

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior de Ingenieros de
Caminos, Canales y Puertos

Detección y cuantificación de patógenos en nuevos sistemas de tratamiento de aguas residuales. Reutilización de aguas y fangos.

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

MARIA CRISTINA ARMENGOL NADAL

Setiembre, 2017

DIRECTOR: DR. LUIS BORRÁS FALOMIR

CODIRECTORA: DRA. MARÍA AGUAS VIVAS PACHÉS GINER

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
Resumen	vii
Abstract	ix
1. Introducción	1
1.1. Nuevas técnicas de depuración.....	1
1.1.1. Situación actual.....	1
1.1.2. Digestión anaerobia	2
1.1.3. Ventajas e inconvenientes	3
1.1.4. Tecnologías de digestión anaeróbica: AnMBR.....	4
1.2. Eliminación de nutrientes y contaminantes con microalgas.	6
1.3. Patógenos	8
1.3.1. Bacterias coliformes.....	9
1.3.2. helmintos	14
1.4. Reutilización de aguas y fangos	18
1.4.1. Reutilización del agua.....	19
1.4.2. Reutilización del fango	26
2. Objetivos.....	30
3. Materiales y Métodos	31
3.1. Plantas piloto.....	31
3.1.1. Reactor anaerobio con membrana sumergida (AnMBR)	31
3.1.2. Fotobiorreactor de membranas (MPBR).....	32
3.1.3. Digestión anaerobia del fango con membranas: Bionuten	34
3.2. Toma de muestras.....	34
3.3. Cadena de custodia.....	35
3.4. Metodología analítica	35
3.4.1. <i>Escherichia coli</i>	35
3.4.2. Helmintos.....	40

4.	Resultados y discusión.....	44
4.1.	Puesta a punto del método.....	44
4.2.	Recuento e identificación de <i>E. coli</i>	44
4.2.1.	Planta piloto AnMBR	44
4.2.2.	Planta piloto MPBR	49
4.2.3.	Bionuten	55
4.3.	Recuento e identificación de helmintos.....	59
5.	Conclusiones	60
6.	Bibliografía	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Principales microorganismos patógenos presentes en aguas residuales	8
Tabla 2 Normas ISO de calidad del agua.....	14
Tabla 3 Métodos o técnicas para analizar los parámetros microbiológicos.	21
Tabla 4 Técnicas de referencia para el análisis de los parámetros contaminantes.	21
Tabla 5 Valores máximos admisibles según el uso del agua regenerada (FUENTE: RD 1620/2007-ANEXO I.A).....	22
Tabla 6 continuación.....	23
Tabla 7 Continuación.....	24
Tabla 8 Frecuencias mínimas de análisis de los parámetros microbiológicos según el uso del agua regenerada.	25
Tabla 9 Frecuencias mínimas de análisis de los parámetros contaminantes según el uso del agua regenerada.	26
Tabla 10 Valores límite de concentración de metales pesados, compuestos orgánicos, dioxinas y furanos y nivel de patógenos en los lodos destinados a uso agrícola (Mg/Kg materia seca).....	29
Tabla 11 Diluciones óptimas para cada uno de los puntos de muestreo	44
Tabla 12 Valores de influente y efluente de UFC de <i>E. coli</i> en 100 ml y Eficacias de eliminación de AnMBR.....	45
Tabla 13 Valores de influente y efluente de UFC de <i>E. coli</i> en 100 ml y Eficacias de eliminación de MPBR.....	49
Tabla 14 Valores de entrada, efluente y purga y Eficacias de eliminación y tanto del efluente filtrado como de la purga de Bionuten respecto a la mezcla de entrada	55
Tabla 15 Recuento e identificación de huevos de helminto en 50 ml de muestra.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema general de transformaciones bioquímicas durante el proceso de digestión anaerobia. Fuente: FAO	3
Figura 2 tamaños de poro de membrana y tamaño de las partículas microbianas (con microorganismos seleccionados marcados con número Fuente: Köster et al., 2003	5
Figura 3 Ciclo de vida de <i>E. coli</i> . Fuente: Groisman y Winfiel, 2003	11
Figura 4 Ciclo de vida de <i>E. coli</i> en ambientes tropicales. Fuente: Groisman y Winfiel, 2003	11
Figura 5 Clasificación de helmintos y generos comunes encontrados en ar. Fuente: B. Jimenez, 2007	15
Figura 6 Huevos de helmintos observados en agua y fango residual Fuente: B. Jimenez, 2007	15
Figura 7 Géneros encontrados en agua residual Fuente:B. Jimenez, 2007	16
Figura 8 Correlación entre huevos de elminto (HO) y (a) sólidos suspendidos totales (SST) y (b) el contenido de partículas de 20-80micrometros. Fuente: Chavez et al., 2004	17
Figura 9 Esquema simplificado de la planta AnMBR. (tanque membrana, TM y “Cleaning In Place”, CIP)	32
Figura 10 Esquema simplificado de la planta MPBR (Depósito intermedio, DI, tanque membrana, TM y “Cleaning In Place”, CIP).....	33
Figura 11 Esquema simplificado de la planta Bionuten (tanque membrana, TM y “Cleaning In Place”, CIP)	34
Figura 12 Medio de cultivo deshidratado Chromocult.....	37
Figura 13 Disolución del medio deshidratado en agua destilada mediante agitación y calor.....	37
Figura 14 Diluciones de los distintos puntos de muestreo.....	38
Figura 15 Material utilizado en la filtración de las muestras	38
Figura 16 Placas petri incubadas durante 24 horas a 36±2°C.....	39
Figura 17 Probetas con 50 ml muestra de cada uno de los puntos de análisis	41
Figura 18 Separación de las tres fases de la muestra.....	42
Figura 19 <i>E. coli</i> en elEfluente de la planta piloto AnMBR. La línea roja corresponde al lavado químico de las membranas.....	46
Figura 20 Relación de el TRH, TRC, pH y temperatura con <i>E. coli</i> del efluente filtrado de la planta piloto AnMBR	47
Figura 21 Valores máximos admisibles de <i>E. coli</i> para la reutilización de agua tratada	48

Figura 22 Muestra de coliformes (colonias rojas) y <i>E. coli</i> (colonias azules) en el efluente del AnMBR (a) y Muestra de coliformes (colonias rojas) y <i>E. coli</i> (colonias azules) influente del MPBR (b)	50
Figura 23 Evolución de el TRH y TRC con <i>E. coli</i> del efluente filtrado del MPBR.	51
Figura 24 Relación la temperatura (T ^a), pH y oxígeno disuelto (OD) con <i>E. coli</i> del efluente filtrado de la planta piloto MPBR	52
Figura 25 Valores máximos admisibles (VMA) de <i>E. coli</i> para la reutilización de agua tratada mediante MPBR (A) y ampliación de los VMA de 200 UFC/100 ml, 100 UFC/100 ml y 0UFC/100 ml (B).	53
Figura 26 colonias de <i>E.coli</i> en 100 ml de la purga y el efluente de Bionuten. Los números corresponden a los días en los cuales el valor de purga superó las 4000 UFC de <i>E.coli</i> /100 ml.	56
Figura 27 Efluente filtrado Bionuten con los dos VMA más restrictivos.	57
Figura 28 <i>E. coli</i> en la purga de bionuten.....	58

RESUMEN

El aumento de población en los últimos tiempos ha ocasionado un mayor consumo del agua. Además, a este hecho se le añade la contaminación y cambio climático asociados a dicho crecimiento, los cuales han generado una disminución de la disponibilidad del recurso hídrico así como de la calidad del mismo.

No obstante, el creciente interés por el consumo sostenible del agua así como de otros recursos como nitrógeno, fósforo, etc. ha suscitado la investigación de nuevas técnicas de tratamiento como son el tratamiento de agua mediante digestión anaerobia con membranas o la utilización de microalgas.

A diferencia de las técnicas de tratamiento convencionales, el tratamiento de agua mediante digestión anaerobia con membranas o el tratamiento de agua con microalgas, permiten la recuperación y revalorización de los residuos generados en los propios tratamientos y la reutilización del recurso hídrico para usos urbanos, agrícolas, industriales, recreativos y ambientales.

Sin embargo, la reutilización del agua residual urbana presenta algunos riesgos potenciales como son los patógenos asociados a la naturaleza del agua residual que pueden generar importantes problemas sanitarios.

La *Escherichia coli* es el organismo indicador de contaminación fecal. A partir de su identificación y recuento se podrá conocer el estado de la calidad del agua para poder reutilizarla según el RD 1620/2007. Otro de los patógenos limitantes para la reutilización del recurso, según la legislación, son los huevos de helmintos. Los helmintos son gusanos que, también por su naturaleza de origen fecal, se encuentran en las aguas residuales, aunque el agente infectante y a identificar son sus huevos.

En este trabajo se conocieron las posibilidades de reutilización del agua de los efluentes (según RD 1620/2007, Orden AAA/1072/2013) de un conjunto de plantas piloto situadas en la estación depuradora de aguas residuales de la Cuenca del Carraixet (Valencia). Dichas plantas están compuestas por un tratamiento de agua residual anaerobio con membrana (AnMBR, del inglés Anaerobic Membrane BioReactor), un tratamiento del agua residual con fotobiorreactores de microalgas con membrana (MPBR, del inglés Membrane Photo BioReactor) y un tratamiento del fango producido en la purga de las plantas piloto anteriores, junto la purga de la decantación primaria de la estación de depuración de aguas residuales del Carraixet. Ésta última también incluye la posibilidad de reutilización del fango digerido.

Para ello se pusieron a punto los distintos métodos utilizados para la identificación y recuento de *E.coli* y helmintos, según el RD 1620/2007 adaptados al conjunto de plantas piloto.

Además, se analizó la evolución de los organismos patógenos anteriormente citados a lo largo del período de estudio para conocer los rendimientos de eliminación de cada una de las plantas piloto. De este modo, se comprobó así la efectividad del sistema de membranas de las plantas piloto.

ABSTRACT

The increase in population in the last years has caused a rise in water consumption. Moreover, pollution and climate change linked to this increase must be considered, as they have caused a decrease in the availability of said resource as well as its quality.

Nevertheless, research about new treatment techniques has come up due to the growing interest in sustainable water consumption, as well as other resources such as nitrogen, phosphorus, etc. Some of these innovative techniques are water treatment through anaerobic digestion with membranes or the use of micro-algae.

As opposed to traditional treatment techniques, water treatment through anaerobic digestion with membranes or using micro-algae, they both allow the reuse and reevaluation of residue produced in the treatment and reuse of water for different purposes, such as public, agricultural, industrial, leisure and environmental.

However, the reuse of urban waste water might imply some potential risks, such as pathogens linked to waste water's own nature, which could create important sanitary and health problems.

Escherichia coli is the organism which shows whether water is polluted with faeces. Based on its identification and count, the quality of water could be known, so as to reuse it, according to RD 1620/2007. Another restricting pathogen for the reuse of water, according to legislation, are helminths eggs. Helminths are worms which, by their faecal origin, are found in sewage even though the agent which infects the water, and therefore should be identified, are its eggs.

In this paper, it was shown the different possibilities of the reuse of effluent water (according to 1620/2007, Orden AAA/1072/2013) of a group of pilot plants located in the waste-water treatment plant in Cuenca del Carraixet (Valencia). Said plants are made up of an Anaerobic Membrane BioReactor (AnMBR), a Membrane Photo BioReactor (MPBR) and a treatment of the mud produced in the clearance of the pilot plants mentioned before, as well as the clearance of the principal decantation of Carraixet's waste-water treatment plant. The last one also includes the possibility of the reuse of digested mud.

In order to do this, the different methods used for the identification and count of *E.coli* and helminths were developed and set up, according to RD 160/2007 adapted to the pilot plants as a whole.

Finally, the evolution of the previously mentioned pathogenic organisms were analysed throughout the research in order to know the performance of the removal of each of the pilot plants. In this way, the efficacy of the membrane system could be examined.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. NUEVAS TÉCNICAS DE DEPURACIÓN

1.1.1. SITUACIÓN ACTUAL

Uno de los principales recursos con problemas hoy en día es el agua (McCarty et al., 2011). Debido al notable crecimiento de la población se ha generado un aumento del consumo por distintas causas: riego de zonas verdes urbanas, usos recreativos e industriales... (Reinoso Tapia, 2008). A todo ello se le suma el cambio climático, el cual también tiene un efecto importante en la disponibilidad del agua a causa de la baja pluviometría en zonas áridas generando un aumento de escasez de agua y estrés hídrico (Walsh et al., 2016). Sin embargo, debido a los hechos anteriormente mencionados, la reutilización de agua residual tratada o regenerada ha crecido considerablemente para el uso en agricultura y acuicultura (Angelakis et al., 2000).

De los diversos sistemas de tratamiento existentes, uno de los más utilizados es el tratamiento de agua residual mediante fangos activos (Rodríguez Fernández-Alba et al., 2006). No obstante, dicho tratamiento genera importantes cantidades de residuos como son los fangos debidos al gran crecimiento bacteriano así como un importante gasto energético, llegando a suponer el 75% de toda la energía consumida en una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) (Alianza por el Agua, 2008).

Actualmente, el desarrollo sostenible se quiere aplicar a dicho tratamiento. Y, gracias al creciente interés en el uso efectivo de los recursos, se ha generado un segundo interés en cuanto a la depuración de aguas: la recuperación de nutrientes específicos (como nitrógeno y fósforo), la obtención de productos específicos (como el metano, los disolventes orgánicos y los bioplásticos) (Kleerebezem y van Loosdrecht, 2007), y la reutilización de éstas para distintos fines dependiendo del grado de calidad y la valorización de los residuos como es el fango (Angelakis et al., 2000; Kelessidisa y Stasinakis, 2012).

Ahora bien, aunque la reutilización del agua genere un beneficio ambiental, conlleva riesgos sanitarios (Toze, 2004). Sin olvidar la naturaleza del recurso, los patógenos, debido a las heces humanas, son uno de los agentes contaminantes a tener en cuenta en cuanto a la reutilización del agua regenerada (Aurazo de Zumaeta, 2004).

1.1.2. DIGESTIÓN ANAEROBIA

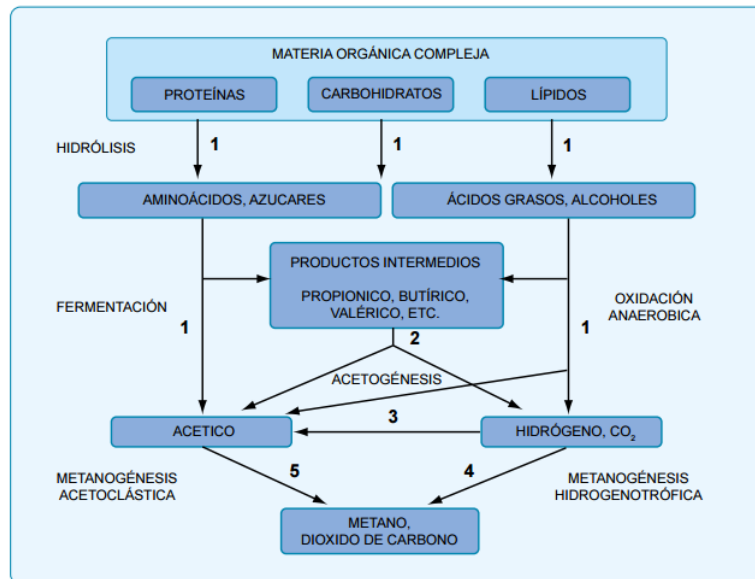
Para llevar a cabo los intereses anteriormente citados existe el tratamiento anaerobio. Dicho tratamiento puede calificarse como alternativa al tratamiento tradicional con fangos activados aerobios presentando una serie de ventajas frente a éstos (Metcalf and Eddy, 2014).

El proceso de digestión anaerobia (DA) se lleva a cabo mediante bacterias y arqueas que producen energía a partir de distintos compuestos en ausencia de oxígeno dando lugar, a su vez, a una mezcla de gases (principalmente metano y dióxido de carbono), Éstas aparecen en una gran variedad de procesos anaerobios para el tratamiento de aguas residuales (en adelante AR) como son: la reducción de nitrito/nitrato a nitrógeno gas, procesos de fermentación para producir ácidos grasos volátiles para la eliminación biológica de fósforo, contacto anaerobio para la absorción de acetato y propiónico en la eliminación biológica de fósforo, oxidación anaeróbica de compuestos orgánicos en aguas industriales y domésticas, digestión anaerobia de fango residual y digestión anaerobia de otros residuos orgánicos (Metcalf y Eddy, 2014).

La digestión anaerobia se podría simplificar en dos fases: la fase no-metanogénica y la fase metanogénica, las cuales dependen de las características que presentan los conjuntos de poblaciones de microorganismos y sus respectivos procesos (Magidan et al., 2003; Willey, 2009).

En las dos fases se distinguen 5 grandes poblaciones de bacterias: fermentativas, acetogénicas que producen hidrógeno, homoacetogénicas, metanogénicas hidrogenotróficas y metanogénicas acetoclásticas. Las bacterias anaerobias crecen muy lentamente debido a sus bajos rendimientos de energía por gramo de sustrato (Ferrer Polo y Seco Torrecillas, 2012) y, del mismo modo, se caracterizan por presentar distintas velocidades de crecimiento y diferente sensibilidad a cada compuesto intermedio como inhibidor (por ejemplo, hidrógeno (H_2), ácido acético o amoníaco producido de la fermentación de aminoácidos). Esto implica que cada etapa presentará diferentes velocidades de reacción según la composición del sustrato siendo la fase metanogénica la más lenta y por eso, la más limitante (Varnero Moreno, 2011). Además, el desarrollo estable del proceso global requerirá de un equilibrio que evite la acumulación de compuestos intermedios inhibidores o la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV), que podría producir una bajada del pH. Para hacer posible algunas reacciones es necesaria la asociación sintrófica entre bacterias acetogénicas y metanogénicas (Magidan et al., 2003).

En la siguiente Figura 1 se describen gráficamente los procesos implicados en la digestión anaerobia:



Los números indican la población encargada del proceso: 1.bacterias fermentativas, 2.bacterias acetogénicas, 3.bacterias homoacetogénicas, 4.bacterias metanogénicas hidrogenotróficas, 5.bacterias metanogénicas acetoclásticas.

FIGURA 1 ESQUEMA GENERAL DE TRANSFORMACIONES BIOQUÍMICAS DURANTE EL PROCESO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA. FUENTE: FAO

1.1.3. VENTAJAS E INCONVENIENTES

Las principales ventajas del tratamiento anaerobio son (Metcalf y Eddy 2014; Torres 2012; Yaniris y Obaya 2006)

- Menor requerimiento de energía: pueden ser productores de energía (metano y otros gases de combustión) a diferencia de los procesos aerobios que son consumidores.
- Menor producción de fangos biológicos: debido a que las bacterias anaerobias tienen baja velocidad de crecimiento.
- Menor requerimiento de nutrientes.
- Producción de metano, una fuente de energía potencial: debido a las reacciones producidas por los microorganismos metanogénicos.
- Requerimiento menor de volumen de reactor: a causa de las mayores tasas de carga orgánica volumétrica en los procesos anaerobios.
- Eliminación de la contaminación por gases de escape: al estar en un ambiente cerrado.
- Capaz de responder rápidamente a la adición de sustrato después de un largo período sin alimentación.
- Menor generación de huella de carbono.
- Menor generación de olores: ya que se encuentra en un espacio cerrado y controlado.

No obstante, también posee algunas desventajas como son la insuficiente eliminación de nutrientes, como el nitrógeno y el fósforo, así como de patógenos y la generación de gases corrosivos. La alcalinidad (ALK) también será una desventaja a considerar a causa de la bajada de pH provocada por las reacciones que se llevan a cabo en el digestor. Además, el tratamiento anaerobio es mucho más sensible a las temperaturas bajas, lo cual obliga a trabajar a elevadas temperaturas y/o elevados tiempos de residencia en el reactor (Mahmoud, 2008).

1.1.4. TECNOLOGÍAS DE DIGESTIÓN ANAERÓBICA: ANMBR

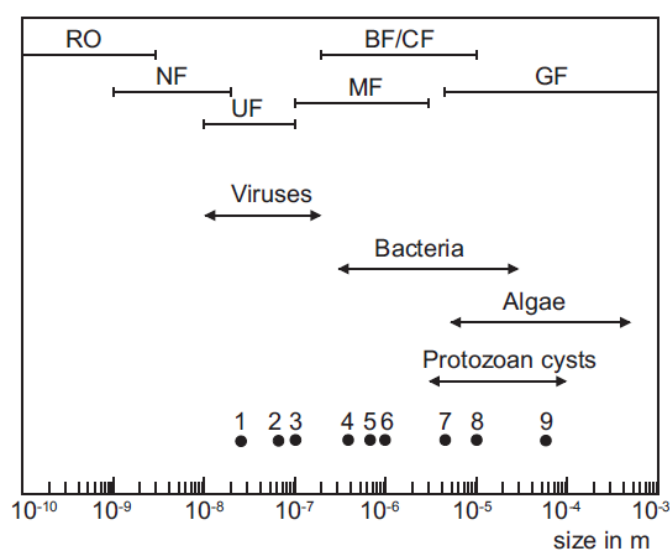
Existen distintas tecnologías para el tratamiento de AR dependiendo de los procesos de tratamiento anaeróbico que incluyen: crecimiento suspendido, crecimiento unido al flujo ascendente y descendente, crecimiento unido por lecho fluidilizado, manto de lodo de flujo ascendente, laguna, crecimiento suspendido con separación de membrana, y muchos otros procesos (Metcalf and Eddy, 2014).

En un primer momento no se utilizó la digestión anaerobia para el tratamiento de aguas municipales debido a la dificultad para retener microorganismos anaeróbicos y la dificultad de cumplir los estándares de descarga para la reutilización de AR debido a las limitaciones cinéticas del metabolismo anaeróbico (Lin et al., 2013). No obstante, posteriormente se demostró que mediante la combinación de la tecnología de separación física mediante membranas sintéticas y un biorreactor anaeróbico se permitiría un tratamiento de AR municipales de manera sostenible con retención de la biomasa y, además con otros beneficios agregados como son una menor producción de lodos, un efluente de mayor calidad, una producción neta de energía y sin costes adicionales de aireación asociados al tratamiento aerobio (Beaubien et al., 1996). Dicha tecnología es conocida como el tratamiento anaeróbico de agua residual con crecimiento suspendido con separación mediante membrana (AnMBR, del inglés *Anaerobic Membrane Bioreactor*) (Metcalf and Eddy, 2014).

Como se ha mencionado anteriormente, las bacterias anaerobias crecen muy lentamente y, por lo tanto, un diseño eficiente del reactor precisaría separar el tiempo de retención hidráulico (TRH) del tiempo de retención celular (TRC). El desacoplar el TRC y TRH favorece la velocidad de carga orgánica y permite reducir el tamaño del reactor (Varnero Moreno, 2011). La solución a dicho problema se lleva a cabo mediante la separación de la fracción líquida de la fracción sólida por medio de membranas sintéticas. Gracias a la separación, el rechazo (fracción sólida), puede

recircularse ayudando a aumentar los TRCs y disminuir los TRHs favoreciendo así la presencia en el digestor de bacterias anaerobias (Stuckey, 2012).

Esta misma separación física, hace que la utilización de membranas sea un tratamiento eficaz en cuanto a la eliminación o separación del efluente (fracción líquida) de patógenos como *Escherichia coli* (*E. coli*) o *Enterococci* debido al pequeño poro de membrana que presentan (Skouteris, Hermosilla, López, Negro, y Blanco, 2012). En la figura 2 se muestran los distintos tamaños de poro existentes así como el tamaño de las partículas microbianas (con los microorganismos seleccionados marcados con números).



Leyenda:

RO: osmosis inversa, NF: nanofiltración, UF: ultrafiltración, MF: microfiltración, BF/CF: filtros de bolsas y cartuchos, GF: filtración granular incluida la filtración con lecho de arena.

1. Bacteriófago MS2, 2. Rotavirus, 3. Bacteriófago PRDI, 4. Complejo *Mycobacterium avium*, 5. *Yersinia spp.*, 6. Bacterias coliformes, 7. *Cryptosporidium* oocysts, 8. *Giardia* cysts, 9. *Balanthidium coli* cysts.

FIGURA 2 TAMAÑOS DE PORO DE MEMBRANA Y TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS MICROBIANAS (CON MICROORGANISMOS SELECCIONADOS MARCADOS CON NÚMERO FUENTE: KÖSTER ET AL., 2003

Además, al tratarse de una digestión anaerobia, el digestor AnMBR también tiene producción de biogás, llegando a producir hasta un 80-90% de metano (Hu y Stuckey, 2006; Liao et al., 2010; Xie et al., 2010). No obstante, en muchos casos se encuentra en un 70% o menos (Saddoud et al., 2007). Esta diferencia de porcentajes en cuanto a la composición de metano es debida a la variabilidad del ratio de dióxido de carbono/metano que depende substancialmente de las características de los compuestos orgánicos a degradar (de Lemos Chernicharo, 2007).

Por otro lado, el sistema de tratamiento AnMBR también representa una serie de desventajas o limitaciones (Ozgun et al., 2013). Éste no parece tener buenos rendimientos en cuanto a la eliminación del nitrógeno total (N_T) o del fósforo total (P_T) debido al requerimiento de zonas anóxicas y/o aerobias necesarias para poder ser eliminados de forma biológica por otros microorganismos. Sin embargo podría ser beneficioso para el uso directo del agua en agricultura o riego. Algunos autores apuntan al proceso de separación por membrana de osmosis directa para resolver el problema de la concentración de N_T y P_T en gran medida, así como otras soluciones de eliminación de nutrientes físicos y químicos que supondrían un gasto energético superior al tratamiento biológico (Lin et al., 2013).

Una de las limitaciones más comunes y principal obstáculo de la aplicación del AnMBR es el ensuciamiento de la membrana (Lin et al., 2013). Dicho ensuciamiento reduce el flujo de membrana y, por lo tanto, aumenta el área de membranas por volumen de reactor (Stuckey, 2012). No obstante, para minimizar el ensuciamiento algunos autores proponen la utilización de una decantación primaria del influente. De esta manera ayudaría a eliminar los sólidos sedimentables y, con el fango decantado y el proceso de digestión anaerobia, se produciría energía y minimizaría el residuo que éste supone (McCarty et al., 2011).

1.2. ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES Y CONTAMINANTES CON MICROALGAS.

Como se ha mencionado anteriormente, la digestión anaerobia no elimina los nutrientes como nitrógeno (N) y fósforo (P) haciendo necesaria una etapa post-tratamiento separada (Mahmoud, 2008). De no ser eliminados, podrían generar problemas de eutrofización en las zonas donde desemboca el efluente. La eutrofización de los ecosistemas acuáticos puede causar un aumento en las algas y las plantas acuáticas de éstos y, consecuentemente, la pérdida de numerosas especies así como del ecosistema propio de la zona (V. H. Smith et al., 1999).

Los considerados procesos convencionales, basados en procesos biológicos con diferentes zonas aerobias, anóxicas y anaerobias, así como procesos químicos, han sido el objeto de numerosos estudios (Aslan y Kapdan, 2006). No obstante, estos procesos suelen consumir significantes cantidades de energía y reactivos aumentando los costes de depuración. Además, los procesos químicos pueden llegar contaminar el fango de las plantas de tratamiento convencional (Hoffmann, 1998).

Es por ello que existen métodos alternativos a los procesos convencionales como el uso de microalgas para las que se ha demostrado, a través de numerosos estudios, un gran potencial para la eliminación de N y P (Caporgno et al., 2015; Ruiz-marin, Mendoza-espinosa, y Stephenson, 2010). Los principales mecanismos en la eliminación de nutrientes por parte de las algas en AR incluyen la captación en la célula y el *stripping* (volatilización) del amoníaco a causa del aumento del pH (Su, et al., 2011).

Además, este tipo de tratamiento presenta una serie de ventajas como son el bajo coste operacional, la posibilidad de reciclar el N y P asimilado en la biomasa de las algas como fertilizante y, todo ello, sin la necesidad de aporte de carbono (Aslan y Kapdan, 2006). Aunque no solo existen cultivos con microalgas sino que también se hallan numerosos estudios que utilizan un concepto algal-bacteriano como sistema de tratamiento (Muñoz y Guieysse, 2006; Su et al., 2011). Esta opción se cree totalmente recomendada para el tratamiento de AR de regiones con alta radiación solar y temperatura a lo largo de todo el año. Este tipo de tratamiento se basa en la relación simbiótica de bacterias aerobias y algas. Éstas últimas generarían oxígeno para la comunidad microbiana y las ventajas serían análogas a las anteriormente descritas con la diferencia de la disminución de materia orgánica por parte de la comunidad microbiana (Su et al., 2011).

Por otro lado, el tratamiento con microalgas también ayuda a la disminución o eliminación tanto de metales pesados como de patógenos como los coliformes o, más concretamente, *E. coli*. Se ha demostrado que los parámetros operacionales óptimos para el cultivo de microalgas de temperatura, pH, oxígeno disuelto (OD) o la presencia de otras bacterias en el cultivo de las algas son desfavorecedores para las bacterias como *E. coli* propiciando su eliminación (Mezrioui et al., 1994). Los metales pesados sin embargo, son eliminados gracias a la capacidad de las algas de generar péptidos capaces de unir metales pesados (Pen et al., 2006).

A pesar de todas las ventajas que presenta la utilización de algas, uno de los principales inconvenientes del cultivo es la cantidad de masa que se genera (Ruiz-marin et al., 2010). Aunque, algunos autores, proponen la gestión de la purga de algas y bacterias mediante el tratamiento de digestión anaerobia lo cual generaría biogás y, consecuentemente, un ahorro económico (Malik, 2002; Muñoz y Guieysse, 2006).

1.3. PATÓGENOS

La contaminación por patógenos (como son las bacterias, virus, protozoos...), está fuertemente relacionada con los vertidos de origen doméstico. Es por ello que las estaciones depuradoras de AR son las encargadas de eliminar este tipo de microorganismos mediante distintos procesos convencionales como la aplicación de ozono, radiación ultravioletas (UV), etc. o más alternativos como la digestión anaerobia del agua, tratamiento con microalgas, etc.(Díaz-Delgado et al., 2003; Summerfelt, 2003). Asimismo, la presencia y concentración de este tipo de microorganismos patógenos, determinará la calidad y posible uso del agua tratada (Díaz-Delgado et al., 2003).

Los principales microorganismos patógenos presentes en el agua se pueden clasificar en 5 grupos: bacterias, virus, protozoos, helmintos y cianobacterias, con sus destacadas especies comúnmente encontradas en agua (Tabla 1). Éstos son causantes de enfermedades y su posible transmisión, además de hídrica, puede ocurrir a través de alimentos, de persona a persona, etc. (Aurazo de Zumaeta, 2004).

TABLA 1 PRINCIPALES MICROORGANISMOS PATÓGENOS PRESENTES EN AGUAS RESIDUALES

Bacterias	<i>Escherichia coli, Salmonella, Shigella, Vibrio cholerae, Legionella spp., Yersinia enterocolitica, Campylobacter</i>
Virus	Enterovirus, rotavirus, adenovirus.
Protozoos	<i>Giardia, Cryptosporidium, Entamoeba histolytica, Balantidium coli</i>
Helmintos	<i>Ascaris, Trichuris, Taenia</i>
Cianobacterias	Anabaena, Microcystis

La gran cantidad de microorganismos patógenos existentes en el agua supone una dificultad a la hora de su detección a causa de los numerosos y costosos análisis a realizar (Larrea-murrell et al., 2013). También, la determinada sensibilidad que presentan algunos de los métodos de detección, hace que tengan un comportamiento diferente para cada organismo patógeno. Por esa razón, frente a estas dificultades y la necesidad de una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en agua, se planteó el uso de utilizar microorganismos indicadores los cuales por sus determinadas características son fáciles de detectar y enumerar (Ashbolt et al., 2001).

La contaminación fecal es uno de los problemas sanitarios más relevantes a la hora de la depuración de AR urbanas debido a la naturaleza de la misma. No obstante, como se ha mencionado anteriormente, también este tipo de contaminación tiene un

organismo indicador el cual debe presentar las siguientes características (Díaz-Delgado et al., 2003; Larrea-murrell et al., 2013):

- Formar parte de la flora intestinal de individuos sanos.
- Estar presente, de forma exclusiva, en las heces de animales homeotérmicos.
- Estar presente cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están.
- Presentarse en número elevado, facilitando su aislamiento e identificación.
- Incapacidad de reproducción fuera del intestino de los animales homeotérmicos.
- Su tiempo de supervivencia debe ser igual o un poco superior al de las bacterias patógenas (su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal).
- Debe ser fácil de aislar y cuantificar.
- No debe ser patógeno.

Aunque los criterios anteriormente citados pertenecerían a un indicador ideal, no existe ningún microorganismo que los reúna todos. No obstante, sí que se encuentran algunos que, según sus características, sirven para conocer los riesgos asociados a la contaminación fecal en el agua (Ashbolt et al., 2001).

1.3.1. BACTERIAS COLIFORMES

Las bacterias coliformes suponen un buen indicador de contaminación fecal ya que éstos se encuentran en grandes cantidades en la microbiota gastrointestinal tanto de procedencia humana como de animales homeotermos. Los microorganismos coliformes, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, están constituidos por un grupo heterogéneo de amplia diversidad en términos de género y especie (Gómez, et al., 2008; Santiago-Rodríguez et al., 2012).

Los coliformes totales son bacterias de forma bacilar, gram negativas, que fermentan lactosa a temperaturas de 35-37 °C y producen ácido y gas (CO₂) en 24 horas, aerobias o anaerobias facultativas, son oxidasa negativas, no forman esporas y presentan la actividad enzimática de β-galactosidasa. No obstante, no todas ellas proceden de origen fecal (Carrillo y Lozano, 2008).

Sin embargo, existe una bacteria muy frecuente entre los coliformes termotolerantes, capaces de fermentar lactosa a 45°C, que está presente en todas las heces de animales homeotérmicos: *E. coli* (Badgley et al., 2011; Santiago-Rodriguez et al., 2012).

1.3.1.1. ECHERICHIA COLI

Esta especie pertenece a la familia de Enterobacteriaceae, es Gram negativa y anaerobia facultativa. Es la bacteria coliforme, como se ha mencionado anteriormente, que se encuentra en mayor concentración en la microbiota del intestino humano y animales homeotolerantes haciendo que se convierta en el indicador por excelencia de contaminación fecal en aguas (Larrea et al., 2009).

Es la única especie dentro de las enterobacterias que posee la enzima β -D-glucuronidasa (GUD), que degrada el sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónico (MUG), formando 4-metilumbeliferona. Por otra parte, son bacilos capaces de producir indol a partir de triptófano, en 21 ± 3 h a 44 ± 0.5 °C. Poseen la enzima β -D-galactosidasa (GAL), que reacciona positivamente en el ensayo del rojo de metilo y pueden descarboxilar el ácido L-glutámico (Carrillo y Lozano, 2008).

Mide $\sim 1-3\mu\text{m}$ y reside en la parte baja del intestino de los seres humanos y animales homeotermos y su tiempo de supervivencia en su hábitat primario es de dos días (Groisman y Winfiel, 2003; Reshes et al., 2008). Se cree que una mitad de la población de *E. coli* reside en su hábitat primario del hospedante y la otra mitad en el ambiente externo o hábitat secundario. No obstante, *E. coli* sólo crece y se divide en su hábitat primario y muere en su hábitat secundario a causa de factores externos (Groisman y Winfiel, 2003) (Figura 3). Tiene una tasa de supervivencia distinta según el medio en el que se encuentre: 1 día en agua, 1,5 días en sedimentos (Gerba y McLeod, 1976) y 3 días en suelo (Larrea-murrell et al., 2013). Todo esto implica que, una continua detección de *E. coli* sólo podría deberse a una continua transferencia de heces humanas y animales manteniendo así la población estable fuera del huésped (Groisman y Winfiel, 2003). Esta es la lógica del empleo de *E. coli* como un microorganismo indicador para la contaminación fecal ambiental (L. Jimenez et al., 1989).

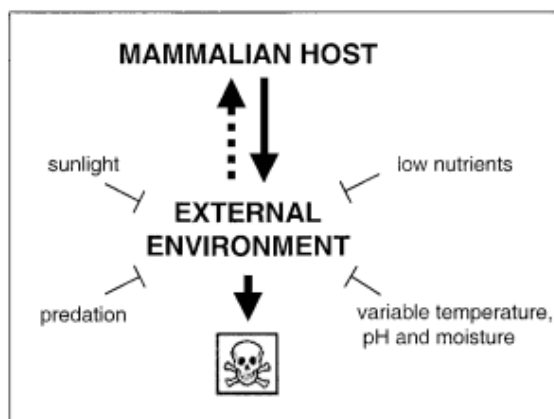


FIGURA 3 CICLO DE VIDA DE *E. COLI*. FUENTE: GROISMAN Y WINFIEL, 2003

Sólo se ha detectado la presencia natural de *E. coli* en ecosistemas tropicales a causa de las altas concentraciones de nutrientes en éstos, junto con el aire caliente constante, el suelo y las temperaturas del agua, proporcionando un hábitat ideal para la supervivencia, el crecimiento y la proliferación de *E. coli* haciendo que sea un miembro de la propia microflora (Groisman y Winfiel, 2003) (Figura 4):

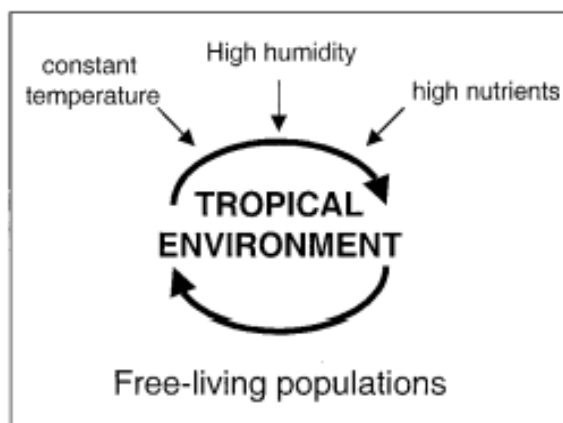


FIGURA 4 CICLO DE VIDA DE *E. COLI* EN AMBIENTES TROPICALES. FUENTE: GROISMAN Y WINFIEL, 2003

1.3.1.2. FACTORES DE ELIMINACIÓN DE *E. COLI*

Como se ha mencionado en el apartado anterior, existen factores los cuales afectan a la supervivencia de *E. coli* (Groisman y Winfiel, 2003). Distintos autores apuntan que dicha supervivencia es influenciada por factores como la luz, la depredación, la escasez de nutrientes y las variables de temperatura, pH y humedad (Groisman y Winfiel, 2003; Pandey y Soupir, 2011; Sichel et al. 2007; S. R. Smith et al., 2005).

A través del conocimiento de los factores que afectan a los patógenos como *E. coli* y en busca de la desinfección del agua y, muchas veces su posible reutilización, uno de

los objetivos del tratamiento de AR es la eliminación de éstos mediante distintas técnicas de tratamiento: digestión anaerobia de AR, mediante microalgas, etc. (Muñoz y Guieysse, 2006; Sichel et al., 2007; S. R. Smith et al., 2005).

Tanto la digestión anaerobia mesófila (30-38°C) como la termófila (50-55°C) resultan un buen método para la eliminación de patógenos como *E. coli* (Pandey y Soupir, 2011). Estas metodologías basan su eliminación en las condiciones de temperatura y tiempo, siendo la temperatura la causante de muchas de las posibles reacciones que se llevarán a cabo en el digester anaerobio (Sahlström, 2003). Los cambios producidos por ésta generarán variaciones en pH, sólidos totales, compuestos volátiles, producción de biogás y contenido en metano, los cuales también afectan a la inactivación del microorganismo (Pandey y Soupir, 2011). El tiempo también es un factor importante ya que se requiere menor tiempo para la inactivación de la bacteria con la digestión anaerobia termófila que con la mesófila (Sahlström, 2003).

Las variaciones del pH, aun siendo influenciadas por la concentración de amonio y la temperatura, también son otro factor a considerar, aunque todo ello sea un efecto del factor dominante que es la temperatura (Pandey y Soupir, 2011). Los valores de pH en los cuales *E. coli* puede sobrevivir están entre 6 y 8 (Foster, 2004). Pandey and Soupir (2011), llevaron a cabo un estudio de la variación de pH en relación a la temperatura aplicada y observaron que, en la digestión mesófila, se alcanzó un pH de 6,86, mientras que en la termófila, un valor de 9,55, obteniendo en ambos casos una eliminación significativa de *E. coli*, pero alcanzando mayores niveles de eliminación en la DA termófila. De todos modos, al ser una bacteria gastrointestinal tiene la capacidad de poder sobrevivir en ambientes más ácidos pero no en ambientes alcalinos (Curtis et al., 1992; Foster, 2004) Además, observaron que existía una correlación entre la toxicidad creada por los AGV producidos en la digestión anaerobia y la eliminación de patógenos, dependiendo del pH del fango del digester anaerobio.

Además de la eliminación llevada a cabo por la propia digestión anaerobia, cuando se le une la tecnología de membranas de poro de 0,03µm, hace que aumenten las eficiencias de eliminación total de *E. coli* del permeado por la barrera física que supone, al igual que con los sólidos suspendidos (Dereli et al., 2012; Skouteris et al., 2012).

Otra tecnología que también presenta elevadas tasas de eliminación es el tratamiento del agua mediante microalgas ya que, los factores ambientales que favorecen el crecimiento de las algas, son desfavorables para la supervivencia de los microorganismos (Abdel-Raouf et al., 2012; Mezrioui et al., 1994). En este caso,

también es la influencia del pH la que favorece la eliminación de *E. coli*, debido al incremento de éste a causa de la respiración fotosintética de las microalgas, captando dióxido de carbono (CO₂) y aportando oxígeno (O₂) al sistema. Aunque la mayoría de poblaciones de microalgas tienen su valor óptimo de crecimiento entre 7.5-8.5 y en algunos casos, para el género *Chlorella*, pueden llegar incluso hasta 10-10.5 (Gong et al., 2014). No obstante, valores de pH tan elevados, aunque favorezcan notablemente la eliminación de *E. coli*, influyen en la eliminación de N y P a causa de la volatilización del NH₃ y la precipitación del ortofosfato, limitando así la disponibilidad de nutrientes para las propias microalgas (Craggs et al., 1996; García et al., 2000; Nurdogan y Oswald, 1995) Afortunadamente, es relativamente fácil el control del pH en este tipo de sistemas, por ejemplo con la inyección de CO₂ (Muñoz y Guieysse, 2006b).

Como se ha mencionado anteriormente, *E. coli* es una bacteria anaerobia facultativa, por lo cual es capaz de desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de O₂. Sin embargo, no es capaz de tolerar grandes cantidades de O₂ ya que, se ha comprobado que, a medida que aumenta la concentración de O₂, aumenta la tasa de eliminación de *E. coli* (Curtis et al., 1992). Además, se ha demostrado que tanto el aumento del O₂ como el aumento del pH son mucho más efectivos para la eliminación de *E. coli* con incidencia de luz (Ansa et al., 2015; Curtis et al., 1992)

Asimismo, en este caso también es importante la temperatura, ya que influye en la eficiencia de eliminación de patógenos con microalgas disminuyendo a bajas temperaturas (Abeliovich, 2004). Según Muñoz y Guieysse (2006) temperaturas de 25 a 30°C pueden llegar a duplicar las eficiencias de eliminación.

El factor luz, también es un factor a tener en cuenta en cuanto a la eliminación de patógenos en este tipo de cultivos, siendo muy variable a lo largo del día y del año. Se conoce que la actividad de las algas aumenta con la intensidad de la luz hasta valores de 200-400 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Abdel-Raouf et al., 2012) y que, valores más elevados de incidencia de luz, siempre preservando el óptimo para el crecimiento de las algas, tienen un efecto significativo a la hora de eliminar patógenos (Ansa et al., 2015).

En conclusión, aunque no estén claros los efectos y valores exactos de cada uno de los parámetros que pueden afectar a la eliminación de *E. coli*, sí se puede afirmar que el conjunto de parámetros y sus efectos en los sistemas de tratamiento realmente ayudan a la eliminación del patógeno (Ansa et al. 2015; Aslan y Kapdan 2006; Curtis et al., 1992).

1.3.1.3. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE *E. COLI*

Existen tres metodologías o normas para la identificación y detección de bacterias coliformes y *E. coli* según la Organización Internacional de Normalización (en adelante ISO) dependiendo de las características y la procedencia del agua a analizar. En la Tabla 2 se muestran las normas junto a sus respectivas modificaciones parciales.

TABLA 2 NORMAS ISO DE CALIDAD DEL AGUA

NORMA	FECHA DE VIGENCIA	MODIFICACIÓN	FECHA DE VIGENCIA
UNE-EN ISO 9308-1:2014 Calidad del agua. Recuento de <i>E. coli</i> y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido de microbiota. (ISO 9308-1:2014).	2014-12-30	UNE-EN ISO 9308-1:2014/A1:2017 Calidad del agua. Recuento de <i>E. coli</i> y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido de microbiota. (ISO 9308-1:2014/Amd 1:2016).	2017-05-17
UNE-EN ISO 9308-2:2014 Calidad del agua. Recuento de <i>E. coli</i> y bacterias coliformes. Parte 2: Método del número más probable. (ISO 9308-2:2012)	2014-07-16		
UNE-EN ISO 9308-3:1999 Calidad del agua. Detección y recuento de <i>E. coli</i> y bacterias coliformes. Parte 3: Método miniaturizado (Número Más Probable) para la detección y recuento de <i>E. coli</i> en aguas superficiales y AR. (ISO 9308-3:1998).	1999-07-30	UNE-EN ISO 9308-3/AC:2000 Calidad del agua. Detección y recuento de <i>E. coli</i> y bacterias coliformes. Parte 3: Método miniaturizado (Número Más Probable) para la detección y recuento de <i>E. coli</i> en aguas superficiales y AR (ISO 9308-3:1998)	2000-07-21

1.3.2. HELMINTOS

Otro patógeno, que por su naturaleza se puede encontrar en los intestinos humanos y en sus heces y, por lo tanto, en el agua a depurar de origen urbano, son los helmintos. Los helmintos son gusanos pluricelulares de distintos tipos y medidas (desde 1 mm hasta varios metros de longitud) con varios ciclos de vida y entornos de vida óptimos (B. Jimenez, 2007).

Según la morfología externa e interna de los estadios de huevo, larva y adulto se distinguen tres tipos diferentes de helmintos: (1) helmintos planos o gusanos planos, (2) nematodos o gusanos redondos y (3) asquelmintos (Figura 5), siendo los dos primeros tipos los que comúnmente se encuentran en el agua residual (Castro, 1996; B. Jimenez, 2007).

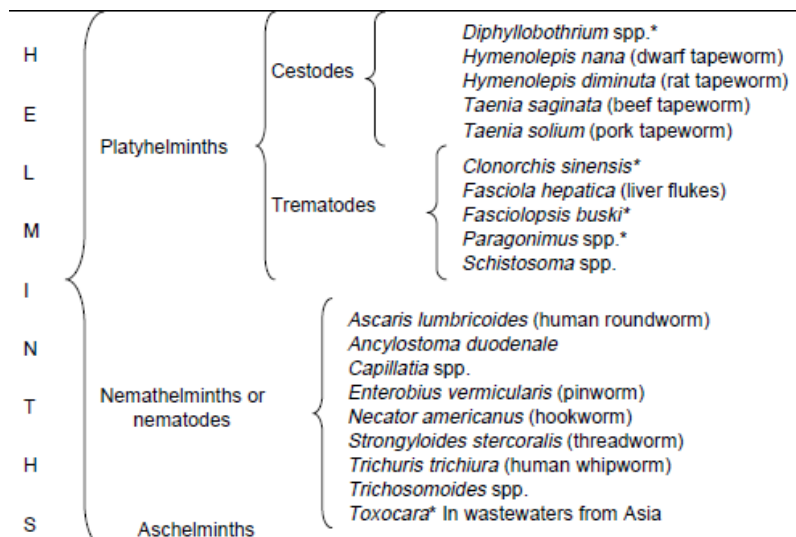


FIGURA 5 CLASIFICACIÓN DE HELMINTOS Y GENEROS COMUNES ENCONTRADOS EN AR. FUENTE: B. JIMENEZ, 2007

Todos ellos se reproducen a través de huevos, siendo diferentes en tamaño y forma según el grupo o subgrupo al que pertenezcan (Figura 6). En general, los huevos en el agua residual varían entre 20-90 µm, tienen una densidad de 1,06-1,15 g/cm³ y son muy pegajosos (Jimenez- Cisneros, 2006). Los huevos de helmintos, gracias a sus características morfológicas, presentan una gran resistencia, haciéndolos muy resistentes a condiciones ambientales adversas. Dicha resistencia es debida a las 3-4 capas que presentan en su envoltura. De ellas las dos capas más externas están formadas con mucopolisacáridos y proteínas. Las capas intermedias están compuestas por el polisacárido quitina y sirven para dar estructura y resistencia a los huevos. Por último, la capa interna está compuesta de lípidos y proteínas que confieren resistencia frente a la desecación, ácidos fuertes y bases, oxidantes y agentes reductores, así como detergentes y compuestos proteolíticos (B. Jimenez, 2007).

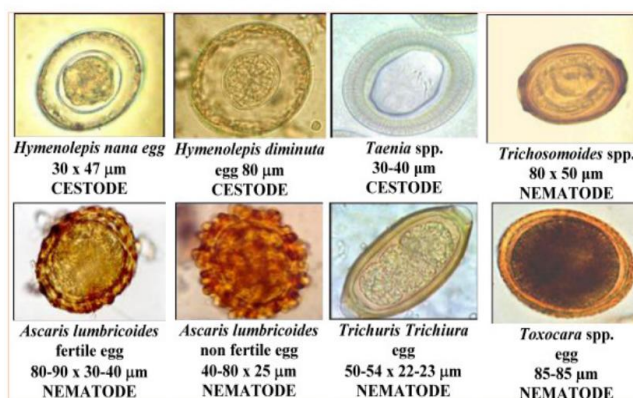


FIGURA 6 HUEVOS DE HELMINTOS OBSERVADOS EN AGUA Y FANGO RESIDUAL FUENTE: B. JIMENEZ, 2007

En la Figura 7 se muestran los huevos de helmintos más comunes tanto en agua residual como en lodos. De todos ellos, el 84 de los géneros más comunes son los del tipo nematodo *Ascaris* (B. Jimenez, 2007).

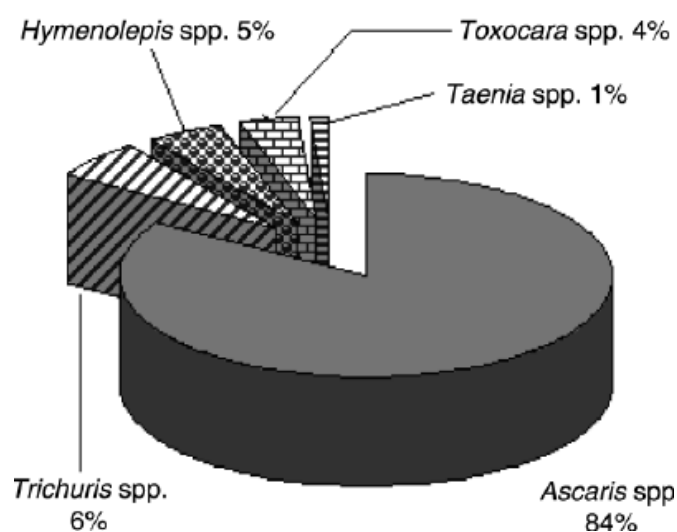


FIGURA 7 GÉNEROS ENCONTRADOS EN AGUA RESIDUAL FUENTE: B. JIMENEZ, 2007

Los huevos y larvas son el agente infectante ya que, los helmintos o gusanos, no pueden sobrevivir fuera del huésped. No obstante, aunque se inicie el desarrollo de la larva o huevo dentro del huésped, los huevos son capaces de convertirse en larva fuera del huésped con unas condiciones de temperatura y humedad determinadas. Estas condiciones óptimas pueden encontrarse en suelos y cultivos regados con AR donde los huevos pueden desarrollarse en 10 días. Además, los huevos de helmintos pueden sobrevivir en estado latente en agua, suelo y cultivos durante varios meses o años (Feachem et al., 1983).

1.3.2.1. FACTORES DE ELIMINACIÓN DE HELMINTOS

La gran resistencia que presentan los huevos de helmintos, como se ha mencionado en el apartado anterior, hace que éstos sean muy difíciles de eliminar (B. Jimenez, 2007). La inactivación de dichos huevos es nula si no se llega, al menos, a una temperatura de 40°C o una humedad menor al 5%. En el tratamiento de AR, a diferencia del tratamiento de lodos, las condiciones de inactivación mencionadas difícilmente pueden lograrse. Por lo tanto, normalmente los huevos de helmintos se eliminan de las AR y se inactivan en el lodo (Chavez et al., 2004).

En cuanto a la inactivación de huevos en el fango, con las condiciones anteriormente citadas, no se han estudiado los ratios de tiempo que se deben cumplir para poder tener una inactivación eficaz de todas las especies sino que, sólo para los huevos del

helminto *Ascaris* se ha determinado que se necesitan 10-20 días (Jimenez-Cisneros, 2008). También se ha demostrado mejores resultados de inactivación de huevos en la estabilización del fango con tratamiento anaerobio termófilo, presentando valores de tiempo de retención más bajos que un tratamiento de digestión anaerobio mesófilo (De León y Jenkins, 2002).

La eliminación de huevos de helmintos en agua, se basa en el hecho de que éstos son partículas que forman parte de la fracción del contenido de sólidos suspendidos totales del agua. Además, se ha demostrado que mediante radiación ultravioletas (UV) u ozono (O₃), no se obtienen resultados significativos en cuanto a la destrucción e inactivación del huevo de *Ascaris* (Brownell y Nelson, 2006; Neftalí Rojas-Valencia y Orta de Velásquez, 2010). El que se consideren partículas hace que los mecanismos utilizados para la eliminación de sólidos suspendidos sean útiles también para la eliminación de huevos. Dichos mecanismos son principalmente: sedimentación, filtración y coagulación-floculación (Brownell y Nelson, 2006; Chavez et al., 2004). En la Figura 8 se observa la correlación que presentan los huevos de helminto y (a) los sólidos suspendidos totales (SST) y (b) las partículas de 20-80µm (Chavez et al., 2004).

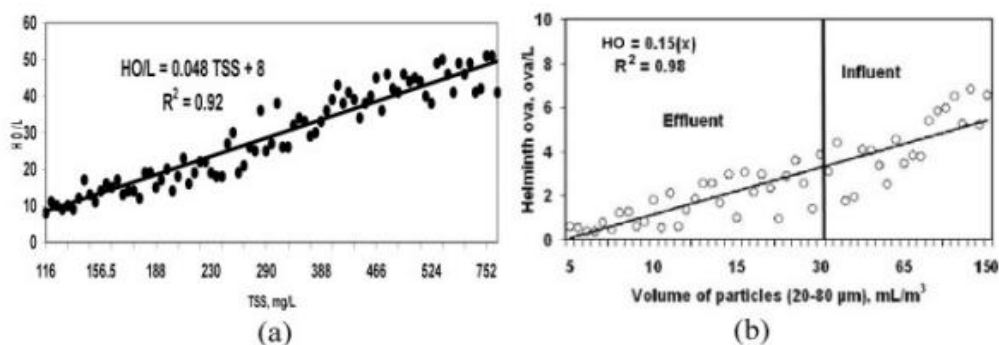


FIGURA 8 CORRELACIÓN ENTRE HUEVOS DE ELMINTO (HO) Y (A) SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES (SST) Y (B) EL CONTENIDO DE PARTÍCULAS DE 20-80MICROMETROS. FUENTE: CHAVEZ ET AL., 2004

1.3.2.2. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE HELMINTOS

Existen numerosos métodos para la enumeración de huevos y larvas de helmintos tanto en fango como en aguas. Todos los métodos disponibles están basados en uno de dos principios fundamentales: o bien mediante la separación de los patógenos por flotación en una solución de densidad relativamente alta, o bien las materias grasas o de otra clase, se separan en una solución interfase (como éter o acetato de etilo) mientras que los parásitos sedimentan en un tampón no miscible. Ambos procesos están basados en la fuerza centrífuga (Amoah et al., 2017).

Bouhoum y Schwartzbrod, en 1989, compararon distintos métodos de análisis para su aplicación en AR teniendo en cuenta las ventajas y desventajas que presentaban cada uno de ellos. Finalmente, llegaron a la conclusión de que, para el recuento e identificación de huevos de helmintos, adaptado por ellos a las AR, el método de Bailenger era el idóneo por dos simples razones: utiliza reactivos poco costosos y concentra eficazmente las especies que normalmente se encuentran en AR (Ayres y Duncan Mara, 1997).

El método Bailenger modificado, método propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS), está basado en el segundo principio anteriormente citado. Dicho método utiliza una serie de reactivos que, gracias a la disminución del pH, hace que los parásitos sedimenten quedando separados de grasas y otras sustancias (Ayres y Duncan Mara, 1997)

El método Bailenger modificado presenta las siguientes ventajas:

- Recogida y preparación de muestras sencillas, sin contenedores especiales y mínimo equipo de laboratorio para el tratamiento de la muestra.
- Necesidad de pocos reactivos y de bajo coste.
- El portaobjetos McMaster a utilizar no requiere periodos largos de tiempo para la evaluación de las muestras.
- Se pueden examinar submuestras para obtener una mayor precisión y una mayor homogeneización.

Aun resultando útil, sencillo y barato, presenta una serie de limitaciones:

- El porcentaje de observación de huevos cuando se aplica el método es desconocido, aun pudiendo compararse ventajosamente frente a los demás métodos.
- El método no es adecuado para muchos huevos de operculado o de trematodo al presentar huéspedes acuáticos intermedios. Dichos huevos pueden flotar en el sulfato de zinc pero rápidamente hundirse o deformarse.
- El reactivo utilizado en el método: el éter es muy tóxico e inflamable. No obstante, también puede utilizarse acetato etílico que es menos tóxico y presenta puntos de ebullición e inflamación más bajos.

1.4. REUTILIZACIÓN DE AGUAS Y FANGOS

El objetivo del tratamiento de AR es permitir que los efluentes humanos e industriales sean eliminados sin peligro para la salud humana y para el medio ambiente así como la revalorización de los subproductos generados a partir del tratamiento. De esta manera, se persigue conseguir el restablecimiento del equilibrio de la oferta y la demanda del agua dulce, como se ha mencionado anteriormente, mediante su posible reutilización (Pescod, 1992). No obstante, en el tratamiento de AR municipales,

también existe la producción de grandes cantidades de lodos de depuradora, los cuales también requieren una gestión adecuada y ambientalmente aceptada antes de la disposición final en vertedero o su posible reutilización en, por ejemplo, agricultura (Fytily y Zabaniotou, 2008; Kelessidisa y Stasinakis, 2012).

1.4.1. REUTILIZACIÓN DEL AGUA

La Directiva Marco del Agua (2000/60/CE) supuso un antes y un después en la protección y conservación de los ecosistemas acuáticos promoviendo un uso sostenible del agua. La gestión sostenible del agua no sólo se considera desde el punto de vista de la demanda sino también en la protección de la calidad y cantidad de la misma. Durante estos últimos años se ha fomentado el ahorro y la eficiencia del uso en busca de fuentes alternativas de agua como es la reutilización de las aguas (Camacho García et al., 2003). Después de la comparación de varias alternativas de suministro de agua, la Comisión Europea (CE) concluyó que la alternativa de reutilización de agua es la que supone un menor coste de inversión y energía (Farbiarz Mas, 2016).

En la actualidad, la CE está estudiando los requisitos mínimos de calidad que deben cumplir las aguas reutilizadas ya sea para riego o la recarga de acuíferos con el fin de establecer una norma para este año 2017. Además, la CE pretende crear un cuerpo legislativo global en la UE referente a esta materia y fomentar el uso de agua regenerada así como enseñar los beneficios y riesgos reales que puede suponer la utilización de agua residual regenerada (Farbiarz Mas, 2016).

Asimismo, la OMS en su documento “WHO Guidelines for the safe use wastewater, excreta and greywater” del 2006, relaciona los objetivos establecidos por la CE en cuanto a la reutilización de aguas considerando la reutilización del agua como un recurso estratégico y de especial valor en zonas donde existe estrés hídrico, sin comprometer la salud pública y la protección del medio ambiente (The World Health Organization, 2006).

Actualmente, un tercio de la UE se encuentra afectada por estrés hídrico durante todo el año, sobre todo en lugares con clima árido o semiárido. Éstos sufren escasez de recursos hídricos conllevando a disfunciones y, en general a una disminución significativa de la calidad del agua (Comisión Europea, 2010; Gil Morales, 1999).

España es una de las regiones que, a nivel climatológico, tiene zonas de baja pluviometría y largos períodos de sequía, obligando a racionalizar y optimizar la

gestión del agua (Gil Morales, 1999) (Angelakis et al., 2000). A todo esto se le suma el aumento de demanda provocando la necesidad de búsqueda de recursos complementarios o nuevos (Camacho García et al., 2003). Una posible solución es la reutilización del agua que además presenta como ventaja la garantía tanto de la calidad como del caudal de agua disponible, no dependiendo de la estacionalidad del recurso ni de las épocas de sequía (Angelakis et al., 2000).

1.4.1.1. ÁMBITO LEGISLATIVO EN ESPAÑA SOBRE LA REUTILIZACIÓN DE AGUA.

El Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas dictamina, en el artículo 109, la necesidad de desarrollo de establecer por parte del Gobierno las condiciones básicas de reutilización y la calidad exigible a las aguas regeneradas (RDL 1/2001, de 20 de julio). Y, es el 7 de diciembre de 2007, cuando se aprueba el Real Decreto (RD) de reutilización de aguas modificando el Reglamento del Dominio Público Hidráulico (RDPH) aprobado por el Real Decreto 849/1986 del 11 de abril mediante la derogación de los artículos 272 y 273 que regulaban la reutilización de las aguas (RD 1620/2007, de 7 de diciembre).

Es en este nuevo RD aparecen, en el ANEXO I, los actuales valores máximos admisibles de los parámetros en función de los usos a los que está destinada el agua regenerada distinguiéndose cinco grandes grupos: urbano, agrícola, industrial, recreativo y ambiental. Además establece la frecuencia y método de análisis de los parámetros. El tratamiento de análisis se puede llevar a cabo mediante el control analítico o autocontrol, según el parámetro analizado.

Los parámetros que se tienen en cuenta, por su presencia o ausencia, a la hora de establecer la calidad de las aguas regeneradas según la legislación vigente son:

- Nematodos intestinales
- *Escherichia coli*
- Sólidos en suspensión
- Turbidez
- Nitrógeno Total y Fosforo Total
- *Legionella spp.*, *Taenia spp.*, *Salmonella spp.*
- Otros contaminantes: metales y compuestos orgánicos.

En las siguientes tablas 2 y 3 se encuentran los métodos propuestos para determinar los distintos parámetros tanto microbiológicos como contaminantes. No obstante, se podrán utilizar métodos alternativos que estén validados y den resultados comparables a los obtenidos por el de referencia. Sólo los análisis de contaminantes deben cumplir

los valores de incertidumbre y límite de cuantificación especificados en la Tabla 2. Los ensayos realizados en laboratorio deben cumplir el sistema de calidad según la UNE ISO 17025 (RD 1620/2007, de 7 de diciembre).

TABLA 3 MÉTODOS O TÉCNICAS PARA ANALIZAR LOS PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS.

PARÁMETRO	MÉTODOS O TÉCNICAS ANALÍTICAS DE REFERENCIA
Nemátodos intestinales	Método Bailinger modificado por Bouhoum y Schwartzbrod. "Analysis of wastewater for use in agriculture" Ayres y Mara O.M.S. (1996)
<i>Esterichia coli</i>	Recuento de Bacterias Escherichia Coli β - Glucuronidasa positiva
<i>Legionella spp</i>	Norma ISO 11731: 2007 Calidad del Agua. Detección y enumeración de Legionella.-
<i>Taenia saginata</i>	-
<i>Taenina solium</i>	-

TABLA 4 TÉCNICAS DE REFERENCIA PARA EL ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS CONTAMINANTES.

PARÁMETRO	TÉCNICA DE REFERENCIA	U ²	LC ²
Sólidos en suspensión (SS)	Gravimetría con filtro de fibra de vidrio	30	5mg/L
Turbidez	Nefelometría	30	0,5 UNT ³
Nitratos	Espectroscopía de absorción molecular Cromatografía Iónica	30	10 mg NO ₃ /L
Nitrógeno Total (N_T)	Suma de Nitrógeno Kjeldahl, nitratos y nitritos Espectrofotometría de plasma	30	3 mg N/L
Fósforo Total (P_T)	Espectroscopía de absorción molecular Espectrofotometría de plasma	30	0,5 mg P/L
Sustancias Peligrosas	Cromatografía Espectroscopía	Metales: 30 Orgánicos: 50	30 de NCA ⁴

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.

³ Unidades Nefelométricas de Turbidez

⁴ Normas Calidad Ambiental

Como se ha mencionado anteriormente, los valores máximos son en función del uso al que vaya destinada el agua regenerada. En la siguiente tabla 3-5 se describen los valores máximos admisibles de los principales parámetros a tener en cuenta según los distintos usos del agua regenerada recogidos en el RD 1620/2007 y descritos en el ANEXO I.A:

TABLA 5 VALORES MÁXIMOS ADMISIBLES SEGÚN EL USO DEL AGUA REGENERADA (FUENTE: RD 1620/2007-ANEXO I.A)

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	Nemátodos intestinales	<i>Esterichia coli</i>	Sólidos en suspensión	Turbidez	Otros criterios
1. USOS URBANOS					
CALIDAD 1.1: Residencial - Riego jardines privados. - Descarga de aparatos sanitarios.	1 huevo/10L	0 (UFC ¹ /100mL)	10 mg/L	2 UNT ²	OTROS CONTAMINANTES ³ contenidos en la autorización de vertido AR: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas ⁴ deberá asegurarse el respeto de las NCAs. ⁵ (*) <i>Legionella spp.</i> 100 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización)
CALIDAD 1.2: Servicios - Riego de zonas verdes urbanas. - Baldeo de calles. - Sistemas contra incendios. - Lavado industrial de vehículos.	1 huevo/10L	200 (UFC/100mL)	20 mg/L	10 UNT	
2. USOS AGRÍCOLAS					
CALIDAD 2.1: - Riego de cultivos con aplicación del agua regenerada con la parte comestible para alimentación humana en fresco.	1 huevo/10L	100 UFC/100 mL	20 mg/L	10 UNT	<i>Legionella spp.</i> 1000 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización) (*)
CALIDAD 2.2: - Riego de productos para consumo humano con posible contacto directo pero el consumo no es en fresco sino con tratamiento industrial posterior. - Riego de pastos para consumo de animales productores de leche o carne. - Acuicultura	1 huevo/10L	1.000 UFC/100 mL	35 mg/L	No se fija límite	<i>Taenia saginata</i> y <i>Taenia solium</i> : 1 huevo/L (si se riegan pastos para consumo de animales productores de carne) (*)

¹ Unidades Formadoras de Colonias

² Unidades Nefelométricas de Turbidez

³ ver el Anexo II del RD 849/1986, de 11 de abril.

⁴ ver Anexo IV del RD 907/2007, de 6 de julio.

⁵ 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.

(*) Se repite el párrafo de OTROS CONTAMINANTES.

TABLA 6 CONTINUACIÓN

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	Nemátodos intestinales	<i>Esterichia coli</i>	Sólidos en suspensión	Turbidez	Otros criterios
2. USOS AGRÍCOLAS					
CALIDAD 2.3					
<ul style="list-style-type: none"> - Riego localizado de cultivos leñosos que impida el contacto del agua regenerada con los frutos consumidos en la alimentación humana. - Riego de cultivos de flores ornamentales, viveros, invernaderos sin contacto directo del agua regenerada con las producciones. - Riego de cultivos industriales no alimentarios, viveros, forrajes ensilados, cereales y semillas oleaginosas. 	1 huevo/10L	10.000 (UFC ¹ /100mL)	35 mg/L	No se fija límite	<i>Legionella spp.</i> 100 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización) (*)
3. USOS INDUSTRIALES					
CALIDAD 3.1					
<ul style="list-style-type: none"> - Aguas de proceso y limpieza excepto en la industria alimentaria. - Otros usos industriales. 	No se fija límite	10.000 UFC/100 mL	35 mg/L	15 UNT	<i>Legionella spp.</i> 100 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización) (*)
<ul style="list-style-type: none"> - Aguas de proceso y limpieza para uso en la industria alimentaria. 	1 huevo/10L	1.000 UFC/100 mL	35 mg/L	No se fija límite	<i>Legionella spp.</i> 100 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización) (*)
CALIDAD 3.2					
<ul style="list-style-type: none"> - Torres de refrigeración y condensadores evaporativos. 	1 huevo/10L	Ausencia UFC/100 mL	5 mg/L	1 UNT	<i>Legionella spp.</i> : Ausencia UFC/L

TABLA 7 CONTINUACIÓN

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	Nemátodos intestinales	<i>Esterichia coli</i>	Sólidos en suspensión	Turbidez	Otros criterios
4. USOS RECREATIVOS					
CALIDAD 4.1 -Riego de campos de golf	1 huevo/10L	200 UFC/100 mL	20 mg/L	10 UNT	<i>Legionella spp.</i> 100 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización) (*)
CALIDAD 4.2 -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	PT : 2 mg P/L (en agua estancada) (*)
5. USOS AMBIENTALES					
CALIDAD 5.1 - 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	Nitrógeno _{Total} : 10 mg N/L Nitratos (NO ₃): 25 mg NO ₃ /L Art. 257 a 259 del RD 849/1986
CALIDAD 5.2 - Recarga de acuíferos por inyección directa.	1 huevo/10L	0 UFC/100 mL	10 mg/L	2 UNT	
CALIDAD 5.3 - Riego de bosques, zonas verdes y de otro tipo no accesibles al público. - Silvicultura.	No se fija límite	No se fija límite	35 mg/L	No se fija límite	(*)
CALIDAD 5.4 -Otros usos ambientales (mantenimiento humedales, caudales mínimos y similares).	La cantidad mínima requerida se estudiará caso por caso				

Además de los parámetros a medir y la metodología a seguir para su medición, en el RD 1620/2007, se dictamina el control que deberá realizarse a partir de las frecuencias mínimas de muestreo y análisis según el parámetro. Las frecuencias podrán ser modificadas en una reducción del 50 si, tras un año de control, se demuestra que no es probable la presencia de los agentes contaminantes así como los microorganismos indicados en las aguas. Si el número de muestras con concentración inferior al VMA del Anexo I.A del RD 1620/2007 (Tablas 3-5) 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. Por último, si el resultado de un control supera al menos en uno de los parámetros los rangos de desviación máxima establecidos (que se establecen en el Anexo I.C del RD 1620/2007) la frecuencia de control del parámetro que supere los rangos de desviación se duplicará durante el resto de este período y el siguiente.

A continuación, se describen las frecuencias mínimas normales a seguir según sean parámetros microbiológicos (Tabla 7) o contaminantes (Tabla 8):

TABLA 8 FRECUENCIAS MÍNIMAS DE ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS SEGÚN EL USO DEL AGUA REGENERADA.

USO	CALIDAD	Nemátodos intestinales	<i>Esterichia coli</i>
1. USO URBANO	1.1 y 1.2	Quincenal	2 veces semana
2. USO AGRARIO	2.1	Quincenal	Semanal
	2.2	Quincenal	Semanal
	2.3	Quincenal	Semanal
3. USO INDUSTRIAL	3.1	-	Semanal
	3.2	Semanal	3 veces semana
4. USO RECREATIVO	4.1	Quincenal	2 veces semana
	4.2	-	Semanal
5. USO AMBIENTAL	5.1	-	2 veces semana
	5.2	Semanal	3 veces semana
	5.3	-	-
	5.4	-	-

TABLA 9 FRECUENCIAS MÍNIMAS DE ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS CONTAMINANTES SEGÚN EL USO DEL AGUA REGENERADA.

USO	CALIDAD	SS	Turbidez	N _T y P _T	OTROS CONTAMINANTES	OTROS CRITERIOS
1. USO URBANO	1.1 y 1.2	Semanal	2 veces semana	-	El Organismo de cuenca valorará la frecuencia de análisis sobre la base de la autorización de vertido y del tratamiento de regeneración.	Mensual
	2.1	Semanal	Semanal	-		Mensual
2. USO AGRARIO	2.2	Semanal	-	-		Quincenal
	2.3	Semanal	-	-		-
	3.1	Semanal	Semanal	-		Mensual
3. USO INDUSTRIAL	3.2	Diaria	Diaria	-		<i>Legionella spp.</i> 3 veces semana
	4.1	Semanal	2 veces semana	-		-
4. USO RECREATIVO	4.2	Semanal	-	Mensual		-
	5.1	Semanal	-	Semanal		-
5. USO AMBIENTAL	5.2	Diaria	Diaria	Semanal		Semanañ
	5.3	Semanal	-	-	-	
	5.4				Frecuencia igual al uso más similar	

1.4.2. REUTILIZACIÓN DEL FANGO

El lodo o fango de AR es considerado como el residuo producido por la separación de los componentes sólidos de los líquidos en el proceso de tratamiento de aguas negras (procedentes de las excretas humanas, orina y heces) y aguas grises (cuyo origen es la limpieza de calles y edificios, así como las aguas domiciliarias empleadas para higiene personal y doméstica) (Fytili y Zabaniotou, 2008). El fango, al ser considerado residuo, entra dentro del marco jurídico de la Unión Europea para la gestión de residuos la cual proporciona instrumentos que permiten la disociación entre el crecimiento económico y la producción de residuos, haciendo hincapié en la prevención así como en la preparación para la reutilización, el reciclaje u otras formas de valorización incluida la valorización energética (Ley 22/2011, de 28 de Julio)

La producción de fango derivado del proceso de tratamiento primario, secundario y muchas veces terciario, en Europa, tiene un peso seco per cápita de 90g por persona por día de promedio (Fytili y Zabaniotou, 2008). Los fangos de depuradora presentan, a su vez, componentes muy valiosos, como la materia orgánica y fitonutrientes (macro y micro), y componentes problemáticos, como son los metales pesados, contaminantes orgánicos y patógenos (Soliva y Huerta, 2004). Los organismos patógenos son debidos a la procedencia principal del fango: excretas humanas (Navarro-garcía, 2016). Según el tipo de planta y método operacional, el fango presentará una composición distinta. Conociendo la

composición del fango a procesar, se podrá determinar de forma eficaz la manera de tratarlo y eliminarlo. Según Metcalf and Eddy (2014), el control de los niveles de pH, ALK y contenido de ácidos orgánicos son relevantes para un posible tratamiento de digestión anaerobia del fango. Además, el contenido de metales pesados, plaguicidas e hidrocarburos también debe ser considerado si el tratamiento a utilizar es la incineración o la deposición en suelo. Finalmente, el contenido energético de los fangos es significativo cuando se consideran procesos térmicos como la gasificación, la pirólisis, la combustión y la oxidación húmeda.(Fytili y Zabaniotou, 2008).

La gran producción generada de fango diaria y sus posibles variaciones de composición, requieren métodos de manejo y técnicas adecuadas para sacar el mayor partido al residuo, ya sea para su óptima deposición para la prevención de posibles daños generados en el entorno y en la salud humana o para su potencial uso en la agricultura. Ésta última es una de las prácticas más utilizadas para este tipo de residuo, llegando en nuestro país a un 67% de lodos utilizados en el sector agrario en el 2015 (Resolución 3243/2009, de 20 de enero; Soliva y Huerta, 2004)

Las técnicas más comunes para la gestión de fangos, con o sin valorización energética, son:

- Digestión anaerobia mesofílica con o sin aprovechamiento energético del metano. En algunos casos el digestato se composte y en otros se somete a un secado térmico, que en ocasiones se destina a incineración.
- Deshidratación y compostaje.
- Deshidratación y secado térmico.
- Deshidratación, secado térmico y compostaje.
- Estabilización aerobia con o sin compostaje posterior.
- Estabilización química.
- Secado térmico e incineración.
- Secado térmico y coincineración en cementeras.

Todavía en alguna depuradora pequeña los lodos se someten a un almacenamiento prolongado como forma de tratamiento (Resolución 3243/2009, de 20 de enero).

1.4.2.1. ÁMBITO LEGISLATIVO EN ESPAÑA SOBRE LA UTILIZACIÓN DE FANGOS DE DEPURADORA.

En cuanto al ámbito legislativo que regula los lodos considerados residuos, como se ha mencionado en el apartado anterior, según el uso final son controlados por distintas leyes.

Si el lodo es aplicado en suelo agrícola se le aplicará el Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, en el cual se regula la utilización de sólidos en el sector agrario. Éste transpone la Directiva Europea 86/278/CEE, del 12 de junio del 1986. Sin embargo, de la necesidad de una mejor gestión de los lodos producidos y utilizados en el sector agrario surgió la Orden de 26 de octubre de 1993 sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario, cuya finalidad es determinar con precisión la información sobre producción y utilización de lodos de depuración en las actividades agrarias.

Por otro lado se tiene que tener en cuenta el Plan Nacional Integrado de Residuos (PNIR) del 2008-2015 el cual menciona que una de las medidas que tendrían que ser consideraras para la consecución de sus objetivos es la revisión y modificación de la Orden de 26 de octubre de 1993.

La posterior aprobación de la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados para la incorporación de la Directiva 2008/98/CE, de 19 de noviembre de 2008 incluye algunos cambios que se ven reflejados en la nueva Orden AAA/1072/2013, de 7 de julio, sobre la utilización de lodos de depuradora en el sector agrario. Esta nueva orden supone el cambio solicitado por el PNIR y deroga la Orden de 26 de octubre del 1993.

Sin embargo, todas tienen algo en común: los parámetros máximos admisibles a considerar si el lodo es utilizado en agricultura, siendo más o igual de estricto que la Directiva Europea.

No obstante, en estos últimos años se han venido desarrollando varias propuestas de modificación de la Directiva vigente (1986) con el fin de llevar a cabo una gestión más específica y delimitada de los lodos de la Unión Europea. De todos modos, hasta la fecha no se ha publicado ningún documento definitivo. El 3er borrador de trabajo sobre lodos (Working document on sludge, abril de 2000) considera la inclusión de ciertos parámetros agronómicos (además de los metales pesados) como son la materia orgánica, pH, N total y N-NH₄, P, K y micronutrientes, así como de los patógenos que pueda contener el lodo a causa de la naturalidad de éste. Además de estos parámetros, el 3er borrador persigue la necesidad de determinar ciertos contaminantes orgánicos así como el contenido en dioxinas y furanos, sustancias tóxicas para la salud humana y el medio ambiente. El borrador obliga a un tratamiento de estabilización e higienización para la reducción de la carga patogénica. Dicho proceso de higienización deberá llevarse a cabo mediante un “tratamiento avanzado” antes de su uso en agricultura. En cambio, si se opera con un “tratamiento convencional”, los criterios son menos restrictivos en cuanto a la reducción de la carga patógena. Así, los objetivos que se buscan con el tratamiento de lodos son, fundamentalmente, reducir su

volumen y su poder de fermentación, a través de la reducción de su contenido en materia orgánica y de microorganismos patógenos. De este modo, se evitará la producción de olores desagradables y la evolución del lodo de forma descontrolada. Como excepción, este documento establece que los Estados Miembros pueden estar exentos de higienizar el lodo cuando éste sea de naturaleza industrial, ya que, a priori, no debe contener microorganismos patógenos (Artículo 175 EC Treaty, abril de 2000).

TABLA 10 VALORES LÍMITE DE CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS, COMPUESTOS ORGÁNICOS, DIOXINAS Y FURANOS Y NIVEL DE PATÓGENOS EN LOS LODOS DESTINADOS A USO AGRÍCOLA (MG/KG MATERIA SECA).

VALORES LÍMITE	UE/ESPAÑA Directiva 86/278/CEE		UNIÓN EUROPEA		
	Suelos con pH menor de 7	Suelos con pH mayor de 7	3 ^{er} borrador ^a	Propuesta de Directiva ^b	
METALES PESADOS (mg/kg m.s.)	Cd	20	40	10	10
	Cd (total)	1000	1500	1000	1000
	Cr (IV)	-	-	10	-
	Cu	1000	1750	1000	1000
	Hg	16	25	10	10
	Ni	300	400	300	300
	Pb	750	1200	750	750
	Zn	2500	4000	2500	2500
	Se	-	-	-	-
	Mo	-	-	-	-
As	-	-	-	-	
COMPUESTOS ORGÁNICOS (mg/Kg m.s.)	AOX			500	-
	LAS			2600	5000
	DEHP			100	-
	NPE			50	450
	PAH PCB			6 0,8	6 0,8
DIOXINAS Y FURANOS (ng TE ⁺ / kg m.s.)	PCDD/F			100	100
NIVEL DE PATÓGENOS	<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> <i>spp</i>	<500 UFC/g ^c Ausencia en 25 g ^c	<500 UFC/g ^c Ausencia en 25 g ^c	<500 UFC/g Ausencia en 50 g ^d	<500 UFC/g Ausencia en 50 g ^d
<p>* Toxic Equivalency Factor. ** Los valores límite de metales pesados en España son los mismos que los indicados en la Directiva 86/278/CEE. a) 3er borrador del documento de trabajo sobre lodos (Working document on sludge. 27 April 2000). b) Propuesta de Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la aplicación de lodos en el suelo (30 de Abril de 2003). c) Según valor indicado en la Orden AAA/1072/2013 sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario. d) Los requerimientos de ausencia de Salmonella en 50 g y < 500 UFC/ g en <i>Escherichia coli</i> se aplican a aquellos lodos tratados mediante tratamientos avanzados de higienización. Para tratamientos convencionales, los requerimientos son menos restrictivos.</p>					

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es poner a punto el método de recuento de *E. coli* para realizar el seguimiento del conjunto de tres plantas piloto de tratamiento de AR con digestión anaerobia.

Para ello se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Poner a punto la metodología de detección y recuento de *Escherichia coli* para muestras de agua y de fango procedentes de distintos puntos del tratamiento de AR llevados a cabo en las plantas piloto.
- Poner a punto la metodología de detección y recuento de huevos de helmintos para muestras de agua y de fango del conjunto de plantas piloto.
- Analizar la evolución de los organismos patógenos (*E. coli* y helmintos) a lo largo del periodo de estudio para todos los puntos de muestreo.
- Obtener los rendimientos de eliminación de patógenos (*E. coli* y helmintos) en cada uno de los módulos que componen la planta piloto.
- Establecer la correlación existente entre las condiciones de operación de la planta y la cantidad de patógenos presentes.
- Determinar los posibles usos de reutilización del agua en cada uno de los módulos de la planta según la legislación vigente (RD 1620/2007, Orden AAA/1072/2013).
- También, se realizará una revisión de la legislación aplicada a la reutilización de lodos según los microorganismos patógenos presentes por debajo de determinados valores según la legislación vigente (método ISO-7251, UNE-EN ISO-6579).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para una mejor comprensión del conjunto y de los puntos de muestreo seleccionados, se describen, en este apartado, las distintas plantas piloto por separado, las cuales son explotadas por el grupo de investigación interuniversitario UPV-UV CALAGUA. Además, se detalla la metodología utilizada para la toma de muestras así como la frecuencia. Y, a continuación, se explican las técnicas llevadas a cabo para la detección de *E. coli* y helmintos del mismo modo que la metodología utilizada para el recuento de éstos.

3.1. PLANTAS PILOTO

Este trabajo experimental se ha llevado a cabo con muestras de efluentes e influentes tomados de un conjunto de plantas piloto de tratamiento de ARU situadas en la EDAR del Cuenca del Carraixet (Alboraia, Valencia). El conjunto de las plantas piloto consta de dos tratamientos consecutivos para agua residuales y uno para fangos.

3.1.1. REACTOR ANAEROBIO CON MEMBRANA SUMERGIDA (ANMBR)

Después de los pretratamientos pertinentes de desbaste, desengrasado, desarenado y tamizado y una decantación primaria del agua bruta procedente de la EDAR del Barranco del Carraixet, una primera planta piloto se encarga de gestionar una fracción de agua mediante un tratamiento de AnMBR.

La planta piloto AnMBR está compuesta de un reactor anaerobio con un volumen total de 1300L (900L de volumen de trabajo), conectado a dos tanques de membrana con un volumen total de 800 L (200L de volumen de trabajo). Cada tanque de membrana cuenta con una unidad de membrana de ultrafiltración de fibras huecas de escala industrial (PURON® KMS PUR-PSH31, poros de 0,03 µm, área de filtración de 31 m²). La temperatura de consiga del reactor es de 20,3±0,5°C y los TRCs y TRHs son de 68,2±3,7 días y 1,6±0,1 días, respectivamente.

Una simplificación de la planta piloto AnMBR se muestra en la **Figura 9**:

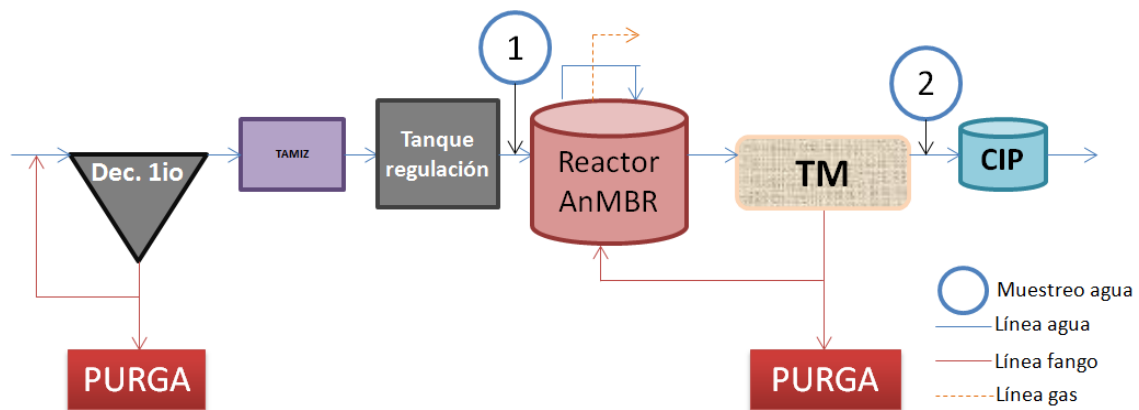


FIGURA 9 ESQUEMA SIMPLIFICADO DE LA PLANTA ANMBR. (TANQUE MEMBRANA, TM Y “CLEANING IN PLACE”, CIP)

En el esquema anterior se muestran los dos primeros puntos de muestreo tomados del conjunto de plantas. El primero de ellos a la entrada del reactor AnMBR (1) y el segundo al permeado de la filtración posterior al tratamiento por digestión anaerobia (2).

3.1.2. FOTOBIORREACTOR DE MEMBRANAS (MPBR)

Tras la primera planta piloto se genera un efluente (permeado) del AnMBR que no presenta sólidos y es rico en nutrientes llegando a concentraciones, durante el presente trabajo, de amonio y fósforo de 29,38 mg/L y 2,74 mg/L, respectivamente. No obstante, con objeto de amortiguar variaciones del efluente y oxidar los sulfuros (S^{2-}) (compuesto tóxico para las microalgas) a sulfatos (SO_4^{2-}) y/o azúfre elemental (S^0), el permeado del AnMBR es almacenado y aireado en un tanque de regulación de 0,2 m³ denominado deposito intermedio (DI). Posteriormente, el agua aireada será el influente del fotobiorreactor de membrana (MPBR).

El MPBR está compuesto por dos fotobiorreactores (FBRs) de placa plana de metacrilato y un sistema de filtración por membrana. Dichos FBRs tienen en total un volumen de trabajo de 220L. Cada FBR está dotado de un sistema de inyección de gases en la parte inferior para reducir la adhesión a las paredes de las microalgas e inyectar el CO₂ puro necesario para el control del pH a 7,5 y así evitar la precipitación del fosfato y el stripping de amonio. Asimismo, gracias al sistema de aireación se proporciona la agitación necesaria para la homogenización del cultivo evitando la sedimentación de éste.

Los dos FBRs están situados hacia al sur, con el fin de aprovechar la máxima intensidad de la luz incidente. En la cara opuesta de la superficie con incidencia de luz natural todos los

fotobiorreactores cuentan con un sistema de iluminación artificial formado por doce lámparas fluorescentes en el rango fotosintéticamente activo (Photosynthetically Active Radiation, PAR) 400 a 700 nm, aportando $273 \pm 118 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de modo que las microalgas reciben luz por ambas partes del fotobiorreactor.

Los FBRs están dotados de sensores de pH, radiación activa fotosintética y de temperatura. La temperatura se controla mediante un sistema de refrigeración con el que cuenta cada FBR formado por un serpentín de acero inoxidable sumergido en el cultivo con un valor objetivo de $23,8 \pm 1,1^\circ\text{C}$.

El sistema de filtración por membrana está compuesto por dos unidades de filtración o tanques de membrana (TMs) de 19 litros. Cada TM contiene un área de filtración de $3,44 \text{ m}^2$ y $0,3 \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Para evitar la formación de torta en la membrana de filtración, una fracción del gas del espacio de cabeza se recicla a cada TM. Gracias a dicha filtración, una parte del rechazo es recirculado consiguiendo un TRC de $4,3 \pm 0,3$ días y un TRH de $1,5 \pm 0,1$ días. El exceso de algas se lleva a una co-digestión anaerobia junto al fango de purga de la primera digestión y el procedente de la decantación primaria.

En la **Figura 10** se puede observar una simplificación del conjunto de la planta MPBR:

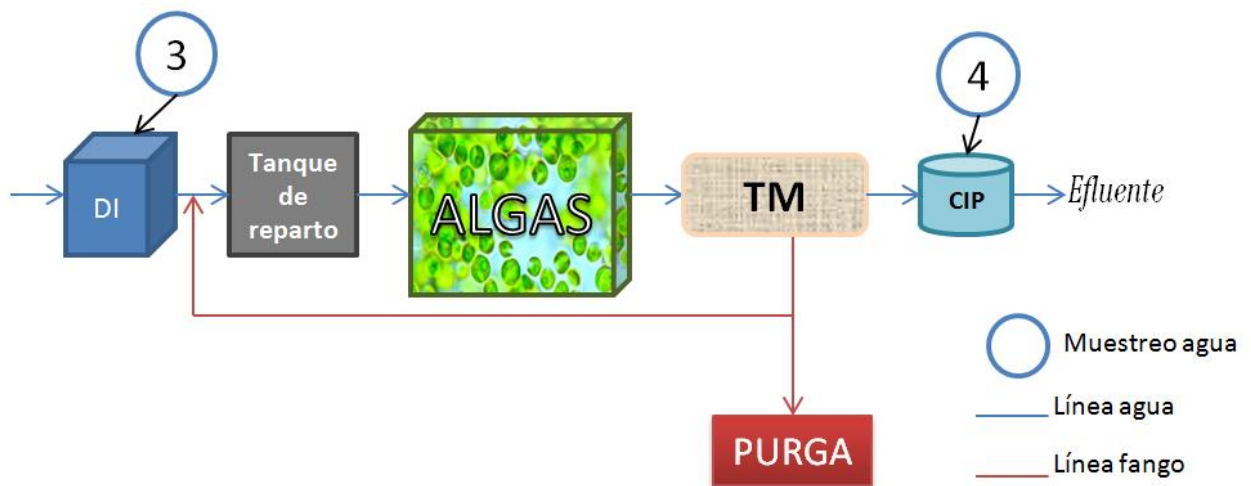


FIGURA 10 ESQUEMA SIMPLIFICADO DE LA PLANTA MPBR (DEPÓSITO INTERMEDIO, DI, TANQUE MEMBRANA, TM Y "CLEANING IN PLACE", CIP)

En la Figura 10 se muestran los dos puntos de muestreo que se llevan a cabo en la segunda planta piloto: en el DI (3) y en el tanque CIP (4).

3.1.3. DIGESTIÓN ANAEROBIA DEL FANGO CON MEMBRANAS: BIONUTEN

Finalmente, la última planta es la de co-digestión anaerobia de fango y algas que cuenta con un volumen total de 1000 L (hasta 900 L de volumen de trabajo) y un TM de 1 L equipado con una unidad de membrana de ultrafiltración de fibra hueca de 0,42 m² (PURON® KMS). El lodo primario, el digestato del AnMBR y las microalgas cosechadas contribuyen en una proporción de 15, 30 y 55, respectivamente al alimento de este último digestor. Además, para garantizar las condiciones óptimas de mezcla del co-digestor y favorecer la separación de los gases producidos de la fase líquida, una fracción del biogás producido se recicla al digestor con una soplante.

En la **Figura 11** se visualiza una simplificación de la planta de Bionuten:

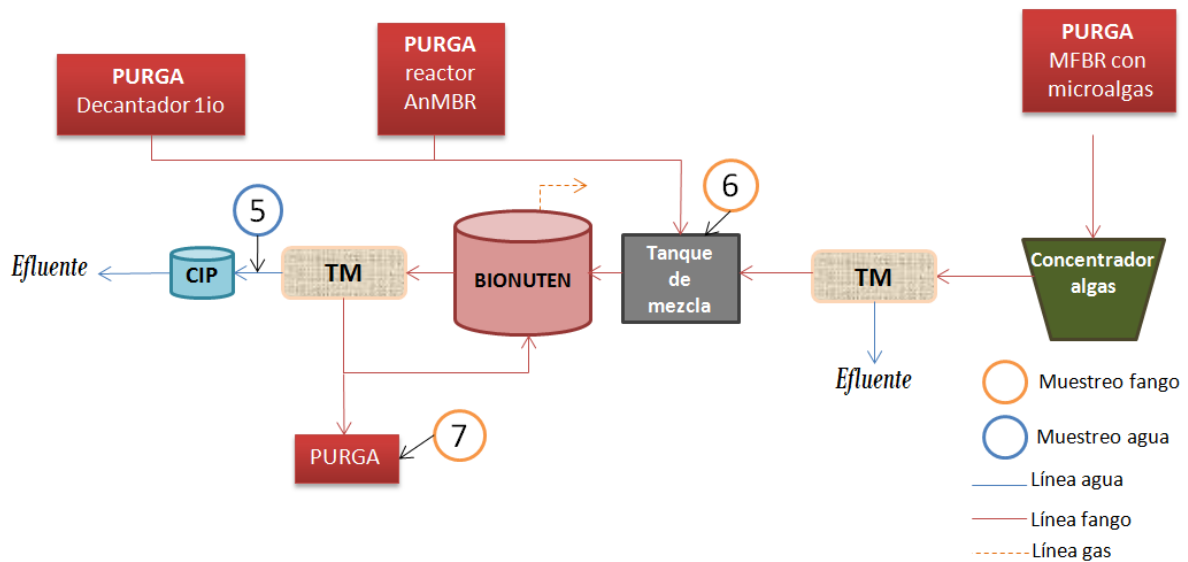


FIGURA 11 ESQUEMA SIMPLIFICADO DE LA PLANTA BIONUTEN (TANQUE MEMBRANA, TM Y “CLEANING IN PLACE”, CIP)

En la Figura 11 se muestran los últimos puntos de muestreo. El punto número 5 corresponde al efluente filtrado del digestor anaerobio Bionuten, a partir de un conducto anterior al CIP. Finalmente, las muestras 6 y 7 de fango, corresponden a la entrada del fango a digerir (purga del decantador primario y purga reactor AnMBR) mezclado con las algas y a la purga del reactor Bionuten, respectivamente.

3.2. TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestra de los distintos puntos (1-7) se realiza según la UNE-EN ISO 19458:2007 sobre el muestreo para el análisis microbiológico en el campo de la calidad del

agua. El personal especializado en tratamiento de agua se encargó de la recogida de muestras empleando botellas de vidrio de 500 ml opacas esterilizadas a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Además, para cada punto de muestreo se utilizaron guantes desechables que se cambiaron en cada toma de muestra.

Se realizaron 25 muestreos en un periodo de tiempo de 13 semanas.

3.3. CADENA DE CUSTODIA

Para el transporte y almacenamiento de la muestra antes de su análisis también se siguió la norma UNE-EN ISO 19458:2007. Una vez recogidas las muestras, el tiempo transcurrido entre el muestreo y el análisis fue lo más corto posible para no alterar la microflora de las muestras. En el laboratorio, las muestras se utilizaron para dos tipos de análisis: la detección y recuento de helmintos y de *E. coli*. Una fracción de cada una de ellas se utilizó para la detección y recuento de helmintos disponiéndolas en probetas numeradas según la muestra para su decantación previa al análisis a realizar. Y, la otra fracción, se reservó en nevera a 4°C para la detección y recuento de coliformes y *E. coli* hasta el momento del análisis.

3.4. METODOLOGÍA ANALÍTICA

3.4.1. *ESCHERICHIA COLI*

3.4.1.1. RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *E. COLI*

El método utilizado para el recuento e identificación de *Escherichia coli*, del presente trabajo, se fundamenta en la norma UNE-EN ISO 9308-1:2014 sobre la calidad del agua. La metodología está basada en el método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido de microbiota. La filtración se lleva a cabo mediante un filtro de $0.45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro con el fin de retener los microorganismos con bomba de vacío. El hecho de utilizar un poro de filtro tan pequeño hace que el método de filtración presente determinadas limitaciones debido a que las partículas en suspensión y sustancias químicas insolubles presentes en las muestras pueden quedar retenidas en la membrana durante la filtración, interfiriendo en el crecimiento de los microorganismos diana. Por estos motivos no es un buen método cuando las muestras presentan turbidez. Además, no siempre es sencillo determinar qué colonias son típicas de coliformes totales y *E. coli* (Köster et al., 2003).

El método de filtración no sólo se basa en la filtración en sí, sino en su posterior siembra en una placa de agar cromogénico para bacterias coliformes y en la incubación a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 21 ± 3 horas de la placa con el filtro. El agar utilizado es el agar cromogénico Chromocult[®] (CCA) de la casa comercial **Merck Millipore**. Este medio de cultivo selectivo sirve para la detección y recuento de coliformes y *E. coli* gracias a los sustratos Salmon-GAL y X-glucurónico.

Debido a la unión de la enzima de los coliformes β -D-Galactosidasa con el sustrato Salmon-GAL se producen colonias de color rojo-asalmonado. Y, por otra parte, las colonias de *E. coli*, además de la unión enzimática típica de coliformes de la β -D-Galactosidasa con el sustrato Salmon-GAL, también se produce el nexo del sustrato X-glucurónido con la β -D-glucuronidasa, enzima característica de *E. coli* generando colonias violetas-azules.

Las bacterias no coliformes aparecen como colonias incoloras o, con baja frecuencia, de color turquesa. La formulación del CCA contiene, como inhibidor de las bacterias gram-positivas, heptadecilsulfato sódico que no tiene efectos negativos sobre el crecimiento de *E. coli* ni de las bacterias coliformes. (**UNE-EN ISO 9308-1:2014**).

3.4.1.2. PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO

Para poner a punto el método se realizó un primer ensayo determinando las diluciones pertinentes para que el número de patógenos, en este caso *E. coli*, entrara dentro de los valores permitidos de baja microbiota y se pudiera ejercer el análisis de datos según la norma **UNE-EN ISO 8199:2005**. Cabe añadir, que todas las muestras de agua, al ser tomadas después de decantación o filtración, contiene poca o casi nula concentración de sólidos en suspensión, uno de los requisitos básicos según la norma para poder utilizar el método de filtración. Además, como se ha mencionado en el apartado de legislación nacional (1.4.1.1), sólo se especifica que el método tiene que basarse en la β -Glucuronidasa positiva, el cual utiliza el método de filtración.

3.4.1.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

La preparación de las placas petri con el medio agar Chromocult[®] (Figura 12) se ha realizado según las indicaciones del fabricante: 26,5 gramos de producto deshidratado para 1 L de agua destilada. Dicha mezcla se ha llevado a hervir con agitación continua de 700 rpm en un agitador magnético-calefactor (Figura 13). Una vez el líquido es homogéneo y ha

llegado al punto de ebullición se ha retirado de la placa calefactora y se ha dejado reposar la solución para evitar la condensación del medio en la superficie de la tapa de la placa petri. Una vez disminuida la temperatura a unos 55-60°C, se procede al vertido de la solución de agar en las placas cerca de una llama de mechero Bunsen para asegurar la máxima esterilización. Llegados a este punto, se dejan enfriar las placas hasta que se solidifique el agar y, posteriormente, se guardan en nevera a unos 4°C.



FIGURA 12 MEDIO DE CULTIVO DESHIDRATADO CHROMOCULT

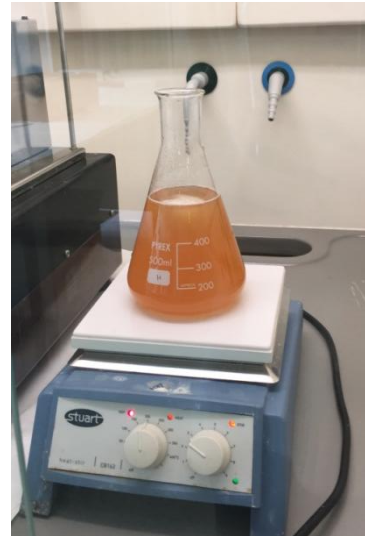


FIGURA 13 DISOLUCIÓN DEL MEDIO DESHIDRATADO EN AGUA DESTILADA MEDIANTE AGITACIÓN Y CALOR

3.4.1.4. MÉTODO DE FILTRACIÓN

Las muestras procedentes de la planta piloto han de ser diluidas previamente a la filtración por las limitaciones que presenta el método. Las diluciones se realizan con agua ultrapura (Milli-Q) y material autoclavado (Figura 14). Se efectuaron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-6} dependiendo de la carga presente en las distintas muestras. Y, una vez obtenidas todas las diluciones correspondientes, se procede al filtrado.



FIGURA 14 DILUCIONES DE LOS DISTINTOS PUNTOS DE MUESTREO

La filtración de las muestras se ha utilizado una rampa de filtración conectada a una bomba de vacío. Para el filtrado se han utilizado embudos estériles de 100 mL (Microfil[®]) y filtros estériles de 0.45 μm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (Microfil[®]). Este proceso se realiza en un ambiente estéril proporcionado por la llama de un mechero Bunsen (Figura 15).

Se filtran 100 ml de las tres últimas diluciones de cada una de las muestras por duplicado.

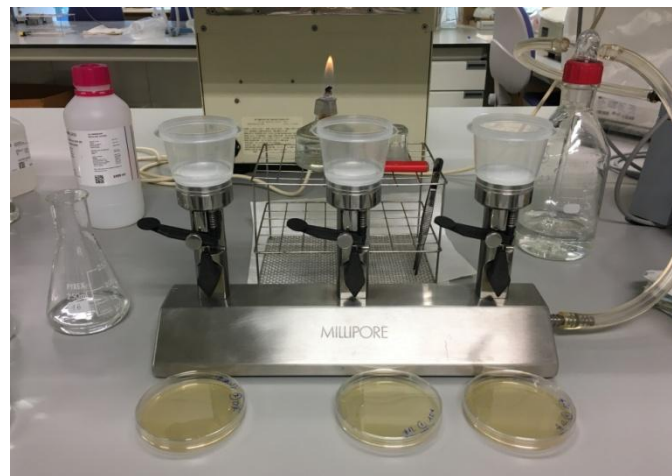


FIGURA 15 MATERIAL UTILIZADO EN LA FILTRACIÓN DE LAS MUESTRAS

Tras la filtración se coloca el filtro en una de las placas petri de agar cromogénico y se incuban a $36\pm 2^\circ\text{C}$ durante 21 ± 3 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procede al recuento que, a partir de las reacciones enzimáticas distintivas de *E. coli* y el resto de coliformes con los substratos presentes en el medio, presentaran un color violeta-azulado y rojizo-asalmonado,

respectivamente (Figura 16). El recuento se expresa como unidades formadoras de colonias por cada 100 ml filtrados (UFC/100 ml).

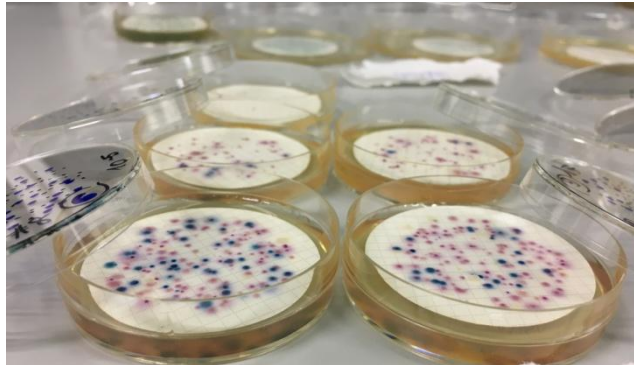


FIGURA 16 PLACAS PETRI INCUBADAS DURANTE 24 HORAS A 36±2°C

3.4.1.5. TRATAMIENTO DE DATOS

Para tratar los resultados obtenidos se utilizó la norma UNE-EN ISO 8199:2008 sobre las orientaciones generales para el recuento de microorganismos del ámbito de calidad del agua. Dicha norma describe los requisitos que se deben cumplir para poder realizar un recuento efectivo limitando el número total de colonias entre 10 y 200 por filtro incubado, a partir de un volumen filtrado conocido de agua.

Mediante las siguientes ecuaciones 1 y 2, que proporcionan la norma, se han calculado las concentraciones teniendo en cuenta el número de repeticiones y diluciones hechas para cada una de las muestras, obteniendo un resultado final en función de la media ponderada de los recuentos de cada placa.

$$C_S = \frac{Z}{V_{tot}} V_S \quad (\text{ec.1})$$

donde

C_S es el número de ufc en el volumen de referencia de la muestra;

Z es la suma de todas las colonias contadas sobre las membranas de filtración de las diluciones d_1, d_2, \dots, d_i

V_S es el volumen de referencia seleccionado para expresar la concentración de microorganismos en la muestra;

V_{tot} es el volumen total calculado de la muestra de origen inoculado en las placas numeradas. V_{tot} es la suma de los volúmenes separados de la porción de ensayo (muestra o dilución) o bien, se calcula a partir de la ecuación (2):

$$V_{tot} = (n_1V_1d_1) + (n_2V_2d_2) + \dots + (n_iV_id_i) \quad (\text{ec.2})$$

donde

V_{tot} es el volumen total calculado de la muestra original incluida en las placas numeradas;

n_1, n_2, \dots, n_i es el número de placas contadas para las diluciones d_1, d_2, \dots, d_i ;

V_1, V_2, \dots, V_i es el volumen de ensayo utilizado en las diluciones d_1, d_2, \dots, d_i ;

d_1, d_2, \dots, d_i es la dilución utilizada para el volumen de ensayo V_1, V_2, \dots, V_i ($d = 1$ para una muestra no diluida, $d = 0,1$, para una dilución decimal, etc.)

3.4.2. HELMINTOS

3.4.2.1. RECUENTO E IDENTIFICACIÓN DE HELMINTOS

El método más recomendado a utilizar en AR para la determinación de helmintos es el Método Bailenger modificado (Ayres y Duncan Mara, 1997). El principio del método se basa en la orientación que sufren las partículas fecales en función de su equilibrio hidrófilo/lipófilo una vez puestas en contacto con dos líquidos no miscibles (la fase acuosa y la fase lipófila de la técnica). El resultado es que los elementos con balance hidrófilo/lipófilo positivo se localizan en la fase acuosa y se acumulan por sedimentación, mientras que si el balance es negativo, se acumulan en la proximidad del éter formando una capa en la interfase entre los dos reactivos, con suficiente actividad como para impedir su sedimentación. A ello colaboran otros factores como la capacidad de disolución de ciertos componentes fecales por parte de los reactivos o el pH, que condiciona en parte la hidrofilia de las formas parasitarias, estableciéndose en 5 el valor que mejor se adapta a todas las posibilidades.

3.4.2.2. MÉTODO DE BAILENGER MODIFICADO

Para llevar a cabo el recuento e identificación de los helmintos se necesitan los siguientes reactivos y equipos:

Reactivos

- Sulfato de zinc (33)
- Éter o Acetato etílico
- Tampón de acetoacético: 15gr de trihidrato de acetato de sodio, 3,6 ml de ácido acético glacial, hasta obtener 1 litro con agua destilada.
- Solución detergente: TRITON X-100

Equipos

- Recipientes acopio muestras
- Centrifugadora
- Tubos centrifugadora con tapa
- Pipeta *Pasteur*
- Portaobjetos McMaster
- Mezcladora de vórtice
- 1 sifón
- 1 pipeta graduada de 10 ml
- Aspirador pipeta

Aunque el método original señala utilizar 1 litro para agua cruda y 10 litros para aguas tratadas y dejarlos sedimentar 1-2 horas, los pequeños caudales de la planta piloto han imposibilitado el análisis de ese volumen de agua y fango. El volumen utilizado para el análisis, en el presente trabajo, ha sido de 50ml dependiendo del funcionamiento de las plantas y sus caudales (Figura 17). Además, se ha dejado sedimentar más de 1-2 horas para asegurarse una óptima decantación.

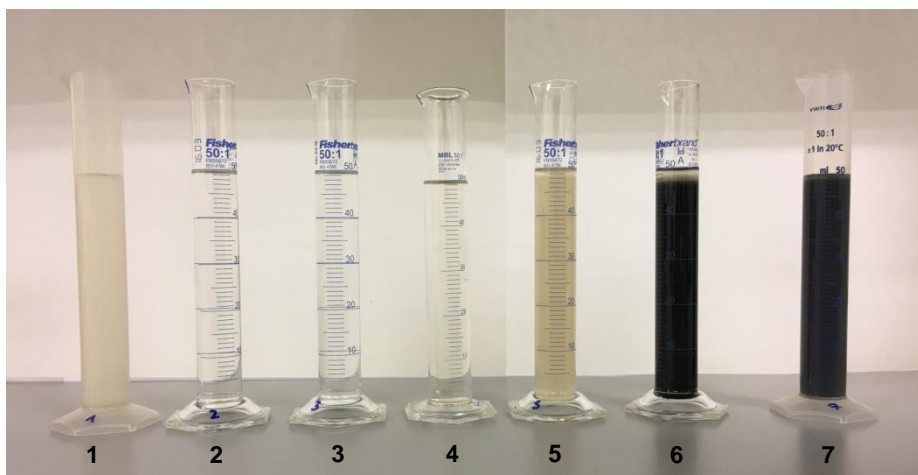


FIGURA 17 PROBETAS CON 50 ML MUESTRA DE CADA UNO DE LOS PUNTOS DE ANÁLISIS

Una vez sedimentado, se procede a la eliminación del 90% del sobrenadante utilizando el sifón y se transfiere el sedimento (el 10% restante) a 1 o más tubos de centrifugación. Es importante que el recipiente en el cual hemos dejado sedimentar se enjuague utilizando la solución detergente y se añada junto al sedimento en los tubos de centrifugación. Posteriormente centrifugar a $1000g$ durante 15 minutos.

Después del centrifugado, se elimina el material sobrenadante. En el caso de que se haya tenido que utilizar más de un tubo para una muestra, una vez quitados los sobrenadantes, se juntan los sedimentos de las mismas muestras y se vuelve a centrifugar.

A continuación, se suspende el sedimento en un volumen igual de solución tampón de acetoacético. No obstante, si el volumen del sedimento no supera los 2 ml, se tendrá que añadir 4 ml de solución tampón para asegurarse que no se produzca una nueva suspensión del sedimento en los siguientes pasos. Posteriormente, se añaden 2 volúmenes de acetato acético o éter y se mezcla con la mezcladora de vórtice.

Una vez mezclado se procede a una nueva centrifugación durante 15 minutos a $1000g$ y, de esta manera, se separa la muestra en tres fases distintas: en la capa inferior se encuentran las materias no grasas, más pesadas, incluidos los huevos y larvas de helminto y protozoos, encima se ésta se encuentra el tampón (transparente), y en la capa superior las materias grasas y otras que se encuentran unidas al éter o acetato etílico formando un tapón grueso y oscuro (Figura 18).

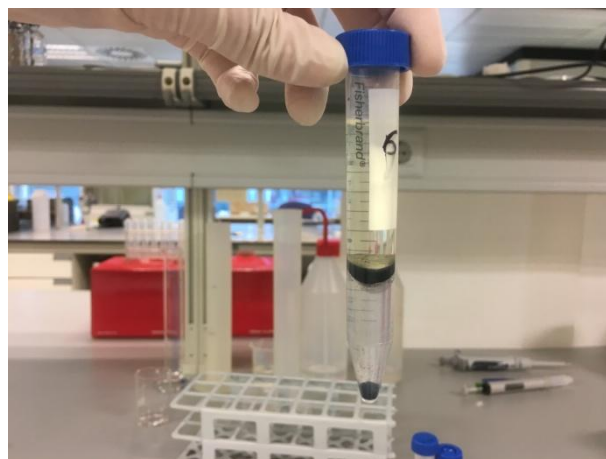


FIGURA 18 SEPARACIÓN DE LAS TRES FASES DE LA MUESTRA

A continuación, y con un solo movimiento se retira el sobrenadante, es decir, todas las capas exceptuando la inferior y se suspende el sedimento con cinco volúmenes de sulfato de zinc. Posteriormente se procede al mezclado y se retira rápidamente una parte alícuota con una pipeta *Pasteur* transfiriéndola a un portaobjetos McMaster. Finalmente, se deja reposar la muestra en el portaobjetos McMaster durante 5 minutos y, mediante el microscopio a 10x o 40x se lleva a cabo el recuento de huevos.

Mediante la siguiente ecuación (ec.3) se calculan el número de huevos por litro:

$$N = \frac{AX}{PV} \quad (\text{ec.3})$$

donde:

N = número de huevos por litro de la muestra

A = número de huevos contados en el portaobjeto McMaster o promedio del recuento en dos o tres portaobjetos

X = volumen del producto final (ml)

P =volumen del portaobjetos McMaster (0,3 ml)

V =volumen de la muestra original (litros)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO

A partir del primer ensayo teniendo en cuenta las limitaciones, tanto del método de filtración como el del análisis de los datos de recuento, se obtuvieron las diluciones óptimas para el recuento de microorganismos (Tabla 11). Dichas diluciones óptimas se han conocido mediante la filtración de las 7 muestras, 5 de agua y 2 de fango, de los distintos puntos de muestreo del conjunto de plantas piloto. Las muestras 1-5 corresponden a muestras de agua y las 6 y 7 a muestras de fango. Todas ellas se han diluido en un primer ensayo hasta 10^{-7} y filtrado 100 ml de cada una de las 7 diluciones para terminar sembrando los filtros en placas petri con medio agar Chromocult. Mediante este primer ensayo se obtuvieron las diluciones con la concentración viable de recuento de *Escherichia coli* y su óptimo análisis posterior de cada punto de muestreo.

TABLA 11 DILUCIONES ÓPTIMAS PARA CADA UNO DE LOS PUNTOS DE MUESTREO

Puntos de muestreo	Agua					Fango	
	1	2	3	4	5	6	7
Dilución óptima	10^{-5}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-4}	10^{-4}

En los siguientes análisis se realizó una dilución adicional, a la dilución óptima, de cada punto de muestreo con el objetivo de confirmar que el número de colonias determinado era el correcto. Todas las filtraciones se ejecutaron y se sembraron por duplicado de las dos últimas diluciones (la óptima y la posterior) de cada uno de los puntos.

4.2. RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *E. COLI*

4.2.1. PLANTA PILOTO ANMBR

Como se ha mencionado anteriormente, en la descripción de las plantas, la primera planta piloto se encarga de gestionar una fracción de agua mediante un tratamiento de AnMBR. Ésta contenía los dos primeros puntos de muestreo (1 y 2).

A medida que se calculaban las eficiencias de eliminación del efluente respecto a la entrada del reactor, se pensó que la fuente de error podría ser el CIP ya que éste podría tener contacto directo con la salida de toma de muestras. Por esta razón, se introdujo una válvula evitando así que el contenido del mismo pudiera afectar a las muestras. Además, la presencia de *E. coli* en cada una de las muestras analizadas hizo creer que sería

conveniente el lavado de las membranas de la planta piloto AnMBR ya que el tamaño de poro de éstas debería retener a toda presencia de patógeno.

A partir de éstas modificaciones llevadas a cabo a lo largo de todo el experimento, se obtuvieron notables mejoras bajando notablemente la presencia de patógenos y aumentando así la eficiencia de eliminación del primer tratamiento de la línea de agua.

Los valores obtenidos durante el seguimiento de *E. coli* del influente (punto de muestreo 1) y efluente (punto de muestreo 2) del digester anaerobio así como el cálculo de las eficacias de eliminación de cada uno de los días analizados, representador en porcentaje, se encuentran en la siguiente Tabla 12:

TABLA 12 VALORES DE INFLUENTE Y EFLUENTE DE UFC DE *E. COLI* EN 100 ML Y EFICACIAS DE ELIMINACIÓN DE ANMBR

Fecha	Influente AnMBR (UFC/100 ml)	Efluente filtrado AnMBR (UFC/100 ml)	Eficacias de eliminación (%)
14/03/2017	1.92E+07	9.62E+03	99.95
21/03/2017	6.20E+06	6.46E+03	99.90
23/03/2017	2.79E+06	6.22E+03	99.78
29/03/2017	5.50E+06	1.80E+03	99.97
30/03/2017	3.57E+06	6.07E+03	99.83
04/04/2017	4.12E+06	3.62E+02	99.99
06/04/2017	2.26E+06	4.52E+02	99.98
11/04/2017	4.75E+06	4.52E+02	99.99
27/04/2017	2.35E+06	5.21E+02	99.98
02/05/2017	3.48E+06	4.19E+02	99.99
11/05/2017	2.38E+06	6.00E+02	99.97
16/05/2017	3.74E+06	1.49E+03	99.96
18/05/2017	2.09E+06	1.66E+03	99.92
23/05/2017	1.68E+06	5.00E+02	99.97
25/05/2017	2.82E+06	2.31E+02	99.99
30/05/2017	3.18E+06	2.56E+03	99.92
01/06/2017	2.23E+06	5.00E+02	99.98
06/06/2017	5.91E+06	2.04E-02	100.00
23/05/2017	1.68E+06	5.00E+02	99.97
25/05/2017	2.82E+06	2.31E+02	99.99
08/06/2017	1.30E+06	1.25E+02	99.99
13/06/2017	9.13E+05	1.64E-01	100.00
15/06/2017	8.80E+05	-	-
20/06/2017	2.76E+05	4.76E-02	100.00
27/06/2017	2.67E+05	5.71E-02	100.00
29/06/2017	2.82E+05	1.05E-01	100.00

Como se puede observar en la Tabla 12, las eficacias de eliminaciones de *E. coli* son generalmente muy elevadas. No obstante, a partir de aproximadamente el 27-29/03/2017, donde se instala la válvula de seguridad anteriormente citada, disminuyen notablemente los valores de *E. coli*. Este hecho afirmaría la influencia del CIP en los resultados del efluente. Asimismo, a partir del 6/6/2017 se alcanza el 100% coincidiendo con el lavado químico de membranas. De igual manera, se observa gráficamente en la Figura 19 la disminución considerable de *E. coli* en el efluente después del lavado químico indicado con la línea roja. Este hecho podría demostrar que un buen estado de las membranas ayuda a la eliminación del patógeno.

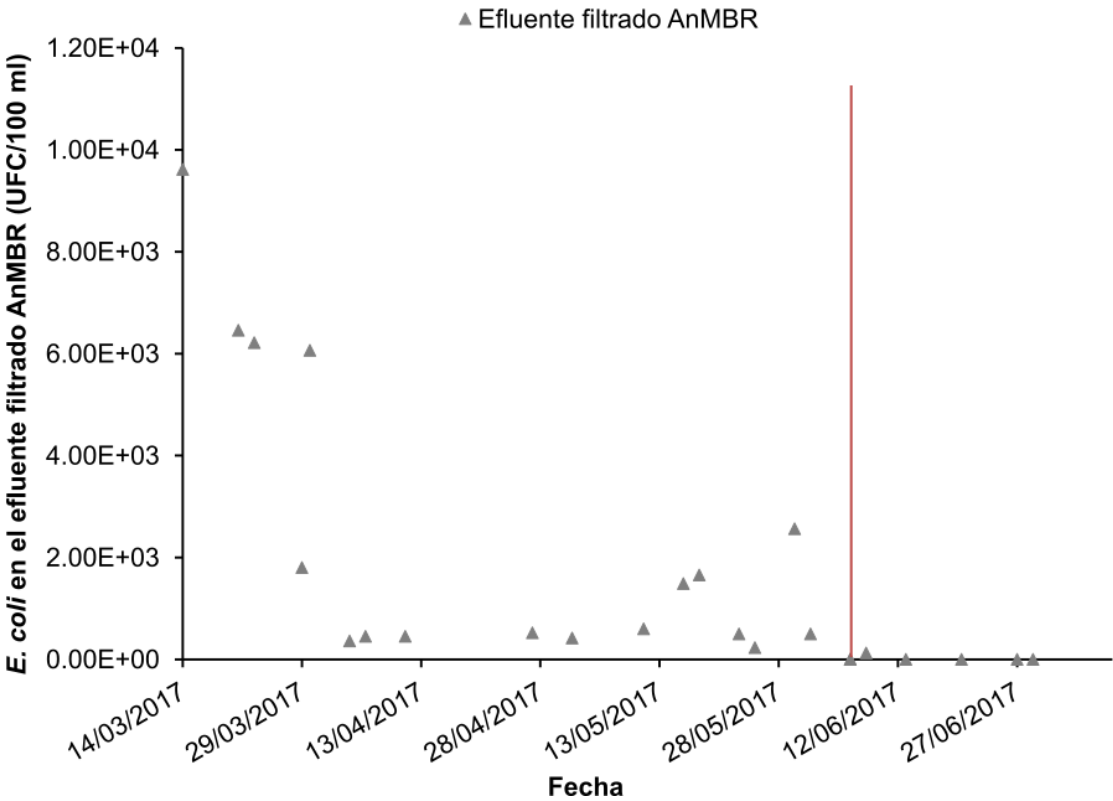


FIGURA 19 *E. COLI* EN ELEFLUENTE DE LA PLANTA PILOTO ANMBR. LA LÍNEA ROJA CORRESPONDE AL LAVADO QUÍMICO DE LAS MEMBRANAS.

En un primer momento, cuando se observaron los niveles altos de *E. coli*, se consideró que la membrana podría estar dañada, por esa razón se intentaron relacionar los parámetros operacionales de la planta con las colonias que se habían hallado. En la figura 20 se observan los parámetros de TRH (días), TRC (días), pH, temperatura y *E. coli* en el efluente:

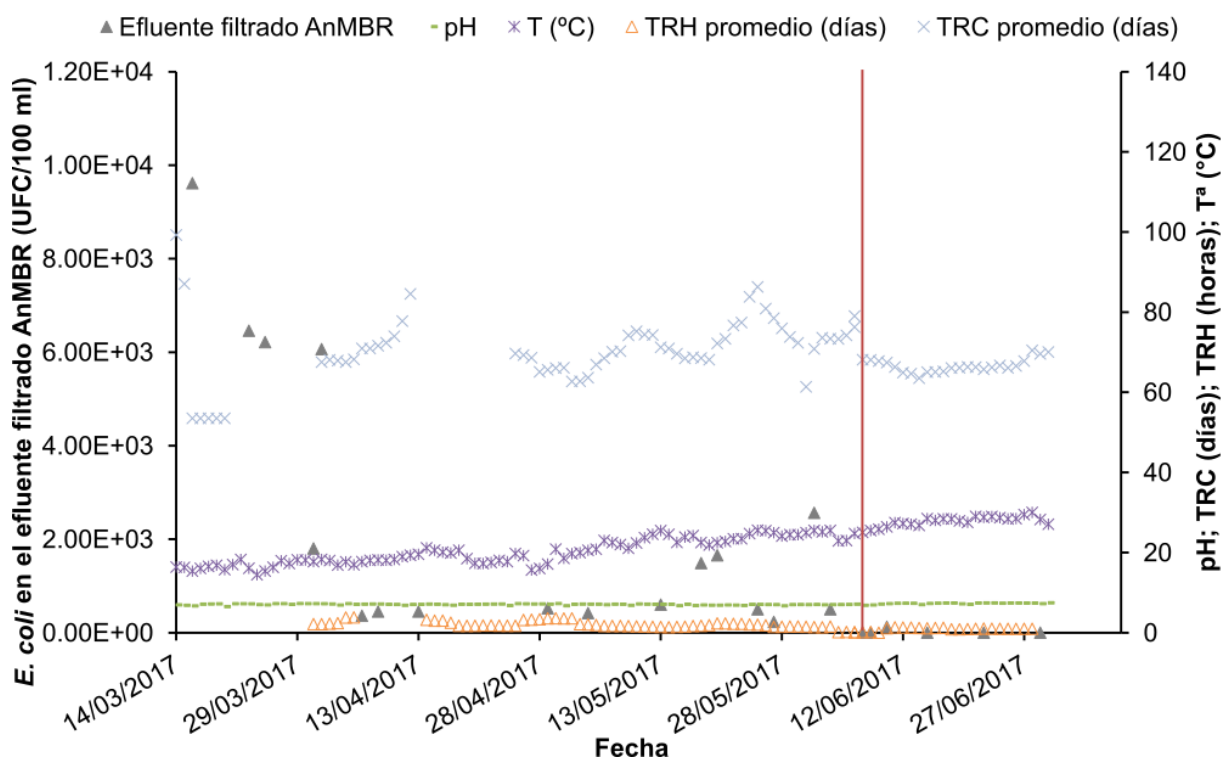


FIGURA 20 RELACIÓN DE EL TRH, TRC, PH Y TEMPERATURA CON *E. COLI* DEL EFLUENTE FILTRADO DE LA PLANTA PILOTO ANMBR

Como se muestra en la figura 20 existe una desviación de los valores de TRC y el TRH entre finales de marzo y principios de abril. Dicha perturbación fue causada por fallos operacionales y fugas en el sistema. No obstante, no se puede afirmar la correlación de las variables representadas con los distintos valores de *E. coli* ya que podrían ser debidos a ensuciamiento o problemas con las membranas. Del mismo modo, en ese período de tiempo aún no se tenía el método correctamente puesto a punto, especialmente en la toma de muestra.

Por otra parte, aunque la temperatura del reactor aumentara ligeramente, no se puede concluir que este parámetro influya en la concentración del patógeno. Del mismo modo, tampoco se encuentra relación entre *E. coli* y el pH ya que éste no ha variado en todo el transcurso de las analíticas.

Finalmente, en la figura 21 se muestran los distintos usos que podría tener el efluente de la planta piloto AnMBR en función únicamente del contenido de *E. coli*. Los valores de la leyenda corresponden a los distintos usos de reutilización según las Tablas 3-5 en el apartado de legislación:

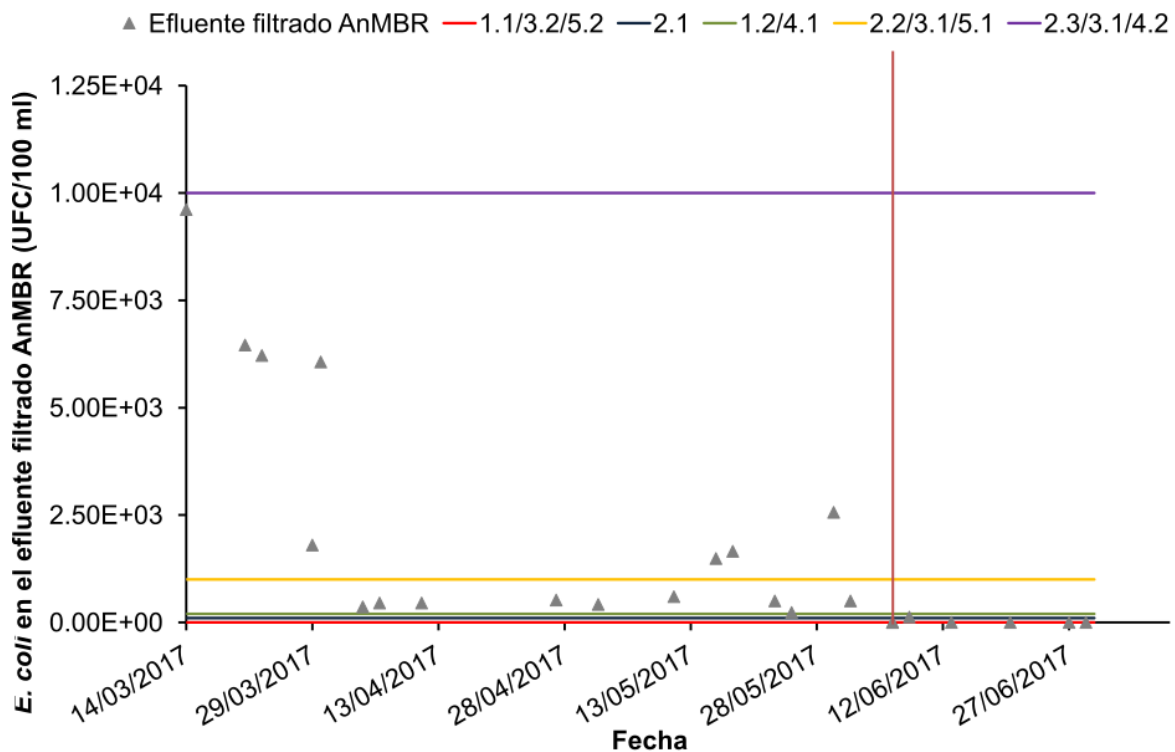


FIGURA 21 VALORES MÁXIMOS ADMISIBLES DE *E. COLI* PARA LA REUTILIZACIÓN DE AGUA TRATADA

Como se observa en la figura 21, todos los valores de *E. coli* en el efluente se encuentran por debajo de 10.000 UFC/100 ml. Casi el 50% de los análisis anteriores a la limpieza de membranas (línea roja) están entre los valores de 10.000 UFC/100ml y 1.000 UFC/100ml haciendo posible la reutilización del recurso hídrico en agricultura para riego de cultivos leñosos sin que el agua regenerada tenga contacto con los frutos, riego de cultivos de flores ornamentales, viveros... y riego de cultivos industriales no alimentarios. También se podría utilizar en el sector industrial como agua de proceso y limpieza (exceptuando la industria alimentaria). Finalmente, su uso también sería apto para estanques o masas de agua sin acceso al público.

El otro 50% de los análisis antes de la limpieza, se encontraron entre los valores de 1.000 y 200 UFC/100ml. El valor máximo admisible de 1.000 UFC/100ml presenta otros usos para el agua regenerada. No obstante, quizá utilizar dicha agua regenerada con el valor máximo admisible de 10.000 UFC/100ml sería lo más correcto ya que, numéricamente se puede observar que en muchos casos se encuentran los valores de UFC por debajo de éste pero por encima de 1.000 UFC/100ml. Además, la legislación no sólo se tiene en cuenta las colonias de *E.coli*. No obstante, es importante la reducción que padecieron dichas colonias después de la limpieza de las membranas.

Del mismo modo, cabe destacar que, esta agua, cumple con los límites de materia orgánica pero no con los de nutrientes, por lo que un posible uso sería para “fertigación”, es decir, agua de riego para cultivos que necesiten nutrientes. Este hecho supondría un importante ahorro en fertilizantes además de ahorros en los procesos de recuperación de P y N (cristalización, etc.)

4.2.2. PLANTA PILOTO MPBR

En este caso también se quisieron conocer las eficacias de eliminación de la planta piloto MPBR. En la siguiente Tabla 13 se muestran las distintas eficacias de eliminación en porcentaje de la salida (punto de muestreo 4) frente la entrada (punto de muestreo 3):

TABLA 13 VALORES DE INFLUENTE Y EFLUENTE DE UFC DE *E. COLI* EN 100 ML Y EFICACIAS DE ELIMINACIÓN DE MPBR

Fecha	Influente MPBR (UFC/100 ml)	Efluente filtrado MPBR (UFC/100 ml)	Eficacias de eliminación (%)
14/03/2017	4.23E+02	0.00E+00	100.00
21/03/2017	1.53E+04	-	-
23/03/2017	5.41E+03	0.00E+00	100.00
29/03/2017	9.01E+02	0.00E+00	100.00
30/03/2017	3.28E+02	0.00E+00	100.00
04/04/2017	3.17E+02	3.20E+01	89.90
06/04/2017	4.52E+01	0.00E+00	100.00
11/04/2017	1.09E+03	0.00E+00	100.00
27/04/2017	5.21E+03	2.84E+01	99.45
02/05/2017	1.90E+02	1.00E+01	94.75
11/05/2017	6.79E+02	0.00E+00	100.00
16/05/2017	5.26E+02	4.76E+00	99.09
18/05/2017	8.57E+02	0.00E+00	100.00
23/05/2017	3.80E+04	9.52E+00	99.97
25/05/2017	4.27E+03	0.00E+00	100.00
30/05/2017	6.36E+02	0.00E+00	100.00
01/06/2017	2.92E+05	0.00E+00	100.00
06/06/2017	4.55E+01	0.00E+00	100.00
08/06/2017	1.05E+03	0.00E+00	100.00
13/06/2017	3.64E-01	9.50E-03	97.39
15/06/2017	9.09E-03	0.00E+00	100.00
20/06/2017	5.91E-02	0.00E+00	100.00
27/06/2017	4.29E-02	0.00E+00	100.00
29/06/2017	4.55E-03	0.00E+00	100.00

La tabla 13 demuestra que la planta piloto MPBR presenta unos valores de eliminación más elevados que la planta piloto AnMBR ya sea por causas de parámetros operaciones, por el funcionamiento de la propia planta o por el buen mantenimiento del sistema de filtración.

También cabe destacar que, aunque el agua de salida de AnMBR y agua de entrada del MPBR son la misma, en algunos casos, ésta presentaba diferencias a nivel de patógenos siendo más elevado en la entrada de MPBR (Figura 22). Este hecho puede ser debido a la mayor demanda de agua a causa de la disminución del TRH que sí afectó al resto de colonias coliformes (y en menor medida a *E. coli*). El aumento podría ser consecuencia de la disminución del tiempo de residencia en el DI y su consecuente menor aireación ya que, como se ha mencionado en la introducción, la aireación con O_2 puede ser un factor influyente en las bacterias anaerobias facultativas. Asimismo, el mantenimiento de la limpieza de conducciones y del propio depósito, también podría afectar al aumento de colonias. De todos modos, es de esperar que, en condiciones industriales, los elevados caudales de tratamiento, minimizarían estos aspectos.

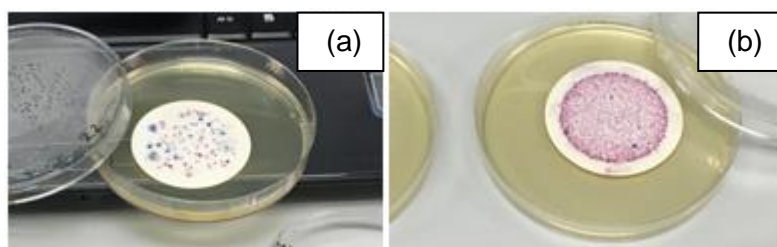


FIGURA 22 MUESTRA DE COLIFORMES (COLONIAS ROJAS) Y *E. COLI* (COLONIAS AZULES) EN EL EFLUENTE DEL ANMBR (A) Y MUESTRA DE COLIFORMES (COLONIAS ROJAS) Y *E. COLI* (COLONIAS AZULES) INFLUENTE DEL MPBR (B)

Del mismo modo que se realizó con la planta AnMBR y, aunque la membrana deba eliminar todos los patógeno, para comprobar si había algún tipo de fallo en la planta piloto, se relacionó la eliminación del patógeno *E. coli* y los parámetros operacionales. Primeramente, se intentó comprobar su posible relación con TRH y TRC. Dicha relación se muestra en la Figura 23:

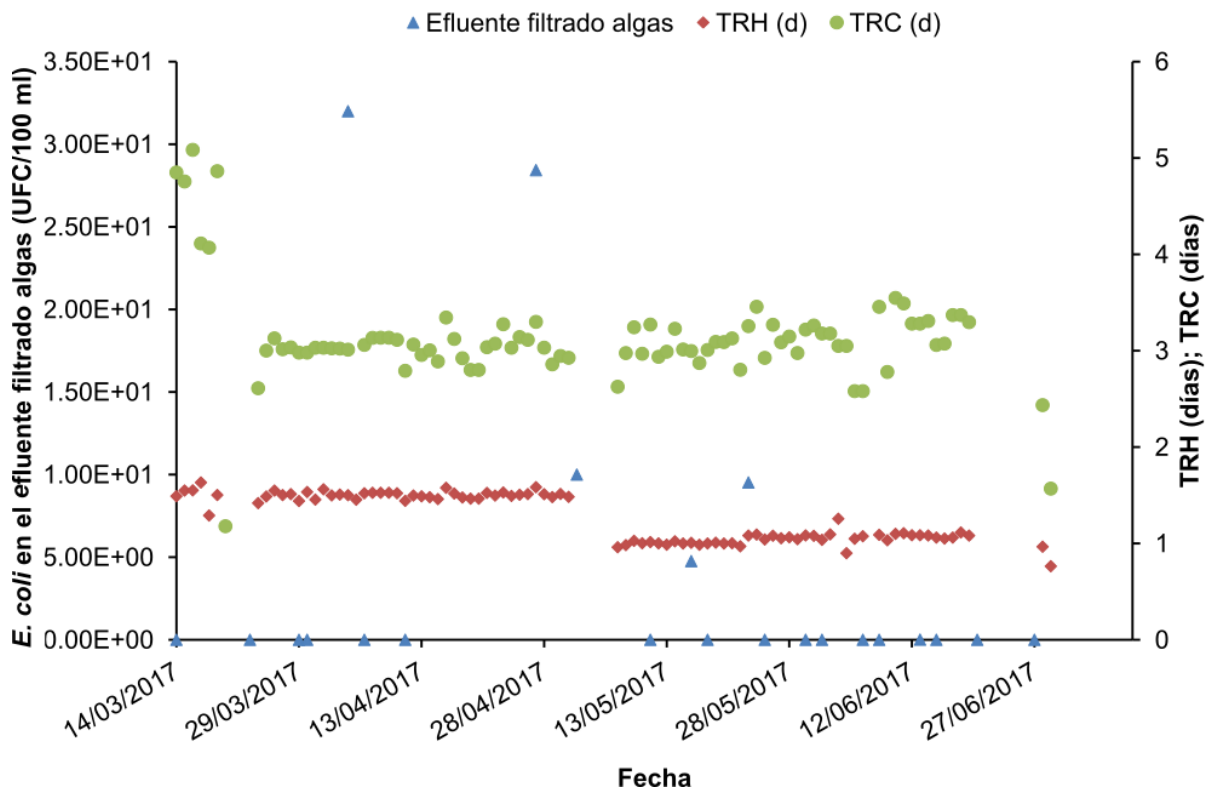


FIGURA 23 EVOLUCIÓN DE EL TRH Y TRC CON *E. COLI* DEL EFLUENTE FILTRADO DEL MPBR.

Aunque, como muestra la figura 23 se cambió el TRH del reactor, éste no generó ningún tipo de repercusión en cuanto a la bacteria *E. coli*. Asimismo, el TRC tampoco parece suponer un parámetro que influya en el crecimiento o eliminación del patógeno. No obstante, como de comentó anteriormente, sí que se detectó que en el caso de la variable TRH un efecto en la detección de patógenos en la entrada de la planta piloto.

Además de los parámetros anteriores también se tuvieron en cuenta la temperatura, el oxígeno disuelto (OD) y el pH (Figura 24).

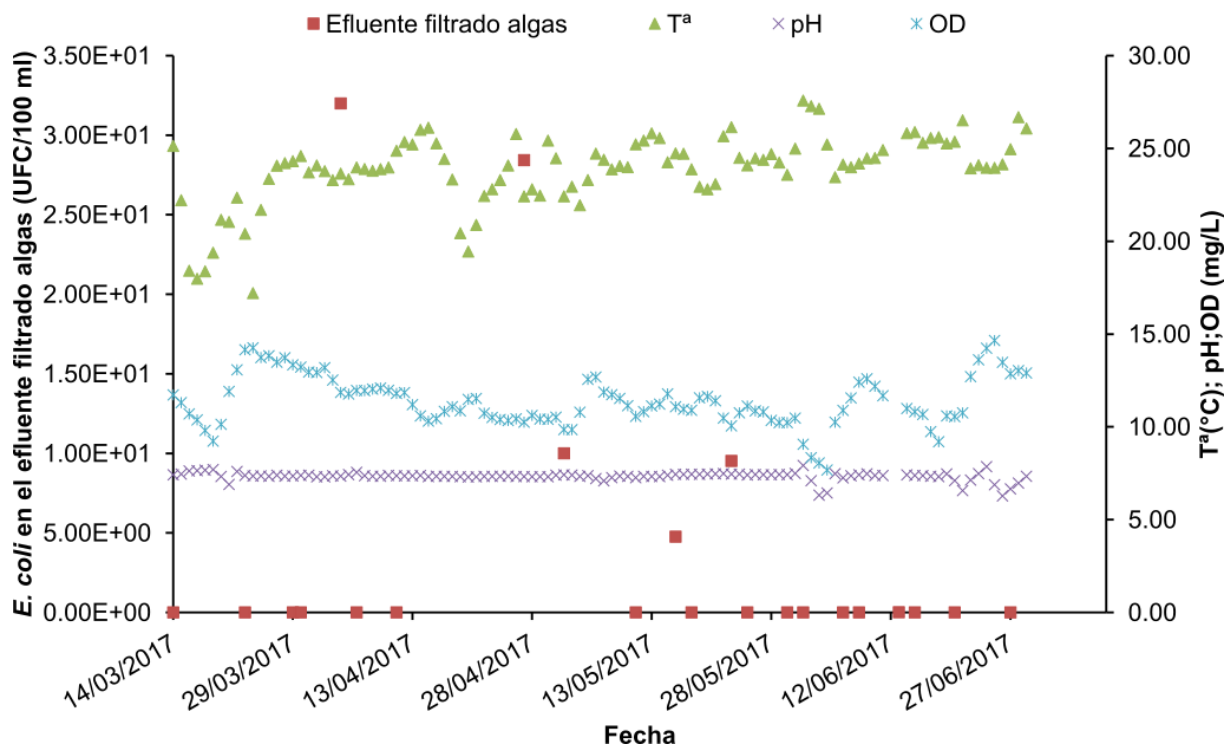


FIGURA 24 RELACIÓN LA TEMPERATURA (Tª), PH Y OXÍGENO DISUELTO (OD) CON *E. COLI* DEL EFLUENTE FILTRADO DE LA PLANTA PILOTO MPBR

Mediante la figura 24 anterior, a primera vista, no se demuestran correlaciones entre los parámetros operacionales y la bacteria *E. coli*. No obstante, aunque no se demuestran relaciones evidentes, los valores de *E. coli* en el efluente del MPBR suelen ser de 0 UFC/100ml sin superar $3,2 \cdot 10^1$ UFC/100ml. De este modo se podría afirmar que, el uso correcto del sistema de filtración, es el principal factor de eliminación de *E. coli*.

Finalmente, en lo que respecta a los distintos usos que podría tener el efluente de la planta piloto MPBR se representó la Figura 25. Del mismo modo que el apartado anterior, los números de la leyenda corresponden a los usos preferentes según el valor máximo admisible:

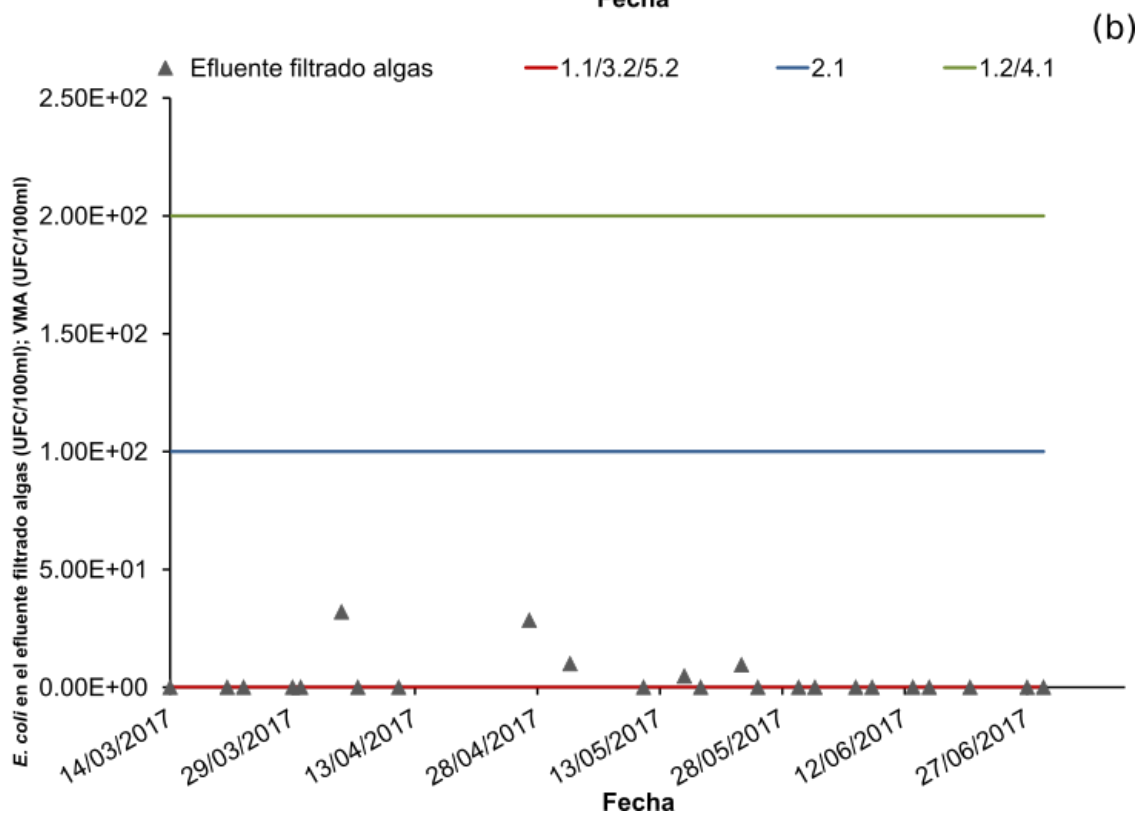
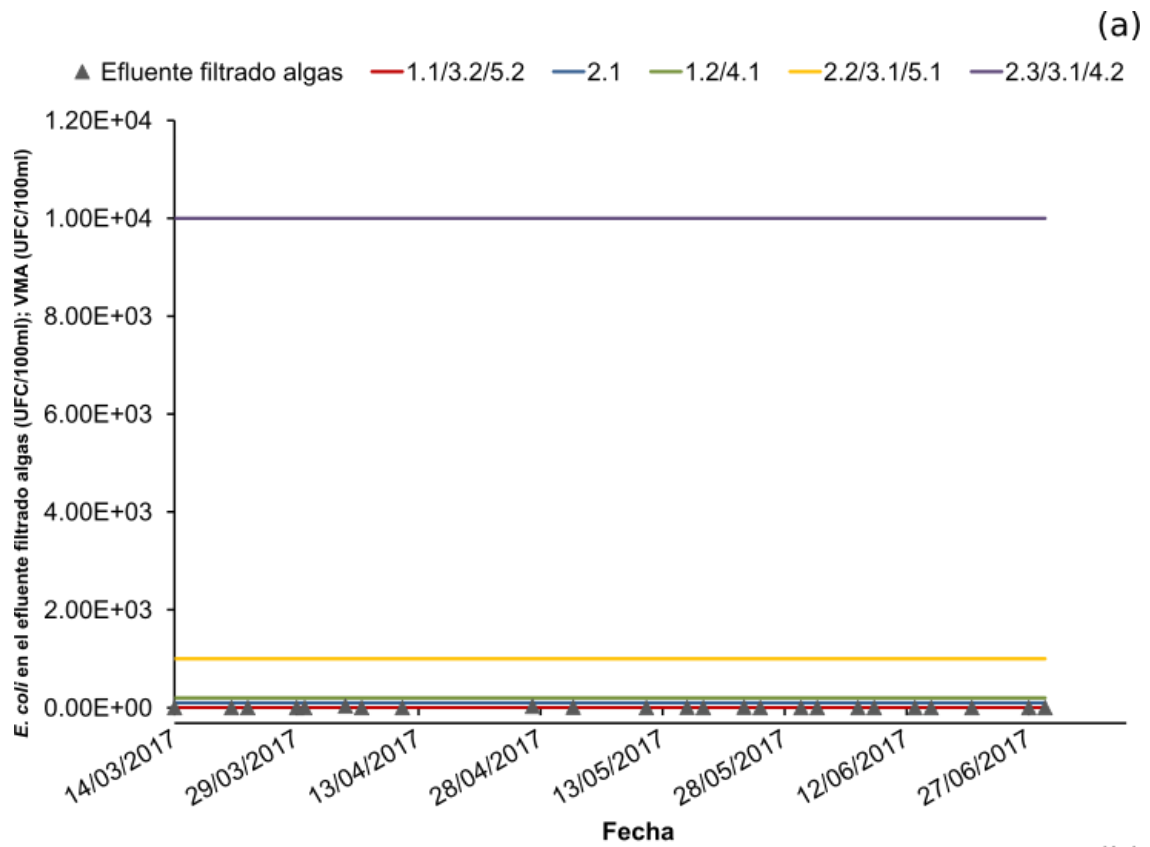


FIGURA 25 VALORES MÁXIMOS ADMISIBLES (VMA) DE *E. COLI* PARA LA REUTILIZACIÓN DE AGUA TRATADA MEDIANTE MPBR (A) Y AMPLIACIÓN DE LOS VMA DE 200 UFC/100 ML, 100 UFC/100 ML Y 0UFC/100 ML (B).

En la Figura 25a, se observa que todos los valores obtenidos en el transcurso del trabajo se encuentran en la franja inferior. No obstante, para aumentar la precisión, se graficó la Figura 25b en la cual sólo se representaron los tres valores máximos admisibles más restrictivos. En ésta se observa que los valores del efluente de MPBR se encuentran sobre 0UFC/100 ml y 100 UFC/100ml. Sólo son 5 las ocasiones en las cuales se supera el valor de 0UFC/100 ml. Este hecho indicaría que el agua, a nivel del patógeno *E. coli*, se podría reutilizar para todos los usos exceptuando los más restrictivos: el uso urbano para calidad residencial, el uso industrial en torres de refrigeración y condensadores evaporativos y en el uso ambiental en la recarga de acuíferos por inyección directa. No obstante, también se tiene que tener en cuenta que existe la posibilidad de contaminación de la propia muestra en dichos casos anómalos ya que, mayoritariamente el valor es 0 UFC/100 ml. Si considerásemos la posibilidad de contaminación, el agua podría utilizarse para los distintos usos tanto urbano, agrícola, industrial, como recreativo y ambiental. Además, dicha agua cumple tanto con los límites de materia orgánica, como con los valores de nutrientes.

Del mismo modo que se analizaron las muestras del efluente de MPBR, se realizó un muestreo del interior del reactor, dando como resultado 3,18 UFC de *E. coli* en 100 ml de muestra. De este modo se comprobó que aparentemente, las condiciones en las cuales se opera en el reactor de microalgas de luz, oxígeno,..., también afectan en la eliminación de *E. coli*. Y, por esta razón, sería interesante realizar futuros trabajos en los cuales se entrara en más detalle en la relación entre las condiciones de operación del reactor MPBR y la eliminación del patógeno.

4.2.3. BIONUTEN

Finalmente, también se cuantificaron, en la planta de BIONUTEN, las eficacias que presentaban tanto su efluente filtrado como la purga del propio reactor respecto a la mezcla de entrada. Los valores obtenidos se encuentran en la siguiente Tabla 14:

TABLA 14 VALORES DE ENTRADA, EFLUENTE Y PURGA Y EFICACIAS DE ELIMINACIÓN Y TANTO DEL EFLUENTE FILTRADO COMO DE LA PURGA DE BIONUTEN RESPECTO A LA MEZCLA DE ENTRADA

Fecha	Purga decantador 1 ^o + Purga AnMBR + purga algas (UFC/100 ml)	Efluente filtrado (UFC/100 ml)	Purga Bionuten (UFC/100 ml)	Eficacias de eliminación Efluente filtrado (%)	Eficacias de eliminación Purga (%)
14/03/2017	6.92E+06	0.00E+00	0.00E+00	100.00	100.00
21/03/2017	2.15E+06	0.00E+00	7.21E+03	100.00	99.90
23/03/2017	2.88E+07	0.00E+00	9.01E+03	100.00	99.87
29/03/2017	7.48E+06	-	-	-	-
30/03/2017	1.01E+07	0.00E+00	4.74E+03	100.00	99.93
04/04/2017	3.98E+06	0.00E+00	0.00E+00	100.00	100.00
06/04/2017	2.13E+06	-	4.74E+03	-	99.93
11/04/2017	1.67E+06	0.00E+00	0.00E+00	100.00	100.00
27/04/2017	2.04E+06	8.26E+00	4.74E+03	100.00	99.93
02/05/2017	1.95E+06	-	0.00E+00	-	100.00
11/05/2017	6.19E+05	-	0.00E+00	-	100.00
16/05/2017	1.45E+06	0.00E+00	0.00E+00	100.00	100.00
18/05/2017	1.41E+06	-	0.00E+00	-	100.00
23/05/2017	8.50E+05	-	0.00E+00	-	100.00
25/05/2017	9.41E+05	-	0.00E+00	-	100.00
30/05/2017	2.02E+06	0.00E+00	5.00E+03	100.00	99.93
01/06/2017	4.92E+06	-	4.86E+03	-	99.93
06/06/2017	5.55E+05	-	5.00E+03	-	99.93
08/06/2017	8.23E+05	-	4.55E+03	-	99.93
13/06/2017	2.29E+06	0.00E+00	0.00E+00	100.00	100.00
15/06/2017	3.56E+05	-	-	-	-
20/06/2017	8.22E+05	-	3.50E+01	-	100.00
27/06/2017	-	-	-	-	-
29/06/2017	-	-	-	-	-

En la tabla 14 se demuestra que los valores de eliminación de *E. coli* son muy elevados llegando a ser del 100% en la mayoría de los casos. No obstante, aunque no se espere relación alguna, para comprobar con más detalle si existía algún fallo operacional o en las

membranas, se analizaron los parámetros que podían influir en la destrucción del patógeno mediante gráficos de las variables del proceso frente a los valores del efluente filtrado y la purga de Bionuten. Sin embargo, en este caso, no se ha encontrado relación entre el contenido del influente y el contenido de DQO a causa de la variación, en porcentaje, de la mezcla de purgas y algas del influente dependiendo de la disponibilidad de cada uno de ellos.

Aunque se han realizado los gráficos pertinentes con los parámetros operacionales de temperatura, pH, AGV, DQO, ALK, cantidad de CH₄ generado, TRC y TRH respecto las muestras de efluente filtrado Bionuten y Purga Bionuten, como cabía esperar, no se han encontrado causas evidentes de relación.

No obstante, sí que se han representado los resultados del efluente y de purga en la Figura 26 siguiente:

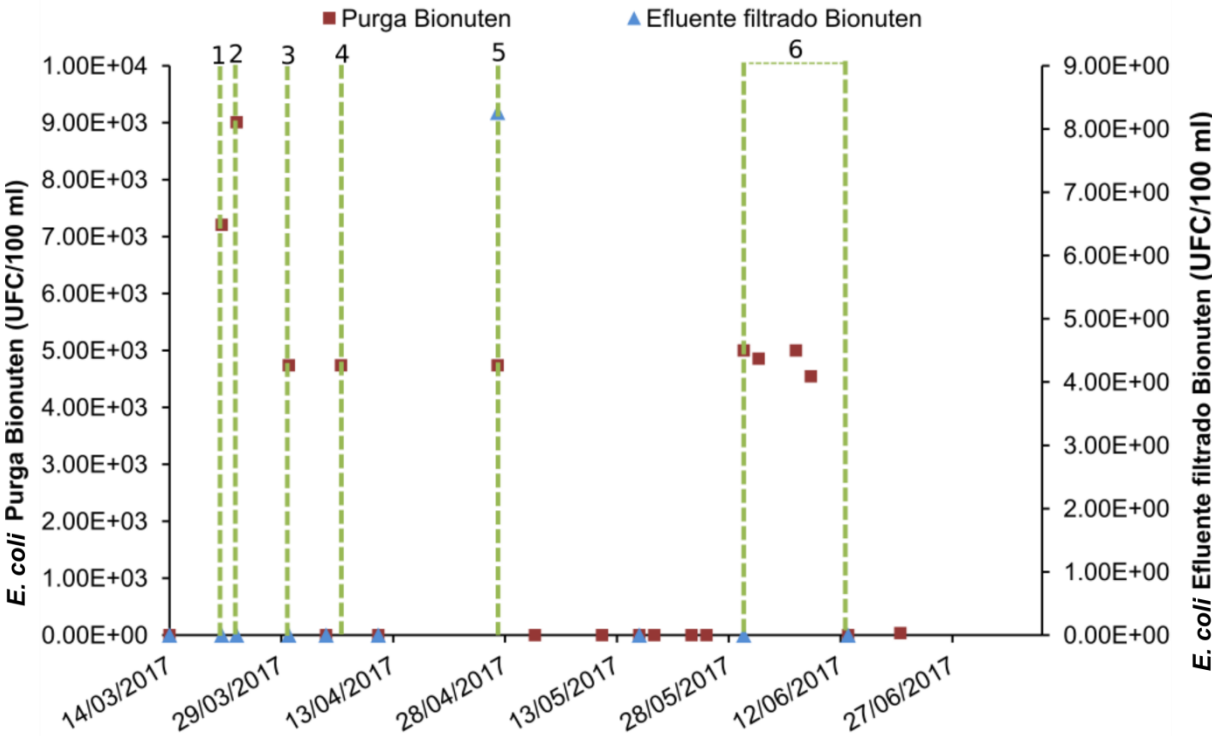


FIGURA 26 COLONIAS DE *E. COLI* EN 100 ML DE LA PURGA Y EL EFLUENTE DE BIONUTEN. LOS NÚMEROS CORRESPONDEN A LOS DÍAS EN LOS CUALES EL VALOR DE PURGA SUPERÓ LAS 4000 UFC DE *E. COLI*/100 ML.

Como se puede observar en la figura 26, existen 5 días (1-5) y un período (6) en los cuales los valores de *E. coli* en la purga se encuentran por encima de 4000 UFC/100 ml y, sólo en el punto 5, el efluente supera las 8 UFC/100 ml. Representados los días y, gracias a los datos ofrecidos por el grupo de investigación que explota Bionuten, se hallaron los días en

los cuales se encontraban picos de colonias coincidían con pruebas, cambios en la explotación o fallos operacionales. De este modo, sobretudo la purga, al no pasar por un sistema de filtración, se podría considerar lógica la variación de los niveles de colonias de *E. coli* debido a los fallos o cambios de operación de la planta.

Finalmente, se representaron los valores del efluente con los dos límites más restrictivos de VMA para conocer los distintos usos que podían tener éstos para su reutilización (Figura 27):

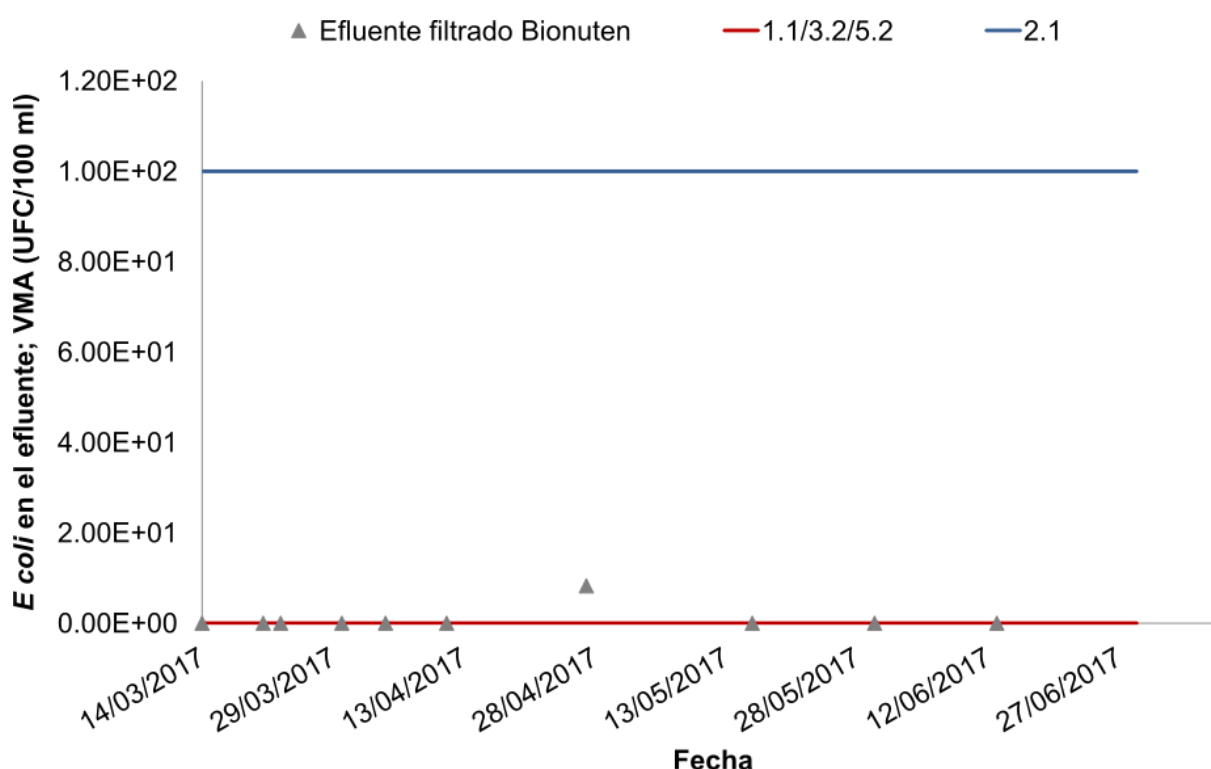


FIGURA 27 EFLUENTE FILTRADO BIONUTEN CON LOS DOS VMA MÁS RESTRICTIVOS.

Como se observa en la Figura 27 se observa, al detalle, el valor el cual supera las 0 UFC/100 ml.

A pesar de los buenos resultados obtenidos en el efluente por parte de la planta Bionuten, éste presenta unos valores elevados de nutrientes como N y P debido al alimento y los procesos de la propia digestión anaerobia. Por lo tanto, para su posible reutilización, se debería tratar antes de su vertido en el medio natural y así evitar posibles problemas de eutrofización en el agua o vinculados al exceso de nutrientes para el uso agrícola. Asimismo, en suelos con escasez de nutrientes, podría ser una buena alternativa para su uso en "fertilización" siempre que el resto de parámetros cumplan la normativa vigente. Y, del mismo modo, supondría un ahorro en cuanto a fertilizantes.

Por otra parte, como se ha mencionado en el apartado introductorio de legislación sobre fangos, éste presenta otro tipo de límites o valores máximos admisibles. En la Figura 28 se observan los resultados obtenidos en la purga y los límites europeos.

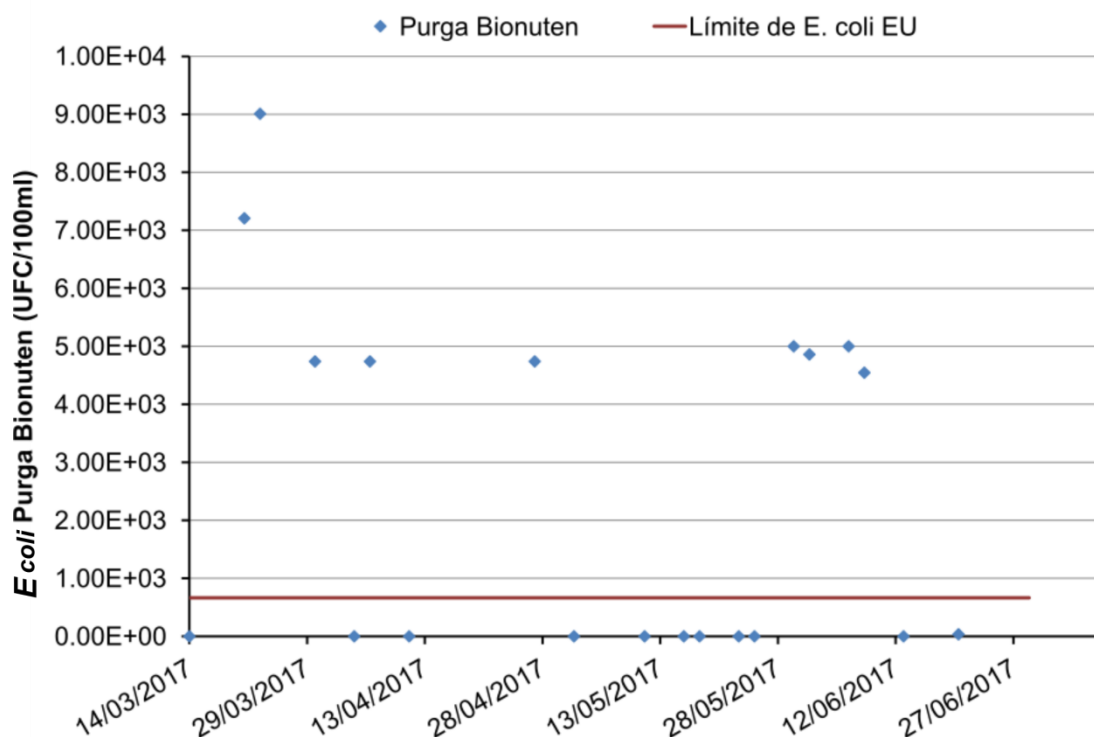


FIGURA 28 E. COLI EN LA PURGA DE BIONUTEN

Conociendo la cantidad media de sólidos de la purga del fango de 13000 mg/L, se calcularon los gramos que había en los 100 ml analizados siendo de 1,33 gramos. El límite europeo de *E. coli* es de hasta 500 UFC/g. No obstante, para poder representarlo en el mismo gráfico, se calculó la equivalencia que supondría el gramo de la legislación a los 1,33 gramos siendo de 665 UFC.

A pesar de utilizar un tratamiento avanzado y que, en muchos casos, se superen los valores límite de requerimientos de < 500 UFC/ g de *E. coli*, el fango siempre suele someterse a un segundo tratamiento de deshidratación. Este último tratamiento tiene el fin de desinfectar, ahorrar espacio y gastos en la gestión del fango.

4.3. RECUESTO E IDENTIFICACIÓN DE HELMINTOS

Para el análisis de helmintos en los distintos puntos del conjunto de plantas piloto se realizaron 9 ensayos en los cuales se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 15):

TABLA 15 RECUESTO E IDENTIFICACIÓN DE HUEVOS DE HELMINTO EN 50 ML DE MUESTRA

(huevos de helminto/50ml)

	1.Influyente AnMBR	2.Efluente filtrado AnMBR	3.Influyente algas (DI)	4.Efluente filtrado algas	5.Efluente filtrado BIONUTEN	6.Purga algas, Bionuten y decantador 1io	7.Purga Bionuten
23/03/2017	0	0	0	0	0	1	0
30/03/2017	0	0	0	0	0	0	0
04/04/2017	0	0	0	0	0	0	0
11/04/2017	0	0	0	0	0	0	0
27/04/2017	0	0	0	0	0	0	1
02/05/2017	0	0	0	0	0	1	0
16/05/2017	0	0	0	0	0	0	0
30/05/2017	0	0	0	0	0	0	0
13/06/2017	0	0	0	0	0	0	0

Tal y como se muestra en la tabla anterior, sólo en 3 ocasiones se ha detectado huevos de helminto y todas ellas en muestras de fango. Como cabía esperar, en las muestras de agua (1-5) no presentaron ningún indicio de presentar huevos de helminto. Este hecho puede ser debido a 2 causas: la separación física que supone la membrana al ser estos huevos de un tamaño entre 100 y 300 veces superior al poro de la membrana de 0,03 μm o la cantidad insuficiente de muestra. Sólo la muestra 1 (Influyente AnMBR) no ha pasado por un filtrado previo pero si por una decantación, presentando también valores bajos de sólidos.

En cuanto a las muestras de fango, se ha observado 3 huevos de helminto en 50 ml de muestra. Sin embargo, este es un hecho común debido a la naturaleza del propio fango y la gran resistencia que presentan dichos organismos. A pesar de ello, mediante distintos tratamientos posteriores como la deshidratación, se podría lograr una correcta desinfección del patógeno para su posible reutilización.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se ha llegado con la realización del presente trabajo son:

- Se ha observado la gran importancia de la toma de muestras, siendo uno de los aspectos más relevantes para la obtención de buenos resultados.
- Mediante el método de filtración se ha podido poner a punto el método para agua gracias a la reducida cantidad de sólidos presente en las muestras de agua del conjunto de plantas piloto del Carraixet. Asimismo, se han obtenido las diluciones pertinentes para la filtración del fango de purga de la planta piloto Bionuten.
- En cuanto a la puesta a punto de la metodología de detección y recuento de huevos de helmintos para muestras de agua y de fango del conjunto de plantas piloto del Carraixet, la pequeña cantidad de 50 ml de las muestras utilizadas respecto a los 10 L (para agua tratada) o 1 L (para aguas sin tratar) óptimos a utilizar según el método Bailenger modificado podría ser la causa de la ausencia de huevos de helmintos. A pesar de ello, al analizar las muestras, la ausencia de sólidos de las muestras de agua, también podría indicar que realmente las muestras no tienen huevos de helmintos.
- La aplicación de los distintos tratamientos ha demostrado tener una buena eficacia en cuanto a la eliminación tanto del patógeno *E. coli* como supuestamente de los huevos de helmintos. De este modo, el conjunto de plantas piloto del Carraixet, además de ser un tratamiento efectivo para los distintos contaminantes usuales de las AR como los nutrientes, materia orgánica..., también proporciona buenos resultados en la eliminación de *E. coli* y huevos de helminto cuando las plantas piloto presentan un correcto funcionamiento.
- Debido a la utilización de membranas, los rendimientos, en casi todos los casos, han llegado a ser del 100% haciendo viable la utilización de dichos tratamientos alternativos para la desinfección del patógeno *E. coli* y los huevos de helminto. De este modo, se podría afirmar que las membranas además de no estar rotas, evitan el paso de patógenos.
- No obstante, se han detectado problemas entre la salida del AnMBR y la entrada al MPBR. Este hecho puede ser debido a contaminación de las conducciones o del depósito intermedio entre las dos plantas. A pesar de ello, la utilización del conjunto de

plantas de manera industrial evitaría estos problemas a causa de las grandes caudales a depurar.

- Según la legislación vigente, respecto *E. coli*, se han obtenido distintas posibilidades de uso dependiendo de la planta piloto:
 - o En el caso de la planta piloto AnMBR se ha determinado que los usos posibles para la reutilización del efluente podrían ser:
 - Uso agrícola en **calidad 2.3** para riego localizado de cultivos leñosos sin contacto del agua regenerada con los frutos consumidos en la alimentación humana, para riego de cultivos de flores ornamentales, viveros, invernaderos sin contacto directo del agua regenerada con las producciones y para riego de cultivos industriales no alimentarios, viveros, forrajes aislados, cereales y semillas oleaginosas.
 - Uso industrial en **calidad 3.1** para aguas de proceso y limpieza excepto en la industria alimentaria y otros usos industriales.
 - Uso recreativo en **calidad 4.2** para estanques, masas de agua y caudales circulantes ornamentales en los que está impedido el acceso del público al agua.
 - o En relación a los posibles usos del efluente de la planta piloto MPBR se han obtenido los siguientes resultados:
 - Uso agrícola en **calidad 2.1** para riego de cultivos con aplicación del agua regenerada con la parte comestible para la alimentación humana en fresco.

No obstante, en este caso, han sido pocos los resultados que han superado 0UFC/100 ml. Por esta razón, se debe considerar hacer más análisis intentando evitar la contaminación y con el correcto funcionamiento de la planta, para poder utilizar el agua regenerada en todos los casos posibles presentes en la legislación.

- o Por lo que se refiere a la planta piloto Bionuten, el efluente filtrado podría utilizarse en todos los usos posibles: uso urbano, uso agrícola, uso industrial, uso recreativo y uso ambiental. Sólo en uno de los casos, el valor del efluente supera las 0 UFC/100 ml. No obstante, el rebasamiento del límite ocasional, supondría el

aumento de la frecuencia de análisis de dicho efluente para seguir utilizándolo en todos los usos posibles según la legislación vigente RD 1620/2007.

- Respecto a la revisión de la legislación aplicada a la reutilización de lodos y su carga patogénica admisible, se ha comprobado que hay carencias legislativas tanto a nivel español como europeo. A pesar de ello, el tercer borrador (*Working document on sludge*) promete ser una herramienta efectiva para sentar las bases de una nueva directiva europea sobre la aplicación de lodos de depuradoras al suelo. No obstante, sería conveniente crear una legislación nacional acorde con las propuestas del borrador europeo así como de técnicas de gestión del residuo.
- Finalmente, a pesar de los buenos resultados de eliminación, tanto de *E. coli* como de huevos de helmintos, cada uso del agua reutilizada previsto en la normativa, conlleva la medida de otros patógenos como *Legionella spp.* o *Salmonella spp.* En consecuencia, sería conveniente realizar futuros proyectos para el control de los patógenos anteriores y, de este modo, garantizar la correcta reutilización de los efluentes del conjunto de plantas del Carraixet.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257-275. <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Abeliovich, A. (2004). Mass Production of Microalgae : Photobioreactors. En A. Richmond (Ed.), *Handbook of Mass Production of Microalgae : Photobioreactors* (Blackwell, pp. 430-438). FL. <http://doi.org/10.1002/9780470995280.ch9>
- Alianza por el Agua. (2008). Manual de depuración de aguas residuales urbanas. *Centa, Secretariado de Alianza por el agua, Ecología y Desarrollo.*, 264. <http://doi.org/Z-2802/08>
- Amoah, I. D., Singh, G., Stenström, T. A., & Reddy, P. (2017). Detection and quantification of soil-transmitted helminths in environmental samples : A review of current state-of-the-art and future perspectives. *Acta Tropica*, 169, 187-201. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.014>
- Angelakis, A. N., Bontoux, L., & Lazarova, V. (2000). Challenges and perspectives for water recycling and reuse in EU countries. *Water Science and Technology: Water Supply*, 3, 59-68.
- Ansa, E. D. ., Andoh, A. H., Nienu, P., Banu, R., Akrong, M., Acheampong, M. A., & Adiyiah, J. (2015). Sunlight inactivation of faecal coliforms in domestic wastewater wastewater. *Desalination and Water Treatment*, (September). <http://doi.org/10.1080/19443994.2015.1063010>
- Ashbolt, N., Grabow, W., & Snozzi, M. (2001). Indicators of microbial water quality. En *Water Quality: Guidelines, Standards and Health* (pp. 289-316). <http://doi.org/10.4324/9781315693606>
- Aslan, S., & Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28(1), 64-70. <http://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.04.003>
- Aurazo de Zumaeta, M. (2004). 2. Aspectos Biológicos De La Calidad Del Agua. *Tratamiento de agua para consumo humano: Plantas de filtración rápida. . Manual I: Teoría tomo 1.* Recuperado a partir de

<http://www.bvsde.paho.org/bvsatr/fulltext/tratamiento/manuall/tomol/dos.pdf>

- Ayres, R. M., & Duncan Mara, D. (1997). *Análisis de aguas residuales para su uso en agricultura: Manual de técnicas parasitológicas y bacteriológicas de laboratorio*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Badgley, B. D., Thomas, F. I. M., & Harwood, V. J. (2011). Quantifying environmental reservoirs of fecal indicator bacteria associated with sediment and submerged aquatic vegetation. *Environmental Microbiology*, 13(4), 932-942. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02397.x>
- Beaubien, A., Bâty, M., Jeannot, F., Francoeur, E., & Manem, J. (1996). Design and operation of anaerobic membrane bioreactors: Development of a filtration testing strategy. *Journal of Membrane Science*, 109(2), 173-184. [http://doi.org/10.1016/0376-7388\(95\)00199-9](http://doi.org/10.1016/0376-7388(95)00199-9)
- Brownell, S. A., & Nelson, K. L. (2006). Inactivation of Single-Celled *Ascaris suum* Eggs by Low-Pressure UV Radiation. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 2178-2184. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2178>
- Camacho García, A., Abellán Gómez, J., Palacios López, J. C., López Hernández, M. D., & Puig Infante, A. (2003). *Guía para la aplicación del R.D. 1620/2007 por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas*. Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino (Vol. 1). Recuperado a partir de http://www.magrama.gob.es/es/agua/temas/concesiones-y-autorizaciones/guia_rd_1620_2007__tcm7-178027.pdf http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/srwe2full.pdf
- Caporgno, M. P., Taleb, A., Olkiewicz, M., Font, J., Pruvost, J., Legrand, J., & Bengoa, C. (2015). Microalgae cultivation in urban wastewater: Nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane. *ALGAL*, 10, 232-239. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.011>
- Carrillo, E., & Lozano, A. (2008). Validación del metodo de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar chromocult. *Pontificia Universidad Javeriana*, 1-82. Recuperado a partir de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis203.pdf>

- Castro, G. A. (1996). Helminths: Structure, Classification, Growth and Development. En Baron S (Ed.), *Medical Microbiology* (4th ed.). Galveston, Texas.
- Chavez, A., Jiménez, R., & Maya, C. (2004). Particle size distribution as a useful tool for microbial detection. *Water Science and Technology*, 50(2), 179-186.
- Comisión Europea. (2010). *Escasez de agua y sequía en la Unión Europea*. < <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=LEGISSUM:I28196>> [Consulta: 15 marzo 2017].
- Craggs, R. J., Adey, W. H., Jenson, K. R., St. John, M. S., Green, F. B., & Oswald, W. J. (1996). Phosphorus removal from wastewater using an algal turf scrubber. *Water Science and Technology*, 33, 191-198.
- Curtis, T. P., Duncan Mara, D., & Silva, S. A. (1992). Influence of pH , Oxygen , and Humic Substances on Ability of Sunlight To Damage Fecal Coliforms in Waste Stabilization Pond Water, 58(4), 1335-1343.
- de Lemos Chernicharo, C. A. (2007). *Biological Wastewater Treatment Vol.4: Anaerobic Reactors. Biological wastewater treatment in warm climate regions* (Vol. 4).
- De León, C., & Jenkins, D. (2002). Removal of fecal coliforms by thermophilic anaerobic digestion processes. *Water Science and Technology*, 46(10), 147-152.
- Dereli, R. K., Ersahin, M. E., Ozgun, H., Ozturk, I., Jeison, D., van der Zee, F., & van Lier, J. B. (2012). Potentials of anaerobic membrane bioreactors to overcome treatment limitations induced by industrial wastewaters. *Bioresource Technology*, 122, 160-170. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.139>
- Díaz-Delgado, C., Fall, C., Quentin, E., Jiménez-Moleón, M. D. C., Esteller-Alberich, M. V., Garrido-Hoyos, S. E., ... García-Pulido, D. (2003). Capítulo 20 INDICADORES DE CONTAMINACION FECAL EN AGUAS. En *Agua potable para comunidades rurales reuso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas* (pp. 224-229). Recuperado a partir de <http://www.revistavirtualpro.com/revista/index.php?ed=2007-01-01&pag=30>
- España. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. *Boletín oficial del Estado*, 29 de julio de 2011, núm. 181, pp. 85650-85703.
- España. Orden SCO/778/2009, de 17 de marzo, sobre métodos alternativos para el análisis

- microbiológico del agua de consumo humano. *Boletín oficial del Estado*, 31 de marzo de 2009, núm. 78, pp. 30417-30420.
- España. Orden AAA/1072/2013, de 7 de junio, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario. *Boletín oficial del Estado*, 14 de junio de 2013, núm. 142, pp. 44966-44973.
- España. Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. *Boletín oficial del Estado*, 8 de diciembre de 2007, núm. 294, pp. 50639-50661.
- España. Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas. *Boletín oficial del Estado*, 24 de julio de 2001, núm. 174, pp. 1-62.
- España. Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. *Boletín oficial del Estado*, 1 de noviembre de 1990, núm. 262, pp. 1-5.
- España. Resolución de 20 de enero de 2009, de la Secretaría de Estado de Cambio Climático, por la que se publica el Acuerdo del Consejo de Ministros por el que se aprueba el Plan Nacional Integrado de Residuos para el período 2008-2015. *Boletín oficial del Estado*, 26 de febrero de 2009, núm. 49, pp. 19893-20016.
- Farbiarz Mas, A. (2016). Europa estudia una nueva legislación sobre reutilización de agua para riego y recarga de acuíferos.
- Feachem, R. G., Bradley, D. J., Garelick, H., & Duncan Mara, D. (1983). *Sanitation and Disease: Health Aspects of Excreta and Wastewater Management*. The World Bank. Washington D.C.: The Pitman Press. <http://doi.org/10.1111/j.1752-1688.1984.tb04765.x>
- Ferrer Polo, J., & Seco Torrecillas, A. (2012). *Tratamientos biológicos de aguas residuales*. (Universitat Politècnica de València, Ed.) (2ª Ed.).
- Foster, J. W. (2004). ESCHERICHIA COLI ACID RESISTANCE : TALES OF AN AMATEUR ACIDOPHILE, 2(November), 898-907. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1021>
- Fytili, D., & Zabaniotou, A. (2008). Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods-A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12(1), 116-140. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2006.05.014>

- García, J., Mujeriego, R., & Hernández-Mariné, M. (2000). High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal. *Applied Phycology*, 12, 331-339.
- Gerba, C. P., & McLeod, J. S. (1976). Effect of Sediments on the Survival of *E. coli* in Marine Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(1), 114-120.
- Gil Morales, A. (1999). Instituto universitario de geografía universidad de alicante. *Instituto de geografía de la universidad de alicante*.
- Gobierno de España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. (2009). *Caracterización de los lodos de depuradoras generados en España*. pp.1-140
- Gómez, Y. D., Elena, M., & Regalado, M. (2008). Indicadores microbiológicos de calidad del agua en la costa oeste de Ciudad de la Habana, 391, 387-391.
- Gong, Q., Feng, Y., Kang, L., Luo, M., & Yang, J. (2014). Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*. *Energy Procedia*, 61, 2012-2015. <http://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.12.064>
- Groisman, E. A., & Winfiel, M. D. (2003). Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *E. coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3687–3694. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3687>
- Hoffmann, J. P. (1998). Minireview Wastewater Treatment With Suspended and Nonsuspended Algae 1. *Journal of Phycology*, 34, 757-763. <http://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340757.x>
- Hu, A. Y., & Stuckey, D. C. (2006). Treatment of Dilute Wastewaters Using a Novel Submerged Anaerobic Membrane Bioreactor. *Journal of Environmental Engineering*, 132(2), 190-198. [http://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2006\)132:2\(190\)](http://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2006)132:2(190))
- Jefatura del estado. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados (2011).
- Jimenez- Cisneros, B. . (2006). Helminth ova control in wastewater and sludge for agriculture reuse. En *Water and health* (Vol. II).
- Jimenez-Cisneros, B. E. (2008). Helminth Ova Control in Wastewater and Sludge for Agricultural Reuse. *Water and Health [Ed.w.o.k.Grabow], Encyclopedia of Life support systems*, 1(9), 5-13. Recuperado a partir de <http://www.eolss.net>
- Jimenez, B. (2007). Helminth ova removal from wastewater for agriculture and aquaculture

- reuse. *Water Science and Technology*, 55(1-2), 485-493.
<http://doi.org/10.2166/wst.2007.046>
- Jimenez, L., Muñiz, I., Toranzos, G. A., & Hanzen, T. . (1989). Survival and activity of Salmonella typhimurium and Escherichia coli in tropical freshwater. *Applied Bacteriology*, 67, 61-69.
- Kelessidisa, A., & Stasinakis, A. S. (2012). Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Management*, 36, 1186-1195. Recuperado a partir de linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956053X12000268
- Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. C. (2007). Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 207-212.
<http://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.05.001>
- Köster, W., Egli, T., Botzenhart, K., Burlion, N., Endo, T., Grimont, P., ... Rust, A. (2003). Analytical methods for microbiological water quality testing. En *Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving approaches and methods*. (pp. 237-292).
[http://doi.org/10.1016/S0048-9697\(04\)00275-X](http://doi.org/10.1016/S0048-9697(04)00275-X)
- Larrea-murrell, J. A., Rojas-badía, M. M., Romeu-álvarez, B., & Heydrich-pérez, M. R. M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas : revisión de la literatura, 44(3), 24-34.
- Larrea, J., Rojas, M., Heydrich, M., Romeu, B., & Lugo, N. R. D. (2009). Evaluación de la calidad microbiológica de las aguas del Complejo Turístico « Las Terrazas », Pinar del Río (Cuba). *Higiene y Sanidad Ambiental*, 504(9), 492-504.
- Liao, B. Q., Xie, K., Lin, H. J., & Bertoldo, D. (2010). Treatment of kraft evaporator condensate using a thermophilic submerged anaerobic membrane bioreactor. *Water Science and Technology*, 61(9), 2177-2183. <http://doi.org/10.2166/wst.2010.123>
- Lin, H., Peng, W., Zhang, M., Chen, J., Hong, H., & Zhang, Y. (2013). A review on anaerobic membrane bioreactors: Applications, membrane fouling and future perspectives. *Desalination*, 314(March 2014), 169-188. <http://doi.org/10.1016/j.desal.2013.01.019>
- Magidan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Brock Biología de los microorganismos*. (PEARSON EDUCATION, Ed.) (10ª Ed.).

- Mahmoud, N. (2008). High strength sewage treatment in a UASB reactor and an integrated UASB-digester system. *Bioresource Technology*, 99(16), 7531-7538. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.021>
- Malik, N. (2002). Biotechnological potential of immobilised algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *BioMetals*, 15, 377-390.
- McCarty, P. L., Bae, J., & Kim, J. (2011). Domestic wastewater treatment as a net energy producer - can this be achieved? *Environmental science & technology*, 45(17), 7100-6. <http://doi.org/10.1021/es2014264>
- Metcalf and Eddy. (2014). *Wastewater engineering . Tratament and Resources Recovery*. (McGraw-Hill Education, Ed.) (5th editio).
- Mezrioui, N., Oudra, B., Oufdou, K., Hassani, L., Loudiki, M., & Darley, J. (1994). Effect of microalgae growing on wastewater batch culture on *Escherichia coli* and *Vibrio Cholerae* survival. *Water Science and Technology*, 30, 295-302.
- Muñoz, R., & Guieysse, B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*, 40(15), 2799-2815. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.011>
- Navarro-garcía, F. (2016). Uso de lodos de depuradora en agricultura: patógenos y resistencias a antibióticos ., 15(April), 113-120.
- Neftalí Rojas-Valencia, M., & Orta de Velásquez, T. (2010). *EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL OZONO Y DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE LA ESTRUCTURA Y VIABILIDAD DE HUEVOS DE HELMINTOS*.
- Nurdogan, Y., & Oswald, W. J. (1995). Enhanced nutrient removal in high-rate ponds. *Water Science and Technology*, 31(12), 33-43. [http://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00490-E](http://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00490-E)
- Ozgun, H., Kaan, R., Evren, M., Kinaci, C., Spanjers, H., & Lier, J. B. Van. (2013). A review of anaerobic membrane bioreactors for municipal wastewater treatment: Integration options , limitations and expectations. *Separation and Purification Technology*, 118, 89-104. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.06.036>
- Pandey, P. K., & Soupir, M. L. (2011). *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. *AMB Express*, 1(1), 18. <http://doi.org/10.1186/2191-0855-1-18>

- Pen, M., Perales-vela, H. V., & Can, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae, *64*, 1-10. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.024>
- Pescod, M. . (1992). *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS*. Rome: Tyne and Wear Professor of Environmental Control Engineering and Head, Department of Civil Engineering University of Newcastle-upon-Tyne Newcastle-upon-Tyne, UK.
- Reinoso Tapia, R. (2008). *MECANISMOS DE ELIMINACIÓN DE PATÓGENOS EN SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES*.
- Reshes, G., Vanounou, S., Fishov, I., & Feingold, M. (2008). Cell Shape Dynamics in *Escherichia coli*, *94*(January). <http://doi.org/10.1529/biophysj.107.104398>
- Rodriguez Fernández-Alba, A., Letón García, P., Rosal García, R., Dorado Valiño, M., Villar Fernández, S., & Sanz García, J. M. (2006). Tratamientos Avanzados De Aguas Residuales Industriales. *Cítme*, 6,8. 13, 30, 34. <http://doi.org/M-30985-2006>
- Ruiz-marin, A., Mendoza-espinosa, L. G., & Stephenson, T. (2010). Bioresource Technology Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, *101*(1), 58-64. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.076>
- Saddoud, A., Hassaïri, I., & Sayadi, S. (2007). Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresource Technology*, *98*(11), 2102-2108. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.013>
- Sahlström, L. (2003). A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource Technology*, *87*(2), 161-166. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00168-2](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00168-2)
- Santiago-Rodriguez, T. M., Tremblay, R. L., Toledo-Hernandez, C., Gonzalez-Nieves, J. E., Ryu, H., Santo Domingo, J. W., & Toranzosa, G. A. (2012). Microbial quality of tropical inland waters and effects of rainfall events. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(15), 5160-5169. <http://doi.org/10.1128/AEM.07773-11>
- Sichel, C., Tello, J., de Cara, M., & Fernández-Ibáñez, P. (2007). Effect of UV solar intensity and dose on the photocatalytic disinfection of bacteria and fungi. *Catalysis Today*, *129*(1-2 SPEC. ISS.), 152-160. <http://doi.org/10.1016/j.cattod.2007.06.061>

- Skouteris, G., Hermosilla, D., López, P., Negro, C., & Blanco, Á. (2012). Anaerobic membrane bioreactors for wastewater treatment: A review. *Chemical Engineering Journal*, 198-199, 138-148. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.070>
- Smith, S. R., Lang, N. L., Cheung, K. H. M., & Spanoudaki, K. (2005). Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. *Waste Management*, 25(4 SPEC. ISS.), 417-425. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.02.010>
- Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems, 100.
- Soliva, M., & Huerta, O. (2004). Compostaje de lodos resultantes de la depuración de aguas residuales urbanas. *Escola Superior de Agricultura de Barcelona*, 1-9.
- Stuckey, D. C. (2012). Recent developments in anaerobic membrane reactors. *Bioresource Technology*, 122, 137-148. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.138>
- Su, Y., Mennerich, A., & Urban, B. (2011). Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water Research*, 45(11), 3351-3358. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.046>
- Summerfelt, T. (2003). Ozonation and UV irradiation * an introduction and examples of current applications, 28, 21-36. [http://doi.org/10.1016/S0144-8609\(02\)00069-9](http://doi.org/10.1016/S0144-8609(02)00069-9)
- The World Health Organization. (2006). SAFE USE OF WASTEWATER, EXCRETA AND GREYWATER. WHO Press.
- Torres, P. (2012). Perspectivas del tratamiento anaerobio de aguas residuales domésticas en países en desarrollo. *Revista EIA*, 18, 115-129. <http://doi.org/10.1533/tepr>
- Toze, S. (2004). Reuse of effluent water – benefits and risks. *New directions for a diverse planet*, (5), 1-11.
- Unión Europea. Directiva 2000/60/CE del parlamento Europeo y del consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 22 de diciembre de 2000, L327/1- L327/73.
- Unión Europea. Working document on sludge. 3rd Draft. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 27 de abril de 2000, ENV.E.3/LM. pp.1-19, Bruselas.

- UNE-EN ISO 6687-1:2000. *Microbiología de los alimentos para el consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para el examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.* Comité Europeo para la Normalización, Bruselas.
- UNE-EN ISO 8199:2005. *Calidad del agua. Orientaciones generales para el recuento de microorganismos en cultivo.* Comité Europeo para la Normalización, Bruselas.
- UNE-EN ISO 19458:2006. *Calidad del agua. Muestreo para el análisis microbiológico.* Comité Europeo para la Normalización, Bruselas.
- UNE-EN ISO 7218:2007//Amd 1:2013. *Microbiología de los alimentos para el consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico. Modificación 1.* Comité Europeo para la Normalización, Bruselas.
- UNE-EN ISO 9308-1:2014. *Calidad del agua. Recuento de Echerichia coli y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido de microbiota.* Comité Europeo para la Normalización, Bruselas.
- Varnero Moreno, M. T. (2011). *Manual de biogás.* (FAO, Ed.). Santiago de Chile. <http://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>
- Walsh, C. L., Blenkinsop, S., Fowler, H. J., Burton, A., Dawson, R. J., Glenis, V., Kilsby, C. G. (2016). Adaptation of water resource systems to an uncertain future, 1869-1884. <http://doi.org/10.5194/hess-20-1869-2016>
- Willey, J. M. (2009). *Microbiología.* (McGraw Hill, Ed.) (7^a Ed.).
- Xie, K., Lin, H. J., Mahendran, B., Bagley, D. M., Leung, K. T., Liss, S. N., & Liao, B. Q. (2010). Performance and fouling characteristics of a submerged anaerobic membrane bioreactor for kraft evaporator condensate treatment. *Environmental Technology*, 31(5), 511-521. <http://doi.org/10.1080/09593330903527898>
- Yaniris, L., & Obaya, M. C. (2006). Anaerobic digestors and UASB reactors. *Icidca*, 1, 13-21. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223121549002.pdf>