



**ADAPTRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para  
a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



MAC 2014-2020  
Cooperação Territorial



Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

# ADAPTRES

Adaptação às mudanças climáticas na Macaronésia a través do uso  
eficiente da água e sua reutilização  
(MAC/3.5b/102)

Control de Calidad Sanitaria del Agua Regenerada en Cabo Verde  
Métodos analíticos

Dr. Néstor J. Abreu Acosta  
NERTALAB SLU



12 de novembro de 2020

# Recomendaciones para la distribución de agua regenerada en camiones cisterna

## • Calidad del agua regenerada

I Série — nº 24 «B.O.» da República de Cabo Verde — 2 de março de 2020 605

Quadro 3 – Parâmetros físico-químicos e VMR e VMA para controlo da qualidade das APR e ART destinadas a rega

	VMA		Frequência de amostragem
	Culturas de consumo em cru e para alimentação animal (1) (3)	Culturas ingeridas cozinhadas e para processamento industrial; espaços verdes, florestas e culturas ornamentais (3)	
Ovos de nematodos (2)	1 ovo/10 l	1 ovo/10 l	mensal
Escherichia coli	100 ufc/100 ml	10 000 ufc/100 ml	semanal
Legionella spp.	1 000 ufc/l (4)	100 ufc/l	mensal
Condutividade	3000 µS/cm	3000 µS/cm	semanal
Nitratos	30 mg N-NO <sub>3</sub> /l	30 mg N-NO <sub>3</sub> /l	semanal
SST	20 mg/l	35 mg/l	semanal
Turvação	10 UNT	Sem limite	semanal

(1) Irrigação localizada (nenhum contacto da ART com os frutos ou legumes), irrigação de culturas lenhosas, flores ornamentais, plantas de viveiro, estufas sem contacto direto da ART com culturas, irrigação de culturas industriais não-alimentares, pastagens, forrageiras e sementes de produtores de óleos.

(2) Têm que ser considerado, pelo menos, os géneros: *Ancylostoma*, *Trichuris* and *Ascaris*.

(3) No caso de risco de pulverização da água de rega, não pode ser detetado qualquer microrganismo patogénico.

5. A monitorização deve ser realizada à saída da estação de tratamento de águas residuais (ETAR) e em todos os pontos de entrega de águas residuais aos utilizadores. Sempre que o ponto de entrega e o local de reutilização de APR ou ART se distanciem menos de 1 km (um quilómetro), o controle será realizado à saída da estação de tratamento.

## Decreto Regulamentar nº 4/2020

de 2 de março

Considerando que a rega de culturas agrícolas, florestais, ornamentais, viveiros, relvados e outros espaços verdes, consome grandes quantidades de água, cuja qualidade deve ser monitorizada para salvaguarda da saúde pública e animal.

✓ Los conductores de los camiones cisternas deben conocer la clase de agua que transportan (usos permitidos)

✓ Los conductores deben informar a los receptores de la calidad del agua regenerada

## *Recomendaciones para la distribución de agua regenerada en camiones cisterna*

- **Requerimientos generales de los camiones y conductores**
  - ✓ Formación obligatoria (capacitación sobre el llenado y el uso seguro)
  - ✓ Documentación (verificación por parte de la autoridad competente)
- ✓ **Requerimientos para acceder a las EDARs para el llenado**
  - ✓ Camiones identificados “agua no potable” y “agua regenerada”
  - ✓ Permisos correspondientes
  - ✓ Apagar el motor durante el llenado
  - ✓ Durante el llenado comprobar que no existan fugas
  - ✓ No dejar basura o escombros
  - ✓ No bloquear la entrada y salida cuando se espere para llenar o en el llenado
- ✓ **Requisitos/precauciones de manejo y uso del agua regenerada**
  - ✓ No llenar demasiado las cisternas
  - ✓ No beber agua regenerada ni utilizarla para la preparación de alimentos
  - ✓ Los conductores y usuarios deben lavarse las manos con agua y jabón y aplicarse desinfectante después de contactar con el agua regenerada

## *Recomendaciones para la distribución de agua regenerada en camiones cisterna*

- ✓ **Requisitos/precauciones de manejo y uso del agua regenerada**
  - ✓ Utilización de guantes y gafas protectoras
  - ✓ Tomar precauciones para que los alimentos no entre en contacto con el agua
  - ✓ El camión debe estar equipado con botiquín de primeros auxilios
  - ✓ El camión debe llevar un libro de registro
    - ✓ Volumen de agua recogida
    - ✓ Fecha y EDAR de recogida
    - ✓ Fecha de entrega/uso
    - ✓ Volumen de agua suministrada/utilizada
    - ✓ Uso previsto del agua
    - ✓ Nombre y dirección del destinatario
  - ✓ No se permitirá que el agua se vierta en fuentes de agua potable
  - ✓ Aplicación de medidas para evitar la pulverización excesiva, encharcamiento
  - ✓ No regar o almacenar agua regenerada cerca de un pozo de agua potable (16 m)

## *Recomendaciones para la distribución de agua regenerada en camiones cisterna*

### ✓ **Requisitos/precauciones de manejo y uso del agua regenerada**

- ✓ Los vehículos para el transporte deben ser inspeccionados antes de cada uso
- ✓ Una cisterna que haya transportado material de un pozo séptico no puede transportar agua regenerada
- ✓ Los camiones que transporten agua regenerada nunca podrán transportar agua potable
- ✓ Las mangueras utilizadas para el llenado y vaciado del camión deben ser extraíbles y almacenarse desconectadas (inspección antes del uso)
- ✓ Etiquetar depósitos, grifos...en contacto con el agua regenerada
- ✓ Revisión periódica por parte de autoridad competente

### ✓ **Desinfección de las cisternas**

- ✓ Cuando se quiera transportar agua regenerada de mayor calidad que la anterior
- ✓ Cuando el camión cisterna desprenda malos olores

## *Recomendaciones para la distribución de agua regenerada en camiones cisterna*

### ✓ **Desinfección de las cisternas**

- ✓ Cuando se quiera transportar agua regenerada de mejor calidad que la anterior
- ✓ Cuando el camión cisterna desprenda malos olores
- ✓ Cuando exista recrecimiento de microorganismos o crecimiento excesivo de biopelícula
- ✓ Cuando exista evidencia de la acumulación de sólidos en el camión cisterna
- ✓ Cuando se realice una limpieza general

### ✓ Tener en cuenta:

- ✓ Utilizar un desinfectante adecuado
- ✓ Hipoclorito de sodio o de calcio
- ✓ Asegurarse que la mezcla desinfectante sea activa para inactivar/matar los patógenos
- ✓ Retirar los sólidos de la cisterna antes de desinfectarlo (eficacia adecuada)
- ✓ Eliminación del agua de lavado en lugares adecuados

## Recomendaciones para la distribución de agua regenerada en camiones cisterna

### ✓ Control microbiológico de camiones cisterna

- ✓ Pruebas mensuales de contaminación bacteriológica
- ✓ Varios días después de haber realizado la desinfección
- ✓ Repetir si la cisterna presenta todavía valores altos
- ✓ Parámetros a analizar:
  - ✓ Los recogidos en el Decreto Regulamenatar nº 4/2020
  - ✓ Recomendación: *Clostridium perfringens* (indicador de eficacia de la desinfección)

# Filtración por membrana

- ✓ Se hace pasar un volumen determinado de muestra/dilución a través de una membrana filtrante con un poro que retenga los microorganismos (0,22/0,45  $\mu\text{m}$ )
- ✓ La membrana se transfiere con una pinza sobre la superficie de un medio sólido, evitando la formación de burbujas
- ✓ Se requiere de un equipo de filtración y una bomba de vacío



# Filtración por membrana

- ✓ Técnica ampliamente reproducible, puede ser utilizada para un gran volumen de muestras
- ✓ Mayor volumen de muestra utilizado
- ✓ Produce resultados numéricos más rápido que el procedimiento de NMP
- ✓ Requiere poco espacio para muchas muestras
- ✓ No apta para aguas con alta turbidez (diluciones)
  
- ✓ Controles de calidad:
  - ✓ Sistema de filtración:
    - ✓ Filtrar 100 ml de solución salina estéril y sembrar en el medio a utilizar.
    - ✓ Frecuencia de los controles: el propio laboratorio
    - ✓ Se deben hacer en los análisis blancos del método para el control de esterilidad de las placas, medios de cultivo y membranas al mismo tiempo
  - ✓ Control ambiental:
    - ✓ Control de superficie de trabajo
    - ✓ Control del aire del ambiente de trabajo
    - ✓ Control de envases para la toma de muestras

# Aislamiento y recuento de *E. coli* (ISO 9308-1:2014)

## ETAPAS

- ✓ Preparación de la muestra
- ✓ Filtración
- ✓ Incubación
- ✓ Recuento
- ✓ Confirmación
  - ✓ Recuento de colonias sospechosas
  - ✓ Verificación por la prueba del indol

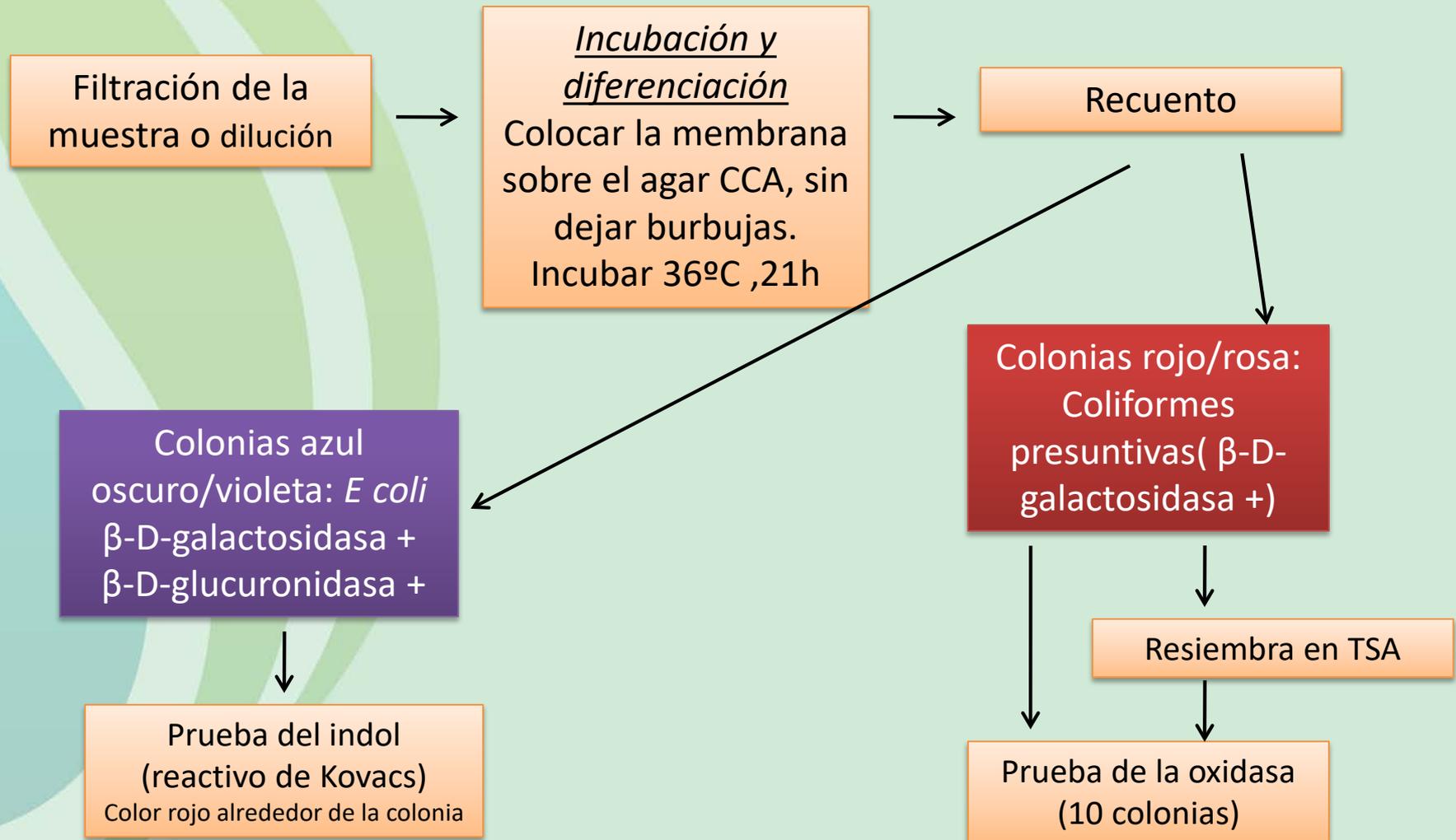
- ✓ Solución Salina de Page
- ✓ Agar Cromogénico Coliformes (CCA)
- ✓ Filtros de membrana
- ✓ Rampa de filtración
- ✓ Reactivo de Kovacs

- ✓ El medio contiene 2 sustancias cromogénicas:
  - ✓ 6-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosido (Salmon<sup>®</sup>-GAL)
  - ✓ 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-glucuronido (X-Glucoronido)

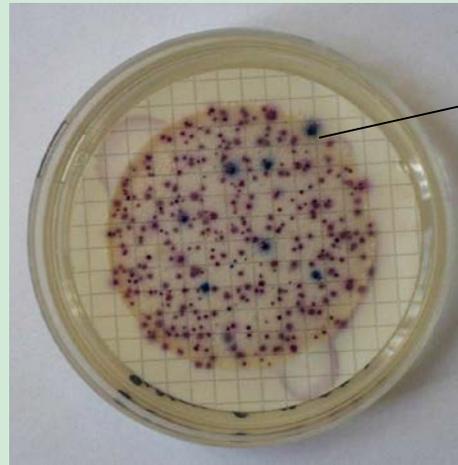
$\beta$ -D-galactosidasa

$\beta$ -D-glucoronidasa

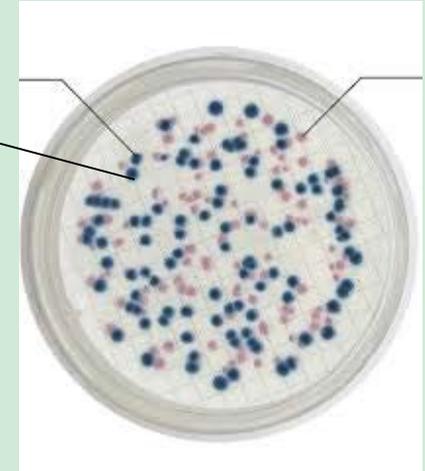
# Aislamiento y recuento de *E. coli* (ISO 9308-1:2014)



# Aislamiento y recuento de *E. coli* (ISO 9308-1:2014)



*E. coli*

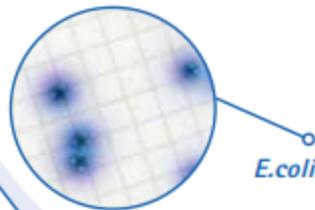


## Interpretación

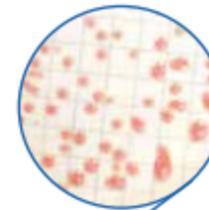
*E. coli* → Colonias de azul a violeta

Coliformes → Rosa salmón a rojo

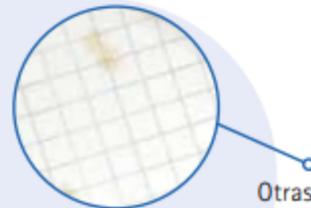
Otras bacterias (principalmente Gram-negativas) → Sin color (excepto aquellas que tengan una débil actividad glucuronidasa pero no galactosidasa que producen colonias azul claro o turquesa).



*E.coli*



Coliformes



Otras enterobacterias  
Salmonella

# Recuento de huevos de nematodos (Método de Bailinger modificado)

## ETAPAS

- ✓ Concentración
- ✓ Etapa de desorción
- ✓ Etapa de flotación
- ✓ Etapa de recuento
- ✓ Expresión de los resultados

- ✓ Solución de sulfato de zinc
- ✓ Buffer acetoácido
- ✓ Solución de Tween 80
- ✓ Centrífuga (1000 g)
- ✓ Microscopio óptico
- ✓ Cámara de McMaster

# Recuento de huevos de nematodos (Método de Bailinger modificado)



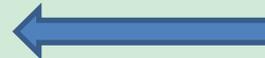
1. Etapa concentración



2. Etapa desorción

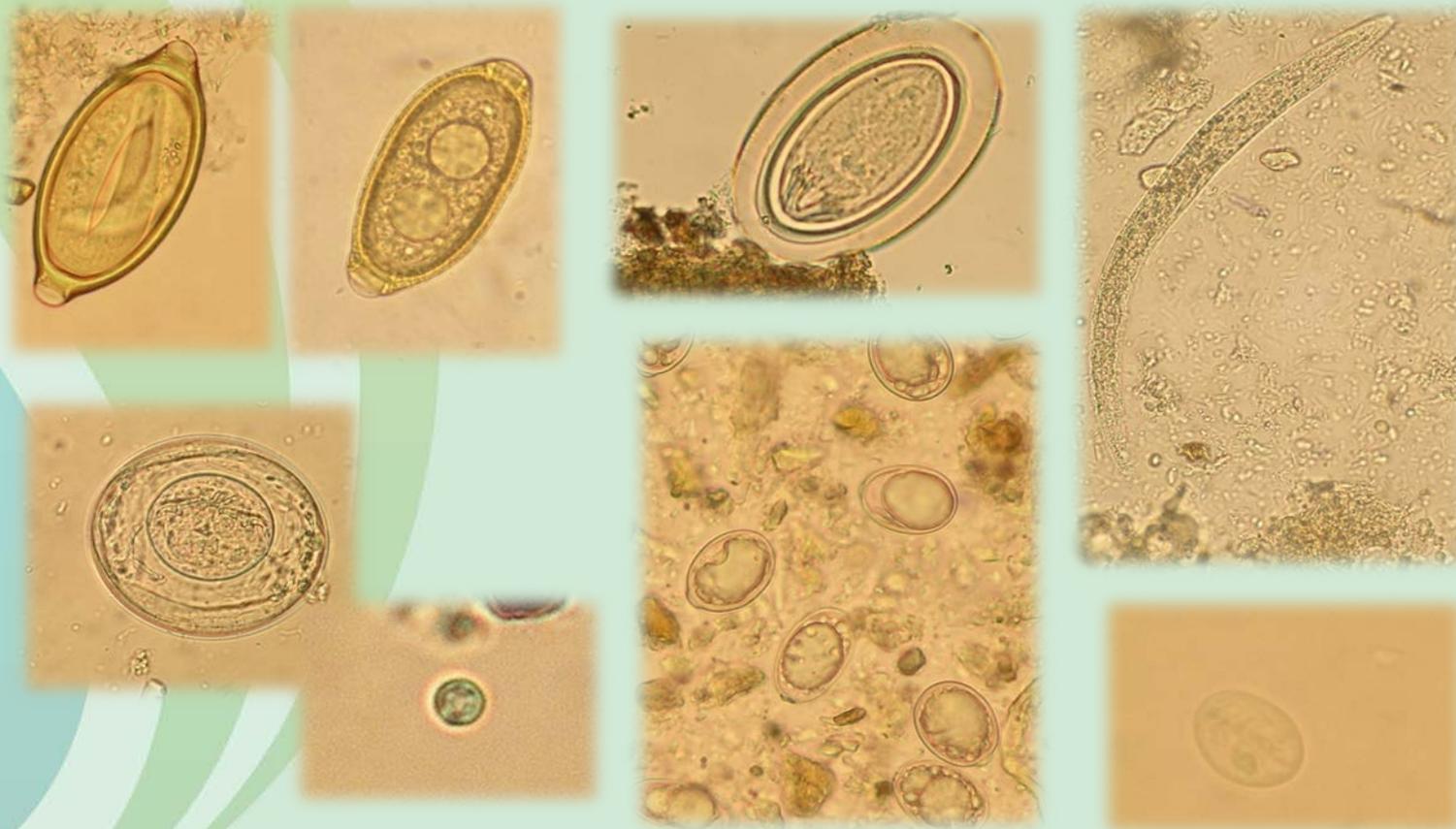


3. Etapa de flotación

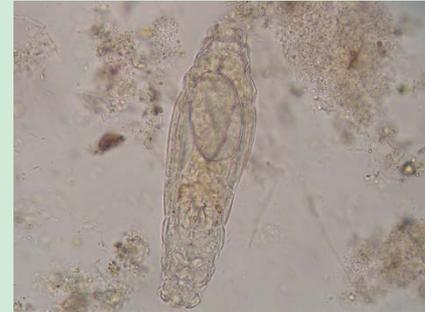
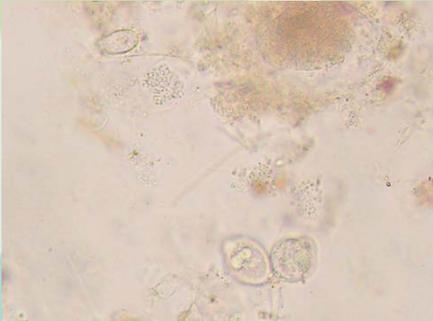


4. Etapa de recuento

# Recuento de huevos de nematodos (Método de Bailinger modificado)



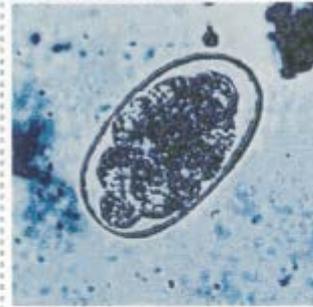
# Recuento de huevos de nematodos (Método de Bailinger modificado)



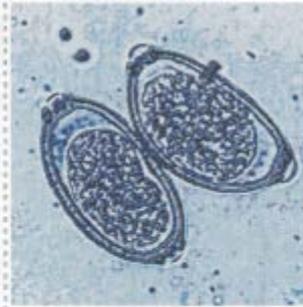
Estructuras que aparecen en las aguas residuales

# Recuento de huevos de nematodos (Método de Bailinger modificado)

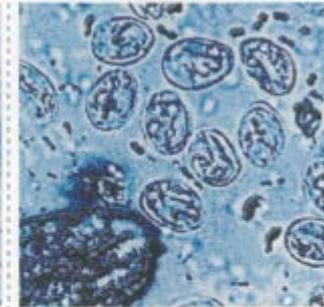
Parásitos que  
pueden  
aparecer en  
las aguas  
residuales



Huevo de *Ancylostoma caninum*.  
Cortesía Lab. Virbac®



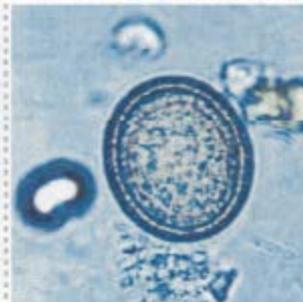
Huevo de *Capilaria* spp.  
Cortesía Lab. Virbac®



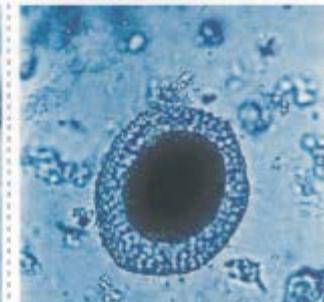
Quiste de *Giardia*.  
Cortesía Lab. Virbac®



Trofozoito de *Giardia*.  
Cortesía Lab. Virbac®



Huevo de *Taenia* spp.  
Cortesía Lab. Virbac®



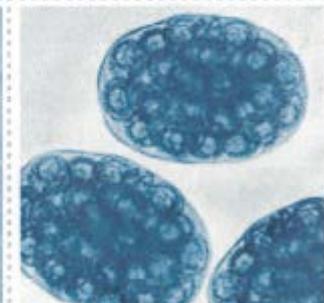
Huevo de *Toxocara canis*.  
Cortesía Lab. Virbac®



Huevo larvado de *Toxocara canis*.  
Cortesía Lab. Virbac®



Huevo de *Trichuris vulpis*.  
Cortesía Lab. Virbac®



Huevo de *Dipylidium caninum*.  
Cortesía Lab. Virbac®



**ADAPTARES**

Microbiología & Investigación



# Recuento de huevos de nematodos (Método de Bailinger modificado)

Recuento de  
huevos de  
nematodos

Calcular el número de huevos por litro según la fórmula:

$$N=A \cdot X / P \cdot V$$

N= Número de huevos por litro de muestra.

A= Número de huevos contabilizados en la cámara o la media del número contabilizados en 2 o 3 celdillas.

X= Volumen del producto final (ml).

P= Volumen de la celdilla de la cámara de McMaster (0,3 ml).

V= Volumen de la muestra original (litros).

# Aislamiento y recuento de *Legionella* sp. (UNE EN ISO 11731)

## ETAPAS

- ✓ Concentración por filtración
  - ✓ Elución del filtro
  - ✓ Descontaminación del concentrado
  - ✓ Inoculación de los medios
    - ✓ Concentrado sin tratamiento de descontaminación
    - ✓ Concentrado tratado térmicamente
    - ✓ Concentrado tratado con solución ácida
  - ✓ Incubación
  - ✓ Examen de las placas
  - ✓ Confirmación de las colonias presuntivas
    - ✓ Siembra en agar BCYE
    - ✓ Siembra en agar BCYE-cys
  - ✓ Expresión de los resultados
- ✓ Solución Salina de Page (SSP)
  - ✓ Solución ácida
  - ✓ Agar Legionella BCYE
  - ✓ Agar Legionella BCYE-cys
  - ✓ Agar selectivo Legionella GVPC
  - ✓ Rampa de filtración
  - ✓ Filtros de membrana 0,22 µm

# Aislamiento y recuento de Legionella sp.(UNE EN ISO 11731)

## 1. CONCENTRACIÓN POR FILTRACIÓN CON ELUCIÓN



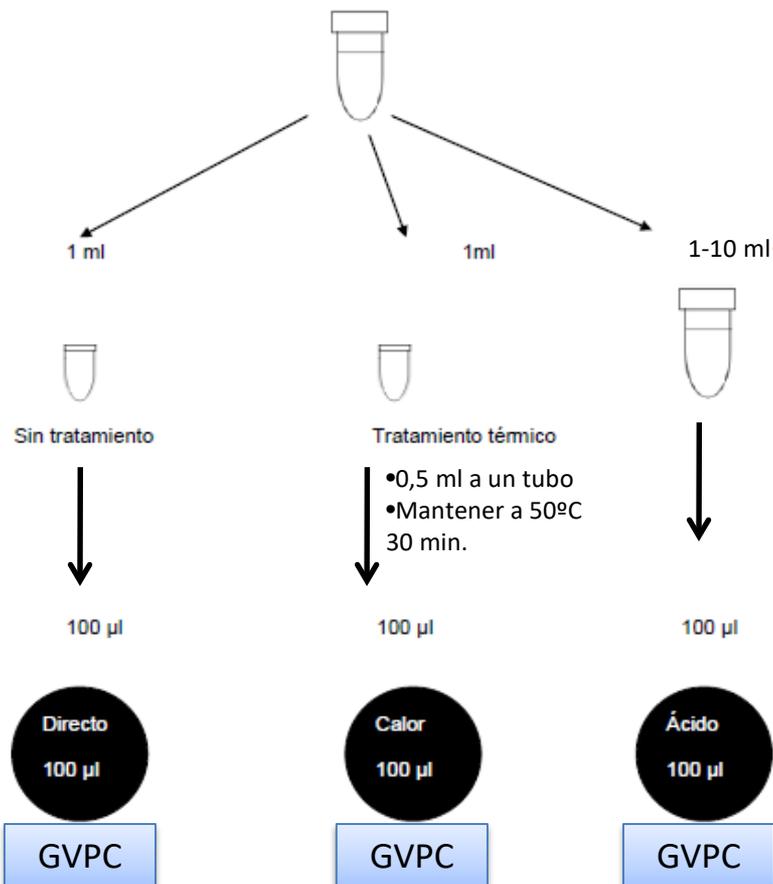
Se corta en varias porciones y se coloca en un tubo tipo Falcon

En muestras con mucha cantidad de sólidos se puede concentrar la muestra por centrifugación

Muestra preparada. Se registra el volumen

# Aislamiento y recuento de *Legionella* sp.(UNE EN ISO 11731)

Se divide el concentrado en 3 porciones



## 2. DESCONTAMINACIÓN E INOCULACIÓN DE LOS MEDIOS

# Aislamiento y recuento de *Legionella* sp. (UNE EN ISO 11731)

## INCUBACIÓN

- 7-10 días
- Atmósfera húmeda

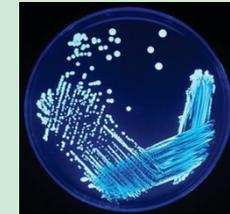
## EXAMEN DE PLACAS

2º, 3º, 4º.. días



## RECuento

Se registra el número de colonias presuntivas



## Identificación de *Legionella* incluye:

- Morfología característica
- Comprobación de crecimiento en BCYE y ausencia en BCYE-cys
- Tinción de Gram (bacilo gram -) (coloración de contraste: Fushina básica)

Cultivo en agar BCYE  
de colonias tipo 36°C  
2-5 días

Cultivo en agar BCYE-Cys  
de las mismas colonias  
tipo 36°C 2-5 días

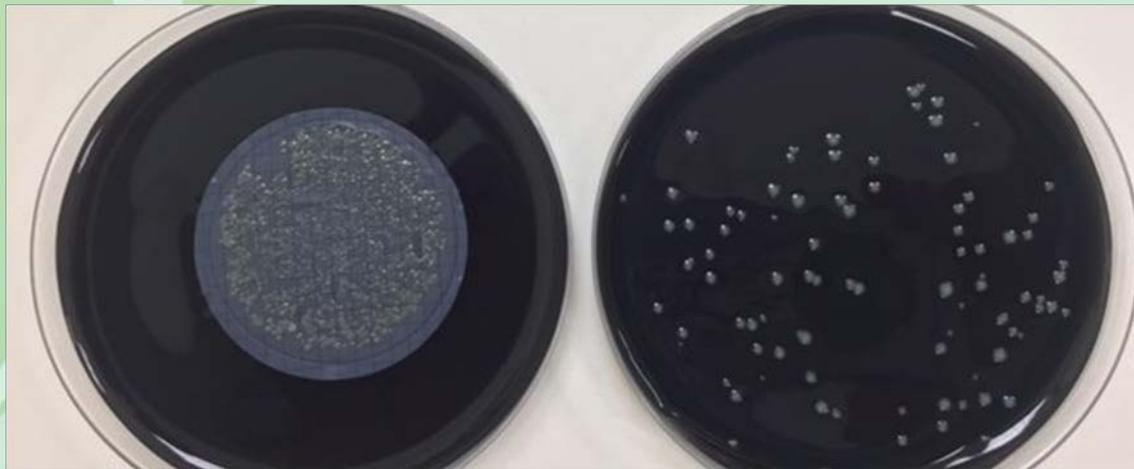
# Aislamiento y recuento de *Legionella* sp.(UNE EN ISO 11731)

## Expresión de los resultados

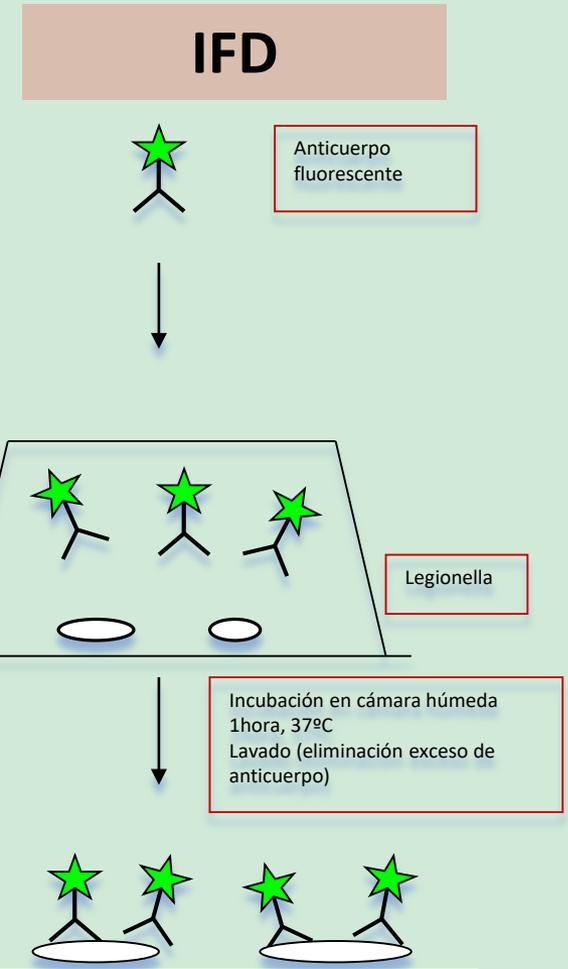
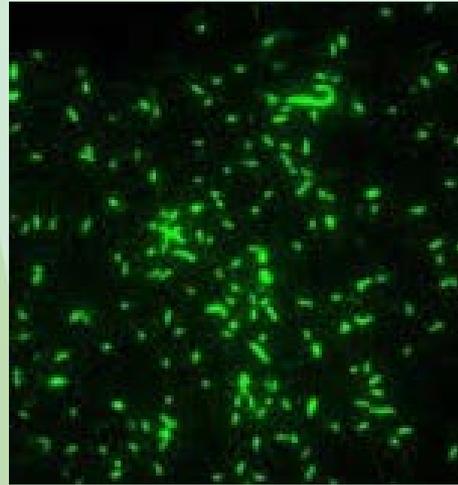
$$C = \frac{[(N \cdot V) / J]}{S} \cdot (1/S)$$

Donde:

- C es el número de UFC por litro de la muestra original.
- N es el número de colonias en la placa de GVPC con mayor número de colonias.
- V es el volumen (ml) del concentrado utilizado.
- J es el volumen (ml) inoculado en la placa.
- S es el volumen (litros) que fue usado del litro original.



# Aislamiento y recuento de Legionella sp. (UNE EN ISO 11731)



# Aislamiento y recuento de *Legionella* sp.(PCR)

## ✓ PCR:

- Amplificación de un gen o un fragmento específico
- Ingredientes necesarios para la reacción:
  - ✓ dNTPs
  - ✓ Buffer de PCR
  - ✓ MgCl<sub>2</sub>
  - ✓ Primers o cebadores
  - ✓ Agua
  - ✓ Polimerasa
- Requisitos para un buen funcionamiento:
  - ✓ Primers
  - ✓ Concentración de MgCl<sub>2</sub>
  - ✓ Tm adecuada

### • Inconvenientes:

- ✓ Equipamiento
- ✓ Personal cualificado
- ✓ Inhibidores: Falsos negativos
- ✓ Protocolos no estandarizados

### • Ventajas:

- ✓ Rapidez
- ✓ Sensibilidad y especificidad

# Aislamiento y recuento de *Legionella* sp. (PCR)

## PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

### Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C

### Step 2 : annealing

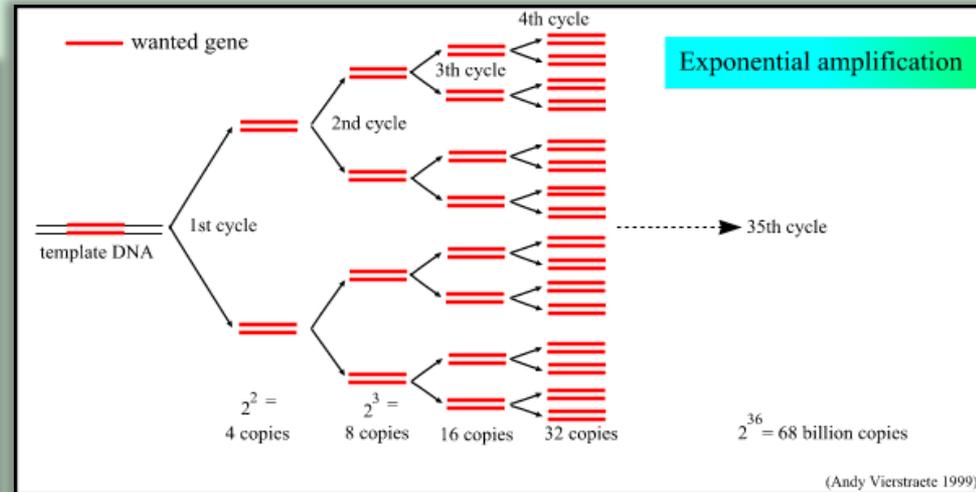
45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!

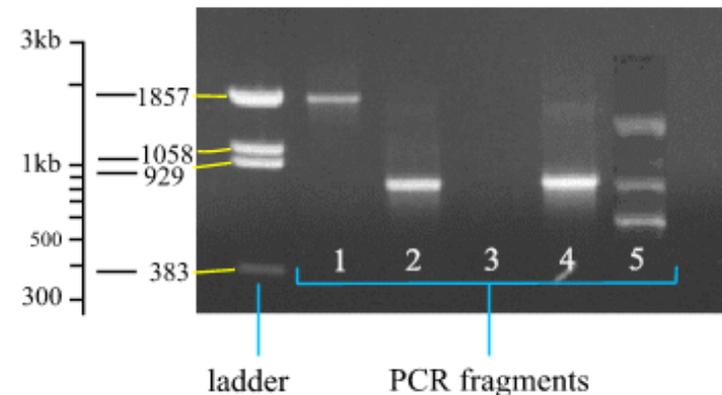
### Step 3 : extension

2 minutes 72 °C  
only dNTP's

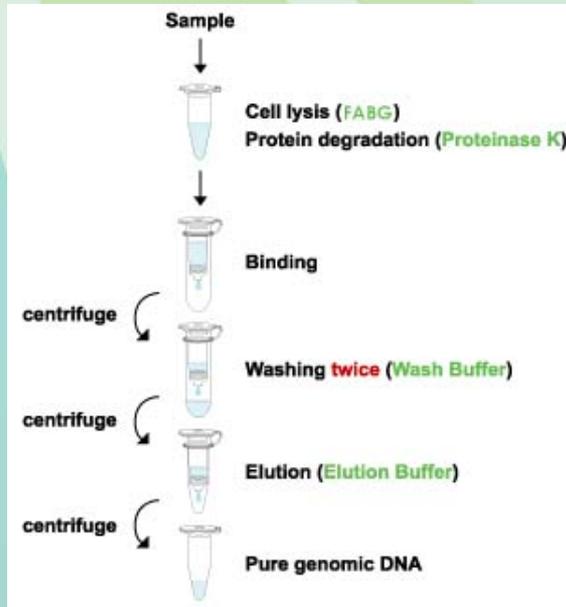
(Andy Vierstraete 1999)



## Verification of PCR product on agarose or sepaside gel



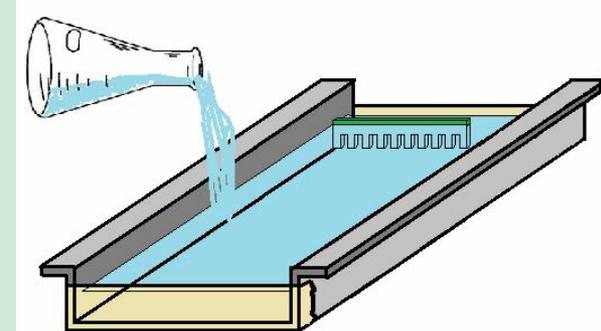
# Aislamiento y recuento de Legionella sp.(PCR)



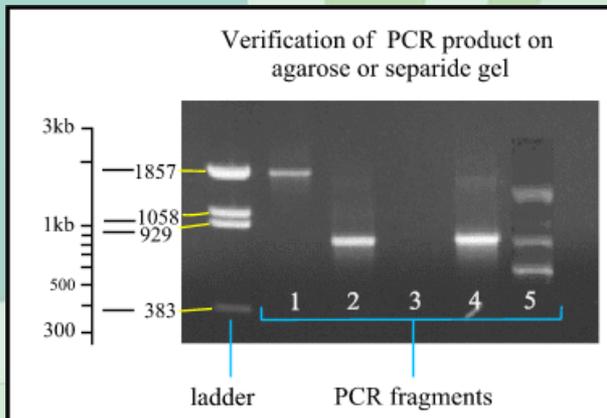
Extracción de ADN



Termociclador

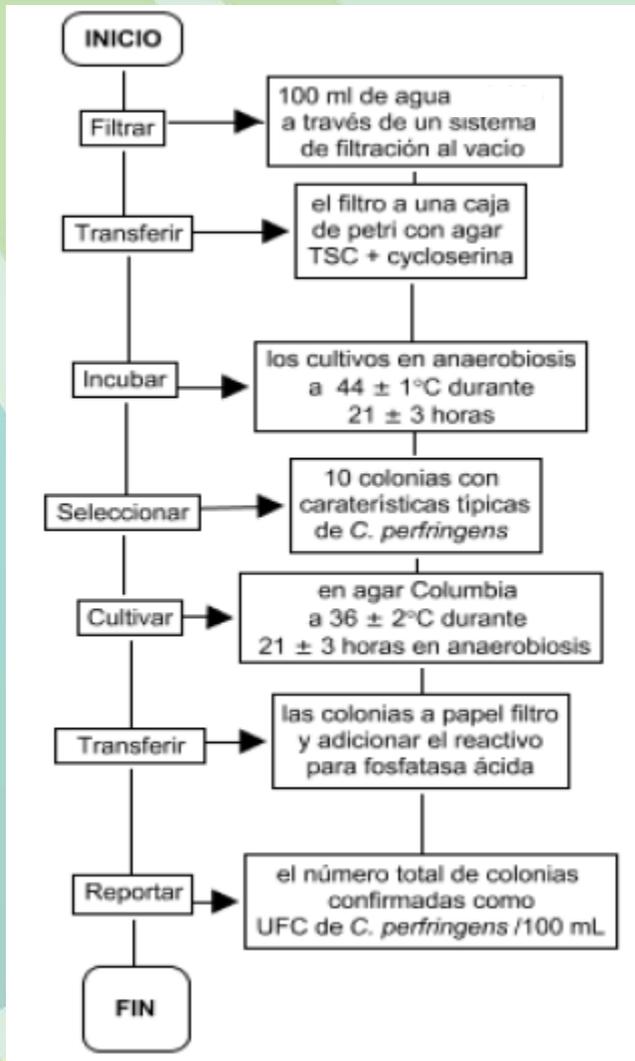


Gel de agarosa



Electroforesis

# Aislamiento y recuento de *Clostridium perfringens*.(ISO 14189)

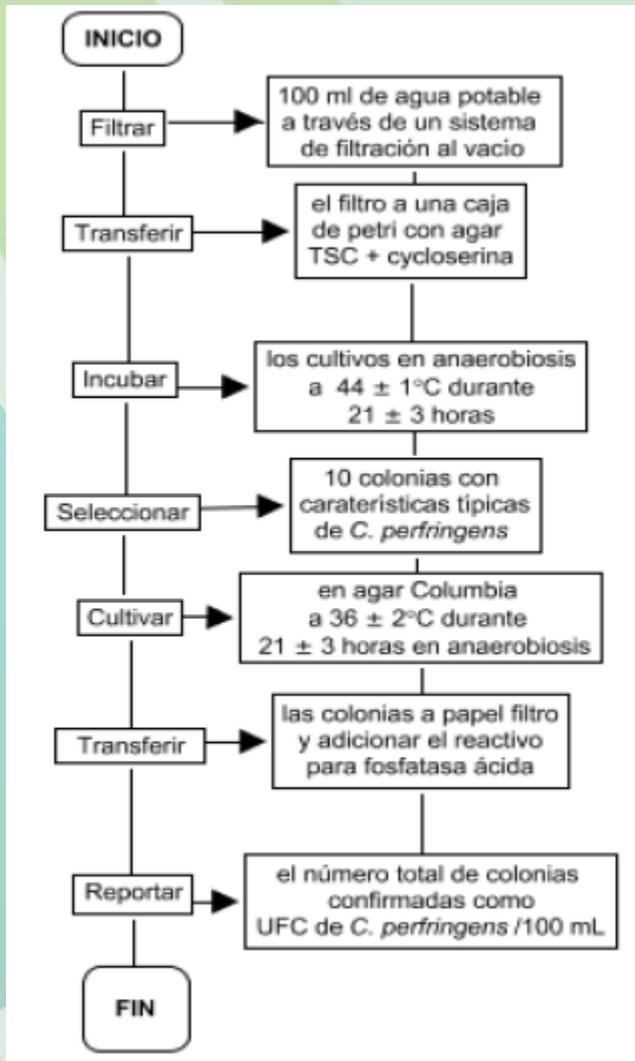


- ✓ Solución Salina de Page
- ✓ Agar Triptosa Sulfito Cicloserina (TSC)
- ✓ Agar sangre (agar Columbia sangre)
- ✓ Jarra de anaerobiosis
- ✓ Generadores de anaerobiosis
- ✓ Filtros de membrana
- ✓ Rampa de filtración

## ETAPAS

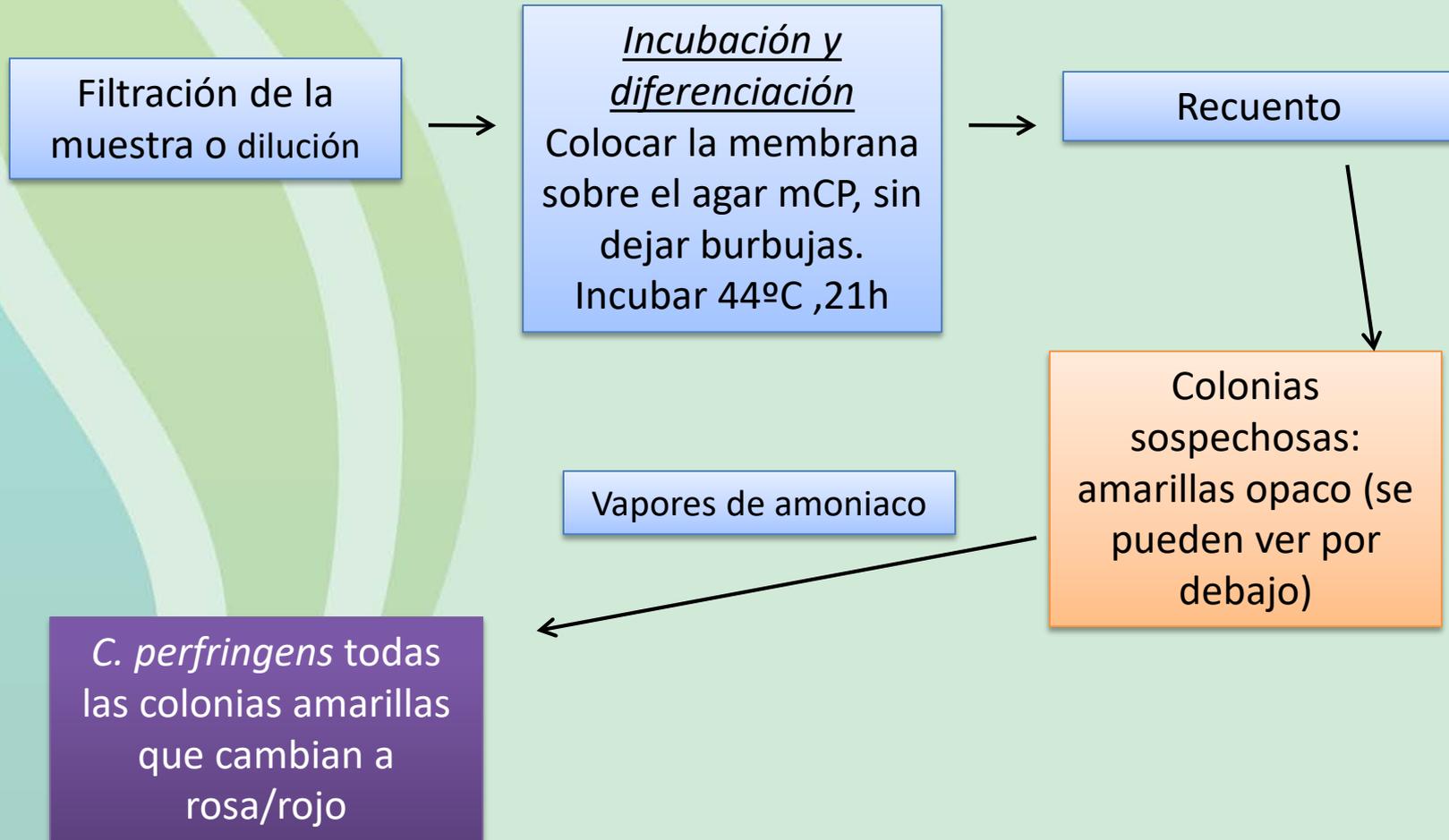
- ✓ Preparación de la muestra
- ✓ Filtración
- ✓ Incubación
- ✓ Recuento
- ✓ Confirmación
  - ✓ Siembra en agar sangre
  - ✓ Prueba de la fosfatasa ácida (10 colonias)

# Aislamiento y recuento de *Clostridium perfringens*.(ISO 14189)

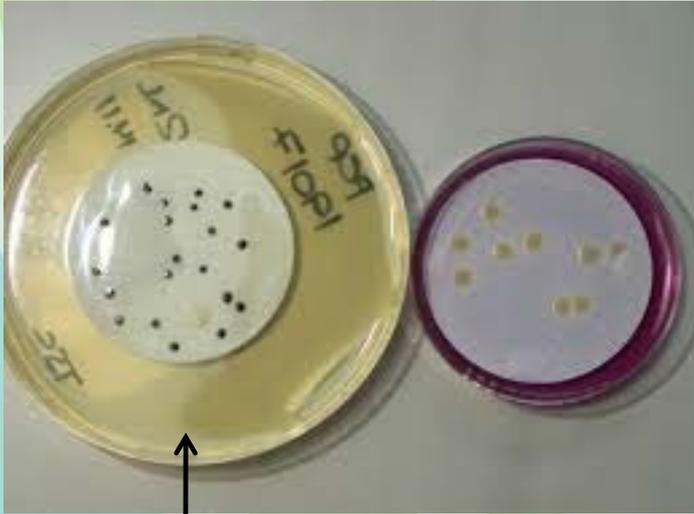


ADDITION OF COMPONENT 1		Pipette 1.5 ml of component 1 into the vial with the colour reagent component 2.	1 min
VORTEX		Vortex until a homogeneous mixture is achieved.	1 min
COOL		Protecting it from light, cool the vial for 1 hour at 2...8 °C.	60 min
CENTRIFUGE		Then centrifuge the vial for 10 minutes at 6,000 RPM.	10 min
TRANSFER THE SUPERNATANT		Transfer 750 µl of the supernatant into a fresh vial.	2 min
ADDITION OF ACID PHOSPHATASE REAGENT REACTION ON FILTER PAPER		To detect acid phosphatase, put 2-3 drops of the reagent onto filter paper and rub a suspect ( <i>Clostridium perfringens</i> ) colony into it.  If there is a positive reaction, the colony changes colour after 3-4 minutes and ends up dark red to brown red.	5 min

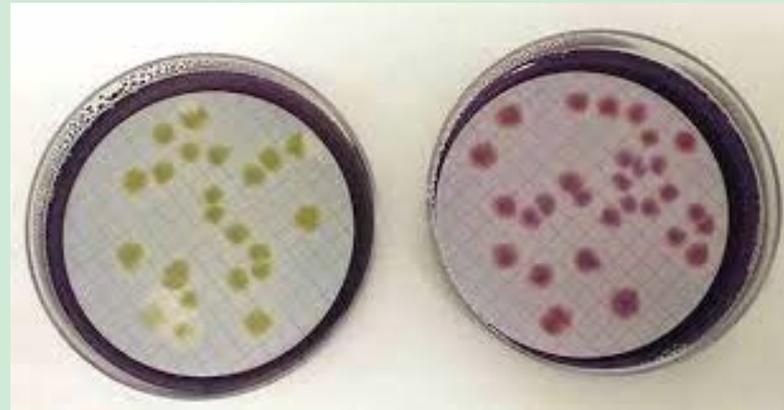
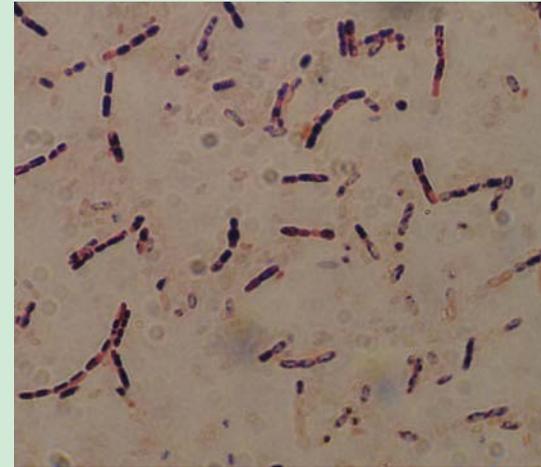
# Aislamiento y recuento de *Clostridium perfringens* DE 12767/97



# Aislamiento y recuento de *Clostridium perfringens* DE 12767/97

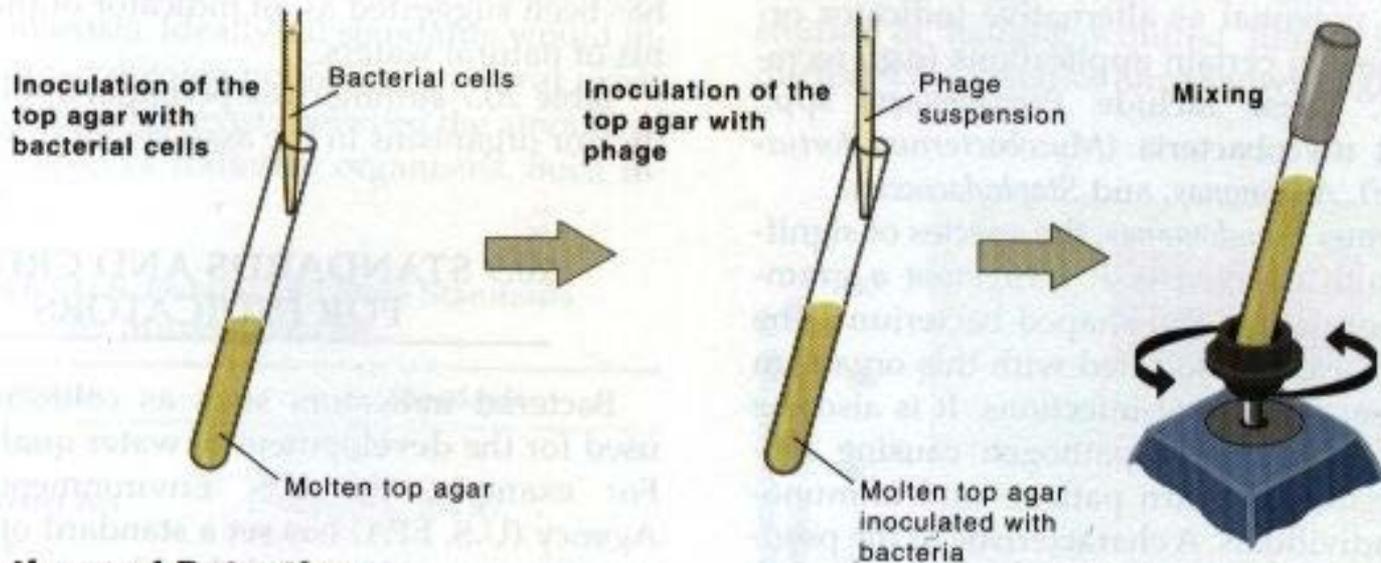


Mayor recuperación

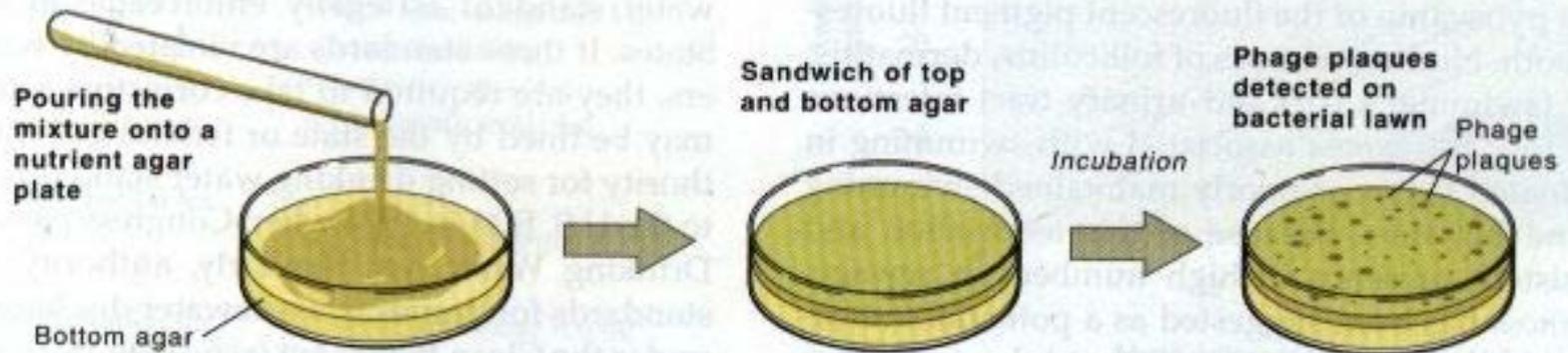


# Recuento de colifagos somáticos ISO 10705-2

## a) Preparation of the Top Agar



## b) Plating and Detection



# Recuento de colifagos somáticos ISO 10705-2

- ✓ Bacteria hospedadora *E. coli* WG5
- ✓ Bacteriófagos  $\phi$ X174
- ✓ Solución de Peptona Salina
- ✓ Solución de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- ✓ Glicerol
- ✓ Caldo de Sholtens modificado (MSB)
- ✓ Agar de Sholtens modificado (MSA)
- ✓ Agar semisólido de Sholtens modificado (ssMSA)
- ✓ Agar MacConkey

## ETAPAS

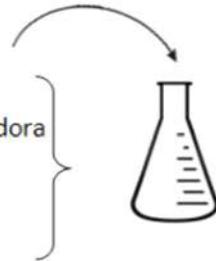
- ✓ Preparación del material del análisis
  - ✓ Cultivo y mantenimiento de la cepa hospedadora
  - ✓ Preparación de los cultivos stock
  - ✓ Preparación de los cultivos de trabajo
  - ✓ Cultivo y mantenimiento del bacteriófago  $\phi$ X174
- ✓ Procedimiento analítico
  - ✓ Preparación de inóculos
  - ✓ Preparación de la muestras
  - ✓ Procedimiento estandar
  - ✓ Expresión de resultados

# Recuento de colifagos somáticos ISO 10705-2

## - PREPARACIÓN DE CULTIVOS

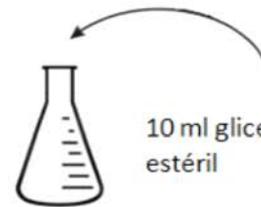
### • STOCK

Liofilizado cepa hospedadora  
+ 3 ml MSB

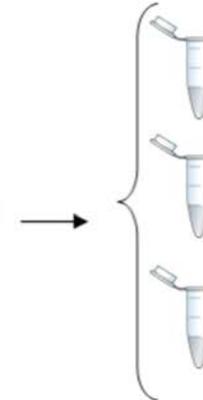


50 ± 5 ml MSB

36 ± 2°C / 20 ± 4h / agitación



10 ml glicerol  
estéril



Alícuotas:  
-70 ± 10°C  
N<sub>2</sub> líquido

### • TRABAJO



Stock  
T<sub>a</sub> amb



Agar McConkey o  
medio con lactosa

(36 ± 2°C / 20 ± 4h)



50 ± 5 ml MSB  
(mejor a 37°C)

(36 ± 2°C / 5 ± 1h / Agit)



10 ml glicerol  
estéril

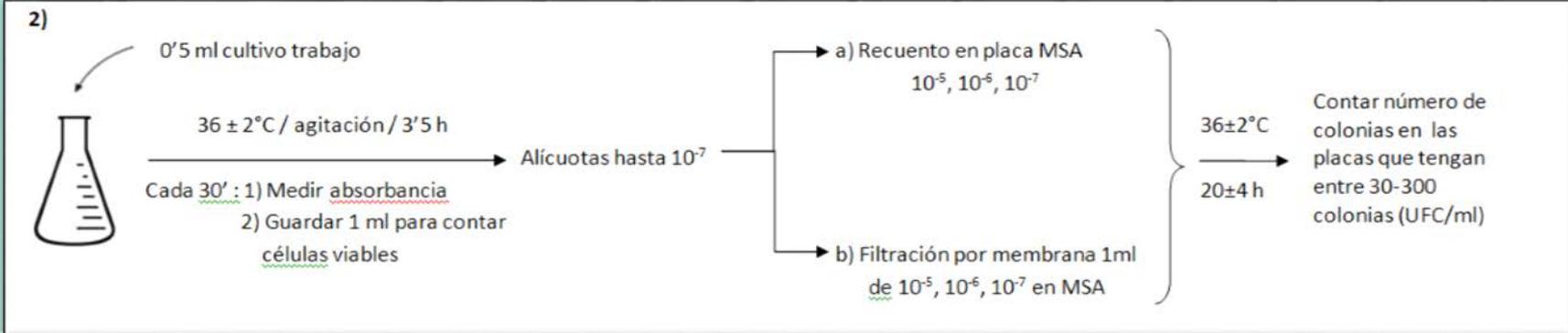
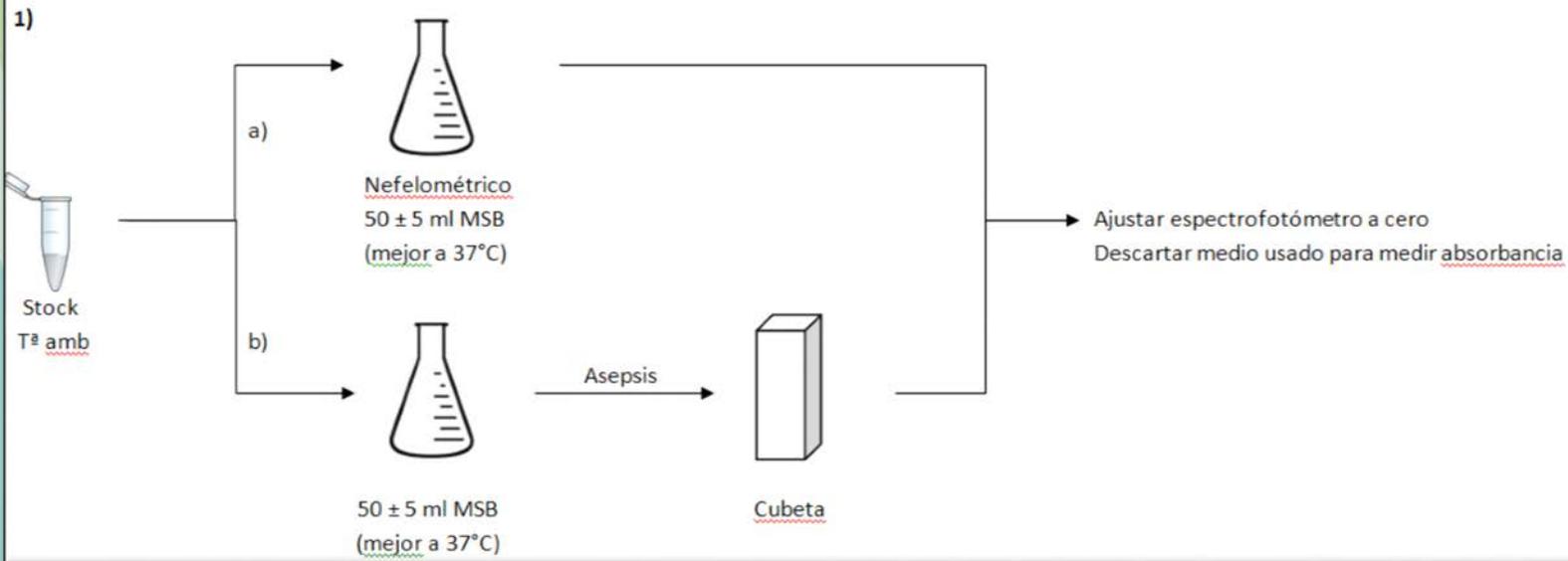
Agitación



Alícuotas:  
-70 ± 10°C  
Máx 2 años

# Recuento de colifagos somáticos ISO 10705-2

## - CALIBRACION MEDIDAS DE ABSORBANCIA



# Recuento de colifagos somáticos ISO 10705-2

## - PROCEDIMIENTO

### • PREPARACIÓN INÓCULOS

1)



Stock  
Tª amb



50 ± 5 ml MSB  
(mejor a 37°C)

Espectrofotómetro a 0

2) 0,5 ml cultivo trabajo

36±2°C / 20±4 h

3) 36±2°C / agitación / 3'5

Medir absorbancia  
cada 30'

Cuando d ~ 10<sup>8</sup> UFC/ml



Baño agua-hielo  
(usar en 24h)

Alternativa B: 36±2°C / agitación / 3±1 h

Alternativa A:



Colonias típicas

# Recuento de colifagos somáticos ISO 10705-2

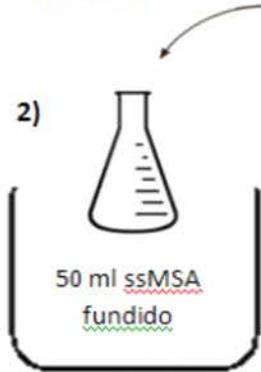
## PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR

1)



Inóculo  
preparado

2)



50 ml ssMSA  
fundido

45±1 °C

300 µl solución  
CaCl<sub>2</sub> a T<sub>amb</sub>

Alicuotas 2,5 ml



45±1 °C

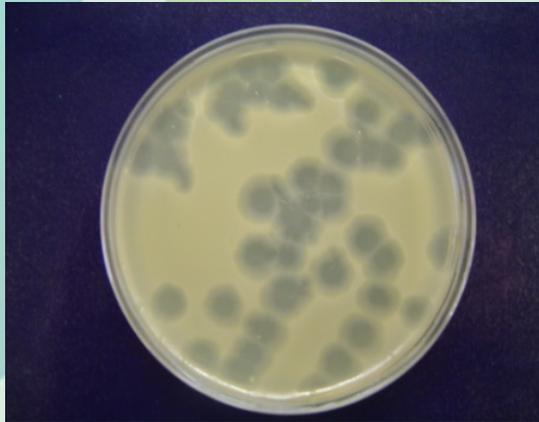
3) 1 ml muestra (x2)

4) 1 ml inóculo

Mezclar cuidadosamente  
evitando formar burbujas



MSA completo  
Incubar 36±2°C / 18±2 h



# Parceiros Canárias



# Parceiros Madeira



ARM - Águas e Resíduos da Madeira, S.A.



# Parceiros Cabo Verde



Ministério  
da Educação

Direção Nacional de Educação



Ministério da Agricultura  
e Ambiente

Direção Nacional do Ambiente



Ministério da Agricultura  
e Ambiente

Direção Geral da Agricultura,  
Silvicultura e Pecuária

# Participante Associado



ADAPTARES

