



DOCUMENTO 3

LICITACIÓN MEDIANTE PROCEDIMIENTO ABIERTO SIMPLIFICADO DEL
“SERVICIO DE ESTUDIO DE BIOINDICACIÓN DE LOS FANGOS ACTIVOS DE LA
EDAR DE GALINDO”

PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS PARTICULARES



1. OBJETO

El objeto del contrato es el estudio de Bioindicación de los fangos activos de la EDAR de Galindo que consiste en el análisis microscópico de protozoos, metazoos y microorganismos filamentosos, y el análisis de microbiota mediante secuenciación masiva o metagenética de las comunidades microbiológicas.

2. TRABAJOS A REALIZAR PARA LA EJECUCIÓN DEL CONTRATO

El trabajo a realizar por la Asistencia Técnica consistirá en el recuento del fango activo de las seis balsas de la EDAR de Galindo y el análisis de microbiota, mediante secuenciación masiva o metagenética de las comunidades microbiológicas, de cuatro balsas, y que se distribuirá de la siguiente manera:

2.1 RECUESTO COMPLETO DEL FANGO ACTIVO

Recuento completo del fango activo por microscopía, con periodicidad semanal, en la muestra de una balsa de aireación y que contabilizará los siguientes parámetros:

- Protozoos ciliados.
- Protozoos flagelados.
- Protozoos ameboides.
- Metazoos.
- Microorganismos filamentosos.

Técnicas a utilizar:

- Recuento en vivo utilizando microscopia de campo claro contraste de fases y técnicas especiales para identificación de taxones si es necesario (tinción vital con Verde de metil-acético, test de tinta china, tinción de Gram, tinción de Neisser).
- Recuento de microorganismos filamentosos en base a la técnica para el recuento de bacterias filamentosas publicada por H. Salvadó (1990,2016).
- Recuento de protozoos ciliados, flagelados y ameboides, y recuento de micrometazoos, así como cálculo de Índice biótico del fango según P. Madoni (1994).
- Microfotografías en campo claro y/o contraste de fases.



Asimismo, se informará de las siguientes propiedades del fango activo:

- Aspecto del fango
- Características del flóculo
- Índice del fango.
- Índice biótico del fango.

En casos de problemas de bulking o foaming en las balsas se solicitará de manera puntual recuentos completos para las balsas afectadas y/o análisis de bioindicación.

El Laboratorio contratado, transcurridos dos días laborables desde la recepción de las muestras, enviará por email un resumen del recuento de filamentosas, y a los siete días laborables un informe.

2.2 RECuento DE MICROORGANISMOS FILAMENTOSOS DEL FANGO ACTIVO

Recuentos de microorganismos filamentosos del fango activo por microscopía, con periodicidad semanal, correspondientes a las muestras de cinco balsas de aireación que contabilizará los filamentos existentes, expresando su concentración en m/ml.

En casos de problemas de foaming en las balsas se solicitará el análisis de espumas. En casos de disfunciones graves, se solicitará un análisis de bioindicación que incluya diagnóstico del estado del proceso de depuración y pautas correctivas.

El Laboratorio contratado, transcurridos dos días laborables desde la recepción de las muestras, enviará por email un resumen del recuento de filamentosas y a los siete días laborables un informe.

2.3 ANÁLISIS DE MICROBIOTA MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA O METAGENÉTICA

Caracterización de las comunidades de los fangos activos mediante técnicas NGS con los siguientes objetivos:

- Comparativa con los resultados obtenidos mediante las técnicas microscópicas.
- Estudio sobre la viabilidad de la técnica e implantación como método de control rutinario adicional.
- Evaluar los resultados de la bioindicación para definir indicadores previsores de las modificaciones en el reactor biológico, que permita generar un protocolo de prevención y corrección, para optimizar y recuperar el sistema biológico en caso de disfunciones en el mismo.
- Efecto de la intrusión salina en el reactor biológico.

La planificación del estudio se realizará en dos fases:



FASE 1

En esta primera fase el objetivo principal será identificar y cuantificar las dos especies de interés *Microthrix calida* y *parvicella* y disponer de datos de secuenciación masiva.

- Planificación del muestreo:
 - Muestra quincenal para la técnica de qPCR aplicada a *Microthrix calida* y *parvicella* de 4 líneas de fangos, con la entrega de resultados en 48 horas desde la recogida de la muestra.
 - Muestra quincenal para las técnicas de gen 16S y metagenética, coincidente con la línea de fango a la que se le realice el recuento taxonómico completo. Se conserva la muestra a -80°C una vez extraído el DNA para la FASE 2.
- Extracción del DNA a todas las muestras.
- Análisis qPCR: Un total de 576 análisis (*Microthrix calida* y *parvicella*)

FASE 1												
MESES :	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º
TOMA DE MUESTRA EDAR GALINDO (Quincenal)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
EXTRACCIÓN DNA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
qPCR * : Microthrix calida Microthrix parvicella	8 x 3 (x2)	8 x 3 (x2)	8 x 3 (x2)	8 x 3 (x2)	8 x 3 (x2)	8 x 3 (x2)	8 x 3 (x2)	8 x 3 (x2)	8 x 3 (x2)	8 x 3 (x2)	8 x 3 (x2)	8 x 3 (x2)
INFORME DE RESULTADOS	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

*** Cuantificación de las especies *Microthrix calida* y *Microthrix parvicella* en 4 líneas de fangos activos. De cada especie se realizarán 3 análisis (submuestras o réplica) lo que hace un total de 576 análisis en la FASE 1.**

FASE 2

- qPCR GEN 16S: Se cuantificará el gen 16S mediante qPCR de las muestras recogidas dos veces al mes, en las muestras coincidentes con el análisis metagenético.

Análisis metagenético (Secuenciación masiva): Se realizará un análisis metagenético de la comunidad bacteriana de las muestras coincidentes con los recuentos taxonómicos completos recogidos quincenalmente en la FASE 1.

- Análisis de datos.



- Comparativa entre los métodos taxonómicos por microscopía y los métodos genéticos.
 - Correlación con las variables fisicoquímicas registradas por el CABB a la presencia de especies de interés.
 - Tratado estadístico de los datos.
- Informe Técnico detallado que contenga la siguiente información:
 - Metodología detallada.
 - Representación gráfica de los resultados e interpretación desarrollada de los mismos.
 - Interpretaciones técnicas de los resultados (discusión y conclusiones)
 - Especial desarrollo sobre la viabilidad de la técnica, la situación actual, retos y hoja de ruta a seguir para implantación como método de control rutinario adicional.

FASE 2												
MESES:		1º	2º	3º	4º	5º	6º					
a)	qPCR * : 16 S	24										
b)	ANÁLISIS METAGENÉTICO (SECUENCIACIÓN MASIVA)	24										
c)	COMPARATIVA TAXONOMÍA		X									
d)	ESTADÍSTICA Y BIOINFORMÁTICA		X	X	X							
e)	INFORME TÉCNICO					X	X					

* Cuantificación del gen 16S mediante qPCR de las muestras recogidas dos veces al mes y coincidentes con el análisis metagenético.

Galindo, 17 de mayo de 2021

El Responsable del Contrato

La Subdirectora de Laboratorio

Fdo.: Francisco Javier Hernani Zabalo

Fdo.: Elena Aspichueta López

