

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



**ANÁLISIS Y MODELIZACIÓN DE LA
INACTIVACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* EN AGUAS
RESIDUALES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Gilberto Antonio Benítez Rodas

Bajo la dirección del doctor

José Martínez Peinado

MADRID, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Microbiología III



**ANÁLISIS Y MODELIZACIÓN DE LA INACTIVACIÓN
DE *Escherichia coli* EN AGUAS RESIDUALES**

**Memoria que presenta Gilberto Antonio Benítez Rodas para optar al grado
de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.**

Director

Dr. José Martínez Peinado

Madrid, 2013



Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología III
José Antonio Novais nº 12
Ciudad Universitaria. 28040 (Madrid)
Tfno y fax: 91 394 49 64

El Dr. José Martínez Peinado, catedrático de Microbiología de la Universidad Complutense

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada “**Análisis y modelización de la inactivación de *Escherichia coli* en aguas residuales**”, presentada por el Lcdo. Gilberto Antonio Benítez Rodas para optar al grado de doctor ha sido realizada en el Departamento de Microbiología III de la Facultad de Biología de esta Universidad bajo mi dirección, y por ello autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal nombrado al efecto.

Y para que conste donde proceda a todos los efectos oportunos firmo el presente certificado en Madrid, a 15 de abril de 2013.

Prof. Dr. José Martínez Peinado
Catedrático de Microbiología

AGRADECIMIENTOS

Antes de mencionar a una gran cantidad de personas que han influido en forma positiva en mi vida durante estos cuatro años de doctorado, debo empezar agradeciendo a la AECID (Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo) por todo el soporte económico que me ha brindado y mediante el cual pude realizar y terminar satisfactoriamente el doctorado. Además, el trabajo experimental de mi tesis se ha desarrollado dentro del proyecto Consolider "Tragua", financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia del Gobierno español. Mi agradecimiento también para ellos.

Durante este período, he conocido a tantas personas maravillosas que ahora me resulta imposible mencionar a todas. De todas maneras, quiero resaltar a algunas que las considero muy importantes en mi vida.

Comenzaré por agradecer a todas las personas del Departamento de Microbiología III de la Facultad de Biología, que colaboraron conmigo durante mi estancia y/o me han brindado su amistad desinteresada. Nunca voy a olvidar los momentos de compartidos, sobre todo en los almuerzos (Belén, Paco, Jessica, Raquel, Sara, Ruth, Eva, Julián, Elena, Noelia, Petra).

A mi Director de tesis Dr. José Martínez Peinado, por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación y por toda la paciencia que me ha tenido para poder realizar y terminar la tesis doctoral, así como también por todas las sugerencias y consejos que me ha dado tanto a nivel personal y sobre todo profesional.

No puedo dejar de mencionar a Maribel, que siempre sonriente y alegre ha atendido a todas mis inquietudes, y por sus palabras de aliento: "Tú no te preocupes, todo saldrá bien, ya lo verás".

A mi querida amiga Eva, que siempre ha estado allí para escucharme, apoyarme en lo que necesite, sobre todo en este último tiempo, que me ha ayudado con todos los papeleos de la Facultad.

Por supuesto que tampoco puedo dejar de agradecer a Silvia, por haberme proporcionado las muestras de efluentes y por toda su amabilidad de siempre.

También debo mencionar aunque ya no esté en el Laboratorio a Julián, que me ayudó en el inicio del doctorado y mediante quién conocí a un grupo de amigos increíble y con quiénes hasta hoy sigo compartiendo de cerca.

Tampoco puedo dejar de recordar a los amigos del Colegio Mayor “Nuestra Señora de Guadalupe” donde he pasado momentos inolvidables (Tatiana, Clarisa, Leticia, Nivia, Mariela, Touraj, Nathalie, Humberto, Pablo, Deni, etc.)

A mi grupo de amigos de Madrid, por lo momentos inolvidables que en muchas oportunidades me sirvieron para relajarme y olvidarme de algunos malos momentos (Kike, Richard, Aura, Fato, Marta, Muro, Robert, Dani y en especial a Daniele).

A los amigos del CEMIT-DGICT-UNA (Paraguay), en especial a la Dra. Inocencia Peralta por todo el apoyo brindado, al Ing. Ftal. César Cardozo por facilitar todos los trámites para mi permiso, al Dr. Héctor Nakayama por su amistad incondicional, a la Lic. Cecilia Araujo por toda la ayuda brindada, y a todos los amigos en especial de Agua e Hidrobiología.

Por último quiero agradecer al CONACyT – Paraguay, por el apoyo económico para poder completar la etapa final de mi tesis.

*Esta tesis va dedicada a mis padres, Francisco Benítez Centurión y
Felipa Rodas Martínez*

INDICE

Índice	I
Resumen	IV
Summary	VII
Acrónimos	XIII
1. Introducción.	1
2. Objetivos de la Tesis.	43
3. Materiales y Métodos.	46
4. Resultados.	76
4.1 Puesta a punto de una metodología general para medir la capacidad de autodepuración de cualquier tipo de agua	
4.1.1. Análisis de la precisión de los resultados de los métodos Chromocult y Colilert en el recuento de <i>E. coli</i>	77
4.1.2. Desarrollo de una metodología específica para el cálculo de la incertidumbre asociada al recuento de <i>E. coli</i> por el método Colilert.....	79
4.1.3. Análisis de la estabilidad de las propiedades de la cepa de <i>E. coli</i> utilizada en los ensayos.....	82
4.1.4. Análisis de la estabilidad de los mecanismos autodepuradores del agua y de la influencia de los factores ambientales (estación del año y radiación solar).....	84
4.2. Desarrollo y validación de un modelo matemático que permita describir y cuantificar la inactivación de <i>E. coli</i> en diversos tipos de aguas	
4.2.1 Análisis de la diversidad de cinéticas de inactivación encontradas en diferentes tipos de aguas.....	87

4.3. Identificación de mecanismos potenciales de inactivación de <i>E. coli</i> en las aguas residuales tratadas	
4.3.1 Efecto de la suspensión en agua destilada sobre la viabilidad de <i>E. coli</i>	94
4.3.2 Efecto de microbiota presente y eliminable por filtración en el laboratorio.....	96
4.3.3 Efecto de los componentes termosensibles.....	100
4.3.4 Efecto de los tratamientos terciarios en las plantas depuradoras: Microfiltración y Ósmosis inversa.....	103
4.4. Observación de los daños celulares inducidos durante un proceso de autodepuración	
4.4.1 Microscopía de fluorescencia.....	105
4.4.2 Citometría de flujo.....	109
4.5. La heterogeneidad de las poblaciones de <i>E. coli</i> sometidas a procesos de autodepuración medida indirectamente a través del estado fisiológico celular (cultivos a partir de una sola célula en Bioscreen)	
4.5.1. Heterogeneidad de poblaciones, en diferentes tipos de aguas, a lo largo del proceso de autodepuración.....	113
4.5.2 Comparación de la heterogeneidad de una población de <i>E. coli</i> , crecida en medio líquido y resuspendida en agua destilada, de estanque y en efluente secundario.....	115

5. Discusión

5.1. Puesta a punto de una metodología general para medir la capacidad de autodepuración de cualquier tipo de agua.	
5.1.1. Análisis de la precisión de los resultados de los métodos Chromocult y Colilert en el recuento de <i>E. coli</i> J08.....	121
5.1.2. Desarrollo de una metodología específica para el cálculo de la incertidumbre asociada al recuento de <i>E. coli</i> J08 por el método Colilert.....	122
5.1.3. Análisis de la estabilidad de las propiedades de la cepa de <i>E. coli</i> J08 utilizada en los ensayos.....	123

5.1.4. Análisis de la estabilidad de los mecanismos inactivantes del agua y de la influencia de los factores ambientales.....	124
5.2. Desarrollo y validación de un método matemático que permita describir y cuantificar la inactivación de <i>E. coli</i> J08 en diversos tipos de agua.	
5.2.1. Análisis de la diversidad de cinéticas de inactivación encontradas en diferentes tipos de aguas.....	131
5.3. Identificación de mecanismos potenciales de inactivación de <i>E. coli</i> J08 en las aguas residuales tratadas.	
5.3.1. Efecto de la suspensión en agua destilada sobre la viabilidad de <i>E. coli</i> J08.....	135
5.3.2. Efecto de la microbiota presente en el efluente y eliminable por filtración en el laboratorio.....	136
5.3.3. Efecto de los componentes termosensibles.....	138
5.3.4. Efecto de los tratamientos terciarios sobre la cinética de inactivación de <i>E. coli</i> J08.....	140
5.4. Observación de los daños celulares inducidos durante un proceso de autodepuración.....	141
5.5. Heterogeneidad de la población de <i>E. coli</i> J08, medida en cultivos procedentes de inóculos celulares.....	142
6. Conclusiones	147
7. Referencias	150

RESUMEN

RESUMEN

Este trabajo de investigación se ha realizado dentro del proyecto CONSOLIDER-TRAGUA, formado por 24 grupos de investigación en diferentes áreas que abordaron, de una manera integrada, el tratamiento y la reutilización de aguas residuales urbanas depuradas. El objetivo del proyecto era obtener, desarrollar y validar nuevos procesos de depuración así como metodologías analíticas y de gestión, para conseguir una gestión sostenible del proceso global de recuperación del agua.

Los objetivos generales de esta tesis han sido: i) Analizar los métodos disponibles comercialmente para el recuento de *Escherichia coli* en aguas, seleccionar el más adecuado y desarrollar un protocolo normalizado de recuento, teniendo como criterio principal la minimización de la incertidumbre asociada al recuento. ii) Desarrollar un modelo matemático general que permita caracterizar, cuantificar y comparar la cinética de inactivación de *E. coli* en diferentes tipos de aguas. iii) Identificar los potenciales tipos de mecanismos de inactivación de *E. coli* en las aguas residuales tratadas y establecer las relaciones entre los tipos de mecanismos fisiológicos de inactivación y las cinéticas de autodepuración observadas. iv) Analizar el efecto de los tratamientos terciarios, diseñados para eliminar los patógenos u otras contaminaciones químicas aún presentes en los efluentes secundarios, sobre la capacidad de autodepuración de los efluentes tratados y su utilización posterior.

La normativa 1620/2007 para la reutilización de las aguas residuales tratadas establece las concentraciones máximas de *Escherichia coli* correspondientes a los diferentes usos. El R.D. especifica que el recuento se debe basar en la detección de las enzimas β -glucuronidasa; por este motivo en este trabajo se han utilizado los métodos Chromocult y Colilert. Ambos métodos ha resultado igualmente válidos. Sin embargo recomendamos el uso de Colilert porque con el uso simultáneo de bandejas con límite de detección diferente (2000 y 200 NMP/100mL) permite aumentar la precisión sin aumentar las diluciones, una de las mayores fuentes de error experimental (y por tanto de incertidumbre) en el cálculo del número de viables.

Otro resultado significativo de esta tesis es el desarrollo y validación de un modelo matemático, que puede ser empleado para describir las diferentes formas cinéticas de inactivación observadas en los distintos tipos de aguas. Esta ecuación, basada en la distribución de Weibull es muy sencilla:

$$\text{Log } N = \text{Log } N_0 - b^* t^n$$

El valor del parámetro **n**, permite clasificar las cinéticas de inactivación en dos grandes grupos, según su valor sea mayor o menor que 1. En el primer grupo (**n**>1) se encuentran las cinéticas convexas que se observan en aguas limpias o residuales con tratamientos terciarios en las que la población responde de forma bastante homogénea y en las que predominan los factores endógenos (envejecimiento celular). En el segundo grupo (**n**<1) están las aguas contaminadas o residuales sin tratar o con tratamientos secundarios, en las que la respuesta es heterogénea y en las que predominan los factores exógenos (microbiota acompañante, toxinas, etc.).

Hay que resaltar que la heterogeneidad de la población ha podido ser medida por el análisis del crecimiento de cultivos procedentes de una sola célula en placas multipocillo utilizando el Bioscreen confirmando la validez de este método para este tipo de estudios. Los resultados confirman la hipótesis de que en aguas limpias los factores de inactivación son endógenos, como el envejecimiento, y toda la población se ve igualmente afectada, mientras que en aguas residuales la acción de los agentes inactivantes exógenos es selectiva y la heterogeneidad producida puede ser cuantificada con este método.

Desde el punto de vista tecnológico podemos destacar una conclusión interesante de esta tesis ya que hemos comprobado que una regeneración exhaustiva elimina los factores de autodepuración del agua, tornándola indefensa antes potenciales recontaminaciones, lo que constituye un riesgo potencial que debe ser tenido en cuenta, por ejemplo en el rellenado de acuíferos cercanos a núcleos urbanos.

En términos generales podemos concluir por tanto que se han cumplido los objetivos previstos ya que, tanto el sistema experimental diseñado para medir la capacidad de depuración natural de los efluentes, como el modelo matemático desarrollado para describir cuantitativamente los resultados, son científicamente y tecnológicamente válidos.

SUMMARY

SUMMARY

This research work is part of the project “CONSOLIDER-TRAGUA”, which included 24 research groups in different areas. They developed an integrated approach for the treatment and reuse of urban waste waters. The objective of the project was to obtain, to develop and to validate new treatment processes, as well as new analytical and management methodologies, taking into account criteria such as chemical and biological quality of water and the assessment of their impact on the environment, to get a sustainable management of the global process of used water regeneration.

There were two main microbiological issues. The first one was to select a counting method of *E. coli* viable cells, accurate and precise; those followed the governmental rules and were also user-friendly both in the R&D labs and the treatment plants. The second one was to study the integration of self-regeneration, a natural process of pathogens inactivation in water, into an integrated system of tertiary treatments which could be useful to the recovery and reuse the effluents from secondary treatments.

For these reasons the general objectives of this thesis have been i) To analyze the commercially available methods to count *E. coli* in waters, selecting the most appropriate and developing a normalized protocol for its use, having as the main criterion to minimize the uncertainty associated to the method. ii) To develop a general mathematical model, which were able to characterize, quantify and compare the inactivation of *E. coli* in different types of waters. iii) To identify the potential types of inactivation mechanisms present in the waste waters and to establish relations between those mechanisms and the observed inactivation kinetics. iv) To analyze the effect of tertiary treatments, designed to eliminate pathogens and other chemical contaminants present in the secondary effluents, on the self-regeneration capacity of the treated effluents and their use.

Those rules are include in the RD.1620/2007 for the reuse of treated waste waters and establishes the maximum limits for the concentration of *E. coli* in waters to be used in urban, agricultural or industrial zones. The rule specifies that the method to be used for counting *E. coli* must be based on the detection

of β -glucuronidase activity. For this reason we have selected the methods Chromocult and Colilert as the most used commercial methods based on that principle.

Our results make us to conclude that both methods are equally valid to quantify the concentration of *E. coli* in waste waters. However we recommend the use of Colilert because with the simultaneous use of several trays, with different detections limits (2000 and 200 MPN/100 ml) it is possible to increase the precision without increasing dilutions, one of the sources of experimental error (and uncertainty) in the viable counts. To perform the calculations we have develop a method that calculates the uncertainty of the MPN, from data obtained with the simultaneous use of several Colilert trays that is available in Excel.

Another significant result of this thesis is the development and validation of a mathematical model, based on the Weibull distribution that can be used to describe the inactivation kinetics of *E. coli* in waters. It has the advantage that one single equation can be used to describe the different kinetics observed in very different types of waters. The equation is very simple:

$$\text{Log } N = \text{Log } N_0 - b * t^n$$

The values of one of the parameters, **n**, classify the kinetics curves in two big groups, depending on the relation of n with 1. The first group (**n**>1) includes the convex kinetics that are observed in clean waters, from distilled water to effluents with a tertiary treatment, and the second one (**n**<1) includes the concave kinetics observed in contaminated natural waters, waste water and effluents from primary and secondary treatments. It has been hypothesized that the two types of kinetics curves observed (convex and concave) are due to the differential action of two big groups of factors, endogenous and exogenous, that are distributed unequally in the different types of waters. In natural, clean waters or effluents with tertiary treatments, the endogenous factors, such as the cellular aging, would be predominant. In these type of water, the bacteria would affected in an homogeneous way by the endogenous factors, all the cells would be similarly altered, the injured cells would accumulated in the population and,

as the Weibull equation predicts, a convex inactivation kinetics ($n > 1$), with an initial period without apparent inactivation, and a late inactivation of all the injured cells would be observed. In natural contaminated water or effluents from secondary treatments, the exogenous factors (other microbiota, toxins, etc.) would be predominant and the bacterial populations would be affected in a selective way, which produces a sequential inactivation of the cells, beginning with the more sensitive ones and accumulating the more resistant ones that would be inactivated very slowly. This kind of process determines concave kinetics ($n < 1$) and produces the tails of resistant bacteria.

To support this hypothesis we have to be able to measure these effects, that is, we have to determine, quantitatively, if a *E. coli* population incubated in clean waters was affected in an homogeneous way and, also that a similar population incubated in affluent or naturally contaminated water showed the selective effect of the exogenous factors present in those types of water.

This objective has been fulfilled in this thesis thanks to the analysis of the growth of cultures coming from a single cell, in multiwell plates using the Bioscreen C apparatus, with a methodology that is called "single cell microbiology".

Our results have confirmed the validity of this methodological approach for these type of studies. The theoretical basis of this approach is i) The population can be subdivided by dilution into aliquots with only one cell per aliquot. That will be inoculated into the wells. ii) The cell of each well will initiate its growth once it is in conditions to do so. The time needed to do so is the lag time. iii) Lag time depends on two factors, the initial physiological state of the cell, that is a consequence of its previous incubation conditions and the characteristics of the new medium and conditions in which it will grow. iv) This physiological state, has been quantify by Baranyi and other authors to oscillates between 0 (that of the cells unable to grow) and 1 (that of the cells ready to grow immediately). v) When the growth conditions are equal in all the wells for all the cells, the lag time of each cell is a direct estimation of its initial physiological state vi) The Bioscreen C does not enable the direct measurement of the lag time but produces an estimation from the detection times, which are the times needed

for each cells to reach a predetermined population value which is measured espectrofotometrically. vii) It has been proved that the stochastic distributions of the detection times that are obtained applying this methodology are related to the distributions of the corresponding lag times and consequently to the distribution of the initial physiological states of the individual cells. In this way, the Bioscreen C results, expressed as detection times can be used to analyze the initial physiological states of the cells after been subject to different incubation conditions.

The results obtained applying this methodology have shown the clear differences existing between bacterial populations incubated in clean water or in waters with exogenous, inactivating agents. In the first case it has been observed that the distribution of the detection times at the beginning of the incubation is symmetric, with a low dispersion, indicating that the population is relatively homogenous with all the cells showing a similar initial physiological state. After incubation in clean water, this homogeneity is maintained during a long time; what changes is the mean of the population, which increases along the incubation time, indicating that the all the cells of the whole population are being affected displaying a worse physiological state. However these physiological alterations are not enough to inactivate the cells and the inactivation curve is a plateau. After about one month of incubation, when in the inactivation curve shows that some cells are dying, it can be observed that groups of cells with very long detections time, that is, with very bad physiological states begin to appear in the distribution plot.

A complete different pattern occurs with the contaminated water. To begin with, the initial distribution is only partially equivalent to that of clean waters because there are some instantaneous effects that can be observed. Just after inoculation, a more asymmetrical distribution, with a wider dispersion can be observed. This is the consequence of the action of the exogenous factor, affecting with different intensity each of the cells, in such a way that, although some resistant ones maintain the initial and normal physiological state, some groups of injured cells begin to appear. The asymmetry and dispersion increase with the incubation time in such a way that, at the end of incubation time the dispersion of the distribution is ten times greater than the initial one. This

pattern is observed both in pond water as in the effluent, but the effects are stronger and occur earlier after incubation in the effluent. The analysis of the distributions after a fortnight, when the inactivation curve shows that most of the cells are already inactivated, shows that a small group of resistant cells with detection times and physiological states similar to those of the control cells are still present, but the great majority of the population is included in groups with very high detection times and very bad physiological states. Taken together these results support the hypothesis sustained by Peleg and others authors relating the differences in shape among inactivation kinetics with the different mechanisms underlying inactivation.

From a technological point of view, we can highlight a conclusion of this thesis: Our results show that a complete regeneration, for example after a tertiary treatment, eliminates the inactivating factors present originally in the water. Consequently the water became defenseless against potential recontaminations. This is a risk that has to be taken into account specially in the refilling of aquifers close to urban zones where this kind of recontamination is possible.

In general terms we can conclude that the objectives of this thesis have been fulfilled because, both the experimental methodology developed to measure the self-regeneration capacity of water and the mathematical model used to describe quantitatively the results are scientifically valid and technologically useful.

ACRÓNIMOS

ACRÓNIMOS

μ_{MAX}	Tasa Específica Máxima de Crecimiento
ADI	Agua Destilada Inoculada
ADTTI	Agua Destilada/Tratamiento Térmico Inoculado
Af	Accuracy o Factor de Exactitud
b	Factor de Localización
Bf	Bias o Factor de Sesgo
cél/mL	Células por Mililitro
CN	Control Negativo
Conc.	Concentración Inicial o Final
CP	Control Positivo
CTC	5-cyano-2,3-ditolyt tetrazolium chloride
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno
DO	Densidad Óptica
DQO	Demanda Química de Oxígeno
Ec.	Ecuación
EDAR	Estación Depuradora de Aguas Residuales
Fac. Biotic.	Factores Bióticos
Fac. Solubl.	Factores Solubles
FSC	Luz Dispersa hacia Adelante (Forward Scatter)
H&R	Ecuación Hurley and Roscoe (1983)
Ind.	Indeterminadas
Inoc.	Inóculo Inicial
INT	2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride
IP (-)	Ioduro de Propidio Negativas
IP (+)	Ioduro de Propidio Positivas
MUG	Metilumbelliferyl- β -D-glucuronico
n	Forma de la Curva resultado del Ajuste de Weibull
N	Número de Células (UFC o NMP/mL)
N₀	Inóculo Inicial (UFC o NMP/mL)
NMP	Número Más Probable
ONPG	Ortonitrophenil- β -D-glucuronico
QT	Quanti Tray (Bandejas Colilert)
R.D.	Real Decreto
RD	Real Decreto
Resd. Sint. – G	Agua Residual Sintética Sin Glucosa
Resd. Sint. + G	Agua Residual Sintética Con Glucosa
SCDLn	Suma de los Cuadrados de las Diferencias del Logaritmo Natural
SE	Standard Error o Error Estándar
SD	Standard Desviation

Sec. CFI	Efluente Secundario Filtrado e Inoculado
Sec. CFTTI	Efluente Secundario Filtrado/Centrifugado/Tratamiento Térmico
Sec. FBFI	Efluente Secundario Fase Biótica No Filtrada Inoculada
Sec. I.	Efluente Secundario Inoculado
SSC	Luz Dispersa Lateralmente (Side Scatter)
td	Tiempo de Detección
Ter. Micr. I.	Efluente Terciario/Microfiltración Inoculado
Ter. Osm. I.	Efluente Terciario/Osmosis Inversa Inoculado
TSA	Triptona Soja Agar
TSB	Triptona Soja Broth
U.S.P.H.S.	Servicio de Salud Público de Estados Unidos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VC	Viable Cultivable
VNC	Viable No Cultivable

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. AGUAS RESIDUALES

Las aguas residuales pueden definirse como las aguas que provienen de las diversas actividades humanas (1) y que poseen materiales que no son propios de un agua en condiciones normales, denominados contaminantes, que provocan el deterioro de los cuerpos de agua y la recontaminación de aquellos que puedan llegar a ser vertidas sin un tratamiento previo.

Estas aguas por lo general son canalizadas hasta las estaciones depuradoras donde por varios procesos son eliminados o retirados los elementos no pertenecientes originalmente a ellas.

Los tipos de contaminación de las aguas residuales se clasifican en físicos, que son los que alteran los factores físicos y a la biota acuática pero que por sí mismos no son tóxicos, como son los tensoactivos, los sólidos en suspensión y la temperatura; los contaminantes químicos cambian la concentración de los componentes químicos naturales del agua causando niveles anormales de los mismos. Generalmente los de tipo industrial, introducen sustancias extrañas al medio ambiente acuático, mucho de las cuales pueden actuar en detrimento de los organismos acuáticos y de la calidad del agua en general. Algunos de estos son la salinidad, el pH de las sustancias marcadamente tóxicas, la desoxigenación, y la contaminación por agentes bióticos, que son los efectos de la descarga de material biogénico que cambia la disponibilidad de nutrientes del agua, y por tanto, el balance de especies que pueden subsistir. También el aumento de materia orgánica origina el crecimiento de especies heterótrofas en el ecosistema, que a su vez provoca cambios en las cadenas alimentarias (2).

1.1.1. Clasificación de las aguas residuales según su origen urbano o industrial:

La clasificación que describimos a continuación es una versión resumida de la publicada por Seoáñez (3)

1.1.1.1. Aguas residuales urbanas

Se puede denominar aguas residuales urbanas a los líquidos procedentes de las actividades domésticas diarias que tienen en su composición gran parte de agua.

1.1.1.1.1. *Origen de las aguas residuales urbanas*

Las aguas residuales pueden ser originadas por las siguientes causas: excretas principalmente heces; residuos domésticos tales como detergentes, pesticidas, sales, grasas, aceites, etc. (4); arrastre de lluvias como el hollín, polvo, cemento, restos vegetales, etc. y por último infiltraciones (fuga de tuberías en mal estado o conexiones defectuosas).

1.1.1.1.2. *Composición de las aguas residuales urbanas*

a. Composición química:

Las aguas residuales domésticas contienen principalmente proteínas, luego hidratos de carbono, seguido por los lípidos (grasas y aceites), y por último compuestos que incluyen fenoles, insecticidas, metales, etc. (5). Los sólidos pueden ser orgánicos e inorgánicos. También contienen gases tales como, ácido sulfhídrico, anhídrido carbónico, y otros gases (ácidos grasos volátiles, derivados del nitrógeno), todos en diferentes concentraciones. Por último, las aguas residuales próximas a una industria pueden contener líquidos volátiles como gasolinas, alcoholes, etc.

b. Composición biológica:

Las aguas residuales urbanas contienen una gran cantidad de microorganismos vivos incluyendo patógenos (*E. coli*, *Salmonella*, *Giardia*, Enterovirus, etc.), que en éste último caso de no eliminarse en forma correcta puede contaminar el medio ambiente y ser un riesgo para la salud humana (4). La actividad biológica de algunos organismos presentes produce fermentaciones, descomposición y degradación de la materia orgánica e

inorgánica. Estos microorganismos pertenecen a diferentes grupos tales como hongos, algas, bacterias, protozoarios, entre otros.

1.1.1.2. Aguas residuales industriales:

Son las que provienen de cualquier tipo de actividad industrial ya sea de producción, transformación o manipulación de un producto determinado, en las que se utilice el agua. Por lo tanto, el vertido de estas aguas si un tratamiento previo, en la mayoría de las ocasiones puede generar un grave problema ambiental no solo debido a la carga de contaminantes que llevan, sino también por la gran cantidad de agua que deben liberar (6). Por ejemplo, en el caso de las industrias químicas, las metalúrgicas, las papeleras, etc., debido a que las sustancias tóxicas presentes en sus vertidos no son fácilmente biodegradables y requieren de un tratamiento previo intenso. Por este motivo, para poder realizar un tratamiento o una adecuada gestión de los distintos vertidos, es conveniente realizar una clasificación de éstos en función de sus características, tales como propiedades físicas y químicas, y en función de estas va a depender el tipo de sistema de tratamiento que se decida aplicar.

1.1.1.2.1. Clasificación según la naturaleza de sus constituyentes

a) Residuos industriales líquidos con constituyentes minerales, que son efluentes que contienen fundamentalmente metales (zinc, hierro, cobre, cadmio, etc), compuestos halogenados y otra serie de sustancias inorgánicas que presentan un elevado índice de toxicidad y peligrosidad. b) Residuos industriales líquidos con constituyentes orgánicos: como la celulosa, los taninos, los compuestos azufrados y clorados, etc., que resultan particularmente difíciles de biodegradar. c) Residuos industriales líquidos con constituyentes minerales y orgánicos, que consiste en una mezcla de los casos anteriores y por ende requieren tratamientos mixtos. d) Residuos líquidos industriales con carácter radiactivo, que incluyen a efluentes que presentan sustancias radiactivas que son el resultado de procesos en los que se utilizan materiales radiactivos tales como reactores nucleares, laboratorios de investigación, etc. e) Residuos líquidos industriales que producen contaminación térmica, comprenden a los efluentes que provocan cambios de

temperatura una vez que entran en contacto con el cuerpo de agua (lago, arroyo, ríos, etc.), afectando a la flora o fauna de la misma.

1.2. MICROORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL

Para la identificación y cuantificación de bacterias patógenas y quistes de protozoos parásitos requieren no solo de un buen entrenamiento del personal del laboratorio o responsable de una planta de tratamiento de aguas residuales, sino también implica tener un equipamiento y materiales básicos de alto costo. En 1914, el Servicio de Salud Público de Estados Unidos (U.S.P.H.S.) adoptó al grupo de los coliformes como indicadores de contaminación fecal en aguas de bebidas (5). Existen otros microorganismos como *Clostridium perfringens*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolítica*, etc. que han sido usados para indicar contaminaciones de origen fecal (7) en la eficiencia del tratamiento de agua potable, piscinas, jacuzzis, plantas de tratamientos de aguas residuales y en el deterioro y posterior contaminación del sistema de distribución de aguas, etc. (8).

1.2.1. Criterios que definen un organismo indicador ideal

Muchos microorganismos se han propuesto como buenos indicadores de calidad de aguas y se siguen buscando indicadores ideales, pero en cualquier caso deben reunir los siguientes requisitos (5, 8):

- Debe ser un miembro de la microbiota intestinal de animales de sangre caliente (heces).
- Debe estar presente cuando los patógenos lo están (aguas residuales, aguas de desecho, etc.) y ausente en muestras no contaminadas.
- Debe estar presente en gran cantidad que los patógenos.
- La capacidad de supervivencia debe ser al menos igual a los patógenos (estrés ambiental, desinfecciones en agua potable y plantas de tratamientos de aguas residuales).
- Tienen que tener la capacidad de crecer y multiplicarse en el agua.
- Debe ser detectable por métodos fáciles, rápidos, de poco costo y tener un programa de monitorización.
- El microorganismo indicador no debe ser un patógeno.

1.2.2. Indicadores microbianos usados comúnmente

1.2.2.1. Coliformes totales:

Los coliformes totales son las Enterobacteriaceae lactosa-positivas y constituyen un grupo de bacterias que se definen más por las reacciones bioquímicas o forma de sus colonias características en medios selectivos y diferenciales para su aislamiento que por criterios taxonómicos (8). Este grupo incluye las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, gran-negativas, no formadoras de esporas, de morfología bacilar y que fermentan la lactosa con producción de gas cuando son incubadas durante 48 h a 30-37°C. A éste grupo pertenecen *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* (5).

Estos coliformes son eliminados a través de las heces humanas en números altos, pero no todos ellos son de origen fecal. Estos indicadores son muy útiles para determinar la calidad del agua potable, aguas de recolección de mariscos (shellfish-harvesting waters) y aguas de recreación. Ellos son menos sensibles que los virus y quistes de protozoos a factores de estrés ambientales y tratamientos de desinfección. En las plantas de tratamientos de aguas residuales los coliformes totales son considerados uno de los mejores indicadores de la eficiencia de la planta de tratamiento (5).

1.2.2.2. Coliformes fecales:

Los coliformes fecales o coliformes termotolerantes incluyen todos los coliformes que pueden fermentar la lactosa a 43,5-45,5°C y con capacidad de crecer en presencia de sales biliares (9). El grupo de los coliformes fecales comprende las bacterias como *E. coli* o *Klebsiella pneumoniae*. La presencia de coliformes fecales indica la presencia de materia fecal procedente de animales de sangre caliente. Sin embargo los humanos y animales como fuente de contaminación no se pueden diferenciar. Algunos investigadores han sugerido el uso exclusivo de *E. coli* como un indicador de contaminación fecal, ya que puede ser fácilmente distinguido de otros miembros del grupo de coliformes fecales por indicadores enzimáticos como la ausencia de ureasa o la presencia de β -glucuronidasa (10, 11). Los coliformes fecales muestran un patrón de supervivencia similar al de las bacterias patógenas, pero su utilidad

como indicadores de contaminación por protozoos o virus son muy limitados ya que son mucho menos resistentes que los quistes de protozoos y virus en los procesos de desinfección. Por tanto la utilización de los coliformes como estándares de calidad de agua es poco fiable en ambientes acuáticos contaminados con virus y quistes de protozoos, que luego podrían volver a crecer en agua potable y aguas residuales bajo condiciones apropiadas. Varias modificaciones metodológicas han sido propuestas para mejorar la recuperación de los indicadores, especialmente los coliformes fecales que hayan sufrido daños (5).

1.2.3. *Escherichia coli*

Para la reutilización de las aguas residuales tratadas existen unos parámetros que deben ser tenidos en cuenta en el momento de hacer uso de éstas. Dentro de estos parámetros está la contaminación fecal y para medirla la legislación ha seleccionado la especie indicadora *E. coli*. La concentración en el agua tratada de esta especie determina el uso a que puede ser destinada, incluyendo usos urbanos, agrícolas, industriales, recreativos o ambientales. Los valores límite están fijados en España por una normativa con rango de Real Decreto (12). En el apartado 1.4 se explican algunos valores que, según normativa oficial, se deben cumplir para la reutilización de las aguas residuales.

1.2.3.1. Características generales:

A pesar de que *E. coli* ha sido muy estudiada a nivel fisiológico, genético y bioquímico, aún se desconoce bastante de su comportamiento en los diferentes hábitats donde puede encontrarse. van Elsas, *et. al.* (13) divide los hábitats de *E. coli* en primarios, que serían el hombre y los animales de sangre caliente, encontrándose, por lo tanto, en sus heces; y secundarios, que incluye todos los demás. Como ya hemos avanzado anteriormente, por su especificidad, esta bacteria está considerada como el mejor índice de contaminación fecal (14-16). Estos microorganismos se encuentran en todo el mundo, y se han aislado cepas patógenas de *E. coli* no solo de enfermos, sino también de agua corriente, fuentes de agua potable y corrientes de montaña. Los actuales tratamientos hacen poco probable que *E. coli* pueda provocar una enfermedad a través de su transmisión por agua potable adecuadamente tratada.

E. coli, pertenece a la familia Enterobacteriaceae y forma parte del grupo denominado coliformes totales. Desde el punto de vista metodológico *E. coli* es considerado tradicionalmente como un coliforme fecal que además da positivo a la prueba del Indol. Aproximadamente el 0,1% de las bacterias intestinales del ser humano está representada por esta especie. Su nombre proviene de su descubridor “Theodore von Escherich”, quién lo aisló por primera vez en 1885 y lo describió como *Bacterium coli* (15).

1.2.3.2. Supervivencia de *E. coli* en aguas

Las bacterias se encuentran en diferentes tipos de ambientes y cada especie se desarrolla de forma óptima en condiciones abióticas y bióticas determinadas. Sin embargo, las condiciones ambientales en las que viven las bacterias sufren, en general, grandes cambios tanto estacionales como circadianos. Algunos de estos cambios que ocurren como en la temperatura, la irradiación solar, la disponibilidad de nutrientes hacen que se alternen situaciones de abundancia y hambruna (feast and famine); por lo general las variaciones de estos parámetros se producen con mayor frecuencia en los medios acuáticos. Otro motivo por el cual una bacteria debe enfrentarse a cambios de su entorno es cuando, es transportada desde su hábitat natural, es decir de su estatus de bacteria autóctona, a uno diferente donde pasa a un estatus de bacteria alóctona. Un ejemplo, es el caso de *E. coli* que se encuentra en forma natural en el intestino grueso del ser humano (15, 17) y luego de su eliminación termina en las aguas residuales.

Por lo tanto, la perdurabilidad de las bacterias depende, en gran medida, de su capacidad supervivencia en condiciones adversas. En el caso de las bacterias su ciclo de vida está constituido por dos estados morfogenéticos; un estado “activo” o fase de crecimiento y un estado “de latencia” (stand-by) o fase de supervivencia. La alternancia entre estos dos estados les permite crecer cuando las condiciones son óptimas y permanecer “dormidas” a la espera de nuevas condiciones favorables (18). Por lo tanto, es muy importante conocer cuáles son los factores que afectan la fase de supervivencia en éste caso de *E. coli* en las aguas sobre todo residuales.

Las aguas dulces muestran una marcada actividad bactericida hacia las bacterias entéricas. Así también se han realizado una gran cantidad de estudios de factores fisicoquímicos tales como la luz, la temperatura, el pH y la toxicidad por metales pesados, que se cree tienen un alto impacto en la mortalidad bacteriana (19-21). Además de éstos factores, recientemente se han centrado en los mecanismos biocénóticos tales como la competencia, alelopatía, infección por fagos y predación, que están involucrados en los fenómenos bactericidas en las aguas naturales (2, 22, 23).

Muchos autores han deducido que la luz visible tiene un efecto negativo en las células de *E. coli* en aguas dulces (19, 24, 25). Esto fue demostrado por la disminución en el número de células de *E. coli* activos metabólicamente. Algunos estudios sugieren que la luz visible provoca una disminución en el transporte activo de aminoácidos marcados en bacterias entéricas. Otra explicación, del daño subletal inducido por la luz solar es la acumulación de peróxidos y otros tóxicos debido a foto-oxidación UV-B de la materia orgánica. También la temperatura tiene un efecto sobre la supervivencia de *E. coli* en agua de río, que fue inversamente proporcional para temperaturas de 5°C a 15°C (22).

En relación a las interacciones entre las bacterias alóctonas y la microbiota natural son complejas y poco comprendidas. Aunque la competencia con las bacterias autóctonas por sustratos y antibiosis presentes en el medio podrían afectar la reducción de la población de coliformes, hay casos en que se ha observado estimulación.

Tampoco en el caso de los bacteriófagos es muy claro el efecto de los mismos sobre las poblaciones bacterianas. Varios trabajos han descrito la fuerte correlación entre *E. coli* y el número de colifagos (26, 27), sin embargo también hay investigaciones que indican lo contrario (22, 28).

Varios estudios contemporáneos hacen hincapié en la importancia del rol de los protozoos en el control de la población bacteriana. Se ha demostrado usando marcadores fluorescentes para bacterias, que los protistas flagelados y ciliados

ingieren y digieren las bacterias entéricas tanto en muestras de agua dulce como marina (28).

Daños	Descripción
Estructura	Daños en la estructura enzimática
	Daños en el material genético
	Daños en los componentes estructurales de la membrana
	Daños en los componentes estructurales de la pared celular
	Daño estructural de fibrilas celulares
Actividad	Inhibición de la actividad enzimática
	Interferencia en la síntesis de carbohidratos
	Interferencia en la síntesis de lípidos
	Interferencia en la síntesis de proteínas

Tabla 1.1- Daños de los compuestos tóxicos sobre las estructuras y actividades esenciales de una bacteria. Fuente: Gerardi (16).

En relación de los compuestos solubles tóxicos Gerardi (16), en el 2006 hizo un esquema de los posibles daños que podrían causar a las estructuras bacterianas y actividades esenciales de una bacteria (ver **Tabla 1.1**).

1.3. DEPURACIÓN DE LAS AGUAS RESIDUALES

Entre los años 1866 y 1872 en Inglaterra las enfermedades transmitidas por el agua como el cólera produjeron miles de víctimas, especialmente en Londres (29). A medida que se tuvo más conocimiento y conciencia de la importancia del papel de los microorganismos relacionados con estas enfermedades, llevó a un aumento de la demanda por el tratamiento de las aguas residuales. Después de que 1849 Snow (30) demostró la transmisión del cólera a través de aguas contaminadas por aguas residuales, se tomó conciencia de que las aguas residuales eran transmisoras de enfermedades y por lo tanto un problema que resolver. Luego, la aprobación de proyectos de ley tendientes a paliar esta situación alentó la construcción de plantas de tratamientos de aguas residuales. Para finales del siglo XIX la Comisión Real Británica sobre la eliminación de aguas residuales (British Royal Commission on Sewage Disposal) propuso fijar unos parámetros y límites que las aguas residuales tratadas debían tener tales como, menos de 30 mg/L de sólidos suspendidos y

20 mg/L para la demanda bioquímica de oxígeno (DBO). La utilización de las plantas de tratamiento de aguas residuales empezó a comienzos del siglo XX (5, 29).

En la actualidad es conocido que los principales contaminantes de las aguas residuales son los compuestos orgánicos biodegradables y volátiles, xenobióticos recalcitrantes, metales tóxicos, sólidos suspendidos, nutrientes (nitrógenos y fósforos), microorganismos patógenos y quistes de parásitos (5, 16).

1.3.1. Procesos del tratamiento de las aguas residuales

En muchos países desarrollados, casi todos los desechos que se propagan en las aguas provenientes de los hogares, empresas, fábricas y la afluencia de las tormentas, fluyen por una red de conductos de alcantarillado hacia las plantas de tratamiento de aguas negras o aguas residuales. Las aguas negras básicas que llegan a una planta de tratamiento suelen ser sometidas a diferentes niveles de tratamientos (31). Con el tratamiento de las aguas residuales se busca la eliminación, degradación o modificación de los contaminantes que presentan para su posterior retorno al ciclo hídrico (32).

El tratamiento físico incluye cribado (screening), sedimentación, filtración o flotación; mientras que los métodos químicos incluyen desinfección, adsorción o precipitación. El tratamiento biológico incluye la actividad microbiana, la cual es responsable de la degradación de la materia orgánica, reducción de la DBO y eliminación de nutrientes (1, 33).

El caso de los vertidos industriales es diferente a la línea convencional de tratamientos de aguas residuales urbanas porque, con mucha frecuencia, la materia orgánica no es el contaminante clave ni está muy presente en los vertidos. Sin embargo, el paralelismo entre ellas se mantiene en los tratamientos más completos.

Algunos de los vertidos industriales sólo requieren una neutralización. En el caso de la salinidad remanente no constituye en la mayoría de las situaciones un problema fundamental para los cauces receptores del efluente. Para la mayoría de aguas diluidas y no tóxicas, es suficiente un proceso que incluya

tratamiento primario y secundario. En otros casos es preciso añadir un tratamiento terciario que lleve la calidad del agua a una mayor calidad genérica o bien que elimine algún contaminante remanente. En el caso de aguas residuales conteniendo compuestos tóxicos es preciso un pretratamiento específico antes de pasar el agua al proceso convencional. Esto es especialmente así cuando las aguas industriales pueden ser aceptadas para su tratamiento en una planta colectiva o municipal, no preparada para recibir estos compuestos.

Los tratamientos específicos son necesarios para efluentes ricos en metales pesados, pesticidas y otras sustancias que atravesarían fácilmente el tratamiento primario e inhibirían el tratamiento biológico. También es razonable su aplicación para efluentes de poco volumen, ricos en materias no degradables, ya que es mucho más económico eliminar un contaminante específico de un efluente de poco volumen y concentrado que de uno voluminoso y diluido. Los procesos específicos incluyen precipitaciones, absorciones en carbón activo, oxidaciones, "stripping" con aire o vapor, intercambio iónico, ósmosis inversa y electrodiálisis (34).

1.3.2. Las etapas del tratamiento de las aguas residuales

1.3.2.1. Tratamiento preliminar:

El objetivo de esta parte inicial del procesamiento de un efluente es la eliminación de los residuos y materiales gruesos que pueden obstruir los equipos utilizados en una planta de tratamiento (**ver Fig. 1.3**).

Los procesos específicos en el pretratamiento incluyen la utilización de distintos tipos de equipos: rejas, tamicas autolimpiantes, microfiltros, que retienen los sólidos de mayor tamaño (34).

1.3.2.2. Tratamiento primario:

Este tratamiento es realizado mediante procesos físicos tales como el cribado y la sedimentación. Durante el tratamiento primario de las aguas residuales se emplean filtros y un tanque de piedra que tiene por objetivo la eliminación de los objetos flotantes de gran tamaño y permitir la decantación de sólidos como

la arena y la roca (ver **Fig. 1.3**). A continuación fluye la corriente de desechos a un tanque de asentamiento primario, en donde los sólidos orgánicos suspendidos sedimentan como lodo (31, 33).

1.3.2.3. Tratamiento secundario:

Incluyen procesos biológicos tales como, el lodo activado, filtro percolador y lagunas de oxidación; y químicos como la desinfección (ver **Fig. 1.3**). La eliminación de los nutrientes se realiza durante este tratamiento de las aguas residuales.

Consiste en un proceso biológico en el cual las bacterias eliminan el 90% de los desechos orgánicos disueltos y biodegradables con consumo de oxígeno. El objetivo principal en el caso del agua residual doméstica o urbana es la reducción fundamentalmente de la materia orgánica y DBO (32), así como la eliminación de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo (33). La eliminación de compuestos a nivel de traza que puedan resultar tóxicos también puede constituir un objetivo de tratamiento (5, 16).

1.3.2.3.1. Biodegradabilidad

Se sabe que gran parte de las sustancias que transporta el agua residual, ya sea disuelta, suspendida o coloidal, es materia orgánica (como carbohidratos, lípidos y proteínas), la cual en una parte importante es biodegradable (5, 30). La biodegradabilidad de estas sustancias es la propiedad que permite que las aguas residuales puedan ser depuradas por medio de microorganismos, que utilizan estas sustancias como alimento y fuente de energía para su metabolismo y reproducción.

Dependiendo de las características de los compuestos orgánicos y de la capacidad de que éstos puedan ser degradados por los microorganismos, determinan o condicionan en gran medida la viabilidad de un tratamiento biológico de un efluente determinado (ver **Fig. 1.1**). La materia orgánica biodegradable puede dividirse en dos grupos: rápidamente biodegradable y

lentamente biodegradable, tanto la primera como la segunda pueden presentarse en estado soluble o partículas (30). Aunque un agua residual presente materia orgánica natural no significa que la biodegradación será fácil, porque hay elementos como las grasas y aceites que en ocasiones son difíciles de degradar.

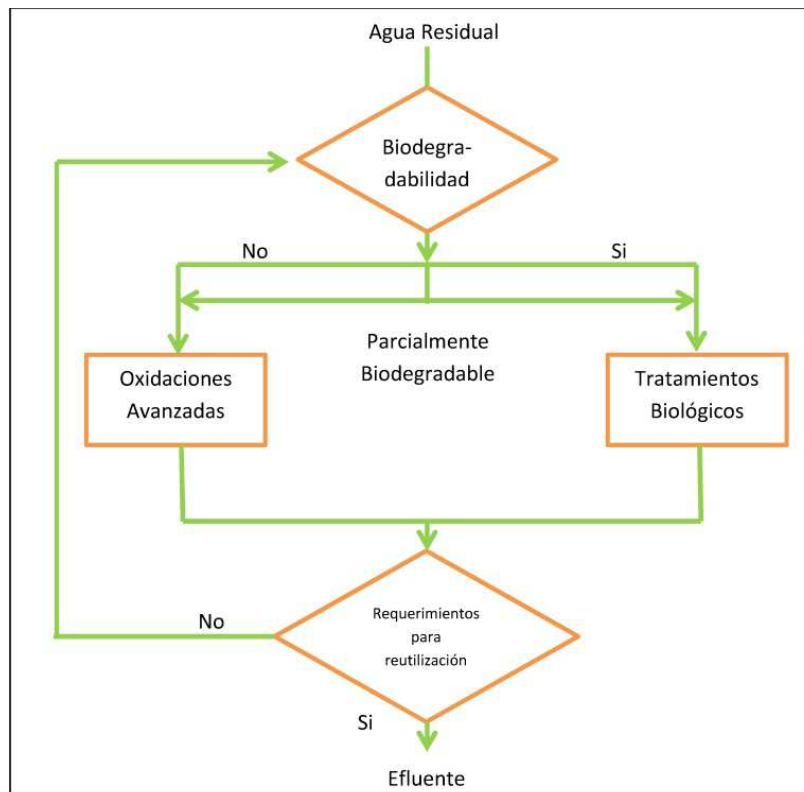


Fig. 1.1- Posible estrategia para seleccionar el método adecuado para obtener un agua con características de reutilización. Fuente: Osorio (30).

Mediante el proceso biológico que ocurre en una planta de tratamiento en función de que la materia sea fácil o lentamente biodegradable da como resultado final la materia inerte (ver **Fig. 1.2**).

La materia fácilmente biodegradable estaría formada por las moléculas de pequeño tamaño (ácido acético, glucosa, etanol, etc.) que a medida que son degradadas por los microorganismos, da como resultado final el aumento de la población al ser utilizadas como fuente de alimentación. La materia lentamente biodegradable está formada por moléculas de gran tamaño en cuyo proceso de degradación están involucradas las enzimas extracelulares liberadas por los

microorganismos que las hidrolizan convirtiéndolas en materia de fácil degradación.

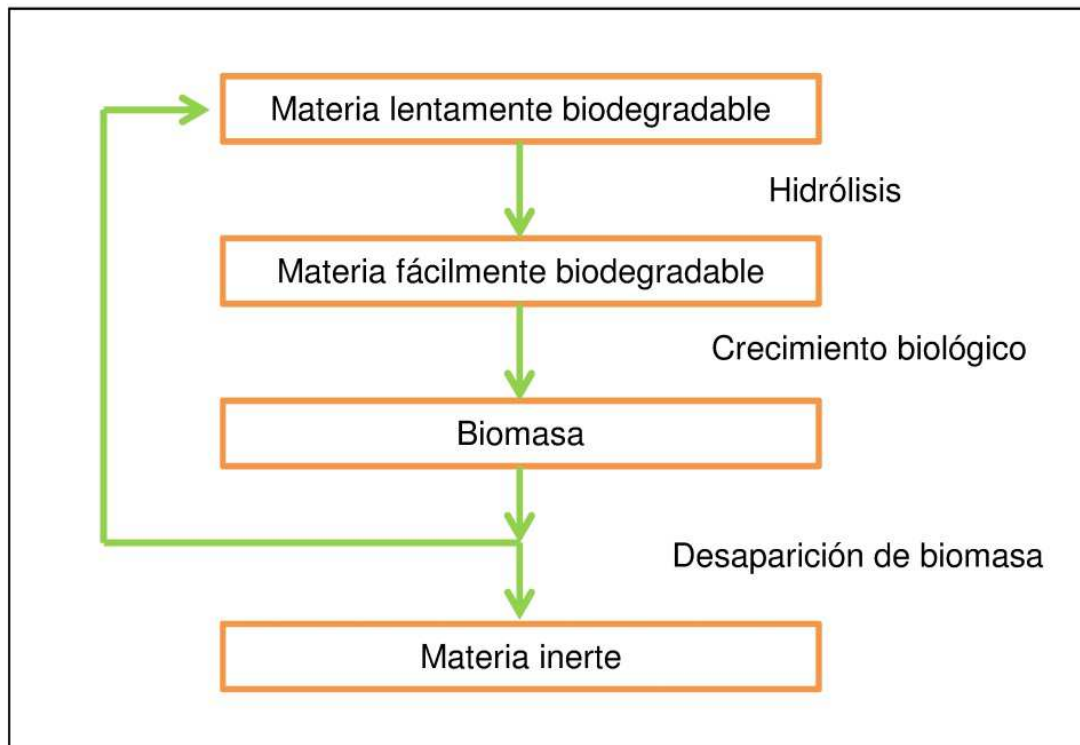


Fig. 1.2- Proceso biológico en una planta de tratamiento de aguas residuales. Fuente: Osorio (30).

1.3.2.4. Tratamiento avanzado o terciario:

Durante este proceso se usan procesos físicos y químicos para disminuir la DBO, eliminar patógenos, parásitos y a veces sustancias tóxicas (ver **Fig. 1.3**). Con este tratamiento se busca la reducción de un 85% de la concentración del agente contaminador (32).

Antes de realizar la descarga de un efluente tratado (primario, secundario o más avanzado) se suele someter a un blanqueo por cloración por dos motivos: uno para aclarar el agua y el otro para realizar una desinfección que tiene por objetivo la eliminación de las bacterias y algunos virus. Sin embargo, en la actualidad ya se usan otros desinfectantes, como el ozono, la luz ultravioleta, ósmosis inversa y otros (5, 30, 35). Son más costosos y sus efectos no duran tanto como el clorado.

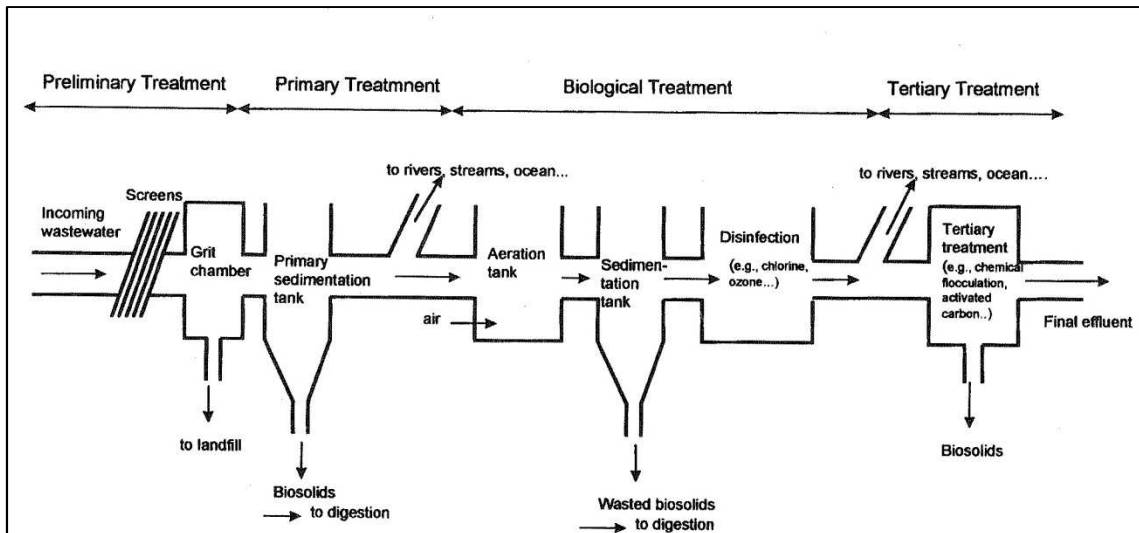


Fig.1.3- Esquema de tratamientos de aguas residuales. Fuente: Bitton (5).

1.3.2.4.1. Microfiltración:

La microfiltración, la ultrafiltración y la ósmosis inversa (que se desarrollará más adelante) son métodos parecidos que difieren sólo en el tamaño de las partículas a separar y en el tipo de membrana usada (ver **Fig. 1.4**). La membrana consiste en una película delgada que separa 2 fases y actúa como barrera selectiva al transporte de la materia (30). Los compuestos líquidos son conducidos sobre la superficie de la membrana y bajo la acción del gradiente de presión algunas partículas o especies permean la membrana, mientras otras son más o menos retenidas (36).

El término microfiltración se usa cuando partículas de diámetros 0,1 a 10 μm se separan de un disolvente, otros componentes de bajo peso molecular y patógenos de gran tamaño (32). Por lo tanto el tamaño de los poros de las membranas microporosas simétricas son de 0,1 a 10 μm y se usan diferencias de presión de 0,1 a 2 bars (36).

El mecanismo de selectividad es análogo a un efecto tamiz; es decir, existe un tamaño aproximado de moléculas o partículas a partir del cual las moléculas mayores son retenidas por la membrana (rechazo), mientras aquellas de tamaño inferior la atraviesan acompañadas por el disolvente (filtrado o permeado). Es preciso destacar que la selectividad cambia cuando una capa dinámica se deposita sobre la membrana. Esta capa puede ser mucho más

selectiva que la propia capa activa, por lo que es común operar con una membrana de microfiltración con una selectividad de ultrafiltración.

El desarrollo industrial de la microfiltración en el tratamiento de aguas está íntimamente ligado al valor del flujo específico de permeado y al grado de dificultad que presente la regeneración de la membrana. La principal limitación reside en los problemas de colmatación difícilmente reversibles que dependen a la vez del tipo de membrana utilizada y de la naturaleza de las aguas a tratar (27).

La filtración a través de membranas es empleada en la actualidad a gran escala, para clarificar efluentes fisiológicos (eliminación de precipitados en suspensión o retención de microorganismos), fraccionar, concentrar o purificar las soluciones macromoleculares en las industrias alimenticia y farmacéutica, y tratar efluentes industriales (producción de agua potable, separación de aceite-agua, recuperación de pinturas).

1.3.2.4.2. *Osmosis inversa*

Cuando el disolvente de una solución pasa a través de una membrana semipermeable, mientras que los demás componentes o solutos quedan retenidos (ver **Fig. 1.4**) se denomina a éste fenómeno ósmosis inversa (37).

Por lo tanto, para que exista flujo a través de una membrana deber haber una diferencia del potencial químico a ambos lados. Por ejemplo, si se tuviera agua a ambos lados de una membrana, para que exista un flujo a uno de los lados se debería añadir sales para formar una solución, de esta manera el agua circulará del lado del agua pura hacia el de mayor concentración, intentando igualar los potenciales químicos por el efecto de la diferencia de presiones. Éste flujo terminará una vez que llegue al equilibrio entre ambos lados. En este momento, la diferencia de altura entre las dos columnas líquidas correspondería a la presión osmótica de la solución.

Posteriormente si uno ejerce una presión sobre la columna más elevada, el agua circulará en sentido inverso al anterior. El flujo inverso creado a través de la membrana mediante la sobrepresión, hará aumentar el volumen de agua

pura a expensas de la solución. Es por este motivo que a este último fenómeno se le llama ósmosis inversa.

Por lo tanto, el poro debe tener unas características fisicoquímicas determinadas para que permita el paso selectivo del agua y el rechazo de las sales disueltas. El flujo de agua se puede aumentar incrementando la presión exterior aplicada, sin que esto represente mayor paso de sales. Por consiguiente, con mayor presión se obtiene una mayor calidad del agua producida. Sin embargo, la mayor presión significa un mayor coste de energía y de diseño de la instalación para conseguir y resistir esta mayor presión (34). Con la ósmosis inversa se logra una eliminación completa de sales (30), iones tales como nitratos, sulfatos, fosfatos, etc., así como también la presencia de microorganismos presentes en un agua (37).

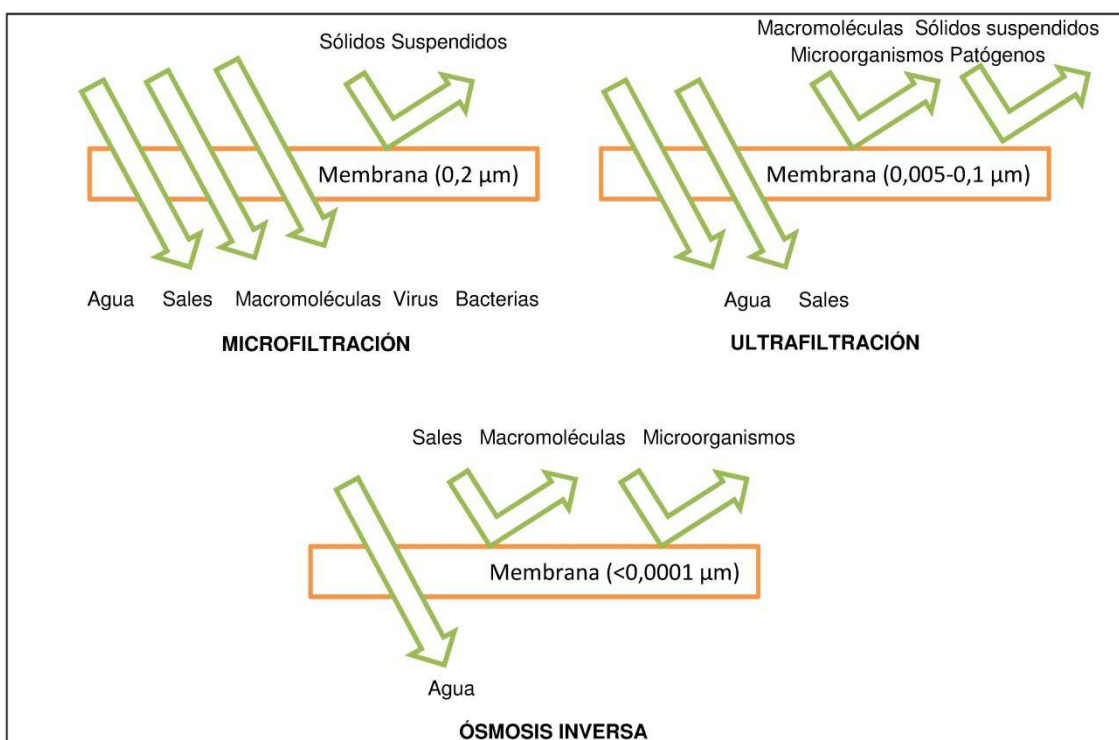


Fig.1.4- Comparación de diferentes tipos de filtraciones a través de membranas. Fuente: Murillo, et. al. (32).

1.3.3. Autodepuración

La autodepuración es un fenómeno biológico conocido desde los albores de la microbiología (38) y su utilización para regenerar aguas tiene una serie de

ventajas pero también inconvenientes. Entre las primeras se encuentra la eliminación o supresión de los contaminantes, gracias a la interacción de compuestos orgánicos e inorgánicos y los seres vivos que se encuentran en el agua residual, siendo un proceso en el cual se requiere escaso control operacional (sencillez tecnológica), con bajo coste económico y reducido impacto ambiental. Entre los segundos pesa mucho su escasa fiabilidad, debida a la complejidad biológica de los procesos subyacentes que tornan muy imprecisas las predicciones sobre sus resultados.

Por todo ello, la utilización de la autodepuración como proceso único a emplear en la regeneración de aguas desde el punto de vista microbiano está descartada en la mayoría de los casos y únicamente se suele considerar su aplicación como proceso complementario que puede mejorar los resultados de los tratamientos terciarios de forma barata y sencilla. En cualquier caso, una utilización racional de la autodepuración dentro de un proceso industrial de regeneración de aguas residuales requiere la elaboración de un modelo matemático predictivo que permita integrarlo dentro del proceso de tratamiento terciario integral, de forma que aprovechemos sus ventajas superando sus limitaciones. Para ello es necesario obtener un conocimiento de cuáles son los mecanismos biológicos subyacentes al fenómeno, evaluar cuantitativamente cual es la aportación de cada uno de ellos al proceso global y cuantificar también el efecto de las condiciones ambientales más relevantes sobre su actividad depuradora.

A pesar que la descontaminación a lo largo de una retención en un tiempo-espacio posibilita que un agua con condiciones de contaminación recupere sus características originales, aunque no en su totalidad, el proceso de la depuración es complejo y en él participan mecanismos biológicos y fisicoquímicos muy diversos. Los mecanismos que se consideran más relevantes son la predación, competición por nutrientes, toxinas bacterianas y el envejecimiento y eventual lisis celular. Los microorganismos responsables son los protozoos bacterívoros, las bacterias heterótrofas, bacteriófagos, otras

bacterias competidoras, hongos y factores fisicoquímicos como el pH, temperatura, la luz, los metales pesados, entre otros (3, 22, 39).

Un método para observar y medir la capacidad de autodepuración y supervivencia de *E. coli* de un agua con tratamiento secundario, consiste en inocularla con una población de *E. coli* o cualquier otra especie que queramos ensayar, hasta alcanzar una población inicial cercana a las 10^7 UFC/mL. La inoculación se realiza para elevar la población inicial de los efluentes secundarios, que no suele superar las 10^3 UFC/mL (40), y poder estudiar la cinética de desaparición con mayor precisión, ya que el análisis microbiológico de poblaciones pequeñas, cercanas al límite de detección de los métodos empleados, implica una mayor incertidumbre de los datos.

A pesar de ser la clave para la optimización del rendimiento, hasta la fecha, la comunidad biológica –motor de la autodepuración de las aguas residuales- ha sido objeto de poca investigación. Algunos autores han desarrollado estudios sobre la autodepuración de aguas residuales, utilizando microorganismos encontrados en las mismas aguas como indicadores de la calidad (41-44).

1.4. LEGISLACIÓN ESPAÑOLA PARA USOS DE AGUAS REGENERADAS

Desde hace 6 años ha entrado en vigencia el RD 1620/2007, que establece el régimen jurídico aplicable a estos procesos. En él se incluyen con detalle los criterios de calidad, químicos y microbiológicos (*E. coli*) que debe cumplir el agua regenerada para ser reutilizada en los diferentes ámbitos, urbanos (0-200 UFC/100mL), agrícolas (100-10.000 UFC/100mL), industriales (0-10.000 UFC/100mL), recreativos (200-10.000 UFC/100mL), ambientales (0-100 UFC/100mL) y la metodología de análisis que debe ser seguida para asegurar el cumplimiento de dichos criterios (12). El Real Decreto con los valores detallados para el caso *E. coli* se puede leer en el **anexo 1**.

Desde luego, la regeneración no es el único proceso que se puede utilizar para disminuir el déficit hídrico. Otras alternativas, como la desalación o los trasvases, ya están siendo utilizadas con ese fin. No obstante, son procesos que aunque económicamente puedan resultar competitivos, presentan otros

problemas medioambientales, energéticos y estructurales, que pueden ser bastante significativos, y que hay que tener en cuenta. Todas estas consideraciones han debido pesar en la fijación de objetivos en política hídrica por el Gobierno español, que ha decidido promover la regeneración y reutilización de aguas residuales. Así queda explícitamente afirmado en el texto refundido de la Ley de Aguas (12).

1.5. MODELOS MATEMÁTICOS

La aplicación de modelos matemáticos no solo ayuda en la organización de grandes cantidades de datos obtenidos de los experimentos, sino además permite interpretar y comprender mejor el comportamiento en forma general o individual de las poblaciones bacterias. Si los modelos pueden ser desarrollados para predecir adecuadamente la inactivación bacteriana, también podría predecir que carga bacteriana puede eliminarse en un determinado tiempo de un sistema.

En el caso de la microbiología predictiva, ésta permite anticipar el efecto del cambio de determinados factores medioambientales sobre el crecimiento o inactivación de los microorganismos, y se sustenta en el desarrollo de modelos matemáticos o probabilísticos de segunda generación.

En ésta disciplina se combinan elementos de microbiología, matemáticas y estadística para desarrollar modelos que describan y predigan matemáticamente el crecimiento o muerte de los microorganismos, cuando se les somete a condiciones medioambientales específicas (45). Se basa en la premisa de que las respuestas de poblaciones de microorganismos a factores medioambientales son reproducibles y que por lo tanto es posible, interpolando entre puntos, predecir el comportamiento de esos microorganismos para condiciones que no han sido ensayadas (46).

1.5.1. Clasificación de los modelos microbiológicos

Para la microbiología predictiva el concepto de modelo primario es fundamental. El modelo primario tiene por objetivo definir y describir con

precisión las distintas etapas de crecimiento microbiano teniendo en cuenta los factores posibles, es decir la respuesta de los microorganismos a un único conjunto de condiciones particulares de entorno y cultivo en el tiempo. En general los modelos primarios permiten diferenciar las tres fases de una curva típica de crecimiento bacteriano (**Fig. 1.5**) que se denominan, fase de latencia, fase exponencial, y fase estacionaria que eventualmente puede acabar en una fase de muerte (47). Durante la última década se ha desarrollado una nueva generación de modelos para describir curva de crecimiento de bacterias, tales como el modelo de Baranyi, el modelo de Buchanan (Trifásico), y el modelo de inóculo heterogéneo (48), entre otros.

A diferencia del modelo primario, el secundario describe los efectos de las condiciones ambientales (físicos, químicos, bióticos), en los valores de los factores de un modelo primario.

Por último se encuentran los modelos terciarios. Históricamente comenzaron a llamarse terciarios a los modelos secundarios que incluían más de una condición ambiental, por ejemplo, a los modelos polinomiales que permitían predecir el valor de μ a unos determinados valores de pH, T y actividad de agua. Hoy en día se suele considerar terciarios a los programas de ordenador que tienen por objetivo la transformación de los modelos de nivel primario y secundario en programas de fácil manejo para los usuarios finales del modelo. Estos programas facilitan notablemente el cálculo las respuestas de los microorganismos a condiciones cambiantes, comparar los efectos de las diferentes condiciones o contrastar el comportamiento de varios microorganismos (48). En este sentido a base de datos Combase es un excelente ejemplo de modelo terciario en ambos sentidos ya que es una herramienta informática basada en modelos matemáticos terciarios (en sentido histórico). Por contraste "Dmfit web edition" es otra útil herramienta informática disponible en la red, y en ese sentido podría considerarse un modelo terciario, pero utiliza solamente los modelos primarios de Baranyi y el de Buchanan.

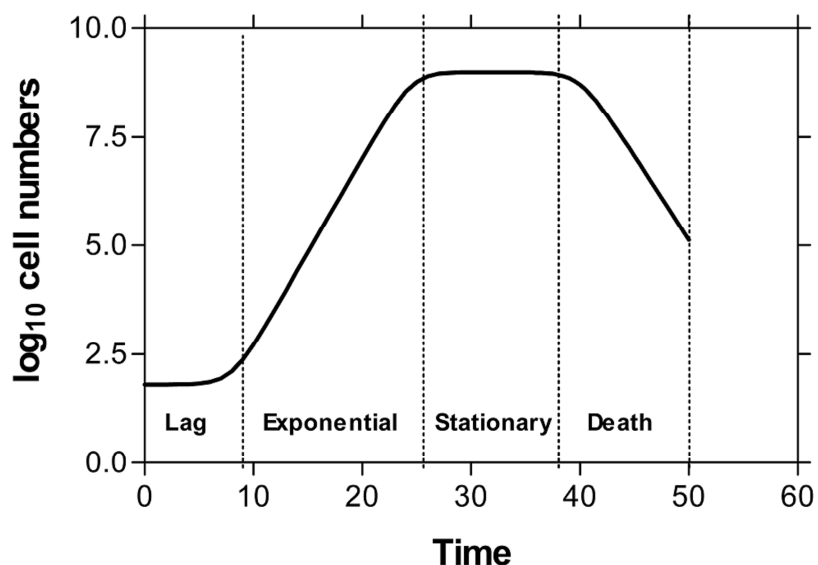


Fig.1.5- Fases de una curva típica de crecimiento bacteriano. Fuente: Mckellar y Lu (48).

1.5.2. Modelos de supervivencia

En la actualidad existen varios modelos matemáticos que pueden usarse para modelar y comprender la capacidad de supervivencia de los microorganismos, sobre todo aplicados en alimentos donde es fundamental conocer la seguridad del suministro y consumo de los mismos. Así también, estos modelos pueden aplicarse para describir la capacidad de supervivencia de otros microorganismos no patógenos como *E. coli* en otros tipos de medios como en nuestro caso en muestras de diferentes tipos de aguas.

A continuación se detallaran brevemente los diferentes modelos de supervivencia desde el enfoque lineal hasta los más complejos para describir las curvas de inactivación que se desvían de la linealidad.

1.5.2.1. Modelo Clásico Lineal

Para la descripción de los modelos seguimos el formato desarrollado por McKellar (48).

Este modelo se basa en que tras la exposición de una población bacteriana a un factor inactivante uniforme como la temperatura, el número de células bacterianas afectadas disminuye exponencialmente con el tiempo. Es decir, la velocidad de inactivación es proporcional al número de células que todavía están vivas.

La cinética de inactivación de primer orden viene dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{dS_t}{dt} = -k'S_t \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde S_t es la relación de supervivencia (N_t/N_0) y k' es la tasa específica de inactivación.

Integrando esta ecuación diferencial se obtiene la ecuación general que representa este modelo:

$$N = N_0 e^{-kt} \quad \text{Ecuación 2}$$

Aplicando logaritmos se lineariza la ecuación:

$$\text{Log } N = \text{Log } N_0 - (k \text{ Ln})t \quad \text{Ecuación 3}$$

Obteniéndose la ecuación:

$$\text{Log } N = \text{Log } N_0 - k't \quad \text{Ecuación 4}$$

Dónde:

N_0 : Población de bacterias en el tiempo 0.

N : Población de bacterias en el tiempo t.

k' : Tasa específica de muerte (para logaritmos decimales).

t: Tiempo

Cuando se expresa en \log_{10} y $k = k'/\text{Ln}10$, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{dS_t}{dt} = -kt \quad \text{Ecuación 5}$$

Una ventaja de este modelo tan simple es que permite calcular el valor D, que es el tiempo que hace falta mantener una población a una temperatura letal para que la población disminuya una unidad logarítmica (**Fig. 1.6**).

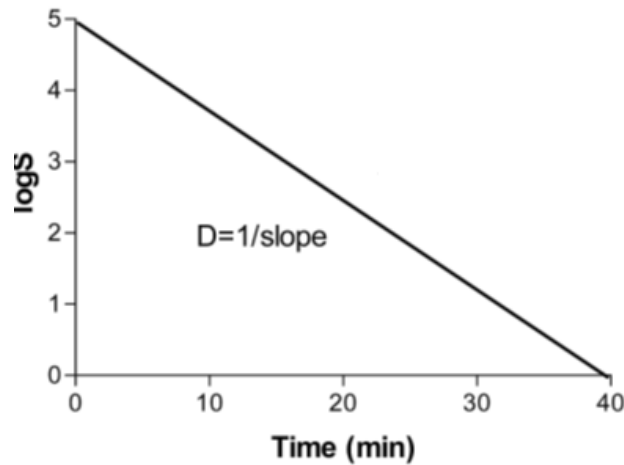


Fig. 1.6- Descripción geométrica del valor de D. Fuente: McKellar y Lu (48).

D es un parámetro ampliamente utilizado en la industria ya que permite calcular muy fácilmente el tiempo que hay que mantener la temperatura letal constante para alcanzar uno objetivo de esterilización N_t a partir de una carga microbiana inicial N_0 :

$$t = D (\text{Log } N_t - \text{Log } N_0) \quad \text{Ecuación 6}$$

La base teórica para asumir el comportamiento logarítmico en la inactivación de las bacterias asume dos premisas (Ec. 1): 1) La muerte celular se debe a la inactivación de un solo sitio crítico de la célula y 2) La población bacteriana se considera homogénea, es decir todas las células de la población están sujetas al proceso inactivador con la misma probabilidad.

1.5.2.2. Modelos no lineales

1.5.2.2.1. Cinéticas de inactivación no lineales

Los reportes de las curvas no lineales de supervivencia no son nuevos, ya que se han descrito de algunas bacterias hace casi 100 años. Por lo general, existen dos clases de curvas no lineales, unas que tienen un hombro, es decir una fase de aparente latencia antes de su inactivación y la otra que presenta una cola.

Estos dos casos pueden presentarse juntos o con otras cinéticas tales como la inactivación bifásica.

1.5.2.2.2. Modelos con hombros y colas.

a. Enfoque lineal

Muchos investigadores han reportado curvas de inactivación que presentan una fase de adaptación o región hombro (shoulder) antes de entrar a una fase de inactivación exponencial. Para estos tipos de comportamientos fue desarrollado por Whiting un modelo lineal simple (48):

$$\log N = \begin{cases} \log N_0 \\ \log N_0 - \left(\frac{1}{D}\right)(t - t_L) \end{cases} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde, t_L es la fase de adaptación antes de la inactivación.

La fase de adaptación o la región hombro de las curvas de supervivencia son muy variables, por lo que desarrollar modelos secundarios para describir la influencia del medio ambiente sobre dichas fases es muy difícil.

b. Enfoque no lineal

Las cinéticas de inactivación compleja requieren el uso de funciones matemáticas no lineales. Si bien es cierto que la regresión lineal se puede realizar fácilmente a través de programas de hojas de cálculo o software que incluyen la regresión lineal, la regresión no lineal también se puede realizar a través de un proceso interactivo más complejo, como el que utiliza la herramienta Solver de Excel.

Una de las formas más comunes de supervivencia, son las curvas semilogarítmicas cóncavas, que no presentan una fase de adaptación y tiene una cola. Esta función puede ser representada por la siguiente ecuación:

$$\log \frac{N}{N_0} = \frac{t^p}{D} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde p es la potencia. Una curva cóncava se produce cuando $p < 1$ y una forma convexa cuando $p > 1$.

1.5.2.3. Distribuciones

Recientemente se ha introducido la noción de distribución estadística en el modelado de supervivencia de las bacterias. Este abordaje está basado en la idea de que los eventos letales son más probabilísticos que deterministas, y que cuando se tiene una gran población inicial de células, se puede usar una función continua. En el caso de la curva de supervivencia de una célula, es una función de paso, donde la célula puede estar viva o muerta:

$$S_i(t) = \begin{cases} 1 & \text{(viva)} & t < t_c \\ 0 & \text{(muerta)} & t \geq t_c \end{cases} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde t_c es el tiempo de inactivación.

Como ya hemos dicho, la inactivación de microorganismos por calor y otros métodos físicos ha sido tradicionalmente descrita por una cinética de primer orden. Es un modelo de aproximación donde se predice que el logaritmo de la población disminuye linealmente a medida que el tiempo aumenta. Por tanto, la disminución de las células viables en relación al tiempo, dN/dt , será igual al número de células vivas, N , multiplicando por la probabilidad de morir, k (Ec.2 y siguientes).

Cuando las curvas de supervivencias no son lineales, el valor k es usualmente determinado teniendo en cuenta las partes lineales de la curva de supervivencia. Esto obviamente no es un método conveniente y se traduciría en más o menos valores en función de las formas de las curvas de supervivencia. Con los años se han propuesto varios modelos para describir las curvas de supervivencias no lineales como las de Cerf, Gompertz (modificado), log-logistic, Baranyi y el modelo Weibull (49).

1.5.2.3.1. Modelo de Weibull

El modelo matemático de la ecuación exponencial negativa que asume la cinética de primer orden no explica los numerosos casos en los que no hay inactivación en tiempos cortos ("offset") o en los que ésta deja de ocurrir a tiempos largos ("tailing") que hemos observado en nuestros efluentes, en los que la representación del logaritmo de las bacterias supervivientes no es una línea recta sino una curva con una larga cola que debe ser tenida en cuenta.

Unos modelos matemáticos que describen bien este efecto “cola” y que además ofrecen una explicación de este efecto, son los basados en el uso de distribuciones estadísticas tipo Weibull que en los últimos tiempos ha ganado popularidad debido a su simplicidad y flexibilidad, cuya aplicación implica que consideramos que la población es heterogénea en relación al carácter estudiado. En este caso, como lo que se mide es la supervivencia de las bacterias a lo largo del tiempo, la premisa básica del modelo es que cada bacteria tiene su propio tiempo de supervivencia en las condiciones experimentales estudiadas, y que la variabilidad de ese tiempo puede ser descrita por la distribución de tipo Weibull (50). Este modelo, además, permite describir tanto las cinéticas convexas, con un período inicial sin aparente inactivación, como las cóncavas en las que no se consigue una inactivación completa. En este trabajo de investigación hemos aplicado una distribución tipo Weibull a nuestras curvas de depuración. Se trata de una ecuación muy sencilla:

$$N = N_0 e^{b \cdot t^n} \quad \text{Ecuación 10}$$

Aplicando logaritmos:

$$\text{Log} \frac{N}{N_0} = -b \cdot t^n \quad \text{Ecuación 11}$$

Despejando LogN:

$$\text{Log} N = \text{Log} N_0 - b \cdot t^n \quad \text{Ecuación 12}$$

Dónde:

N₀: Tamaño del inóculo.

N: Número de sobrevivientes en el tiempo t.

b: Coeficiente de localización.

n: Coeficiente de forma.

t: Tiempo

La ecuación tiene dos parámetros, **b**, que suele ser llamado coeficiente de localización, porque es una medida de la situación de la curva de frecuencias

en los ejes de coordenadas y n , llamado coeficiente de forma, ya que la curva correspondiente a la ecuación toma formas convexas cuando n es mayor que 1 y cóncavas cuando es menor que 1. Cuando n es igual a 1 la ecuación de Weibull se convierte en la típica ecuación exponencial negativa. La convexidad o concavidad de la curva puede aportar también información sobre los mecanismos inactivantes subyacentes (50).

Una cinética cóncava, es decir n menor que uno, muestra que la tasa absoluta de inactivación dN/dt disminuye con el tiempo, lo que se explicaría por la rápida desaparición de las células más sensibles al principio del proceso y la consecuente acumulación de las más resistentes que irían desapareciendo cada vez más lentamente a medida que fueran quedando las de mayor resistencia individual. Eventualmente este proceso podría acabar con la persistencia de una pequeña población de células inmunes o inaccesibles al proceso inactivador, que se mantendrían largo tiempo en el efluente.

Por otra parte cuando n es mayor que uno, la distribución de frecuencias se asemeja más a la normal, las células por lo general son más resistentes y la curva de supervivencia es convexa, por lo que se puede apreciar un periodo inicial sin muerte aparente, es decir que la tasa de muerte parece ser cero, pero que va aumentando a medida que pasa el tiempo. La interpretación desde el punto de vista biológico que se suele dar en estos casos es que el efecto inactivante va produciendo daños progresivos en cada célula, que no son letales pero que se van acumulando hasta alcanzar un número suficiente de ellos que provocarían la muerte. Por eso al principio parece que hay efecto inactivador y sólo al cabo de un cierto tiempo, cuando se han acumulado daños suficientes en un número significativo en las células, empieza a notarse la disminución de la población viable.

Cuando n es igual a 1 la ecuación de Weibull se convierte en la típica ecuación logarítmica negativa que corresponde a la cinética de inactivación de primer orden que ya fue mencionada en el **apartado 1.5.2.1**. Por tanto, este caso se puede considerar como un caso específico de la ecuación de Weibull cuando n es igual a 1.

1.5.3. Validación y Evaluación de los modelos

Los modelos para el crecimiento o la inactivación se realizan normalmente en medio de cultivo con factores controlados. Una vez obtenidos, los modelos deben ser validados con nuevos datos obtenidos. Esto proporciona una estimación de la bondad del ajuste y pone de manifiesto cuándo son necesarios datos adicionales. Un segundo paso de la validación consiste en comparar las predicciones con el comportamiento real de los microorganismos en el medio en estudio.

Un método para evaluar la exactitud de un modelo es la de McClure (51) que consiste en cuantificar la exactitud en base a la suma de los cuadrados de las diferencias del logaritmo natural (SCDLn) de los valores observados y esperados. El uso del logaritmo se basa en que las diferencias por sí solas pueden ser engañosas, ya que se puede dar más peso a los valores mayores de los esperados que a los valores por debajo de la predicción. Por ello se aplica el logaritmo, para limitar el peso de estos valores elevados, aproximando el peso de los dos tipos de valores en la determinación del promedio de la desviación. Cuando se obtiene la suma de las diferencias, cuanto menor sea su valor, mejor es la predicción del modelo (52).

$$\sum (\text{Ln}(\text{observado}) - \text{Ln}(\text{esperado}))^2 \quad \text{Ecuación 13}$$

Dónde: *esperado* es el valor que predice el modelo y *observado* es el valor del observado experimentalmente.

Otra forma de evaluar la bondad de un modelo, puede ser a través de ciertos índices que establezcan la relación que existe entre los datos obtenidos experimentalmente y los predichos (esperados) por el modelo. Basado en esto, Ross en 1996 (52) sugirió la utilización de dos índices conocidos como el factor de sesgo (Bf, por sus siglas en inglés, bias factor) y el factor de exactitud (Af, accuracy factor). De estos índices, el factor de exactitud aporta una información acerca de la bondad del modelo similar a la del índice de McClure (51), ya que considera el promedio de las desviaciones entre los valores esperados y los

observados, pero no analiza si las desviaciones del modelo sobrevaloran o infravaloran los valores experimentales

1.5.3.1. Bias o factor sesgo (Bf)

El factor de sesgo mide la relación entre los valores esperados y observados y se calcula como (52):

$$Factor\ de\ sesgo = 10^{\left(\frac{\sum \text{Log}\left(\frac{esperado}{observado}\right)}{n}\right)} \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde *esperado* es el valor que predice el modelo y *observado* es el valor observado experimentalmente. Las diferencias se calculan en logaritmos por las mismas razones ya explicadas en el índice de MacClure (51). En este caso sin embargo se calcula después la media de estas diferencias, dividiendo por **n**, que es el número de datos o valores y hallando el antilogaritmo con lo que el índice se convierte en factor que puede ser utilizado para conocer el rango de las desviaciones. Un factor del sesgo =1 indica un ajuste perfecto, sin sobre- ni infravaloraciones. Si el factor es de sesgo es mayor que 1, por ejemplo 1,1 significa que en caso de utilizar el modelo para predicción o para ajuste a los datos experimentales, las predicciones exceden a las observaciones en un promedio del 10%. Por el contrario, un valor de sesgo menor que 1 indicaría que el modelo hace predicciones menores que los valores observados. Tal como en el caso anterior, un factor de sesgo de 0,9 indicaría que las predicciones son menores a las observaciones en un promedio del 10%

1.5.3.2. Accuracy o factor de exactitud (Af)

Este factor es un promedio de la distancia entre cada punto y la línea de equivalencia, como una medida de la proximidad del promedio entre las predicciones y las observaciones, sin tener en cuenta cuál de ellas es mayor, ya que se toman los valores absolutos del logaritmo de su cociente. El antilogaritmo de estos valores siempre será igual o mayor a uno. Por ello, el factor de exactitud y se define como (52):

$$Factor\ de\ la\ exactitud = 10^{\frac{\sum \left| \text{Log}\left(\frac{esperado}{observado}\right) \right|}{n}} \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde *esperado* es el valor de la predicción del modelo y *observado* es el valor observado experimentalmente; n es el número de datos o valores.

Un valor del factor de la exactitud igual a 1 definiría la perfecta exactitud de la predicción, mientras que valores mayores que 1 indicarían la pérdida de exactitud. Por ejemplo un valor de 1,7 indica que las predicciones en promedio difieren un 70% de las observaciones.

1.6. IMPORTANCIA DE LAS CÉLULAS VIABLES NO CULTIVABLES CON RESPECTO A LA EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA SUPERVIVENCIA BACTERIANA

La capacidad de crecimiento de un microorganismo en un medio de cultivo general se consideró, hasta la década de los 80, como prueba suficiente para considerarlo viable, mientras que si no lo hacía, se consideraba como muerta (53). Sin embargo, en la actualidad se sabe que esta asunción es simplista, y que existen muchas situaciones donde una célula pierde la capacidad de crecimiento, pero permanece viable y potencialmente capaz de volver crecer.

Se ha comprobado mediante el empleo de técnicas microscópicas que permiten detectar actividad en el ámbito celular, que muchas de las células muertas, de acuerdo con la definición establecida por Postgate en 1976, presentan actividad fisiológica (53). En 1982, Xu reportó que *E. coli* permanecía viable, pero no cultivable en un medio de agar o caldo (54). Luego, esto fue confirmado nuevamente por Roszak y Colwell (55) al demostrar que a lo largo de la supervivencia de *E. coli* en los sistemas acuáticos, el número de bacterias que presentaron actividad metabólica fue superior a las que lograron crecer en un medio de cultivo.

En base a estos resultados estos autores describieron un nuevo estado celular, el estado viable no cultivable (VNC). Esto significa que las bacterias en estado VNC no crecen en un medio bacteriológico convencional, en el cuál normalmente deberían crecer y desarrollarse en colonias, pero a pesar de esto, las bacterias siguen vivas y con capacidad de reanudar su actividad metabólica. Las células que se encuentran en este estado se caracterizan por tener baja actividad metabólica, pero con capacidad de crecimiento (56).

La definición del estado vital de las células sigue siendo una controversia a nivel científico, como lo demuestra la complejidad de las precisiones que hay que emplear en su caracterización (viables, no viables y viables no cultivables) en comparación con lo que debería ser la simple división en vivas o muertas. Algunos autores sostienen que la hipótesis de que no sean cultivables es la culminación de una ruta alternativa para generar formas de latencia de supervivencia, similar a la formación de esporas que se producen en bacterias diferenciadas (57).

Pero al mismo tiempo existen otros autores que afirman que las células expuestas a condiciones de estrés se vuelven no cultivables debido al deterioro celular (58-60), que puede ser un fenómeno estocástico o genéticamente programado (61, 62).

Algunos de los factores que se piensa inducen a que una célula entre en estado VNC (viable no cultivable), son la temperatura, la presión osmótica, ausencia de nutrientes (63) incubación fuera del rango de temperatura de crecimiento, exposición a la luz blanca (64) y la edad de la célula (64). A pesar que se ha demostrado que durante la transición de *E. coli* al estado de VNC se excretan moléculas en el medio circundante, no se pudo establecer una relación entre éstas moléculas y la pérdida de capacidad de crecimiento (65)

Varios trabajos han reportado que las bacterias de origen intestinal que terminan en un ecosistema acuático muestran que una pequeña población tiene una capacidad de supervivencia con una densidad que oscila entre 10^3 y 10^4 cél/mL y que se mantiene viable cultivable (VC) frente a la desaparición del resto de la población (24, 42, 66, 67). Esta situación también hemos observado en varias muestras de efluentes que mostraron a lo largo del tiempo de incubación la presencia de un pequeño grupo de bacterias resistentes. Una posible explicación para este caso es la heterogeneidad intrínseca de las poblaciones bacterianas y que podría consistir en un mecanismo adicional para asegurar la perdurabilidad de las especies. En 2002 Makinoshima *et al.* (68) analizaron mediante la técnica de gradientes de Percoll, la densidad de las células que componen la población bacteriana de diversos cultivos y han demostrado en cultivos aparentemente homogéneos de *E. coli*, la existencia de

5 a 10 fracciones diferentes tanto en fase exponencial como en fase estacionaria (68) . Una posible explicación es que durante la división celular no se produce un reparto simétrico de las proteínas y mRNA entre las células hijas, lo que da como resultado una distribución heterogénea a nivel proteómico entre las células que componen la población. Este reparto desigual, sobre todo de las proteínas minoritarias daría lugar a diferentes fenotipos morfológicos o fisiológicos (62).

El método tradicional utilizado para el recuento de las bacterias, solo permite cuantificar las células que pueden crecer y formar colonias visibles en un medio, y por tanto el número de organismos viables podría no representar el valor real de la población, existiendo bacterias que mantienen su integridad celular y ciertas actividades metabólicas y con capacidad de regeneración en condiciones adecuadas, las denominadas VNC, cuya detección no es sencilla. Entre los métodos enzimáticos que se utilizan para poder determinar si una célula es viable, destacan dos métodos de identificación por reacción con un sustrato. El primero es un análisis de la hidrólisis de CTC o reducción de INT, ya que ambas actividades serían indicadores de actividad metabólica (69). El segundo es la medición de la integridad de la membrana citoplasmática, a través del ioduro de propidio, integrado en el método BacLight, que hemos utilizado para realizar nuestros experimentos.

Otra alternativa, también muy utilizada para realizar el estudio de las células viables, es realizar el recuento por medio del citómetro de flujo. La ventaja de ésta técnica es que permite realizar un análisis individual de las partículas en estudio, a parte que posibilita una cuantificación física (forma y complejidad de la célula) y bioquímica (contenido de ADN). Además tiene la ventaja adicional y al parecer muy importante de que permite procesar una gran cantidad de muestras en tiempo corto, proporcionando resultados estadísticamente fiables. (70, 71). En este trabajo hemos optado por aplicar esta técnica para el estudio de los mecanismos potenciales de inactivación celular favoreciéndola sobre los estudios con microscopía de fluorescencia. Este abordaje fue considerado necesario ya que la aplicación única del método de recuento directo al estudio de la supervivencia de las bacterias entéricas en los sistemas acuáticos ha puesto de manifiesto importantes diferencias cuantitativas entre el número total

de células y el número de células cultivables (54, 55, 72) que deben ser tenido en cuenta en el momento de evaluar la capacidad de autodepuración de un efluente, así como en los casos que se utilicen para valorar los riesgos que podría tener la reutilización de las aguas residuales tratadas.

1.7. ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD DE MICROORGANISMOS Y SU INCERTIDUMBRE ASOCIADA

1.7.1. Estimación de la densidad bacteriana por medio Número Más Probable (NMP)

En 1915 McCrady introdujo el concepto de Número Más Probable para la estimación de la densidad bacteriana a través de los resultados de una serie de diluciones. La estimación del **NMP** se basa en varios supuestos: El primero es que los organismos están distribuidos al azar en todo el líquido. Esto significa que es igualmente probable que un organismo se encuentre en cualquier parte del líquido, y que no existe tendencia a formar parejas o grupos (73). En la práctica esto implica que el líquido está bien mezclado y que, si el volumen no es lo suficientemente grande, se suele emplear algún tipo dispositivo de agitación adecuado. El segundo supuesto es que cada muestra del líquido, si incluye un(os) organismos, cuando es inoculada en un medio de cultivo adecuado, producirá un crecimiento detectable de la población. Si el medio de cultivo es pobre, o si hay factores inactivantes del crecimiento, o si es necesario más de un organismo para el crecimiento inicial, el **NMP** da una subestimación de la verdadera densidad. El tercero es que la probabilidad de que haya crecimiento en cada uno de los tubos inoculados con las muestras correspondientes a la serie de diluciones puede ser calculada a partir de una distribución estadística. Asumiendo estos supuestos, a partir del número de tubos o pocillos totales inoculados y del número de pocillos en los que no se detecta crecimiento se puede estimar la concentración de células que ha sido inoculada. En este trabajo hemos utilizado las bandejas Colilert que se basan en la aplicación de este método.

1.7.2. Desarrollo de una metodología específica para el cálculo de la incertidumbre asociada al recuento de *E. coli* por el método Colilert

Existen diferentes maneras de calcular la incertidumbre asociada del estimador de densidad del Número Más Probable (N.M.P.)

1.7.2.1. Error Estándar del logaritmo decimal del estimador de densidad (N.M.P.)

El método de la dilución serial para estimar la densidad bacteriana tiene una baja precisión en comparación con el método del recuento directo. Además es vital que cualquier tipo de estimación este acompañada del error estándar y si es posible con los intervalos de confianza del 95%.

Debido a que la distribución del log del **NMP** es más simétrica, se recomienda que para las pruebas de significación y cálculos de los límites de confianza sea realizado a partir del logaritmo que de la densidad estimada en valores absolutos.

Si se tiene **n** muestras por cada dilución, el error estándar del Log_{10} puede ser calculado aplicando la siguiente ecuación (73, 74):

$$\text{SE Log}_{10} = 0,55 * \sqrt{\frac{\text{Log}_{10} a}{n}} \quad \text{Ecuación 16}$$

Donde **a** es el factor de dilución. Ésta ecuación puede usarse para un rango de dilución de 5 o menos. En caso contrario se debe usar la siguiente ecuación (73):

$$\text{SE Log}_{10} = 0,58 * \sqrt{\frac{1}{n}} \quad \text{Ecuación 17}$$

1.7.2.2. Error estándar del logaritmo neperiano del estimador de la densidad

Las dos fórmulas anteriores desarrolladas por Fisher y Cochran son frecuentemente usadas para derivar los límites de confianza del **NMP** a pesar de que en algunos casos, dependiendo del tamaño de muestra, se sobreestima el error estándar del **NMP**. La desventaja de esta fórmula es que no se puede aplicar a un diseño general con número variable de volumen de

muestra y diluciones. Sin embargo, existe otra fórmula que permite calcular la error estándar (SE) del **NMP** para los casos generales y que es la siguiente (ver Materiales y Métodos):

$$SE \text{ Ln NMP} = \left(\text{NMP}^2 \sum_{i=1}^k \frac{v_i^2 d_i^2 n_i}{e^{v_i d_i \text{NMP}} - 1} \right)^{-1/2} \quad \text{Ecuación 18}$$

Esta fórmula fue desarrollada por Fisher en 1921 y Finney en 1964, y aunque no es difícil de aplicarla, no se suele utilizar con mucha frecuencia (75). Es la que se ha utilizado en este trabajo de investigación porque nos ha parecido muy útil.

En el caso de que solo se dispongan de los límites superior e inferior de los logaritmos neperianos, como se asume que su distribución se aproxima a una normal, se puede calcular la desviación estándar relativa mediante la aplicación de la siguiente ecuación (76):

$$SE \text{ NMP} = \frac{\text{Ln}(\text{Límite superior NMP}) - \text{Ln}(\text{Límite inferior NMP})}{4} \quad \text{Ecuación 19}$$

Como según el principio de Myrberg “El error relativo de una cantidad es aproximadamente igual al error absoluto de su logaritmo neperiano” (77), hemos utilizado las dos ecuaciones anteriores para calcular la incertidumbre relativa de la población.

1.8. EVALUACIÓN DE LA HETEROGENEIDAD DE LA POBLACIÓN SOMETIDA A ESTRÉS

La mayoría de las contaminaciones empiezan con bajas concentraciones de células, como ya fue mencionado por varios trabajos desde la década de los noventa (78). Sin embargo casi todos los trabajos de laboratorio comienzan con inóculos grandes, más fáciles de cuantificar. Esta característica influye en los resultados obtenidos ya que la población resultante procede de células del inóculo en mejor estado fisiológico, las que necesitan menos tiempo de latencia para adaptarse y arrancar a crecer. El hacer un estudio individual de cada célula en fase de adaptación es importante para hacer una correcta evaluación de los riesgos correspondientes a poblaciones originadas a partir de inóculos

pequeños. Conocer el tiempo promedio de la fase de adaptación de las células, las propiedades del efluente y las condiciones ambientales del mismo, puede ayudar a evaluar el riesgo de recontaminación al cual está expuesta el agua residual una vez tratada. Por tanto, es importante saber bajo qué condiciones una célula individual pasa de un estado en que no crece a uno en el cuál crece exponencialmente.

En la actualidad se utilizan varios modelos que permiten describir el comportamiento de las poblaciones bacterianas, consideradas como grupos clonales, homogéneos, que no tienen en cuenta la variabilidad biológica de las células individuales. Una excepción de estos modelos matemáticos son los modelos tipo Weibull cuya aplicación considera que la población es heterogénea en relación al carácter estudiado. En pequeñas poblaciones de células la variabilidad puede ser muy importante sobre todo cuando se trata de hacer predicciones exactas, particularmente cuando las células han sido expuestas a un estrés (79).

La técnica basada en la medida espectrofotométrica del crecimiento de poblaciones en placas multipocillo inoculados con una o muy pocas células, tiene una serie de ventajas, ya que es una técnica rápida, fiable, no destructiva y económica, además de ser fácil de manejar a través de un software y permite realizar el seguimiento simultáneo de gran número de muestras. No obstante, como inconvenientes se describen una baja sensibilidad, porque es necesario una densidad de población de 10^5 - 10^6 cél/mL para obtener una señal de medida (80) y la relación entre las medidas de densidad óptica y los recuentos en placa no es directamente proporcional cuando las densidades celulares son elevadas.

Una de las limitaciones de las lecturas de absorbancia es que necesitan de un medio líquido de suspensión claro. Hay otras limitaciones, como el hecho de que la relación entre la concentración celular y la absorbancia es lineal únicamente en un rango limitado de concentración. Este rango está determinado por el límite de detección inferior del orden de 10^6 cél/mL, y el límite superior, que normalmente es menor que la concentración celular al

comienzo de la fase estacionaria, por lo que, la determinación de la fase de adaptación sólo puede hacerse en cultivos densos.

El tamaño de la célula suele variar con la tasa de crecimiento y las condiciones de crecimiento, por lo tanto, la misma biomasa puede contener muchas células pequeñas o menos más grandes. En contraste, la densidad óptica es proporcional sobre todo al número de partículas que refractan la luz y es relativamente independiente de los efectos del tamaño de células. Aunque pueden existir excepciones, sólo en casos extremos, en que existen grandes variaciones en el tamaño de las células se afectan las mediciones de densidad óptica (81). Otras alteraciones pueden ser consecuencias de las condiciones ambientales extremas en la que se encuentren las células (82).

1.8.1. Medida automatizada de crecimiento a través del Bioscreen C

Un método indirecto y práctico para controlar el crecimiento de una población en un medio líquido en un experimento, es la medición de la turbidez o turbidimetría (83). Éste método permite hacer un seguimiento del crecimiento bacteriano (que da lugar a un incremento de la turbidez de la suspensión) a partir de las medidas de la densidad óptica en tiempo real (82, 84, 85).

La turbidimetría es una técnica muy utilizada por su rapidez, sencillez y fiabilidad. Su forma de medición se basa en que las células bacterianas suspendidas en un medio líquido transparente son capaces de absorber y dispersar un haz de luz incidente, pero están sometidas a errores debido a la variación de la concentración, tamaño de las bacterias, como también del índice de refracción y longitud de onda (86). La relación entre la proporción de luz que atraviesa la suspensión y la concentración de las células está dada por la siguiente fórmula (87):

$$A = \text{Log} \frac{I_{\text{incidente}}}{I_{\text{transmitida}}} = \epsilon l c \quad \text{Ecuación 20}$$

Dónde: $I_{\text{incidente}}$ es la intensidad de luz que entra en la suspensión; $I_{\text{transmitida}}$, es la intensidad de luz que se dispersa la suspensión; ϵ , es una constante dependiente de las características del medio y de las células bacterianas; c , es la concentración de células y l , es la longitud del paso de luz. La relación

$\text{Log} (I_{\text{incidente}} / I_{\text{transmitida}})$ se corresponde con el valor de absorbancia, o densidad óptica que puede ser detectada y medida por un espectrofotómetro.

Para poder comprobar y cuantificar la heterogeneidad de poblaciones de *E. coli*, en relación a su capacidad de supervivencia se puede utilizar una metodología conocida como “single cell microbiology” o microbiología unicelular. Dicho método consiste en el estudio del crecimiento inicial de poblaciones procedentes a partir de una sola célula, que se obtienen por diluciones sucesivas y cuyo desarrollo es medido en placas multipocillos incubadas en espectrofotómetros especiales como el Bioscreen (78).

A partir de los parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de los cultivos procedentes de una sola célula podemos estimar el estado fisiológico de dicha célula. Esta metodología, desarrollada entre otros por el grupo del Dr. Baranyi (88, 89), se basa en las premisas siguientes: 1) El crecimiento puede ser descrito por un modelo trifásico, con fase de latencia, exponencial y estacionaria 2) La duración de la fase de latencia es característica de cada célula y depende del estado fisiológico celular y de la tasa específica de crecimiento en el medio del pocillo (μ_{MAX}) 3) Una vez que ha empezado a crecer, la μ es aproximadamente constante e igual para todas las células 4) El tiempo de detección, es decir, el tiempo que tarda la población de cada pocillo en alcanzar una densidad óptica determinada depende del tiempo de latencia y de la tasa específica de crecimiento, es proporcional al tiempo de latencia cuando la biomasa inicial, N_0 , es 1 célula para todos los pocillos e igualmente N_{det} es otro valor fijado aleatoriamente e idéntico para todos ellos. Como consecuencia, al ser μ_{MAX} constante, el tiempo de detección puede ser utilizado como una estimación del tiempo de latencia y éste a su vez como una estimación del estado fisiológico celular. Así mismo, la distribución estadística de los tiempos de detección individuales debe ser la misma que la de los tiempos de latencia y los estados fisiológicos celulares.

1.8.1.1. El modelo lineal trifásico de Buchanan

La relación entre tiempo de detección y tiempo de latencia se ve muy claramente cuando se utiliza el modelo Trifásico de Buchanan para describir el crecimiento y por ello hemos utilizado este modelo primario para analizar las

curvas de Bioscreen. Está formado por tres fases separadas: la fase de latencia, la fase exponencial y la fase estacionaria, cada una representada por las siguientes ecuaciones (48):

Fase de latencia:

$$t \leq t_{LAG}, \quad N_t = N_0 \quad \text{Ecuación 21}$$

Fase exponencial:

$$t_{LAG} < t < t_{MAX}, \quad \ln N_t = \ln N_0 + \mu(t - t_{LAG}) \quad \text{Ecuación 22}$$

Fase estacionaria:

$$t \geq t_{MAX}, \quad N_t = N_{MAX} \quad \text{Ecuación 23}$$

Como puede observarse, son varios los parámetros tenidos en cuenta para la aplicación del modelo. La tasa máxima de crecimiento específico está representada por μ que puede ser estimada por la pendiente de la tangente trazada a la inflexión de la curva sigmoidea que se ajusta a los datos que representan el logaritmo natural de la concentración de las células contra el tiempo, t . t_{LAG} es el tiempo de latencia que en este modelo se calcula como el tiempo transcurrido desde la inoculación hasta la intersección de la recta que representa el crecimiento exponencial con el nivel del inóculo, y t_{MAX} es el momento en que se alcanza la densidad máxima de la población, que se calcula como la intersección de la recta del crecimiento con la horizontal de la fase estacionaria.

El tiempo de detección, t_d puede ser calculado a partir de la ecuación 24,

$$\ln\left(\frac{N_d}{N_0}\right) = \mu(t_d - t_{LAG}) \quad \text{Ecuación 24}$$

$$t_d = t_{LAG} + \frac{1}{\mu} \ln\left(\frac{N_d}{N_0}\right) \quad \text{Ecuación 25}$$

La ecuación 25 muestra la proporcionalidad entre t_d y t_{LAG} cuando μ , N_d y N_0 son constantes para todos los pocillos.

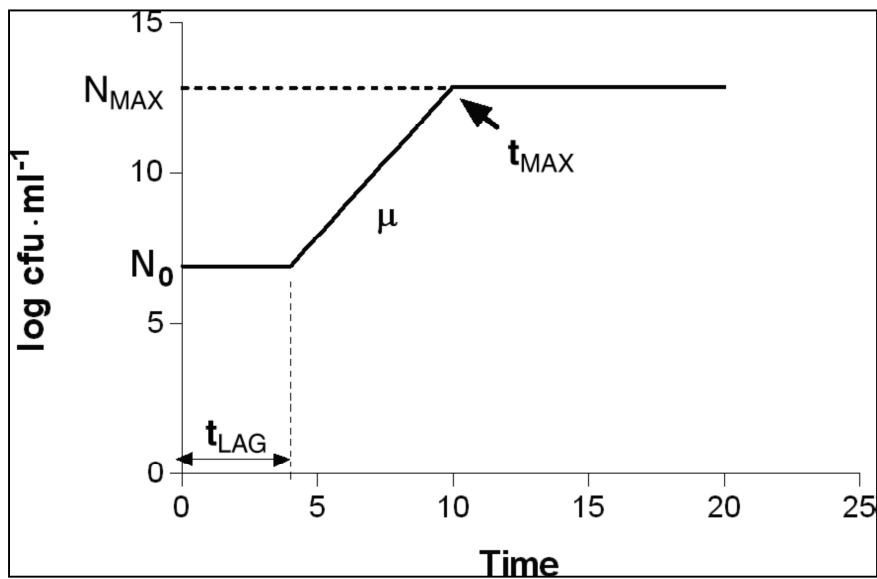


Fig.1.7- Curva de crecimiento generada por el Modelo Buchanan. Fuente: McKellar y Lu (48).

Las fuentes de incertidumbre ligadas a la utilización del modelo están relacionadas con los tres parámetros que forman parte de la ecuación y debe ser tenidas en cuenta. En primer lugar está la precisión en la concentración de las células por pocillo, especialmente conseguir una célula inicial por pocillo. Este es uno de los puntos más débiles de las técnicas de microbiología unicelular y actualmente se admite que el criterio más adecuado es utilizar la distribución de Poisson para calcular el número de células por pocillo, basándose en el número de pocillos inoculados en los que no hay crecimiento. En segundo lugar la proporción entre el valor de densidad óptica y la concentración celular empeora a medida que aumenta la concentración, por lo que es aconsejable utilizar valores pequeños, pero significativos, de N_d . En tercer lugar es también aconsejable medir la μ_{MAX} en cada pocillo. Siguiendo estas recomendaciones es posible obtener una medida fiable de la heterogeneidad de la población a partir de los cultivos a partir de una sola célula cuyo crecimiento se mide espectrofotométricamente en el Bioscreen C.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este trabajo de investigación se realizó dentro del proyecto CONSOLIDER-TRAGUA, formado por 24 grupos de investigación en diferentes áreas, desde la ingeniería química a la microbiología y desde el análisis químico a la economía, que abordaron, de una manera integrada, el tratamiento y la reutilización de aguas residuales urbanas depuradas. El objetivo del proyecto era obtener, desarrollar y validar nuevos procesos de depuración así como metodologías analíticas y de gestión teniendo en cuenta criterios de calidad química y biológica de las aguas y la determinación de su impacto sobre el medio natural, para conseguir una gestión sostenible del proceso global de recuperación del agua. La misión encomendada a nuestro grupo dentro del proyecto fue doble: En primer lugar, seleccionar un método de recuento de *E. coli*, fiable y preciso, que cumpliera las exigencias de la normativa y que fuera aplicable tanto en los laboratorios de I+D como a pie de planta. En segundo lugar, estudiar la integración de un proceso de eliminación natural de patógenos en aguas, como es la autodepuración, en un sistema integrado de tratamientos terciarios que sirviera para recuperar y reutilizar las aguas residuales procedentes de tratamientos secundarios. Por todo ello, los objetivos generales de esta tesis integrada en el Proyecto fueron:

- 1- Analizar los métodos disponibles comercialmente para el recuento de *E. coli* en aguas, seleccionar el más adecuado y desarrollar un protocolo normalizado de recuento, teniendo como criterio principal la minimización de la incertidumbre asociada al recuento.
- 2- Desarrollar un modelo matemático general que permita caracterizar, cuantificar y comparar la cinética de inactivación de *E. coli* en diferentes tipos de aguas.
- 3- Identificar los potenciales tipos de mecanismos de inactivación de *E. coli* en las aguas residuales tratadas y establecer las relaciones entre los tipos de mecanismos fisiológicos de inactivación y las cinéticas de autodepuración observadas.

- 4- Analizar el efecto de los tratamientos terciarios, diseñados para eliminar los patógenos u otras contaminaciones químicas aún presentes en los efluentes secundarios, sobre la capacidad de autodepuración de los efluentes tratados y su utilización posterior.
- 5- Utilizar los modelos matemáticos desarrollados para optimizar la integración del proceso de autodepuración en el tratamiento terciario integral y para tomar decisiones correctas sobre los usos a que puede ser dedicada el agua regenerada según la normativa vigente.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS

3.1.1. Cepa *E. coli* J08 y J09

Las cepas de *E. coli* J08 y *E. coli* J09 que se utilizaron en este estudio fueron aisladas en el laboratorio del departamento de Microbiología III de la Universidad Complutense de Madrid. Ambas fueron aisladas a partir de un efluente en julio de 2008 en el caso de la primera cepa y la segunda en julio de 2009.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANOS

3.2.1. TSA

Componente	g/L
Peptona de Soja	5,0
Peptona de Caseína	15,0
Sodio Cloruro	5,0
Agar	15,0

3.2.2. Caldo Nutritivo (TSB)

Componente	g/L
Péptico de harina de soja	3,0
Glucosa	2,5
Fosfato dipotásico de sodio	2,5
Cloruro sódico	5,0

3.2.3. Chromocult

Componente	g/L
Peptona	3,0
Cloruro Sódico	5,0
Dihidrogenofosfato Sódico	2,2
Hidrogenofosfato disódico	2,7
Triptófano	2,7
Piruvato Sódico	1,0
Tergitol®7	0,15
Sorbita	1,0
Agar-Agar	10,0
6-Cloro-3-Indoxil-beta-D-galactopiranosido	0,2
Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido	0,1
5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-glucorónico acido	0,1

3.2.4. Colilert

Los dispositivos Quanti-Tray de IDEXX están diseñados para realizar recuentos bacterianos cuantificados de alícuotas de 100mL, a los que se añaden los reactivos según la metodología “Tecnología del Sustrato Definido (Defined Substrate Technology)” de IDEXX.

3.2.5. LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits L7007

Componente	g/L
SYTO 9 dye, 1.67 mM / Ioduro de Propidium, 1.67 mM (Componente A),	300 µL solution in DMSO
SYTO 9 dye, 1.67 mM / Ioduro de Propidium, 18.3 mM (Componente B)	300 µL solution in DMSO
BacLight mounting oil (Componente C)	10 mL

3.3. MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE LAS CEPAS BACTERIANAS

3.3.1. Mantenimiento

Para el mantenimiento de la cepa se preparó el medio TSA en tubos inclinados, indicando el nombre de la cepa y la fecha de siembra y se mantuvieron conservadas a 4°C. Se resembró cada 6 meses y en caso de notar dificultad para la recuperación de la cepa se realizó este procedimiento antes de cumplirse el período para el mantenimiento de la cepa.

3.3.2. Cultivo

Los cultivos se realizaron en diferentes medios de cultivos sólidos y líquidos que se describieron en el **apartado 3.2**. Los sólidos se prepararon en placas de Petri de 90 mm y para el caso los líquidos en tubos de 20 mL.

3.3.3. Obtención de Inóculo

A partir del banco mantenido en la cámara fría a 4°C, se cultivó la cepa en tubo de TSA para su recuperación a 37°C durante 24 horas y luego se realizó la siembra en placa de TSA para luego incubar nuevamente a 37°C durante 24 horas (19).

3.3.4. Escala de McFarland

Se utilizó la escala de McFarland para poder realizar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón. Esta escala establece una relación entre una precipitación química (del Cl_2 Ba en presencia del H_2SO_4) y una suspensión bacteriana. Para todos los experimentos que necesitaron preparar un inóculo aproximado de 1×10^8 se utilizó el 0,5 McFarland (90). Para esto se tomó una alícuota de la suspensión de la cepa *E. coli* J08 en TSA, se inoculó en tubo con suero salino y se comparó la turbidez con la escala 0,5 McFarland.

3.3.5. Aislamiento, cultivo y mantenimiento de Protozoos

Para poder aislar los diferentes protozoos presentes en las muestras de efluentes, se procedió a analizar las muestras bajo un estereoscopio, a partir de las cuales, mediante una pipeta Pasteur, se fueron separando los diferentes protozoos (91). A continuación se colocaron los microorganismos aislados en un frasco con agua destilada, más *E. coli* como fuente de alimentación. Luego se incubó el cultivo a 20°C en agitación continua (120 rpm). Tras 24 horas de incubación se observaron las muestras bajo microscopio observándose el aumento de la población de los protozoos.

3.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE EFLUENTES

3.4.1. Almacenamiento

Todas las muestras fueron depositadas en frascos de plástico con un volumen total de 2 litros. Las alícuotas fueron procesadas el día de su recepción en el laboratorio. En caso contrario, fueron guardadas en una cámara fría (4°C) durante un máximo de 24 horas.

3.4.2. Origen y características de las muestras de efluentes

3.4.2.1. Efluente secundario

Las muestras de efluentes secundarios fueron tomadas en una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) de Madrid. A lo largo del trabajo de investigación se han recepcionado 16 muestras en las cuales se han realizado la mayor parte de los experimentos. Todas las muestras contaron con datos fisicoquímicos tales como sólidos disueltos, fósforo total, nitrógeno total, pH, DBO, DQO y Nitritos, proporcionados por la estación depuradora.

3.4.2.2. Efluente terciario

En relación a las muestras de efluentes terciarios provinieron de una EDAR de Cantabria. Durante todo el período de investigación se han recibido dos muestras. Una de las muestras correspondió a un efluente al cual se le aplicó Microfiltración y a la otra Osmosis Inversa.

3.4.2.3. Agua de estanque

Para comparar los efectos de aguas contaminadas tratadas con otras naturales, se decidió realizar unos ensayos con muestras de agua de un estanque que se encuentra en el Real Jardín Botánico Alfonso XIII, ubicada entre la Avda. Complutense y la calle José Antonio Novais, del campus de la ciudad Universitaria de Madrid.

3.4.2.4. Agua destilada

El agua destilada fue utilizada como control de agua sin ningún tipo de agente inactivante exógeno. Se usó la disponible en el laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. El proceso de destilación del agua fue realizado a través del equipo Milli-U10-Millipore.

3.4.2.5. Agua Residual Sintética

El agua residual sintética fue utilizada en los primeros ensayos en el laboratorio para poder poner a punto las técnicas de detección y manipulación de la cepa *E. coli* J08. El agua residual sintética se obtuvo a partir de 1 litro de agua desnionizada más la adición de los siguientes compuestos:

Componente	g/L
(NH ₄)SO ₄	4,70
K ₂ PO ₄ H	0,56
MgSO ₄	0,25
CaCO ₃	0,25

3.4.3. Recepción de las Muestras

Las muestras se recibieron en el laboratorio nº 15, del Departamento de Microbiología III, de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. En caso de haber algún tipo de inconveniente para procesar inmediatamente la muestra a su recepción, se depositó en la cámara fría con un máximo de 24 horas para la preparación de la misma para los ensayos experimentales.

3.4.4. Registro de las Muestras

Una vez depositada la muestra en el laboratorio, se pasó a completar una serie de datos de la misma, para su posterior procesamiento o almacenaje en la cámara fría (**ver Fig. 2.1**).

<u>REGISTRO PARA AGUAS</u>		
Nº de Muestra:.....		
Nº de ensayo:.....		
Nombre de la depuradora:.....		
Fecha de Ingreso:.....		
Tipo de muestra:.....		
Volumen de la muestra:.....		
Tipo de tratamiento:.....		
Características del recipiente:.....		
pH:.....	Fósforo Total:.....	Nitrógeno Total:.....
D.Q.O.:.....	D.B.O.:.....	Nitratos:.....
Sólidos Totales:.....	Recibido por:.....

Fig. 2.1- Hoja de registro utilizada para anotar los datos de las muestras.

3.5. INCUBACIÓN

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en condiciones completamente asépticas.

3.5.1. Muestra Control

Todos los experimentos se realizaron con controles positivos o negativos (experimentos controlados). Los controles fueron prácticamente idénticos al del grupo de tratamiento, salvo por la única variable de interés cuyo efecto se estaba probando. Para el control positivo se utilizaron las mismas muestras del efluente secundario sin aplicarle ningún tipo de tratamiento en el laboratorio. Las muestras del efluente secundario suelen contener *E. coli* en una concentración aproximada entre 10^2 y 10^3 células/mL (44). Para rotular los matraces se utilizaron las letras (CP)

3.5.2. Efluente secundario

Para las muestras del efluente secundario, una vez recepcionadas en el laboratorio se procedieron a separarlas en diferentes alícuotas de acuerdo al experimento a realizar (**ver Fig. 2.2**). A continuación se describen los diferentes procesos realizados a las mismas.

3.5.2.1. Alícuota-Completa Inoculada (Sec. I)

A esta Alícuota no se le realizó ningún tipo de tratamiento de centrifugación, filtración o tratamiento térmico. Una vez obtenido el volumen para el ensayo se procedió a inocular la cepa de estudio *E. coli* J08. La alícuota fue rotulada con el nombre (Sec. I.).

3.5.2.2. Alícuota-Centrifugada y Filtrada (Sec. CFI)

La Alícuota fue centrifugada en equipo Sigma 6K10 a 3500 rpm, a 15°C durante 10 min. Luego se filtraron a través de una membrana Millipore de 0,22µm de poro, de manera a eliminar la mayor cantidad posible de microorganismos que tengan un tamaño superior al poro. Las alícuotas se rotularon con el nombre (Sec. CFI)

3.5.2.3. Alícuota-Centrifugada, Filtrada y con Tratamiento Térmico (Sec. CFTTI)

Para la eliminación de todos los compuestos termosensibles inactivantes de *E. coli* tales como proteínas y otros, después de la centrifugación y filtración descritas anteriormente, se procedió a aplicar calor (100°C) en un baño maría durante 5 minutos. Los matraces se rotularon con el nombre (Sec. CFTTI)

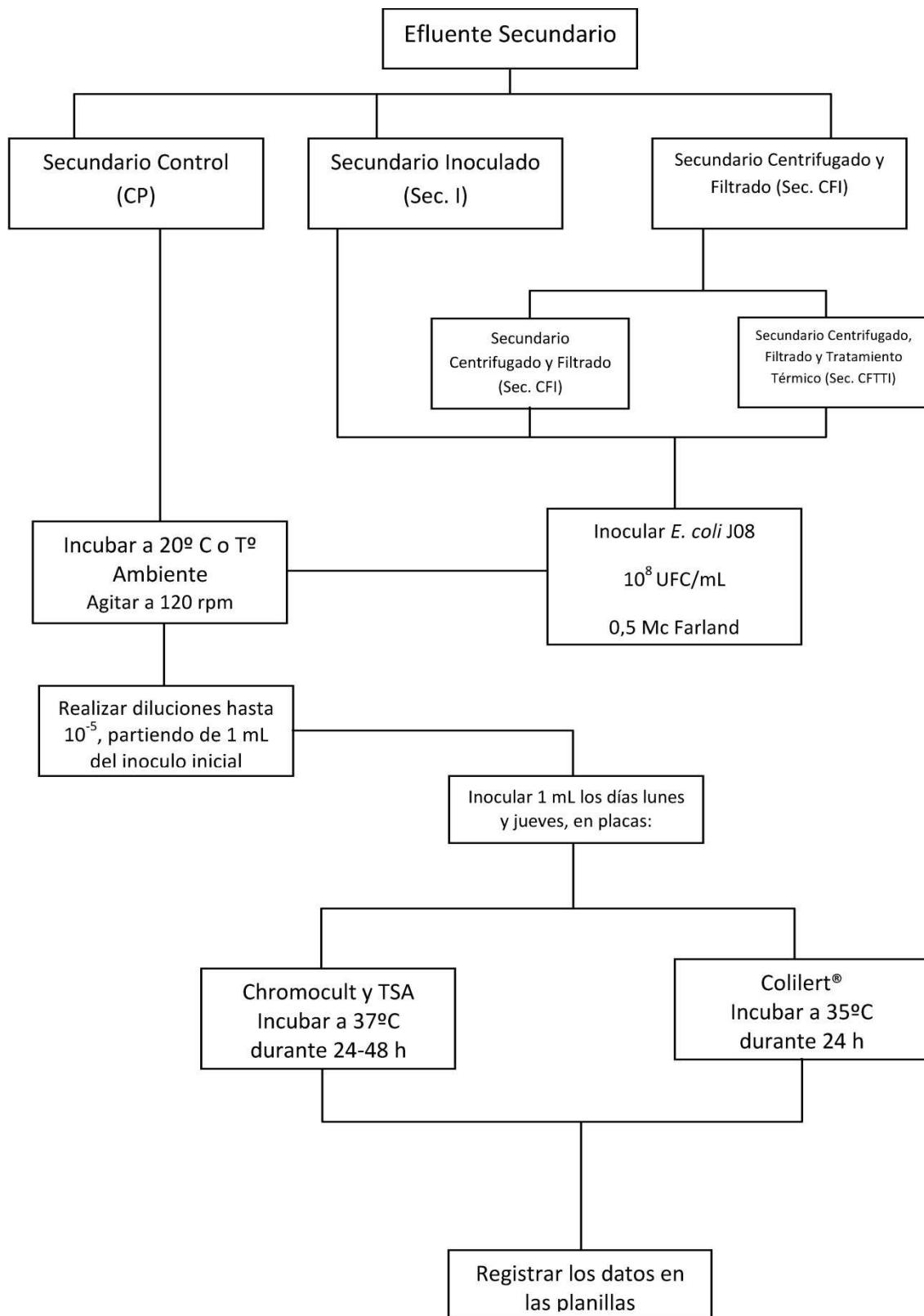


Fig. 2.2- Esquema de los diferentes tratamientos realizados a las muestras de efluentes secundarios.

3.5.2.4. Alícuota-Fase Biótica Filtrada (Sec. FBFI)

Para poder determinar la importancia de la fase biótica presente en la Alícuota del efluente sobre la cinética de inactivación de *E. coli* J08 se procedió a centrifugar en un equipo Sigma 6K10 a 1200 rpm durante 5 minutos y luego a filtrar a través de una membrana Millipore de 0,45 µm de poro. A esta alícuota filtrada recientemente se le aplicó el método descrito en el **apartado 3.5.2.4.** y luego se le reinoculó con la FBF retenida en el filtro de 0,45 µm. Una vez preparado la Alícuota se procedió a rotular con el nombre (Sec. FBFI).

3.5.3. Efluente terciario

El volumen total de Alícuota del efluente terciario, se dividió en dos alícuotas para diferentes ensayos (**ver Fig. 2.3**). Los experimentos realizados a las mismas se detallan a continuación:

3.5.3.1. Alícuota-Control

Para el control también se utilizaron Alícuotas del efluente terciario al que no se le aplicó ningún tipo de tratamiento dentro del laboratorio. Como el tratamiento terciario tiene como objetivo en algunos casos la eliminación completa de los patógenos, la alícuota no contenía *E. coli* en el permeado en el caso de la osmosis inversa. El matraz se etiquetó con las letras (CN)

3.5.3.2. Alícuota-Completa Inoculada

Se siguió el mismo procedimiento que al efluente secundario mencionado en el **apartado 3.5.2.1.** Tampoco se le realizó ningún tipo de tratamiento dentro del laboratorio. Luego de tener la alícuota preparada se rotuló la alícuota con el nombre de (Ter. Micr. I.) para un efluente terciario que tuvo un tratamiento de microfiltración y (Ter. Osm. I.) para un efluente al que se le aplicó un tratamiento de Osmosis Inversa.

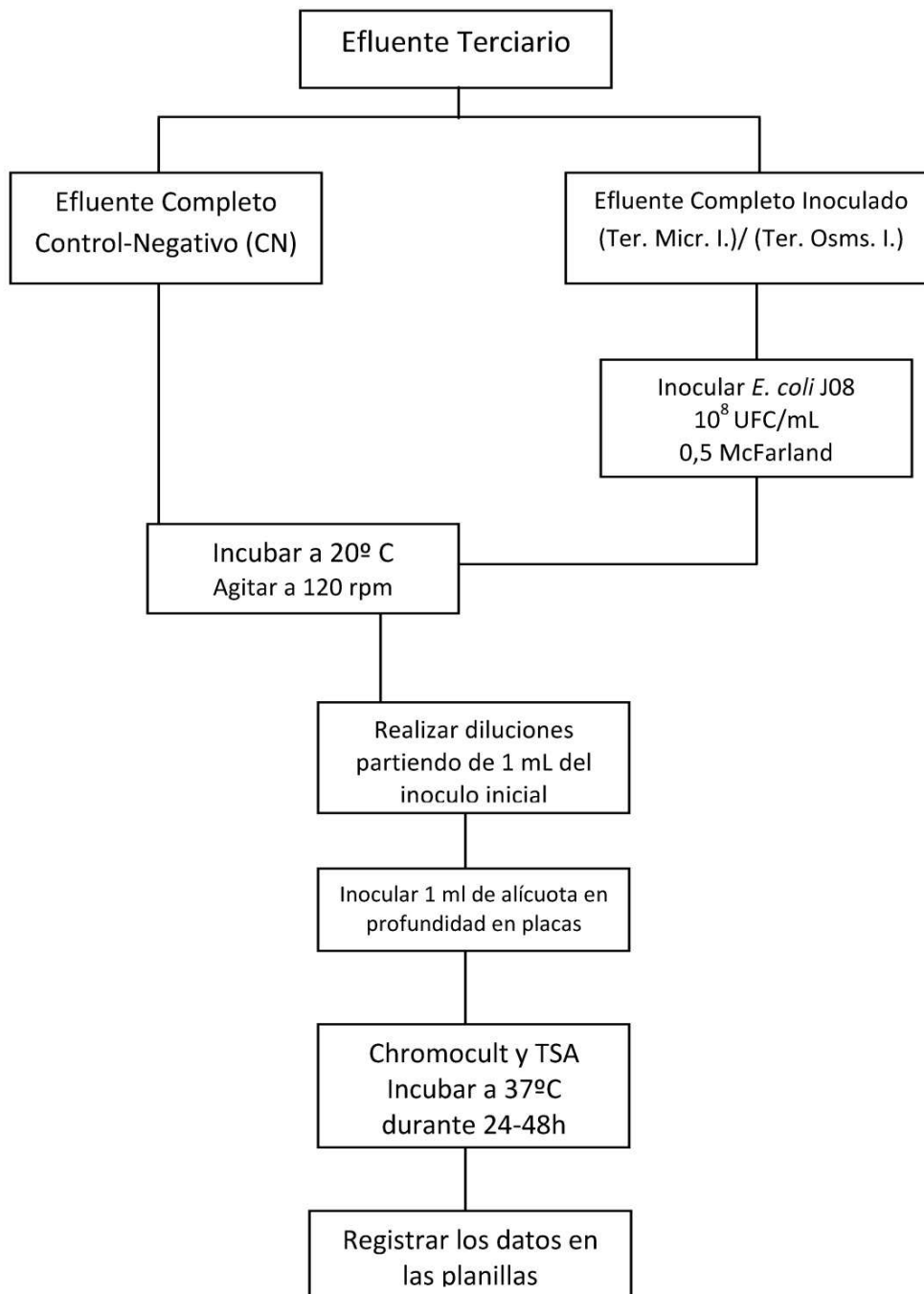


Fig. 2.3- Esquema de los diferentes tratamientos realizados a las muestras de efluentes terciarios.

3.5.4. Agua de estanque

Las alícuotas de aguas también se dividieron en dos alícuotas y a las cuales se les realizó diferentes tratamientos (ver **Fig. 2.4**), que continuación se detallan:

3.5.4.1. Alícuota-Control Negativo (CN)

Como ya se mencionó en el **apartado 3.5.3.1.** se procedió a realizar el mismo método para el agua de estanque. Es decir, la alícuota del agua de estanque durante todo los análisis nunca dio positivo para *E. coli*. Para etiquetar la alícuota, se utilizaron las letras (CN).

3.5.4.2. Alícuota-Completa Inoculada (Estq. I)

Se siguió el mismo método descrito en el **apartado 3.5.2.1.** tanto para la preparación de la alícuota como su etiquetado.

3.5.4.3. Alícuota-Completa Centrifugada y Filtrada (Estq. CFI)

Se siguió el mismo método descrito en el **apartado 3.5.2.2.** tanto para la preparación de la alícuota como su etiquetado.

3.5.5. Agua destilada

Para los experimentos llevados a cabo con el agua destilada se realizaron diferentes tipos de tratamientos (ver **Fig. 2.5**). En este caso se dividieron en tres alícuotas que fueron las siguientes:

3.5.5.1. Alícuota-Control Negativo (CN)

Se realizó el mismo método para efluentes terciarios descrito en el **apartado 3.5.3.1.**

3.5.5.2. Alícuota-Sin autoclavar (ADI)

En algunos experimentos se utilizó el agua destilada sin habersele aplicado ningún tipo de tratamiento dentro del laboratorio. Para etiquetar se utilizó las letras (ADI).

3.5.5.3. Alícuota-Autoclavada (ADTTI)

Para varios experimentos las alícuotas de agua destilada fueron autoclavadas, con una temperatura de 120°C y con una 1atm de presión durante 20 minutos. Para rotular la alícuota se utilizaron las letras (ADTTI)

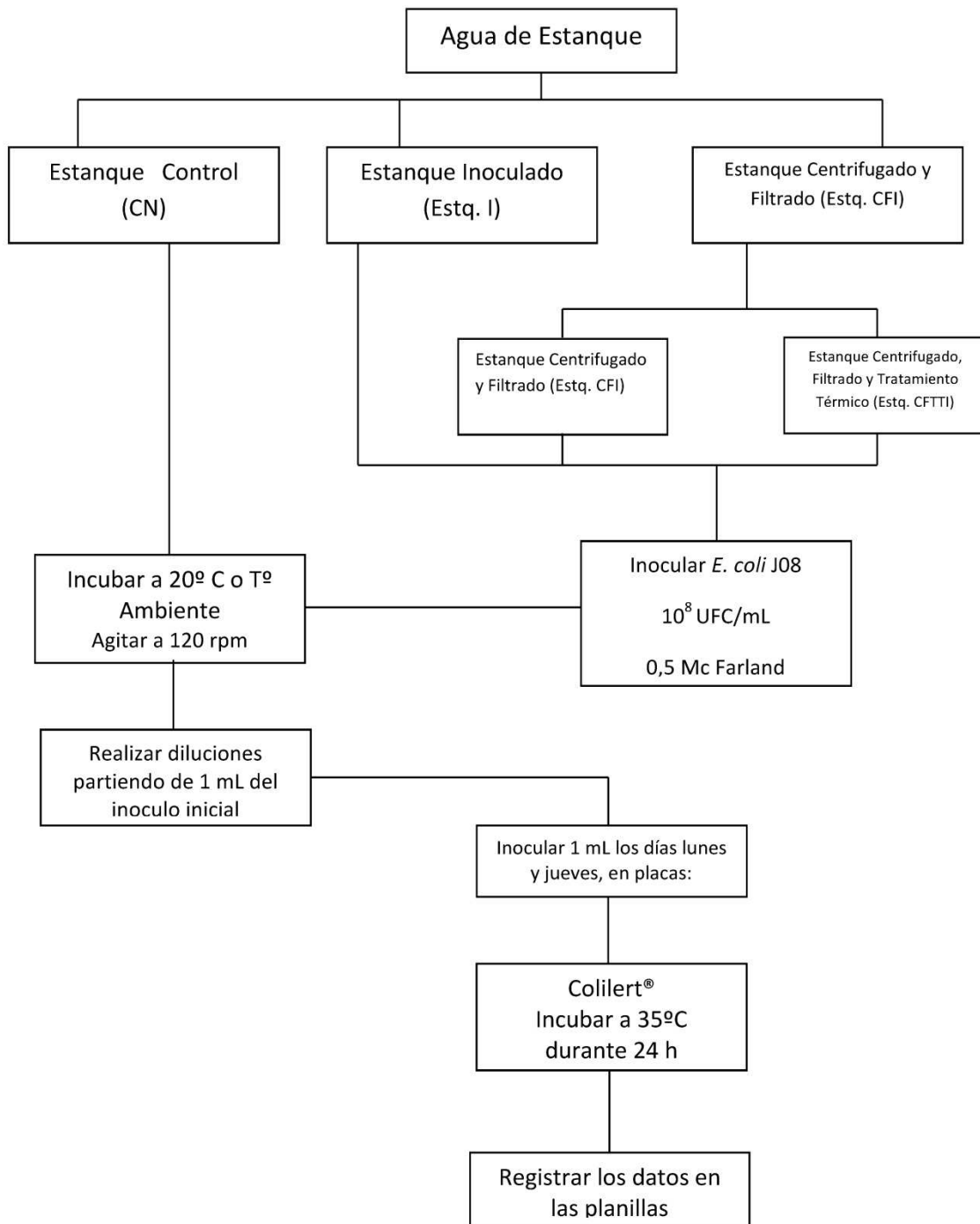


Fig. 2.4- Esquema de los diferentes tratamientos realizados a las muestras del agua de estanque.

3.5.6. Agua Residual Sintética

Para realizar los diferentes experimentos con el agua residual sintética, fueron sometidas a diferentes tratamientos (ver **Fig. 2.5**) que se detallan a continuación:

3.5.6.1. Alícuota-Control Negativo (CN)

Se realizó el mismo método para efluentes terciarios detallado en el **apartado 3.5.3.1.**

3.5.6.2. Alícuota-Completa sin Glucosa (Resd. Sint. - G)

Al agua residual sintética no se le realizó ningún tipo de tratamiento dentro del laboratorio. La característica de esta agua se encuentra detallada en el **apartado 3.4.2.5.** Las letras utilizadas para etiquetar fueron (Resd. Sint. - G)

3.5.6.3. Alícuota-Completa + Glucosa (Resd. Sint. + G)

Para la elaboración del agua residual sintética, se preparó con agua desionizada según lo descrito en el **apartado 3.4.2.5.** y se le adicionó 0,3 g/L de glucosa. Las letras utilizadas para etiquetar fueron (Resd. Sint. + G).

3.5.7. Volumen de la alícuota

Durante la primera etapa de los experimentos el volumen de alícuota utilizado fue de 100mL en matraces Erlenmeyers. Posteriormente debido al aumento de la cantidad de volumen a ser analizado, se aumentó el volumen final de la alícuota a ser incubada a 500 mL por matraz.

3.6. INOCULACIÓN DE LA ALÍCUOTA

Luego de la obtención del inóculo descrito en el **apartado 3.3.3.** y después de haber utilizado la escala de McFarland (**apartado 3.3.4**), se procedió a inocular todas las alícuotas a excepción del control, con la cepa *E. coli* J08. Para ello, una vez que la concentración inicial de la cepa *E. coli* J08 fue de $1 \cdot 10^8$ células/mL aproximadamente, comparada con la turbidez de la escala de McFarland, se procedió a inocular 1mL por cada 100 mL de alícuota, a manera de obtener una concentración final entre 10^6 y 10^7 células/mL.

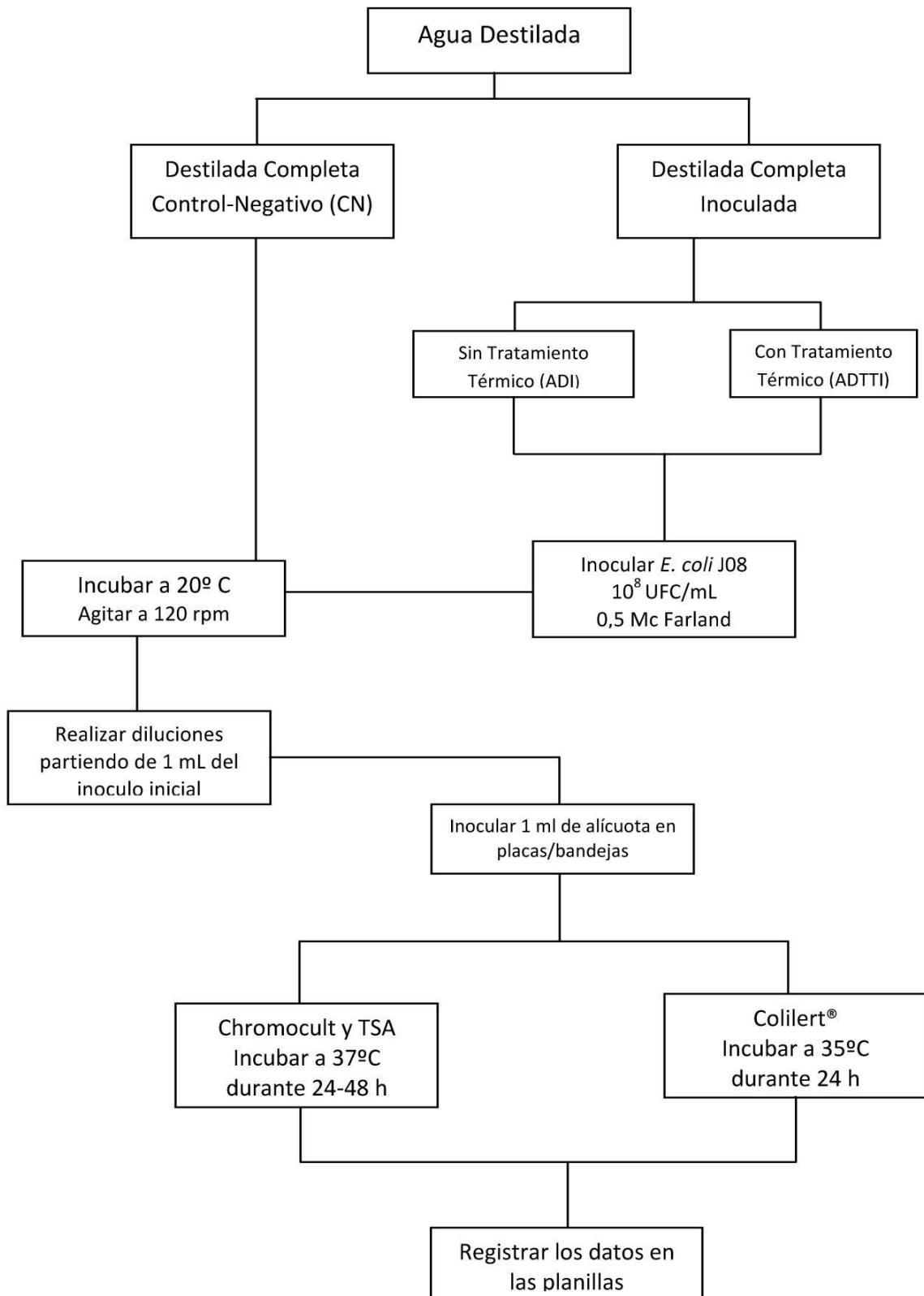


Fig. 2.5- Esquema de los diferentes tratamientos realizados a las muestras de agua destilada.

El objetivo por tanto fue elevar la concentración de la población inicial en el caso del efluente secundario que suele presentar una baja densidad, y en el

caso del efluente terciario, agua de estanque y agua destilada de obtener una elevada concentración de *E. coli* para facilitar el estudio de la cinética de inactivación con mayor precisión y disminuyendo la incertidumbre de los datos.

3.7. INCUBACIÓN DE LA ALÍCUOTA Y MEDIOS PARA EL RECuento DE *E. coli*.

Durante todo el período de investigación, tanto las alícuotas como los medios con las muestras fueron incubadas a diferentes temperaturas.

3.7.1. Incubación en cámara a 20°C

Las Alícuotas que debían estar a 20°C en oscuridad fueron incubadas en la cámara Sanpas y en agitación en una plancha agitadora a 120 rpm.

3.7.2. Incubación en estufa a 35°C

La estufa Memmert fue utilizada para incubar las placas de Colilert a 35°C durante 24h de acuerdo a lo establecido en su protocolo.

3.7.3. Incubación en estufa a 37°C

La estufa PreciLab. S.L. fue utilizada principalmente para la recuperación de la Cepa *E. coli* J08, ya sea para medios Chromocult o TSA

3.7.4. Incubación a temperatura ambiente

Algunas muestras fueron incubadas a temperatura ambiente, en presencia (8 horas) o usencia de luz (total), y en agitación continua en una plancha a 120 rpm.

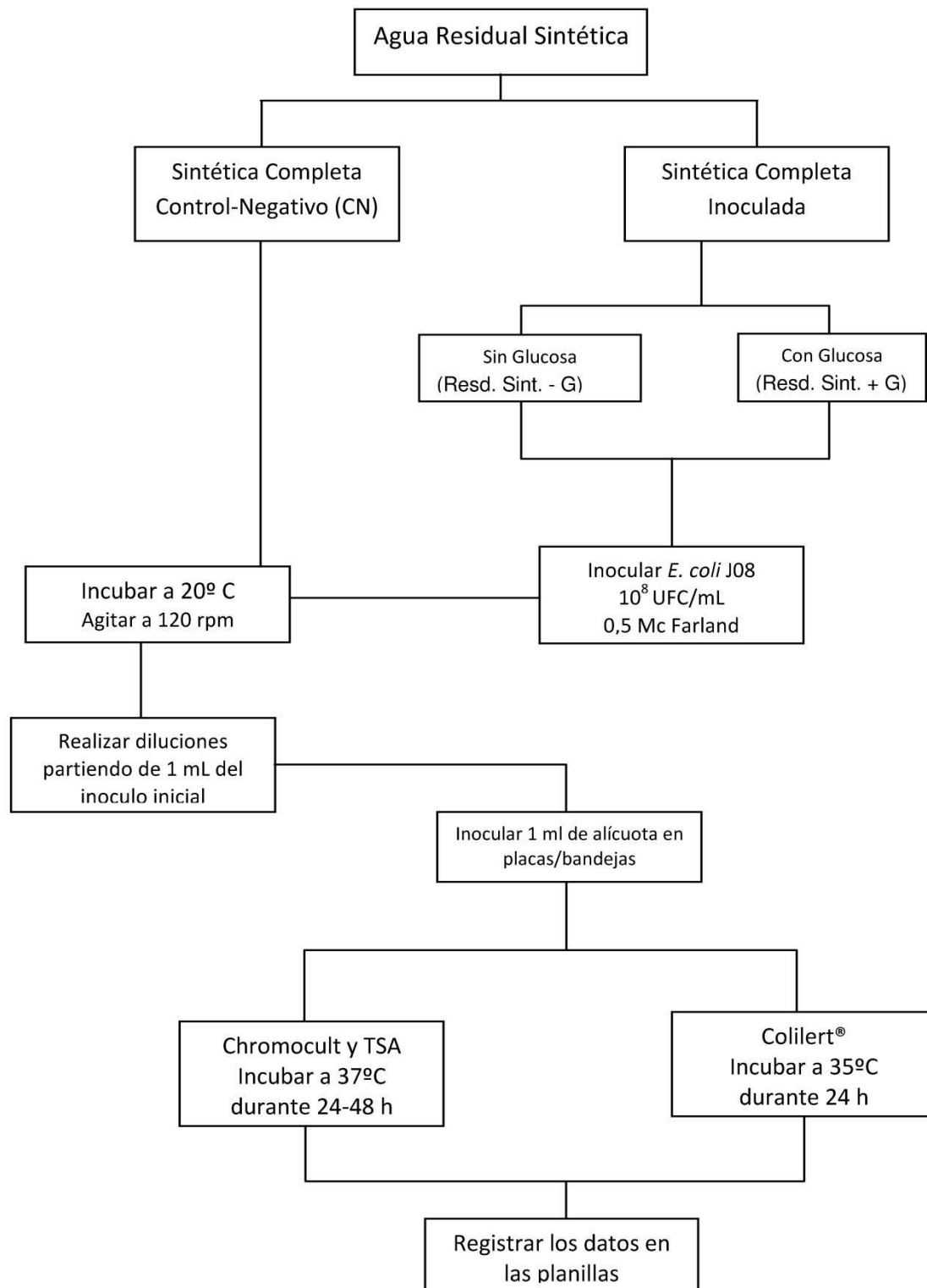


Fig. 2.6- Esquema de los diferentes tratamientos realizados a las muestras de agua residual sintética.

3.8. AGITACIÓN DE LAS ALÍCUOTAS

Todas las alícuotas sometidas a diferentes ensayos durante el período de investigación fueron mantenidas en agitación constante a 120 rpm.

3.8.1. Plancha de agitación

En la mayoría de los experimentos las alícuotas permanecieron en agitación sobre una plancha Infors H.T.

3.8.2. Agitación por imán

En caso que la alícuota tuviera que ser incubada a una temperatura diferente, ésta se colocó dentro de un matraz Erlenmeyer y se utilizó como agitador un imán Stuart.

3.9. IDENTIFICACIÓN Y RECuento DE *Escherichia coli*

3.9.1. En medio sólido

3.9.1.1. Identificación morfológica de colonias

Para la identificación y cuantificación de células viables de *E. coli* se tuvieron en cuenta las morfologías que presentaron las colonias en los diversos medios utilizados, que se describen a continuación.

Es frecuente que para mantener la fiabilidad del número de colonias por placa, el recuento de colonias se haga entre un rango de 10-100, 30-300, etc. Sin embargo, cuando se tienen varias placas de una misma muestra, la precisión estadística depende en gran medida de la suma de los números de las colonias y no existe ninguna necesidad de tener en cuenta la regla del límite del menor número (10 o 30) al momento de contar (76). Por tanto, en todos los experimentos en placas se realizaron recuentos inferiores a 10 colonias de *E. coli*.

3.9.1.1.1. Viables

Son las células que al ser cultivados por métodos de recuentos clásicos en placas mantienen su capacidad de crecimiento (92).

a. TSA

Para el recuento en TSA, primero se inoculó 1 mL de la alícuota en profundidad en placas de Petri de 90 mm y luego se incubaron las placas durante 24 h a 37°C.

El recuento de las placas en profundidad (1mL de muestra) se basó en el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) que aparecieron tras la incubación.

Las colonias se observaron de color blanco, en forma de puntos en el medio de TSA y no superaron los 2mm de diámetro a las 24 h de incubación (ver **Fig.2.7**).



Fig. 2.7- Imagen de una placa de TSA con colonias de *E. coli*.

b. Chromocult

El mismo procedimiento que para el TSA (ver **apartado anterior**) se realizó para la siembra e incubación de la muestra en medio Chromocult. Para el recuento de *E. coli* J08 en éste medio, en todos los experimentos se realizaron también por medio de la enumeración de UFC en placas. El Chromocult es un agar diferencial que permite identificar simultáneamente coliformes totales y *E. coli*, en muestras de agua y alimentos. Gracias a la acción conjunta de peptonas, piruvato y tampón de fosfatos se garantiza un rápido crecimiento también de coliformes con daños subletales. El contenido en lauril sulfato inhibe ampliamente el crecimiento de bacterias gram-positivas, sin tener influencias negativas sobre el crecimiento de coliformes. La identificación simultánea de coliformes totales y *E. coli* se hace posible por la combinación de

dos sustratos cromógenos. El sustrato Salmon-GAL que es escindido por la enzima beta-D-galactosidasa característico de coliformes y provoca una coloración roja de las colonias de coliformes. La identificación de la beta-D-glucuronidasa, característica para *E. coli*, tiene lugar mediante el sustrato X-glucurónico, cuyo producto de escisión produce una coloración azul de las colonias positivas (12). Debido a que *E. coli* escinde tanto Salmon-GAL como X- glucurónido, las colonias se tiñen de violeta-azul oscuro y debido a ello son fáciles de diferenciar de las restantes coliformes, que se presentan en color rojo. Sin embargo, constituyen una excepción algunas salmonellas, que poseen actividad de beta-D-glucuronidasa. Estas colonias se colorean de turquesa claro. Por último están las colonias incoloras que suelen ser Enterobacteriáceas.

Para la preparación del medio se disolvieron 27 g/L en agua desmineralizada para luego hervir y posteriormente, previa inoculación de la alícuota verter en las placas.

El recuento de las placas al igual que en TSA, también se hizo en profundidad (1mL de muestra) y se basó en el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) que aparecieron tras la incubación, teniendo en cuenta la coloración de las colonias mencionada anteriormente (ver **Fig. 2.8**).

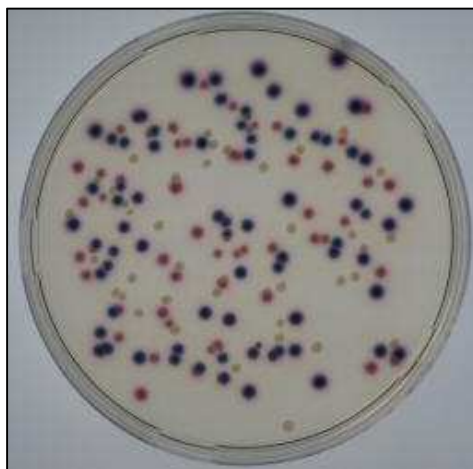


Fig. 2.8- Imagen de una placa de Chromocult con colonias de *E. coli* (color violeta) y coliformes totales (color rojo).

3.9.2. En medio líquido

3.9.2.1. Identificación morfológica de colonias

En algunos casos se tuvieron en cuenta la turbidez y en otros la coloración para la identificación y cuantificación de *E. coli* J08.

3.9.2.1.1. Viables

a. TSB

La turbidez es utilizada principalmente en este medio para indicar el crecimiento de *E. coli* J08 después de haberla inoculada el medio y luego ser incubada durante 24h a 37°C. Este medio se utilizó para medir la heterogeneidad de la población y realizar la curva de crecimiento de *E. coli* J08 mediante la medición de la turbidez a través del Bioscreen C.

b. Mediante la tecnología enzima-sustrato definido: Colilert®

Otro medio utilizado para realizar el recuento de *E. coli* fue Colilert, que es un medio selectivo y diferencial, y está diseñado para cuantificar bacterias en alícuotas de 100mL. El recuento se puede realizar en dos tipos de bandejas que presentan diferentes límites de detección. El QT 200 que es una bandeja con 51 pocillos con un volumen individual de 1,90 mL; mientras que el QT 2000 presenta 97 pocillos, divididos 49 grandes con un volumen de 1,80 mL y 48 pequeños con un volumen de 0,180 mL. La primera bandeja tiene un límite de detección de 200 cél/100 mL y la segunda 2420 cél/100 mL. El reactivo Colilert utilizados en las bandejas contiene dos nutrientes cromogénicos indicadores, el ortonitrophenil- β -galactopyranoside (ONPG) que produce ortonitrofenol, con un color amarillo, cuando se hidroliza el galactósido. También contiene 4-metilumbelliferyl- β -D-glucuronico (MUG), que es hidrolizado por una enzima característica de *E. coli*, la beta-glucuronidasa, haciendo que se libere un indicador 4-metilumbelliferone (4-MU) el cual emite una fluorescencia azul cuando es expuesto a luz ultravioleta con una longitud de 365 nm (93). Para el recuento se realizó también por siembra de 1 mL Alícuota en frascos con 99 mL de medio Colilert disuelto en suero fisiológico. Posteriormente se vertió el contenido en bandejas de 200 o 2000 de acuerdo a la carga bacteriana, y se incubó a 35° C durante 24 h.

3.9.2.1.2. *Viables no cultivables*

Para la identificación y cuantificación de las células viables pero no cultivables (VNC), es decir aquellas células que perdieron su habilidad de crecer en medios de cultivos a través de métodos tradicionales para el recuento en placa, pero que siguen manteniendo su integridad celular y algunas actividades metabólicas (92) se utilizaron diversos métodos descritos a continuación.

a. Microscopia de Fluorescencia

Para la observación y caracterización de las bacterias *E. coli* J08 presentes en las diferentes alícuotas, se realizaron algunas modificaciones del protocolo original del kit L7007. A continuación describen los pasos realizados en el laboratorio:

- ◆ Se combinó en igual volumen el componente A y componente B del kit en un tubo de microcentrífuga y luego mezclar en forma vigorosa.
- ◆ Se adicionó 3 µl de la mezcla de reactivos (componentes A + B) por cada mL de la suspensión bacteriana que fue filtrada.
- ◆ Se mezcló en forma vigorosa y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos.
- ◆ Se filtró la muestra a través de una membrana Millipore de 0,22 µm.
- ◆ Se puso una gota del componente C (mountaing oil) sobre el portaobjetos.
- ◆ Se colocó el filtro sobre el portaobjetos y encima el cubreobjetos.
- ◆ Se observó al microscopio de fluorescencia.

b. Citómetro de Flujo

La citometría de flujo es un método muy extendido para la evaluación de la concentración total y viabilidad, tanto de células procariotas y eucariotas en medio acuáticos ambientales, así como también para estudios sobre el riesgos de transmisión de enfermedades infecciosas por medio de microorganismos en forma de aerosoles durante el tratamiento de aguas residuales de hospitales (71). Otra ventaja es que permite evaluar en forma rápida la viabilidad de las células debido al almacenamiento y tiempo de incubación de la muestra (94).

Antes de empezar un análisis con el citómetro de flujo, lo más importante para realizar un estudio de la concentración total de células es determinar las áreas o regiones de los diferentes estados fisiológicos de la población bacteria, para la representación gráfica y cuantificación.

En un citómetro, las células convenientemente procesadas y marcadas fluyen de forma alineada y sobre ellas incide un haz de luz, normalmente rayos láser. La luz que incide sobre las células se dispersa hacia delante (“Forward Scatter” o FSC) y da una idea del volumen de la partícula. La luz dispersada lateralmente (“Side Scatter” o SSC) da idea de la complejidad celular. La representación gráfica de estos dos parámetros permite diferenciar las poblaciones a analizar y, en todo caso, permite descartar la información procedente de restos celulares, agregados del medio extracelular (ver **Fig.2.9**). Si las células han sido previamente marcadas con fluorocromos, la interacción de la célula con el láser da como consecuencia la emisión de una luz que proviene del fluorocromo excitado. Esta señal de emisión es filtrada, amplificada y detectada a diferentes longitudes de onda, con lo que la luz dispersada lateralmente es seleccionada mediante espejos dicróicos y recogida en detectores adecuados, lo que permite realizar simultáneamente diversas mediciones de determinadas características celulares. En el caso del equipo FACSS Calibur. Becton Dickinson, utilizado para realizar los ensayos, toda esta información fue procesada por un sistema informático (Cell Quest Pro).

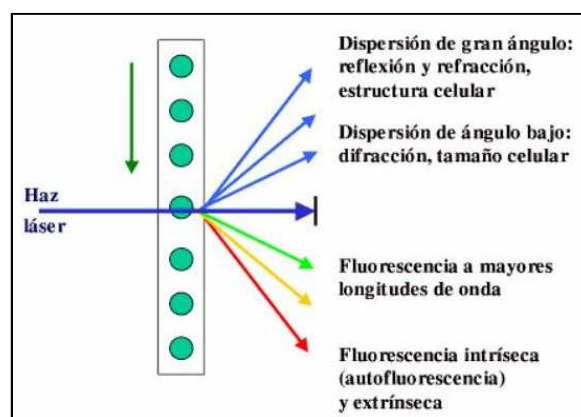


Fig. 2.9- Esquema del sistema de detección de fluorescencia por citometría de flujo.

La citometría de flujo es muy objetiva, permite hacer mediciones celulares individuales, tiene gran sensibilidad y resolución. Permite rapidez de análisis, así como realizar múltiples mediciones simultáneas sobre una misma célula.

◆ Componentes del citómetro de flujo (95):

- *Inyectores de la Alícuota:*

Es muy importante que la velocidad de flujo sea constante y adecuada a cada tipo de análisis. Hay inyectores de presión e inyectores isovolumétricos por jeringa que permiten contar las células, si bien su velocidad de flujo es menor.

- *Cámaras de flujo:*

Dependen de la fuente de iluminación del citómetro. Nos referimos sólo a las cámaras para citómetros con fuente de luz láser.

- *Sistema óptico:*

Contiene varios elementos: fuente de iluminación (normalmente láser), background o fondo lumínico y filtros para discriminar las diferentes señales luminosas.

- *Fuente de iluminación:*

La fuente de iluminación siempre se sitúa de forma perpendicular al flujo de células que se va a analizar, es decir, que su configuración es ortogonal. Algunos citómetros poseen varios láser (los más utilizados son argón o kriptón) y algunos emplean como fuente de iluminación una lámpara de mercurio o xenón.

La longitud emitida por el equipo para excitar la muestra fue de 488 nm.

- *Fondo lumínico:*

Para eliminar la luz no emitida o dispersada por las células se suele utilizar un pinhole.

- *Filtros:*

La finalidad de los filtros consiste en eliminar y separar las diversas luces emitidas. Son fundamentalmente de dos tipos:

- ✓ *De absorción: ayudan a eliminar longitudes de onda no deseadas.*
- ✓ *Dicroicos: dejan pasar la longitud de onda que interesa y reflejan las longitudes de onda no deseadas.*

El equipo empleado para realizar el análisis de la muestra cuenta con dos filtros, el FL1-H -530/30 nm para el caso de la fluorescencia verde, y el FL3-H para el caso de la fluorescencia roja.

- *Detectores:*

Existen dos tipos de detectores de la luz emitida en un citómetro: los fotomultiplicadores, para detectar luz dispersada lateralmente que en el caso del equipo utilizado fue el SSC-H y que permite medir la complejidad de la muestra; y los fotodetectores diodos, para detectar la dispersión frontal de la luz, que fue el FSC-H para medir el tamaño celular.

◆ **Cuantificación de las bacterias teñidas con el LIVE/DEAD BacLight Kit L7007**

- La concentración de la suspensión bacteriana fue de 10^6 cél/mL.
- Se combinó en igual volumen el componente A y componente B del kiten un tubo de microcentrífuga y luego mezclar en forma vigorosa.
- Se adicionó 3 μ l de la mezcla de reactivos (componentes A + B) por 1 mL de la suspensión bacteriana de la muestra.
- Se mezcló en forma vigorosa y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Por último se llevó al citómetro para realizar la cuantificación de las células teñidas.

Los primero fue pasar por el equipo las células obtenidas de un cultivo nuevo y con una concentración mínima de 10^6 cél/mL, para tener una idea de las características morfológicas de las mismas llamado R1. Luego se procedió a pasar las células tratadas térmicamente y teñidas con Ioduro de propidio, que se utilizarían como indicadores de células muertas o con daños en la estructura de la membrana, en una región de un gráfico denominado R2. Por último, otra

muestra fue teñida con el colorante SYTO-9 para evaluar la integridad de la membrana y metabolismo, que correspondería a las células viables y que fue denominado como R3.

Otra región fue observada durante la combinación de los colorantes y a la cual se le asignó el nombre de R4 y que correspondería a las células dañadas, es decir que por algún motivo no formaban parte de las células viables o muertas.

A continuación, se comenzó a trabajar con diversas muestras tanto de aguas residuales y agua destilada. Para la representación gráfica, se continuó utilizando la cinética de inactivación ajustado con el modelo matemático Weibull, indicando en ciertos puntos de los recuentos las imágenes obtenidas de los análisis de las muestras con el citómetro de flujo (ver **apartado 4.4.2.**).

3.10. BIOSCREEN

El analizador Bioscreen C (ver **Fig. 2.10A**) es un espectrofotómetro que mide, a lo largo del tiempo, la turbidez de un cultivo líquido por trayectoria vertical, proporcionando rápidamente una gran cantidad de datos por cultivo de placas. Una de las ventajas del aparato es que todas las funciones del analizador son controladas por medio de un software, facilitando el trabajo en gran medida. Este software de uso fácil, permite seleccionar los parámetros como temperatura de incubación, frecuencia de agitación e intensidad a los cuales uno quiere incubar la muestra, así como el tiempo y la longitud de onda del filtro a la cual que requiere hacer las mediciones.



Fig. 2.10- Bioscreen C (Labsystem, Finlandia). A- El equipo Bioscreen. B- Placa multipocillos.

Este equipo, ofrece además la posibilidad de obtener gran cantidad de réplicas, que garantizan idénticas condiciones de incubación, lo que permite obtener satisfactoriamente datos para la microbiología predictiva. La gran versatilidad de este sistema turbidimétrico se basa, entre otras propiedades, en la posibilidad de trabajar de forma conjunta con un número elevado de muestras, hasta 200 muestras (100 pocillos cada una) por experimento (ver **Fig. 2.10B**), que pueden además presentar como ya se mencionó diferentes condiciones experimentales.

En nuestro caso, para la medición de los tiempos de latencia y de las tasas de crecimiento para la valoración del crecimiento o de la divergencia poblacional de la línea celular del trabajo se utilizó la técnica del Bioscreen C.

Tanto para la calibración de la curva de crecimiento de *E. coli* J08 como para la curva de crecimiento de una célula de *E. coli* J08 por pocillo, se midió la densidad óptica dentro de un rango de 420-580 nm, durante 24 y a intervalos de 6 min.

Los datos de densidades ópticas arrojados por el Bioscreen C fueron procesados con el software informático Microsoft Excel y Sigma Plot para el posterior análisis de los parámetros de tiempo de latencia y tasa de crecimiento, con respecto a los valores obtenidos en condiciones óptimas.

3.10.1. Calibración de la Curva de crecimiento de *E. coli* J08 con el bioscreen

El método seguido para la calibración de la curva de crecimiento de *E. coli* J08 fue el siguiente:

1. Se recuperó y resembró la cepa *E. coli* J08.
2. Se ajustó la turbidez a la escala McFarland 0,5 para obtener una concentración de 10^8 cél/mL en suero salino 0,9%.
3. Se realizaron diluciones seriadas (1/10) en medio Colilert a manera de obtener una concentración final de 10^6 cél/mL que es la concentración mínima capaz de detectar el Bioscreen C.
4. Se depositó 250 μ l de la concentración 10^6 en cada pocillo de la placa multipocillos, luego se incubó en el Bioscreen C a 37°C, shaker 10 seg. antes de la toma de alícuota.

5. Se tomó 100 µl de alícuota cada 30 min y se realizaron diluciones seriadas (1/10) en solución salina 0,9%.
6. Se sembró en Colilert o Chromocult para realizar el recuento.
7. Por último se incubó la placa de acuerdo a lo mencionado en el **apartado 3.7.**

3.10.2. Curva de crecimiento de 1 célula/pocillo

El método seguido para la obtención de una célula por pocillo de *E. coli* J08 fue el siguiente:

1. Se determinó la concentración de *E. coli* J08 en el matraz, mediante el recuento en la bandeja Colilert.
2. Se realizaron diluciones cuando fueron necesarias (78), de manera a obtener una concentración final de 1-3 células por pocillos, basándonos en el método de Baranyi (88).
3. Luego se realizó el seguimiento del crecimiento individual (medio Colilert) de cada célula en el Bioscreen C. Las condiciones de incubación fueron de 37°C, Shaker 10 segundos antes de la lectura de DO, cada 6 min.

3.11. CÁLCULO DE LA TASA ESPECÍFICA DE INACTIVACIÓN

La ecuación de la Tasa Específica de Inactivación (**k**) se obtuvo a partir de la primera derivada de la ecuación de Weibull:

$$k = b * n * t^{(n-1)} \quad \text{Ecuación 26}$$

3.12. PROCESAMIENTO DE DATOS

En los anexos 2-4 se encuentran algunos de los resultados crudos obtenidos de los diferentes experimentos realizados y analizados en esta tesis.

3.12.1. Portada

En la portada se indican si el experimento es un primer ensayo o una repetición. A continuación los datos generales de la muestra y sus datos fisicoquímicos. Luego están la condiciones del experimento tales como el tipo de cepa utilizada, la agitación, si el experimento se realizó en presencia o ausencia de luz y volumen de alícuota utilizada.

3.12.2. Registro

En la parte superior de la tabla se encuentran los datos correspondientes a las fechas, tratamientos, temperatura de incubación, concentración inicial de *E. coli* y método de recuento utilizado en el experimento.

3.12.2.1. Caso Chromocult/TSA

Los datos correspondientes a la lectura y procesamiento de los mismos se encuentran en una tabla dividida en varias columnas (ver **Anexo 2**).

En la primera columna “Tiempo” se indica el tiempo de lectura de las muestras, en la segunda columna “Dilución” las diluciones realizadas para la lectura, en la tercera “UFC/placa”, que corresponde a la cantidad de colonias contadas en las placas. La cuarta, quinta, sexta y séptima corresponde al “Log UFC/mL”, su límite inferior, superior y su desviación estándar.

Por último en las columnas nueve, diez y once corresponden al ajuste de la ecuación Weibull. Para esto, luego de aplicar la ecuación mencionada en el **apartado 1.5.2.3.1** de la introducción y al obtener los valores **n** y **b** en base a los valores reales, se procedió a asignar valores de tiempo dentro del intervalo de los días de muestro a manera de obtener la mayor cantidad de puntos posibles y poder obtener una mejor representación de la curva a partir del ajuste.

3.12.2.2. Caso Colilert

Los datos correspondientes a la lectura y procesamiento de los mismos se encuentran en una tabla dividida en varias columnas (ver **Anexo 3**).

En la primera columna “Tiempo” se indica el tiempo de lectura de las muestras, en la segunda columna “Dilución” las diluciones realizadas para la lectura, en la tercera columna “Pocillos +” los pocillos que dieron positivos para *E. coli*. En esta columna puede haber dos tipos de valores registrados. Si hay un solo valor indica que la lectura se ha realizado en una bandeja de Quanti Tray 200 (detecta hasta 200 cél/mL), si son dos valores separados por una barra indican que la lectura fue hecha en una Quanti Tray 2000 (detecta hasta 2419 cél/mL), donde el primer valor corresponde al número total de pocillos grandes positivos y el segundo valor a los pocillos pequeños positivos.

En la cuarta columna se encuentran los valores de las NMP/mL, a continuación los límites inferiores y superiores. Estos datos se obtuvieron mediante la utilización de un software IDDEX MPN Generator y divididos por factor de dilución.

En la séptima y octava columna se corresponden a dos formas de cálculos del error estándar:

3.12.2.2.1. SEi:

Debido a que el software proporcionado por IDEXX, la empresa distribuidora de Colilert, solo proporciona la media (**NMP**) y los límites superior e inferior del 95%, para poder calcular el error estándar se aplicó la siguiente ecuación a los logaritmos neperianos del **NMP** (76), que está basada en que la distribución de los logaritmos es aproximadamente normal :

$$SE = \frac{\text{Ln}(\text{Límite superior NMP}) - \text{Ln}(\text{Límite inferior NMP})}{4} \quad \text{Ecuación 27}$$

3.12.2.2.2. SEii:

En caso de tener varias diluciones de una misma muestra, el software de IDEXX no permite calcular el error estándar, mientras que la ecuación de Hurley and Roscoe permite calcular el error estándar (75).

$$SE \text{ Ln NMP} = \left((\text{NMP})^2 \sum_{i=1}^k \frac{v_i^2 d_i^2 n}{e^{v_i d_i \text{NMP}} - 1} \right)^{1/2} \quad \text{Ecuación 28}$$

Dónde:

Variables	Quanti Tray 200	Quanti Tray 2000	
		Pocillos Grandes	Pocillos Pequeños
v_i	1,96 mL	1,86 mL	0,186 mL
d_i	dilución utilizada	Dilución	Dilución
p_i	pocillos positivos	Pocillos positivos	Pocillos positivos
n	51 pocillos	49 pocillos	48 pocillos
NMP	Número Más Probable		

Para poder calcular el error estándar es necesario primero calcular el **NMP** a partir de los valores de las placas Colilert, para lo cual se aplicó la siguiente ecuación (75) en la que el **NMP** se obtiene por el ajuste de la ecuación a los datos experimentales (pocillos totales y con crecimiento del total de bandejas y diluciones utilizados) realizado por la aplicación Solver de Excel:

$$\sum_{i=1}^k \frac{v_i d_i p_i}{1 - e^{-v_i d_i \text{NMP}}} - \sum_{i=1}^k v_i d_i n = 0 \quad \text{Ecuación 29}$$

Las referencias utilizadas son las mismas mencionadas para la ecuación anterior.

Por último en las columnas nueve, diez y once corresponden al ajuste de la ecuación Weibull. Para esto, luego de aplicar la ecuación mencionada en el **apartado 1.5.2.3.1** de la introducción y al obtener los valores **n** y **b** en base a los valores reales, se procedió a asignar valores de tiempo dentro del intervalo de los días de muestro a manera de obtener la mayor cantidad de puntos posibles y poder obtener una mejor representación de la curva a partir del ajuste.

3.13. CÁLCULOS MATEMÁTICOS

Para todos los cálculos matemáticos se utilizó la planilla Excel (Microsoft Office 2007). También para realizar comparaciones (t-student o One Way ANOVA) y gráficos se utilizó el programa Sigma Plot 11.0. Copyright© 2008. Systat Software, Inc.

3.14. REFERENCIAS

Para el procesamiento de las bibliografías, se utilizó el programa EndNote X4.0.2 (Bld 5149). Copyright© 1988-2010 Thomson Reuters.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA GENERAL PARA MEDIR LA CAPACIDAD DE AUTODEPURACIÓN DE CUALQUIER TIPO DE AGUA

4.1.1. Análisis de la precisión de los resultados de los métodos Chromocult y Colilert en el recuento de *E. coli*

Como hemos avanzado en la introducción, la normativa aplicable a la reutilización de aguas residuales (12) fija los principios en los que se deben basar los métodos experimentales de análisis aplicados a las muestras de agua. En el caso del recuento de células viables de *E. coli* se especifica que el método debe detectar “bacterias *E. coli* beta-glucuronidasa positivas”. Existen en el mercado varios medios de cultivo y kits comerciales basados en la detección de esta actividad enzimática. Una primera selección, basada en criterios de sencillez y facilidad de uso, ya que el método debería poder ser realizado en los laboratorios de la propia planta de tratamiento, evitando el traslado de muestras, dio como resultado la elección para estudios posteriores de los métodos Chromocult y Colilert. Ambos métodos comerciales están basados en la detección colorimétrica debido a la acción catalítica de las enzimas que se pretenden detectar, pero la gran diferencia entre ellos es que el Chromocult se realiza por siembra en placa y el Colilert se basa en el crecimiento en pocillos rellenos con medio líquido. Se ha especulado con la posibilidad de que la recuperación de células potencialmente estresadas sería más fácil en medio líquido que en medio sólido. Si esta hipótesis fuera cierta, los recuentos en Colilert deberían ser más altos que los obtenidos con Chromocult. Para comprobar esta hipótesis se realizaron ensayos en el laboratorio de recuentos de diversas suspensiones de la cepa J08 de *E. coli* utilizando simultáneamente ambos métodos.

Se utilizaron como matrices agua destilada, aguas residuales tratadas o aguas fecales sin tratar, inoculadas con cultivos puros de *E. coli* J08, o mezclados con otras bacterias fecales. Algunos problemas fueron detectados aunque minoritarios. En bandejas Colilert inoculadas con una suspensión de un cultivo puro de *E. coli* apareció algún pocillo negativo para la beta-galactosidasa y positivo para la beta-glucuronidasa, cuando deberían ser positivos los dos ya que la especie posee ambas actividades. Además, cuando se emplearon aguas residuales con poblaciones microbianas naturales, el color indicativo de la actividad beta-galactosidasa desapareció en algunos casos en pocas horas,

mucho más rápidamente que cuando la matriz era agua destilada e incluso antes de cumplirse el tiempo de incubación prescrito en el método. Esto nunca ocurrió con la beta-glucuronidasa, cuyo indicador mantuvo siempre la fluorescencia durante el tiempo descrito en el método. Se tomó nota de estas anomalías excepcionales pero sus causas no fueron investigadas ya que implicaban una desviación de la línea principal de investigación.

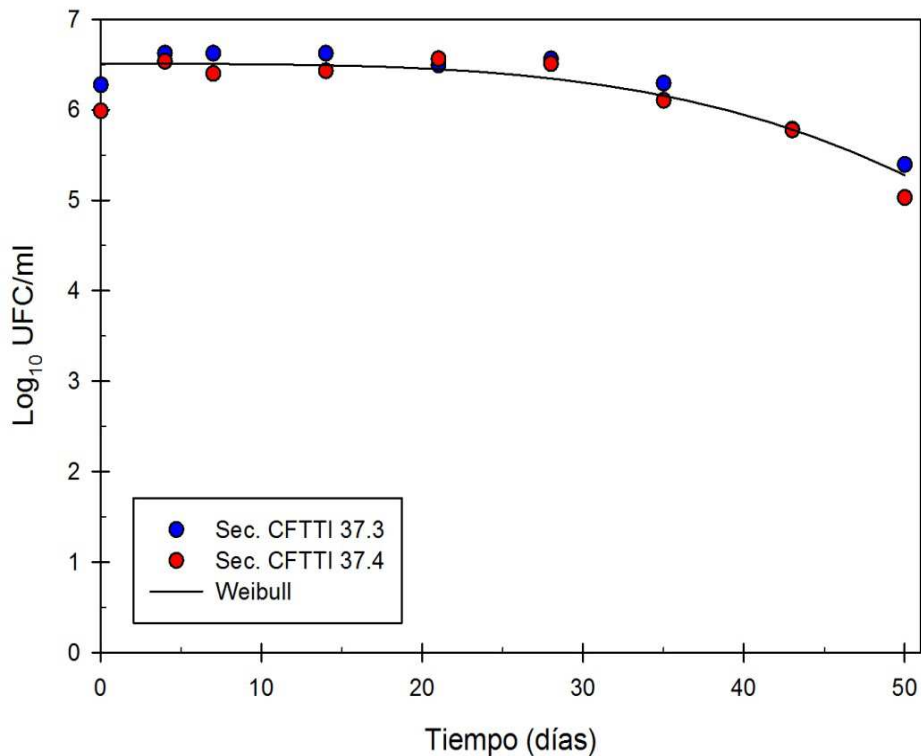


Fig. 4.1- Recuentos en una misma suspensión en agua de *E. coli* J08, utilizando el método Chromocult (círculos rojos) y Colilert (círculos azules).

En general pudimos concluir que ambos métodos daban resultados iguales, sin diferencias que fueran estadísticamente significativas como muestra la **Fig. 4.1**, que presenta los resultados de un ensayo representativo. Por tanto, desde el punto de vista de la recuperación ambos métodos eran equivalentes. Sin embargo existía una diferencia bastante relevante entre ambos métodos, que era el cálculo de la incertidumbre asociada al análisis. En el caso del método Chromocult la incertidumbre se calculaba directamente a partir de los recuentos en placa mientras que el Colilert se basa en una estimación del Número Más Probable (NMP) cuya incertidumbre se calcula de forma

completamente diferente y presentaba posibilidades de poder ser mejorada alterando el número de bandejas propuestas en el método comercial. Por ello, ya que el aumento en la precisión del método de recuento era uno de los objetivos específicos del proyecto, se decidió seleccionar este método y diseñar un nuevo protocolo que hiciera disminuir, si fuera posible la incertidumbre asociada al recuento. Este proceso es el que se describe en el apartado siguiente.

4.1.2. Desarrollo de una metodología específica para el cálculo de la incertidumbre asociada al recuento de *E. coli* por el método Colilert

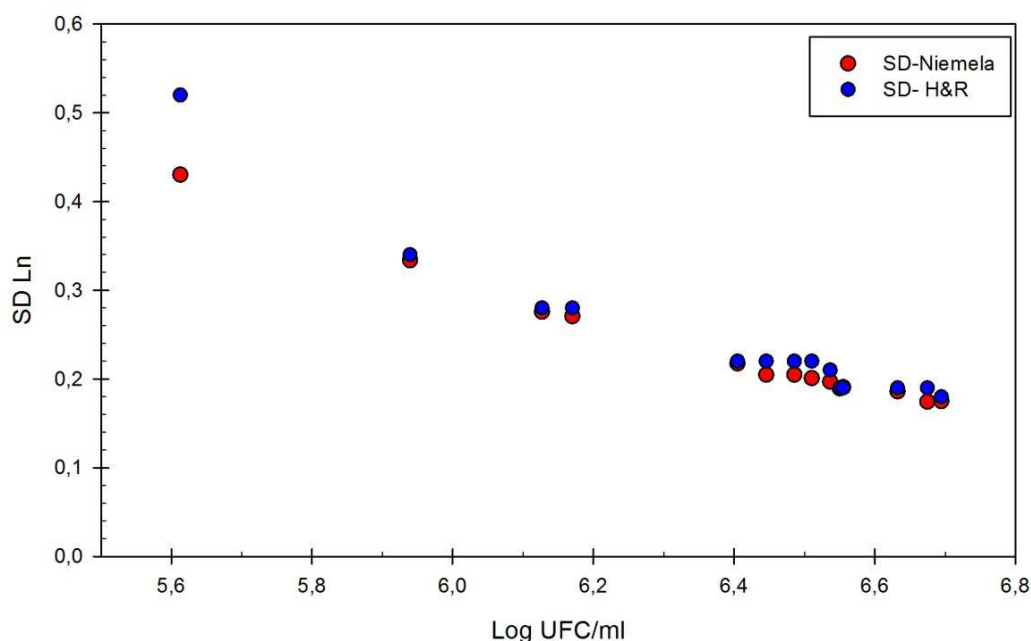


Fig. 4.2- Comparación del error estándar calculada por medio de Niemelä (77) en color rojo y Hurley & Roscoe (75) en color azul, entre diluciones sencillas iguales y utilizando bandejas de QT 200 y 2000.

El método Colilert tiene una página web en la red en la que se introducen los datos de crecimiento obtenidos tras la inoculación de una bandeja, sea para 200 o para 2000, y el programa asociado calcula el NMP y los límites de confianza superior e inferior del 95% del NMP. La normativa exige calcular la incertidumbre, es decir el error estándar. Según Niemelä (77), partir de los límites del 95% se puede calcular el error estándar dividiendo entre 4 el intervalo contenido entre los logaritmos de dichos límites. Esta fórmula se basa

en que se asume que la distribución de los logaritmos se aproxima a una distribución normal y por tanto la distancia entre la media y cada límite del 95% es igual a 1,96 por el error estándar. Sin embargo existe una fórmula más general, descrita por Hurley y Roscoe en 1983 que permite calcular el error estándar utilizando un conjunto de datos procedentes de varias diluciones diferentes y con volúmenes de ensayo también distintos (75).

Tiempo	Dilución	Pocillos (+)	Bandeja	Inoc. Inicial (NMP/mL)	Conc. Final (UFC/mL)	(H&R)
0	1E-05	13/0	2000	14,8	1,48E+06	0,28
	1E-05	20	200	25,4	2,54E+06	0,22
	1E-05	13/0	2000	14,8	1,10E+06	0,22
	1E-05	20	200	25,4		
4	1E-05	28/5	2000	47,3	4,73E+06	0,19
	1E-06	6	200	6,3	6,30E+06	0,50
	1E-05	29	200	42,9	4,29E+06	0,19
	1E-06	6	200	6,3	4,20E+06	0,19
	1E-05	29	200	42,9		
	1E-06	6	200	6,3	5,22E+06	0,19
	1E-05	28/5	2000	47,3		
	1E-05	29	200	42,9	4,20E+06	0,13
1E-05	28/5	2000	47,3			
7	1E-05	31/2	2000	49,5	4,95E+06	0,18
	1E-06	5	200	5,3	5,30E+06	0,63
	1E-05	23	200	30,6	3,06E+06	0,22
	1E-06	5	200	5,3	3,12E+06	0,20
	1E-05	23	200	30,6		
	1E-06	5	200	5,3	3,11E+06	0,20
	1E-05	31/2	2000	49,5		
	1E-05	23	200	30,6	4,20E+06	0,13
1E-05	31/2	2000	49,5			
14	1E-05	23/4	2000	35,5	3,55E+06	0,19
	1E-06	1	200	1	1,00E+06	1,17
	1E-05	29	200	42,9	4,29E+06	0,19
	1E-06	1	200	1	4,20E+06	0,18
	1E-05	29	200	42,9		
	1E-06	1	200	1	4,20E+06	0,18
	1E-05	23/4	2000	35,5		
	1E-05	29	200	42,9	4,20E+06	0,13
1E-05	23/4	2000	35,5			

Tiempo	Dilución	Pocillos (+)	Bandeja	Inoc. Inicial (NMP/mL)	Conc. Final (UFC/mL)	(H&R)
21	1E-05	21/1	2000	27,9	2,79E+06	0,22
	1E-06	2	200	2	2,00E+06	0,98
	1E-05	25	200	34,4	3,44E+06	0,21
	1E-06	2	200	2	3,12E+06	0,20
	1E-05	25	200	34,4	3,12E+06	0,20
	1E-06	2	200	2	3,12E+06	0,20
	1E-05	21/1	2000	27,9	3,12E+06	0,20
	1E-05	25	200	34,4	3,12E+06	0,15
28	1E-05	24/3	2000	35,9	3,59E+06	0,19
	1E-06	2	200	2	2,00E+06	0,98
	1E-05	24	200	32,4	3,24E+06	0,22
	1E-06	2	200	2	2,86E+06	0,20
	1E-05	24	200	32,4	2,86E+06	0,20
	1E-06	2	200	2	2,86E+06	0,20
	1E-05	24/3	2000	35,9	2,86E+06	0,20
	1E-05	24	200	32,4	3,64E+06	0,14
35	1E-05	24/3	2000	35,9	3,64E+06	0,14
	1E-05	11/1	2000	13,4	1,34E+06	0,28
	1E-06	2	200	2	2,00E+06	0,98
	1E-05	20	200	25,4	2,54E+06	0,22
	1E-06	2	200	2	2,60E+06	0,21
	1E-05	20	200	25,4	2,60E+06	0,21
	1E-06	2	200	2	2,60E+06	0,21
	1E-05	11/1	2000	13,4	2,60E+06	0,21
43	1E-05	20	200	25,4	1,80E+06	0,18
	1E-05	11/1	2000	13,4	1,80E+06	0,18
	1E-05	4/0	2000	4,1	4,10E+05	0,52
	1E-05	8	200	8,7	8,70E+05	0,34
50	1E-05	4/0	2000	4,1	6,07E+05	0,30
	1E-05	4/0	2000	4,1	4,10E+05	0,52
	1E-05	1	200	1	1,00E+05	1,00
	1E-04	18	200	22,2	2,22E+05	0,24
	1E-05	1	200	1	2,08E+05	0,23
	1E-04	18	200	22,2	2,44E+05	0,22
	1E-04	18	200	22,2	2,44E+05	0,22
	1E-05	4/0	2000	4,1	2,60E+05	0,44
50	1E-05	1	200	1	2,60E+05	0,44
	1E-05	4/0	2000	4,1	2,60E+05	0,44

Tabla 4.1- Variación del SE en función de la dilución adecuada y calculada mediante la ecuación de Hurley and Roscoe (H&R) (75).

Está fórmula permitía utilizar por tanto varias bandejas simultáneamente y pensamos que al aumentar el número de datos podríamos conseguir una disminución del error estándar. Realizamos el experimento utilizando al mismo tiempo bandejas para 200 y 2000 y comparando los resultados del análisis conjunto con los obtenidos por el cálculo de Niemelä con bandejas individuales. La comparación de la incertidumbre de bandejas individuales se muestra en la **Fig. 4.2** y las correspondientes a todos los cálculos, que incluye la utilización combinada de bandejas de 200 y 2000 en la **Tabla 4.1**

Mediante este experimento se pudo comprobar que no existe una diferencia significativa ($P=0,59$) al comparar los valores de ambas formas de calcular el error estándar en bandejas individuales. Solo en el caso de una concentración de 5,6 UFC/ml se pudo apreciar una pequeña diferencia. Sin embargo el uso conjunto de los tipos de bandejas si hizo bajar la incertidumbre si se utilizaban las diluciones adecuadas.

4.1.3. Análisis de la estabilidad de las propiedades de la cepa de *E. coli* utilizada en los ensayos

Una de las fuentes de variación en los resultados de las cinéticas de inactivación de *E. coli* que dificulta su comparación, es la cepa bacteriana utilizada para realizarlos. Está ampliamente asumido que no se deben utilizar cepas de laboratorio, ya que suelen ser menos resistentes que las cepas autóctonas. Por esa razón se decidió desde el principio de este trabajo utilizar una cepa aislada de una de las depuradoras que hemos estudiado en este trabajo (*E. coli* J08). Sin embargo también se ha especulado que la cepa autóctona, conservada en una colección de laboratorio, podría ir perdiendo las propiedades que la tornan más resistente a la inactivación.

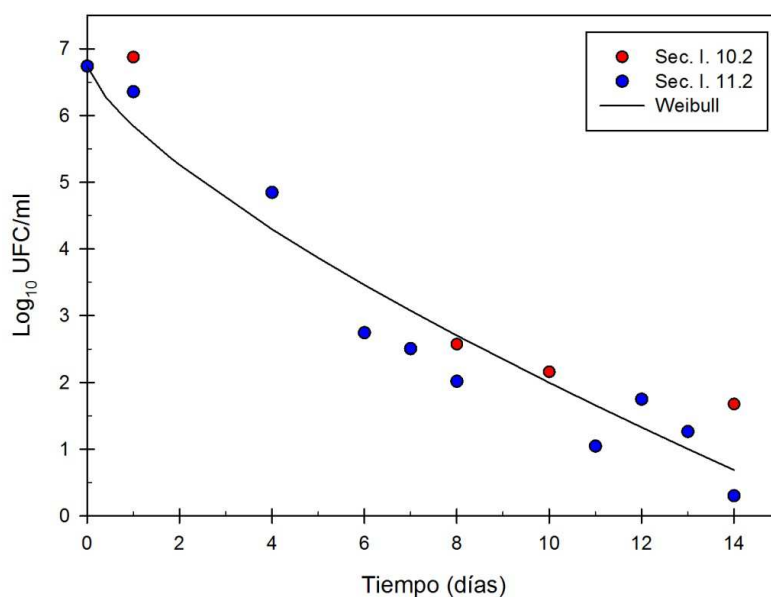


Fig 4.3- Efecto del mantenimiento de la cepa de *E. coli* J08 en cultivos inclinados a 4°C, sobre su resistencia a la inactivación. Cepa mantenida en el laboratorio durante un mes (*E. coli* J08), círculos rojos. Cepa recién aislada de un efluente (*E. coli* J09), círculos azules.

Para descartar esta hipótesis, una muestra del efluente secundario Sec. I. 10.2 fue inoculada con la cepa *E. coli* J08, conservada en un cultivo inclinado y mantenida en cámara fría a 4°C y en oscuridad y paralelamente con otra cepa *E. coli* J09, recién aislada del mismo efluente. Los resultados muestran en la **Fig. 4.3** la similitud de cinéticas que pueden observarse demostró que la capacidad de supervivencia no era afectada por el almacenamiento en medio de mantenimiento en las condiciones descritas, al menos durante un mes.

Debe ser citado que, aunque no se realizaron más experimentos de laboratorio para analizar sistemáticamente la estabilidad de las propiedades de la cepa, ésta ha sido mantenida en las mismas condiciones durante los cuatro años de la tesis y nunca hemos observado comportamientos que pudieran ser atribuidos a cambios en su capacidad de resistencia a los factores inactivantes. Por ello la cepa *E. coli* J08, ha sido utilizada a lo largo de todo el estudio, mantenida en la colección del laboratorio en las condiciones descritas en Material y Métodos.

4.1.4. Análisis de la estabilidad de los mecanismos inactivantes del agua y de la influencia de los factores ambientales (estación del año y radiación solar)

Otra fuente de variación importante en las cinéticas de inactivación, que ha sido descrita previamente, es el estado del efluente que podría verse afectado por su almacenamiento en laboratorio, incluso a temperaturas bajas. Para evaluar este efecto, una alícuota de un efluente fue inoculada y su cinética de autodepuración seguida durante un mes. Otra alícuota fue mantenida en el laboratorio durante 16 días en el laboratorio a 4°C y, transcurrido ese tiempo, fue inoculado y medida su cinética de autodepuración también durante un mes. La **Fig. 4.4** presenta las cinéticas observadas en ambos casos, siendo el tiempo cero para ambos el tiempo en que cada uno de los efluentes fue inoculado. Como se puede observar en la figura, las cinéticas observadas fueron muy semejantes, lo que indican que las propiedades inactivantes del efluente no se alteraban de forma significativa tras dos semanas de almacenamiento.

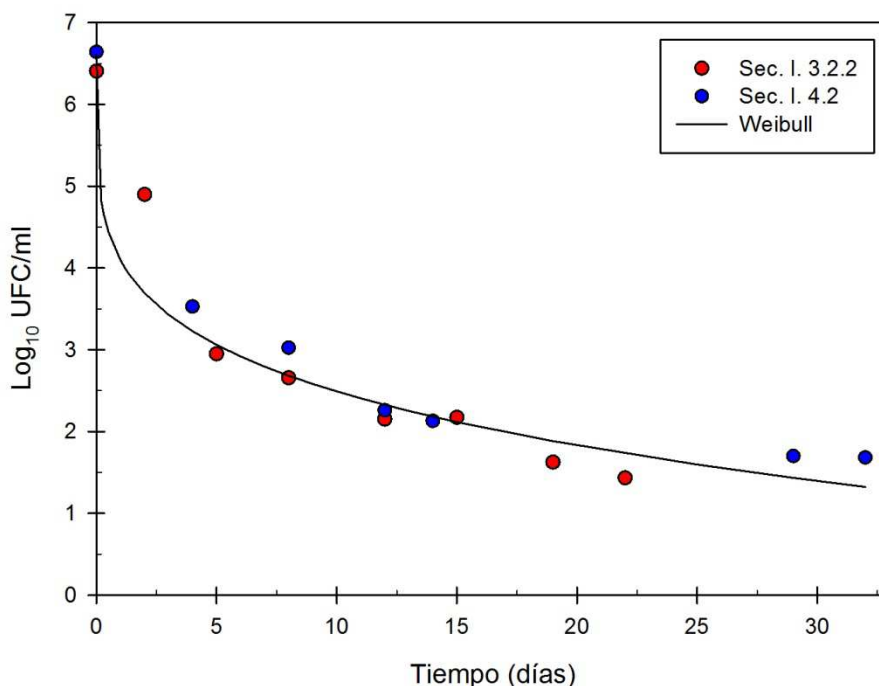


Fig. 4.4. Comparación del efecto del tiempo de almacenamiento en el laboratorio (16 días a 4°C) del efluente secundario, sobre su capacidad de autodepuración. Efluente recién llegado al laboratorio, círculos rojos. Efluente mantenido 16 días a 4°C, círculos azules.

Estos resultados tuvieron una gran relevancia práctica y facilitaron mucho el trabajo en el laboratorio puesto que demostraron que el efluente se podía transportar desde la EDAR sin refrigeración y sin urgencia, ya que sus características, en lo que se refiere a los procesos de autodepuración, no se veían afectadas por el mantenimiento a temperatura ambiente durante al menos 16 días.

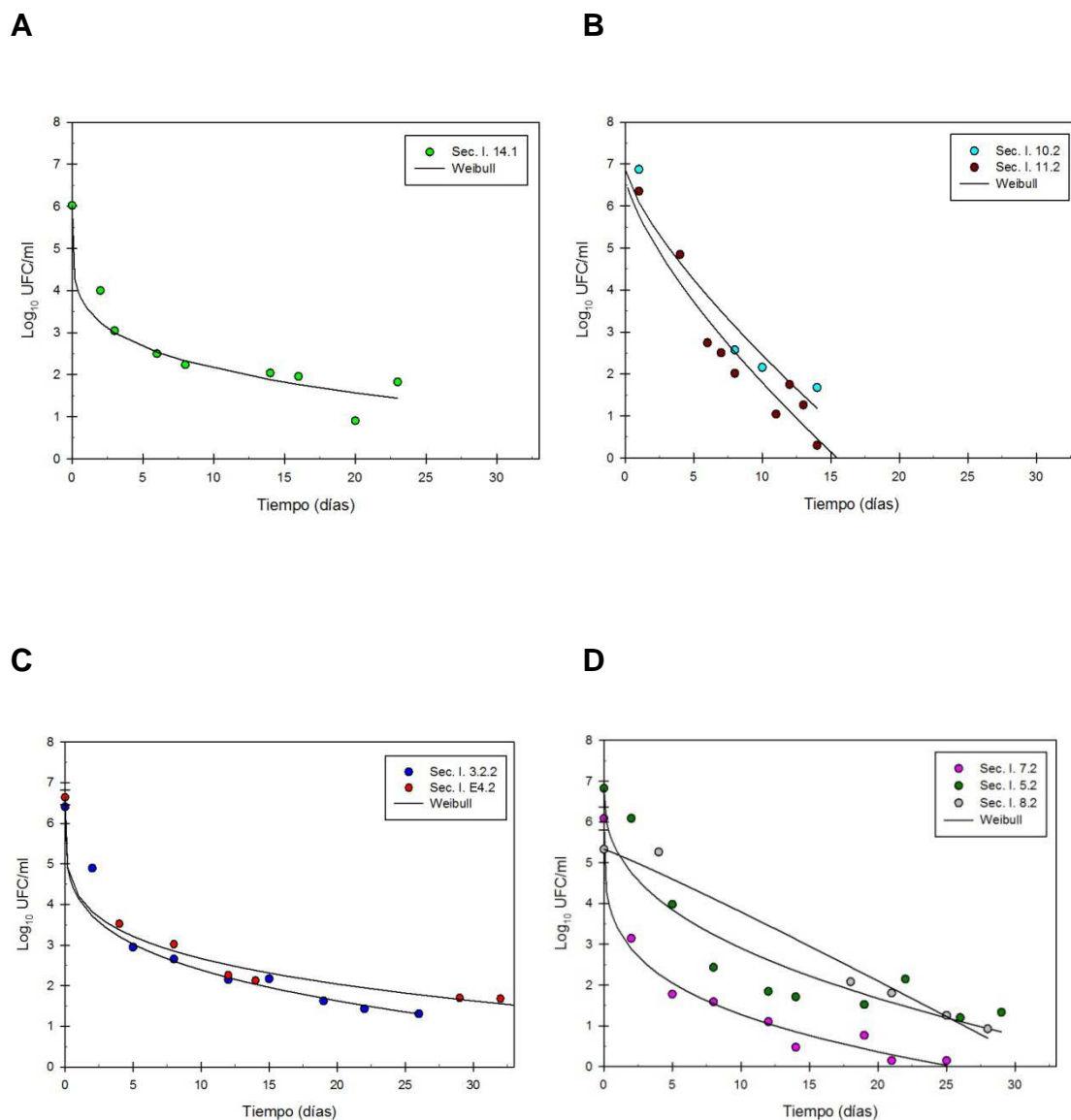


Fig.4.5- Comparación de las cinéticas de inactivación de *E. coli* J08 en efluentes secundarios de diferentes depuradoras, durante diferentes estaciones del año: primavera (A), verano (B), otoño (C) e invierno (D).

Por otra parte es también conocido que las características generales de los efluentes de depuradoras son afectadas por la época del año en que son recolectados. Estas variaciones afectan, por ejemplo al estado de depuración en que salen del tratamiento secundario, que suele ser medido por su DQO y la DBO5. Para evaluar esta influencia en las **Figs. 4.5 (A, B, C y D)** hemos reunido datos sobre las cinéticas de inactivación de efluentes secundarios de dos depuradoras diferentes a lo largo de las cuatro estaciones del año, así como los correspondientes valores medios de sus respectivos DBO y DQO. Efectivamente, aunque hay un patrón general de curva cóncava en todas las estaciones, pueden observarse diferencias cualitativas en cuanto a las tasas de inactivación observadas. Sin embargo parece haber correlación entre estas diferencias cinéticas y los valores de DBO5 sobre todo en verano.

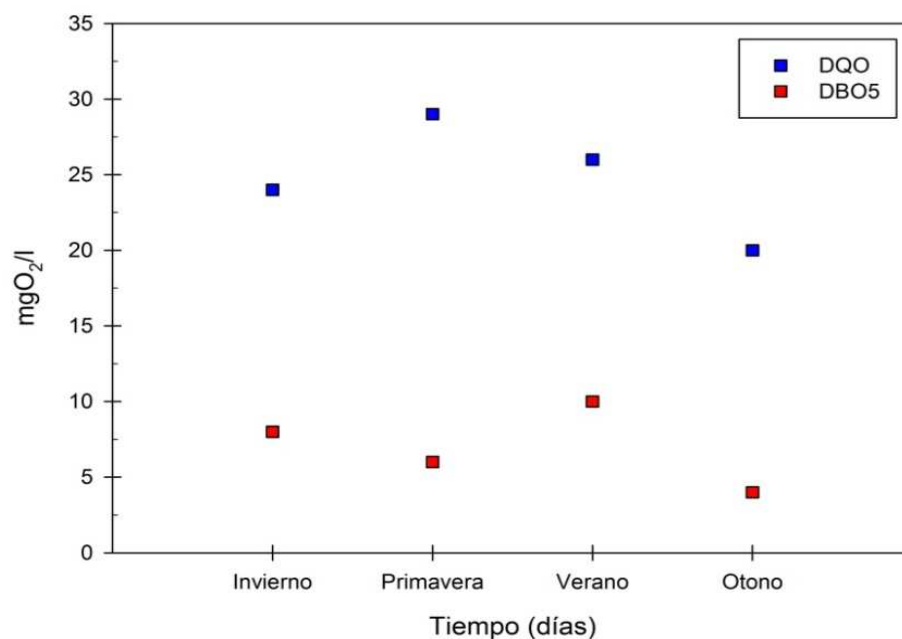


Fig.4.6- Comparación de la variación de los valores de la DQO y DBO5, de algunas muestras analizadas durante las diferentes estaciones del año.

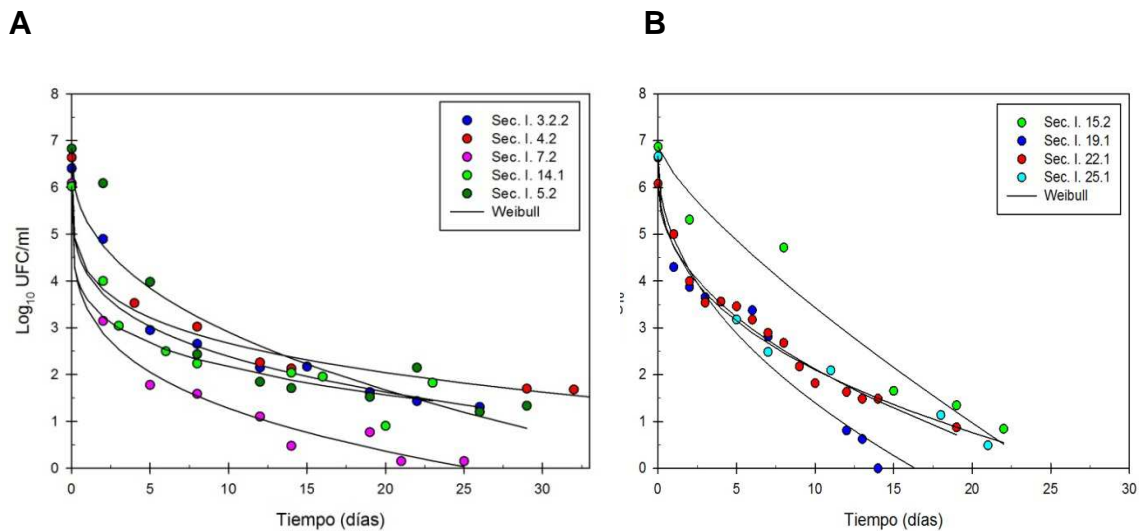


Fig.4.7- Efecto de la radiación solar sobre las cinéticas de inactivación. En ausencia de luz solar (A) y en presencia de luz (B).

La luz, como era de esperar tuvo un efecto moderadamente positivo, acelerando la cinética de inactivación y fue un factor tenido en cuenta cuando se analizaron los mecanismos subyacentes a los procesos de inactivación como veremos más adelante. Con estos experimentos dimos por terminada la primera fase de la tesis, que tenía por objetivo el diseño de una metodología específica para medir la cinética de inactivación. El análisis de los resultados obtenidos y descritos más arriba nos llevaron a diseñar el método que se ha descrito explícita en la sección de Material y Métodos.

4.2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MODELO MATEMÁTICO QUE PERMITA DESCRIBIR Y CUANTIFICAR LA INACTIVACIÓN DE *E. coli* EN DIVERSOS TIPOS DE AGUAS

4.2.1. Análisis de la diversidad de cinéticas de inactivación encontradas en diferentes tipos de aguas

Uno de los problemas previamente identificados en la revisión bibliográfica de esta tesis fue la diversidad de cinéticas de inactivación encontradas en los diferentes tipos de aguas ensayadas en los diversos trabajos analizados, que eran descritas con diferentes modelos de muy diversa formulación matemática como ya hemos apuntado en la introducción. Era previsible que tal diversidad cinética se debiera fundamentalmente a las características inactivantes de las aguas, y no a los diferentes métodos analíticos empleados para cuantificarlas.

Para comprobar esta hipótesis se estudió la inactivación en diversos tipos de aguas, incluyendo efluentes de varias depuradoras, agua de estanque y agua destilada, con un único método analítico, cuya gestación hemos descrito en el apartado anterior. Los resultados se muestran en las **Figs. 4.8, 4.9, 4.10 y 4.11**.

Como se puede observar, las cinéticas obtenidas con los efluentes corresponden en términos generales a las previamente publicadas: Curvas cóncavas en las que a un periodo corto (inferior a una semana) con una tasa de inactivación rápida sucede un periodo largo, de varias semanas, con una tasa de inactivación lenta, que llegado a un valor mínimo, puede mantenerse muchas durante semanas. La concavidad era también observable en la cinética correspondiente al agua del estanque y se convertía en convexidad en el agua destilada, pero solo tras muchos días de incubación. Los resultados obtenidos con el agua destilada fueron sorprendentes, porque no estábamos esperando que la viabilidad de la población inoculada se mantuviera intacta durante tantos días. Quizá por una cierta tendencia antropocéntrica, creíamos que, igual que el hombre se muere de hambre, las bacterias también morirían en la ausencia de nutrientes, pero no fue el caso. Las bacterias, en agua destilada, parecían comportarse como meros sacos de enzimas, inertes, sin poder realizar su metabolismo y crecer, pero también sin morir. Pensamos que el proceso de muerte podría tener también una naturaleza metabólica y necesitar energía para su desarrollo. Para comprobar esta hipótesis incubamos agua destilada a la que se había adicionado glucosa como fuente de energía, pero que seguía desprovista de fuente de nitrógeno y del resto de los nutrientes necesarios para el crecimiento. Los resultados de este experimento se muestran en la **Fig. 4.11**, que describe la cinética de inactivación en una suspensión bacteriana en condiciones de desacoplamiento energético: con catabolismo pero sin anabolismo.

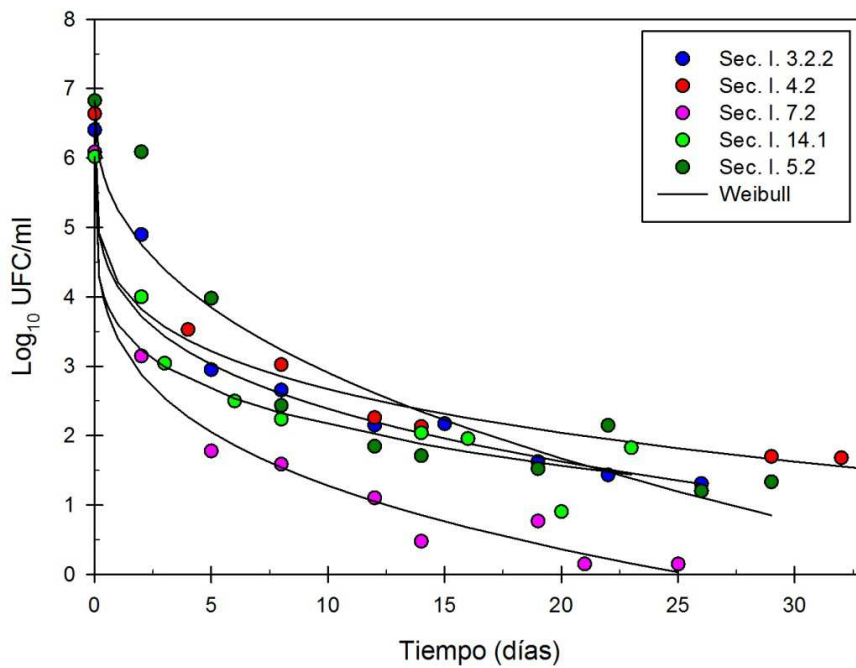


Fig.4.8- Cinética de inactivación observada en muestras de efluentes secundarios de diferentes depuradoras inoculadas con *E. coli* J08.

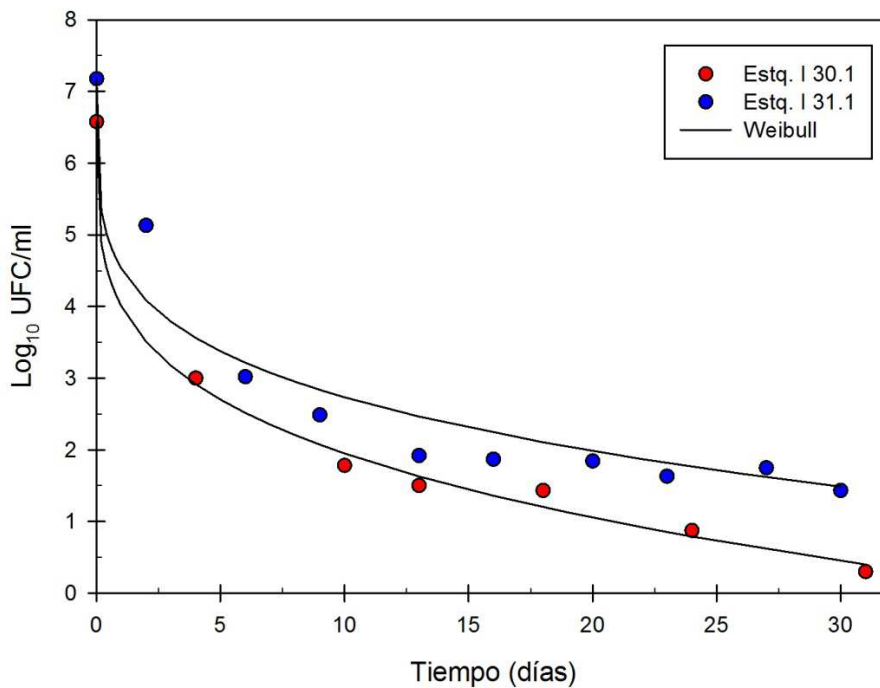


Fig. 4.9- Cinética de inactivación observada en muestras de estanques inoculadas con *E. coli* J08.

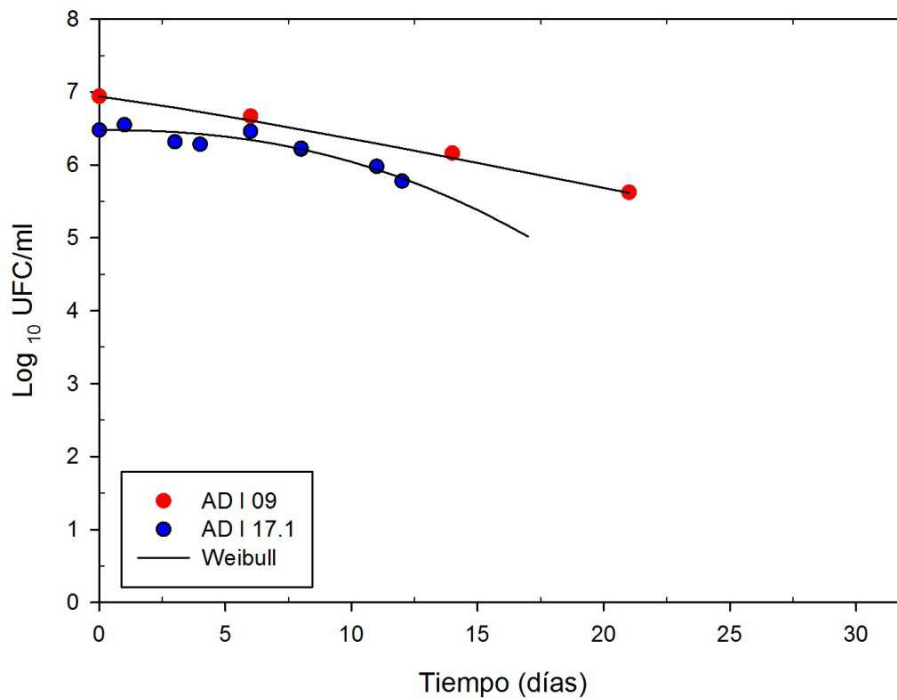


Fig. 4.10- Cinética de inactivación observada en muestras de agua destilada sin tratamiento térmico inoculadas con *E. coli* J08.

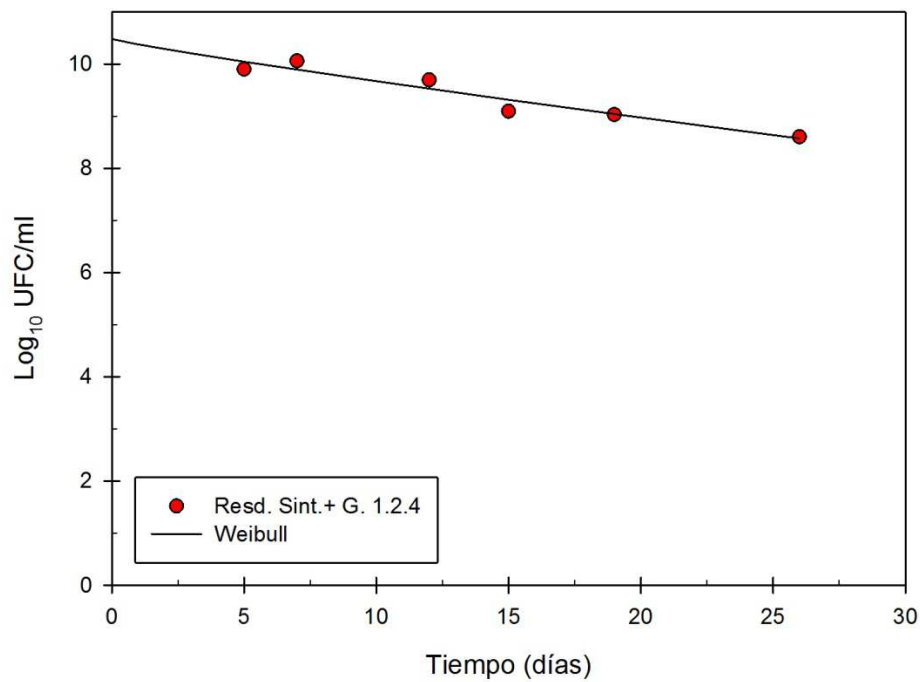


Fig. 4.11- Cinética de inactivación observada en muestras de agua residual sintéticas más glucosa e inoculadas con *E. coli* J08.

A pesar de la diversidad de formas geométricas que se podían observar en los distintos tipos de agua inoculadas, que iban desde las curvas muy cóncavas hasta las rectas horizontales, pasando por rectas con una pendiente lineal, que se pueden observar en las **Figs. 4.8 al 11**, había un patrón emergente que podría relacionar todas las formas. Las curvas cóncavas se observaban en aguas residuales y efluentes de tratamientos secundarios. Esa curvatura cóncava se perdía a medida que el agua procedía de ambientes más limpios, como el agua de estanque y desaparecía por completo en agua completamente limpia como el agua destilada. Un conjunto de curvas semejante había sido previamente observado en experimentos de inactivación térmica de diferentes microorganismos. Los trabajos de Peleg y otros autores, que hemos descrito en la introducción, habían permitido seleccionar una ecuación única, basada en la distribución estadística de Weibull, que describía todas las cinéticas de muerte térmica ensayadas. Este modelo matemático cumple, al menos parcialmente, una de las condiciones que deseábamos para nuestro modelo: que fuera lo más mecanístico posible, es decir que su estructura estuviera basada en la inactivación y sus parámetros estuvieran relacionados con los mecanismos biológicos subyacentes al proceso. La base biológica del modelo reside en varias premisas: 1) La inactivación celular, que hace perder a la célula su capacidad de reproducirse, es el resultado de un proceso a través el cual la célula va perdiendo su capacidad para ir superando los problemas bioquímicos y estructurales que le impone cualquier tipo de estrés, 2) Se asume también que la población es heterogénea, es decir, que cada célula desarrolla ese proceso de forma individual durante un tiempo propio para cada célula., 3) Si la población es suficientemente grande, de forma que la distribución de los tiempos de inactivación de cada célula puede ser descrita por una función continua, entonces la curva de inactivación de la población con el tiempo puede ser descrita por la distribución estadística. Como ya hemos descrito en la introducción, una de las formas de la ecuación de Weibull, que hemos empleado en este trabajo es:

$$N = N_0 + \exp(-B \cdot t^n)$$

La transformación logarítmica lineariza la ecuación

$$\text{Log } N = \text{Log } N_0 - b * t^n$$

en la que **b** = B/ln10. Es una ecuación muy simple, con solo dos parámetros, **b**, el coeficiente de localización y **n**, el coeficiente de forma, porque su valor determina la forma de la curva de inactivación. La curva de la representación logarítmica es convexa cuando **n** es mayor que 1 y presenta un aspecto cóncavo cuando **n** es menor que 1. Cuando **n** es igual a 1, la ecuación de Weibull se transforma en una ecuación exponencial negativa que describe una cinética de inactivación de primer orden, el modelo más popular y extendido para describir la cinética de la inactivación microbiana. Por tanto, la cinética de inactivación exponencial puede ser considerada un caso especial de la ecuación de Weibull, que es más general.

Pero además, como ya hemos avanzado, los valores de los coeficientes de esta ecuación, que determinan la distribución estadística subyacente, pueden relacionarse con la sensibilidad individual de cada célula a los mecanismos de inactivación. Cuando **n** es menor que 1, se asume que hay muchas células de la población sensibles al factor inactivante, lo que provoca una rápida tasa inicial de inactivación. A medida que las células sensibles van desapareciendo, quedan las más resistentes y la tasa de inactivación va disminuyendo, lo que determina la forma cóncava de la curva. Por el contrario, si **n** es mayor que 1, eso implica que la mayoría de las células resisten inicialmente los efectos de los agentes inactivantes, pero van acumulando los daños producidos; transcurrido un tiempo, esta acumulación provoca que todas las células dañadas mueran rápidamente, lo que determina la convexidad de la curva en estas condiciones.

Nos pareció que la misma ecuación podía ser usada para describir la cinética de inactivación en los distintos tipos de aguas inoculadas y para ello ajustamos la ecuación de Weibull a los puntos experimentales de todos los experimentos de inactivación realizadas hasta ese momento. Para el ajuste ese empleó la aplicación Solver de Excel, como se ha descrito en Material y Métodos. Las curvas resultantes están representadas con trazo continuo en todas las figuras. El análisis biométrico de la bondad del ajuste está resumido en la **Tabla 4.1**

Código	Ecuación	SCD Ln	Sesgo	Exactitud	Figura N°
Ter. Micr. I. 6.1.2	Log N = 6,45 - 0,26 t^{0,90}	0,01	0,99	1,08	4.19
Ter. Osm. I. 6.2.4	Log N = 6,14 - 0,72 t^{0,15}	4E-06	1,00	1,02	4.20
Sec. I. 3.2.2	Log N = 6,40 - 2,26 t^{0,25}	1,9	1,2	1,17	4.8
Sec. I. 3.2.3	Log N = 6,46 - 0,38 t^{0,79}	0,01	1,01	1,10	4.9
Sec. I. 4.2	Log N = 6,46 - 0,38 t^{0,21}	2E-05	1,00	1,06	4.8
Sec. I. 5.2	Log N = 6,83 - 1,58 t^{0,40}	0,01	1,01	1,26	4.8
Sec. CFI 5.3	Log N = 6,71 - 0,58 t^{0,72}	0,72	1,09	1,35	4.20
Sec. I. 7.2	Log N = 6,09 - 2,69 t^{0,25}	0,81	1,11	1,50	4.13
Sec. CFI 7.3	Log N = 6,12 - 1,50 t^{0,37}	0,30	0,95	1,23	4.13
Sec. CFTTI 7.4	Log N = 6,18 - 0,08 t^{1,05}	0,02	1,00	1,06	4.13
Sec. I. 10.2	Log N = 6,87 - 0,78 t^{0,75}	0,02	1,04	1,22	4.5B
Sec. I. 11.2	Log N = 6,74 - 0,96 t^{0,71}	0,02	0,99	1,28	4.5B
Sec. CFTTI 12.4	Log N = 8,75 - 2,02 t^{0,30}	0,001	1,00	1,09	4.15
Sec. CFTTI 13.1	Log N = 6,87 - 0,23 t^{0,18}	1E-07	1,00	1,01	4.14
Sec. FBFI 13.2	Log N = 6,87 - 0,65 t^{0,57}	1,97	0,88	1,29	4.14
Sec. I. 14.1	Log N = 6,02 - 2,42 t^{0,20}	0,16	0,96	1,09	4.8
Sec. I. 15.2	Log N = 6,87 - 0,63 t^{0,74}	0,0004	1,00	1,13	4.7B
Sec. I. 19.1	Log N = 6,64 - 1,74 t^{0,48}	0,003	1,01	1,13	4.7B
Sec. I. 22.1	Log N = 6,08 - 1,33 t^{0,47}	0,002	1,00	1,08	4.7B
Sec. I. 25.1	Log N = 6,67 - 1,94 t^{0,37}	0,02	1,02	1,10	4.7B
AD I. 09	Log N = 6,94 - 0,05 t^{1,11}	0,0003	1,00	1,20	4.10
AD I. 17.1	Log N = 6,48 - 0,002 t^{2,28}	0,0002	1,00	1,01	4.10
AD TTI 20.2	Log N = 6,63 - 5,7 E⁻⁶ t^{2,25}	0,01	0,99	1,02	4.12A
Sec. CFTTI 25.3	Log N = 6,52 - 7,6 E⁻⁶ t^{3,71}	0,0002	1,00	1,05	4.24
ADTTI 29.1	Log N = 7,61 - 1,04 t^{0,12}	1E-06	1,00	1,02	4.25
Estq. I 30.1	Log N = 6,58 - 2,57 t^{0,26}	0,02	1,02	1,10	4.9
Estq. I 31.1	Log N = 7,18 - 2,65 t^{0,23}	0,005	1,01	1,20	4.9
ADTTI 33	Log N = 6,54 - 0 t 0,04	0,003	0,99	1,01	4.28
Estq. I 34	Log N = 6,30 - 0,96 t^{0,52}	0,006	1,02	1,13	4.29
Sec. CFI 36	Log N = 5,84 - 0,92 t^{0,51}	0,001	1,01	1,10	4.30

Tabla 4.2- Evaluación de la bondad de ajuste del modelo matemático empleado.

La exactitud del modelo fue analizada por el método de McClure (51) que consiste en cuantificar la exactitud en base a la suma de los cuadrados de las diferencias del logaritmo natural (SCDLn) de los valores observados y esperados. Cuando se obtiene de esta diferencia un valor pequeño indica un modelo que en promedio predice mejor la respuesta observada. Otro método para cuantificar la exactitud de los modelos matemáticos es el cálculo de los factores de sesgo y exactitud, realizado según se explica en Materiales y Métodos. Este análisis, mostrado en la **Tabla 4.2**, nos permitió concluir que ambos factores varían en los diferentes tipos de aguas, pero, salvo en algunos pocos casos concretos, están siempre muy cercanos a 1, que sería el valor que se obtendría si el ajuste fuera perfecto. Ambos métodos de cuantificación de la exactitud demostraban que el modelo de Weibull era un modelo matemático aceptable y general para describir las cinéticas de inactivación de *E. coli* en agua medida con la metodología desarrollada en la primera parte de este trabajo.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS POTENCIALES DE INACTIVACIÓN DE *E. coli* EN LAS AGUAS RESIDUALES TRATADAS

4.3.1. Efecto de la suspensión en agua destilada sobre la viabilidad de *E. coli*

Los primeros experimentos en agua destilada, realizados para tener una visión general de las diferentes cinéticas que se podían observar según el tipo de agua inoculada habían mostrado una supervivencia de las bacterias muy superior a la que habíamos esperado en un principio. Para confirmar y profundizar el análisis de estos resultados se realizaron nuevos experimentos incorporando una nueva matriz: agua residual sintética, con una composición empleada previamente en otros muchos ensayos publicados y que está descrita en Materiales y Métodos. De esta forma pretendíamos averiguar la influencia potencial que los componentes químicos del agua residual podían tener en la inactivación. Si estos compuestos químicos no afectaban la supervivencia bacteriana, las propiedades inactivantes de esta agua residual

sintética deberían ser muy similares a las del agua destilada. Esto fue lo que ocurrió, como se puede observar en las **Figs. 4.12 A y B**.

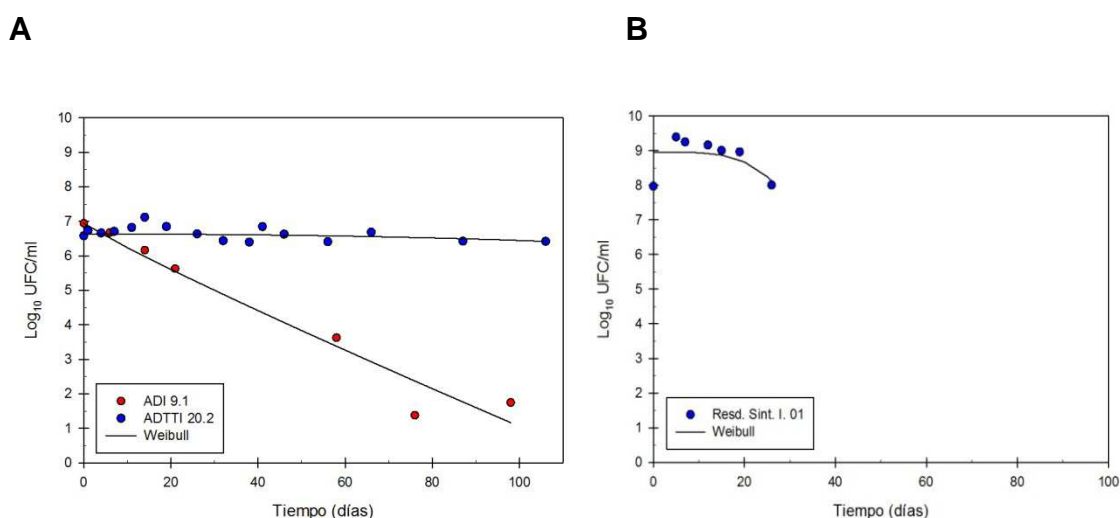


Fig. 4.12- Comparación de las cinéticas de inactivación de *E. coli* J08 en muestras de H₂O destilada (A) los de color azul corresponden a una muestra con tratamiento térmico (TT) y las de color rojo sin TT. El gráfico B corresponde a un agua residual sintética.

Estos resultados mostraron la gran capacidad de supervivencia de *E. coli* en aguas limpias ya que las células mantenían su viabilidad durante más de tres meses en agua destilada y durante un mes, por lo menos, en agua residual sintética. Quedaba demostrada la falsedad de la hipótesis, que ya habíamos puesto en duda en los experimentos preliminares con agua, que postulaba que las células de *E. coli* podrían morir de hambre, por la ausencia de nutrientes en aguas limpias en un plazo de tiempo relativamente breve. Esta idea, de raíz antropocéntrica, pues postula para los microorganismos un comportamiento fisiológico semejante al animal, tuvo que ser desechada tras obtener los resultados anteriores. Por otra parte, tampoco podía decirse que la suspensión en agua limpia no tuviera ningún efecto sobre las células, puesto que al cabo de un largo tiempo de incubación, se podía observar cierta pérdida de viabilidad, pero se trataba de un efecto a largo plazo que solo provocaba la inactivación de una pequeña parte de la población después de muchas semanas manteniendo la viabilidad original. Este resultado y la conclusión a que da lugar, es decir, la prácticamente nula capacidad de autodepuración que tienen las aguas limpias, tienen importantes consecuencias prácticas, como por

ejemplo el diseño de sistemas de rellenado de acuíferos que discutiremos en la sección correspondiente de esta memoria.

4.3.2. Efecto de microbiota presente en el efluente y eliminable por filtración en el laboratorio

La comparación de las cinéticas de inactivación de *E. coli* resuspendida en agua destilada y en diversos tipos de efluentes era una confirmación más de un hecho bien conocido: la presencia en los efluentes de factores inactivantes que son los que les confieren su capacidad de autodepuración. Una revisión de los potenciales agentes inactivantes fue realizada en la Introducción de esta memoria. Para iniciar el estudio de la identificación de los factores reales que son responsables de las inactivaciones observadas, iniciamos una serie de experimentos que permitieran diferenciar algunos de ellos. Por otra parte, y dada la necesidad de relacionar nuestros resultados y utilizar las conclusiones obtenidas con el reciclado de aguas residuales tratadas, diseñamos estos experimentos de forma que pudieran ser relacionados con los tratamientos terciarios que se realizan en las estaciones depuradoras. Por ello seleccionamos dos tratamientos en el laboratorio que mimetizaban sendos tratamientos terciarios en una EDAR: 1) La filtración del efluente a través de filtros de 0,22 micrómetros de diámetro de poro, que tendría un efecto semejante a la microfiltración en una EDAR, y 2) un tratamiento térmico que eliminaría los agentes inactivantes termosensibles y que, realizado tras la filtración tendría un efecto tan completo en la eliminación de agentes inactivantes como la osmosis inversa realizada en una EDAR.

La filtración a través de filtros Millipore (0,22 μm) debería eliminar toda la microbiota, aunque posteriormente comprobamos con citometría de flujo y microscopia de fluorescencia que pasaban el filtro bacterias que tienen un tamaño menor a 0,1 como otros habían visto anteriormente (70). En realidad retuvo protozoos y bacterias grandes aunque no los bacteriófagos, ni las macromoléculas tóxicas. Cuando el efluente filtrado fue inoculado y se midió la inactivación a lo largo del tiempo, se pudo observar (**Fig. 4.13**) que parte de la capacidad inactivante se había perdido, pero solo parcialmente, de forma que se podía observar todavía una cinética de inactivación, relativamente

rápida, que tenía que ser debida a la acción de agentes inactivantes que habían permeado a través del filtro.

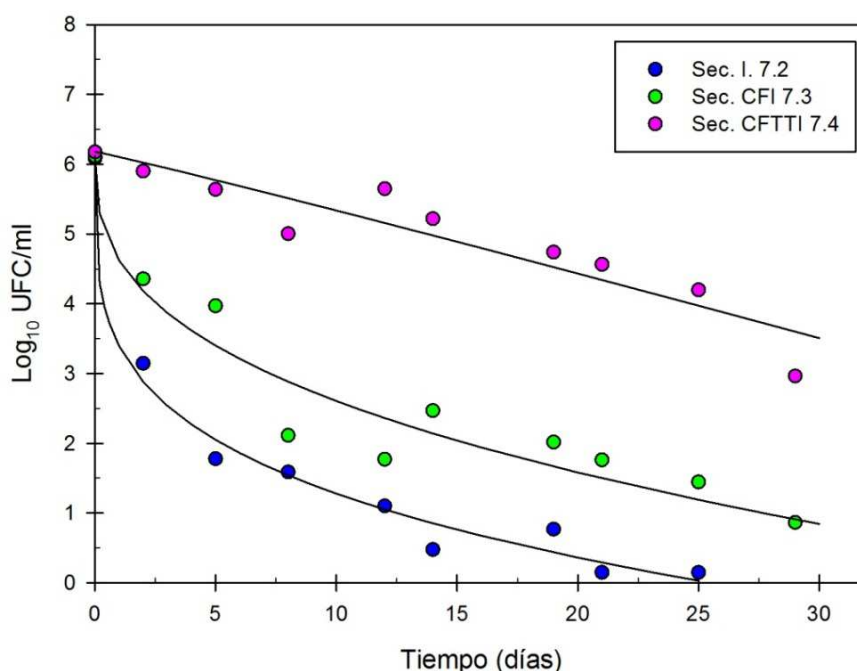


Fig. 4.13- Efecto de la microbiota presente y eliminable por filtración en el laboratorio en diferentes estaciones y de la eliminación por tratamiento térmico de los componentes termosensibles. Los puntos de color azul corresponden a un efluente secundario sin tratamiento inoculado con *E. coli* J08; los de color verde a uno centrifugado y filtrado y los de color rosa a un efluente centrifugado, filtrado y con tratamiento térmico.

Además, como se puede observar, tras la eliminación de la microbiota filtrable, la cinética seguía siendo del mismo tipo, cóncava, con un coeficiente de Weibull menor que 1, aunque los valores paramétricos habían cambiado, de manera que tras 30 días de incubación la contaminación tenía el mismo nivel (10 cél/mL) que se había alcanzado a los 10 días con el efluente completo. La composición de la microbiota presente no pudo ser estimada de forma cuantitativa. Observamos al microscopio que se trataba de una mezcla de protozoos y bacterias que no fueron identificados. Por ello, a este conjunto de microorganismos no identificados que quedaban retenidos en la superficie del filtro le damos el nombre de fase biótica no filtrable, para distinguirla de otros componentes de la microbiota total, bacterias muy pequeñas, que no sedimentaban en la centrifugación y atravesaban el filtro de 0,22 micrómetros de diámetro de poro, y que tuvimos ocasión de detectar posteriormente en los

experimentos de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Para comprobar que esta microbiota no filtrable afectaba realmente a la población de *E. coli* inoculada en el efluente se realizaron dos tipos de experimentos. En el primero, se filtró e inactivó térmicamente un efluente secundario. La microbiota que quedó retenida en la superficie del filtro se volvió a reinocular en el filtrado para observar si se recuperaba la capacidad de inactivación, utilizando como control otra alícuota del filtrado sin adición de la fase biótica retenida en el filtro. Ambas alícuotas fueron inoculadas con la bacteria y se siguió su cinética de inactivación a lo largo del tiempo.

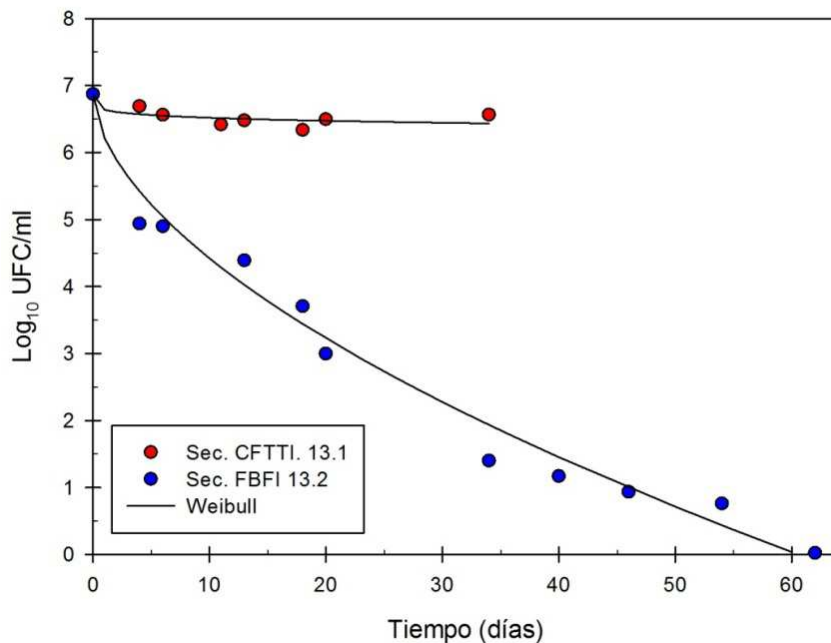


Fig. 4.14- Efecto de la adición de la fase biótica de un efluente secundario retenida en el filtro al efluente filtrado (azul). Como control se utilizó otra alícuota del mismo filtrado a la que no se añadió la microbiota retenida en el filtro (rojo).

Los resultados de este experimento se muestran en la **Fig. 4.14**, donde se puede observar que la adición de la fase biótica recuperó la capacidad inactivante que había perdido por completo con los tratamientos realizados al efluente, como muestra el control.

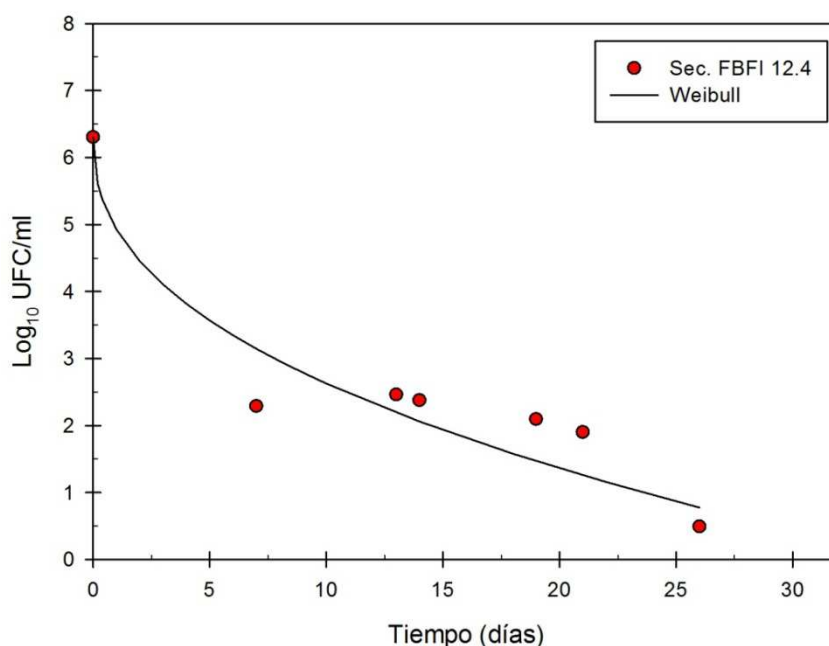


Fig.4.15- Cinética de inactivación de *E. coli* en un efluente secundario filtrado y con tratamiento térmico (sin capacidad inactivante) reinoculado con su propia microbiota no filtrable crecida en un medio de cultivo para protozoos para aumentar la cantidad de microorganismos.

El segundo experimento consistió en cultivar la fase biótica retenida en el filtro en un medio de cultivo para protozoos para aumentar su número. Este cultivo no axénico, puesto que contenía también el resto de la microbiota no filtrable, fue inoculado en un efluente al que se le había eliminado su capacidad inactivante por los tratamientos ya citados (filtración y tratamiento térmico). Como era de esperar, y se puede observar en la **Fig. 4.15**, tras la inoculación del cultivo de protozoos el efluente recuperó su capacidad inactivante pero además mostró que esta capacidad era proporcional a la biomasa presente ya que se observó una cinética más rápida en el efluente inoculado con la microbiota crecida en medio para protozoos (**Fig. 4.15**) que la que se observó cuando se reinoculaba simplemente con la retenida en el filtro, es decir, con la microbiota presente en el efluente en el momento de la filtración (**Fig.4.14**). Quedaba por tanto comprobado que la microbiota no filtrable presente en el efluente participaba de forma significativa en la autodepuración.

Para profundizar en el análisis y cuantificar el aporte de la microbiota al proceso de autodepuración a lo largo del tiempo, calculamos la tasa específica

de inactivación, estimada como la pendiente de la curva de inactivación obtenida a partir de la ecuación de Weibull.

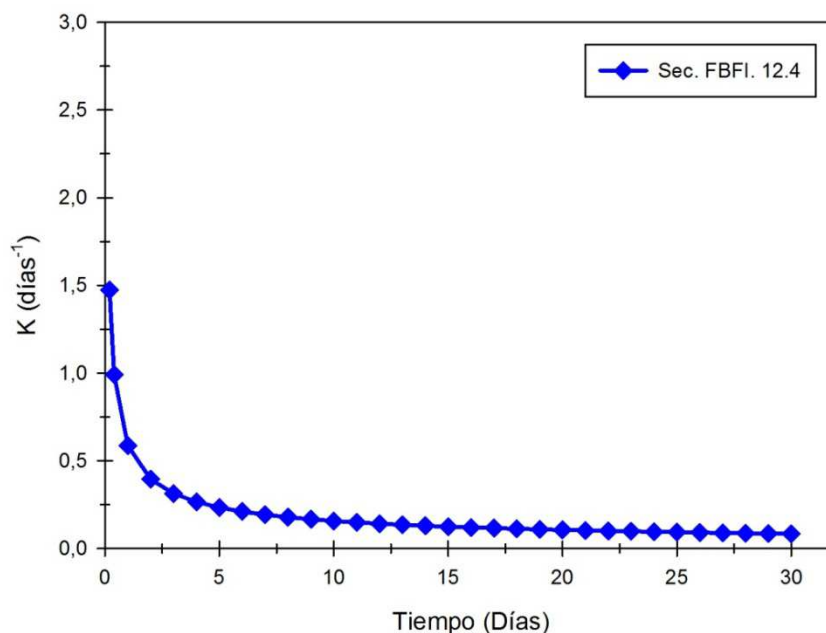


Fig.4.16- Tasa específica de inactivación (bacterias inactivadas por día y por bacteria presente), k (días⁻¹) provocada por un cultivo de protozoos en un efluente centrifugado, filtrado e inoculado con *E. coli*.

Los resultados se muestran en la **Fig. 4.16**. La tasa de inactivación es significativa en la primera semana aunque con valores decrecientes. A los 10 días ha alcanzado un valor mínimo que se mantiene aproximadamente constante, aunque con un continuo y pequeño decrecimiento. Es decir, la aportación de la microbiota al proceso de autodepuración se realiza fundamentalmente en la primera semana de incubación tras la inoculación de las bacterias, cuando su concentración es alta y superior a las 1000 bacterias por mL. A concentraciones más bajas, la aportación de la microbiota a la autodepuración es poco significativa.

4.3.3. Efecto de los componentes termosensibles

El tratamiento por calor se realizó calentando la muestra de efluente centrifugado y filtrado en un baño maría con agua hirviendo durante 5 minutos, según se describe en Materiales y Métodos. La cinética de inactivación muestra las grandes diferencias observadas en relación al efluente intacto y al centrifugado y filtrado (**Fig. 4.13**). No solo había desaparecido gran parte de la

capacidad de autodepuración, sino que la cinética convexa indicaba que el mecanismo o la causa de la pequeña inactivación que todavía podía observarse eran diferentes de los mecanismos que actuaban en el efluente centrifugado y filtrado. Esta cinética era muy semejante, cinética convexa, a la observada cuando se resuspendían las bacterias en agua destilada o en agua residual sintética (ver **Fig. 4.12**), aunque en este caso el efecto fuera más rápido. Estaba claro que el pequeño efecto inactivador del agua destilada y el, un poco mayor del agua residual sintética solo podían deberse a factores celulares endógenos, que desencadenasen la muerte celular por acumulación de errores metabólicos que podíamos agrupar bajo el nombre genérico de envejecimiento celular. Por ello, al comparar la cinética de inactivación en efluente centrifugado, filtrado y tratado térmicamente con la obtenida en agua destilada, concluimos que el tratamiento térmico eliminaba el resto de los factores exógenos que existían en el efluente y que determinaban las cinéticas cóncavas. La inactivación que ocurría en este efluente tratado debía ser semejante a la que ocurría en el agua destilada. El efecto observado, en algunas ocasiones, de mayor rapidez en la inactivación (manteniendo siempre la forma convexa) se podía interpretar como debida al mantenimiento de factores estresantes que acelerarían el envejecimiento celular.

Por tanto, con los tratamientos de laboratorio conseguíamos eliminar prácticamente todos los factores exógenos que eran los causantes de la inactivación observada y podíamos intentar evaluar la contribución relativa de cada uno de ellos en nuestras condiciones experimentales. Para ello realizamos un experimento como el representado en la **Fig. 4.13** en el que un mismo efluente fue sometido a centrifugación y filtración y posteriormente a tratamiento térmico. Posteriormente, una alícuota del efluente completo, otra del centrifugado y filtrado y otra del tratado térmicamente fueron inoculadas con *E. coli* J08 y sus cinéticas de inactivación seguidas a lo largo del tiempo. Por último, a partir de las curvas de inactivación se calcularon las pendientes para estimar las tasas de inactivación. Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. 4.17** y como habíamos observado en experimentos anteriores, la tasa de inactivación era alta únicamente en la primera semana, tanto en el efluente completo como en el que había perdido la microbiota no filtrable. En esa primera semana el efecto inactivador del envejecimiento celular era prácticamente nulo, mientras tras quince días de incubación la mayor tasa de inactivación era debida al envejecimiento celular.

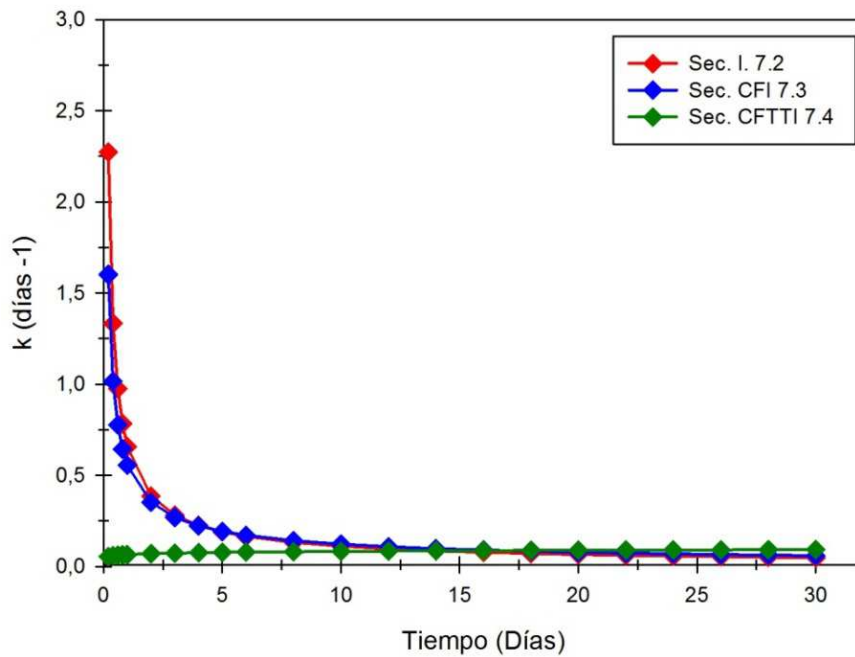


Fig. 4.17- Tasas específicas de inactivación (bacterias inactivadas por día y por bacteria presente) medidas en un efluente completo (línea roja), centrifugado y filtrado, es decir, sin microbiota no filtrable (línea azul) y centrifugado, filtrado y con tratamiento térmico (línea verde).

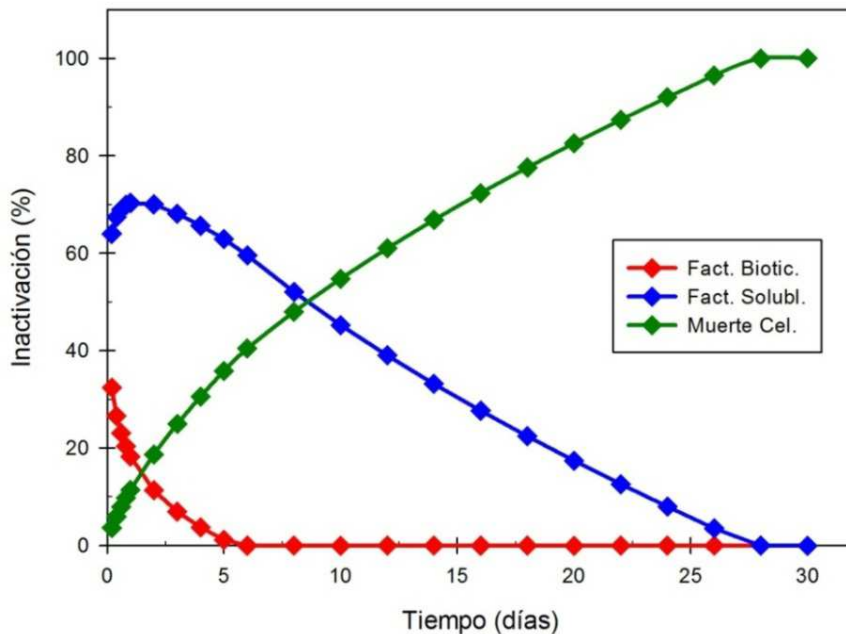


Fig. 4.18- Contribución relativa, expresada en porcentaje de la inactivación total, de los diferentes tipos de mecanismos al proceso de autodepuración. Factores bióticos no filtrables (rombos rojos). Factores solubles termosensibles (rombos azules). Muerte celular por envejecimiento (rombos verdes).

Para analizar mejor el efecto relativo de cada uno de los tipos de factores inactivantes, hemos representado en la **Fig. 4.18** las contribuciones relativas de cada uno de los factores a la tasa de inactivación total, calculadas a partir de los datos de la **Fig. 4.17**. La tasa debida a los factores bióticos no filtrables fue calculada restando a la tasa del efluente completo la suma de las tasas obtenidas en el centrifugado y filtrado y el tratado además térmicamente. De la observación conjunta de las **Figs. 4.17 y 4.18** se puede concluir que la inactivación tiene lugar sobre todo en la primera semana de incubación y es debida, sobre todo, a los factores que atraviesan el filtro (bióticos filtrables y termosensibles) que aportan un 64% de la inactivación aproximadamente. La microbiota no filtrable (presumiblemente protozoos) funciona solo en la primera semana y aporta un 32%. En esa primera semana el envejecimiento no tiene relevancia inactivadora (4%). En la semana siguiente, siguen actuando, cada vez con menor intensidad los factores bióticos filtrables y termosensibles y en la tercera semana el envejecimiento es el único proceso inactivante activo, pero a una tasa muy pequeña, diez veces menor que la que se obtiene inicialmente cuando los dos procesos anteriormente citados están activos.

4.3.4. Efecto de los tratamientos terciarios sobre la cinética de inactivación de *E. coli* J08

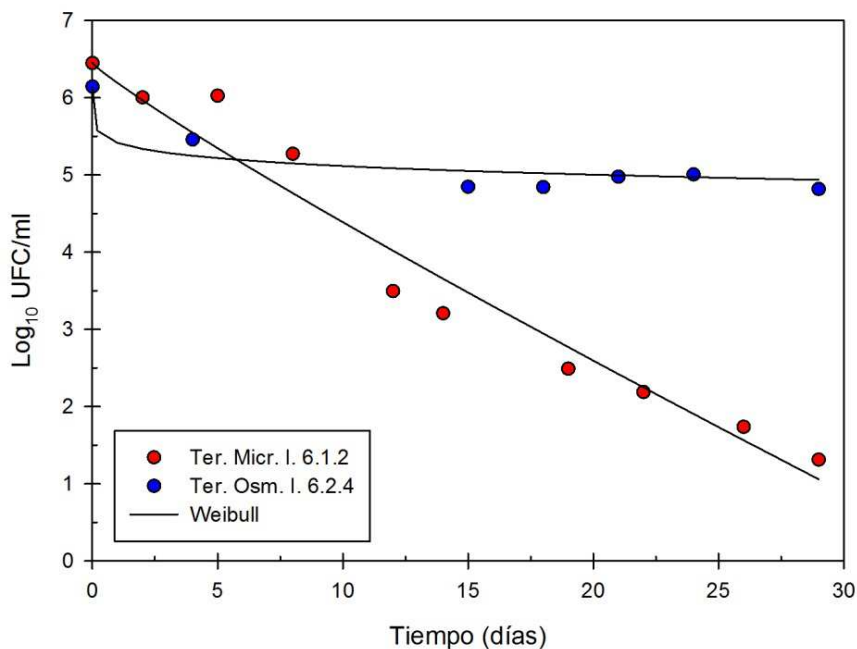


Fig. 4.19- Comparación de las cinéticas de inactivación de *E. coli* J08 en un efluente terciario con microfiltración (Ter. Micr. I. 6.1.2) y permeado de osmosis inversa (Ter. Osm. I. 6.2.4).

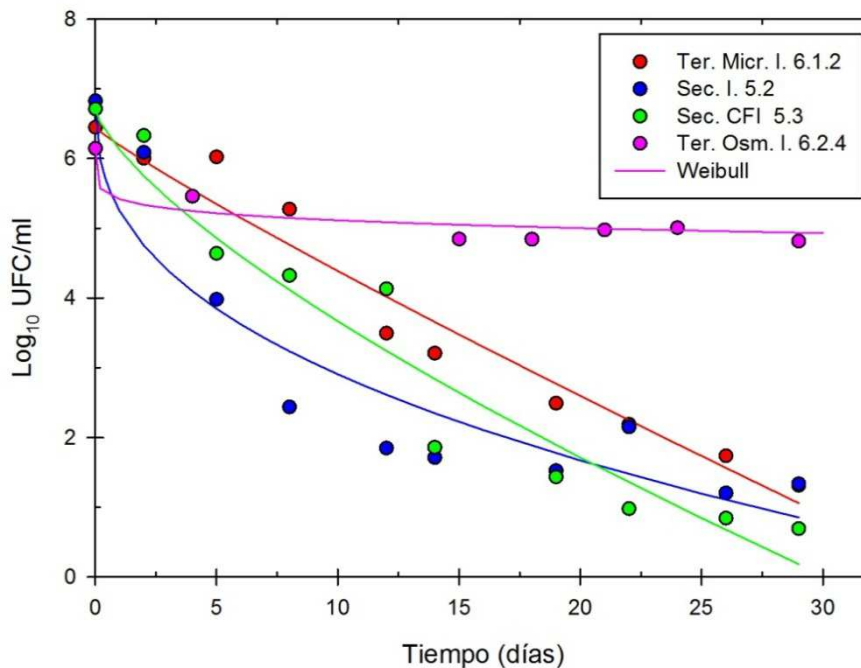


Fig. 4.20- Comparación de las cinéticas de inactivación de *E. coli* J08 entre un efluente terciario con microfiltración (Ter. Micr. I. 6.1.2), un efluente secundario inoculado (Sec. I. 5.2), un efluente secundario centrifugado y filtrado (Sec. CFI 5.3) y un efluente terciario con permeado de ósmosis inversa Ter. Osm. I. 6.2.4.

En la Fig. 4.19 puede observarse que los tratamientos terciarios hacen disminuir la capacidad de autodepuración de un efluente. Al comparar el efecto de dos tratamientos terciarios como microfiltración y ósmosis inversa se observa que presentan cinéticas muy diferentes, una vez finalizado el proceso de eliminación de los factores inactivantes presentes en los mismos. El de mayor eficacia para limpiar un efluente es el tratamiento por ósmosis inversa.

Nos pareció interesante comparar las diferentes cinéticas de inactivación que se obtenían en los efluentes con tratamientos terciarios con los que mostraban los de un efluente secundario, sometido a tratamientos equivalentes dentro del laboratorio. La microfiltración podría considerarse equivalente a nuestra centrifugación y filtración, mientras la ósmosis inversa fue comparada con el tratamiento completo (centrifugación/filtración/tratamiento térmico). Los resultados de esta comparación se muestran en la Fig. 4.20. Pudimos observar una vez más, que cuanto mayor es la eficacia en la limpieza de un efluente, mayor es la capacidad de supervivencia de *E. coli* J08, por haber desaparecido en gran parte la capacidad de autodepuración. Nos parece

importante resaltar este resultado, porque aunque a primera vista los tratamientos terciarios limpian el agua de bacterias de forma no selectiva y en ese sentido se pueden considerar positivos, tienen el inconveniente de disminuir su capacidad de autodepuración de potenciales patógenos que pudieran recontaminar el agua así depurada. Cuanto más limpia esté el agua, más indefensa estará frente a una posible recontaminación. Es un hecho que, como analizaremos más ampliamente en la Discusión, habrá que tener en cuenta en el análisis de riesgos de la reutilización del agua, especialmente en algunos usos como el rellenado de acuíferos en los que la recontaminación por filtración de fecales podría ocurrir.

4.4. OBSERVACIÓN DE LOS DAÑOS CELULARES INDUCIDOS DURANTE UN PROCESO DE AUTODEPURACIÓN

4.4.1. Microscopia de Fluorescencia

La cinética observada hasta ahora en todos los experimentos de la tesis se basaba en los datos de células viables, o más exactamente en la determinación de las unidades formadoras de colonias, estuvieran formada por una o más células. Como la transformación de las células viables en viables pero cultivables está bien documentada en aguas naturales, decidimos intentar cuantificar ese proceso comparando los datos de viabilidad a lo largo del tiempo con los obtenidos por el examen con microscopía de fluorescencia después de tratar las células con Ioduro de Propidio que solo penetra y tiñe las células que han perdido la integridad de su membrana celular. La metodología utilizada está descrita en Materiales y Métodos.

Un primer experimento consistió en inocular agua destilada, matriz en la que no debían existir agentes perturbadores del proceso de tinción, con *E. coli* J08 y seguir su evolución tanto por el recuento de viables por recuperación en placa como por microscopía de fluorescencia. El agua fue inoculada el 17-02-10, a partir de esa fecha se comenzó a realizar el recuento de viables la población inoculada. Al mismo tiempo se empezó a poner a punto la técnica del microscopio de fluorescencia para la cuantificación y caracterización de las bacterias por campo. Las primeras imágenes se tomaron el 09-03-10, y luego se realizó otra toma el 27-05-10. Los resultados, que se pueden observar en la

Fig. 4.21, mostraron que la técnica podía ser utilizada con resultados positivos mostrando con nitidez las diferencias entre las células ioduro de propidio positivas (fluorescencia roja) y las negativas marcadas con fluorescencia verde. Sin embargo, dada la elevada incertidumbre asociada a la técnica que implica elevadas diluciones y la observación de numerosos campos, no pudo establecerse una relación cuantitativa fiable entre la concentración de células viables medidas por recuento en placa y por recuento en los campos microscópicos de fluorescencia. A pesar de todo sí se podía establecer una relación cualitativa y el aumento de la población de no viables a lo largo del tiempo podía ser observado con ambos métodos. Y también podíamos concluir que la pérdida de la viabilidad se debía, en parte y probablemente en su mayor parte, a la muerte celular definida por la pérdida de la integridad de la membrana celular. La microscopía de fluorescencia nos permitió también realizar otras dos observaciones interesantes. Cuando el recuento de las células viables se encontraba por debajo de la unidad de la escala logarítmica, se procedió a seguir realizando observaciones de la alícuota al microscopio de fluorescencia. Esperábamos encontrar una gran mayoría de células ioduro de propidio positivas y alguna rara célula viva por campo. Como puede apreciarse en la imagen tomada el 02-06-10 mostrada en la **Fig. 4.22**, seguían observándose bastantes células viables, pero no cultivables, porque no aparecían en los recuentos realizados a través del medio de cultivo líquido de Colilert.

Además podía apreciarse claramente una modificación de la forma morfológica de las bacterias. Tanto en algunas células viables cultivables como las VNC, las bacterias sufrieron un alargamiento, probablemente como una consecuencia de la exposición prolongada al estrés provocado por la falta de nutrientes.

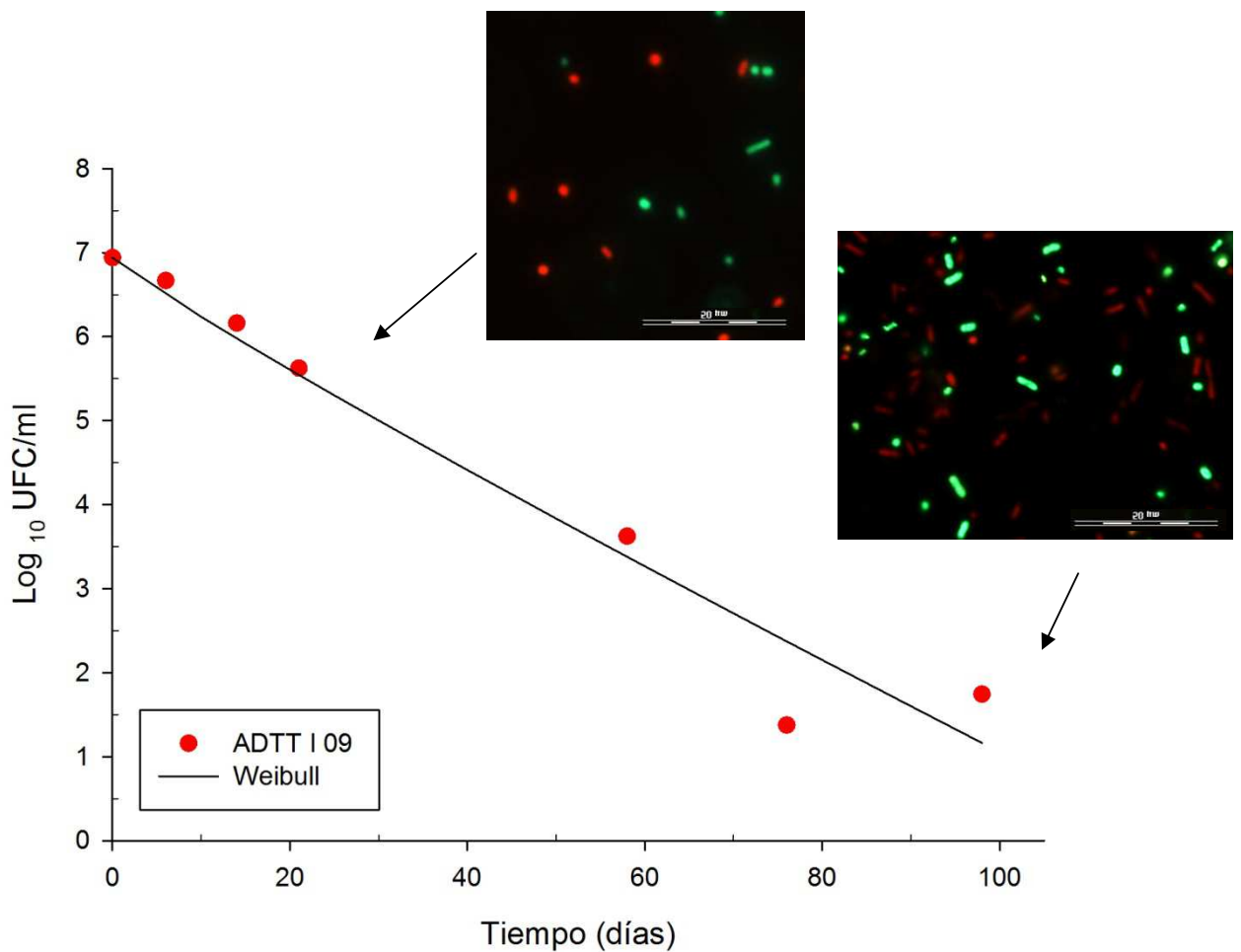


Fig. 4.21- Caracterización y comparación de la población de *E. coli* J08 inoculada en una muestra de agua destilada (ADTT I 09) e incubada por más de 90 días por recuento en placa (viabilidad, puntos rojos) y observación de la tinción con Ioduro de propidio con microscopia de fluorescencia (fotografías).

Aunque no se pudieron obtener datos cuantitativos con la fiabilidad suficiente, el aumento en la proporción de células ioduro de propidio positivas indica que la pérdida de viabilidad es debida a la aparición de daños celulares que acaban en la destrucción de la membrana celular.

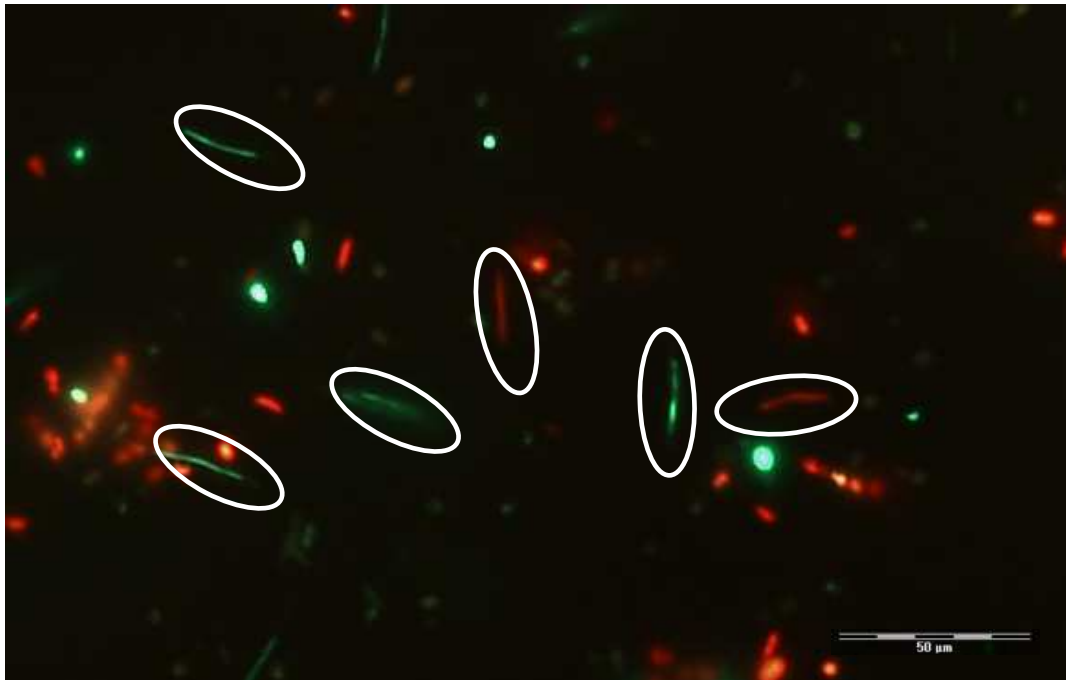


Fig. 4.22- Comparación de la variación morfológica de la población de *E. coli* J08 a los 108 días de incubación en una alícuota de agua destilada inoculada (ADTTI 09). Hay que resaltar que la población de viables por recuento era mucho menor que la observada en la fotografía.

Haciendo un seguimiento continuo en el caso de una alícuota de agua destilada a la cual se inoculó la cepa de *E. coli* J08, luego de 108 días de incubación se observó una variación muy notable de la morfología de las células. En la **Fig. 4.22** se puede ver en forma clara que algunas células presentaron un alargamiento muy notorio en comparación con las otras células de la misma cepa. Este alargamiento podría ser una consecuencia de una exposición muy prolongada a la falta de nutrientes o podría tratarse de un mecanismo de defensa contra algunos depredadores, de tal manera que al aumentar su tamaño les cuesta más ser consumidas por otros microorganismos. En la parte de la Discusión, se hará un análisis más detallado de las posibles causas y beneficios de este cambio en cuanto a sus características externas por parte de *E. coli*.

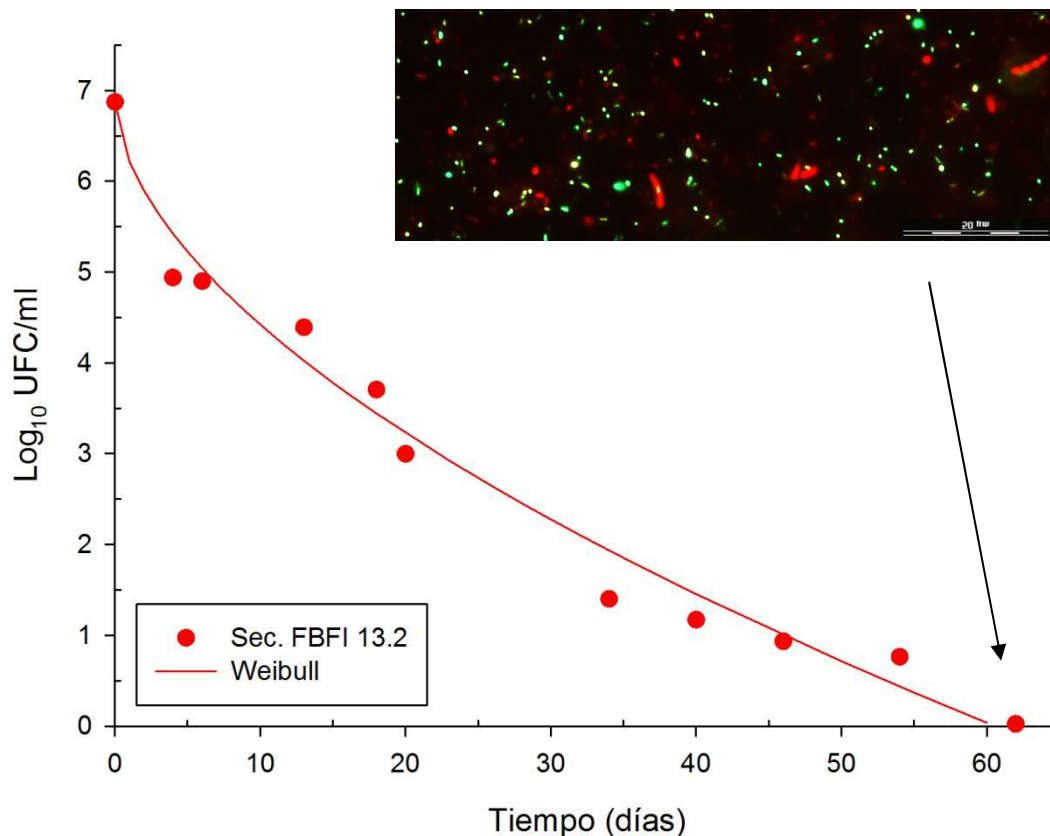


Fig. 4.23- Microfotografía de la población presente a los 62 días después de la incubación del efluente Sec. FBFI 13.2, cuando ya no quedan bacterias viables detectables, y reinoculada con la Fase Biótica Filtrable.

Sorprendentemente, como puede apreciarse en la imagen, se observaron varios tipos de bacterias, de diferentes formas y tamaños, a pesar de que en el recuento en Colilert, la concentración de las células viables fue igual a cero (marcado como tal en la escala logarítmica aunque sea matemáticamente incorrecto) para destacar que no solo la cinética predecía ausencia de viables sino que fue comprobada experimentalmente. Estas bacterias de menor tamaño no fueron posteriormente estudiadas.

4.4.2. Citometría de flujo

Los experimentos con citometría de flujo se realizaron con los mismos fluorógenos que ya habían demostrado su eficiencia en los estudios microscópicos previos. Se realizaron ensayos, según se describe en Materiales y Métodos, obteniendo muestras a lo largo de la curva de inactivación, de

diferentes tipos de aguas inoculadas. Como ya habíamos observado que había una gran población de bacterias de pequeño tamaño que atravesaban el filtro, los primeros experimentos se realizaron con Efluente centrifugado, filtrado y con tratamiento térmico. Los resultados se muestran en la **Fig. 4.24**. Como se puede observar en dicha figura que el citómetro detectó una gran masa de células muertas en la región correspondiente (R2) y solo unas pocas vivas (1,4%) entre las que habría que incluir las células de *E. coli* inoculadas. Lo que ocurrió tras la incubación es que las células de *E. coli* fueron muriendo, como demostró el recuento por Colilert y por ende en la curva de inactivación (ver **Fig. 4.24**). A pesar de esto el citómetro siguió detectando el crecimiento de las otras bacterias filtrables que al final del experimento, cuando apenas quedaban células de *E. coli* supervivientes, aportaban la totalidad de las células vivas detectadas por el citómetro como IP(-).

Podíamos concluir que la presencia de las bacterias filtrables era una interferencia que tornaba poco aconsejable continuar con los experimentos de citometría de flujo. Como control que eliminase esta interferencia, inoculamos *E. coli* en agua destilada, previamente sometida al mismo tratamiento térmico y a continuación medida por el citómetro para poder observar la evolución de la población. Eliminadas las células filtrables y por tanto la interferencia efectivamente pudimos comprobar que el citómetro era capaz de medir la muerte celular con resultados comparables a los que se obtenían con Colilert, por lo menos durante el período durante el cual se realizaron las mediciones (ver **Fig. 4.25**). El problema era que también se eliminaban los factores inactivantes, por lo que no continuamos con los experimentos citométricos.

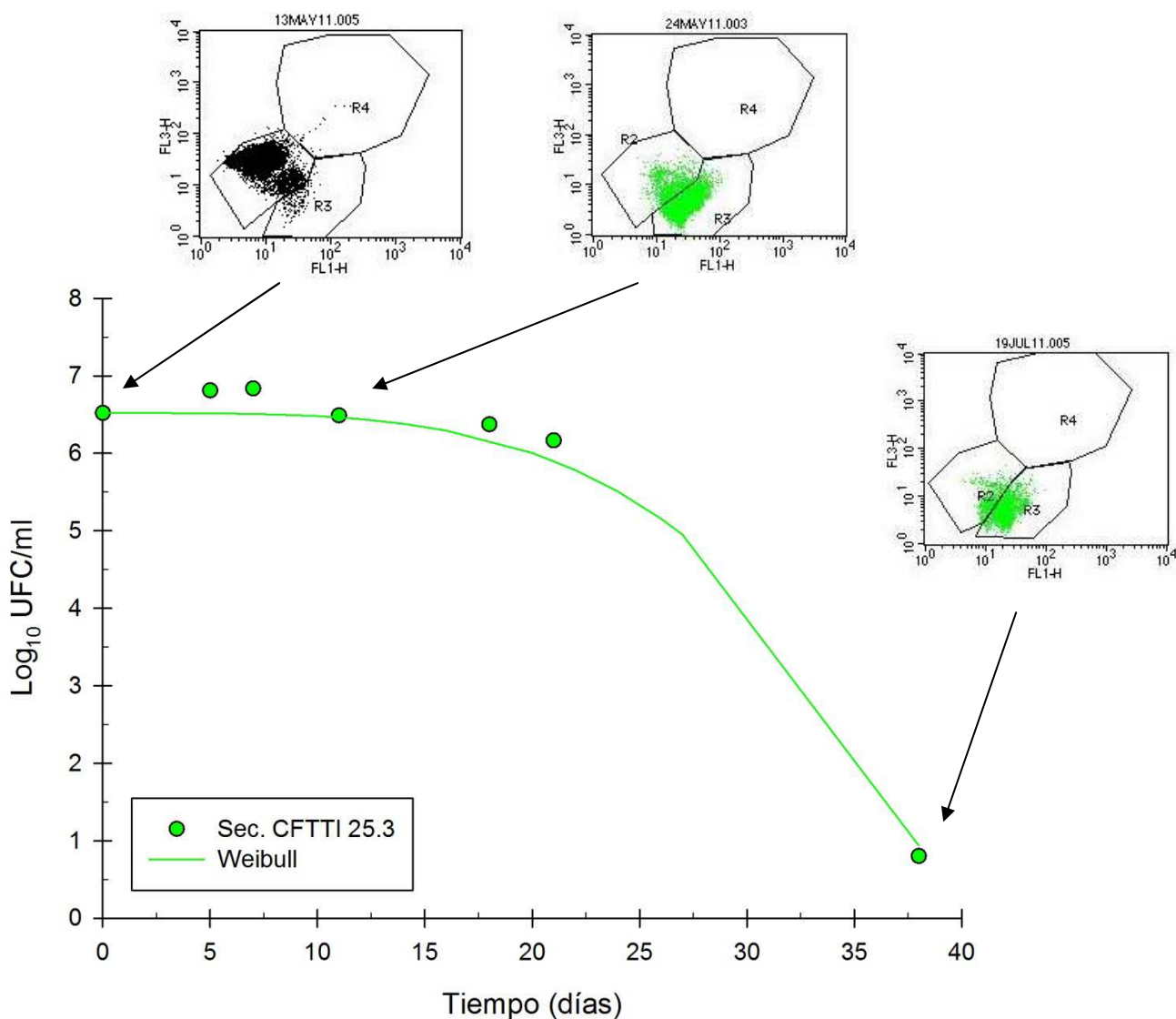


Fig. 4.24- Caracterización y cuantificación por citometría de flujo de la población de *E. coli* J08 inoculada en un efluente secundario Sec. CFTTI 25.3.

Región	% Observado		
Fechas	13 MAY	24 MAY	19 JUL
R2 (IP+)	97,42	21,07	27,13
R3 (IP-)	1,39	77,40	72,27
R4 (Ind.)	0,81	1,41	0,55

En efecto, la curva de inactivación media la supervivencia por recuento en placa en un medio específico (Colilert) y por tanto los datos se referían exclusivamente a la supervivencia de *E. coli*, mientras que los datos

citométricos median la fluorescencia de todas las células presentes. Como habíamos comprobado en los estudios por microscopía de fluorescencia, existían otros tipos de células presentes, en cantidades significativas, que también eran contadas por el citómetro, haciendo imposible relacionar estos datos con los de supervivencia.

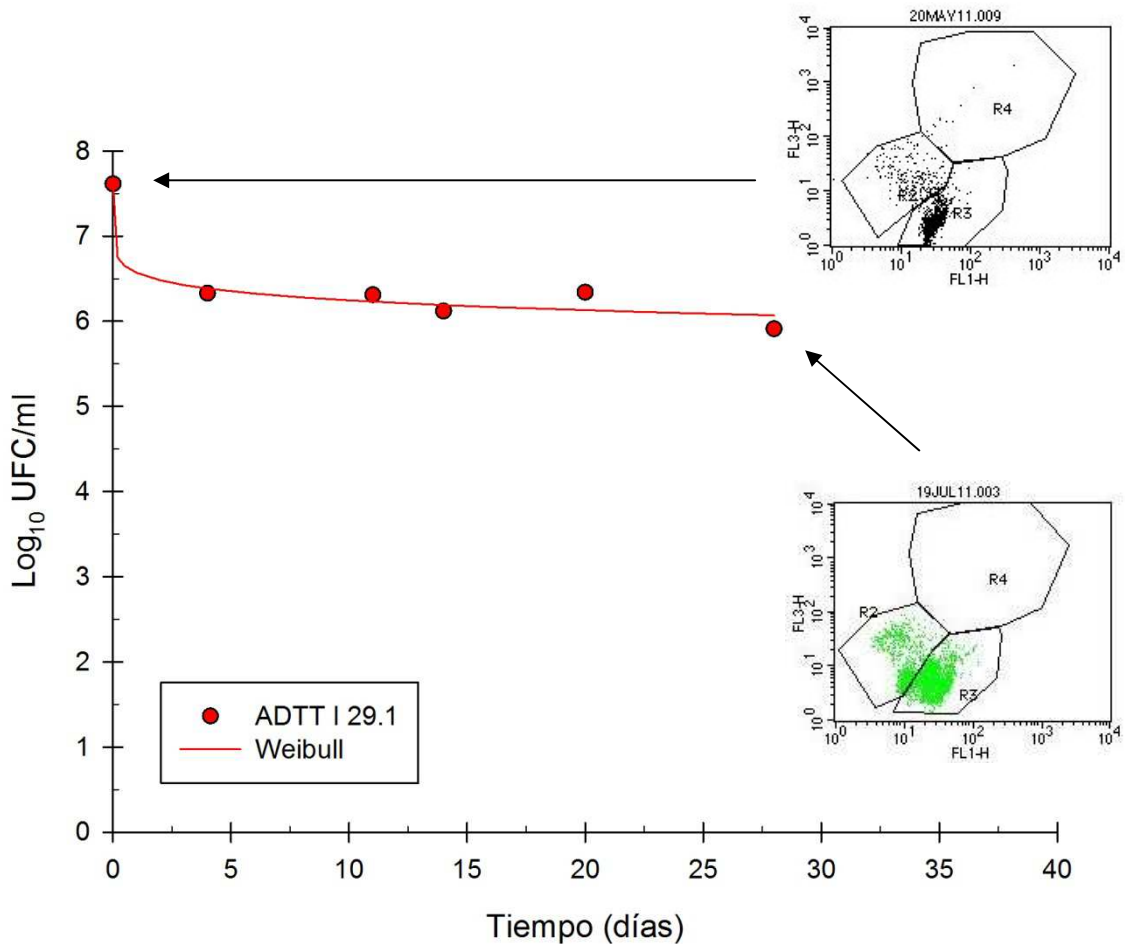


Fig. 4.25- Caracterización y cuantificación por citometría de flujo de la población de *E. coli* J08 inoculada en una alícuota AD TT I 29.1.

Región	% Observado	
	20 MAY	19 JUL
R2 (IP+)	12,47	36,45
R3 (IP-)	85,18	61,84
R4 (Ind.)	1,43	1,35

4.5. HETEROGENEIDAD DE LA POBLACIÓN DE *E. coli*, MEDIDA EN CULTIVOS PROCEDENTES DE INÓCULOS UNICELULARES

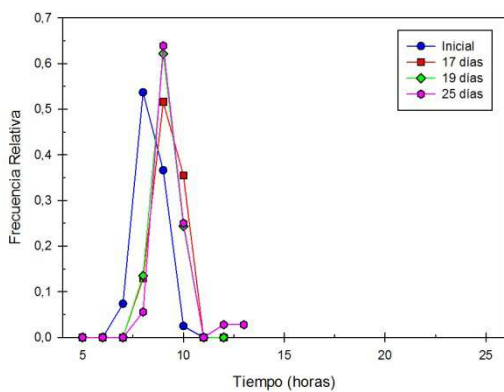
Una de las pocas formas de medir el comportamiento individual de las células de una población consiste en aislarlas por dilución de la población original, inocularlas en un medio de cultivo apropiado y medir el crecimiento de las poblaciones originadas a partir de cada una de ellas. En la Introducción hemos justificado la validez de esta metodología y en Materiales y Métodos hemos descrito las técnicas concretas que se han seguido en esta tesis para aplicarla, básicamente la preparación de inóculos, cuya unicelularidad ha sido estimada por la distribución de Poisson y su incubación en placas multipocillo en un espectrofotómetro específico, el Bioscreen, que permite evaluar el crecimiento por la medida de la turbidez en cada pocillo a lo largo del tiempo. La justificación de este tipo de experimentos residía en la necesidad de obtener datos experimentales que apoyasen la hipótesis de que 1) La población bacteriana en el agua es heterogénea como predice el que su inactivación pueda ser descrita por la ecuación de Weibull, que se basa precisamente en que cada célula de la población se encuentra en un estado fisiológico diferente que determina el tiempo que va a tardar en inactivarse y 2) Los diferentes tipos de agua poseen distintos tipos de agentes y mecanismos inactivantes que determinan a su vez la cinética de inactivación. El parámetro que distingue los diferentes tipos de cinética es el coeficiente de forma, n , que, como ya hemos repetido a lo largo de la tesis, cuando es mayor que 1 indicaría que todas las células son similarmente afectadas por los agentes inactivantes y la inactivación se daría cuando la acumulación de daños afectara irreversiblemente a cada célula. Por el contrario, un valor de n inferior a 1 indicaría que hay una determinada proporción de células en la población que son muy sensibles y mueren rápidamente, quedando las más resistentes para los tiempos finales en los que estas células resistentes van muriendo lentamente.

4.5.1. Heterogeneidad de poblaciones, en diferentes tipos de aguas, a lo largo del proceso de autodepuración

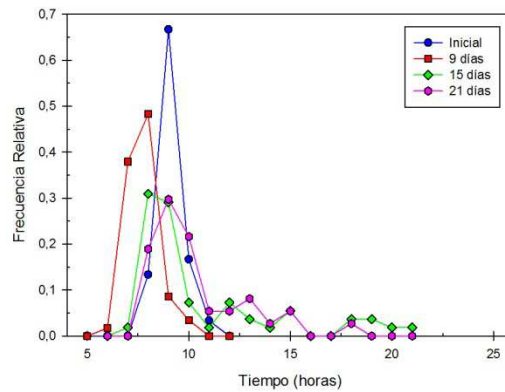
Por todo ello los análisis de heterogeneidad se han hecho incubando las bacterias en agua destilada, cuya cinética de inactivación muestre un valor de

$n > 1$ y con agua de estanque y efluente secundario que muestras cinéticas con valores de $n < 1$. El agua destilada nos sirvió también como control del efecto del choque que reciben las células del cultivo original cuando se inoculan en el agua. La premisa básica que subyace en este tipo de análisis es que cuando una célula está afectada por los agentes inactivantes, cuanto mayor sea el daño infligido, mayor será el tiempo que la célula necesitará para arrancar o crecer cuando sea inoculada en un medio de crecimiento (latencia) y por tanto mayor será el tiempo que necesitará el cultivo para alcanzar una turbidez prefijada (tiempo de detección, t_d) que es lo que medimos en el Bioscreen. Además, como se ha explicado en la Introducción, ha sido demostrado que en determinadas condiciones, que se cumplen en nuestro modelo experimental, la distribución estadística de los tiempos de detección es equivalente a la de los tiempos de latencia.

A.



B.



C.

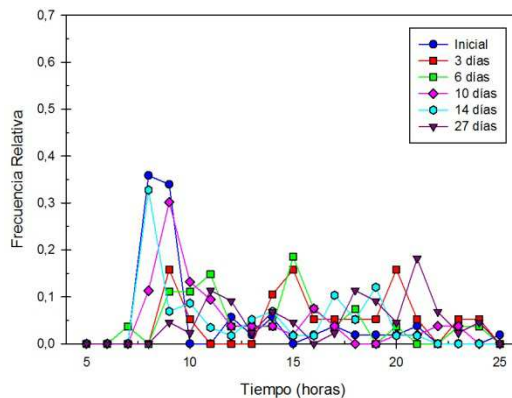


Fig. 4.26– Comparación de la Distribución Relativa del t_d de *E. coli* J08 incubada en diferentes tipos de aguas A (agua destilada), B (agua de estanque) y C (Efluente Secundario).

Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. 4.26** que muestran las distribuciones de los tiempos de detección en diferentes condiciones de incubación. Hay que señalar en primer lugar que en todos los casos se ha observado una variabilidad de los valores individuales de t_d , lo que demuestra la primera parte de nuestra hipótesis: las poblaciones son heterogéneas en lo que se refiere al estado fisiológico individual de sus células. Pero analizando cómo evoluciona esa heterogeneidad a lo largo del tiempo de incubación en los distintos tipos de agua, podemos alcanzar muchas más conclusiones.

4.5.2 Comparación de la heterogeneidad de una población de *E. coli*, crecida en medio líquido y resuspendida en agua destilada, estanque y en efluente secundario

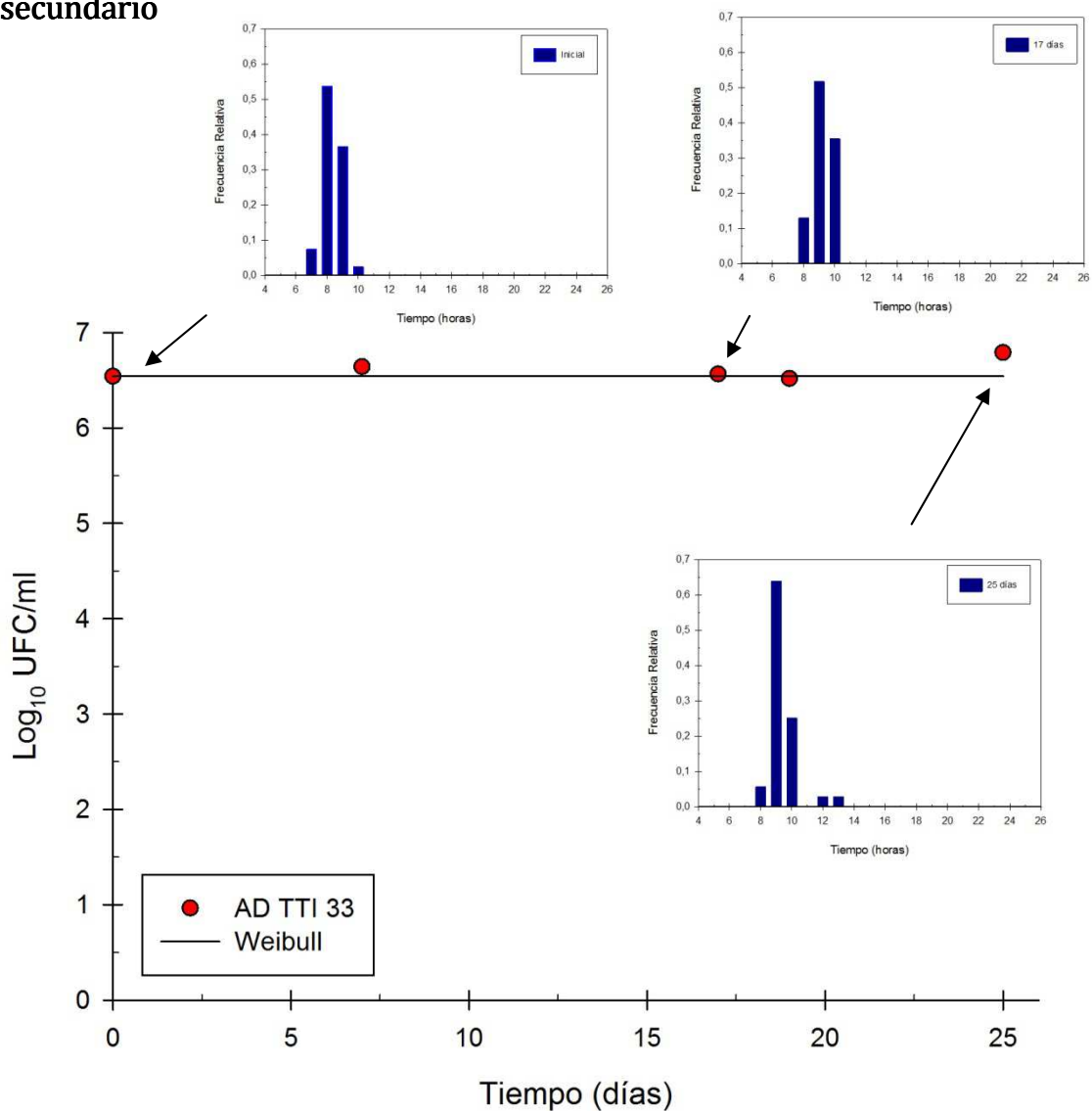


Fig. 4.27– Comparación de la Distribución Relativa del t_d (en horas) de *E. coli* J08 incubada en una muestra de agua destilada con tratamiento térmico.

Haciendo un análisis más detallado en el caso del agua destilada (ver **Fig.4.27**), se puede confirmar que su heterogeneidad inicial no es muy elevada. El 53,7% de las células tienen un **td** de 8 horas y el 36,6% de 9 horas, es decir un 90% de las células tienen un **td** entre 8 y 9 horas. El 10% restante se reparte entre células más sanas, que tienen **td** menor (7,3%) o más dañadas, con **td** superior (2,4%). Si observamos lo que ocurre inicialmente tras inocular las células (parecidas a las inoculadas en agua destilada) en agua de estanque (ver **Fig. 4.28**), vemos que ya hay un efecto choque inicial, porque solo el 80% de las células tienen **td** entre 8 y 9 h. y un 20% lo tienen superior a 9. Más fuerte es todavía el choque inicial cuando se inoculan las bacterias en efluente secundario (ver **Fig. 4.29**). En este caso, las células que podríamos llamar normales, con **td** entre 8 y 9 h. se reducen al 69% en pocos minutos y el resto es afectado de forma muy variable porque el rango de los **td** va desde las 10 a las 25 horas.

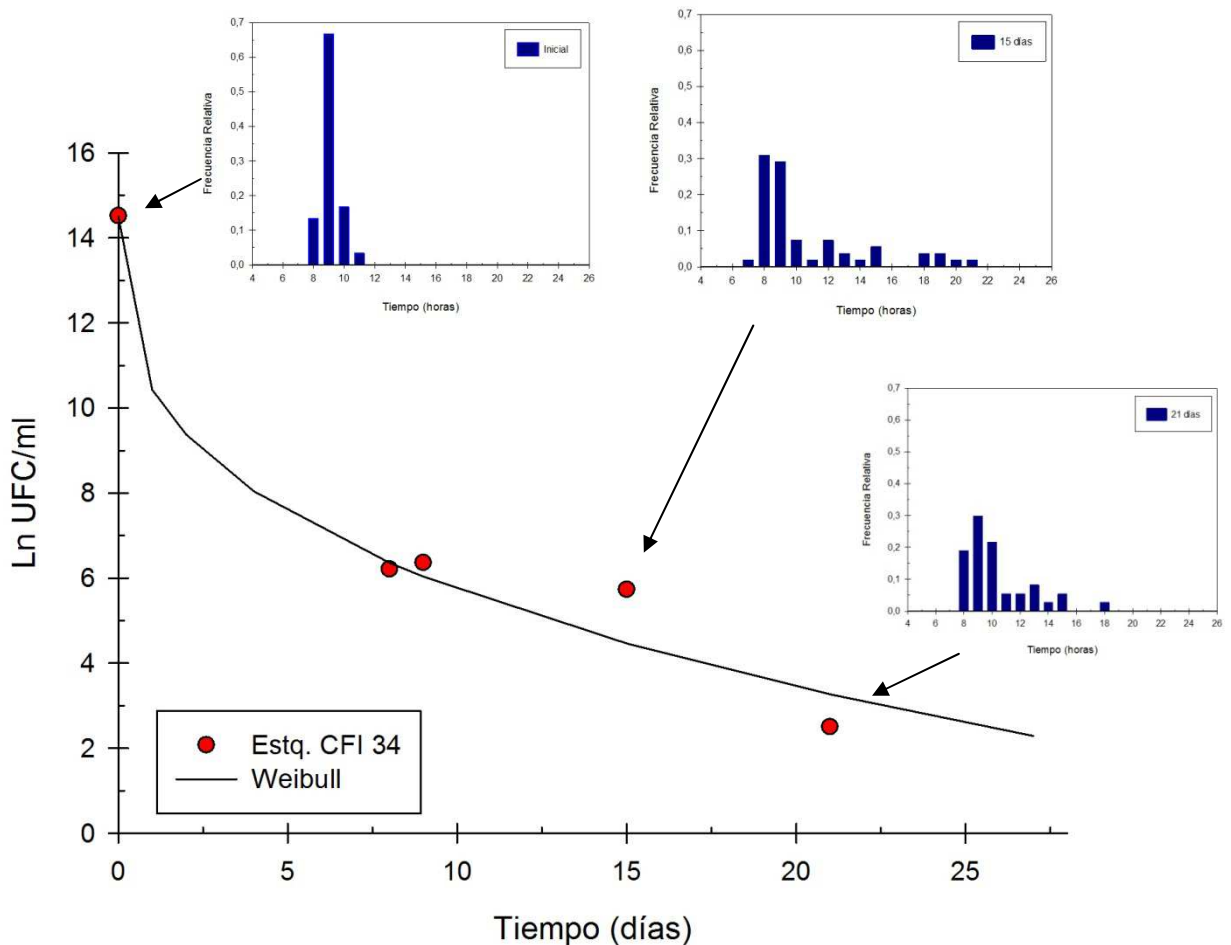


Fig. 4.28– Comparación de la Distribución Relativa del **td (en horas) de *E. coli* J08 incubada en una muestra de agua de estanque centrifugada y filtrada.**

Pero lo más significativo de los resultados es la evolución de la heterogeneidad a lo largo del tiempo. En agua destilada podemos observar (ver Fig. 4.27) como la distribución entera se desplaza hacia valores de t_d más altos, es decir todas las células de la población están afectadas. Así, a los 17 días de incubación el 87% de la población muestra valores de t_d entre 9 y 10, superiores en 1 hora al rango inicial, y a los 25 días esta proporción se mantiene, aunque ya van apareciendo algunas células más dañadas con valores de t_d superiores a 11 y 12 horas. Este es precisamente el mecanismo postulado para la cinética de la inactivación convexa que se observa en agua destilada, aparición de daños para todas las células que se reflejan en su estado fisiológico celular, pero que todavía no son suficientes para provocar la muerte celular.

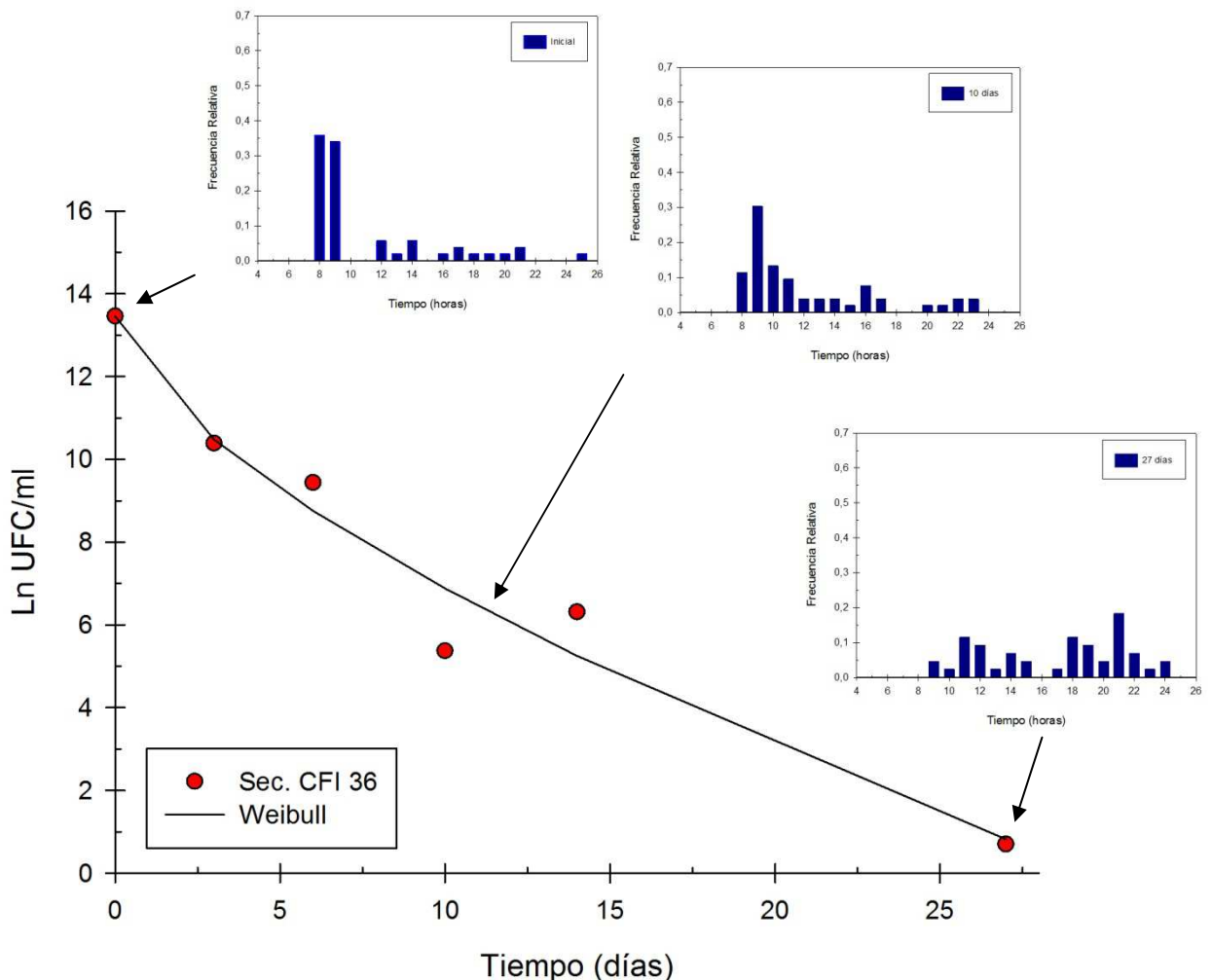


Fig. 4.29– Comparación de la Distribución Relativa del t_d (en horas) de *E. coli* J08 incubada en una muestra de efluente secundario centrifugada y filtrada.

En contraste con lo que ocurre en el agua destilada, la evolución de la variabilidad en agua de estanque y efluente es completamente diferente (ver **Figs. 4.28-29**). Tras el choque inicial, en el que mueren las más sensibles, las células que quedan a los 9 días en el caso del estanque y a los 10 días en el del efluente, son mayoritariamente resistentes, mostrando valores de t_d similares a los de una población no afectada (8 o 9 horas) aunque con la prolongación de la incubación se van dañando cada vez más células, de forma aleatoria, hasta que al final de la incubación la población es muy heterogénea y el rango de valores de t_d se extiende desde las 8 a las 18 horas en el caso del estanque (ver **Fig. 4.28**) y de las 9 a las 24 horas en el del efluente (ver **Fig.4.29**).

Los resultados de la medida de la heterogeneidad de la población, y su evolución a lo largo del tiempo de incubación en las diferentes aguas, confirman por tanto la hipótesis no solo de que la población es siempre heterogénea, incluso en condiciones favorables, sino de que las diferentes cinéticas de inactivación observadas se deben a mecanismos diferentes que afectan de modo diverso a las células. En el caso del agua destilada, una matriz sin agentes inactivantes externos, la única causa de muerte es el envejecimiento celular, que va afectando por igual a todas las células, y por ello observamos que toda la población va envejeciendo, va empeorando su estado fisiológico, lo que hace aumentar su tiempo de latencia tras ser inoculada y por tanto su tiempo de detección, pero ese deterioro no es suficiente para provocar la inactivación celular y el número de células viables se mantiene constante durante el tiempo del experimento (ver **fig. 4.27**). Por el contrario en las aguas con agentes inactivantes filtrables (estanque y efluente), el efecto sobre la población se nota instantáneamente (ver **Figs. 4.28-29**), desde el primer momento tras la inoculación y es selectivo, afectando sólo a las células sensibles. Por ello, tras unos pocos días de incubación, las células que componen la población, ya sensiblemente mermada, son mayoritariamente las resistentes y tienen un valor de t_d semejante a las células no afectadas de 8 a 9 horas. Sin embargo también estas resistentes van desapareciendo y las células que componen la población a medida que avanza el proceso de autodepuración se revelan como un conjunto cada vez más heterogéneo de

células dañadas en mayor o menor grado, como lo demuestran los valores de **td** que se observan, que se extienden por un amplio rango de 9 a 21 horas, aunque las células mayoritarias, el grupo que mayor frecuencia presenta, es el de las células menos afectadas con valores de **td** de 8 a 9 horas. En el periodo final es también destacable la diferencia observada entre agua de estanque y efluente. Mientras en la primera todavía se mantiene un grupo numeroso de células resistentes (30%), con valores de **td** entre 8 y 9 horas tras 21 días de incubación, en el efluente esta proporción es más baja (ver **Fig. 4.29**) de tal manera que a los 27 días el grupo más numeroso (18,2%) está constituido por células fuertemente dañadas con un valor de **td** de 21 horas y las células más resistentes suponen apenas un 11%.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA GENERAL PARA MEDIR LA CAPACIDAD DE AUTODEPURACIÓN DE CUALQUIER TIPO DE AGUA

5.1.1. Análisis de la precisión de los resultados de los métodos Chromocult y Colilert en el recuento de *E. coli* J08

Cuando los microorganismos son expuestos a factores químicos, biológicos o físicos presentes en el agua, éstos pueden sufrir lesiones que suelen ser descritos como daños fisiológicos letales, si causan al microorganismo la pérdida de su viabilidad para crecer en un medio selectivo, o subletales, que provocan un retraso en el crecimiento en el medio selectivo comparado con el que necesitaría a una célula normal (96). Por lo tanto, es importante seleccionar el medio de cultivo adecuado para realizar la recuperación y el recuento del microorganismo de estudio. Además, de la precisión del método, el medio seleccionado debe ser sensible, diferencial, específico y con una tasa baja de falsos positivos y negativos.

En la actualidad existen diferentes medios y métodos disponibles para el aislamiento selectivo y recuento de *E. coli*. Sin embargo, estos métodos fueron desarrollados para la detección de *E. coli* en agua no tratada y potable (97). Uno de los métodos más recientes y muy utilizados es el que se basa en un sustrato definido que tiene un indicador y que permite detectar la presencia de *E. coli* en una muestra de agua. Se han realizado trabajos relacionados con la evaluación del rendimiento de los métodos de sustrato definido para el análisis de agua residuales tratadas y reportaron que son tan buenos como el método tradicional e incluso pueden considerarse mejores que éste (93).

En este trabajo de investigación se decidió inicialmente usar dos medios de cultivo diferenciales para el recuento de *E. coli* J08. Éstos fueron Chromocult y Colilert, que están basados en la detección de la actividad enzimática de la β -glucuronidasa, ya que dicha enzima ha sido reportada hasta el presente en más del 94% de *E. coli* (97) y como ya se ha mencionado el RD 1620/2007 especifica dicha enzima para el recuento de las células viables (12).

Si bien es cierto, que hay trabajos que relacionan la capacidad de recuperación de *E. coli* en muestras de lodo activado y que reportaron que no existen

diferencias significativas entre los métodos de membrana de filtración, utilizando medios cromogénicos, como el agar lactosa-glucuronico y el método del NMP utilizando Colilert para la detección de *E. coli* (97), se decidió comprobar si se reproducían estos resultados y con qué precisión, en el caso de la inoculación de 1mL de una alícuota de efluente secundario previamente tratado en el laboratorio, en los medios de Chromocult y Colilert.

Como es de conocimiento, el medio cultivo Chromocult es más económico y permite diferenciar y cuantificar *E. coli* y coliformes totales, pero requiere mayor tiempo para preparar los medios de cultivo e inocularlos con la alícuota problema y tiene asociadas más fuentes de incertidumbre (probabilidad de cometer errores), a diferencia de Colilert, más caro pero cuyo uso está más extendido, debido a que es mucho más rápido y de fácil manejo (ver **apartado 3.9.2.1.1.b**). Además después de hacer la lectura de las bandejas y una vez señalados los pocillos positivos, éstas se pueden seguir almacenando en el laboratorio sin ningún tipo de inconvenientes, a diferencia de las placas, que después de cierto tiempo presentan malos olores y se pierde el recuento original de las bacterias.

En la **Fig. 4.1** puede observarse que no existió una diferencia importante en la capacidad de crecimiento de *E. coli* J08 entre ambos medios de cultivos. Si bien es cierto, que al mirar la gráfica se puede apreciar una cierta mejor capacidad de recuperación de la cepa en un medio de Colilert, desde el punto de vista estadístico no tiene una diferencia significativa ($P=0,510$). Esta diferencia es la que se espera a partir de la idea, ampliamente extendida, de que las células se recuperarían mejor en un medio líquido. Nuestros datos no confirman cuantitativamente esta especulación en el caso concreto estudiado.

5.1.2. Desarrollo de una metodología específica para el cálculo de la incertidumbre asociada al recuento de *E. coli* J08 por el método Colilert

Para realizar un buen seguimiento de la inactivación de *E. coli* J08/09 en diferentes tipos de aguas, hubo que realizar diversas diluciones. Ello provocó posteriormente ciertas dificultades al momento en el procesamiento de los datos, que se pasará a detallar a continuación.

El software proporcionado para calcular el NMP de Colilert, solo permite obtener un solo recuento por bandeja, y no contempla el poder realizar un promedio de varias bandejas con varias diluciones de la misma muestra, de manera a obtener un solo punto de recuento por día, para luego representarlo en una gráfica. Por éste motivo, y para poder aumentar el número datos analíticos de una misma muestra, se tomó la decisión de recurrir a la fórmula de Hurley & Roscoe, para poder estimar cantidad de organismos por unidad de volumen de una misma muestra, a partir de varias diluciones, así como la incertidumbre asociada (75).

La fórmula utilizada aparte de ser muy útil, permitió realizar una mejor presentación gráfica de los resultados, además de favorecer una interpretación más cómoda de las diversas formas de las cinéticas de inactivación, ya que permite calcular la **SE** de la muestra. Pero, al mismo tiempo se planteó averiguar si era mejor realizar una dilución sencilla con una bandeja de 2000 o una doble dilución con la bandeja de 200, basándonos en el error estándar de las mismas.

Para esto se realizó el experimento descrito en el **apartado 4.1.2**, en la que se puede ver de forma clara que cuando se usan diluciones simples con la bandeja de 2000 y diluciones dobles con la bandeja de 200, no existe una diferencia significativa ($P=0,426$); mientras que si se quiere aumentar la precisión y disminuir más el error estándar, usando para una misma dilución una bandeja de 200 y otra de 2000, la diferencia del SE con respecto a los casos anteriores si es significativa ($P<0,001$). Por tanto, ya que la dilución es una de las fuentes de error más significativas, proponemos en esta tesis que se minimicen el número de diluciones a realizar y se empleen los dos tipos de bandejas para aumentar el rango de concentración detectable (ver **Tabla 4.1**).

5.1.3. Análisis de la estabilidad de las propiedades de la cepa de *E. coli* J08 utilizada en los ensayos

El motivo por cual se prefirió trabajar con una cepa proveniente de un efluente, fue por su capacidad de supervivencia en el mismo y para evitar incorporar variables adicionales tales como dificultad de crecimiento, variación de la adaptación de la cepa, entre otros factores, en el caso de que fuera aislada de

otro lugar diferente. Otra ventaja adicional de usar un microorganismo propio de un efluente, es que presenta características similares de supervivencia de los patógenos, por lo tanto puede servir de referencia para otros estudios que puedan realizarse (97). Aunque la cepa seleccionada había sido previamente aislada de un agua residual (ver **apartado 3.1.1.**), cabía la posibilidad de que su mantenimiento en un medio de laboratorio durante largo tiempo la hiciera perder total o parcialmente su resistencia a los elementos inactivadores. Esta resistencia debía estar completamente activada en las bacterias alóctonas presentes en un efluente nuevo. Para comprobar esta hipótesis, un mismo efluente fue inoculado con dos cepas distintas, la J08 que era mantenida en medio TSA en tubos inclinados a 4°C durante meses, y la J09 recién aislada del mismo efluente empleado en el experimento.

Los resultados de las cinéticas de inactivación que se muestran en la **Fig. 4.3** permitió concluir que no hay una pérdida de resistencia por el mantenimiento en un medio de cultivo de la cepa *E. coli* J08, ya que ambas cinéticas fueron muy semejantes y no presentaron una diferencia estadística significativa ($P=0,793$). Por lo tanto se pudo concluir que el tiempo de almacenamiento dentro del laboratorio no afecta la capacidad de supervivencia de la cepa *E. coli* J08, que fue utilizada durante todo el período de investigación.

5.1.4. Análisis de la estabilidad de los mecanismos inactivantes del agua y de la influencia de los factores ambientales (estación del año y radiación solar)

Por lo general, todas las muestras de efluentes ya sean secundarios o terciarios, así como las muestras de aguas de estanque fueron procesadas en menos de 24 h después de su recepción en el laboratorio. Para los casos en que el procesamiento de la muestra requirió esperar más de un día se procedió a almacenarla en la cámara de 4°C.

De todas maneras, para poder comprobar que las muestras de efluente secundario una vez recibidas en el laboratorio y después de ser inoculadas e incubadas no perdían su capacidad de autodepuración al estar cierto tiempo almacenado en el laboratorio, se procedió a guardar una alícuota sin ningún tipo de tratamiento en oscuridad a 4°C durante 16 días. A los 16 días se procedió a inocular con la cepa en estudio *E. coli* J08 y se incubó a 20° C en

oscuridad. El objetivo de este experimento fue demostrar que la capacidad de supervivencia de *E. coli* J08 se debía a las características de la misma para adaptarse y permanecer viva en un medio diferente al cual está preparado en forma biológica para desarrollarse que es el intestino de un mamífero (15, 17), y que no estaban relacionadas con la disminución del poder depurador del efluente en sí. De esta forma se descartaron estas fuentes de variación al caracterizar al efluente inoculado con la cepa *E. coli* J08.

En la **Fig. 4.4** se pueden observar los valores de los recuentos realizados durante 30 días de las muestras incubadas, así también se puede apreciar que existió muy poca variación entre los datos de los recuentos entre ambas alícuotas y por lo tanto son perfectamente comparables, sin presentar una diferencia estadística significativa ($P= 0,865$). Por lo tanto, puede afirmarse que un efluente almacenado en el laboratorio a 4°C, en oscuridad y durante 16 días no se ve afectado en su capacidad de autodepuración con respecto a la cinética de inactivación de la cepa en estudio.

Muchos autores han mencionado la importancia de la variación de las estaciones del año en la inactivación de las bacterias en diferentes tipos de aguas (98-102) por lo cual para realizar un análisis más detallado de las influencias de las estaciones del año, sobre la capacidad de autodepuración de las aguas residuales, se decidió comparar las cinéticas obtenidas de las diferentes muestras de aguas residuales que no recibieron tratamientos adicionales en el laboratorio y que fueron recibidas entre julio de 2008 a junio de 2010.

El motivo por el cual se seleccionaron datos de un período determinado (2008-2010) para hacer el estudio fue debido a que las muestras fueron incubadas a 20°C y en ausencia de luz, a diferencia de otras muestras incubadas en condiciones diferentes y que formaron parte de otros experimentos dentro de la línea de investigación.

En algunos casos, solo se cuenta con una curva de inactivación y esto tiene una explicación lógica. No siempre pudimos obtener todas las muestras que hubiésemos necesitado en un diseño experimental con rigor estadístico. Nuestra dependencia de las entregas de la EDAR, a la que por otra parte

debemos agradecer su colaboración, que prestó amablemente dentro de sus posibilidades, hizo que en algunos casos se contara con una sola muestra representativa de esa estación como el caso de la primavera (ver **Fig.4.5-A**). Para las otras estaciones si se contaron con dos o tres muestras.

También es importante mencionar que para llevar a cabo un análisis lo más preciso posible, las diferentes muestras fueron clasificadas teniendo en cuenta estrictamente el mes en que se realizaron las tomas y no así los meses durante los cuales estuvieron incubadas debido a que las condiciones ambientales ya estaban controladas en el laboratorio.

La muestra Sec. I. 14.1 correspondió a una muestra colectada en primavera (ver **Fig. 4.5-A**) y que tuvo una gran capacidad de autodepuración que viene definido por el valor de $n < 1$. En la misma figura pueden diferenciarse dos etapas de inactivación, una donde fue mayor durante los primeros días (0-14) y la otra donde fue menor (15-23) y que correspondió a la típica cola que representaría a las células más resistentes. Otra característica de esta muestra fue que pasado los 20 días ya se encontraban solo de 10 a 100 células presentes de una inoculación inicial de 10^6 cél/mL.

Una posible explicación de la gran capacidad de autodepuración de éste efluente secundario puede estar relacionada con el aumento de la temperatura que se produce durante la estación de primavera, facilitando la aparición de las primeras poblaciones de protozoos, algas, sustancias tóxicas (ya mencionado en la Introducción), entre otros que favorecen la inactivación de *E. coli* (13, 102).

La teoría anteriormente mencionada se sustenta más aún, al mirar la **Fig. 4.5-B**, que correspondió a la estación de verano y con muestras procedentes de la misma EDAR. Además existen publicaciones bibliográficas que sugieren que con el mayor aumento de la temperatura se incrementa la actividad celular y disminuye el tiempo de generación de las bacterias, aumentando la acción tóxica sobre todo de las algas y acelerando la autólisis (103). Esto, unido a que la combinación de los efectos inactivantes de la luz solar con la presencia de la microbiota natural son generalmente mayores a temperaturas más altas (25, 104-106), podría explicar por qué en verano se

obtuvo un número menor de recuentos de bacterias. Lo que es indudable es que las oscilaciones estacionales de la temperatura provocan una alteración de las poblaciones microbianas (43, 98).

Las diferencias en la supervivencia de bacterias alóctonas, principalmente enterobacterias en función de la estación, también están relacionadas con la microbiota autóctona por llamarlo así, cuyas densidades son mayores en la estación cálida, por lo que muchos autores encuentran, durante la época de verano, una menor supervivencia de las poblaciones de enterobacterias (104, 107). Durante el verano, no sólo aumenta la temperatura como resultado de la absorción solar por parte del agua, sino también el oxígeno disuelto y el pH como producto de la actividad fotosintética de las algas, es decir un aumento de la variedad de las condiciones ambientales (98).

El mecanismo por el cual los niveles elevados de pH causan mayor alteración en *E. coli* (13, 43) y en coliformes fecales, así como la capacidad de inactivación por longitudes de onda larga, no es muy claro; sin embargo existen dos posibilidades: que el pH disminuya la resistencia de los microorganismos a los efectos de la radiación solar, o que incremente la producción de formas tóxicas de oxígeno e induzca cambios en la ionización o configuración de algunas moléculas implicadas en este complejo proceso. La alteración en las membranas hace pensar que frente a un aumento en el pH pueden generarse flujo de iones hidroxilos, los cuales incrementan el pH interno de coliformes fecales o enterococos alterando su funcionamiento.

La mayoría de las bacterias se inactivan más rápidamente durante el verano como ya hemos comprobado, dada las diferencias en las características del agua (pH, temperatura, radiación solar) de manera que la inactivación se presenta como un fenómeno integrado, debido posiblemente a fenómenos de foto-oxidación generados por la radiación solar y la materia orgánica (22), catalizados por el oxígeno e influenciados por la turbidez del agua que permite la absorción de la radiación solar (98, 99).

Desde el punto de vista del ajuste matemático, el efecto de la oscilación estacional queda muy claro por la descripción del modelo matemático basado en distribución de Weibull. En el caso del valor de n , se encontró muy cercano

a 1 y que indicarían que las células prácticamente van muriendo con una cinética de primer orden. De tal manera que a los 15 días la población de las células viables cultivables prácticamente fue nula (ver **Fig. 4.5-B**) en comparación con la estación de primavera.

Para el otoño se esperaba que disminuyera la capacidad de autodepuración de un efluente en comparación con la del verano, y efectivamente se pudo comprobar. En la **Fig. 4.5-C** se encuentran representadas las curvas de inactivación de las muestras Sec. I. 3.2.2 y Sec. I. 4.2, ambas pertenecientes a la misma EDAR, pero la primera se obtuvo a principios de octubre y la segunda a finales del mismo mes.

Basta con mirar la **Fig. 4.5-C**, para confirmar que la población murió en forma más lenta que en el verano, pero presentó una semejanza con la cinética de la primavera en cuanto a las etapas de inactivación, observándose una mayor actividad en los primeros días (0-15) y la otra con menor actividad (16-31). En cuanto al tiempo inactivación total, en el efluente secundario del verano a los 15 días la población inoculada fue casi nula, mientras que en el otoño entre los 25 y 30 días seguían entre 10^2 a 10^4 cél/mL vivas. Siempre recordando que se denominan vivas a las viables cultivables.

Al analizar las formas de las **Fig. 4.5 A y C**, se puede observar que existió mucha semejanza entre los mismos, lo cual nos indicó que los factores inactivantes parecen ser los mismos y que están muy relacionados con las oscilaciones de las estaciones del año.

Por último está la **Fig. 4.5-D** que perteneció a la estación de invierno. En la gráfica puede observarse una clara diferencia entre las tres cinéticas de inactivación presentes en las muestras de diferentes orígenes. En el caso de los efluentes Sec. I. 7.2 y 8.2 procedieron de la misma EDAR, mientras que la otra muestra Sec. I. 5.2 provino de otra estación depuradora.

Las muestras Sec. I. 7.2 y Sec. I. 8.2 como ya se mencionó, procedían de la misma estación depuradora, pero la primera se obtuvo a finales de febrero y la otra a finales de marzo. Al observar la **Fig.4.5-D**, se puede ver que existió una diferencia en cuanto a la forma de la curva y por lo tanto el tiempo de

inactivación casi total de la población inoculada en ambas muestras fue muy diferente. No pudimos obtener información adicional sobre diferencias en cuanto a su composición fisicoquímica y biológica, por lo que no tenemos bases documentales para explicar las diferencias en su capacidad de inactivación.

Según la bibliografía en invierno es normal encontrar una mayor concentración de bacterias, que se atribuye a unas condiciones de vida y nutrición más favorables para las mismas, debido principalmente a la reducción de la energía solar, disminución de la temperatura, y por consiguiente menor cantidad de factores inactivadores como los protozoos, algas, y otros microorganismos (98). Además, hemos comprobado que *E. coli* y otras bacterias sobreviven mejor cuando la temperatura de incubación es menor (ver **anexo 4**) porque los procesos de inactivación endógena, como el envejecimiento celular son también más lentos.

Los parámetros tales como nitrógeno total, fósforo total, amonio, nitratos, y pH, no mostraron variaciones significativas, por lo que, en nuestro caso, no podemos evaluar su relevancia.

La DBO5 y la DQO si variaron como está representado en la **Fig.4.6**. Al comparar y relacionar estos dos parámetros con respecto a las curvas observadas durante las diferentes estaciones del año, se pudo afirmar que DBO5 si presentó cierta relación con el aumento (verano) o disminución (otoño) de la capacidad de autodepuración de los efluentes analizados (ver **Fig.4.5**). Lo que apoya la conclusión anterior de que la capacidad de inactivación está fuertemente relacionada con la biomasa presente en el efluente.

Algunos autores consideran que principal factor inactivador en sistemas a cielo abierto es la radiación solar (22, 101). Además de que se ha demostrado que la inactivación de diferentes grupos bacterianos es de 2 a 4 unidades logarítmicas mayor, en experimentos comparados con la inactivación en oscuridad (66). Otros la consideran importante pero sin dejar de lado que la inactivación natural se produce como la suma de varios factores tales como el aumento de la

temperatura, la predación por protozoos, estrés osmótico, eliminación de partículas, materia orgánica y deficiencias de nutrientes (98, 99, 101).

Dentro de las longitudes de onda de la radiación solar, los rayos UV (44) y la luz visible (21, 22, 42, 72, 108) parecen ejercer con mayor fuerza su acción sobre bacterias y virus, al captar oxígeno molecular y estimular a los fotosensibilizadores. Una función ecológica de los inactivadores sería acentuar los efectos de inactivación de la radiación solar sobre bacterias, virus y bacteriófagos.

Uno de los factores que influye en la absorción o difracción de la luz solar en el agua, es la turbidez, que unido al hecho de que las bacterias y bacteriófagos tienden a la adhesión a partículas suspendidas en el agua, puede generar un efecto protector. La profundidad también es un factor determinante. Dado que, en las capas superficiales la absorción de luz es más efectiva. Trabajos de Whitlam y Codd de 1986 (20) han sugerido que la luz solar tiene efectos destructivos y desempeñan un papel importante en la ecología microbiológica de los estratos superiores de los ambientes acuáticos. Así también la luz solar juega un papel importante en el número de indicadores fecales y bacterias entéricas patógenas tanto en agua dulce y en agua de mar (21). Barcina *et al* en 1989, sugirió que una de las consecuencias de la luz, es la pérdida de la capacidad de crecimiento de las células como consecuencia de la inhibición de la incorporación de la glucosa (24, 72).

Nuestros estudios confirma este efecto. A simple vista en la **Fig. 4.7** puede observarse una clara diferencia de las cinéticas de inactivación en ausencia y presencia de luz. Pero también queda claro que no es el único factor inactivante que afecta a los efluentes y que uno de ellos presenta una capacidad de autodepuración en función de otros factores externos, como ya habíamos visto en relación a la influencia que tienen las estaciones del año.

5.2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO MATEMÁTICO QUE PERMITA DESCRIBIR Y CUANTIFICAR LA INACTIVACIÓN DE *E. coli* J08 EN DIVERSOS TIPOS DE AGUAS

5.2.1. Análisis de la diversidad de cinéticas de inactivación encontradas en diferentes tipos de aguas

Como ya se ha mencionado en la Introducción (1.3.2.3.), el tratamiento secundario consiste en la eliminación de la materia orgánica y es un proceso que no incluye la eliminación de los microorganismos, sobre todo los patógenos, y en los cuales es normal encontrar como ya se ha mencionado una carga bacteriana de *E. coli*, con una concentración entre 10^2 y 10^3 cél/mL (40). Además dependiendo de las características del efluente, se pueden obtener diferentes tipos de cinéticas de inactivación de *E. coli*. Por lo tanto, se pudo corroborar que al igual que lo mencionado en algunas publicaciones (40) la concentración inicial de *E. coli* en las muestras de efluentes secundario no superaron 10^3 cél/mL. Estas células van desapareciendo en un proceso de autodepuración, pero debido a su pequeña concentración, la incertidumbre asociada a su recuento es grande y no permite realizar un estudio cinético preciso. Por ello, tal como se ha descrito en Materiales y Métodos, todos los efluentes y otras aguas analizadas en este estudio, fueron inoculados para alcanzar una población inicial aproximada de 10^6 UFC/mL.

La **Fig. 4.8** muestra las cinéticas de inactivación de efluentes de varias estaciones depuradoras a las que se ajustó la ecuación de Weibull como primer paso para validar nuestro modelo matemático. El resultado del ajuste fue satisfactorio, como se muestra en la **Tabla 4.2**. Experimentos subsiguientes con agua de estanque (**Fig. 4.9**), agua destilada sin tratamiento térmico (**Fig. 4.10**) y agua residual sintética más glucosa (**Fig. 4.11**) mostraron una similar bondad del ajuste. Esto no solo permitió afirmar que el modelo matemático empleado podía aplicarse a muestras de muy diversos orígenes, en los que los factores inactivantes presentes debían ser muy diversos, sino que los valores ajustados de los parámetros del modelo permitían una caracterización cuantitativa de la capacidad de cada agua para eliminar la población de *E. coli* inoculada.

Creemos que la cinética de inactivación observada es una medida directa de la capacidad autodepuradora del efluente para eliminar su propia microbiota indicadora. Sin embargo, la pequeña y variada concentración inicial de bacterias presentes, que dificulta su recuento introduce una gran variabilidad en el sistema que impide que el modelo matemático, que describe muy bien la inactivación de poblaciones grandes, pueda ser usado para predecir el comportamiento de las pequeñas poblaciones residuales. El análisis microbiológico de poblaciones pequeñas, cercanas al límite de detección de los métodos empleados, implica una mayor incertidumbre de los datos, que afecta fuertemente a los valores de los parámetros ajustados con la ecuación de Weibull.

En la **Tabla 4.2** están incorporados los valores de **n** y **b** de las ecuaciones correspondientes a todos los experimentos que se han representado gráficamente en esta memoria, con indicación del número de la figura correspondiente. En la misma tabla se han incorporado además los análisis de la validez del modelo para todos esos experimentos. Para poder comprobar cuantitativamente el ajuste del modelo matemático empleado con respecto a los diferentes tipos de datos obtenidos de los diferentes tipos de tratamientos, si cumplía con las expectativas y al mismo tiempo comparar la bondad del ajuste entre los datos reales y predichos, se utilizaron tres herramientas estadísticas que fueron, SCDLn (51), el sesgo y la exactitud (52) que han sido previamente descritos en Materiales y Métodos.

El test de McClure (51) muestra que, a excepción de unos pocos casos con valores superiores a 1, la mayoría muestran un buen ajuste. Esta conclusión también se alcanza estudiando el factor de exactitud del modelo, cercano a 100% en todos los casos excepto en los ya citados. El cálculo del factor de sesgo nos permite concluir que el modelo describe la cinética sin apenas sesgo y que en todo caso, hay una pequeña tendencia a supervalorar (valor de sesgo mayor que 1) la cinética de inactivación. La conclusión es que la cinética de inactivación de poblaciones grandes (del orden de 10^6 UFC/mL o mayores) suspendidas en diversos tipos de aguas puede ser descrita por una ecuación única que tiene la forma de una distribución de Weibull, con valores de n variables. Hubo pocos experimentos, en los cuales el modelo falló al describir

con exactitud el comportamiento real, que se pueden clasificar como fallos peligrosos (Fail-Dangerous), en los que el uso de la predicción como valor real podía implicar riesgos, porque el modelo minusvaloraba la contaminación. Es el caso de la muestra Sec. FBFI 13.2 (ver **Tabla 4.2**). En la mayoría de los casos el fallo fue seguro (Fail-Safe), porque se supervaloraban los valores de supervivencia, por lo que las aguas serían rechazadas, sobre bases falsas, pero sin riesgo para el consumidor. Este fue el caso de las muestras tales como Sec. I. 3.2.2 y Sec. I. 7.2 (ver **Tabla 4.2**).

A pesar de ello, el modelo matemático permite realizar una buena descripción de la inactivación de *E. coli* J08, al demostrar una buena correlación de las formas de las cinéticas de inactivación de la cepa en estudio, tanto en aguas naturales como en aguas tratadas en las que se procedió a la eliminación de los diferentes factores inactivantes presentes en las diferentes muestras de efluentes secundarios, terciarios y otros tipos de muestras de aguas (ver **Figs. 4.3, 4.4, 4.5, 4.7-9, 4.13, 4.10, 4.20**).

Un valor de n diferente, según el análisis de Peleg (50), implica un mecanismo de inactivación diferente, provocado por agentes inactivantes específicos para cada caso.

En un trabajo de investigación llevado a cabo en el 2007 por Ravva y Korn (41), demostraron que la capacidad de autodepuración de un agua residual es característico, y que a pesar de esta conclusión, las curvas de inactivación observadas por ellos son muy parecidas a la obtenidas por nosotros en el laboratorio, lo cual indicaría que los factores inactivantes presentes podrían ser comunes, sobre todo en el caso de las muestras de efluentes autoclavadas y no autoclavadas e inoculadas con *E. coli*.

Con respecto a la naturaleza de esos posibles factores que podrían estar involucrados con la inactivación de *E. coli*, se apunta a la ausencia de nutrientes (92), a la predación por protozoos (92, 107, 109, 110), la competición por nutrientes (55), la presencia de compuestos solubles tóxicos, la interacción con la microbiota presente (111). Estos factores también incluirían desde la adsorción de bacterias y bacteriófagos en sedimentos, hasta los efectos

ambientales más diversos (13, 19, 24, 55, 92, 110), que favorecerían la supervivencia de las células más resistentes o mejor adaptadas.

Todos estos factores podrían afectar de forma selectiva a la población de células, ya que es heterogénea, inactivando antes a las células más cercanas, en el caso de la predación o a las más sensibles, en el caso de otros factores. La acción de este tipo de factores produciría una cinética cóncava ($n < 1$), que afecta a la mayoría de las células inoculadas de forma selectiva (13, 39, 98, 99, 101, 102). Las células sensibles morirían primero dejando una cola de supervivientes como la que aparece en las **Figs. 4.8 y 4.9** y se debería, bien a la resistencia de algunas células o a la menor accesibilidad de éstas por parte de los procesos de inactivación/es. Un ejemplo de este último caso podría ser dado por las partículas en suspensión en los efluentes secundarios o aguas de estanque, que protegen a las bacterias de la predación, mejorando su capacidad de supervivencia y proveyendo de un sitio donde los nutrientes puedan estar concentrados (112). Además, en 1986, Klein, T. y Alexander, M. reportaron que además de los factores inactivantes mencionados anteriormente, en algunos casos los agentes bactericidas son compuestos de gran peso molecular presentes en concentraciones pequeñas (21), que se ven favorecidos en su actividad inactivadora cuando el pH es bajo (102).

Es importante destacar que las cinéticas de inactivación observadas en las diferentes muestras del estanque son muy semejantes a los observados en las muestras de efluentes secundarios. También fue parecida a la observada por Korhonen y Martikainen (109), pero en muestras de agua de lago, y Arana, *et al.* (66) con agua de río, sobre todo en el caso de la muestra con TTI. En éste caso ellos al igual que nosotros, apoyan que la ausencia de competición por nutrientes y predación por protozoos favorecen la supervivencia de *E. coli* (109).

5.3. IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS POTENCIALES DE INACTIVACIÓN DE *E. coli* J08 EN LAS AGUAS RESIDUALES TRATADAS

5.3.1. Efecto de la suspensión en agua destilada sobre la viabilidad de *E. coli* J08

Nuestros resultados mostraban una clara asociación de las cinéticas de depuración en dos grandes grupos, 1) las aguas relativamente limpias, sin, o con pocos, factores inactivantes que muestran cinéticas convexas, con valores de n superiores a 1 y 2) las aguas sucias, con numerosos y variados agentes inactivantes, que muestran curvas de inactivación cóncavas, con valores de n menores que 1. En el primer grupo se encuentran el agua de grifo, agua destilada, efluente terciario con microfiltración, efluente terciario zona de alimentación de la ósmosis inversa y efluente terciario con permeado de ósmosis inversa (ver **Figs. 4.12, 4.19 y 4.20**). En el segundo grupo están las aguas naturales contaminadas, estanques y efluentes secundarios.

Los ensayos con agua destilada desionizada autoclavada y no autoclavada, mostraron de forma clara que cuanto más limpia este un agua, mayor es la viabilidad y tiempo de supervivencia de *E. coli*. En éste experimento la cepa en estudio ha permanecido viable y cultivable por más de tres meses. Este resultado nos sorprendió en un principio, porque pensábamos, con un criterio muy antropocéntrico, que las bacterias se morirían de hambre. Posteriormente hemos podido comprobar en la literatura que esta capacidad de supervivencia en agua destilada no solo de *E. coli*, sino de otros muchos géneros bacterianos (39), hasta el punto de que algunos autores recomiendan la conservación de cepas en agua destilada estéril.

La gran supervivencia de *E. coli* en agua destilada podría atribuirse a que allí suspendidas, sin ninguna otra molécula, excepto las de agua que pueda interaccionar con ellas, las células se comportan como sacos de enzimas, completamente inertes. Podríamos concluir que, para morir, las células necesitan un mínimo de actividad metabólica. Esta hipótesis se ve apoyada por los resultados obtenidos con agua destilada a la que se le agregaron determinados compuestos químicos como sales (ver **apartado 3.4.2.5**), para reproducir de cierta manera un agua residual sintética en los que se pudo

observar un pequeño descenso de la población (ver **Fig. 4.12-B**). Cuando además se añade glucosa, la inactivación aumenta (ver **Fig. 4.11**).

Se ha sugerido que la ausencia de nutrientes no es el causante de la muerte de *E. coli* y ni de otras bacterias, sino que se debe a que el agua podría contener uno o más inactivantes (102). Nuestros resultados apoyan esta hipótesis en el sentido de que hemos comprobado que las células no se mueren de hambre, al menos durante meses, y tienen que existir otros mecanismos de inactivación. Esto podría ser explicado si admitimos que el proceso de muerte implica una cierta actividad metabólica, que las condiciones del ensayo podrían permitir debido a la presencia de la glucosa. Es una hipótesis que está fuertemente apoyada por el hecho de que, como ya hemos citado, las bacterias se mantienen viables, algunas durante años, en agua destilada estéril, es decir en ausencia de nutrientes (113). Un candidato obvio es el envejecimiento celular, que discutiremos más adelante.

5.3.2. Efecto de la microbiota presente en el efluente y eliminable por filtración en el laboratorio

Trabajábamos con la hipótesis de que las diferentes cinéticas de inactivación que habían sido descritas previamente y encontradas en la literatura se debían a la acción predominante de distintos factores con mecanismos de acción diferentes (20) y principalmente los microorganismos predadores de bacterias (23, 66, 114, 115). Para comprobar esta hipótesis se procedió a eliminar secuencialmente estos factores, centrifugando y filtrando las muestras de efluentes para eliminar las partículas mayores de 0,22 μm de diámetro, lo que incluía a la mayoría de los protozoos, otras bacterias presentes retenidas en el filtro, algas productoras de toxinas y la materia sólida en suspensión.

Nuestros resultados (**Fig. 4.13**), nos indican que la eliminación progresiva de los factores anteriores hace disminuir, como era de esperar, la capacidad de autodepuración del efluente, al contrario de los resultados obtenidos por Ravva y Korn en el 2007 (41). En éste caso ellos justifican que pudo deberse que al filtrar las muestras se eliminaron muchos nutrientes inorgánicos, así como los microorganismos nativos que favorecían la degradación de la materia orgánica presente, y que serviría de fuente de energía para la cepa en estudio, además

de la presencia de colifagos (41). En algún caso también nosotros hemos observado que la filtración tiene un efecto poco intenso. Un ejemplo se describe en la **Fig. 4.13**, que corresponde a la muestra Sec. I. 7.2, con un valor de n igual a 0,25 semejante al de Sec. CFI 7.3 que tuvo 0,37. Por lo tanto, al parecer en este caso la mayoría del o de los factores inactivantes fueron solubles o tuvieron un tamaño menor a 0,22 μm pudiendo pasar a través del poro del filtro de la membrana, como ha sido descrito anteriormente (39, 70, 111). En el caso de la muestra Sec. CFTTI 7.4, el tratamiento térmico parece ser el más eficiente a la hora de eliminar la mayor parte de los factores inactivantes de un efluente, como se puede comprobar en la **Fig. 4.13** y que presentó un valor de n igual a 1,05.

Con estos datos obtenidos de la centrifugación y filtración, podíamos concluir que una parte importante de los factores inactivantes están relacionados con compuestos solubles y la microbiota presente. Esa conclusión está corroborada por los resultados de los experimentos en los que la fase filtrable se reinoculó en la suspensión de la que fue separada (ver **Figs. 4.14**). Cuando a la suspensión sin elementos inactivantes se le añadió una suspensión de lo que había quedado retenido en el filtro, se recuperó la capacidad de inactivación. Una parte importante de esa capacidad se debió, al menos en este caso a los protozoos, ya que cuando de la materia retenida en el filtro se aislaron los protozoos y luego de cultivarlos de tal manera a aumentar su densidad fue reinoculada en un efluente CFTTI, se obtuvo una inactivación mayor (**Fig. 4.15**).

El modelo matemático basado en la distribución de Weibull ha sido también muy útil a la hora de calcular las contribuciones relativas de los diferentes grupos de factores inactivantes y los tiempos a lo largo de la autodepuración en que cada uno de ellos es más relevante. La primera derivada de esta ecuación, dividida por la biomasa instantánea mide la tasa específica con que los microorganismos están siendo inactivados en cada momento. Hemos calculado esta tasa específica, K , en un efluente completo y los efluentes tratados en el laboratorio tratando de separar los diferentes tipos de agentes inactivantes. La **Fig. 4.16** muestra la acción de los protozoos, inoculados en un efluente al que se le intentaron suprimir el resto de los agentes inactivantes por filtración y

tratamiento térmico. Observamos una elevada tasa de inactivación inicial de 1,5 células inactivadas por célula viva y por día se mantiene, con valores decrecientes durante la primera semana y luego se mantiene prácticamente constante, con valores muy pequeños durante el resto del período de incubación. La explicación de esta elevada tasa inicial reside en que al haber una elevada concentración de *E. coli* J08, se facilita la acción de los predadores, como los protozoos, para poder alimentarse con mayor facilidad. La disminución de la tasa de inactivación a partir de la segunda semana podría deberse a la baja concentración de las bacterias, que dificulta su captura por parte de los protozoos haciendo que quede una población muy pequeña que puede notarse en forma de una cola en la cinética de inactivación. Por otra parte, cuando se comparan las tasas iniciales de inactivación del efluente completo con las del efluente sin fase biótica no filtrable en la que se han reinoculado los protozoos, se comprueba que se recupera casi un 70% de la tasa de inactivación inicial (**Fig. 4.17**). No podemos asegurar que la concentración de protozoos inoculados fue la misma que existía en el efluente completo. Probablemente fue mayor, debido a que fueron resuspendidos en un medio de mantenimiento que permitía su crecimiento. Pero en cualquier caso, podemos concluir que entre los agentes inactivantes que se pueden eliminar por filtración, los protozoos son agentes inactivantes muy significativos aunque solo durante la primera semana del proceso de autodepuración, perdiendo importancia después. Ya hemos mencionado anteriormente que quizá haya otros factores bióticos o abióticos no filtrables involucrados, que no hemos intentado identificar, pero probablemente de menor importancia.

5.3.3. Efecto de los componentes termosensibles

Hacia 1889, Giaxa ya advirtió que las bacterias podían sobrevivir muy bien en aguas que hayan recibido un tratamiento térmico (115, 116). En nuestro trabajo hemos confirmado esos resultados. En la **Fig. 4.13** se puede ver que la muestra con tratamiento térmico ha perdido gran parte de su capacidad de autodepuración. Es decir que gran parte de los compuestos filtrables con actividad inactivante son termosensibles (41, 42, 54, 92).

Los agentes inactivantes que son resistentes al tratamiento térmico, podrían ser metales pesados (102, 115). Jones en 1963, sugirió que cuando hay presencia de metales pesados en una muestra, luego de autoclavar, éstos se quelan, dando lugar a compuestos tóxicos que favorecen la inactivación de *E. coli* (115, 117). Niewwolak y Chomutowska en 1996, sugirieron que éstos metales pesados podrían ser Sn, Cd, Cu, Ni, Pb, Hg, Mn y Zn (22).

Pero un factor que no se puede descartar y que estará siempre presente es la mortalidad natural de las células, que podría ocurrir por una acumulación de fallos metabólicos, además de la acción de otro/s factor/es inactivante/s (102) o por el envejecimiento celular.

Algunos autores, como Van Elsas *et al*, sugieren que bajo condiciones de ausencia de nutrientes, para poder mantenerse viables las células comienzan a metabolizar sus componentes celulares, empezando por las proteínas y el RNA, mientras protegen el DNA. Sin embargo estos tipos de respuestas son aún muy complejas de entender (13, 118).

Si admitimos que el único proceso que provoca la inactivación celular en un efluente al que se le han retirado los factores bióticos no filtrables y los filtrables termosensibles es el envejecimiento celular, este proceso aportaría una tasa de inactivación muy baja, inferior al 10% de la tasa inicial y podría por si solo explicar la lenta inactivación observada a partir del décimo día de proceso (**Fig.4.17**)

En términos relativos y considerando el conjunto de los resultados discutidos más arriba, podemos describir el proceso de autodepuración como una secuencia en la que los diversos mecanismos subyacentes se van sucediendo a lo largo del tiempo. Esto es lo que describe la **Fig. 4.18**, en la que podemos observar el aporte cuantitativo de cada uno de los grupos de agentes inactivantes a la tasa total de inactivación que se observa en el efluente completo. Los agentes filtrables termosensibles son los más importantes desde el principio, aportando aproximadamente el 70% de la tasa de inactivación total en los primeros 5 días de autodepuración. Los protozoos y otros agentes no filtrables aportan el otro 30% en el mismo periodo. Transcurrida la primera semana la inactivación inicia su periodo lento en la que la fase filtrable sigue

siendo la dominante, la fase no filtrable prácticamente no aporta inactivación y el envejecimiento celular tiene una aportación creciente. A partir del décimo día la inactivación es muy lenta, solo un 10% de la tasa máxima inicial porque el envejecimiento se va convirtiendo en el único proceso inactivador activo.

5.3.4. Efecto de los tratamientos terciarios sobre la cinética de inactivación de *E. coli* J08

Los resultados de la capacidad de autodepuración de efluentes terciarios confirmaron la predicción que hicimos a partir de nuestros resultados con los efluentes tratados en el laboratorio para eliminar los grupos de agentes inactivantes. Tanto la microfiltración como la ósmosis inversa disminuyen la capacidad autodepuradora de los respectivos efluentes, mucho más el segundo tratamiento que el primero (**Fig. 4.19 y Fig. 4.20**). La microfiltración que se aplica a un efluente durante el tratamiento terciario, elimina en forma significativa los factores inactivantes presentes, en comparación con un efluente secundario completo y su efecto se podría comparar al efecto de un efluente centrifugado y filtrado en el laboratorio. Por otro lado, como se ha mencionado en el **apartado 1.3.2.4.2**, la ósmosis inversa es un tratamiento que elimina todos los componentes sólidos presentes en una fase acuosa, y esta eliminación de los compuestos sólidos permite que el agua conserve una capacidad muy reducida del poder auto depurador.

Esto nos indica que un efluente cuando recibe un tratamiento terciario de ósmosis inversa, aumenta su vulnerabilidad en caso de recontaminación con *E. coli*, por lo tanto es muy importante tener en cuenta esta situación para realizar controles específicos a modo de detectar una recontaminación en efluentes que hayan recibido un tratamiento similar o igual. Este control parece especialmente recomendable cuando se usen aguas residuales, regeneradas por tratamientos secundarios y terciarios que incluyan ósmosis inversa. Nos parece importante mencionar que, a primera vista, los tratamientos que limpian el agua de bacterias de forma no selectiva nos pueden parecer positivos, pero tienen el inconveniente de disminuir su capacidad de autodepuración de patógenos. Cuanto más limpia esté el agua, más indefensa estará frente a una posible recontaminación. Es un hecho que habrá que tener en cuenta en el análisis de riesgos, especialmente en algunos usos, como el rellenado de

acuíferos en los que la recontaminación por filtración o lixiviación de fecales pueda ocurrir.

5.4. OBSERVACIÓN DE LOS DAÑOS CELULARES INDUCIDOS DURANTE UN PROCESO DE AUTODEPURACIÓN

El uso de la microscopía de fluorescencia y el citómetro de flujo nos ha permitido conocer o confirmar algunos aspectos importantes del proceso de inactivación celular. En concreto hemos podido documentar que el proceso de inactivación, incluye, además de la predación que no se observa con esta técnica, unos mecanismos que dañan a la célula de forma que acaban destruyendo su membrana, lo que permite que se tiñan por el yoduro de propidio. Además hemos podido observar cambios morfológicos en la población celular que podrían deberse al crecimiento de las células individuales sin que hubiera división posterior. Efectivamente, en las muestras incubadas por un tiempo superior a 100 días, se observaron que algunas células aumentaron más de 10 μm de longitud (**Fig. 4.22**). Esta última situación también fue registrada por Na *et al.* en el 2006 en muestras de agua filtrada destilada (39) y en agua dulce por Arana, *et al.* en el 2003 (66). Esta modificación en la forma de las células que al compararlas con todas las observadas durante el período de la inoculación fueron diferentes, puede deberse al tiempo prolongado de ausencia de nutrientes (39) o a una estrategia de supervivencia, debido que al aumentar de tamaño resulta imposible ser consumidas por los flagelados (66).

Por otra parte, pudimos observar la presencia de formas bacilares más pequeñas. También otros autores (55, 64) han reportado disminución del tamaño de las células cuando se encuentran expuestas a situaciones muy prolongadas de ausencia de nutrientes u otros tipos de estrés, por lo cual pueden penetrar profundamente en materiales sólidos como rocas y areniscas (103). Oliver en 1999 sugirió que durante la reducción del tamaño celular se producen cambios significativos en la estructura de la membrana, composición de las proteínas, contenido ribosomal y del ADN (64). En la **Fig. 4.23** se puede apreciar en forma clara la diferencia de tamaños de las diferentes poblaciones de presentes en las muestras. No parece ser ese nuestro caso porque las minibacterias se mantienen viables y abundantes cuando la población de células capaces de crecer en Colilert (células lactosa + y beta-glucuronidasa +)

casi han desaparecido (ver en la **Fig. 4.23**, la curva de inactivación). No se trata por tanto de células de *E. coli* que hayan disminuido de tamaño, sino de otras bacterias pequeñas presentes en el efluente (70).

Las minibacterias, capaces de pasar el filtro de 0,22 μm y detectables por el citómetro han dificultado que esta última técnica haya podido ser usada, como era nuestra intención, para validar los resultados de cuantificación de la población viable por recuento en placa (**Figs. 4.24 y 25**).

5.5. HETEROGENEIDAD DE LA POBLACIÓN DE *E. coli* J08, MEDIDA EN CULTIVOS PROCEDENTES DE INÓCULOS UNICELULARES

Con la selección de un modelo matemático que describe la inactivación de una población de *E. coli* inoculada en agua y su validación a través del análisis de la bondad del ajuste en muy diversos tipos de aguas, habíamos cumplido uno de los objetivos generales de esta tesis, concretamente el objetivo 2, que consistía en: “Desarrollar un modelo matemático general que permita caracterizar, cuantificar y comparar la cinética de inactivación de *E. coli* en diferentes tipos de aguas y modelizar la cinética de la autodepuración en cada caso”. Este modelo, que ya ha demostrado su validez en la gran mayoría de los casos analizados en esta tesis, puede ser usado como un modelo empírico cuyos parámetros sirven para evaluar cuantitativamente la capacidad de autodepuración de cualquier tipo de agua. Más aún, uno de los parámetros del modelo, ***n***, el exponente al que está elevada la variable tiempo en la ecuación, puede servir para clasificar a los procesos de depuración en dos grandes grupos. El primer grupo lo constituyen las aguas cuya cinética de autodepuración muestra una curva convexa con un valor de ***n*** superior a 1, en el que se integran las aguas naturales limpias o las residuales regeneradas tras tratamientos terciarios. El segundo grupo está constituido por aguas cuya cinética es cóncava, con valores de ***n*** inferiores a 1, en el que se integran las aguas naturales contaminadas o las residuales sin tratar o tratadas sólo con tratamientos primarios y secundarios. A partir de esta clasificación podemos establecer la hipótesis, elaborada y descrita, entre otros, por Peleg en 2006, de que los mecanismos subyacentes al proceso de inactivación en cada uno de los diferentes grupos serían también diferentes (50). En la introducción hemos

explicado estas diferencias que podemos resumir aquí en que el mecanismo subyacente a una cinética convexa sería una acumulación de daños que va afectando a toda la población haciendo cada vez más débiles a todas las células que la componen, pero sin llegar a matarlas en los primeros momentos, mientras que en las cinéticas cóncavas habría muerte desde el primer momento de las células más débiles provocando una acumulación relativa de las más fuertes a medida que la población se va inactivando.

La heterogeneidad de las poblaciones microbianas, premisa básica de las hipótesis anteriores, es una característica que ha sido, está siendo analizada y confirmada por varios abordajes experimentales. Uno de los más utilizados es el que se basa en técnicas de la llamada “microbiología unicelular” que corresponde al estudio de cultivos, sólidos o líquidos, procedentes de inóculos con una sola célula. Trabajos como los descritos por Li et al. (79) y Ravva y Korn, A (41) han demostrado que determinados tratamientos o condiciones ambientales afectan en forma individual la capacidad de activación o de crecimiento de cada una de las células y que ese efecto puede ser medido por espectrofotómetros del tipo del Bioscreen C, que permite hacer un seguimiento individual de las poblaciones en cultivos procedentes de una sola célula, a través de lecturas continuas durante 24 h.

Nosotros hemos utilizado el Bioscreen C con cultivos procedentes de una sola célula para obtener una medida indirecta del estado fisiológico individual de las células de la población a lo largo de su incubación en distintos tipos de aguas. Este abordaje experimental está basado en dos premisas: 1) asumimos que el estado fisiológico de las células del inóculo es uno de los factores que determinan la duración de la fase de latencia y 2) el tiempo de detección, es decir el tiempo que tarda una cultivo procedente de una sola célula en alcanzar una densidad óptica determinada incubado en el Bioscreen, es proporcional y tiene la misma distribución estadística que el tiempo de latencia (88, 89) . El punto más crítico en el análisis de la validez de esta técnica estriba en la dificultad de conseguir que los pocillos reciban solo una célula como inóculo. No es nada fácil medir experimentalmente concentraciones tan bajas y por ello la cuantificación hay hacerla a través de una distribución estadística que prediga la probabilidad de que en un pocillo hayan caído, ninguna, una o más

células. La distribución habitualmente usada es la distribución de Poisson y el método que nosotros hemos utilizado es el descrito por Baranyi *et al.* (88), que permite asegurar con rigor estadístico que con más del 60% de pocillos sin crecimiento y con crecimiento en los restantes presenta una concentración entre 1 y 3 células.

Buchanan *et al.* en 1997 fue el primero en proponer que la transición entre la fase de latencia y la exponencial, es el resultado de la variación biológica entre las células individuales (119). Era previsible que cuanto más tiempo las células estuvieran expuestas al estrés, las variaciones biológicas individuales inducidas se reflejarían en el estado fisiológico celular por lo que unas células pasarían más tiempo que otras recuperándose en la fase de latencia (ver **Fig. 4.26**) antes de poder arrancar su reproducción característica de la fase exponencial (47, 120-122).

Hay que destacar, en primer lugar que nuestros resultados demuestran de forma inequívoca que la población es heterogénea, incluso desde el primer momento de su resuspensión en el agua. Si tomamos como control la suspensión en agua destilada, efectivamente se trata de una población poco dispersa, con tiempos de detección que se extiende por un rango relativamente limitado ya que el 90% de la población tiene tiempos de detección entre 8 y 9 horas (**Fig.4.27**). La simple inoculación de las bacterias, crecidas en un medio de cultivo de laboratorio, en agua natural como es la del estanque, ya provoca, instantáneamente, un aumento en la variabilidad. La mayoría de la población (80%) muestra ahora unos tiempos de detección algo mayores, entre 9 y 10 horas, y lo que es más significativo aparece un pequeño porcentaje (3%) de células más dañadas, con tiempos de detección de 11 horas (**Fig. 4.28**). Este efecto es mucho más marcado cuando las bacterias se inoculan en un efluente secundario centrifugado y filtrado. En este caso solo el 69% de las células resisten el choque manteniendo tiempos de detección como los del agua destilada y el 31% restante se distribuye en grupos con estados fisiológicos claramente afectados, porque son muy superiores al control, pero además en un rango bastante amplio, entre 11 y 25 horas de tiempo de detección.

Por otra parte, si se considera la evolución de esta variabilidad en cada tipo de agua, vemos que los resultados apoyan la hipótesis sobre el tipo de mecanismo que provoca la inactivación en cada caso que predice la cinética de inactivación. En primer lugar, en el agua destilada, con inactivación convexa y valor de n mayor que 1, el mecanismo postulado es una acumulación progresiva de daños en todas las células de la población que, durante los 25 días del experimento no llegan a provocar una pérdida significativa de la viabilidad. Eso es precisamente lo que se observa en la evolución del histograma de frecuencias del tiempo de detección que se muestra en la **Fig.4.27**. Es la población entera la que desplazando hacia valores de tiempos de detección un poco más altos. Solo a los 25 días de incubación aparecen algunas células dañadas que predicen el comienzo de la inactivación que ocurrirá después. Los daños se están acumulando, afectando de forma no selectiva a toda la población.

Le evolución de los histogramas de la suspensión en agua de estanque, es completamente diferente como corresponde a una cinética cóncava, con n menor que 1, que según la hipótesis de Peleg (50) corresponde a una acción selectiva de los agentes inactivantes sobre las células más sensibles. En efecto, tras 15 días de incubación, cuando sobreviven apenas 300 células por mL del millón inoculado, encontramos que la población se encuentra dividida en dos grandes grupos, el primero homogéneo, que incluye el 60% de los supervivientes, son células resistentes, en perfecto estado fisiológico, como lo demuestran sus tiempos de detección, entre 8 y 9 horas, semejantes al control. El otro grupo es el de las células dañadas, muy heterogéneo, con tiempos de detección entre 11 y 21 horas. La prolongación de la incubación en el agua del estanque hace disminuir todavía más a la población (sobreviven poco más de 10 células por mL) ya que van muriendo las células dañadas, pero siguen seleccionándose las resistentes, con tiempos de detección normales, que constituyen ya el 70% de la población. Así es como la población, aunque cada vez más pequeña, se va haciendo cada vez más resistente y provoca la cola de supervivientes que resulta tan difícil de eliminar (**Fig. 4.28**).

Los datos de la suspensión en el efluente, que también tiene una cinética de autodepuración cóncava con valor de n menor que 1. Muestra el mismo patrón de evolución con el tiempo que la del estanque, pero con las características exacerbadas por el mayor poder inactivante de alguno de sus componentes. Así, a los 10 días de incubación, cuando quedan solo unas 200 células por mL, aproximadamente la mitad tienen tiempos de detección normales, entre 8 y 10 horas, y la otra mitad constituyen un grupo muy heterogéneo de células dañadas en distinta magnitud con tiempos de detección que oscilan entre las 11y las 23 horas. Tras casi un mes de incubación se observa la principal diferencia con el agua del estanque. Aunque aún sobreviven algunas células no afectadas (7%) la inmensa mayoría de la población está formada por células muy dañadas con tiempos de detección largos, la mitad de ellas con valores superiores a 17 horas (**Fig. 4.29**).

Integrando estos resultados con los anteriores creemos que el modelo matemático único que proponemos para la descripción de la inactivación de *E. coli* en diversos tipos de aguas es adecuado, no solo por la evidencia empírica de la bondad de los ajustes encontrados en los distintos tipos de aguas, sino porque su base biológica, es decir que la capacidad de supervivencia está distribuida heterogéneamente entre las células de la población y puede ser descrita por una distribución estadística, quedando demostrada por los estudios en Bioscreen que estiman el estado fisiológico celular individual.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Los métodos Colilert y Chromocult son igualmente válidos para la recuperación de *E. coli* a partir de aguas residuales. Se recomienda el uso de Colilert porque con el uso simultáneo de bandejas con límite de detección diferente (200 y 2000 UFC/ml) permite aumentar la precisión sin aumentar las diluciones, una de las mayores fuentes de error experimental (y por tanto de incertidumbre) en el cálculo del número de viables.
2. Metodológicamente, el modelo matemático basado en la distribución de Weibull que proponemos puede ser empleado para describir la cinética de inactivación de las bacterias entéricas en aguas residuales, con la ventaja de que una sola ecuación permite describir las diferentes formas cinéticas observadas en los distintos tipos de aguas. El valor de uno de los parámetros del modelo, n , permite clasificar las cinéticas de inactivación en dos grandes grupos, según el valor de n sea mayor o menor que 1.
3. Científicamente, los resultados de la aplicación del modelo, apoyan la hipótesis de que los dos tipos de cinéticas de inactivación observadas (convexas y cóncavas) se deben a la acción diferencial de dos grandes grupos de factores, endógenos y exógenos, que se encuentran distribuidos de forma desigual en los distintos tipos de aguas naturales y tratadas.
4. En las aguas naturales limpias o residuales con tratamientos terciarios, predominan los factores endógenos, como el envejecimiento celular. En ellas la población responde de forma bastante homogénea, todas las células son igualmente dañadas, lo que determina cinéticas de inactivación convexas ($n > 1$), con periodos iniciales sin inactivación aparente.
5. En las aguas naturales contaminadas o residuales sin tratar o tratadas solo con tratamientos secundarios, predominan los factores exógenos (microbiota acompañante, toxinas, etc.) y la población responde de

forma heterogénea, con una eliminación secuencial de las células, comenzando por las más sensibles, lo que determina cinéticas cóncavas ($n < 1$) con colas de bacterias resistentes.

6. Tecnológicamente, hemos comprobado que una regeneración exhaustiva elimina los factores de autodepuración del agua, tornándola indefensa ante potenciales recontaminaciones, lo que constituye un riesgo potencial que debe ser tenido en cuenta, por ejemplo en el rellenado de acuíferos cercanos a núcleos urbanos.
7. En términos generales podemos concluir por tanto, que tanto el sistema experimental diseñado para medir la capacidad de depuración natural de los efluentes, como el modelo matemático desarrollado para describir cuantitativamente los resultados, son científica y tecnológicamente válidos.

REFERENCIAS

1. Fernández-Alba AR, Letón Garcia P, Rosal Garcia R, Dorado Valiño M, Villar Fernández S, Sanz García JM. vt2 biod. Informe de Vigilancia Tecnológica. Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales Segunda ed. España: Elecé Industria Gráfica; 2006. 136 p.
2. Sans R, Ribas J. Ingeniería Ambiental: Contaminación y Tratamientos. Barcelona, España: Marcombo S.A. ; 1989. 153 p.
3. Seoáñez M. Depuración de las aguas residuales por tecnologías ecológicas y de bajo costo. Colección Ingeniería del Medio Ambiente ed. Madrid-España: Mundi-Prensa Libros, s.a.; 2004. 464 p.
4. Henze M, Harremoës P, la Cour Jansen J, Arvin E. Wastewater Treatment. Biological and Chemical Processes. Berlin, Alemania: Springer; 2002. 433 p.
5. Bitton G. Wastewater Microbiology. USA: Wiley-Liss, Inc.; 2005. 765 p.
6. Kumar A, Bohra C, Singh Lk. Environment, Pollution and Management. New Delhi, India: Efficient Offset Printers; 2003. 607 p.
7. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman EW, Schreckenberger P. Koneman Diagnóstico Microbiológico, Texto y Atlas en Color. Argentina: Medica Panamericana; 2008. 1691 p.
8. García H. M, Martínez C. F, Utrilla A. A. ATS/DUE Vol. II Personal Laboral Grupo II. Junta de Extremadura. España: Mad, S.L.; 2006. 714 p.
9. Pascual A. M, Calderon y Pascual V. Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. Madrid, España: Diaz de Santos. S. A.; 1999. 464 p.
10. Edberg SC, Konnick CM. Comparison of 3-Glucuronidase-Based Substrate Systems for Identification of *Escherichia coli*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1986;24(3):368-71.

11. Bej AK, Dicesare JL, Haff L, Atlas RM. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella spp.* in Water by Using the Polymerase Chain Reaction and Gene Probes for uid. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991;57(4):1013-7.
12. BOE. Ministerio de la Presidencia. Real Decreto 1620 del 7 de diciembre 2007.
13. van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *International Society for Microbial Ecology*. 2011;5:173-83.
14. Schroeder E, Wuertz S. *Water and Wastewater Microbiology*. London, UK: Academic Press; 2003. 621 p.
15. Gerardi M, Zimmerman MC. *Wastewater Pathogens*. New Jersey, USA: Wiley-Interscience; 2005. 188 p.
16. Gerardi M. *Wastewater Bacteria*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2006. 255 p.
17. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Brock. Biología de los microorganismos*. 12 ed. España: Pearson Educación, S. A. ; 2009. 1259 p.
18. Guerrero R, Berlanga M. La "inmortalidad" procariótica y la tenacidad de la vida. *Sociedad Española de Microbiología*. 2001;32:16-23.
19. Barcina I, Arana I, Iriberrí J, Egea L. Factors affecting the survival of *E. coli* in a river. *Hydrobiologia*. 1986:249-53.
20. Belkin S, Colwell RR. *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. New York: Springer; 2005. 464 p.
21. Curtis TP, Mara DD, Silva SA. Influence of pH, oxygen, and humic substance on ability of sunlight to damage fecal coliforms in waste stabilization pond water. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992;58(4):1335-43.

22.Wcisło R, Chróst RJ. Survival of *Escherichia coli* in Freshwater. Polish Journal of Environmental Studies. 2000;9:215-22.

23.McCambridge J, McMeekin TA. Relative Effects of Bacterial and Protozoan Predators on Survival of *Escherichia coli* in Estuarine Water Samples. Applied and Environmental Microbiology. 1980;40(5):907-11.

24.Barcina I, González JM, Iriberry J, Egea L. Effect of Visible Light on Progressive Dormancy of *Escherichia coli* Cells during the Survival Process in Natural Fresh Water. Applied and Environmental Microbiology. 1989;55(1):246-51.

25.McCambridge J, McMeekin TA. Effect of Solar Radiation and Predacious Microorganisms on Survival of Fecal and Other Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 1981;41(5):1083-7.

26.Bratbak G, Heldal M, Norland S, Thingstad TF. Viruses as Partners in Spring Bloom Microbial Trophodynamics. Applied and Environmental Microbiology. 1990;56(5):1400-5.

27.García-Lara J, Pierre PM, Billen G. Mortality of Fecal Bacteria in Seawater. Applied and Environmental Microbiology. 1991;57(3):885-8.

28.González JM, Sherr EB, Sherr BF. Size-Selective Grazing on Bacteria by Natural Assemblages of Estuarine Flagellates and Ciliates. Applied and Environmental Microbiology. 1990;56(3):583-9.

29.Johstone DWM, Horan NJ. INSTITUTIONAL DEVELOPMENTS, STANDARDS AND RIVER QUALITY: A UK HISTORY AND SOME LESSONS FOR INDUSTRIALISING COUNTRIES. Pergamon. 1996;33(3):211-22.

30.Osorio R. F, Torres R. JC, Sanchez B. M. Tratamiento de aguas para la eliminación de microorganismos y agentes contaminantes.: Ediciones Díaz de Santos; 2010. 216 p.

31. Miller T. *Ciencia Ambiental: desarrollo sostenible, un enfoque integral*: Cengage Learning; 2007. 323 p.
32. Murillo D. JM, López G. JA, Rodríguez H. L. *Desarrollo Sostenible, uso Conjunto y Gestión Integral de Recursos Hídricos*. Alicante, España: Torreangulo 2010. 398 p.
33. Drechsel P, Scott C, Raschid-Sally L, Redwood M, Bahri A. *Wastewater Irrigation and Health*. Inglaterra: Earthscan; 2010. 432 p.
34. Rigola M. *Tratamiento de aguas industriales: aguas de proceso y residuales*. España: Marcombo; 1989. 160 p.
35. Sette R. *Tratamiento de aguas residuales: Reverte*; 1996. 705 p.
36. Hernández A, Tejerina F, Arribas J, Martínez L, Martínez F. *Microfiltración, Ultrafiltración y Ósmosis Inversa*. España: Lerko Print, S. A. ; 1990. 140 p.
37. Cabildo M. MP, Claramunt V. RM, Cornago R. MP. *Reciclado Y Tratamiento de Residuos*: UNED - Madrid; 2010. 390 p.
38. Hankin EH. L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du cholera. . *Annales de l'Institut Pasteur*. 1896;10:511.
39. Na SH, Miyanaga K, Unno H, Tanji Y. The survival response of *Escherichia coli* K12 in a natural environment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;72:386-92.
40. Czajkowska D, Boszczyk-Maleszak H, Sikorska I, Sochaj A. Studies on the Survival of Enterohemorrhagic and Environmental *Escherichia coli* Strains in Wastewater and in Activated Sludges from Dairy Sewage Treatment Plants. *Polish Journal of Microbiology*. 2008;57(2):165-71.

41. Ravva SV, Korn A. Extractable Organic Components and Nutrients in Wastewater from Dairy Lagoons Influence the Growth and Survival of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(7):2191-8.
42. Arana I, Justo JI, Muela A, Barcina I. Survival and plasmid transfer ability of *Escherichia coli* in wastewater. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2001;126:223-38.
43. Czajkowska D, Boszczyk-Maleszak H, Sikorska I, Sochaj A. Studies on the survival of Enterohemorrhagic and environmental *Escherichia coli* Strains in Wastewater and in Activated Sludges from Dairy Sewage Treatment Plants. *Polish Journal of Microbiology*. 2008;57:165-71.
44. Watts RJ, Kong S, Orr MP, Miller GC, Henry BE. Photocatalytic inactivation of coliform bacteria and viruses in secondary wastewater effluent. *Pergamon*. 1994;29(1):95-100.
45. Whiting R. Microbial Modeling in Foods. . *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1995;35(6):467-94.
46. Ross T, McMeekin J. Predictive Microbiology. *International Journal of Food Microbiology*. 1994;23:241-64.
47. Baranyi JP, C. Estimating Bacterial Growth Parameters by Means of Detection Times. *American Society for Microbiology*. 1999;65(2):732-6.
48. McKellar R, Lu X. Modeling Microbial Responses in Food. Canadá: CRC Press; 2004. 342 p.
49. Chen H, D H. Use of Weibull model to describe and predict pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2004;5:269-76.

50. Peleg M. Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems. Models for Predicting Growth and Inactivation. USA: Taylor & Francis Group, LLC; 2006. 390 p.

51. McClure PJ, Baranyi J, Boogard E, Kelly TM, Roberts TA. A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*. International Journal of Food Microbiology. 1993;19:161-78.

52. Ross T. Indices for Performance Evaluation of Predictive Models in Food Microbiology. Journal of Applied Bacteriology. 1996;81:501-8.

53. Postgate JR. Death in microbes and macrobes. In The Survival of Vegetative Microbes. Edited by Gray TRG, Postgate JR. Cambridge, UK: University Press; 1976. p. 1-19.

54. Xu H, Roberts N, Singleton F, Attwell RW, Grimes DJ, Colwell RR. Survival and Viability of Nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the Estuarine and Marine Environment. Microb Ecol. 1982;8:313-23.

55. Roszak DB, Colwell RR. Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol Rev. 1987;365-79.

56. Linder K, Oliver JD. Membrane Fatty Acid and Virulence Changes in the Viable but Nonculturable State of *Vibrio vulnificus*. Applied and Environmental Microbiology. 2004;55(11):2837-42.

57. Kell DB, Young M. Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. Current Opinion in Microbiology. 2000;3:238-43.

58. Arana I, Seco C, Epelde K, Muela A, Fernández-Astorga A, Barcina I. Relationships between *Escherichia coli* cells and the surrounding medium during survival processes. Antonie van Leeuwenhoek. 2004;86:189-99.

59. Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods*. 2003;53(2):175-83.
60. Barcina I, Arana I. The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria? *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2009;8:245-55.
61. Nyström T. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Arch Microbiol*. 2003;176:159-64.
62. Aertsen A, Michiels C. Stress and How Bacteria Cope with Death and Survival. *Crit Rev Microbiol*. 2004;30(4):263-73.
63. Bogosian G, Bourneuf EV. A matter of bacterial life and death. *Embo Reports*. 2001;2(9):770-4.
64. Oliver JD. The viable but nonculturable state and cellular resuscitation. In CR Bell, M Brylinsky, and P Johnson-Green (eds), *Microbial Biosystems: New Frontiers Atlantic Canada Soc Microb Ecol*, Halifax, Canada. 1999:723-30.
65. Muela A, Seco C, Camafeita E, Arana I, Orruño M, López JA, et al. Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiology Ecology*. 2008;64(1):28-36.
66. Arana I, Irizar A, Seco C, Muela A, Fernández-Astorga A, Barcina I. gfp-Tagged Cells as a Useful Tool to Study the Survival of *Escherichia coli* in the Presence of the River Microbial Community. *Microbial Ecology*. 2003;45(1):29-38.
67. Craig DL, Fallowfield HJ, Cromar NJ. Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;96:922-30.

68. Makinoshima H, Akiko Nishimura A, Ishihama A. Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. *Molecular Microbiology*. 2002;43(2):269-79.
69. Rodriguez GG, Phipps D, Ishiguro K, Ridgway HF. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992;58(6):1801-8.
70. Monfort P, Baleux B. Comparison of flow cytometry and epifluorescence microscopy for counting bacteria in aquatic ecosystems. *Cytometry*. 1992;13(2):188-92.
71. Chen P-S, Li C-S. Bioaerosol characterization by flow cytometry with fluorochrome. *J Environ Monit*. 2005;7:950-9.
72. Arana I, Justo JI, Muela A, Pocino M, Iriberry J, Barcina I. Influence of a Survival Process in a Freshwater System upon Plasmid Transfer Between *Escherichia coli* Strains. *Microb Ecol*. 1997;33:41-9.
73. Cochran WG. Estimation of Bacterial Densities by Means of the "Most Probable Number". *Biometrics*. 1950;6(2):105-16.
74. Woodward RL. How probable is the most probable number? *Journal (American Water Works Association) JSTOR*. 1957:1060-8.
75. Hurley M, Roscoe M. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. *Journal of Applied Bacteriology*. 1983;55(159-164):159-64.
76. Niemelä S. Uncertainty of Quantitative Determinations Derived by cultivation of Microorganisms. Helsinki, Finlandia: Mittatekniikan Keskus; 2002. 77 p.
77. Niemelä S. Metrologia. Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Finlandia: Mikes; 2003. 83 p.

78.Francois K, Devlieghere F, Standaert A, Geeraerd A, Van Impe JF, Debevere J. Modelling the individual cell lag phase. Isolating single cells: protocol development. *Applied Microbiology*. 2003;37(1):26-30.

79.Li Y, Odumeru J, Griffiths M, McKellar R. Effect of environmental stresses on the mean and distribution of individual cell lag times of *Escherichia coli* O157H7. *International Journal of Food Microbiology*. 2006;110(3):278-85.

80.Stephens P, Joynson J, Davies K, Holbrook R, Lappin-Scott H, Humphrey T. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *Journal of Applied Microbiology*. 1997;83:445-55.

81.Krist KA, Ross T, McMeekin TA. Final optical density and growth rate; effects of temperature and NaCl differ from acidity. *International Journal of Food Microbiology*. 1998;43:195-203.

82.Métris A, George SM, Peck MW, Baranyi J. Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. *Journal of Microbiological Methods*. 2003;55(3):821-7.

83.Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana; 2007. 963 p.

84.Robinson TP, Aboaba OO, Kaloti A, Ocio MJ, Baranyi J, Mackey BM. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001;70:163-73.

85.Begot C, Desnier I, Daudin JD, Labadie JC, Lebert A. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*. 1996;25:225-32.

86.Pumarola A, Rodriguez-Torres A, García-Rodríguez JA, Piédrola-Angulo G. *Microbiología y Parasitología Médica*. Barcelona, España: MASSON, S.A.; 1987. 916 p.

87. Striegel AM, Yau WW, Kirkland JJ, Bly DD. Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography. New Jersey, USA: WILEY & SONS. Inc.; 2009. 494 p.
88. Baranyi J, George SM, Kotalik Z. Parameter estimation for the distribution of single cell lag times. *Journal of Theoretical Biology*. 2009;259:24-30.
89. Métris A, George S, Baranyi J. Use of optical density detection times to assess the effect of acetic acid on single-cell kinetics. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(10):6674-9.
90. Silva MCS, García B. J, del Castillo T. J, Ania P. JM, Gómez M. D. Técnico Especialista en Laboratorio. OSAKIDETZA. Servicio Vasco de Salud. España: Mad S.L.; 2006. 642 p.
91. Esteban G, Téllez C. Método de aislamiento, cultivo y bioensayo de toxicidad con protozoos ciliados. *Microbiología SEM*. 1990;6:100-3.
92. Petit M, George I, Servais P. Survival of *Escherichia coli* in freshwater: B-D-Glucuronidase activity measurements and characterization of cellular states. *Canadian Journal of Microbiology*; . 2000:679-84.
93. Yakub G, Castric D, Stadterman-Knauer K, Tobin M, Blazina M, Heineman T, et al. Evaluation of Colilert and Enterolert defined substrate methodology for wastewater applications. *Water Environment Research*. 2002;74(2):131-5.
94. Porter J, Diaper J, Edwards C, Pickup R. Direct Measurements of Natural Planktonic Bacterial Community Viability by Flow Cytometry. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(7):2783-6.
95. Campos A, Muñoz C, Rubio G. Manual de prácticas de Inmunología: Masson S.A.; 2004. 127 p.
96. Brenner KP, Rankin CC, Sivaganesan M, Scarpino PV. Comparison of the recoveries of *Escherichia coli* and total coliforms from drinking water by the MI

agar method and the US environmental protection agency-approved membrane filter method. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(1):203-8.

97. Eccles J, Searle R, Holt D, Dennis P. A comparison of methods used to enumerate *Escherichia coli* in conventionally treated sewage sludge. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;96:375-83.

98. Van Donsel DJ, Geldreich EE, Clarke NA. Seasonal variations in survival of indicator bacteria in soil and their contribution to storm-water pollution. *Applied Microbiology*. 1967;15(6):1362-70.

99. Edmonds R. Survival of coliform bacteria in sewage sludge applied to a forest clearcut and potential movement into groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*. 1976;32(4):537-346.

100. Hirn J, Viljamaa H, Raevuori M. The effect of physicochemical, phytoplankton and seasonal factors on faecal indicator bacteria in northern brackish water. *Water Research*. 1980;14(3):279-85.

101. Crane SR, Moore JA. Modeling enteric bacterial die-off: A review. *Water, Air, & Soil Pollution*. 1986;27(3):411-39.

102. Klein TM, Alexander M. Bacterial inhibitors in lake water. *Applied and Environmental Microbiology*. 1986;52(1):114-8.

103. Stevik KT, Aa K, Ausland G, Hanssen JF. Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: a review. *Water Research*. 2004;38(6):1355-67.

104. Anderson IC, Rhodes MW, Kator HI. Seasonal variation in survival of *Escherichia coli* exposed in situ in membrane diffusion chambers containing filtered and nonfiltered estuarine water. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983;45(6):1877-83.

105. Awong J, Bitton G, Chaudhry GR. Microcosm for Assessing Survival of Genetically Engineered Microorganisms in Aquatic Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990;56(4):977-83.
106. McCambridge J, McMeekin TA. Effect of temperature on activity of predators of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in estuarine water. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. 1980;31(6):851 - 5.
107. Rhodes MW, Kator H. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* in Estuarine Environmentst. *American Society for Microbiology*. 1988:2902-7.
108. Pommepuy M, Butin M, Derrein A, Gourmelon M, Colwell RR, Cormier M. Retention of enteropathogenecity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(12):4621-6.
109. Korhonen LK, Martikainen PJ. Survival of *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* in untreated and filtered lake water. *Journal of Applied Bacteriology*. 1991:379-82.
110. Carlucci AF, Pramer D. An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in sea water. *Appl Microbiol* 1959;8:247-50.
111. Banning N, Toze S, Mee BJ. *Escherichia coli* survival in groundwater and effluent measured using a combination of propidium iodide and the green fluorescent protein. *Journal of Applied Microbiology*. 2002;93(1):69-76.
112. Fish JT, Pettibone GW. Influence of freshwater sediment on the survival of *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* as measured by three methods of enumeration. *Applied Microbiology*. 1995;20:277-81.
113. Liao C-H, Shollenberger LM. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Letters in Applied Microbiology*. 2003;37:45-50.

114. Enzingeri RM, Cooper RC. Role of bacteria and protozoa in the removal of *Escherichia coli* from estuarine waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 1976;31(5):758-63.
115. Mitchell R. Factors affecting the decline of non-marine microorganisms in seawater. *Water Research Pergamon Press*. 1968;2:535-43.
116. Giaksa G. Ueber das Verhalten einiger pathogener Mikroorganismen im Meerwasser. *Medical Microbiology and Immunology*. 1889;6(1):162-224.
117. Jones G. Effect of chelating agents on the growth of *Escherichia coli* in seawater. *Journal of Bacteriology*. 1964;87(3):483-99.
118. Ihssen J, Egli T. Global physiological analysis of carbon- and energy-limited growing *Escherichia coli* confirms a high degree of catabolic flexibility and preparedness for mixed substrate utilization. *Environmental Microbiology*. 2005;7(10):1568-81.
119. McKellar R, Knight K. A combined discrete - continuous model describing the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 2000;54:171-80.
120. Ramírez J, Contreras G, Gómez M. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Latinoamericana de Microbiología*. 2005;47(3-4):92-101.
121. Swinnen I, Bernaerts K, Dens E, Geeraerd A, Impe J. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;94:137-59.
122. Baranyi J. Comparison of Stochastic and Deterministic concepts of bacterial lag. *Journal of Theoretical Biology*. 1998;192:403-8.

ANEXO: 1
Real Decreto 1620/2007

ANEXO II**Métodos de análisis**

- Grado Brix: EN 12143 (1996). IFU n.º 8.
 Acidez total: EN 12147 (1996). IFU n.º 3.
 Fructosa: EN 1140 (1994). IFU n.º 55. EN 12630 (1999).
 IFU n.º 67.
 Glucosa: EN 1140 (1994). IFU n.º 55. EN 12630 (1999).
 IFU n.º 67.
 Sacarosa: EN 12146 (1994). IFU n.º 56. EN 12630 (1999).
 IFU n.º 67.
 Ácido cítrico: EN 1137 (1994). IFU n.º 22.
 Ácido D-isocítrico: EN 1139 (1994). IFU n.º 54.
 Densidad relativa 20/20.º: EN 1131 (1994). IFU n.º 1. IFU
 n.º 1A
 Índice de formol: EN 1133 (1994). IFU 30.
 Cenizas: EN 1135 (1994). IFU n.º 9.
 Fósforo: EN 1136 (1994). IFU n.º 50.
 Potasio: EN 1134 (1994). IFU n.º 33.
 Sorbitol: EN 12630 (1998) IFU n.º 67. IFU n.º 62.
 Ácido D-málico: EN 12138 (1997). IFU n.º 64.
 Ácido L-málico: EN 1138. IFU n.º 21.
 Ácido ascórbico: EN 14130. Vitamina C (ácido ascór-
 bico + Ácido dehidroascórbico). IFU 17-A.
- Parámetros isotópicos:
 δ^{18} O agua: EN V 12141 (1997).
 (D/H)1 Etanol 2H-NMR: AOAC 995.17 (1999).
 δ^{13} C azúcar: EN V 12140 (1997).
 δ^{13} C etanol: J. AOAC Vol 79, n.º 1 (1996).
 δ^{13} C pulpa: EN V 13070 (2001).
 δ^{13} C ácidos: Anal. Chim. Acta 299 (1994).

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

21092 REAL DECRETO 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.

La Ley 11/2005, de 22 de junio, por la que se modifica la Ley 10/2001, de 5 de julio, del Plan Hidrológico Nacional, contiene una modificación del texto refundido de la Ley de Aguas, aprobado por el Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, en la que se ha dado nueva redacción del artículo 109.1 «el Gobierno establecerá las condiciones básicas para la reutilización de las aguas, precisando la calidad exigible a las aguas depuradas según los usos previstos. El titular de la concesión o autorización deberá sufragar los costes necesarios para adecuar la reutilización de las aguas a las exigencias de calidad vigentes en cada momento».

Se mantiene, sin modificación, el apartado 2 del artículo 109, en el que se recoge la obligación de obtener concesión administrativa que quedará sustituida por una autorización cuando quien solicite el aprovechamiento de las aguas depuradas sea el titular de la autorización de vertido que dio lugar a la depuración de dichas aguas.

Se completa la modificación del artículo 109 con la supresión de los apartados 3, 4 y 5 del precepto.

Este profundo cambio legislativo exige adaptar los artículos del Reglamento del Dominio Público Hidráulico, aprobado por el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, dedicados a la reutilización.

Este real decreto se inscribe, además, en el mandato que el artículo 19.2 de la Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad, impone a las autoridades sanitarias de participar en la elaboración y ejecución de la legislación sobre aguas, por lo que en su articulado prevé su intervención en aquellos aspectos de la reutilización de aguas no contemplados en las especificaciones técnicas y que podrían suponer un riesgo para la salud de los ciudadanos. Con el real decreto, se cumple también con el objetivo general previsto en la mencionada Ley General de Sanidad, sobre la necesaria participación de las Administraciones competentes en este ámbito mediante la vigilancia sanitaria, la promoción y la mejora de los sistemas que permiten alcanzar parámetros de calidad de aguas compatibles con la salud de la población.

Se hace preciso establecer una regulación reglamentaria más completa y detallada que posibilite las soluciones necesarias respecto de la reutilización. De este modo, se define el concepto de reutilización y se introduce la denominación de aguas regeneradas, más acorde con las posibilidades de reutilización que la norma establece y ampliamente admitida en la doctrina técnica y jurídica. Se determinan los requisitos necesarios para llevar a cabo la actividad de utilización de aguas regeneradas, los procedimientos para obtener la concesión exigida en la ley así como disposiciones relativas a los usos admitidos y exigencias de calidad precisas en cada caso.

Finalmente, debe destacarse la incorporación de dos anexos; el anexo I recoge los criterios de calidad para la utilización de las aguas regeneradas según los usos. Estos criterios tendrán la consideración de mínimos obligatorios exigibles. Por su parte el anexo II contiene el modelo normalizado de solicitud que deben presentar quienes deseen obtener la concesión o autorización de reutilización de aguas depuradas.

Este real decreto deroga, con carácter general, cuantas disposiciones de igual o inferior rango se opongan a lo en él dispuesto y, en particular, los artículos 272 y 273 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico.

En el procedimiento de elaboración de esta norma se ha consultado a las comunidades autónomas, a las entidades locales y al Consejo Nacional del Agua.

Debe significarse que aunque el Tribunal Constitucional ha exceptuado de regulación mediante normas reglamentarias las condiciones básicas en una determinada materia, también ha señalado que esta excepción no es absoluta, pudiendo regularse reglamentariamente aquellas materias que por su carácter técnico o coyuntural, como es el caso, hacen imposible una determinación ex lege de sus requisitos básicos.

En su virtud, a propuesta de los Ministros de Medio Ambiente, de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo, con la aprobación previa de la Ministra de Administraciones Públicas, de acuerdo con el Consejo de Estado y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 7 de diciembre de 2007,

DISPONGO:

CAPÍTULO I**Disposiciones generales**

Artículo 1. *Objeto.*

Este real decreto tiene por objeto establecer el régimen jurídico para la reutilización de las aguas depuradas, de acuerdo con el artículo 109.1 del texto refundido de la Ley de Aguas, aprobado por el Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio.

Artículo 2. *Definiciones.*

A los efectos de este real decreto se entiende por:

a) Reutilización de las aguas: aplicación, antes de su devolución al dominio público hidráulico y al marítimo terrestre para un nuevo uso privativo de las aguas que, habiendo sido utilizadas por quien las derivó, se han sometido al proceso o procesos de depuración establecidos en la correspondiente autorización de vertido y a los necesarios para alcanzar la calidad requerida en función de los usos a que se van a destinar.

b) Aguas depuradas: aguas residuales que han sido sometidas a un proceso de tratamiento que permita adecuar su calidad a la normativa de vertidos aplicable.

c) Aguas regeneradas: aguas residuales depuradas que, en su caso, han sido sometidas a un proceso de tratamiento adicional o complementario que permite adecuar su calidad al uso al que se destinan.

d) Estación regeneradora de aguas: conjunto de instalaciones donde las aguas residuales depuradas se someten a procesos de tratamiento adicional que puedan ser necesarios para adecuar su calidad al uso previsto.

e) Infraestructuras de almacenamiento y distribución: conjunto de instalaciones destinadas a almacenar y distribuir el agua regenerada hasta el lugar de uso por medio de una red o bien depósitos móviles públicos y privados.

f) Sistema de reutilización de las aguas: conjunto de instalaciones que incluye la estación regeneradora de aguas, en su caso, y las infraestructuras de almacenamiento y distribución de las aguas regeneradas hasta el punto de entrega a los usuarios, con la dotación y calidad definidas según los usos previstos.

g) Primer usuario: persona física o jurídica que ostenta la concesión para la primera utilización de las aguas derivadas.

h) Usuario del agua regenerada: persona física o jurídica o entidad pública o privada que utiliza el agua regenerada para el uso previsto.

i) Punto de entrega de las aguas depuradas: lugar donde el titular de la autorización de vertido de aguas residuales entrega las aguas depuradas en las condiciones de calidad exigidas en la autorización de vertido, para su regeneración.

j) Punto de entrega de las aguas regeneradas: lugar donde el titular de la concesión o autorización de reutilización de aguas entrega a un usuario las aguas regeneradas, en las condiciones de calidad según su uso previstas en esta disposición.

k) Lugar de uso del agua regenerada: zona o instalación donde se utiliza el agua regenerada suministrada.

l) Autocontrol: programa de control analítico sobre el correcto funcionamiento del sistema de reutilización realizado por el titular de la concesión o autorización de reutilización de aguas.

Artículo 3. *Régimen jurídico de la reutilización.*

1. La reutilización de las aguas procedentes de un aprovechamiento requerirá concesión administrativa tal como establecen los artículos 59.1 y 109 del texto refundido Ley de Aguas. Será aplicable a la reutilización el régimen jurídico establecido en las secciones 1.^a «La concesión de aguas en general» y 2.^a «Cesión de derechos al uso privativo de las aguas» del capítulo III del título IV del texto refundido de la Ley de Aguas.

2. No obstante lo establecido en el apartado anterior, en el caso de que la reutilización fuese solicitada por el titular de una autorización de vertido de aguas residuales, se requerirá solamente una autorización administrativa.

3. En el caso de que no coincidan en una misma persona, física o jurídica, la condición de primer usuario de

las aguas y de titular de la autorización de vertido se entenderá preferente la solicitud de reutilización que hubiese presentado el titular de la autorización de vertido.

4. La misma preferencia a favor del titular de la autorización de vertido se entenderá reconocida respecto de las solicitudes de concesión de reutilización que presenten terceros que no coincidan con el primer usuario de las aguas.

CAPÍTULO II

Condiciones básicas para la reutilización de las aguas depuradas

Artículo 4. *Usos admitidos para las aguas regeneradas.*

1. Las aguas regeneradas podrán utilizarse para los usos indicados en el anexo I.A.

2. En los supuestos de reutilización del agua para usos no contemplados en el anexo I.A, el organismo de cuenca exigirá las condiciones de calidad que se adapten al uso más semejante de los descritos en el mencionado anexo. Será necesario, en todo caso, motivar la reutilización del agua para un uso no descrito en el mismo.

3. En todos los supuestos de reutilización de aguas, el organismo de cuenca solicitará de las autoridades sanitarias un informe previo que tendrá carácter vinculante.

4. Se prohíbe la reutilización de aguas para los siguientes usos:

a) Para el consumo humano, salvo situaciones de declaración de catástrofe en las que la autoridad sanitaria especificará los niveles de calidad exigidos a dichas aguas y los usos.

b) Para los usos propios de la industria alimentaria, tal y como se determina en el artículo 2.1 b) del Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, salvo lo dispuesto en el anexo I.A.3.calidad 3.1c) para el uso de aguas de proceso y limpieza en la industria alimentaria.

c) Para uso en instalaciones hospitalarias y otros usos similares.

d) Para el cultivo de moluscos filtradores en acuicultura.

e) Para el uso recreativo como agua de baño.

f) Para el uso en torres de refrigeración y condensadores evaporativos, excepto lo previsto para uso industrial en el anexo I.A.3.calidad 3.2.

g) Para el uso en fuentes y láminas ornamentales en espacios públicos o interiores de edificios públicos.

h) Para cualquier otro uso que la autoridad sanitaria o ambiental considere un riesgo para la salud de las personas o un perjuicio para el medio ambiente, cualquiera que sea el momento en el que se aprecie dicho riesgo o perjuicio.

Artículo 5. *Criterios de calidad.*

1. Las aguas regeneradas deben cumplir en el punto de entrega los criterios de calidad según usos establecidos en el anexo I.A. Si un agua regenerada está destinada a varios usos serán de aplicación los valores más exigentes de los usos previstos.

2. Los organismos de cuenca, en las resoluciones por las que otorguen las concesiones o autorizaciones de reutilización, podrán fijar valores para otros parámetros o contaminantes que puedan estar presentes en el agua regenerada o lo prevea la normativa sectorial de aplicación al uso previsto para la reutilización. Asimismo,

podrán fijar niveles de calidad más estrictos de forma motivada.

3. La calidad de las aguas regeneradas se considerará adecuada a las exigencias de este real decreto si el resultado del control analítico realizado de acuerdo con lo previsto en el anexo I.B cumple con los requisitos establecidos con el anexo I.C

4. El titular de la concesión o autorización de reutilización de aguas es responsable de la calidad del agua regenerada y de su control desde el momento en que las aguas depuradas entran en el sistema de reutilización hasta el punto de entrega de las aguas regeneradas.

5. El usuario del agua regenerada es responsable de evitar el deterioro de su calidad desde el punto de entrega del agua regenerada hasta los lugares de uso.

6. Las responsabilidades previstas en los apartados 4 y 5 se entenderán sin perjuicio de la potestad de supervisión y control de las autoridades ambientales y sanitarias.

7. La concesión de reutilización podrá ser modificada como consecuencia de las variaciones o modificaciones que se aprueben respecto de la concesión otorgada para el uso privativo del agua al primer usuario de la misma.

CAPÍTULO III

Contratos de cesión de derechos sobre aguas regeneradas

Artículo 6. *Características de los contratos de cesión de derechos sobre aguas regeneradas.*

1. Los titulares de la concesión de reutilización y los titulares de la autorización complementaria para reutilización de las aguas podrán suscribir contratos de cesión de derechos de uso de agua de acuerdo con lo establecido en los artículos 67 y 68 de la texto refundido de la Ley de Aguas con las siguientes particularidades:

a) El volumen anual susceptible de cesión no será superior al que figure en la concesión o autorización otorgada.

b) La Administración pública al autorizar el contrato suscrito, además de velar por el cumplimiento de los criterios previstos en el artículo 68.3 texto refundido de la Ley de Aguas., observará que se cumplen los criterios de calidad en relación a los usos a que se vayan a destinar los caudales cedidos.

2. Quienes obtienen la concesión o la autorización de reutilización podrán ceder, en los términos que establece el artículo 343 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico, aprobado por el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, con carácter temporal a otro concesionario o titular de derechos de igual rango, la totalidad o parte de los derechos de uso que le correspondan, percibiendo a cambio la compensación económica que establece el artículo 345.2 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico. De igual modo podrán participar en las operaciones de los Centros de Intercambio de Derechos.

CAPÍTULO IV

Procedimiento para la reutilización de aguas depuradas

Artículo 7. *La reutilización de aguas a través de iniciativas o planes de las Administraciones Públicas.*

1. Con la finalidad de fomentar la reutilización del agua y el uso más eficiente de los recursos hidráulicos, las Administraciones Públicas estatal, autonómica o local, en el ámbito de sus respectivas competencias, podrán llevar a cabo planes y programas de reutilización de aguas. En estos planes se establecerán las infraestructuras

que permitan llevar a cabo la reutilización de los recursos hidráulicos obtenidos para su aplicación a los usos admitidos. En dichos planes se especificará el análisis económico-financiero realizado y el sistema tarifario que corresponda aplicar en cada caso. Asimismo, estos planes y programas serán objeto del procedimiento de evaluación ambiental estratégica conforme a lo establecido en la Ley 9/2006, de 28 de abril, sobre evaluación de los efectos de determinados planes y programas en el medio ambiente.

2. En la ejecución de los citados planes y programas, se cumplirán las exigencias establecidas en el artículo 109 del texto refundido de la Ley de Aguas, y en este real decreto respecto de la necesidad de obtener la concesión o autorización de reutilización de aguas por quien vaya a realizar la actividad.

3. Si la explotación se realiza de forma temporal o permanente por alguna de las administraciones públicas, estatal, autonómica o local, la concesión o autorización de reutilización se otorgará a nombre de la misma, o de la entidad o sociedad pública a quien se haya encomendado la ejecución de las infraestructuras o su explotación, que será la responsable del cumplimiento de todas las condiciones impuestas durante los periodos de prueba y explotación.

4. Cuando la explotación de una infraestructura correspondiese a determinados usuarios, será preciso que la Administración pública correspondiente lleve a cabo la entrega de dicha infraestructura formalizando el oportuno documento en el que deberán constar todas las circunstancias en las que se produce la entrega. En particular se mencionará el hecho de que se transfiere a los usuarios, desde ese momento, la concesión o autorización de reutilización del agua y en consecuencia la responsabilidad en el cumplimiento de las condiciones impuestas. En el ámbito de la Administración General del Estado, las Sociedades Estatales de Aguas solicitarán la necesaria concesión o autorización respecto de las instalaciones de reutilización que se le hubieran encomendado en el correspondiente Convenio de Gestión Directa.

5. Cuando la explotación del sistema de reutilización del agua se realice a través de contratos de concesión de obra pública, el concesionario estará obligado a solicitar la correspondiente concesión o autorización de reutilización.

Artículo 8. *Procedimiento para obtener la concesión de reutilización.*

1. Cuando la solicitud de concesión para reutilizar aguas sea formulada por quien ya es concesionario para la primera utilización de las aguas, el procedimiento se tramitará, sin competencia de proyectos, de acuerdo con lo establecido en este artículo.

2. El expediente se iniciará por el concesionario de las aguas para la primera utilización, que a tal efecto deberá presentar su solicitud dirigida al organismo de cuenca territorialmente competente en cualquiera de los lugares designados en el artículo 38.4 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, y en el modelo normalizado que figura en el anexo II, manifestando en ella su propósito de reutilizar las aguas, con indicación del uso para el que las solicita. Dicho modelo estará disponible en la página Web del Ministerio de Medio Ambiente.

3. El peticionario deberá presentar un proyecto de reutilización de aguas que incluya la documentación necesaria para identificar el origen y la localización geográfica de los puntos de entrega del agua depurada y regenerada; la caracterización del agua depurada; el volumen anual solicitado; el uso al que se va a destinar; el lugar de uso del agua regenerada especificando las caracte-

terísticas de las infraestructuras previstas desde la salida del sistema de reutilización de las aguas hasta los lugares de uso; las características de calidad del agua regenerada correspondientes al uso previsto así como el autocontrol analítico propuesto como establece el anexo I; el sistema de reutilización de las aguas; los elementos de control y señalización del sistema de reutilización; las medidas para el uso eficiente del agua y las medidas de gestión del riesgo en caso de que la calidad del agua regenerada no sea conforme con los criterios establecidos en el anexo I correspondientes al uso permitido.

4. Cuando el destino de las aguas regeneradas fuese el uso agrícola se acreditará la titularidad de las tierras que se pretenden regar a favor del peticionario o, en el caso de concesiones solicitadas por comunidades de usuarios, el documento que acredite que la solicitud de concesión ha sido aprobada por la Junta General. Se presentará en todo caso una copia actualizada del plano parcelario del catastro, donde se señalará la zona a regar. Cuando las características del agua regenerada superen los valores de los parámetros e indicadores definidos en el «anexo I.A. Uso Agrícola», el organismo de cuenca recabará, de acuerdo con las instrucciones técnicas vigentes, información adicional referida a los parámetros y las características de los cultivos.

5. El organismo de cuenca examinará la documentación presentada e informará sobre la compatibilidad o incompatibilidad de la solicitud con el Plan Hidrológico de cuenca atendiendo, entre otros, a los caudales ecológicos. En el primer caso continuará la tramitación del expediente; en el segundo denegará la solicitud presentada.

Simultáneamente solicitará el informe al que se refiere el artículo 25.3 del texto refundido de la Ley de Aguas, para el que se concede el plazo de un mes, transcurrido el cual, sin que se haya emitido, continuará la tramitación del expediente en los términos previstos en la Ley 30/1992, de 26 de noviembre.

6. A continuación, el organismo de cuenca elaborará una propuesta en la que se establecerán las condiciones en las que podría otorgarse la concesión para reutilizar las aguas. Este condicionado contendrá, entre otros extremos:

- a) El origen y la localización geográfica del punto de entrega del agua depurada;
- b) El volumen máximo anual en metros cúbicos y modulación establecida, caudal máximo instantáneo expresado en litros por segundo.
- c) El uso admitido.
- d) El punto de entrega y el lugar de uso del agua regenerada.
- e) Las características de calidad del agua regenerada que deben cumplir los criterios de calidad exigidos para cada uso que se establecen en el anexo I.A de este real decreto, hasta su punto de entrega a los usuarios.
- f) El sistema de reutilización de las aguas.
- g) Los elementos de control y señalización del sistema de reutilización.
- h) El programa de autocontrol de la calidad del agua regenerada que incluya los informes sobre el cumplimiento de la calidad exigida que se determinará conforme establece el anexo I.B y I.C.
- i) El plazo de vigencia de la concesión.
- j) Las medidas de gestión del riesgo en caso de calidad inadmisibles de las aguas para el uso autorizado.
- k) Cualquier otra condición que el organismo de cuenca considere oportuna en razón de las características específicas del caso y del cumplimiento de la finalidad del sistema de reutilización del agua.

7. Elaborada la propuesta de condiciones, se solicitará la conformidad expresa del peticionario que tendrá lugar en el plazo de diez días hábiles. Transcurrido este plazo, el organismo de cuenca notificará la resolución

expresa en el plazo máximo de un mes, contado desde que ha tenido constancia de la conformidad.

8. Si el solicitante no estuviera de acuerdo con las condiciones propuestas, presentará motivación justificada que podrá ser o no admitida, dando lugar a resolución expresa de la administración en el plazo de un mes.

9. De no haber respuesta, se denegará la concesión solicitada en el plazo de un mes, contado desde la notificación de la propuesta de condiciones.

Artículo 9. *Procedimiento para obtener la autorización de reutilización.*

1. Cuando el titular de la autorización de vertido presente una solicitud para reutilizar las aguas se le otorgará una autorización administrativa, que tendrá el carácter de complementaria a la de vertido, en la que se establecerán los requisitos y condiciones en los que podrá llevarse a cabo la reutilización del agua.

2. Si se solicita la obtención de una autorización de vertido manifestando el propósito de reutilizar las aguas residuales, la autorización de reutilización quedará supe-ditada al otorgamiento de la autorización de vertido.

3. Para obtener la autorización complementaria a la de vertido será preciso presentar la solicitud prevista en el anexo II con la información exigida en el artículo 8.3 y, en su caso, 8.4. Dicha solicitud se dirigirá al organismo de cuenca territorialmente competente en cualquiera de los lugares designados en el artículo 38.4 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre.

4. Los sucesivos trámites serán los establecidos en los párrafos 5, 6, 7, 8 y 9 del artículo 8.

Artículo 10. *Procedimiento para quien no es concesionario de la primera utilización ni titular de la autorización de vertido.*

Si quien formula la solicitud de concesión para reutilización es un tercero que no ostenta la condición de concesionario para la primera utilización, ni la de titular de la autorización de vertido de las aguas residuales, se seguirá el procedimiento que establece el Reglamento del Dominio Público Hidráulico para las concesiones en general, previa presentación de la solicitud para obtener la concesión de reutilización de aguas según el modelo del anexo II. La propuesta de condiciones en la que podría otorgarse la concesión para reutilizar las aguas determinará los extremos establecidos en el artículo 8.6 de este real decreto.

Artículo 11. *Disposiciones comunes a la concesión y autorización de reutilización de aguas.*

1. Tanto las concesiones de reutilización como las autorizaciones de reutilización serán inscritas en la Sección A) del Registro de Aguas en la forma que establece el artículo 192 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico.

2. El incumplimiento de las obligaciones derivadas del condicionado de la concesión o autorización de reutilización será sancionado con arreglo a lo dispuesto en el título VII del texto refundido de la Ley de Aguas.

3. El titular de la concesión o autorización de reutilización deberá sufragar los costes necesarios para adecuar la reutilización de las aguas a las exigencias de calidad vigentes en cada momento y responderá permanentemente de dicha adecuación.

Cuando proceda a juicio de la administración concedente, la sustitución de caudales concesionales por otros procedentes de la reutilización, la administración responderá de los gastos inherentes a la obra en los términos del

artículo 61.3 segundo párrafo del texto refundido de la Ley de Aguas.

Disposición transitoria primera. *Régimen transitorio de las reutilizaciones directas de aguas depuradas con concesión o autorización administrativa vigente.*

Las reutilizaciones directas de aguas depuradas que, a la entrada en vigor de este real decreto, cuenten con concesión o autorización administrativa deberán realizar las adaptaciones que resulten necesarias para poder cumplir las condiciones básicas de la reutilización y las obligaciones impuestas en este real decreto en el plazo de dos años contados desde su entrada en vigor.

Disposición transitoria segunda. *Régimen transitorio de los expedientes de reutilización directa de aguas depuradas, iniciados y no resueltos a la entrada en vigor de este real decreto.*

Los expedientes de reutilización directa, iniciados y no resueltos a la entrada en vigor de este real decreto, se resolverán conforme a la legislación vigente al tiempo de su solicitud, sin perjuicio de que una vez otorgada la correspondiente concesión o autorización, el titular de la misma deba realizar, en el plazo de dos años contados desde el otorgamiento de la autorización, las adaptaciones que resulten necesarias para poder cumplir las condiciones básicas de la reutilización y las obligaciones impuestas en este real decreto.

Disposición derogatoria única. *Derogación normativa.*

Quedan derogados los artículos 272 y 273 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico, así como cuantas disposiciones de igual o inferior rango se opongan a lo dispuesto en este real decreto.

Disposición final primera. *Carácter básico.*

Este real decreto tiene el carácter de legislación básica sobre sanidad y medio ambiente y sobre contratos y concesiones administrativas, de conformidad con lo dispuesto en el artículo 149.1.13.^a, 16.^a, 23.^a y 18.^a de la Constitución, excepto los artículos 3.3, 8 –salvo el primer párrafo de su apartado 5 que también tiene carácter de legislación básica ambiental de conformidad con lo establecido en el artículo 149.1.23.^a–, 9, 10 y 11.1, que serán exclusivamente de aplicación en las cuencas hidrográficas intercomunitarias, cuya gestión corresponde a la Administración General del Estado conforme al artículo 149.1.22.^a de la Constitución.

Disposición final segunda. *Desarrollo, aplicación y adaptación del real decreto.*

Por los Ministros de Medio Ambiente, de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo se dictarán conjunta o separadamente, según las materias de que se trate, y en el ámbito de sus respectivas competencias, las disposiciones que exija el desarrollo y aplicación de este real decreto.

Disposición final tercera. *Entrada en vigor.*

El presente real decreto entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Dado en Madrid, el 7 de diciembre de 2007.

JUAN CARLOS R.

La Vicepresidenta Primera del Gobierno
y Ministra de la Presidencia,
MARÍA TERESA FERNÁNDEZ DE LA VEGA SANZ

ANEXO I.A: CRITERIOS DE CALIDAD PARA LA REUTILIZACIÓN DE LAS AGUAS SEGÚN SUS USOS

CALIDAD REQUERIDA

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES ¹	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
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	

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

² Deben someterse a controles que aseguren el correcto mantenimiento de las instalaciones.

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

⁴ Unidades Formadoras de Colonias.

⁵ Unidades Nefelométricas de Turbiedad.

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

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

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

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

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
2.- USOS AGRÍCOLAS¹					
CALIDAD 2.1 ²					
a) Riego de cultivos con sistema de aplicación del agua que permita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles para alimentación humana en fresco.	1 huevo/10 L	100 UFC/100 mL Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases ³ con los siguientes valores: n = 10 m = 100 UFC/100 mL M = 1.000 UFC/100 mL c = 3	20 mg/L	10 UNT	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido de aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Legionella spp.</i> 1.000 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización) Es obligatorio llevar a cabo la detección de patógenos Presencia/Ausencia (Salmonella, etc.) cuando se repita habitualmente que c=3 para M=1.000

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

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

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

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

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)			
	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ
<p>CALIDAD 2.2</p> <p>a) Riego de productos para consumo humano con sistema de aplicación de agua que no evita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles, pero el consumo no es en fresco sino con un tratamiento industrial posterior.</p> <p>b) Riego de pastos para consumo de animales productores de leche o carne.</p> <p>c) Acuicultura.</p>	<p>1 huevo/10 L</p>	<p>1.000 UFC/100 mL</p> <p>Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases¹ con los siguientes valores: n = 10 m = 1.000 UFC/100 mL M = 10.000 UFC/100 mL c = 3</p>	<p>35 mg/L</p> <p>No se fija límite</p>	<p>OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Taenia saginata</i> y <i>Taenia solium</i>: 1 huevo/L (si se riegan pastos para consumo de animales productores de carne)</p> <p>Es obligatorio llevar a cabo detección de patógenos Presencia/Ausencia (<i>Salmonella</i>, etc.) cuando se repita habitualmente que c=3 para M=10.000</p>
<p>CALIDAD 2.3</p> <p>a) Riego localizado de cultivos leñosos que impida el contacto del agua regenerada con los frutos consumidos en la alimentación humana.</p> <p>b) Riego de cultivos de flores ornamentales, viveros, invernaderos sin contacto directo del agua regenerada con las producciones.</p> <p>c) Riego de cultivos industriales no alimentarios, viveros, forrajes ensilados, cereales y semillas oleaginosas.</p>	<p>1 huevo/10 L</p>	<p>10.000 UFC/100 mL</p>	<p>35 mg/L</p> <p>No se fija límite</p>	<p>OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Legionella spp.</i> 100 UFC/L</p>

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

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

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

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

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

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

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

¹ Nitrógeno total, suma del nitrógeno inorgánico y orgánico presente en la muestra

ANEXO I.B: FRECUENCIA MÍNIMA DE MUESTREO Y ANÁLISIS DE CADA PARÁMETRO

El control deberá realizarse a la salida de la planta de regeneración, y en todos los puntos de entrega al usuario.

La frecuencia de análisis se modificará en los siguientes supuestos:

- i. Tras 1 año de control se podrá presentar una solicitud motivada para reducir la frecuencia de análisis hasta un 50%, para aquellos parámetros que no sea probable su presencia en las aguas.
- ii. Si el número de muestras con concentración inferior al VMA del Anexo I.A es inferior al 90% de las muestras durante controles de un trimestre (o fracción, en caso de periodos de explotación inferiores), se duplicará la frecuencia de muestreo para el periodo siguiente.
- iii. Si el resultado de un control supera al menos en uno de los parámetros los rangos de desviación máxima establecidos en el Anexo I.C, la frecuencia de control del parámetro que supere los rangos de desviación se duplicará durante el resto de este periodo y el siguiente.

Las frecuencias mínimas de análisis se especifican en la tabla siguiente:

USO	CALIDAD	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SS	TURBIDEZ	Nº y PT	OTROS CONTAMINANTES	OTROS CRITERIOS
1.- USO URBANO	1.1 y 1.2	Quincenal	2 veces semana	Semanal	2 veces semana	-----	El Organismo de cuencia valorará la frecuencia de análisis sobre la base de la autorización de vertido y del tratamiento de regeneración.	Mensual
	2.1	Quincenal	Semanal	Semanal	Semanal	-----		Mensual
	2.2	Quincenal	Semanal	Semanal	-----	-----		Quincenal
2.3	Quincenal	Semanal	Semanal	-----	-----	-----		
3.- USO INDUSTRIAL	3.1	-----	Semanal	Semanal	Semanal	-----		Mensual
	3.2	Semanal	3 veces semana	Diaria	Diaria	-----		<i>Legionella spp.</i> 3 veces semana
4.- USO RECREATIVO	4.1	Quincenal	2 veces semana	Semanal	2 veces semana	-----		-----
	4.2	-----	Semanal	Semanal	-----	Mensual		-----
	5.1	-----	2 veces semana	Semanal	-----	Semanal		-----
5.- USO AMBIENTAL	5.2	Semanal	3 veces semana	Diaria	Diaria	Semanal		Semanal
	5.3	-----	-----	Semanal	-----	-----	-----	
	5.4	-----	-----	-----	-----	-----	Frecuencia igual al uso más similar	

ANEXO I.C: EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS AGUAS REGENERADAS

La calidad de las aguas regeneradas se valorará mediante el análisis de muestras tomadas sistemáticamente en todos los puntos de entrega de las mismas y con las frecuencias mínimas previstas en el Anexo I.B.

CRITERIOS DE CONFORMIDAD

La calidad de las aguas regeneradas se considerará adecuada a las exigencias de este real decreto si en los controles analíticos de un trimestre, o fracción cuando el periodo de explotación sea inferior, cumple simultáneamente:

- i. El 90% de las muestras tendrá resultados inferiores a los VMA en todos los parámetros especificados en el Anexo I.A.,
- ii. Las muestras que superen el VMA del Anexo I.A no sobrepasen los límites de desviación máxima establecidos a continuación
- iii. Para las sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las Normas de Calidad Ambiental en el punto de entrega de las aguas regeneradas según la legislación propia de aplicación

PARÁMETRO	LIMITE DE DESVIACIÓN MÁXIMA*
Nematodos intestinales	100% del VMA
<i>Escherichia coli</i>	1 unidad logarítmica
<i>Legionella spp</i>	1 unidad logarítmica
<i>Taenia saginata</i>	100% del VMA
<i>Taenia solium</i>	100% del VMA
Sólidos en suspensión	50% del VMA
Turbidez	100% del VMA
Nitratos	50% del VMA
Nitrógeno Total	50% del VMA
Fósforo Total	50% del VMA
*Se entiende por desviación máxima la diferencia entre el valor medido y el VMA	

MEDIDAS DE GESTIÓN FRENTE A INCUMPLIMIENTOS

- 1º. Se procederá a la suspensión del suministro de agua regenerada en los casos en los que no se cumplan los criterios de conformidad i e iii anteriores.
- 2º. Si en un control se superan en un parámetro los límites de desviación máxima de la tabla anterior, se procederá a realizar un segundo control a las 24 horas. En el caso de persistir esta situación se procederá a la suspensión del suministro.
- 3º. El suministro se reanudará cuando se hayan tomado las medidas oportunas en lo relativo al tratamiento para que la incidencia no vuelva a ocurrir, y se haya constatado que el agua regenerada cumple los VMA del Anexo I.A durante cuatro controles efectuados en días sucesivos.
- 4º. En los casos de incumplimiento descritos en los apartados 1º, 2º y 3º será de aplicación la modificación de frecuencias de control prevista en el Anexo I.B.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Los métodos o técnicas analíticas de referencia que se proponen en este Anexo se tomarán como referencia o guía. Se podrán emplear métodos alternativos siempre que estén validados y den resultados comparables a los obtenidos por el de referencia. Para el caso del análisis de contaminantes deberán cumplir los valores de incertidumbre y límite de cuantificación especificados en la tabla correspondiente.

Los análisis deberán ser realizados en laboratorios de ensayo que dispongan de un sistema de control de calidad según la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025.

MICROBIOLÓGICOS

PARÁMETRO	MÉTODOS O TÉCNICAS ANALÍTICAS DE REFERENCIA
Nematodos intestinales	Método Baillinger modificado por Bouhoum & Schwartzbrod. "Analysis of wastewater for use in agriculture". Ayres & Mara O.M.S. (1996)
<i>Escherichia coli</i>	Recuento de Bacterias <i>Escherichia Coli</i> β -Glucuronidasa positiva
<i>Legionella spp</i>	Norma ISO 11731 parte 1: 1998 Calidad del Agua. Detección y enumeración de <i>Legionella</i> .-
<i>Taenia saginata</i>	-----
<i>Taenia solium</i>	-----

CONTAMINANTES

PARÁMETRO	TÉCNICA DE REFERENCIA	U ¹	LC ²
Sólidos en suspensión	Gravimetría con filtro de fibra de vidrio	30%	5 mg/L
Turbidez	Nefelometría	30%	0,5 UNT
Nitritos	Espectroscopia de absorción molecular Cromatografía iónica	30%	10 mg NO ₂ /L
Nitrógeno Total	Suma de Nitrógeno Kjeldahl, nitratos y nitritos Autoanalizador	30%	3 mg N/L
Fósforo Total	Espectroscopia de absorción molecular Espectrofotometría de plasma	30%	0,5 mg P/L
Sustancias Peligrosas	Cromatografía Espectroscopia	Metales: 30% Orgánicos: 50%	30% de NCA

¹ Incertidumbre máxima expandida con un factor de cobertura de 2.

² Límite de cuantificación, es decir, concentración mínima de interés que puede determinarse con el nivel de incertidumbre requerido en la tabla.

ANEXO: 2
Ejemplo del Registro de Datos de Chromocult

SUPERVIVENCIA DE *E.coli* EN DIFERENTES TIPOS DE AGUA

Ensayo

X

Repetición

Datos Generales

Código del ensayo:	E3.2
Número del Efluente:	01
Nombre de la Depuradora:	Villaviciosa
Fecha de Ingreso:	14-10-08
Tipo de Muestra:	Efluente
Tipo de Tratamiento:	Secundario
Volumen de la Muestra:	2000 ml

Datos Físicoquímicos

pH:	6,9
DQO:	20 mg/l
DBO5:	4 mg/l
Sólidos totales:	2 mg/l
Fósforo total:	1,41 mg/l
Nitrógeno total:	8,15 mg/l
Amonio:	----
Nitratos:	----

Datos Experimentales

<i>E. coli</i>		Agitación		Luz		Volumen de alícuota	
J08	J09	Imán	Plancha	SI	NO	100 ml	500 ml
X			X		X	X	

Observaciones:

1- Los experimentos se realizaron en condiciones asépticas y sin alteraciones de las condiciones de incubación.

ANEXO: 3
Ejemplo del Registro de Datos de Colilert

SUPERVIVENCIA DE *E. coli* EN DIFERENTES TIPOS DE AGUA

Ensayo		Repetición	X
---------------	--	-------------------	----------

Datos Generales

Código del ensayo:	E13
Número del Efluente:	5
Nombre de la Depuradora:	Villaviciosa
Fecha de Ingreso:	03-03-10
Tipo de Muestra:	Efluente
Tipo de Tratamiento:	Secundario
Volumen de la Muestra:	2000 ml

Datos Fisicoquímicos

pH:	7,2
DQO:	32 mg/l
DBO5:	11 mg/l
Sólidos totales:	4 mg/l
Fósforo total:	0,62 mg/l
Nitrógeno total:	13,1 mg/l
Amonio:	2,1 mg/l
Nitratos:	6,1 mg/l

Datos Experimentales

<i>E. coli</i>		Agitación		Luz		Volumen de alícuota	
J08	J09	Imán	Plancha	SI	NO	100 ml	500 ml
X			X		X		X

Observaciones:

1- Los experimentos se realizaron en condiciones asépticas y sin alteraciones de las condiciones de incubación.

Experimento E13.1		Control	Tratamiento					Inoculado	Glucosa	Incubación			Concentración			Método de recuento		
Fecha inicio:	Sin		Centrifugado	Filtrado	Térmico	Fase biótica filtrada	Temperatura Ambiente			10°C	20°C	37°C	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	Collert	Chromocult	T.S.A.
04-03-10																		
Fecha termino:																		
07-04-10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Tiempo	Dilución	Pocillos +	UFC/ml	Lim inf	Lim sup	SEi	SEii	Tiempo	Log (Esperado)	Weibull								
0	1,00E-06	10/0	1,10E+07	5,70E+06	2,01E+07	0,32	---	0	6,87	logN	6,87							
0	1,00E-05	33/3	5,48E+06	3,92E+06	7,86E+06	0,17	---	1	6,64	b	0,23							
0			7,40E+06	5,52E+06	9,93E+06	---	0,15	2	6,61	n	0,18							
4	1,00E-06	4/0	4,10E+06	1,70E+06	9,50E+06	0,43	---	3	6,59									
4	1,00E-05	32/3	5,38E+06	3,73E+06	7,50E+06	0,17	---	4	6,57									
4			4,90E+06	3,54E+06	6,78E+06	---	0,17	5	6,56									
6	1,00E-06	2	2,00E+06	6,00E+05	7,30E+06	0,62	---	6	6,55									
6	1,00E-05	27/0	3,74E+06	2,45E+06	5,45E+06	0,20	---	7	6,54									
6			3,64E+06	2,54E+06	5,21E+06	---	0,18	8	6,53									
11	1,00E-05	22	2,88E+06	1,90E+06	4,39E+06	0,21	---	9	6,53									
11	1,00E-04	49/15	2,61E+06	1,71E+06	3,99E+06	0,21	---	10	6,52									
11			2,60E+06	1,95E+06	3,46E+06	---	0,15	11	6,51									
13	1,00E-05	25	3,44E+06	2,33E+06	5,12E+06	0,20	---	12	6,51									
13	1,00E-04	49/17	2,91E+06	1,90E+06	4,46E+06	0,21	---	13	6,50									
13			3,00E+06	2,26E+06	3,98E+06	---	0,14	15	6,49									
18	1,00E-05	19	2,38E+06	1,53E+06	3,73E+06	0,22	---	18	6,48									
18	1,00E-04	48/16	2,28E+06	1,58E+06	3,23E+06	0,18	---	18	6,48									
18			2,16E+06	1,63E+06	2,87E+06	---	0,15	19	6,48									
20	1,00E-05	26	3,64E+06	2,47E+06	5,39E+06	0,20	---	20	6,47									
20	1,00E-04	49/17	2,91E+06	1,90E+06	4,46E+06	0,21	---	20	6,47									
20			3,12E+06	2,35E+06	4,14E+06	---	0,14	25	6,46									
34	1,00E-04	49/21	3,65E+06	2,32E+06	5,56E+06	0,22	---	34	6,44									

ANEXO: 4
Efectos de la temperatura sobre la cinética de *E. coli*

SUPERVIVENCIA DE *E. coli* EN DIFERENTES TIPOS DE AGUA

Ensayo	X	Repetición	
---------------	----------	-------------------	--

Datos Generales

Código del ensayo:	E24
Número del Efluente:	-----
Nombre de la Depuradora:	-----
Fecha de Ingreso:	12-01-11
Tipo de Muestra:	Agua de Estanque
Tipo de Tratamiento:	-----
Volumen de la Muestra:	2000 ml

Datos Físicoquímicos

pH:	-----
DQO:	-----
DBO5:	-----
Sólidos totales:	-----
Fósforo total:	-----
Nitrógeno total:	-----
Amonio:	-----
Nitratos:	-----

Datos Experimentales

<i>E. coli</i>		Agitación		Luz		Volumen de alícuota	
J08	J09	Imán	Plancha	SI	NO	100 ml	500 ml
X		X	X		X		X

Observaciones:

- 1- Para la muestra incubada a 10°C la agitación se realizó a través de un imán, mientras que para la otra la agitación se realizó en una plancha.
- 2- Los experimentos se realizaron en condiciones asépticas y sin alteraciones de las condiciones de incubación.

Experimento E24.1		Control	Tratamiento					Inoculado	Glucosa	Incubación				Concentración			Método de recuento		
Fecha inicio:			Sin	Centrifugado	Filtrado	Térmico	Fase biótica filtrada			Temperatura Ambiente	10°C	20°C	37°C	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	Collert	Chromocult	T.S.A.
12-01-11																			
Fecha termino:																			
17-03-11																			
Tiempo	Dilución	Pocillos +	UFC/ml	Lim inf	Lim sup	SEi	SEii	Tiempo	Log (Esperado)	Weibull									
0	1,00E-05	11/4	1,68E+06	9,70E+05	2,68E+06	0,25	---	0	6,23	logN	6,23								
1	1,00E-05	23	3,06E+06	2,04E+06	4,63E+06	0,20	---	0,1	6,06	b	0,55								
2	1,00E-05	23	3,06E+06	2,04E+06	4,63E+06	0,20	---	0,2	5,99	n	0,51								
3	1,00E-05	13	1,50E+06	8,80E+05	2,57E+06	0,27	---	0,4	5,89										
5	1,00E-05	1	1,00E+05	3,00E+04	5,60E+05	0,73	---	0,6	5,81										
5	1,00E-04	9/0	9,80E+04	4,70E+04	1,84E+05	0,34	---	0,8	5,74										
5			9,78E+04	5,25E+04	1,82E+05	---	0,32	1	5,68										
8	1,00E-03	15	1,78E+04	1,08E+04	2,94E+04	0,25	---	2	5,45										
8	1,00E-03	19	2,38E+04	1,53E+04	3,73E+04	0,22	---	3	5,27										
8	1,00E-04	2	2,00E+04	6,00E+03	7,30E+04	0,62	---	5	4,98										
8	1,00E-04	3	3,10E+04	1,10E+04	9,00E+04	0,53	---	5	4,98										
8			2,12E+04	1,55E+04	2,91E+04	---	0,16	8	4,64										
12	1,00E-02	32	5,04E+03	3,54E+03	7,25E+03	0,18	---	8	4,64										
12	1,00E-03	7	7,50E+03	3,70E+03	1,55E+04	0,36	---	12	4,27										
12			5,38E+03	3,87E+03	7,48E+03	---	0,17	13	4,18										
13	1,00E-02	34	5,60E+03	3,97E+03	8,01E+03	0,18	---	14	4,10										
15	1,00E-03	4	4,10E+03	1,70E+03	9,50E+03	0,43	---	14,2	4,09										
19	1,00E-02	16	1,92E+03	1,19E+03	3,13E+03	0,24	---	14,4	4,07										
22	1,00E-01	48	1,45E+03	1,02E+03	2,24E+03	0,20	---	14,6	4,06										
28	1,00E-02	8	8,70E+02	4,50E+02	1,71E+03	0,33	---	14,8	4,04										
33	1,00E-03	3	3,10E+03	1,10E+03	9,00E+03	0,53	---	15	4,03										
48	1,00E-02	5	5,30E+02	2,30E+02	1,23E+03	0,42	---	19	3,74										
48	1,00E-01	16	1,92E+02	1,19E+02	3,13E+02	0,24	---	22	3,55										
48	0,00E+00	39/6	8,36E+01	5,96E+01	1,14E+02	0,16	---	28	3,19										
48			1,08E+02	8,18E+01	1,42E+02	---	0,14	33	2,93										
56	1,00E-01	10	1,11E+02	6,10E+01	2,05E+02	0,30	---	48	2,23										
56	0,00E+00	45/11	1,40E+02	9,93E+01	1,90E+02	0,16	---	56	1,90										
56			1,30E+02	9,86E+01	1,72E+02	---	0,14	56	1,90										

Experimento E24.2		Control	Tratamiento					Inoculado	Glucosa	Incubación			Concentración			Método de recuento		
Fecha inicio:	Sin		Centrifugado	Filtrado	Térmico	Fase biótica filtrada	Temperatura Ambiente			10°C	20°C	37°C	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	Collert	Chromocult	T.S.A.
12-01-11																		
Fecha termino:																		
14-02-11	X					X		X					X					
Tiempo	Dilución	Pocillos +	UFC/ml	Lim inf	Lim sup	SEi	SEii	Tiempo	Log (Esperado)	Weibull								
0	1,00E-05	18/0	2,18E+06	1,34E+06	3,39E+06	0,23	---	0	6,34	logN	6,34							
1	1,00E-05	10	1,11E+06	6,10E+05	2,05E+06	0,30	---	0,1	4,97	b	2,45							
3	1,00E-02	7/1	8,50E+01	3,90E+02	1,56E+03	0,35	---	0,2	4,71	n	0,25							
5	1,00E-01	20	2,54E+03	1,65E+02	3,94E+02	0,22	---	0,4	4,40									
5	1,00E+00	47/7	1,45E+02	1,01E+02	2,05E+02	0,18	---	0,6	4,18									
5			1,69E+02	1,28E+02	2,24E+02	---	0,14	0,8	4,02									
7	1,00E-01	5	5,30E+01	2,30E+01	1,23E+02	0,42	---	1	3,89									
7	1,00E+00	31	4,78E+01	3,34E+01	6,90E+01	0,18	---	3	3,09									
7			4,84E+01	3,45E+01	6,79E+01	---	0,17	5	2,64									
8	1,00E+00	17	2,07E+01	1,30E+01	3,33E+01	0,24	---	7	2,31									
8	1,00E+00	21	2,71E+01	1,77E+01	4,16E+01	0,21	---	7,5	2,24									
8			2,38E+01	1,73E+01	3,28E+01	---	0,16	8	2,17									
12	1,00E+00	35	5,91E+01	4,20E+01	8,44E+01	0,17	---	8,5	2,11									
13	1,00E+00	29	4,29E+01	2,97E+01	6,25E+01	0,19	---	12	1,72									
15	1,00E+00	7	7,50E+00	3,70E+00	1,55E+01	0,36	---	13	1,63									
20	1,00E+00	29	4,29E+01	2,97E+01	6,25E+01	0,19	---	15	1,45									
21	1,00E+00	35	5,91E+01	4,20E+01	8,44E+01	0,17	---	17	1,29									
22	1,00E+00	16	1,92E+01	1,19E+01	3,13E+01	0,24	---	19	1,15									
28	1,00E+00	4	4,20E+00	1,70E+00	1,07E+01	0,46	---	21	1,01									
33	1,00E+00	2	2,00E+00	6,00E-01	7,30E+00	0,62	---	23	0,89									
								25	0,77									
								27	0,66									
								29	0,56									
								30	0,51									
								31	0,46									
								32	0,41									
								33	0,37									

SUPERVIVENCIA DE *E. coli* EN DIFERENTES TIPOS DE AGUA

Ensayo		Repetición	X
---------------	--	-------------------	----------

Datos Generales

Código del ensayo:	E26
Número del Efluente:	-----
Nombre de la Depuradora:	-----
Fecha de Ingreso:	28-03-11
Tipo de Muestra:	Agua de Estanque
Tipo de Tratamiento:	-----
Volumen de la Muestra:	2000 ml

Datos Físicoquímicos

pH:	-----
DQO:	-----
DBO5:	-----
Sólidos totales:	-----
Fósforo total:	-----
Nitrógeno total:	-----
Amonio:	-----
Nitratos:	-----

Datos Experimentales

<i>E. coli</i>		Agitación		Luz		Volumen de alícuota	
J08	J09	Imán	Plancha	SI	NO	100 ml	500 ml
X			X	X			X

Observaciones:

- 1- Para la muestra incubada a 20°C la agitación se realizó a través de un imán, mientras que para la otra la agitación se realizó en una plancha.
- 2- Los experimentos se realizaron en condiciones asépticas y sin alteraciones de las condiciones de incubación.

Experimento E26.1		Control	Tratamiento					Inoculado	Glucosa	Incubación				Concentración			Método de recuento		
Fecha inicio:	Sin		Centrifugado	Filtrado	Térmico	Fase biótica filtrada	Temperatura Ambiente			10°C	20°C	37°C	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	Collert	Chromocult	T.S.A.	
Fecha termino:																			
29-03-11	03-05-11	X					X		X				X						
Tiempo	Dilución	Pocillos +	UFC/ml	Lim inf	Lim sup	SEi	SEii	Tiempo	Log (Esperado)	Weibull									
0	1,00E-05	13/2	1,71E+06	9,90E+05	2,74E+06	0,25	---	0	6,230	logN	6,23								
2	1,00E-05	6	6,30E+05	3,00E+05	1,39E+06	0,38	---	0,2	6,090	b	0,44								
6	1,00E-04	9	9,90E+04	5,30E+04	1,88E+05	0,32	---	0,4	6,000	n	0,72								
8	1,00E-03	16	1,92E+04	1,19E+04	3,13E+04	0,24	---	0,6	5,922										
13	1,00E-02	14	1,64E+03	9,80E+02	2,75E+03	0,26	---	0,8	5,852										
15	1,00E-01	30	4,53E+02	3,15E+02	6,56E+02	0,18	---	1	5,786										
15	1,00E-02	9	9,90E+02	5,30E+02	1,88E+03	0,32	---	2	5,500										
15			5,22E+02	3,75E+02	7,27E+02	---	0,17	3	5,253										
28	1,00E+00	18/1	2,31E+01	1,42E+01	3,57E+01	0,23	---	4	5,029										
30	1,00E+00	10	1,11E+01	6,10E+00	2,05E+01	0,30	---	5	4,820										
35	1,00E+00	6	6,30E+00	3,00E+00	1,39E+01	0,38	---	6	4,623										
								7	4,435										
								8	4,255										
								9	4,081										
								10	3,912										
								13	3,432										
								16	2,982										
								19	2,556										
								22	2,148										
								25	1,756										
								28	1,377										
								31	1,009										
								35	0,534										

Experimento E26.2		Control	Tratamiento					Inoculado	Glucosa	Incubación				Concentración			Método de recuento		
Fecha inicio:	Sin		Centrifugado	Filtrado	Térmico	Fase biótica filtrada	Temperatura Ambiente			10°C	20°C	37°C	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	Collert	Chromocult	T.S.A.	
Fecha termino:																			
29-03-11																			
03-05-11		X					X					X		X					
Tiempo	Dilución	Pocillos +	UFC/ml	Lim inf	Lim sup	SEi	SEii	Tiempo	Log (Esperado)	Weibull									
0	1,00E-05	13/0	1,48E+06	8,50E+05	2,51E+06	0,27	---	0	6,170	logN	6,17								
8	1,00E+00	36	6,24E+01	4,46E+01	8,88E+01	0,17	---	0,2	4,288	b	2,56								
8	1,00E-01	10	1,11E+02	6,10E+01	2,05E+02	0,30	---	0,4	4,021	n	0,19								
8	1,00E-02	2	2,00E+02	6,00E+01	7,30E+02	0,62	---	0,6	3,848										
8			7,21E+01	5,29E+01	9,82E+01	---	0,16	0,8	3,716										
13	1,00E+00	50	2,01E+02	1,36E+02	3,88E+02	0,26	---	1	3,609										
14	1,00E-01	17	2,07E+02	1,30E+02	3,33E+02	0,24	---	2	3,247										
28	1,00E+00	17	2,07E+01	1,30E+01	3,33E+01	0,24	---	3	3,011										
30	1,00E+00	17	2,07E+01	1,30E+01	3,33E+01	0,24	---	4	2,833										
35	1,00E+00	7	7,50E+00	3,70E+00	1,55E+01	0,36	---	5	2,687										
								6	2,564										
								7	2,456										
								8	2,360										
								9	2,273										
								10	2,194										
								13	1,989										
								16	1,820										
								19	1,675										
								22	1,547										
								25	1,432										
								28	1,329										
								31	1,234										
								35	1,118										

SUPERVIVENCIA DE *E. coli* EN DIFERENTES TIPOS DE AGUA

Ensayo	X	Repetición	
---------------	----------	-------------------	--

Datos Generales

Código del ensayo:	E27
Número del Efluente:	-----
Nombre de la Depuradora:	-----
Fecha de Ingreso:	10-05-11
Tipo de Muestra:	Agua de Estanque
Tipo de Tratamiento:	-----
Volumen de la Muestra:	2000 ml

Datos Fisicoquímicos

pH:	-----
DQO:	-----
DBO5:	-----
Sólidos totales:	-----
Fósforo total:	-----
Nitrógeno total:	-----
Amonio:	-----
Nitratos:	-----

Datos Experimentales

<i>E. coli</i>		Agitación		Luz		Volumen de alícuota	
J08	J09	Imán	Plancha	SI	NO	100 ml	500 ml
X		X	X		X		X

Observaciones:

- 1- Para la muestra incubada a 37°C la agitación se realizó a través de un imán, mientras que para la otra la agitación se realizó en una plancha.
- 2- Los experimentos se realizaron en condiciones asépticas y sin alteraciones de las condiciones de incubación.

Experimento E27.1		Control	Tratamiento					Inoculado	Glucosa	Incubación				Concentración			Método de recuento		
Fecha inicio:	Sin		Centrifugado	Filtrado	Térmico	Fase biótica filtrada	Temperatura Ambiente			10°C	20°C	37°C	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	Collert	Chromocult	T.S.A.	
Fecha termino:																			
10-05-11	19-05-11	X					X				X		X		X				
Tiempo	Dilución	Pocillos +	UFC/ml	Lim inf	Lim sup	SEi	SEii	Tiempo	Log (Esperado)	Weibull									
0	1,00E-05	23/3	3,41E+06	2,23E+06	4,92E+06	0,20	---	0	6,53	logN	6,53								
1	1,00E-05	8/0	8,60E+05	4,50E+05	1,69E+06	0,33	---	0,2	6,11	b	1,36								
2	1,00E-03	5/0	5,20E+03	2,30E+03	1,19E+04	0,41	---	0,4	5,83	n	0,74								
6	1,00E+00	15/2	1,99E+01	1,19E+01	3,09E+01	0,24	---	0,6	5,59										
8	1,00E+00	1/0	1,00E+00	3,00E-01	5,60E+00	0,73	---	0,8	5,37										
9	1,00E+00	0						1	5,17										
								2	4,26										
								3	3,47										
								4	2,75										
								5	2,07										
								6	1,43										
								7	0,82										
								8	0,23										
								9	-0,34										

Experimento E27.2		Control	Tratamiento					Inoculado	Glucosa	Incubación				Concentración			Método de recuento		
Fecha inicio:	Sin		Centrifugado	Filtrado	Térmico	Fase biótica filtrada	Temperatura Ambiente			10°C	20°C	37°C	104	106	108	Collert	Chromocult	T.S.A.	
10-05-11																			
Fecha termino:																			
19-05-11	X					X		X					X						
Tiempo	Dilución	Pocillos +	UFC/ml	Lim inf	Lim sup	SEi	SEii	Tiempo	Log (Esperado)	Weibull									
0	1,00E-05	10/2	1,32E+06	7,10E+05	2,20E+06	0,28	---	0	6,120	logN	6,12								
2	1,00E-03	3/0	3,10E+03	7,00E+02	8,90E+03	0,64	---	0,2	5,229	b	1,99								
6	1,00E-01	1	1,00E+01	3,00E+00	5,60E+01	0,73	---	0,4	4,860	n	0,50								
6	1,00E+00	4/3	7,20E+00	2,90E+00	1,37E+01	0,39	---	0,6	4,576										
6			7,56E+00	5,82E+00	9,80E+00	---	0,14	0,8	4,337										
8	1,00E+00	2/0	2,00E+00	3,00E-01	7,10E+00	0,79	---	1	4,126										
9	1,00E+00	3/0	3,10E+00	7,00E-01	8,90E+00	0,64	---	2	3,299										
								3	2,665										
								4	2,129										
								5	1,658										
								6	1,231										
								7	0,839										
								8	0,474										
								9	0,131										

SUPERVIVENCIA DE *E. coli* EN DIFERENTES TIPOS DE AGUA

Ensayo		Repetición	X
---------------	--	-------------------	----------

Datos Generales

Código del ensayo:	E28
Número del Efluente:	-----
Nombre de la Depuradora:	-----
Fecha de Ingreso:	13-10-10
Tipo de Muestra:	Agua de Estanque
Tipo de Tratamiento:	-----
Volumen de la Muestra:	1000 ml

Datos Fisicoquímicos

pH:	-----
DQO:	-----
DBO5:	-----
Sólidos totales:	-----
Fósforo total:	-----
Nitrógeno total:	-----
Amonio:	-----
Nitratos:	-----

Datos Experimentales

<i>E. coli</i>		Agitación		Luz		Volumen de alícuota	
J08	J09	Imán	Plancha	SI	NO	100 ml	500 ml
X			X		X		X

Observaciones:

- 1- Para la muestra incubada a 20°C la agitación se realizó a través de un imán, mientras que para la otra la agitación se realizó en una plancha.
- 2- Los experimentos se realizaron en condiciones asépticas y sin alteraciones de las condiciones de incubación.

Experimento E28.2		Control	Tratamiento					Inoculado	Glucosa	Incubación				Concentración			Método de recuento		
Fecha inicio:	Sin		Centrifugado	Filtrado	Térmico	Fase biótica filtrada	Temperatura Ambiente			10°C	20°C	37°C	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	Collert	Chromocult	T.S.A.	
20-05-11																			
Fecha termino:																			
03-06-10																			
		X					X		X					X					
Tiempo	Dilución	Pocillos +	UFC/ml	Lim inf	Lim sup	SEi	SEii	Tiempo	Log (Esperado)	Weibull									
0	1,00E-06	2/0	2,00E+06	3,00E+05	7,10E+06	0,79	---	0	6,30	logN	6,30								
3	1,00E-02	7/0	7,50E+02	3,60E+02	1,49E+03	0,36	---	0,2	5,04	b	2,30								
5	1,00E+00	39/8	8,84E+01	6,30E+01	1,19E+02	0,16	---	0,4	4,66	n	0,37								
10	1,00E+00	13/0	1,48E+01	8,50E+00	2,51E+01	0,27	---	0,6	4,40										
14	1,00E+00	5	5,30E+00	2,30E+00	1,23E+01	0,42	---	0,8	4,18										
								1	4,00										
								2	3,32										
								3	2,84										
								4	2,45										
								5	2,11										
								6	1,82										
								7	1,56										
								8	1,31										
								9	1,09										
								10	0,88										
								13	0,33										
								14	0,16										

SUPERVIVENCIA DE *E. coli* EN DIFERENTES TIPOS DE AGUA

Ensayo	X	Repetición	
---------------	----------	-------------------	--

Datos Generales

Código del ensayo:	E30
Número del Efluente:	-----
Nombre de la Depuradora:	-----
Fecha de Ingreso:	16-06-11
Tipo de Muestra:	Agua de Estanque
Tipo de Tratamiento:	-----
Volumen de la Muestra:	1000 ml

Datos Fisicoquímicos

pH:	-----
DQO:	-----
DBO5:	-----
Sólidos totales:	-----
Fósforo total:	-----
Nitrógeno total:	-----
Amonio:	-----
Nitratos:	-----

Datos Experimentales

<i>E. coli</i>		Agitación		Luz		Volumen de alícuota	
J08	J09	Imán	Plancha	SI	NO	100 ml	500 ml
X		X	X		X		X

Observaciones:

1- Para la muestra incubada a 20°C la agitación se realizó a través de un imán, mientras que para la otra la agitación se realizó en una plancha.

2- Los experimentos se realizaron en condiciones asépticas y sin alteraciones de las condiciones de incubación.

Experimento E30.1		Control	Tratamiento					Inoculado	Glucosa	Incubación				Concentración			Método de recuento		
Fecha inicio:	Sin		Centrifugado	Filtrado	Térmico	Fase biótica filtrada	Temperatura Ambiente			10°C	20°C	37°C	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	Colliert	Chromocult	T.S.A.	
16-06-11																			
Fecha termino:																			
		X					X			X			X	X					
Tiempo	Dilución	Pocillos +	UFC/ml	Lim inf	Lim sup	SEi	SEii	Tiempo	Log (Esperado)	Weibull									
0	1,00E-05	25/3	3,79E+06	2,55E+06	5,40E+06	0,19	---	0	6,58	logN	6,58								
4	1,00E-03	1/0	1,00E+03	1,00E+02	5,50E+03	1,00	---	0,2	4,87	b	2,57								
10	1,00E+00	35/2	6,05E+01	4,20E+01	8,37E+01	0,17	---	0,4	4,54	n	0,26								
13	1,00E+00	21/4	3,18E+01	2,08E+01	4,64E+01	0,20	---	0,6	4,32										
18	1,00E+00	21	2,71E+01	1,77E+01	4,16E+01	0,21	---	0,8	4,15										
24	1,00E+00	7	7,50E+00	3,70E+00	1,55E+01	0,36	---	1	4,01										
31	1,00E+00	2	2,00E+00	6,00E-01	7,30E+00	0,62	---	2	3,51										
39	1,00E+00	2	2,00E+00	6,00E-01	7,30E+00	0,62	---	3	3,17										
								4	2,92										
								5	2,70										
								6	2,52										
								7	2,35										
								8	2,21										
								9	2,07										
								10	1,95										
								13	1,63										
								16	1,36										
								19	1,13										
								22	0,92										
								23	0,85										
								24	0,79										
								31	0,40										
								34	0,25										
								39	0,03										

Experimento E30.2		Control	Tratamiento					Inoculado	Glucosa	Incubación				Concentración			Método de recuento		
Fecha inicio:	Sin		Centrifugado	Filtrado	Térmico	Fase biótica filtrada	Temperatura Ambiente			10°C	20°C	37°C	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	Collert	Chromocult	T.S.A.	
Fecha termino:																			
16-06-11		X					X					X		X					
25-02-08																			
Tiempo	Dilución	Pocillos +	UFC/ml	Lim inf	Lim sup	SEi	SEii	Tiempo	Log (Esperado)	Weibull									
0	1,00E-05	36/2	6,37E+06	4,41E+06	8,78E+06	0,17	---	0	6,80	logN	6,80								
10	1,00E+00	6/2	8,40E+00	3,70E+00	1,53E+01	0,35	---	0,2	2,86	b	4,61								
13	1,00E+00	7/0	7,50E+00	3,60E+00	1,49E+01	0,36	---	0,4	2,58	n	0,10								
18	1,00E+00	6	6,30E+00	3,00E+00	1,39E+01	0,38	---	0,6	2,42										
24	1,00E+00	6	6,30E+00	3,00E+00	1,39E+01	0,38	---	0,8	2,29										
31	1,00E+00	3	3,10E+00	1,10E+00	9,00E+00	0,53	---	1	2,20										
39	1,00E+00	1	1,00E+00	3,00E-01	5,60E+00	0,73	---	1,2	2,11										
								1,4	2,04										
								1,5	2,01										
								2	1,88										
								2,5	1,77										
								3	1,68										
								3,5	1,61										
								4	1,54										
								5	1,43										
								6	1,33										
								7	1,25										
								10	1,06										
								13	0,91										
								16	0,79										
								19	0,69										
								22	0,60										
								23	0,58										
								24	0,55										
								31	0,40										
								39	0,25										

SUPERVIVENCIA DE *E. coli* EN DIFERENTES TIPOS DE AGUA

Ensayo		Repetición	X
---------------	--	-------------------	----------

Datos Generales

Código del ensayo:	E31
Número del Efluente:	-----
Nombre de la Depuradora:	-----
Fecha de Ingreso:	16-06-11
Tipo de Muestra:	Agua de Estanque
Tipo de Tratamiento:	-----
Volumen de la Muestra:	1000 ml

Datos Fisicoquímicos

pH:	-----
DQO:	-----
DBO5:	-----
Sólidos totales:	-----
Fósforo total:	-----
Nitrógeno total:	-----
Amonio:	-----
Nitratos:	-----

Datos Experimentales

<i>E. coli</i>		Agitación		Luz		Volumen de alícuota	
J08	J09	Imán	Plancha	SI	NO	100 ml	500 ml
X		X	X		X		X

Observaciones:

1- Para la muestra incubada a 20°C la agitación se realizó a través de un imán, mientras que para la otra la agitación se realizó en una plancha.

2- Los experimentos se realizaron en condiciones asépticas y sin alteraciones de las condiciones de incubación.

Experimento E31.1		Control	Tratamiento					Inoculado	Glucosa	Incubación				Concentración			Método de recuento		
Fecha inicio:	Sin		Centrifugado	Filtrado	Térmico	Fase biótica filtrada	Temperatura Ambiente			10°C	20°C	37°C	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	Collert	Chromocult	T.S.A.	
16-06-11																			
Fecha termino:																			
25-02-08	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Tiempo	Dilución	Pocillos +	UFC/ml	Lim inf	Lim sup	SEi	SEii	Tiempo	Log (Esperado)	Weibull									
0	1,00E-06	13	1,50E+07	8,80E+06	2,57E+07	0,27	---	0	7,18	logN	7,18								
2	1,00E-03	47/5	1,35E+05	9,13E+04	1,93E+05	0,19	---	0,2	5,34	b	2,65								
6	1,00E+00	49/39	1,05E+03	7,05E+02	1,51E+03	0,19	---	0,4	5,03	n	0,23								
9	1,00E+00	49/18	3,08E+02	1,95E+02	4,71E+02	0,22	---	0,6	4,82										
13	1,00E+00	41	8,31E+01	5,99E+01	1,18E+02	0,17	---	0,8	4,66										
16	1,00E+00	39	7,38E+01	5,31E+01	1,05E+02	0,17	---	1	4,53										
20	1,00E+00	38	6,97E+01	5,00E+01	9,90E+01	0,17	---	2	4,08										
23	1,00E+00	29	4,29E+01	2,97E+01	6,25E+01	0,19	---	3	3,79										
27	1,00E+00	34	5,60E+01	3,97E+01	8,01E+01	0,18	---	4	3,56										
30	1,00E+00	21	2,71E+01	1,77E+01	4,16E+01	0,21	---	5	3,38										
43	1,00E+00	18	2,22E+01	1,41E+01	3,52E+01	0,23	---	6	3,22										
50	1,00E+00	18	2,22E+01	1,41E+01	3,52E+01	0,23	---	7	3,08										
64	1,00E+00	2	2,00E+00	6,00E-01	7,30E+00	0,62	---	8	2,95										
72	1,00E+00	0						9	2,84										
								10	2,73										
								13	2,46										
								18	2,11										
								22	1,87										
								26	1,67										
								30	1,49										
								40	1,11										
								50	0,79										
								60	0,53										
								64	0,43										

Experimento E31.2		Control	Tratamiento				Inoculado	Glucosa	Incubación				Concentración			Método de recuento		
Fecha inicio:	Sin		Centrifugado	Filtrado	Térmico	Fase biótica filtrada			Temperatura Ambiente	10°C	20°C	37°C	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	Colliert	Chromocult	T.S.A.
16-06-11																		
Fecha termino:																		
25-02-08	X					X						X	X					
Tiempo	Dilución	Pocillos +	UFC/ml	Lim inf	Lim sup	SEi	SEii	Tiempo	Log (Esperado)	Weibull								
0	1,00E-06	1	1,00E+06	3,00E+05	5,60E+06	0,73		0	6,00	logN	6,00							
2	1,00E-02	32/6	5,91E+03	4,21E+03	8,12E+03	0,16		0,1	5,32	b	1,75							
2	1,00E-01	49/26	1,52E+03	1,03E+03	2,28E+03	0,20		0,5	4,68	n	0,41							
2			5,06E+03	3,93E+03	6,52E+03	---	0,13	2	3,66									
6	1,00E+00	42/13	1,20E+02	8,79E+01	1,60E+02	0,15		3	3,24									
9	1,00E+00	41/2	8,30E+01	5,75E+01	1,15E+02	0,17		4	2,89									
13	1,00E+00	9	9,90E+00	5,30E+00	1,88E+01	0,32		5	2,59									
16	1,00E+00	2	2,00E+00	6,00E-01	7,30E+00	0,62		6	2,32									
20	1,00E+00	1	1,00E+00	3,00E-01	5,60E+00	0,73		7	2,08									
23	1,00E+00	0						8	1,86									
27	1,00E+00	0						9	1,65									
								10	1,46									
								11	1,27									
								12	1,10									
								13	0,94									
								14	0,78									
								15	0,63									
								16	0,48									
								17	0,34									
								18	0,21									
								19	0,08									
								20	-0,05									