UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA

EVALUACIÓN DEL RIESGO SANITARIO POR *LEGIONELLA* EN LA REUTILIZACIÓN DE AGUA RESIDUAL REGENERADA EN TORRES DE REFRIGERACIÓN

Mariana Fittipaldi

Laboratori de Microbiologia Sanitària i Mediambiental
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Centre de Recerca en Seguretat i Control Alimentari
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

EQUIPO HUMANO

Dr. Jordi Morató	MSMLab
Francesc Codony	MSMLab
Mariana Fittipaldi	MSMLab
Bàrbara Adrados	MSMLab
Dr. Josep Garcia Raurich	CRESCA
Daniel Mateo	CRESCA
Coral Martil Martinez	CRESCA
Ignasi Canal	CRESCA
Dr. Josep Ma Nacenta	Dept. Maquines i Motors Tèrmics
Albert Cuesta Matarredona	Dept. Maquines i Motors Tèrmics

¿Aumenta el riesgo sanitario si utilizamos agua residual regenerada en torres de refrigeración?

OBJETIVOS

Evaluación de la **calidad de los efluentes de depuradoras** con sistemas de tratamientos terciarios.

Validación del **efecto del origen del agua** (residual regenerada o potable) en el riesgo sanitario.

Evaluación en planta piloto del riesgo sanitario de la reutilización de aguas residuales regeneradas en instalaciones industriales de refrigeración.

MARCO NORMATIVO

Para poder desarrollar este proyecto se tuvo presente:

- "**Criterios de Calidad del Agua Regenerada según diferentes usos**", de l'Agència Catalana de l'Aigua, donde se requiere el análisis de *Legionella pneumophila* en aguas de tipo B, para uso en cultivos de invernadero y para aguas de tipo D en refrigeración industrial.

- **RD 1620/2007. Régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.** Se prohíbe la reutilización de las aguas para su uso en torres de refrigeración y análogos excepto para uso **industrial (I.A.3, calidad 3.2):**

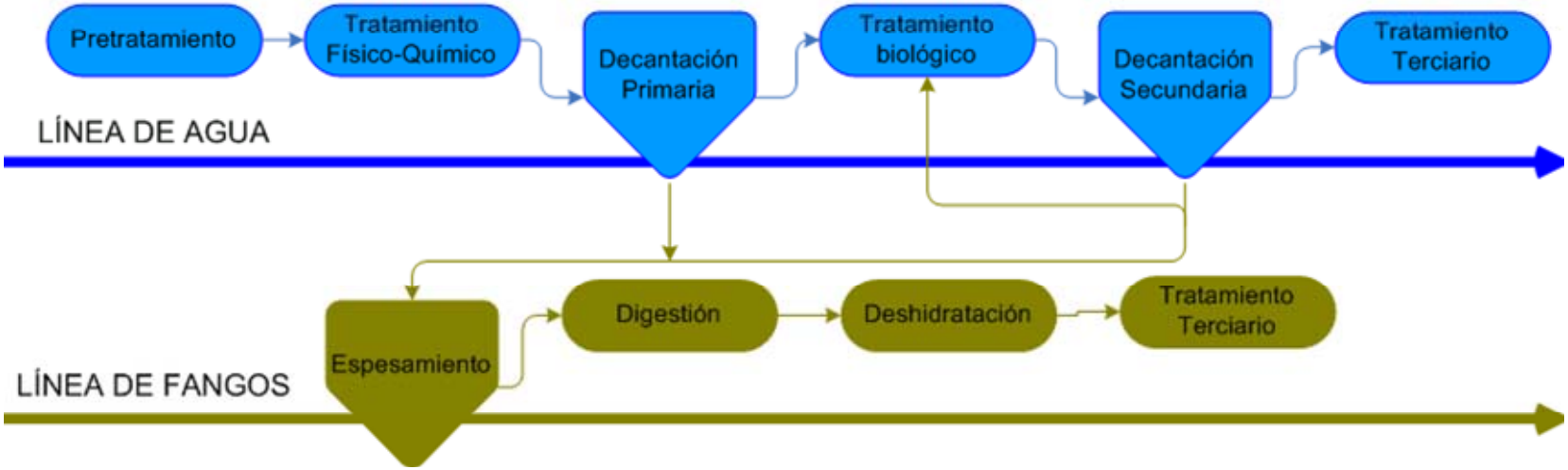
Legionella spp. Ausencia UFC/L
Uso exclusivo industrial y en zona no urbana

Evaluación de la **calidad de los efluentes de depuradoras con sistemas de tratamiento terciario**.

UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA

EDAR BLANES

Estación depuradora de agua residual Blanes



Tratamiento terciario EDAR Blanes

Entrada, depósito 1500 m³

Trat. fisicoquímico

Decantadores laminares

Filtros de arena

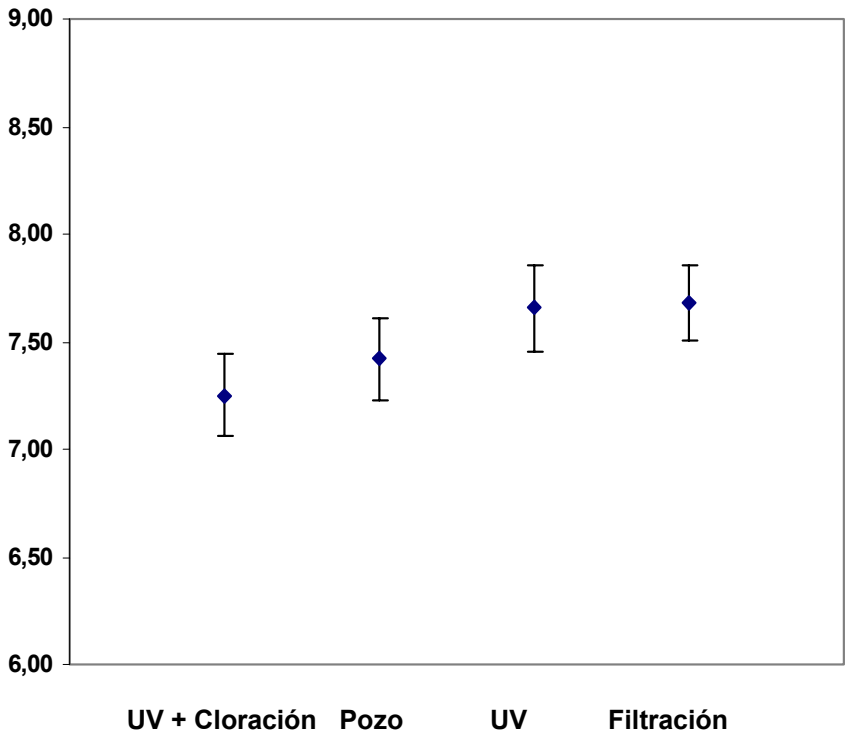
Desinfección UV/Cl_2

Salida

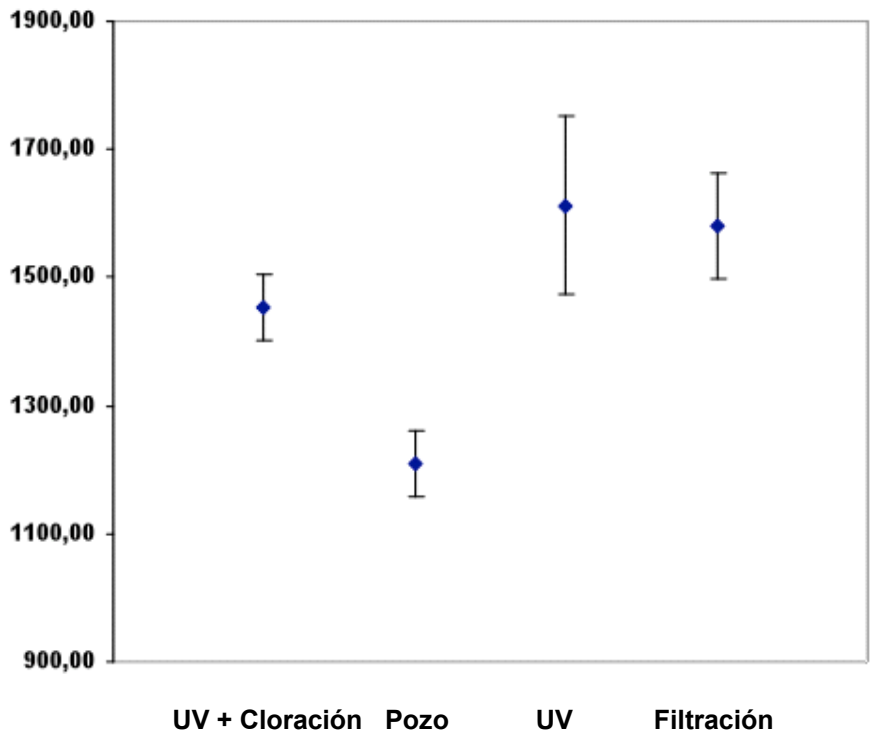
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

CARACTERIZACIÓN: PARAMETROS FISICOQUÍMICOS

pH



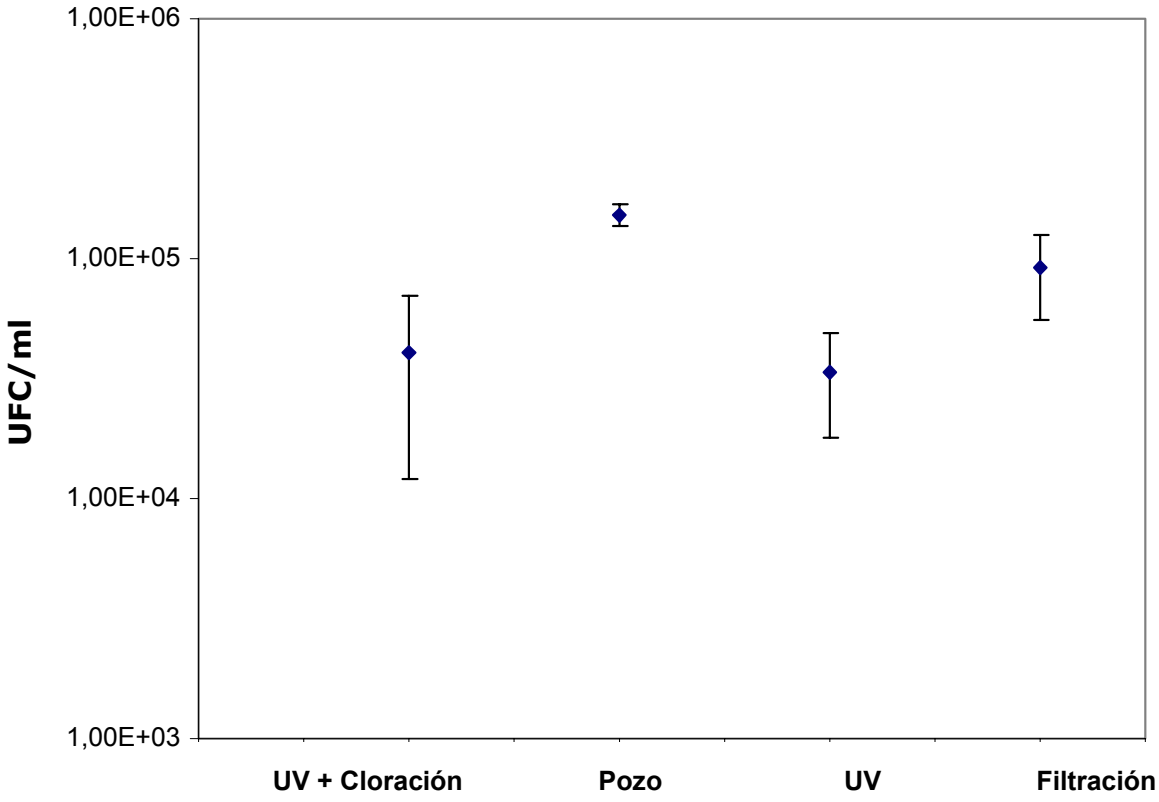
Conductividad (µS/cm²)



n =9

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

CARACTERIZACIÓN: PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS (CULTIVO)



AEROBIAS TOTALES
Cel. Suspensión
(ISO 6222)

n =9

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS (CULTIVO)

Calidad del agua	*E.Coli* (UFC/ml)	Coliformes totales (UFC/ml)	*Legionella pneumophila* (UFC/L) Cultivo	*Legionella pneumophila* (UFC/L) PCR*
Pozo	< 10/ 100 ml	< 10/ 100 ml	nd	No se detecta
UV +Cloración	< 10/ 100 ml	< 10/ 100 ml	nd	$9,07 \times 10^2$
UV	< 10/ 100 ml	<100/100 ml	nd	$8,77 \times 10^2$
Filtración	$2,95 \times 10^2$	$9,90 \times 10^2$	nd	$1,08 \times 10^3$

Nd. No determinable

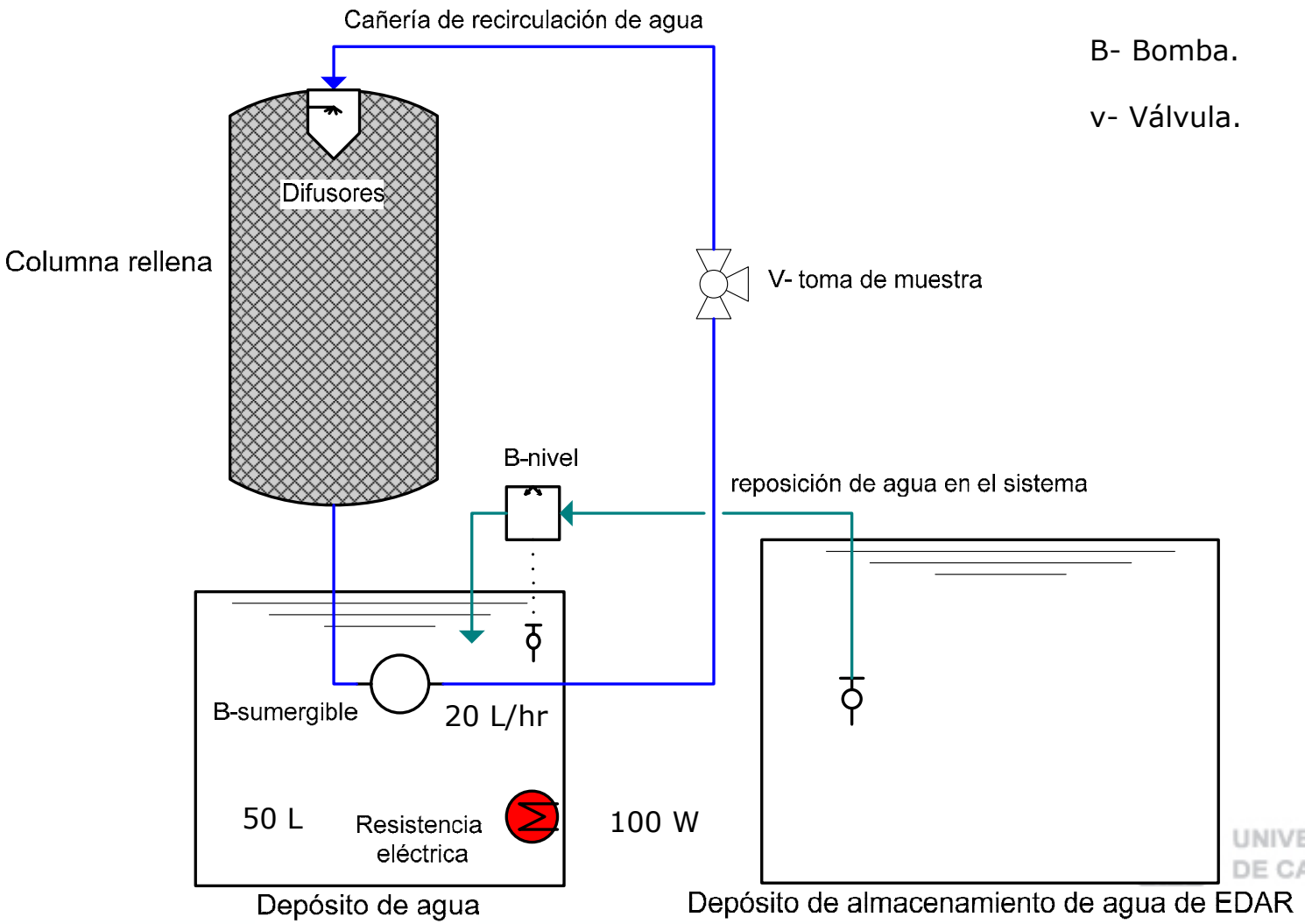
.

Límite de detección de *Legionella pneumophila* por PCR en tiempo real 4×10^2 UFC/L

Validación del efecto del origen del agua (residual regenerada o potable) en el riesgo sanitario.

UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA

DISEÑO DE LAS UNIDADES DEMOSTRATIVAS



B- Bomba.

v- Válvula.

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

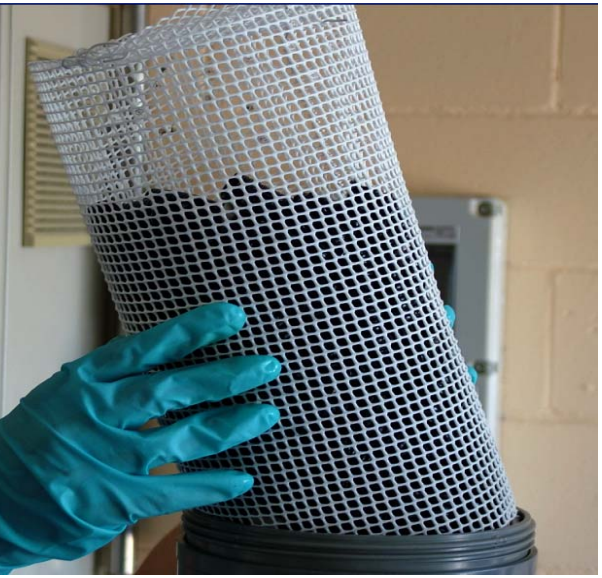
UNIDADES DEMOSTRATIVAS EN EDAR-BLANES

UNIDADES DEMOSTRATIVAS EN EDAR-BLANES

POLITÈCNICA
A

UNIDADES DEMOSTRATIVAS EN EDAR-BLANES

Agua – Cel. en suspensión
Biofilm – Cel. adheridas



Monitoreo de las UD

- Determinación de parámetros físico-químicos.

- Analíticas microbiológicas :

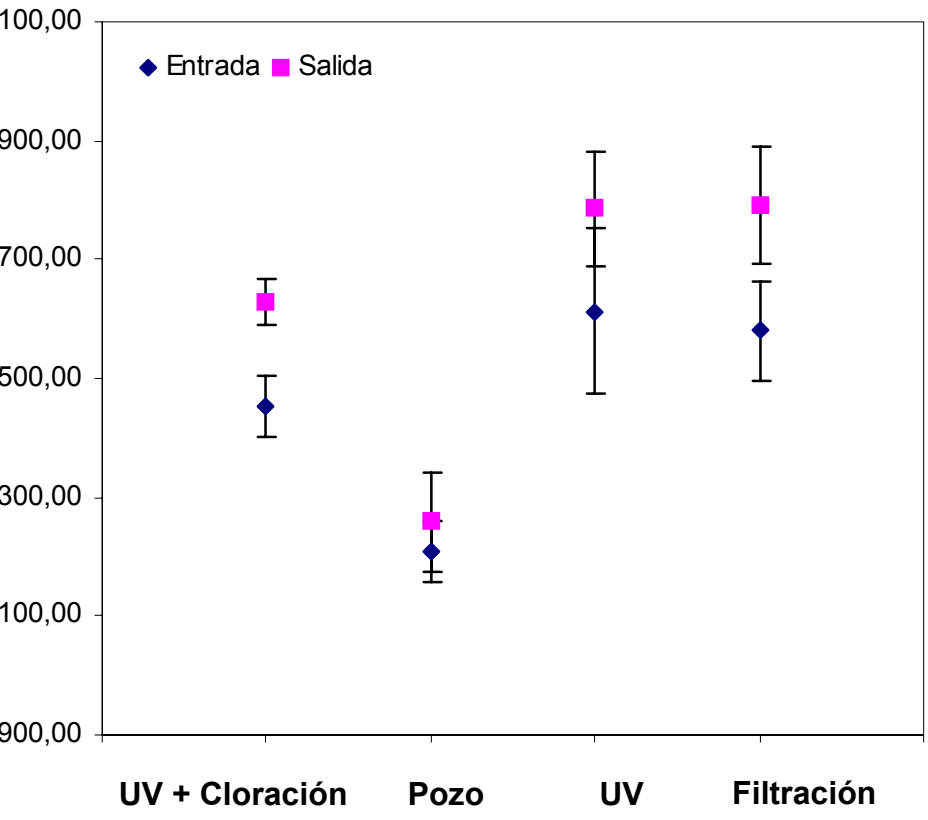
  - ***Legionella*** spp. (ISO 11731)
  - ***E. Coli* y coliformes totales** (Método de FM en agar Chromocult, según EPA).
  - **Aerobios totales** a 22ºC (ISO 6222)

- Analíticas microbiológicas mediante **PCR en tiempo real** (procedimiento interno):

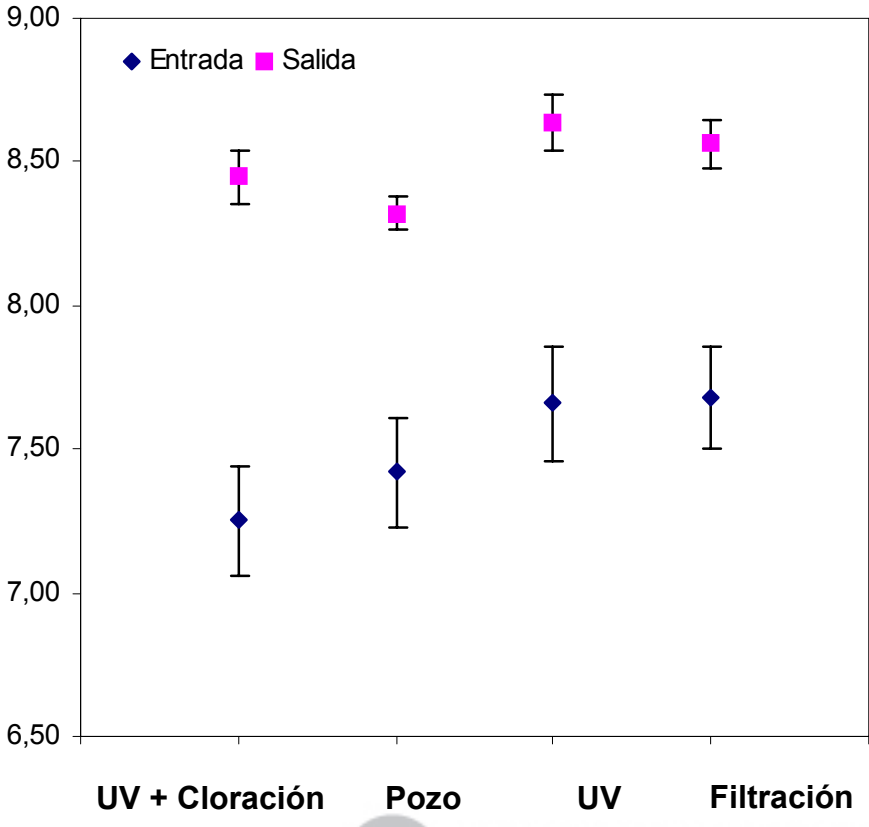
  - ***Legionella pneumophila* en aguas y biofilm.**

RESULTADOS PARAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Conductividad



pH

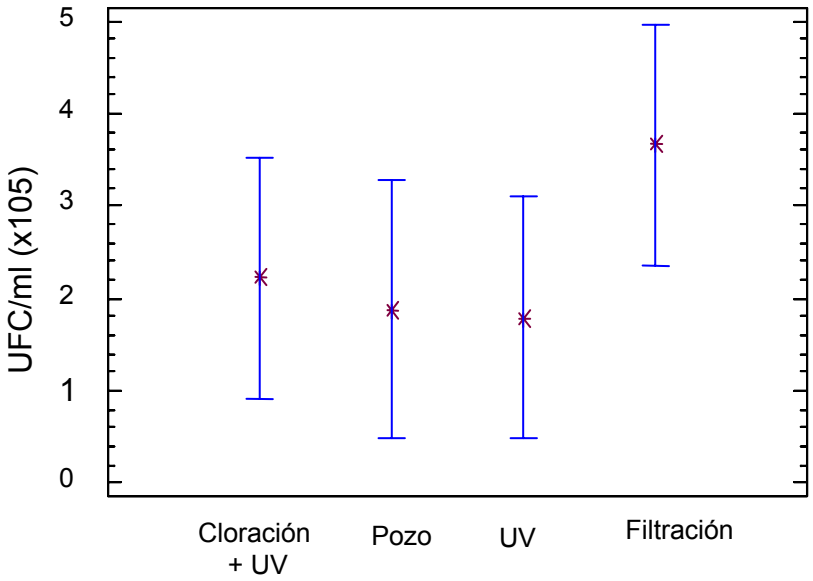


n = 9

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

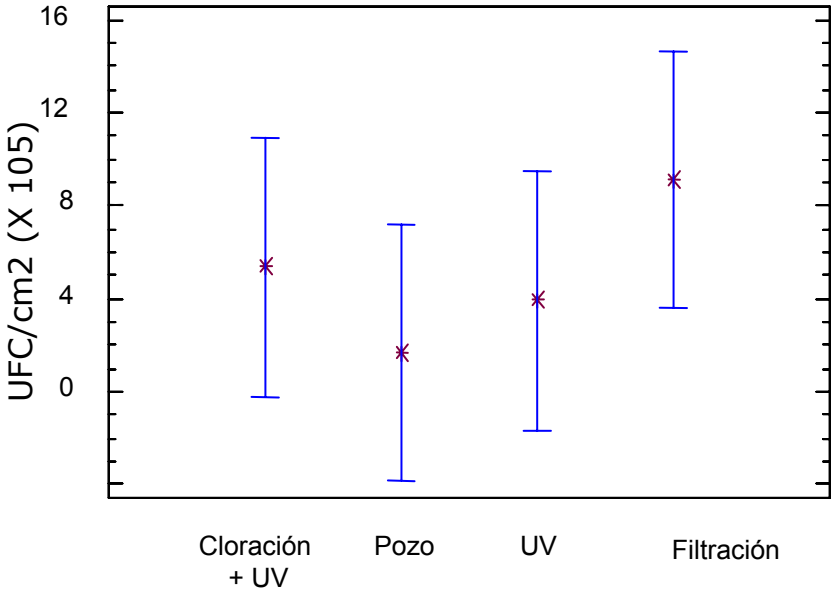
RESULTADOS PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS (CULTIVO)

Aerobias totales (agua)



***p* = 0,3253 > 0,05 (no dif.)**

Aerobias totales (biofilm)



***p* = 0,59> 0,05 (no dif.)**

n = 9

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

RESULTADOS PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS (CULTIVO)

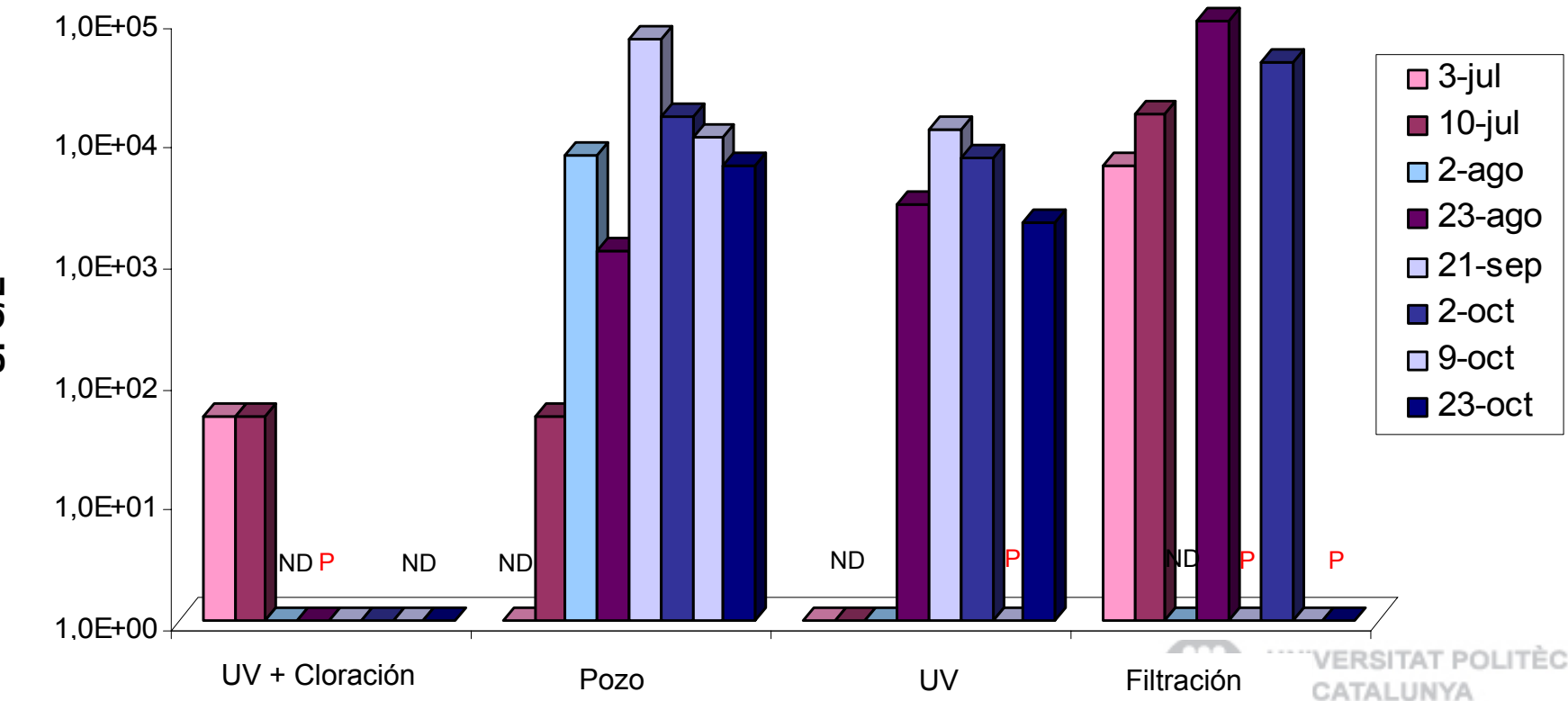
Unidades demostrativas	*E. coli* (UFC/100 ml)	Coliformes totales (UFC/100 ml)
Pozo	< 10	< 10
UV + cloración	< 10	< 10
UV	< 10	<100
Filtración	$3{,}09 \times 10^3$	$8{,}40 \times 10^4$

n = 9

RESULTADOS PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS (CULTIVO)

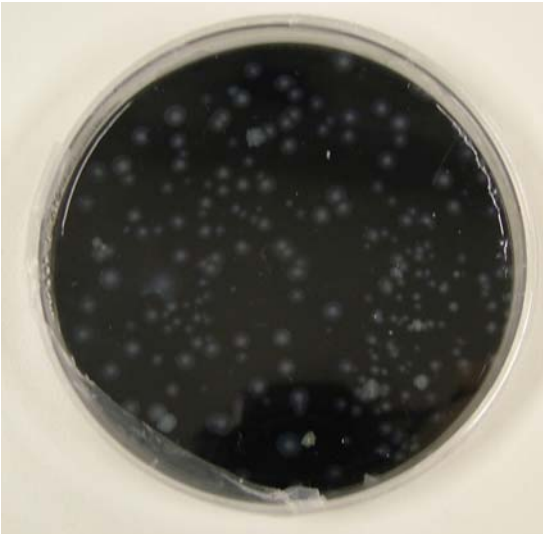
Legionella spp. en agua (Cultivo)

ND: No determinable
P: presencia

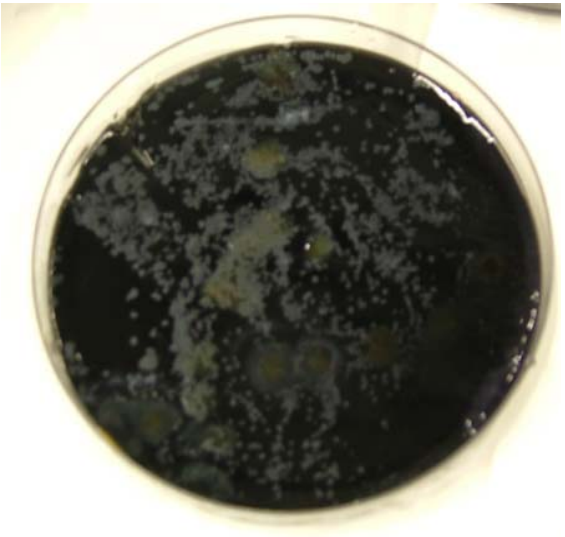


UNIVERSITAT POLITÈCNICA CATALUNYA

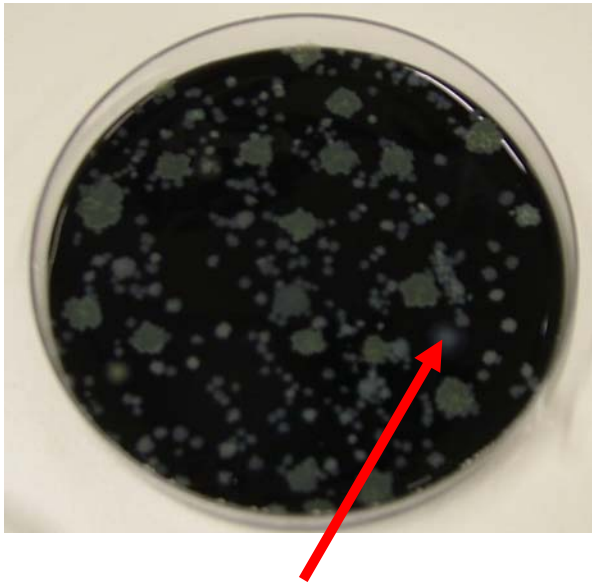
RESULTADOS LIMITACIONES DEL CULTIVO DE *LEGIONELLA*



PLACA POSITIVA
Y RECUENTO



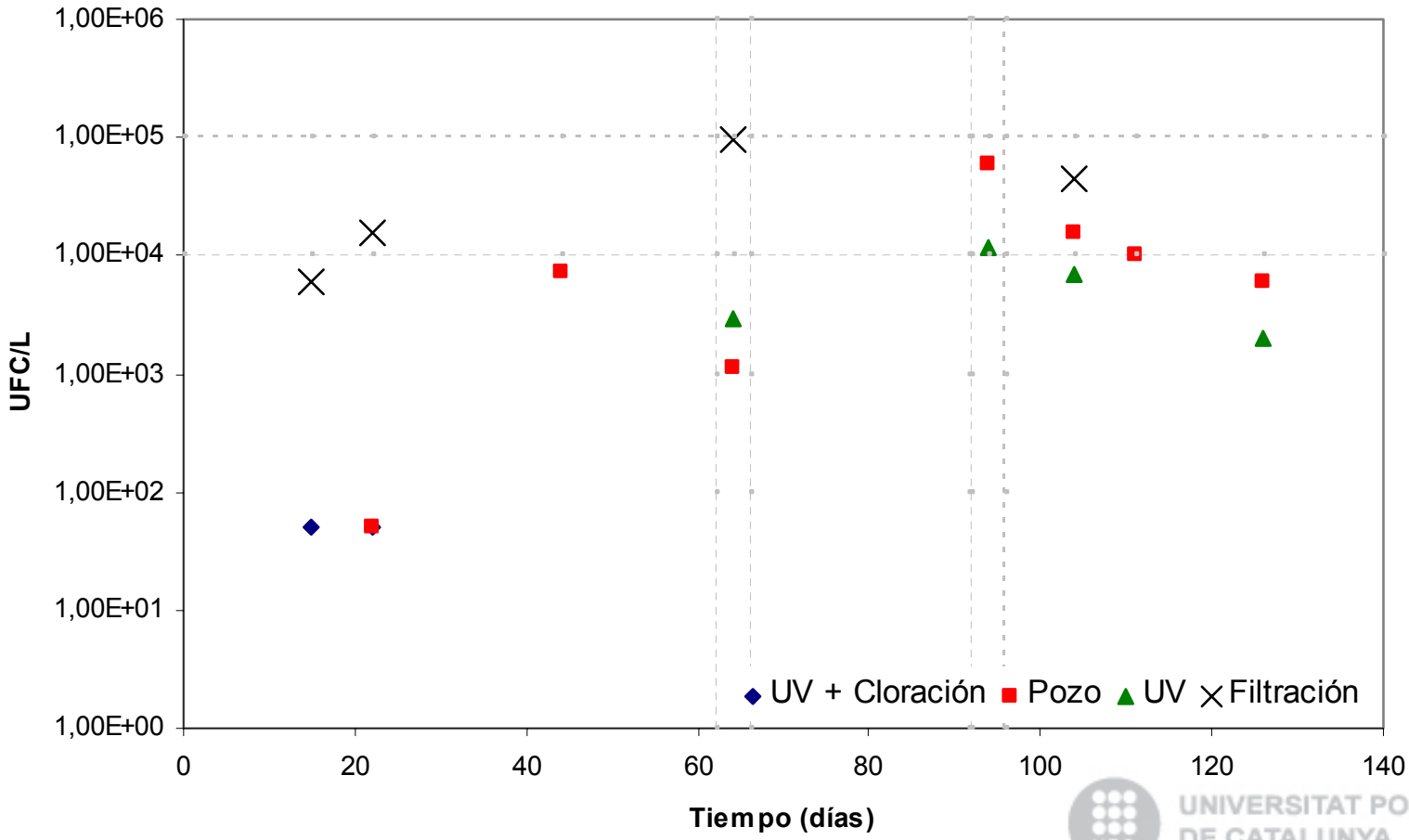
RESULTADO NO
DETERMINABLE



PRESENCIA, NO
CUANTIFICABLE

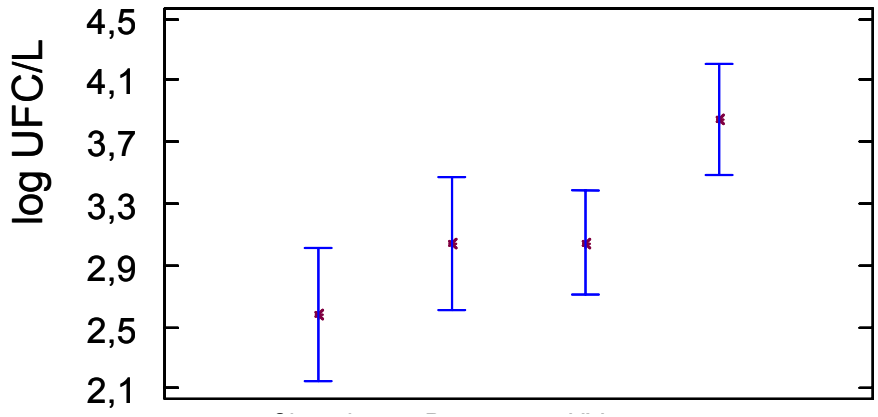
RESULTADOS PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS (CULTIVO)

Legionella spp. en agua (Cultivo)



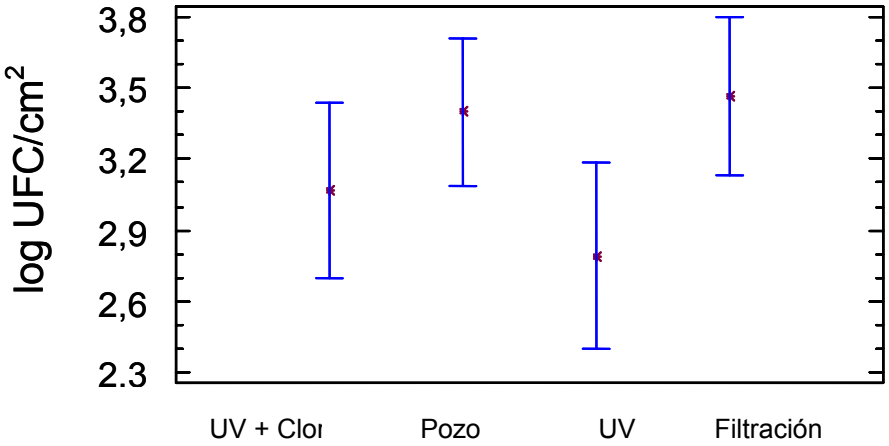
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

RESULTADOS PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS (RT-PCR)



Legionella pneumophila
Cel. Suspensión

***p*=0,0195 < 0,05 (significativo)**



Legionella pneumophila
Cel. Adheridas
(Biofilm)

***p* = 0,2214 (no significativo)**

n = 9

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

RESUMEN DE RESULTADOS

No se han observado diferencias significativas en la colonización de las unidades demostrativas alimentadas con efluentes de la desinfección del terciario de la EDAR y de pozo.

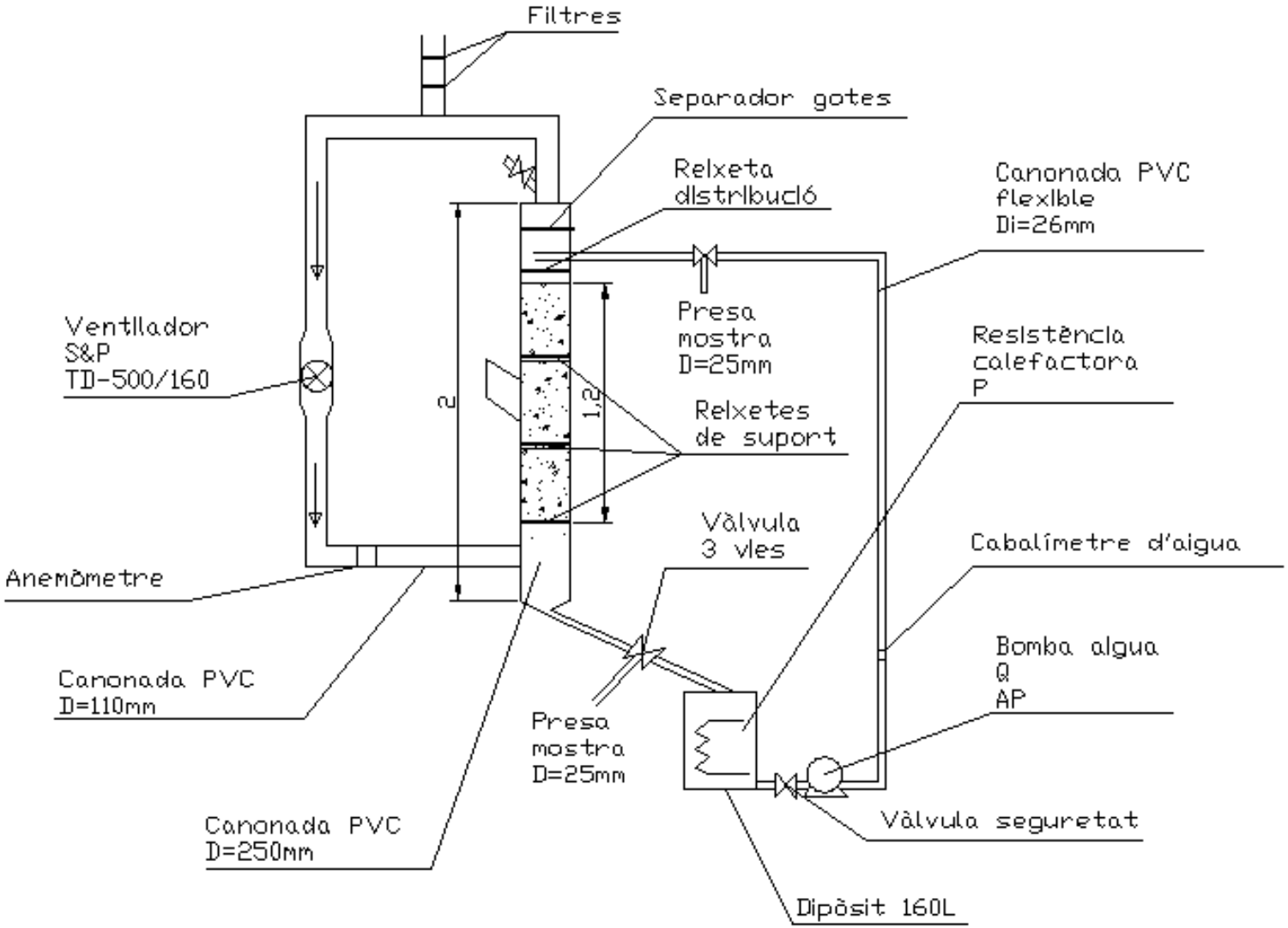
Se observaron diferencias significativas en la presencia de *Legionella pneumophila* de acuerdo a la calidad del agua (filtración, desinfección o pozo) con la que se alimentaban las UD.

Limitación de la técnica de análisis por cultivo. Se debe valorar la importancia de las técnicas moleculares (PCR en tiempo real) para la determinación de *Legionella pneumophila* a partir de aguas residuales.

Evaluación en planta piloto del riesgo sanitario de la reutilización de aguas regeneradas para instalaciones industriales de refrigeración.

UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA

DISEÑO SISTEMA PILOTO CRESCA



SISTEMA PILOTO

Diferentes detalles de
las piezas que componen
la columna rellena del
sistema piloto.

SISTEMA PILOTO CRESCA

Resistencia (izq.). Filtro pera evitar riesgo sanitario por formación aerosoles (derecha).

Depósito (izq.). Imagen completa del sistema piloto (derecha).

PRUEBAS DE COLONIZACIÓN

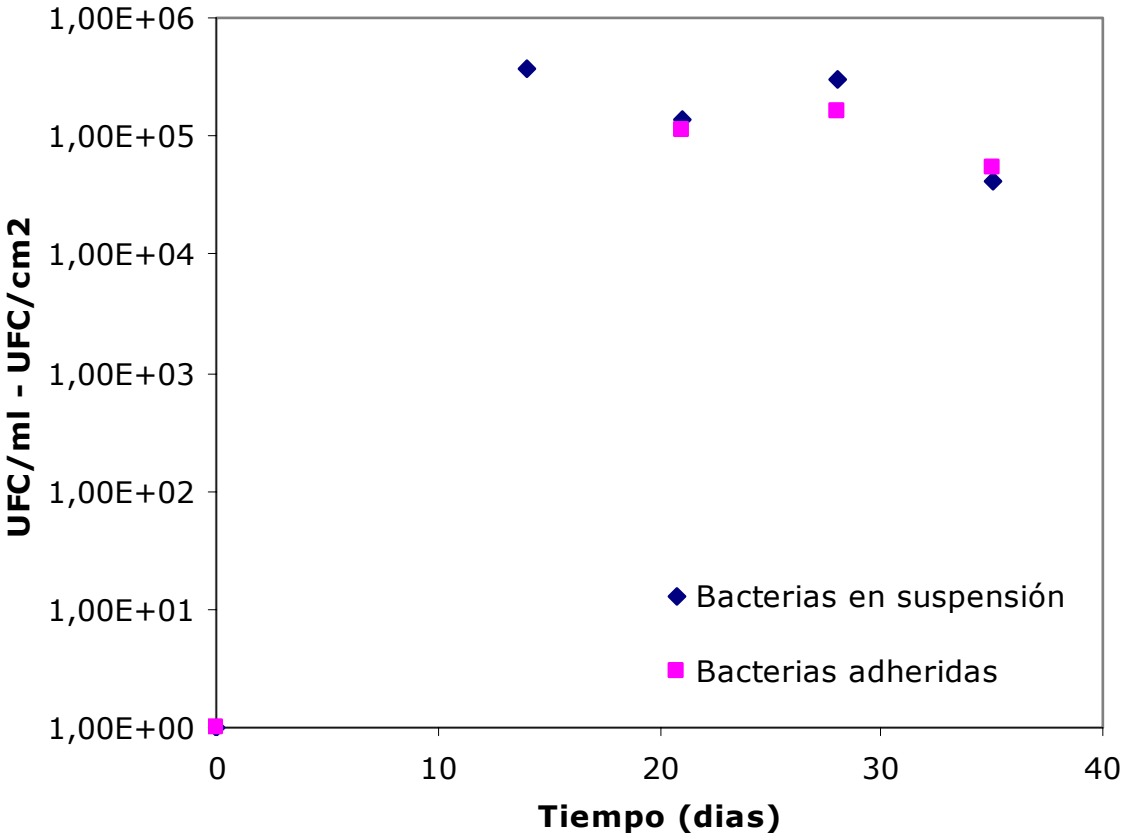
- Con agua de red resultaron negativos a las 2 semanas de recirculación.

- Se incorpora agua de EDAR con un inóculo de *Legionella pneumophila.* Se realizó el seguimiento de la colonización del sistema piloto mediante recuento de aerobias totales y *Legionella pneumophila*.

- Se evaluó la desinfección del sistema con 5 ppm de cloro en pastilla.

COLONIZACIÓN DEL SISTEMA PILOTO CRESCA

Aerobios totales

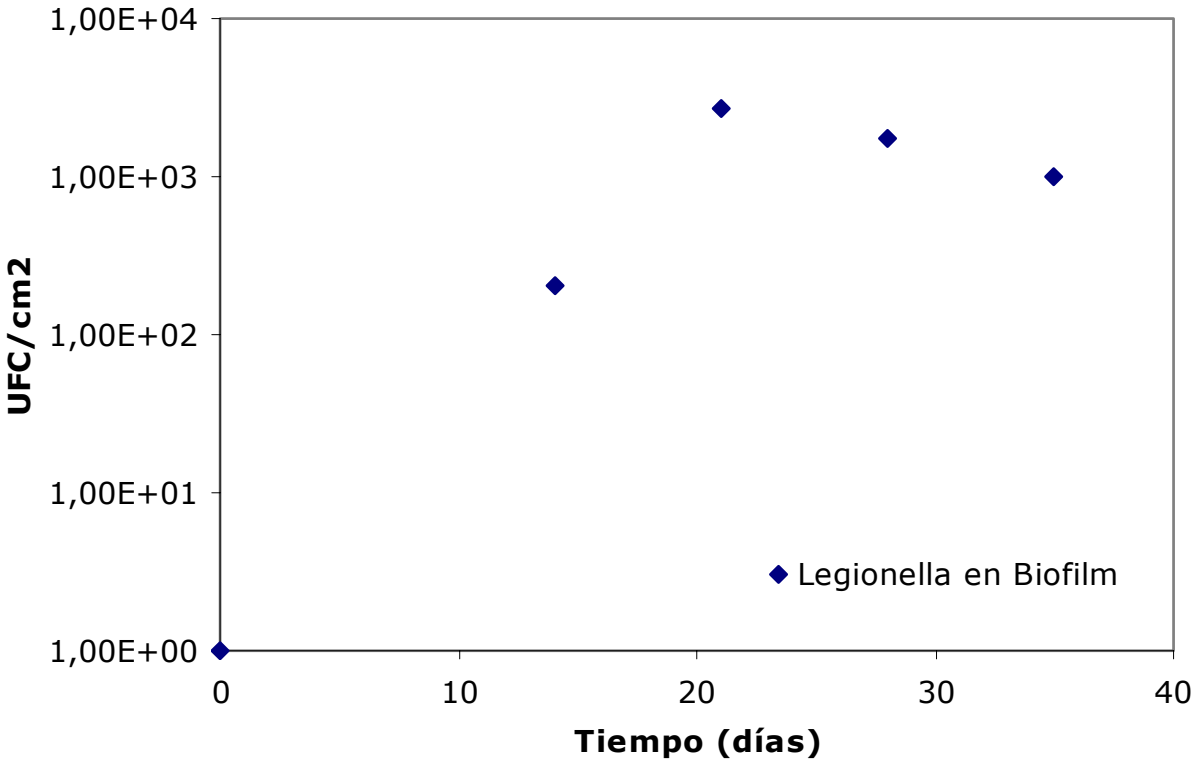


El sistema piloto tardó cerca de unos **20 días en obtener el máximo de biomasa de biofilm** con niveles de $1 \cdot 10^5$ UFC/cm^2.

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

COLONIZACIÓN DEL SISTEMA PILOTO CRESCA

Legionella pneumophila



Patrón de colonización similar al mostrado por las aerobias totales, con un máximo a los 20 días ($3 \cdot 10^4$ UFC/cm^2), con una ligera disminución entre los 20 y los 40 días.

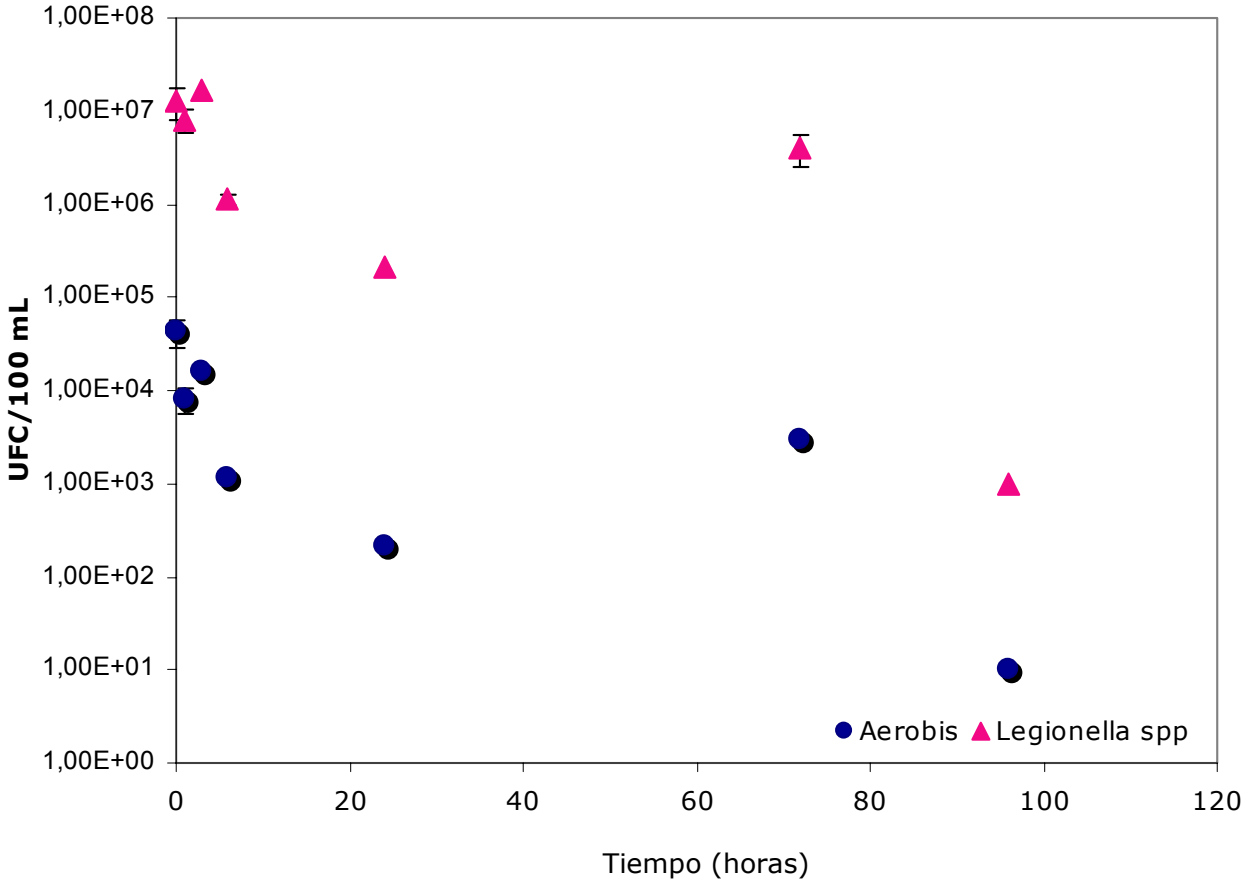
DESINFECCIÓN DEL SISTEMA PILOTO

Luego de colonizar el sistema piloto, se evaluó la **eficiencia de un biocida frente a *Legionella pneumophila***.

- Metodología:
  - Biocida utilizado: **cloro** en pastilla (Millipore), concentración **5 ppm** (Kim et al., 2002).
  - Muestreo y análisis de agua:
    - Neutralización con tiosulfato de sodio.
    - Determinación de aerobias totales a 22 ºC /72 hrs.
    - *Legionella* spp. por cultivo, en agua y en biofilm.

DESINFECCIÓN DEL SISTEMA PILOTO

Recuento en placas – Aerobios totales y *Legionella* spp.

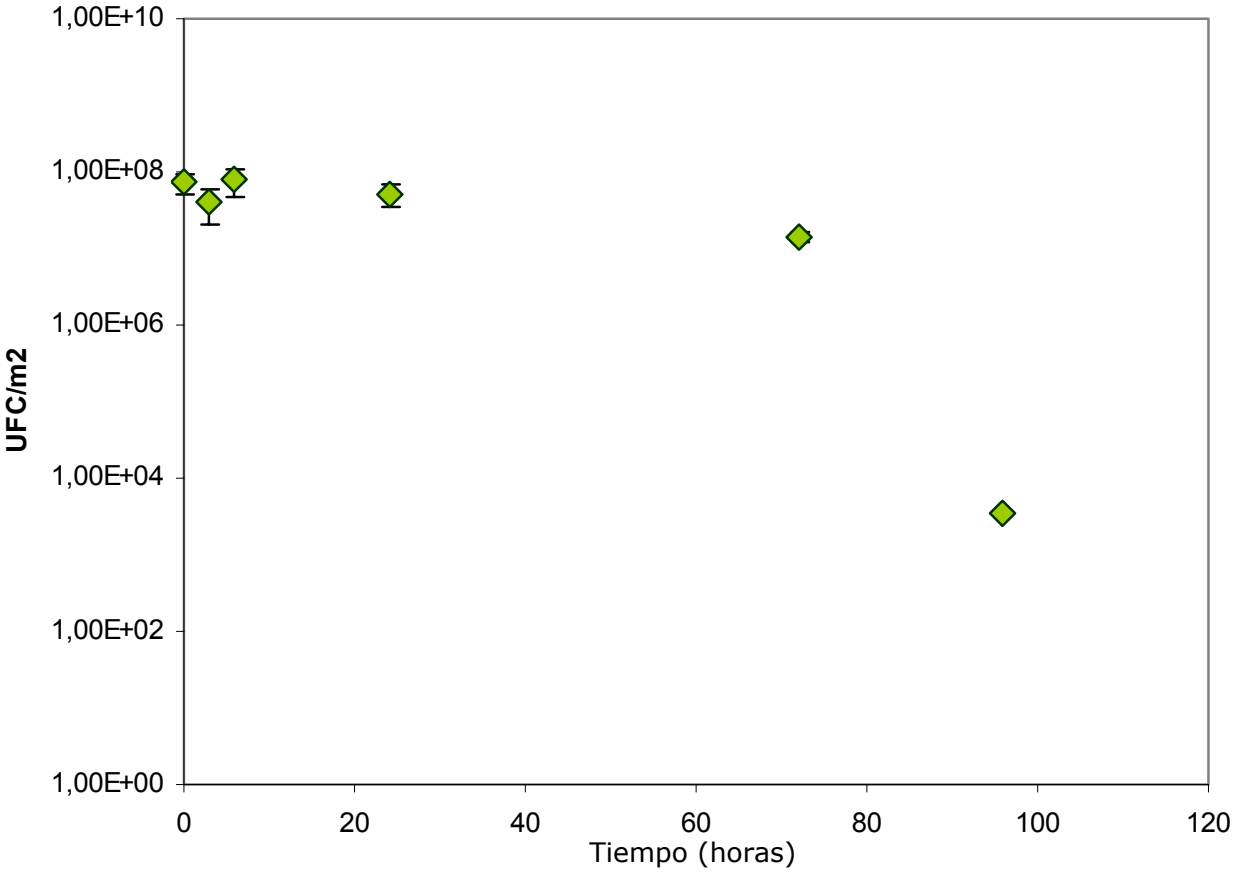


Después de 96 horas de dosificación continua con 5 ppm de Cl_2, la carga microbiana disminuye aproximadamente 4 unidades logarítmicas.

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

DESINFECCIÓN DEL SISTEMA PILOTO

***Legionella* spp. (biofilm) PCR en tiempo real – Cloración 5 ppm**



A las 96 horas los valore de *Legionella* en el biofilm son menores de $1x10^3$ UFC/m2

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

COLONIZACIÓN DEL SIST. PILOTO CON AGUA REGENERADA

- **Limpieza del sistema piloto: shock de cloro, cambios de filtro y relleno.**
- **Recogida de agua de salida del tratamiento con UV de la EDAR de Blanes.**
- **Evaluación de la colonización del sistema piloto con desinfección por cloro in situ (1,5 y 5 ppm).**
- **Monitoreo parámetros fisicoquímicos y microbiológicos: aerobios totales (22ºC, ISO 6222) y *Legionella* spp. (ISO 11731).**

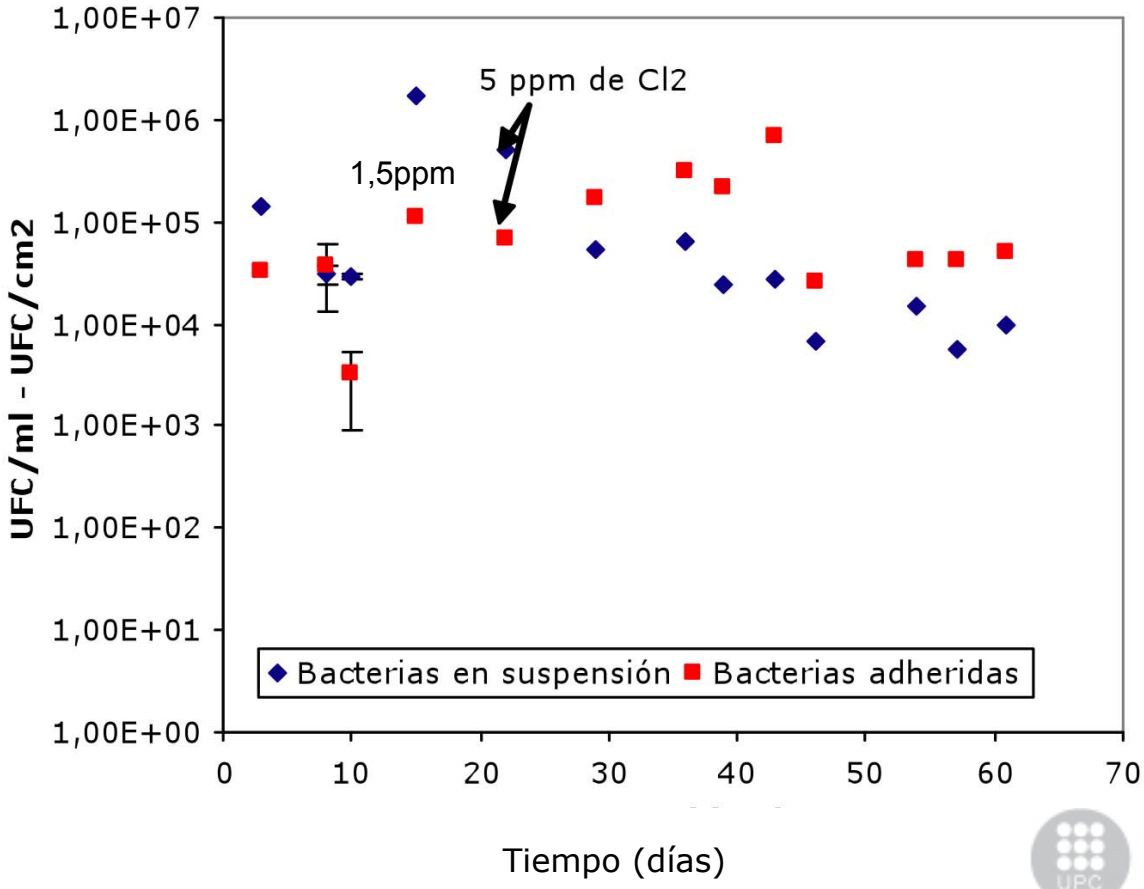
COLONIZACIÓN DEL SIST. PILOTO CON AGUA REGENERADA

Caracterización inicial del agua regenerada

Parámetros	Resultados
pH	8,35
Conductividad (µS/cm^2)	1276
E.coli	<1 UFC/100 ml
Coliformes totales	<1 UFC/100 ml
Enterococcus intestinalis	<1 UFC/100 ml
Aerobios totales (22ºC)	1,4 x 10^5 UFC/ml
Legionella spp.	3,7 x 10^1 UFC/ml
Legionella pneumophila por PCR en tiempo real	Positivo

COLONIZACIÓN DEL SIST. PILOTO CON AGUA REGENERADA

Colonización agua EDAR (UV) y desinfección in situ

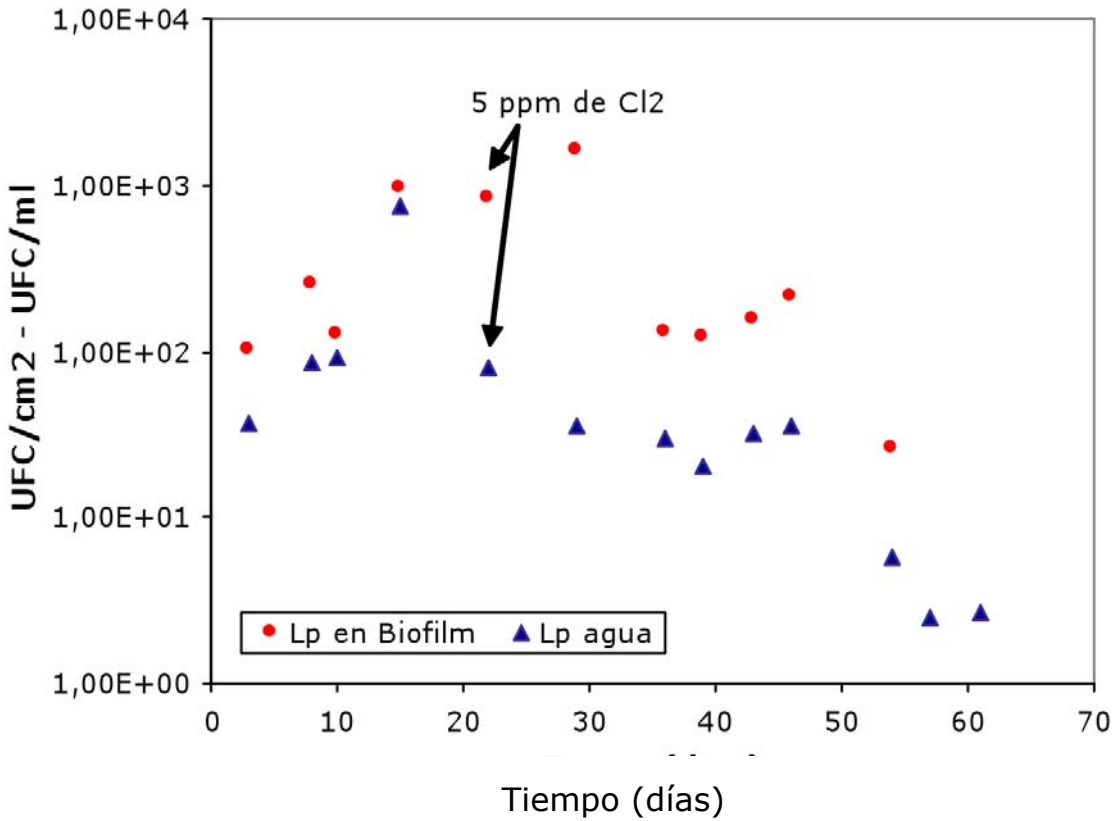


Aerobios totales

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

COLONIZACIÓN DEL SIST. PILOTO CON AGUA REGENERADA

Colonización agua EDAR (UV) y desinfección in situ



Legionella pneumophil

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

RESUMEN DE RESULTADOS

•La cloración in situ con una concentración de 1.5 ppm de cloro no afecta la colonización del sistema en aerobios totales y *Legionella* spp.

•Se observa que la aplicación de 5 ppm de **cloro provoca una disminución** de la carga bacteriana estudiada (*Legionella pneumophila* y microorganismos aerobios totales) **en los sucesivos días** de tratamiento.

• Un sistema colonizado por *Legionella* se puede desinfectar con independencia del origen del agua.

COLONIZACIÓN DEL SIST. PILOTO CON AGUA REGENERADA

- **Limpieza del sistema piloto: shock de cloro, cambios de filtro y relleno.**

- **Recogida de agua de salida del tratamiento terciario (UV) de la EDAR de Blanes.**

- **Evaluación de la colonización del sistema piloto con desinfección por UV y peróxido de hidrógeno in situ y desinfección por UV en el almacenamiento.**

- **Monitoreo parámetros fisicoquímicos y microbiológicos: aerobios totales (22ºC, ISO 6222) y *Legionella* spp. (ISO 11731).**

COLONIZACIÓN DEL SIST. PILOTO CON AGUA REGENERADA

CONDICIONES EXPERIMENTALES		
Parámetros	Depósito de almacenamiento	Depósito del sist. piloto
UVC (mW/cm^2)	0.10	0.16
Tiempo de contacto (h)	2	2
Dosis de H_2O_2 (ppm)	-	150*
Frecuencia de desinfección (h)	24	24
Frecuencia semanal de muestreo	3	3

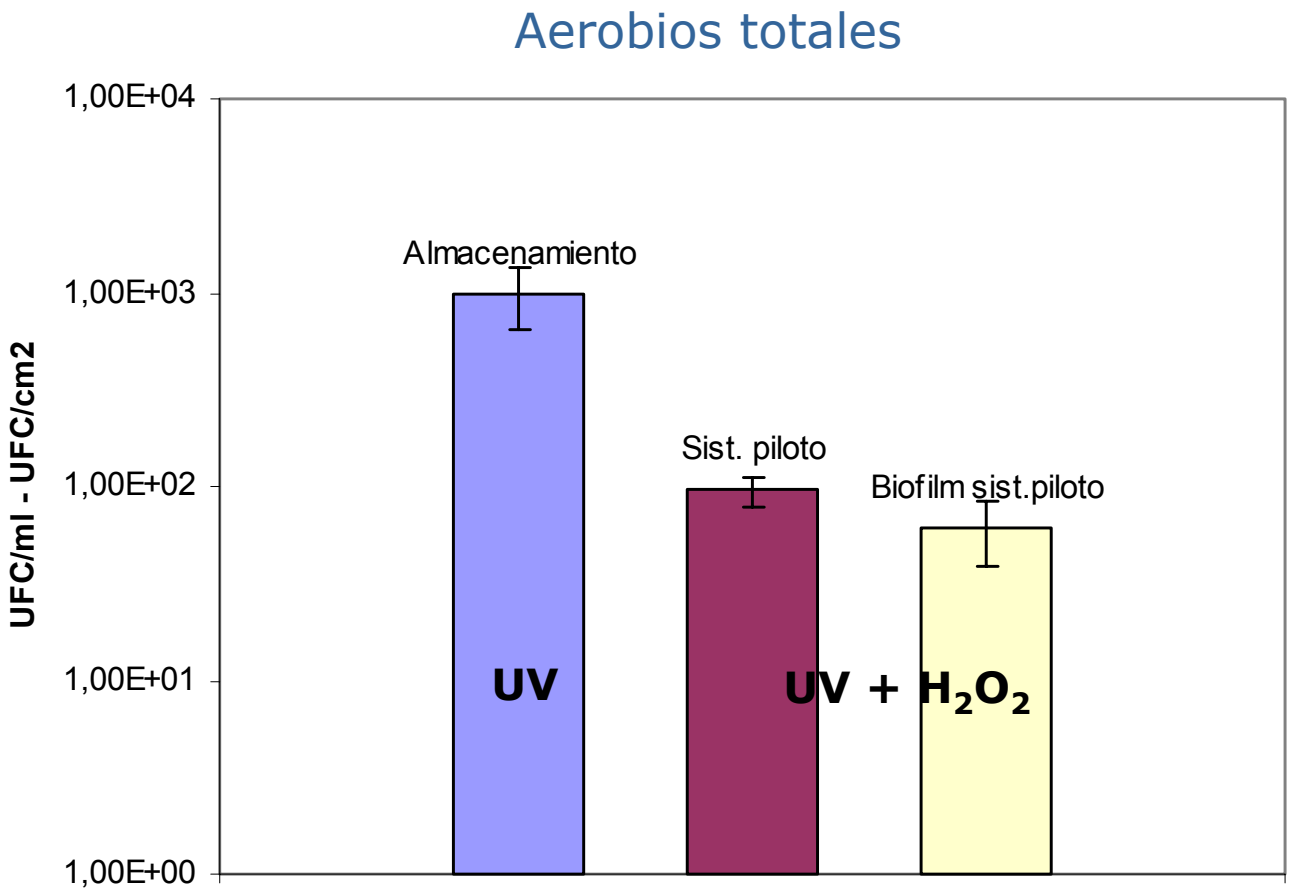
*Dosificación: cuatro dosis de 10 ml cada 10 minutos.

COLONIZACIÓN DEL SIST. PILOTO CON AGUA REGENERADA

Caracterización inicial del agua regenerada

Parámetros	Resultados
pH	8,07
Conductividad (µS/cm^2)	1648,5
E.coli	<1 UFC/100 ml
Coliformes totales	<1 UFC/100 ml
Enterococcus intestinalis	<1 UFC/100 ml
Aerobios totales (22ºC)	<100 UFC/ml
Legionella spp.	<20 UFC/l
Legionella pneumophila por PCR en tiempo real	No se detecta

COLONIZACIÓN DEL SIST. PILOTO CON AGUA REGENERADA



COLONIZACIÓN DEL SIST. PILOTO CON AGUA REGENERADA

- *E. Coli* < 1 UFC/100 ml
- Coliformes totales < 1 UFC/100 ml
- *Enterococcus intestinalis* < 1UFC/100 ml
- *Legionella* spp. (cel. En suspensión y adheridas) < 10 UFC/ L
- *Legionella pneumophila* por PCR en tiempo real : no se detecta

RESUMEN DE RESULTADOS

•La carga microbiana, expresada como aerobios totales, se mantuvo en un orden de entre 2 y 3 unidades logarítmicas (cloración 4-5).

• No se detectó la presencia de *Legionella* spp. en ningún muestreo a lo largo de la experiencia.

•En el caso del biofilm la colonización se mantuvo aproximadamente en un orden de 2 unidades logarítmicas, mientras que para el ensayo de cloración el orden fue de 5 unidades logarítmicas.

• La combinación entre radiación UV y peróxido de hidrógeno es potencialmente efectiva frente a *Legionella.* Se deben realizar más estudios que confirmen los resultados obtenidos y permitan optimizar la concentración de los desinfectantes.

•Los resultados resaltan la importancia de la desinfección en la etapa de almacenamiento.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES

- En cuanto al riesgo sanitario en la reutilización de aguas residuales regeneradas utilizadas en instalaciones industriales de refrigeración según el origen del agua:
  - A escala piloto **no se han observado diferencias estadísticamente significativas en la colonización de los pilotos alimentados con agua de pozo y agua regenerada con tratamiento de desinfección.**
  - El sistema piloto alimentado con **agua de salida de filtración muestra una mayor carga microbiana,** tanto para aerobias totales, como por *Legionella pneumophila*; además de una alta carga en coliformes totales y *E.coli.*

CONCLUSIONES

- De los ensayos realizados y teniendo en cuenta las tecnologías disponibles actualmente para el tratamiento de aguas regeneradas, se desprende la **importancia de implementar tratamientos terciarios que incluyan desinfección en las EDARs, si el objetivo es la reutilización.**

- Cabe destacar los **problemas y limitaciones existentes en la determinación de *Legionella* spp. por métodos microbiológicos convencionales**, y el **importante papel** que pueden jugar las tecnologías moleculares como la **PCR en tiempo real en el seguimiento y valoración del riesgo sanitario.**

CONCLUSIONES

- De cara a la reutilización planificada del agua se debe prestar especial atención a la **calidad del agua en el punto de aplicación**; la cuál viene dada principalmente por:

  - la **variabilidad de la calidad del agua regenerada** entregada por la EDAR.

  - por las **condiciones de almacenamiento en el punto de uso.**

Es muy importante el estudio y aplicación de **estrategias de almacenamiento que estén asociadas a un buen tratamiento de desinfección** y fundamentadas en un plan de autocontrol.

AGRADECIMIENTOS

Agència Catalana de l'Aigua – Consell de Cambres

Consorci de la Costa Brava (Lluis Sala; Gabriel Delgado; Montse Soler y Operarios EDAR-Blanes)

Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu (Beca FI).

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN!

UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA