN
- ZONA ALMACENAMIENTO
- ZONA PREPARACIÓN Y EXAMEN MUESTRAS
- ZONAS INCUBACIÓN Y MANIPULACIÓN MICROORGANISMOS
- ZONA ALACENAMIENTO CEPAS DE REFERENCIAS Y OTRAS
- ZONA ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN MEDIOS, REACTIVOS
- ZONA LAVADO Y DESCONTAMINACIÓN
- CABINAS FLUJO LAMINAR O DE SEGURIDAD PARA ATMÓSFERAS DE BAJA CONTAMINACIÓN
- ILUMINACIÓN EMPOTRADA
- LAVAMANOS DE ACCIONAMIENTO NO MANUAL
- ARMARIOS HASTA EL TECHO
- EN GENERAL: DISEÑO CAMINO SIN REGRESO Y ORDEN Y LIMPIEZ GENERAL
- REDUCCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN:
 - ESTRUCTURAS (PAREDES, TECHOS, SUPERFICIES), FÁCILES DE LIMPIAR Y DESINFECTAR, INCLUIDAS ESTRUCTURAS LABORATORIO. NO MADERA
 - TUBERÍAS ELEVADAS PARA TRANSPORTAR LÍQUIDOS DEBEN ESTAR AISLADAS HERMÉTICAMENTE
 - TEMPERATURA AMBIENTAL: 18-27° C: RECOMENDADO SISTEMA VENTILACIÓN AIRE FILTRADO ENTRADA Y SALIDA

ORGANIZACIÓN LABORATORIOS

- CONTAMINACIÓN CRUZADA
 - PROCEDIMIENTOS SECUENCIALES
 - SEPARAR ACTIVIDADES EN TIEMPO Y EN ESPACIO
 - EQUIPOS Y MATERIALES EXCLUSIVOS DE CADA ZONA.
 - RESTRICCIÓN ACCESO PERSONAL AUTORIZADO SEGÚN TIPO ANALÍTICA
 - CONTROL CONDICIONES AMBIENTALES: PLACAS DE SEDIMENTACIÓN O FROTIS DE SUPERFICIE. PROCEDIMIENTO DOCUMENTADO CON DETECCIÓN DE TENDENCIAS A LOS NIVELES DE BIOCONTAMINACIÓN
 - PROGRAMA DOCUMENTADO DE LIMPIEZA: CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LAS SUPERFICIES DE TRABAJO- ISO 18593
 - PROCEDIMIENTO DE VERTIDOS ACCIDENTALES
- PERSONAL- ISO/IEC 17025: NIVEL DE COMPETENCIA Y REQUISITOS GENERALES PARA LA COMPETENCIA DE LOS LABORATORIOS DE ENSAYO Y CALIBRACIÓN. FORMACIÓN PARA CADA TÉCNICA.
 - PROGRAMA ANUAL INTERNO O EXTERNO- GUIA ISO/IEC 43-1- **Ensayos de aptitud por comparaciones interlaboratorios : Desarrollo y funcionamiento de programas de ensayos de aptitud. Selección y uso de programas**
 - PROGRAMAS DE CONTROL DE CALIDAD INTERNO
 - EJERCICIOS INTERLABORATORIOS
 - HIGIENE. INDUMENTARIA APROPIADA, EPIS, DESCONTAMINACIÓN CORPORAL Y DE INDUMENTARIA.
 - NORMA ISO – 14461-1: FUENTES BAJOS NIVELES COMPETENCIA PERSONAL PARA RECUENTO DE COLONIAS:
 - PIPETEO
 - POCA HOMOGENEIDAD SUSPENSIÓN INICIAL
 - ERRORES DE RECUENTO...

TOMA DE MUESTRAS

- TOMA DE MUESTRAS
 - FRASCOS ESTÉRILES (500-1000 mL) DE VIDRIO BOROSILICATADO
 - BOLSAS DE PLÁSTICO DE UN SOLO USO
 - PLÁSTICO NO TÓXICO RESISTENTE AL CALOR O CON CAPACIDAD PARA ESTERILIZARSE POR RADIACIÓN
- ESTERILIZACIÓN PUNTO MUESTREO: PICAJES
- INERTIZACIÓN CLORO CON TIOSULFATO SÓDICO (1 L muestra--- 0,8 mL tiosulfato sódico al 3 %).
- DEFINICIÓN RASTREO PUNTOS MUESTREO
- TRASLADO A TEMP INFERIOR A 10º C
- ANÁLISIS ANTES DE 8 HORAS DEL MUESTREO



FRASCOS RECOLECTORES

* Frasco cuadrado de PE, boca ancha. Caducidad 5 años. Esterilizados por irradiación. Dimensiones de los frascos de 500 ml: base 80 x 65 mm, altura 120 mm.

REFERENCIA	CAPACIDAD	PRESENTACIÓN
064-BA0000	500 ml	25
064-BA2140*	500 ml	25
064BA00001	1000 ml	15
064BA21401*	1000 ml	15

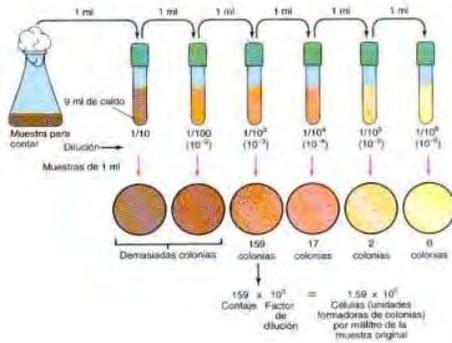
*RECOLECTOR DE AGUAS CLORADAS. LOS FRASCOS DE 500 ML Y 1 L CONTIENEN RESPECTIVAMENTE 0,4 ML Y 0,8 ML DE UNA SOLUCIÓN AL 3% DE TIOSULFATO SÓDICO.



* Frasco cuadrado de PEHD con tiosulfato, boca estrecha. Caducidad 2 años. Esterilizados por irradiación. Dimensiones de los frascos: base 70 x 70 mm, altura 160 mm

REFERENCIA	CAPACIDAD	PRESENTACIÓN
630-FIT0522*	500 ml	100

*RECOLECTOR DE AGUAS CLORADAS. CONTIENE 10 MG DE TIOSULFATO SÓDICO.



TÉCNICAS ANALÍTICAS BACTERIOLÓGICAS



$$Ci = N \times D \times 10$$

Ci = Concentración inicial (unidades: número de células / ml)

N = n° de colonias

D = dilución

- FILTRACIÓN POR MEMBRANA (ALTO GRADO REPRODUCIBILIDAD, ANALIZA GRANDES VOLÚMENES DE MUESTRA Y ES MÁS RÁPIDO QUE EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP), TÉCNICA DE CONCENTRACIÓN PARA OTROS ORGANISMOS
- UFC/100 mL
- ANALISIS MÍNIMOS:
 - BACTERIAS AEROBIAS TOTALES (37 °C y 22° C)
 - COLIFORMES TOTALES
 - COLIFORMES FECALES
 - *STREPTOCOCCOS FECALES*
 - *CLOSTRIDIUM SULFITO-REDUCTORES*

OTROS GRUPOS BACTERIANOS PARA ANÁLISIS COMPLETOS: PSEUDOMONAS, MOHOS Y LEVADURAS

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS:

- * INCAPAZ DE DESARROLLARSE EN EL AGUA.
- * SUPERVIVENCIA EN EL AGUA SUPERIOR A LOS ORGANISMOS PATÓGENOS.
- * SOPORTAR MEJOR A LOS DESINFECTANTES.
- * FÁCILES DE AISLAR, IDENTIFICAR Y CONTAR.
- * MUY ABUNDANTES EN HECES Y ESCOS EN OTROS MEDIOS.

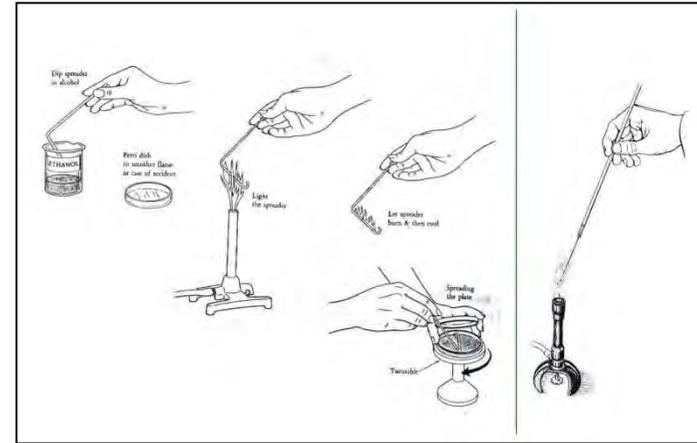
TÉCNICAS ANALÍTICAS BACTERIOLÓGICAS-INTERFERENCIAS

- ALTO GRADO DE TURBIDEZ EN LA MUESTRA
PROBLEMA- NECESIDAD DE DILUCIÓN
- PRESENCIA DE SUSTANCIAS TÓXICAS O INHIBITORIAS
- TEMPERATURAS NO ESTABLES
- ESTERILIZACIÓN CORRECTA DE TODO EL MATERIAL Y MEDIOS: 121 °C DE 15-20 MIN (AUTOCLAVE) O 170 °C DURANTE 1 HORA (CALOR SECO).

TÉCNICAS ANALÍTICAS BACTERIOLÓGICAS

MATERIALES

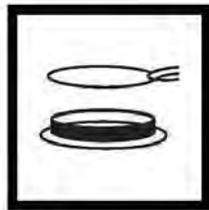
- EQUIPO FILTRACIÓN
- ESTUFAS INCUBADORAS
- LUPAS DE MANO O BINOCULARES
- MECHERO BUNSEN
- PROBETAS GRADUADAS Y ESTÉRILES DIFERENTES VOLÚMENES
- PIPETEAS GRADUADAS Y ESTERILES DIFERENTES VOLÚMENES
- PUNTAS ESTERILES MICROPIPETAS
- TUBOS DE ENSAYO CON TAPONES CON SOLUCIÓN TAMPONADA ESTERIL
- PINZAS DE ACERO INOXIDABLE CON BORDES BISELADOS
- SOPORTES FILTROS ESTERILES
- JERINGAS ESTÉRILES
- MEMBRANAS ESTERILES DE 0,22 Y 0,45 MICRAS
- PLACAS PETRI HERMÉTICAS Y ESTÉRILES (50 mm DE DIÁMETRO)
- CARTONES ABSORBENTES ESTÉRILES Y SIN SUSTANCIAS INHIBITORIAS DE UNOS 48 mm DE DIÁMETRO PARA 1,8-2,2 ml MEDIO CULTIVO
- MEDIOS DE CULTIVOS SELECTIVOS CON LOS INDICADORES QUE SE PRECISEN



SISTEMAS ESTERILIZACIÓN

- AUTOCLAVE (CALOR HÚMEDO)
- HORNO (CALOR SECO)
- LÁMPARAS ULTRAVIOLETA

TÉCNICAS ANALÍTICAS BACTERIOLÓGICAS- PROCEDIMIENTO GENERAL



1. Colocar una almohadilla absorbente esterilizada en una caja petri (utilizar las pinzas esterilizadas). Volver a colocar la tapa de la caja petri.

Nota: No tocar la almohadilla ni el interior de la caja petri.

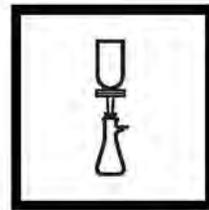
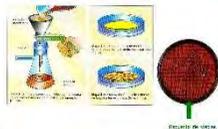
Nota: Para esterilizar las pinzas, sumergirlas en alcohol y quemarlas en un mechero de Bunsen o de alcohol. Dejar enfriar antes de usar.



2. Invertir la posición de las ampollas 2 ó 3 veces para mezclar el caldo. Abrir una ampolla de caldo m-ColiBlue24. Verter los contenidos en forma uniforme sobre la almohadilla absorbente. Volver a colocar la tapa de la caja petri.



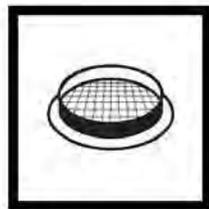
3. Armar el aparato de filtro de membrana, ver *Preparación de los materiales*, página 101. Con las pinzas esterilizadas, colocar un filtro de membrana con la rejilla hacia arriba en el conjunto.



4. Agitar la muestra enérgicamente para mezclar. Verter 100 ml de muestra o muestra diluida en el embudo. Aplicar vacío y filtrar la muestra. Enjuagar las paredes del embudo 3 veces con 20 a 30 ml de agua de dilución tamponada esterilizada.



5. Apagar el vacío y levantar la parte superior del embudo. Con las pinzas esterilizadas, transferir el filtro a la caja petri previamente preparada.



6. Rotar levemente el filtro y colocarlo con la rejilla hacia arriba en la almohadilla absorbente. Verificar la presencia de aire atrapado debajo del filtro y asegurarse de que el filtro esté en contacto con toda la almohadilla. Volver a colocar la tapa de la caja petri.



7. Invertir la caja petri e incubar a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 22 a 24 horas.



8. Retirar la caja petri de la incubadora y realizar el recuento de colonias utilizando un microscopio estereoscópico de 10 a 15X. Las colonias rojas y azules representan los coliformes totales y las azules representan al *E. coli*.

*Nota: Las colonias rojas pueden variar en la intensidad del color. Considerar todas las colonias rojas y azules como coliformes totales. Las colonias azules pueden parecer azules o violetas. Considerar todas las colonias azules o violetas como *E. coli*.*

AGAR LÍQUIDO

AGAR SÓLIDO

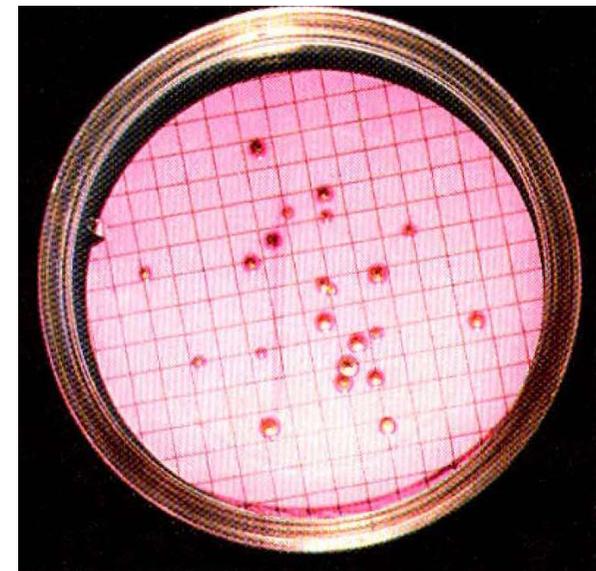
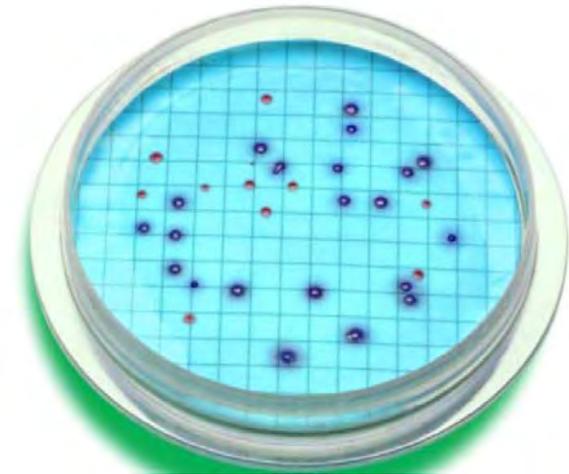
AMPOLLAS MONODOSIS

MEDIOS DESHIDRATADOS

- PREPARAR n PLACAS DE PETRI CON SUS CARTONES ABSORBENTE, ADICIONANDO EL MEDIO CON AMPOLLAS O 2 mL CON PIPETA ESTERÍL
- TRABAJAR EN MEDIO ESTERÍL- CAMPANA O MEDIO BUNSEN. REALIZAR FILTRACIONES DE LA MUESTRA POR DUPLICADO O TRIPPLICADO, CON DISTINTOS VOLUMENES (MAX DE 100 mL) O DILUCIONES.
- CONTROL + Y CONTROL –
- ESTERILIZAR CON ALCOHOL Y FLAMEADO LAS PINZAS Y COLOCAR LA MEMBRANA CON LA CUADRÍCULA HACIA ARRIBA, COLOCAR EMBUDO Y FILTRAR.
- TRAS FILTRAR LAVAR LAS PAREDES CON SOLUCIÓN TAMPONADA ESTERIL. PARA NUEVAS MUESTRAS FLAMEAR O ESTERILIZAR.
- LLEVAR LA MEMBRANA AL MEDIO-REFERENCIAR LA MUESTRA, TENIENDO EN CUENTA QUE NO SE FORMEN BOLSAS
- INTRODUCIR LA PLACA EN POSICIÓN INVERTIDA EN EL INCUBADOR
- TRAS PASAR TIEMPO INCUBACIÓN CONTAR CRECIMIENTO COLONIAS.
- CONTROL + Y -

TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS- COLIFORMES TOTALES Y *E. COLI*

- COLIFORMES TOTALES: INDICADORES NIVEL CONTAMINACIÓN DEL MEDIO. FERMENTAN LA LACTOSA A 37°C, DE 24-48 HORAS. **Colonias rojas, azules o violetas**
- COLIFORMES FECALES : HABITAN EXCLUSIVAMENTE EN EL INTESTINO DE LOS ANIMALES DE SANGRE CALIENTE: PRESENCIA=INDICADOR DE CONTAMINACIÓN FECAL. FERMENTAN LA LACTOSA A 44°C DE 24-48 HORAS, SIENDO UN SENSOR PRIMARIO LA *ECHERICHIA COLI*: INCUBACIÓN 36 +/- 2°C, DURANTE 21 +/-3 HORAS. **Colonias azules o violetas**
- MEDIO SELECTIVO: TERGITOL 7-AGAR O SIMILARES (M-COLIBLUE24)
- RANGOS: 0-200 UFC/100 mL.



Coliformes y *Escherichia coli*

TÉCNICAS MICROBIOLÓGICA S- COLIFORMES

AGAR CHAPMAN TTC (AGAR TERGITOL® 7) (AGAR DE LACTOSA TTC CON HEPTADECILSULFATO DE SODIO)

Medio selectivo para la detección y enumeración de coliformes, coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* mediante el método de filtración por membrana.

Este medio es el recomendado por las normativas UNE EN ISO 9308-1:2000.



COMENTARIOS

El Tergitol 7 inhibe el crecimiento de las bacterias Gram positivas.

La solución de TTC añadida al medio sirve como indicador del crecimiento bacteriano y para un reconocimiento previo de *E. coli* y *Enterobacter aerogenes*.



INSTRUCCIONES

Filtrar 100 ml de la muestra de agua a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,45 µm. Usar pinzas estériles para colocar, con cuidado, la cara filtrada de la membrana boca arriba dentro de la placa de filtración.

INCUBACIÓN

Incubar durante (21 ± 3) horas a (36 ± 2) °C, evitando una excesiva deshidratación de la placa controlando el grado de humedad.

INTERPRETACIÓN

Las colonias capaces de fermentar la lactosa con la consiguiente producción de ácido, provocando un cambio de color del medio de verde a amarillo, son consideradas sospechosas.

CONFIRMACIÓN

Todas las colonias sospechosas deben ser confirmadas mediante la prueba de la oxidasa y del indol. Deben ser consideradas coliformes todas las colonias características que son oxidasa negativas. Las colonias oxidasa negativas e indol positivas son consideradas *Escherichia coli*.



E. coli



Otras bacterias

SUPLEMENTOS
TTC 06-023

HELMINTOS: Método de Bailenger Modificado

Procedimiento

- 1) toma de muestra: 10 L para aguas tratadas y 1 L para aguas residuales crudas.
- 2) Dejar sedimentar la muestra 1-2 horas.
- 3) Eliminar aproximadamente el 90% de sobrenadante.
- 4) Repartir el sobrenadante en tubos de centrífuga y centrifugar a 1000g, 15 minutos.
- 5) Eliminar el sobrenadante de los tubos.
- 6) Realizar las centrifugaciones necesarias hasta terminar con el sedimento, reuniendo finalmente todo el sedimento en un solo tubo.
- 7) Lavar recipientes y tubos, y añadir el agua de lavado al propio sedimento.
- 8) Centrifugar a 1000g, 15 minutos
- 9) Suspender el sedimento en un volumen igual de tampón acetoacético pH=4,5.
- 10) Sedimento < 2 ml → añadir tampón hasta 4 ml.
- 11) Agitación; manualmente o con la ayuda de un vórtex.
- 12) Añadir 2 volúmenes de acetato etílico o de éter.
- 13) Agitación; manualmente o con la ayuda de un vórtex.
- 14) Centrifugar a 1000g, 15 minutos: Muestra dividida en 3 fases: a) Huevos de helmintos (inferior). b) Tampón (intermedia). c) Materias grasas (superior).
- 15) Anotar V de sedimento (fase inferior), y eliminar el resto de capas volcando suave y rápidamente.



Procedimiento

* Suspensión del sedimento en 5 volúmenes de solución de sulfato de zinc, y anotar correctamente el V final.

Mezclar bien la muestra, preferiblemente con la ayuda de un vórtex.

* Llenar la cámara de Mc Master con la ayuda de una pipeta Pasteur, y dejarla reposar mínimo 5 minutos.

Observar la cámara al microscopio con un aumento de 100x y/o 400x, y contar todos los huevos que aparecen dentro de la rejilla.

Pueden contarse 2-3 cámaras.

Cálculos: $N = AX/PV$

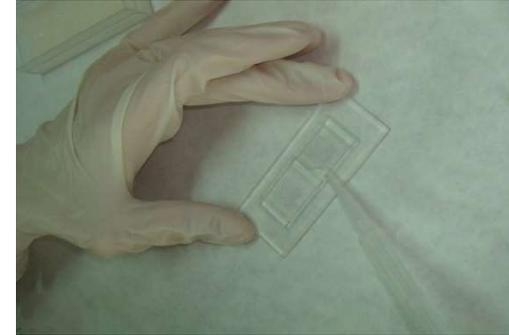
N = n° huevos/ litro muestra.

A = n° huevos contados, o promedio en 2 o 3 cámaras.

X = volumen del producto final en ml.

P = volumen cámara Mc Master (0,3 ml, o 0,15 ml si el portaobjetos es de una sola cámara).

V = volumen de la muestra original (litros).



Inconvenientes

- El éter puede resultar tóxico → guantes, mascarilla, campana.
- Fiabilidad no conocida con exactitud:
 - Buenos resultados para huevos de Nematodos, como *Ascaris spp.* y *Trichuris spp.*
 - Peores resultados para Trematodos.

R.D. 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas RD 4/2023

Nematodos Intestinales

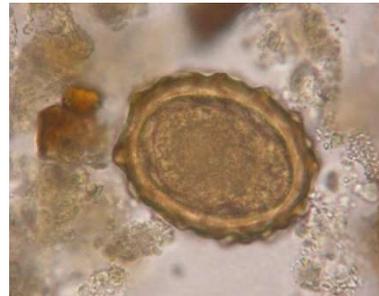
➤ *Ancylostoma spp.*



➤ *Trichuris spp.*



➤ *Áscaris spp.*



CESTODOS

	Imagen	Características
<i>Taenia spp.</i>		Tamaño: aproximadamente 40 µm. De forma casi esférica, y de color café. Presenta una cápsula externa gruesa, estriada, radial, en cuyo interior hay una oncosfera con seis ganchitos embrionarios.
<i>Hymenolepis nana</i>		Tamaño: aproximadamente 60x40 µm. Elíptico, ovoide, con pared delgada. Oncosfera con ganchos larvarios y rodeada por el embrióforo que presenta dos protuberancias con 4-8 filamentos polares.
<i>Hymenolepis diminuta</i>		Tamaño: aproximadamente 80 µm. Esférico. Oncosfera rodeada por embrióforo. Sin filamentos polares.

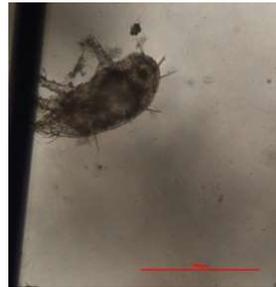
NEMATODOS

Nombre	Imagen	Características
<i>Trichuris trichiura</i>		<p>Tamaño: 50-55x20-25 μm.</p> <p>Presenta forma de barril. Alargado, con tapones en los extremos. Cubierta de color café.</p>
<i>Enterobius vermicularis</i>		<p>Tamaño: 50-60x20-30 μm.</p> <p>Ovoide, alargado, con un lado plano y otro convexo. Cubierta exterior albuminoidea, gruesa y transparente. Recién depositado, en el interior hay una larva giriniforme.</p>
<i>Áscaris lumbricoides</i>		<p>Tamaño: 50-70x30-40 μm.</p> <p>Ovalado. Presenta tres cubiertas: interior delgada y lipídica, intermedia gruesa y transparente, y exterior albuminoidea, de aspecto mamelonado y de color café dorado.</p>
<i>Ancylostoma duodenale</i>		<p>Tamaño: 60x40 μm.</p> <p>Forma ovoide. Cubierta delgada y transparente. Recién depositado, en el interior aparece una mórula que presenta de 2 a 8 células.</p>

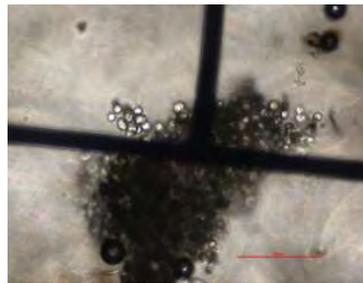
NEMATODOS

<p><i>Necator americanus</i></p>		<p>Muy similares a los huevos de <i>Ancylostoma duodenale</i>, solo que un poco más largos (70x40 µm).</p>
<p><i>Toxocara canis</i></p>		<p>Tamaño: 80-90 µm. Forma casi esférica. El aspecto de su superficie nos recuerda a una pelota de golf.</p>

ARTEFACTOS



Ácaro



Restos almidón



Espirales vegetales



Gotas de grasa



Grano de polen



Levaduras



Burbujas de aire



Célula vegetal

CONTROLES DE CALIDAD

- INSTRUMENTOS DE MEDIDA CUYA INTERFERENCIA SE DETERMINA POR MEDIOS DE REPRODUCIBILIDAD
 - MEDIOS ISOTERMOS:
 - INCUBADOR
 - NEVERAS, CÁMARAS REFRIGERACIÓN, CONGELADORES, ULTRACONGELADORES
 - BAÑO TERMOSTÁTICO
 - HORNO ESTERILIZACIÓN, AUTOCLAVE
 - TERMÓMETRO Y SISTEMAS DE CONTROL AUTOMÁTICO O NO DE TEMPERATURA
 - pH-METRO
 - CENTRÍFUGAS
 - TEMPORIZADORES Y CRONÓMETROS
- CEPAS DE REFERENCIA
- REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

INSTRUMENTOS DE MEDIDA CUYA INTERFERENCIA SE DETERMINA POR MEDIOS DE REPRODUCIBILIDAD. MEDIOS ISOTERMOS: INCUBADOR

CÁMARA AISLADA A TEMPERATURA ESTABLE.

- REGULADORES DE TEMPERATURA EN FUNCIÓN VOLUMEN INTERNO
 - SISTEMA DE REFRIGERACIÓN SI LA TEMPERATURA DE TRABAJO ES CERCANA O INFERIOR A LA AMBIENTE
 - LOCALIZACIÓN PROTEGIDA DE LUS SOLAR DIRECTA
 - LLENADOS PAULATINOS PARA EVITAR PÉRDIDAS DE TEMPERATURA
 - NO MANTENER PUERTAS ABIERTAS DURANTE PERIODOS PROLONGADOS Y EVITAR CORRIENTES.
- TEMPERATURAS PARA ALIMENTOS: 3º C +/- 2º C
 - OTRAS MUESTRAS: 5º C +/- 3º C
 - ALMACENAMIENTOS DISTINTOS PARA EVITAR CONTAMINACIÓN CRUZADA
 - REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS NO INOCULADOS
 - MUESTRAS DE ANÁLISIS
 - MEDIOS INCUBADOS Y CULTIVOS DE MICROORGANISMOS

INSTRUMENTOS DE MEDIDA CUYA INTERFERENCIA SE DETERMINA POR MEDIOS DE REPRODUCIBILIDAD: MEDIOS ISOTERMOS: CONGELADORES Y ULTRACONGELADORES

- CONGELADOR: TEMPERATURAS INFERIORES A -15°C . PREFERENTEMENTE -18°C PARA MUESTRAS DE ALIMENTOS
- ULTRACONGELADOR: UTILIZADO PARA MICROORGANISMOS, CULTIVOS DE TRABAJO Y/O DE REFERENCIA Y REACTIVOS. TEMPERATURAS INFERIORES A -70°C .
 - DEBE DISPONER DE CÁMARAS DIFERENCIADAS PARA REACTIVOS NO INOCULADOS Y MUESTRAS PARA ANÁLISIS Y CULTIVOS DE MICROORGANISMOS.
 - PROCEDIMIENTO DE CARGA PARA EVITAR PÉRDIDAS DE TEMPERATURA Y CONTAMINACIÓN CRUZADA
- MANTIENEN **TEMPERATURA FIJA** EN LÍQUIDOS (AGUA, ETILÉN, GLICOL, ETC...) CON O SIN AISLAMIENTO. NECESITAN SISTEMAS DE REFRIGERACIÓN SI LA TEMP DE TRABAJO ES SIMILAR O INFERIOR A LA TEMP AMBIENTE. BOMBA DE AGUA OPCIONAL.
- ERRORES PERMISIBLES $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- USOS: INCUBACIÓN MEDIOS CULTIVO INOCULADOS A TEMPERATURA CONSTANTE, MANTENIMIENTO DE AGAR FUNDIDO ESTERIL A TEMPERATURA FIJADA PARA USO EN MÉTODOS ESPECÍFICOS, PREPARACIÓN SOLUCIONES MUESTRAS TRATAMIENTO POR CALENTAMIENTO DE LAS MUESTRAS (POR EJEMPLO PASTEURIZACIÓN)
- INCUBACIÓN MEDIOS INOCULADOS: NIVEL LÍQUIDO 2 cm POR DEBAJO MEDIO ANÁLISIS, SIN QUE ENTRE AGUA POR LA APUERTURAS DE LAS PLACAS. APLICACIÓN DE GRADILLAS

INSTRUMENTOS DE MEDIDA CUYA INTERFERENCIA SE DETERMINA POR MEDIOS DE REPRODUCIBILIDAD: MEDIOS ISOTERMOS: HORNO ESTERILIZACIÓN

- DESTRUCCIÓN MICROORGANISMOS POR CALOR SECO: 160-180° C UNIFORME +/- 1° C
- DEBE INCLUIR TERMOSTATO Y SISTEMA DE REGISTRO DE TEMPERATURA
- APLICACIÓN: MATERIAL METÁLICO Y/O VIDRIO. NO VÁLIDO PARA PLÁSTICOS Y GOMAS.
- PROCESO ESTERILIZACIÓN: 1 h A 170° C O COMBINACIÓN EQUIVALENTE DE TEMPERATURA/TIEMPO
- TRAS ESTERILIZACIÓN ESPERAR AL ENFRIAMIENTO COMPLETO PARA EVITAR ROTURAS
- OBJETIVO: ALCANZAR TEMPERATURA SATURACIÓN DE VAPOR EN LA CÁMARA PARA CONSEGUIR LA ESTERILIZACIÓN BIOLÓGICA
- EQUIPACIÓN MÍNIMA: VÁLVULA SEGURIDAD, LLAVE PASO DE DRENAJE, DISPOSITIVO REGULACIÓN TEMPERATURA (+/- 3° C), SONDA TEMPERATURA O TERMOPAR, TEMPORIZADOR Y REGISTRO DE TEMPERATURA
- EL VALOR SATURADO DE LA CÁMARA DEBE ESTAR COMO MÍNIMO A 121°C PARA DESTRUIR LOS MICROORGANISMOS
- NO RETIRAR EL MATERIAL HASTA QUE LA TEMPERATURA NO HAYA DESCENDIDO POR DEBAJO DE 80° C

- INSTRUMENTOS DE MEDIDA CUYA INTERFERENCIA SE DETERMINA POR MEDIOS DE REPRODUCIBILIDAD: TERMÓMETRO Y SISTEMAS DE CONTROL AUTOMÁTICO O NO DE TEMPERATURA

- TIPOS TERMÓMETROS: DE COLUMNA LÍQUIDA, DE RESISTENCIA DE PLATINO, TERMOPARES...
- DEBEN INCLUIRSE EN RECIPIENTES ADECUADOS RELLENOS DE GLICEROL, PARAFINA LÍQUIDA O POLIPROPILENGLICOL PARA AMORTIGUAR PÉRDIDA DE CALOR AL ABRIR LAS PUERTAS Y DISPONER DE UNA TEMPERATURA MÁS ESTABLE O EN EL AGUA SEGÚN ESPECIFICACIONES.
- CALIBRADO CON PATRONES CERTIFICADOS- G- ENAC-04- DE FORMA ANUAL EN VARIOS PUNTOS INTERMEDIOS
- TERMÓMETROS CERTIFICADOS DEBEN SER RECALIBRADOS CADA CINCO AÑOS Y TERMOPARES CADA TRES.
- UTILIZACIÓN DEL TIPO Y RANGO EN FUNCIÓN TEMPERATURA REQUERIDA
- LA INCERTIDUMBRE DE MEDIDA EN LOS PATRONES CERTIFICADOS DEBE SER CUATRO VECES INFERIORES AL INTERVALO DE ERRORES MÁXIMOS PERMISIBLES

- INSTRUMENTOS DE MEDIDA CUYA INTERFERENCIA SE DETERMINA POR MEDIOS DE REPRODUCIBILIDAD: CENTRÍFUGAS
 - SEPARACIÓN DE PARTÍCULAS Y MICROORGANISMOS POR FUERZAS CENTRÍFUGAS O CONCENTRACIÓN DE MICROORGANISMOS
 - PREVENCIÓN AEROSOLES Y CONTAMINACIÓN CRUZADA: CONOS CENTRÍFUGAS ESTÉRILES Y SELLADOS
 - CALIBRACIÓN VELOCIDAD CENTRIFUGACIÓN- PARÁMETRO CRÍTICO: G-ENAC-04. ANUAL
 - MANTENIMIENTO: LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN. ESPECIFICACIONES FABRICANTE
- INSTRUMENTOS DE MEDIDA CUYA INTERFERENCIA SE DETERMINA POR MEDIOS DE REPRODUCIBILIDAD: TEMPORIZADORES Y CRONÓMETROS
 - SE UTILIZAN PARA CONTROLAR LOS TIEMPOS CONCRETOS DE CADA APLICACIÓN, DONDE LA OPERACIÓN DEL PROCESO ES CRÍTICA
 - CALIBRACIÓN: G-ENAC-04- ANUAL O TRAS REPARACIÓN
 - MANTENIMIENTO: LIMPIEZAS PROGRAMADAS
- INSTRUMENTOS DE MEDIDA CUYA INTERFERENCIA SE DETERMINA POR MEDIOS DE REPRODUCIBILIDAD: CEPAS DE REFERENCIA
 - USO: DEMOSTRAR EXACTITUD RESULTADOS, CALIBRAR EQUIPOS, CONTROLAR CALIDAD LABORATORIO, VALIDAR MÉTODOS, PERMITIR COMPARACIÓN MÉTODOS
 - LAS CEPAS DE REFERENCIA PUEDEN SER SUBCULTIVADAS- ISO 11133-1 PARA MATERIAL DE RESERVA- CONSERVACIÓN EN ALÍCUOTA ULTRACONGELADAS Y LIOFILIZADAS

- INSTRUMENTOS DE MEDIDA CUYA INTERFERENCIA SE DETERMINA POR MEDIOS DE REPRODUCIBILIDAD: REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO
- REACTIVOS: CALIDAD ADECUADA. VERIFICACIÓN , IDONEIDAD POR LOTES Y DEFINICIÓN DEL PERIODO DE VÁLIDEZ (MEDIANTE MICROORGANISMOS TRAZABLES-CERTIFICADOS CON RESPUESTA NEGATIVA-POSITIVA)
- REGISTRO DE: NOMBRE DE LOS MEDIOS Y LISTAS DE COMPONENTES, PERIODO VALIDEZ Y CRITERIOS ACEPTABILIDAD ACEPTADOS, CONDICIONES CONSERVACIÓN, PLAN Y FRECUENCIA DE MUESTREO, CONTROL ESTERILIDAD, CONTROL CRECIMIENTO ORGANISMOS DESEADOS Y NO DESEADOS, CONTROLES FÍSICOS Y FECHA DE EMISIÓN DE LAS ESPECIFICACIONES.
- EVALUACIÓN DE RECUPERACIÓN Y SUPERVIVENCIA: ISO 11133- PARTES 1 Y 2
- IDENTIFICACIÓN- TRAZABILIDAD- ETIQUETADO
- CONSERVACIÓN ADECUADA SEGÚN REQUERIMIENTOS
 - MEDIOS DESHIDRATADOS: LUGARES FRESCOS, SECOS Y OSCUROS. HERMETICAMENTE CERRADOS. VERIFICAR QUE NO HAY APELMAZAMIENTO NI CAMBIOS DE COLOR Y DEBEN SER REHIDRATADOS CON AGUA DESTILADA, DESIONIZADA O DE ÓSMOSIS INVERSA LIBRE DE SUSTANCIAS BACTERICIDAS O INHIBIDORAS SALVO QUE EL MÉTODO ASÍ LO ESPECIFIQUE.
 - MEDIO DE CULTIVOS LISTOS PARA USO. VERIFICACIÓN POR SIEMBRAS

DOCUMENTACIÓN APORTADA

MANUAL PRÁCTICO PARA EL ESTUDIO
DE GRUPOS BIOINDICADORES
EN PROCESOS DE FANGOS ACTIVOS



MUCHAS GRACIAS

gbs@asociaciongbs.com



+ INFORMACIÓN
info@aeopas.org
955 40 85 06



AGUASRESIDUALES.INFO

aeopas
Asociación Española de Operadores
Públicos de Abastecimiento y Saneamiento

