



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Utilidad de los bacteriófagos y otros indicadores de contaminación fecal en muestras ambientales sólidas

Julia Martín Díaz



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Departamento de Genética, Microbiología y Estadística
Facultad de Biología
Universitat de Barcelona

**Utilidad de los bacteriófagos y otros indicadores de contaminación
fecal en muestras ambientales sólidas**

Memoria presentada por Julia Martín Díaz para optar al grado de doctora por la
Universitat de Barcelona

Programa de doctorado EEES: Microbiología Ambiental y Biotecnología

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Francisco Lucena Gutiérrez en el Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Facultad de Biología de la Universitat de Barcelona.

El director y tutor

La doctoranda

Dr. Francisco Lucena Gutiérrez

Julia Martín Díaz

Barcelona, junio de 2017

Agradecimientos

Barcelona, junio de 2017

Gracias.

Sólo es una palabra, pero significa mucho, muchísimo... Cuando aparecí por el departamento con la idea de hacer el prácticum del máster era imposible que se me pasara por la cabeza todo lo que esa decisión iba a traer consigo y todas las grandes personas que entrarían en mi vida a partir de ese momento. Curso 2011-2012. Ha llovido desde entonces... sí, unas cuantas veces (con unos cuantos muestreos incluidos). Otras personas ya llevabais más tiempo conmigo por aquella época, algunos incluso toda mi vida.

Lo reconozco, esta parte de la tesis es la que más me gusta estar escribiendo. Vale, la cerveza bien fría y los maicitos que me acompañan ahora mismo ayudan... pero por sí solos no serían suficientes para conseguir que me vuelva a sentar por enésima vez en esta maldita silla que ha estado a punto de convertirse en una extensión más de mi cuerpo... No, lo he hecho porque tengo unas ganas enormes de dejar esto por escrito. Así que lo voy a decir otra vez: **gracias**...

... a **Francisco**, por haber aceptado dirigir esta tesis y por la gran libertad que me has dado siempre; por enseñarme la forma de unirlo todo en uno y a “pensar en los semáforos”; por todos los muestreos al río y a la depuradora; por tu buen humor y por ser siempre tan escandalosamente sincero y compartirnos tus ideas de pirómano; por tu mítica frase súper motivadora de “que no me trabajas nada”; por las horas y horas de charlas sobre cualquier cosa en el laboratorio; porque a ver si ahora consigo convencerte de ¡que no soy de Leóoon!

... al resto de seniors y veteranos del grupo MARS: a **Anicet**, por toda tu ayuda con esa enorme cantidad de papeles que nos hacen rellenar para cada paso que se da durante la FPI, por tus buenos consejos con la escritura de artículos, por ser siempre tan amable y por tomarte tan bien que usara tu cara para ponerla dentro del “buscando a Wally”; a **Maite**, por ser tan cercana y todo un ejemplo de eficiencia, por encontrar siempre la forma de facilitarnos las cosas a los más jóvenes y por apuntarte a todos los cafés, calçotadas, cenas y salidas variadas; a **Joan**, por estar siempre dispuesto a compartirnos tu experiencia y tu excelencia, escucharte hablar de ciencia siempre es inspirador; a **Cristina**, porque fuiste la primera que me dijo que tenía la beca, por hacer de reviewer oficial de mis artículos, por tus buenos consejos sobre el Climagua (respiremos, ¡ya se ha acabado!) y por todas las veces que me has ayudado; a **Eli**, por acogerme en el 11, por tu ayuda con los *Bacteroides*, la real time y los “decay rates”, ¿te has planteado alguna vez hacer la carrera militar? podrías pedir que te destinaran a la Antártida cada poco... jejeje; a **Javi Méndez**, por tu ayuda con la estadística y por saludar siempre tan amablemente, por cierto, no te asustes cuando nos veas, porque pronto será obligatorio en el grupo MARS llevar pintalabios “discreto”; a **Lorena**, ¡te deseo lo mejor!

Agradecimientos

... al **IdRA**, Institut de Recerca de l'Aigua de la UB, por su ayuda para la impresión de esta tesis.

... a todos los compañeros de la **Secció Microbiologia, Virologia i Biotecnologia**, a los que nombraré y a los que se me olvidará mencionar.

... a las Pedrochas y el Chicote de **Secretaría**, gestor@s de papeles y grandes animador@s de carnavales; a **Rosario**, por toda tu ayuda cuando empezaba con las prácticas; a **Beatriz** (con todas las letras), porque por fin dejaré de asustarte cada vez que entro con papeles en la mano; a **Manolo**, por toda tu paciencia con la entrega de tesis, este junio tenemos que hacerte un monumento; a **Susana**, por recibirme siempre con una sonrisa; a **Mònica**, por conseguirnos las neulas de Navidad.

... a todos los que formáis la **Fase I**, en especial a **Montse, Anna, Susana, Sara y Oscar, Noemí, Youseff, Lily y Tania**; a **Aurora**, por nuestros comienzos en el máster, mucho ánimo con lo que queda.

... a la **Fase II**, los que quedamos “escondidos” al doblar la esquina donde se encuentra el cuadro de los dos hombres desnudos, cuya historia nunca conoceremos verdaderamente.

... a los del **7**, a **Maite**, porque siempre saluda; a **Elena**, porque me encanta tu humor sarcástico; a los que han llegado hace menos tiempo y no conozco tanto.

... a los del **8**, por todos sus consejos qPCRianos; a **Martus**, por ser tan maja; a **Laura** y a **Sílvia Cervero**; a **Persi**, por ser el jefe de la resistencia Vircontiana contra el complot organizado por MARS; a **Ayalke**, el negro que siempre está dispuesto a tomar una cerveza; a **Eloy, Carmina, Edu, Yexenia, David, Alberto, Natalia, Sandra** y **Eva**, por ser tan buenos vecinos.

... a todos los que habéis estado en el **9**, ese pequeño lugar de olores indescriptibles, música dark/gótica, temperaturas abrasadoras, extrañas vibraciones procedentes de la centrífuga del 10 y gritos permanentes... ¡¡gran sitio!!; a **Carlos y Enric**, os deseo lo mejor; a **Tumi**, porque me encantó enseñarte Barcelona; a **Sergi, Lina, Dolly, Pilar, Angélica, Sihem y Mariem**; y a los que estáis ahora, a **Dani** (el salmantino) que sepas que te hemos prestado al 10, pero eres del 9 y a **Judit**, vuestro plan de traerlos a **Robert** a MARS está casi completado; a **Anna**, porque ya sabes la importancia del kahoot en la qPCR; a **Jennifer**, por la dosis de café colombiano; a **Laia, Patricia y Carla**; a los que estabais cuando llegué: **Maru** monguita a la que no le gusta el trago y **Arnau**, fue un placer compartir los primeros años con vosotros.

... a **Míriam Agulló**, por ser mi “mentor” aquí y allá, además de una científica admirable, por enseñarme a dar los primeros pasitos en el mundo de la ciencia; por recogerme en aquel aeropuerto después de 23 horas de viaje y por pensar que en el PC2 lab necesitaban un bunsen que no fuera de juguete, llegó un pelín tarde, sí... pero ¡piensa que hemos salvado un montón de vidas!

... a **Miriam Pascual**, porque cuando nos encontramos aquel equipo de baloncesto con un cerdo de mascota nos pareció un buen lugar para hacer las prácticas; por empezar con el Climagua y porque el futuro de los Lucenas está en tus manos, no tardando mucho estaremos presenciando tu tesis, ¡ánimo!

... a nuestra **Ángela** María, Ange, Angelita, Angelines, mujer curranta; por ostentar el récord de “única persona que consiguió una limpieza general en el 9”; porque has conseguido que te echemos mucho de menos, pero Las Marías nos volveremos a ver algún día en tu querida Colombia.

... a **Raquel Díaz**, Raquelilla, porque ha sido maravilloso verte crecer y convertirte en la gran creadora de realidades que siempre has sido, aunque Ramira intentara esconderlo; por perdonarnos por el secuestro del escape room, porque eres una pedazo de profesional y una grandísima persona; a **Sergi**, por robarme a Óscar de vez en cuando y cuidarlo tan bien; por traerte la camiseta de Goku a las II Jornadas del IdRA, un detallazo.

... a mi **Rachiii**, por ser tan maravillosamente diferente a cualquier otra persona; por cuidarme desde el primer momento; porque tus irremediables ganas de enterarte de todo te hacen ser tan buena investigadora; por autoimponerte el papel de mami de todos los componentes del grupo, pasados, presentes y futuros; porque nadie podrá contigo, ni siquiera un autobús; ¡por tu revisión de la tesis!; porque hacemos un buen equipo de creación de álbumes Hoffmann, reconócelo; porque ¡¡te nos casaaaas!!; a **Sayuri** y a **Garu**, sois del 9, lo sabéis, sin vosotros nada sería como es.

... a la **Dra. Sala**, Lauuu, por introducirme en el mundo de la multitarea, lianta, que por tu culpa me ha dado por irme por ahí a hacer fotos y ponerme a organizar kahoots a 15 días de entregar la tesis; por los millones de anécdotas y cafés que hemos compartido; porque, aunque yo sea de la Castilla profunda y tú de la Catalunya profunda (que me perdone Almodis por llamar así a la ilustre villa de Cervera), tenemos una idea muy parecida sobre cómo funcionan las cosas y eso hace que hablar contigo y pedirte consejo sea tan fácil; por todas las veces que me has ayudado a luchar contra el Monstruo de las Mañanas; porque, hablemos claro, ha sido genial compartir estos años de tesis contigo.

... al Monfoebo de los coj... porque a ti te debo media tesis, tienes cara de simpático.

... a los que estáis y estuvisteis en el **10**; a **Carmen**, a **Ferrán** y a **Ana Melgarejo**, por encajar tan bien en el grupo; al trío **Anna**, **Marta Gómez** y **Marta Colomer**, porque fue divertidísimo preparar vuestros vídeos de tesis y para que Marta siga volviendo de vez en cuando a hacernos visitillas; a **Álex**, el Señor de las Bromas, porque se podría escribir un libro de anécdotas sólo con los grandes momentos para recordar que has dejado en el departamento y por ser tan buena gente; a **Lirain** y a **Olatz**.

... a **Aiora**, mujer eficiente de risa inconfundible, por ser la gran conseguidora de pedidos, la que hace que cualquier experimento se pueda llevar a cabo a tiempo; por todos los momentos fotográficos compartidos y por los que nos quedan por compartir; menos mal que esta tesis se acaba ya... una montaña más mientras yo estoy escribiendo y ¡me matas de envidia!

Agradecimientos

... a **Pablo**, el profesor Quirós, el caballero más caballeroso de la Historia; por todas las veces que has hecho la pregunta mágica: “¿café?”; porque siempre tienes buenas palabras para todos; por lo bien que lo vamos a pasar en Valencia y para que te vayas de estancia de una vez, ¡que me estás poniendo nerviosa!

... a **Maryury**, por tener las cosas tan claras, por ser “muy amable” y toda una curranta, por contarme tu historia del brownie; ya te queda poco para ser doctora, mucho ánimoo; a **Jonás**, primero fue la taza, ahora ya tienes el carnet de MARS preparado para que pases a recogerlo cuando quieras.

... a **William**, por los buenos recuerdos; por los trabajos del máster y las excursiones del principio y por animarte a visitar mi tierra; por los kilos y kilos de sedimento muestreados y los fines de semana regando bandejas y cuidando bolsas de diálisis como si fueran bebés; por tantas comidas, cenas, salidas y eventos varios compartidos.

... a **Sergi Astals** y a **Miriam Peces**, por las cenas de hummus y clostridios; por ese récord de 8 koalas avistados y por adoptar a la pequeña orquídea; por las noches de Tronos y helado; por la maldita tortura que supone escribir un artículo con Sergi... juas, juas, he aprendido un montón, lo sabes; porque sois grandes científicos y llegaréis muy lejos, seguro que de aquí a unos años mi paisano JL os contrata para su canal.

... a **Maria Ruiz-Hernando**, Maria kimiks UB, ingeniera a domicilio, por ser “esta mujer” que ha venido a hacer unas *E. colis* que estarán listas antes de San Juan (si llego a saber lo que iba a durar de verdad salgo corriendo); por enseñarme con tanto entusiasmo al gato procesionando encima de una tortuga; por todo lo que he aprendido de ti; por tu sangre cazurra y tu espíritu de profe; porque ¡¡ya está!!, desde ahora quedo oficialmente liberada para que quedemos donde y cuando quieras.

... a **los que ya estabais conmigo** desde antes, por ayudarme a llegar y por apoyarme durante.

... a **Sandra Sagredo** y a **Bea Lázaro**, inevitablemente vais juntas en estos agradecimientos, espero que me lo perdonéis; por creer en mí cuando ni siquiera yo lo hacía; por vuestra amistad de verdad, porque aunque pase el tiempo volver a veros siempre es como si no hubiera pasado.

... a **Ana**, sencillamente por estar siempre ahí.

... a mis cuatro amores, **Ignacio, Carmen, Bernardo** y **Juan**, porque os quiero y porque sé que me queréis; porque si empezara a agradecerlos no acabaría nunca.

... a **Óscar**, ese regalo que me encontré un día en el lago Truchillas; por ser mi economista preferido, mi chico eficiente y pragmático; por hacer que los tupperes y las ensaladas “aparecieran” mágicamente en el frigo; cinco años viviendo de bocadillos no habrían sido tan buenos; por revisarme la tesis, ¡uy! lamentablemente al final se me han colado cuatro espacios en blanco justo aquí... he puesto los códigos para que los veas; porque te quiero y porque la vida a tu lado es más fácil.

Resumen

La presente investigación explora la utilidad de los bacteriófagos y otros microorganismos indicadores de la contaminación fecal en relación a dos grandes tipos de sólidos relevantes en el ciclo del agua, los lodos de depuradora (y biosólidos derivados) y los sedimentos fluviales. Por otro lado, se lleva a cabo también el estudio del comportamiento de enterovirus y otros patógenos de referencia en el mismo ámbito. Ambos tipos de sólidos poseen la potencialidad de actuar como reservorios de microorganismos patógenos y de dispersar esos patógenos en el medio, los lodos a través de su aplicación como fertilizantes en agricultura y los sedimentos a través de su estrecho contacto con la columna de agua del río, provocando así los consiguientes riesgos para la salud humana, animal y ambiental y atentando contra el principio de One Health. La tesis está dividida en tres bloques y el trabajo experimental consta de seis artículos científicos.

En el primer bloque se valora la capacidad de varios microorganismos para actuar como indicadores de la higienización producida durante el tratamiento de los lodos de depuradora. *E. coli* y las esporas de clostridios reductores de sulfito no permitieron una correcta valoración de los tratamientos debido a sus bajas concentraciones iniciales en el primer caso y a los aumentos de las mismas producidos por algunos tratamientos, en el segundo de los casos. En cambio, los colifagos somáticos mostraron su utilidad para indicar la efectividad de los tratamientos estudiados y el comportamiento de enterovirus a lo largo de dichos procesos, por lo que fueron propuestos para ser incluidos en las normativas que regulan la aplicación de lodos y biosólidos como fertilizantes en agricultura.

Las investigaciones que conforman el segundo bloque se centran en la evaluación del comportamiento y las capacidades de varios indicadores de la contaminación fecal, patógenos y marcadores de MST en los sedimentos de un río típicamente mediterráneo, bajo condiciones de fuertes lluvias alternadas con periodos de sequía. Se generaron datos microbiológicos de interés para su inclusión en programas sobre modelización de cuencas, pudiendo ser útiles así para la mejora de la gestión de los recursos hídricos de cara a futuros escenarios afectados por el cambio climático. La carga microbiológica fecal tanto de los sedimentos como de la columna de agua aumentó justo después de cada evento de lluvias, reflejando dos posibles aportes de contaminación: uno reciente en el tiempo, proveniente de la sobrecarga de los sistemas unitarios de alcantarillado, las EDARs y otras fuentes y otro más extendido en el tiempo, debido a la resuspensión de los microorganismos presentes en los sedimentos. Las altas concentraciones de indicadores y patógenos encontradas en los sedimentos fluviales alertaron sobre los peligros de su resuspensión en la columna de agua. La generación de microcosmos a escala de laboratorio permitió cuantificar las inactivaciones sufridas por cada indicador estudiado y valorar los distintos patrones de sedimentación y resuspensión.

Resumen

En el último bloque se realiza la valoración de distintas metodologías de extracción de enterovirus en muestras ambientales sólidas para su posterior detección mediante RT-qPCR, atendiendo a sus capacidades de recuperación de partículas víricas y de eliminación de sustancias inhibidoras. De esta forma, se desarrolló un método de extracción adaptable a distintos tipos de muestras y concentraciones y se llevó a cabo la revisión, adaptación y aplicación de una técnica de RT-qPCR para enterovirus.

Índice de contenidos

| | |
|---|----|
| Agradecimientos..... | 3 |
| Resumen | 9 |
| Índice de contenidos | 11 |
| Listado de abreviaturas | 15 |
| Índice de tablas y figuras..... | 17 |
| 1. Introducción | 19 |
| 1.1. El agua y la vida..... | 21 |
| 1.2. Control de la calidad microbiológica del agua..... | 25 |
| 1.3. La relación de los microorganismos con los sólidos en el ciclo del agua..... | 28 |
| 1.4. Lodos de depuradora y biosólidos..... | 30 |
| 1.5. Sedimentos fluviales..... | 34 |
| 2. Objetivos..... | 39 |
| 3. Evaluación de la higienización de lodos de depuradora y biosólidos | 43 |
| 3. 1. Estrategias para el tratamiento de los lodos de depuradora | 45 |
| 3.2. La necesidad de higienización | 47 |
| 3.3. Indicadores de contaminación fecal y patógenos de referencia para valorar la higienización de lodos de depuradora..... | 50 |
| 3.4. Artículo 1: Efecto de los pretratamientos de ultrasonidos, térmico a baja temperatura y alcalino sobre la reología, higienización y potencial de biometanización del lodo secundario | 53 |
| 3.4.1. Resumen..... | 53 |
| 3.4.2. Informe sobre el factor de impacto | 57 |
| 3.4.3. Informe de participación | 57 |
| 3.5. Artículo 2: Los colifagos somáticos como indicadores de enterovirus en tratamientos de higienización de los lodos de depuradora | 71 |
| 3.5.1. Resumen..... | 71 |
| 3.5.2. Informe sobre el factor de impacto | 73 |
| 3.5.3. Informe de participación | 73 |
| 3.6. Artículo 3: Evaluación de la utilidad de las esporas de clostridios para valorar la higienización de lodos de depuradora..... | 83 |
| 3.6.1. Resumen..... | 83 |

| | |
|---|-----|
| 3.6.2. Informe sobre el factor de impacto | 85 |
| 3.6.3. Informe de participación | 85 |
| 4. Evaluación del comportamiento de indicadores y patógenos en los sedimentos fluviales | 95 |
| 4.1. El papel protector de los sedimentos | 97 |
| 4.2. Presencia de microorganismos fecales en los sedimentos fluviales..... | 99 |
| 4.3. Ríos mediterráneos, lluvias y resuspensión..... | 100 |
| 4.4. Indicadores de contaminación fecal y patógenos de referencia para valorar los riesgos microbiológicos asociados a la resuspensión de los sedimentos fluviales..... | 102 |
| 4.5. Artículo 4: Movilización de indicadores microbianos, marcadores de MST y patógenos después de eventos de lluvias..... | 104 |
| 4.5.1. Resumen..... | 104 |
| 4.5.2. Informe sobre el factor de impacto | 107 |
| 4.5.3. Informe de participación | 107 |
| 4.6. Artículo 5: Utilización de microcosmos para evaluar la persistencia y movilización de indicadores microbianos en sedimentos fluviales durante eventos de lluvias | 115 |
| 4.6.1. Resumen..... | 115 |
| 4.6.2. Informe sobre el factor de impacto | 117 |
| 4.6.3. Informe de participación | 117 |
| 5. Evaluación de diversas metodologías de extracción de enterovirus en muestras ambientales sólidas para su posterior detección mediante RT-qPCR..... | 139 |
| 5.1. Extracción directa | 142 |
| 5.2. Extracción indirecta | 142 |
| 5.3. Detección mediante RT-qPCR..... | 144 |
| 5.4. Artículo 6: Extracción y detección de enterovirus mediante RT-qPCR en muestras ambientales sólidas: método flexible para diferentes tipos de muestras y concentraciones víricas..... | 147 |
| 5.4.1. Resumen..... | 147 |
| 5.4.2. Informe sobre el factor de impacto | 149 |
| 5.4.3. Informe de participación | 149 |
| 6. Discusión..... | 165 |
| 6.1. Higienización de lodos de depuradora y biosólidos | 167 |
| 6.2. Comportamiento de indicadores y patógenos en los sedimentos fluviales..... | 169 |

| | |
|--|-----|
| 6.3. Metodologías de extracción de enterovirus en muestras ambientales sólidas para su posterior detección mediante RT-qPCR..... | 172 |
| 7. Conclusiones..... | 175 |
| 8. Bibliografía..... | 179 |
| 9. Anexos..... | 195 |
| 9.1. Otras publicaciones..... | 197 |
| 9.2. Participaciones en congresos científicos..... | 197 |
| 9.3. Becas y premios..... | 198 |

Listado de abreviaturas

[]: concentración

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario sintetizado “*in vitro*” a partir de una molécula de ARN

ARN: ácido ribonucleico

cEC: *E. coli* detectada mediante técnicas de cultivo

CFU: unidades formadoras de colonias

Da: dalton

DQO: Demanda Química de Oxígeno

dw: del inglés “dry weight”, peso seco

E. coli: *Escherichia coli*

EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales

EMA: monoazida de etidio

EPA: del inglés “Environmental Protection Agency”, Agencia de protección del medioambiente de Estados Unidos

ETAP: Estación de Tratamiento de Aguas Potables

GA17PH: Bacteriófagos que infectan a la cepa GA17 de *Bacteroides thetaiotaomicron*.

GC: copias genómicas

GCEV: copias genómicas de enterovirus detectados mediante RT-qPCR

h.e.: habitantes equivalentes

INFEV: enterovirus infecciosos detectados mediante cultivo celular

LOD: límite de detección

LOQ: límite de cuantificación

MPN: número más probable

MPNCU: número más probable de unidades citopatogénicas

MST: del inglés “Microbial Source Tracking”, identificación del origen de la contaminación

Listado de abreviaturas

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFU: unidades formadoras de calvas de lisis

PMA: monoazida de propidio

QMRA: del inglés “Quantitative Microbial Risk Assessment”, evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico

qPCR: PCR cuantitativa

RT: retrotranscripción

SAL: *Salmonella*

SFBIF: *Bifidobacterium* fermentadoras de sorbitol

SOMCPH: colifagos somáticos

SSRC: esporas de clostridios reductores de sulfito

ST: sólidos totales

T₉₀: tiempo requerido para producir la inactivación del 90% de los microorganismos presentes en una muestra

tEC: *E. coli* detectada mediante qPCR

TBIF: *Bifidobacterium* totales detectados mediante técnicas de cultivo

Tm: toneladas métricas

TSRC: clostridios reductores de sulfito totales cultivables

UE-15: Europa de los 15, formada por los estados miembros de Alemania, Austria, Bélgica, Dinamarca, España, Finlandia, Francia, Grecia, Irlanda, Italia, Luxemburgo, Países Bajos, Portugal, Reino Unido y Suecia. Los 13 estados miembros adheridos a partir de 2004 son Bulgaria, Croacia, Chipre, Eslovaquia, Eslovenia, Estonia, Hungría, Letonia, Lituania, Malta, Polonia, República Checa y Rumanía

VBNC: Estado fisiológico de “viable pero no cultivable” de las bacterias

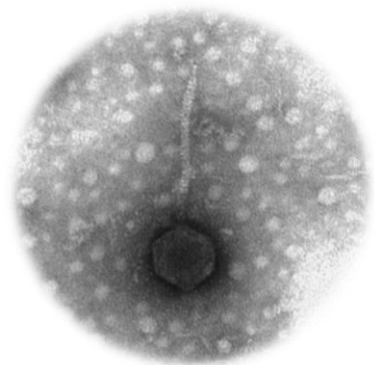
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ww: del inglés “wet weight”, peso húmedo

Índice de tablas y figuras

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Demanda mundial de agua, captación de agua dulce. | 22 |
| Figura 2. Evolución de la población mundial y la demanda de agua durante el siglo XX e inicios del XXI..... | 23 |
| Figura 3. Concepto de One Health. | 27 |
| Figura 4. El ciclo urbano del agua, mostrando el agua como recurso interaccionando con su entorno. | 28 |
| Figura 5. Microorganismos adheridos a sólidos en distintos ambientes..... | 29 |
| Figura 6. Esquema general de las líneas de tratamiento de aguas residuales y lodos de depuradora que se llevan a cabo en una EDAR. | 31 |
| Figura 7. Vías de gestión de los lodos de depuradora para la UE-15 en el año 2010. | 32 |
| Figura 8. Vías de gestión de lodos de depuradora en los 27 estados miembros de la Unión Europea (antes de la adhesión de Croacia en 2013). | 33 |
| Figura 9. Las tres zonas que componen un sistema fluvial. | 35 |
| Figura 10. Estructura de los lodos primario y secundario. | 45 |
| Figura 11. Relación de los patógenos e indicadores con las partículas sólidas de sedimento en un sistema fluvial. | 97 |
| Figura 12. Comportamiento de las bacterias en la interfase sedimento-agua de un sistema fluvial..... | 98 |
| Figura 13. Métodos de extracción y detección mediante qPCR de virus entéricos en muestras sólidas. | 141 |
| Figura 14. Modos de acción de los inhibidores de la RT-qPCR..... | 146 |
| Tabla 1. Concentraciones de patógenos e indicadores encontradas en lodos de depuradora. | 48 |
| Tabla 2. Concentraciones de patógenos e indicadores encontradas en lodos primarios y secundarios..... | 49 |
| Tabla 3. Concentraciones de enterovirus encontradas a lo largo del tratamiento de los lodos de depuradora. | 52 |
| Tabla 4. Concentraciones de microorganismos fecales en varios tipos de sedimentos fluviales. | 100 |

1. Introducción



1. Introducción

1.1. El agua y la vida

El agua es esencial para la vida. La vida, tal y como la entendemos en nuestro planeta, no puede existir sin agua. Todos los seres vivos incluyen agua en su composición en mayor o menor medida: el 95% de una medusa, el 60% de un ser humano o el 55% de un líquen están compuestos de agua. Incluso el 15% de una espora bacteriana o el 10% de un grano de arroz también lo están. Desde un punto de vista antropológico no sólo la supervivencia, sino también el desarrollo de la humanidad se encuentran estrechamente ligados al agua. El líquido elemento no es solamente esencial para mantener una salud y una higiene correctas, también se utiliza en actividades económicas y productivas (agricultura, industria, turismo, transporte, etc.), en actividades recreativas y de ocio (piscinas, fuentes ornamentales, etc.) e incluso en el mantenimiento y restauración de ecosistemas naturales.

La demanda de agua por parte de la humanidad se reparte principalmente entre cuatro destinos: agricultura (incluyendo además ganadería y acuicultura), industria (que también contempla la obtención de energía), abastecimiento municipal (considerando también usos domésticos) y mantenimiento de ecosistemas (UNESCO, 2012). Del total del agua utilizada en los tres usos que más volumen consumen a nivel mundial, según datos del año 2010 (FAO, 2016b), el 69% de la demanda se emplea en la agricultura, el 19% en la industria y el 12% en abastecimiento municipal (Fig. 1). Con respecto a España, siguiendo este mismo esquema, el 68% de la demanda se emplea en la agricultura, el 18% en la industria y el 14% en abastecimiento municipal (FAO, 2016c). En el año 2014 el 67,7% del volumen de agua captada en España para su posterior utilización procedió de aguas superficiales, el 27,9% tuvo su origen en aguas subterráneas y el 4,4% restante provino de la desalación del mar o la utilización de aguas salobres (INE, 2016a).

Es conocido que algunos de los problemas más importantes que tiene la humanidad son de naturaleza ecológica (reducción de la capa de ozono, efecto invernadero y calentamiento progresivo del planeta, pérdida de diversidad biológica, lluvia ácida, contaminación del suelo, aire y agua...), constituyéndose el medio ambiente y el conjunto de recursos naturales en objetos de protección y de control en su utilización (Gutiérrez-Aragón, 2016). Ya que el agua es el agua un recurso esencial para la existencia del ser humano y para el desarrollo de muchas de sus actividades, supone tanto un derecho como una responsabilidad y tiene un valor económico, social y ambiental, por lo que cualquier actuación pública y privada está obligada a tener en cuenta esta triple dimensión (INE, 2008). El agua, por lo tanto, no debe considerarse un bien comercial como los demás, sino un patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal (CE, 2000). En este contexto, la distribución de los usos del agua varía ampliamente a lo largo de la geografía mundial dependiendo del nivel de desarrollo de cada región (que al

incrementarse hace aumentar el porcentaje de demanda de agua para usos industriales), la cantidad de tierra agrícola (que evidentemente influye en el incremento de la demanda para usos agroganaderos) y la localización geográfica (que favorece el incremento de la demanda de agua para usos agrícolas en aquellas regiones con un clima adecuado para estas actividades) (Fig. 1).

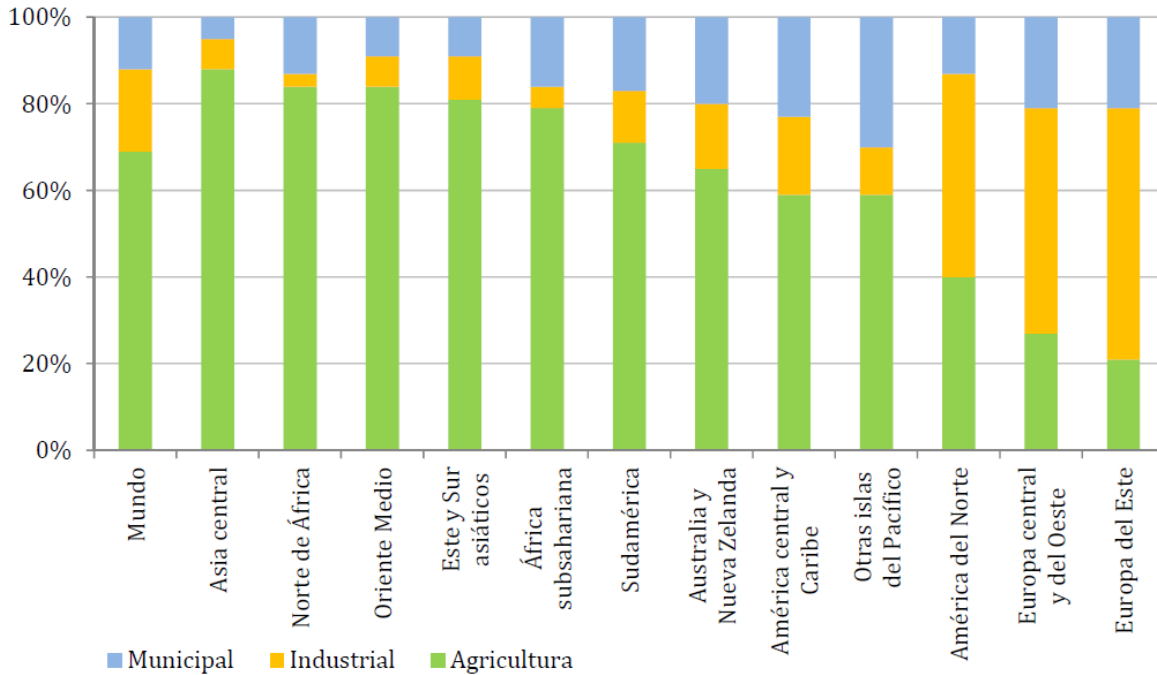


Figura 1. Demanda mundial de agua, captación de agua dulce. Fuente: FAO (2016a).

Por otro lado, el aumento de la población es otra variable que incide muy significativamente en la cantidad de agua demandada. Según apunta Gutiérrez-Aragón (2014) la gestión de los recursos naturales constituyó una preocupación fundamental de los economistas clásicos, siendo el aumento de población uno de los problemas que ocupaba una parte muy importante de sus estudios. Alguno de ellos, como Smith (1776), consideraba que el crecimiento económico y el crecimiento de la población eran fenómenos pasajeros, o pensaban, como Mill (1857), que la Tierra como fuente de recursos era indefinida e incommensurable. En cambio, Ricardo (1817) advertía de los graves problemas que podía provocar el crecimiento descontrolado y los análisis de Malthus (1798) se caracterizaron por un gran pesimismo, llegando a considerar que los límites de los recursos a nivel global provocarían que la capacidad de crecimiento de la cantidad de alimentos resultara inferior al crecimiento de la población. Una de sus hipótesis más conocidas afirmaba que como la oferta de tierra agrícola (o de otros recursos, como el agua potable) era finita y estaba dada, y que, como la población crecería exponencialmente, existiría una progresiva reducción de la oferta de alimentos per cápita.

En este sentido, y con relación al uso del agua, según advierte la FAO (FAO, 2016a), la población mundial aumentó 4,4 veces durante el último siglo, mientras que la demanda de agua aumentó 7,3 veces durante el mismo periodo, resultando pues que dicha demanda aumentó 1,66 veces más rápidamente que la población del mundo. De todos modos, este incremento de la demanda de agua fue mucho mayor en las décadas centrales del siglo XX (4,2 por ciento al año entre 1950 y 1960), y ha ido reduciéndose paulatinamente hasta llegar a la cifra de sólo un 0,5 por ciento de incremento anual durante el periodo 2000-2010 (Fig. 2). Precisamente esa reducción del incremento del uso de este recurso es una de las pruebas evidentes de que las teorías de Malthus no se han cumplido en los términos que este economista expuso, ya que el descubrimiento de nuevas fuentes de recursos (nuevos acuíferos o descubrimiento de tierras aptas para la agricultura), y, sobre todo, los descubrimientos científicos y la mejora de la tecnología (mecanización de los cultivos, tecnificación del riego, nuevas técnicas para el tratamiento y reutilización del agua, etc.) han provocado que la eficiencia en el uso de los recursos, y en concreto, en el uso del agua, se vaya incrementando de una forma cada vez más grande. Así, por ejemplo, del agua utilizada para el riego agrícola en España durante el año 2014, tal y como informa el INE (2016b), ya sólo el 36,1% se emplea en la modalidad de riego por gravedad, mientras que el restante 63,9% utiliza técnicas mucho más eficientes como el riego por aspersión (26,4%) y sobre todo el riego por goteo (37,5%).

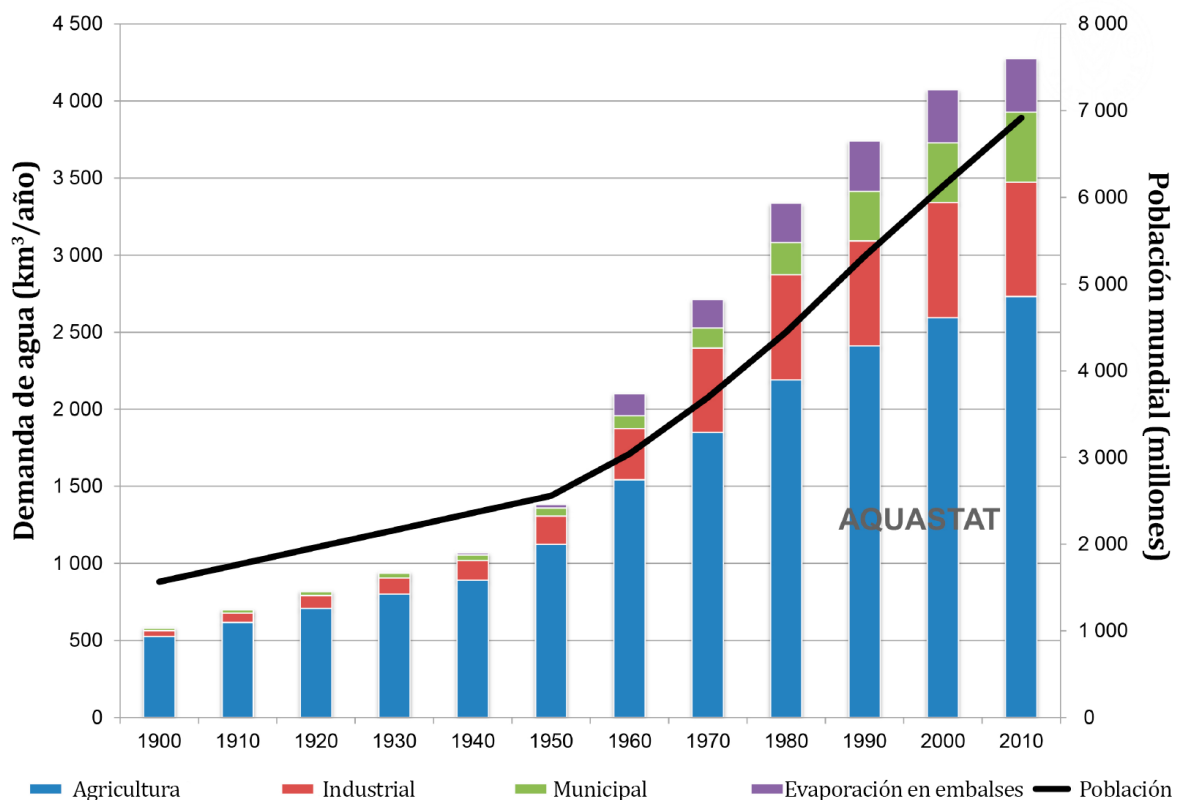


Figura 2. Evolución de la población mundial y la demanda de agua durante el siglo XX e inicios del XXI. Fuente: adaptado de FAO (2015).

Sin embargo, la disponibilidad de agua no sólo depende del aumento de población y del uso más o menos eficiente que de ella lleve a cabo la humanidad, sino que se encuentra estrechamente relacionada con el clima y, por lo tanto, con sus dinámicas y alteraciones. De este modo, las proyecciones climáticas incluidas en el último informe del IPCC (2014) sobre el cambio climático muestran cómo, bajo todos los escenarios de emisiones evaluados, la temperatura superficial de la Tierra continuará aumentando durante el siglo XXI. Debido a ello existe una “*alta probabilidad*” de que en muchas regiones del planeta aumente la intensidad y frecuencia tanto de las olas de calor (y de las sequías asociadas), como de los eventos de precipitación extrema. En este sentido, la calidad de las aguas continentales se verá alterada (con una “*evidencia media*” y un “*alto grado de acuerdo*”), debido a una combinación de, entre otros factores (IPCC, 2014):

- El aumento de la temperatura.
- El incremento de las concentraciones de sedimentos, nutrientes y contaminantes a consecuencia de las lluvias torrenciales.
- El incremento de la concentración de contaminantes durante los periodos de sequía.
- El fallo de las estaciones de tratamiento de las aguas provocado por las inundaciones.

Independientemente de los efectos del calentamiento global, la gran variedad de sistemas climáticos existentes a lo largo del planeta han hecho que la disponibilidad de agua de calidad haya sido a lo largo de la historia una problemática de primer nivel a la que la humanidad ha tenido que enfrentarse.

Para mitigar los efectos nocivos que el aumento de población, la actividad humana y el cambio climático ejercen sobre la cantidad y la calidad de las aguas naturales es imprescindible la aplicación de tratamientos adecuados a cada caso (potabilización, depuración, regeneración, etc.), así como la mejora de la eficiencia de utilización de este preciado recurso y la búsqueda de nuevas vías de abastecimiento como, por ejemplo, el reciclaje y reutilización de aguas contaminadas.

El deterioro de la calidad del agua debido a la contaminación supone un riesgo para la salud y el medio natural. Se han descrito gran variedad de contaminantes del agua, generando diversos listados que se actualizan continuamente, como el elaborado por Manahan en 2006: elementos químicos traza; metales pesados; metales enlazados orgánicamente; radionúclidos; contaminantes inorgánicos; asbesto; nutrientes de algas que favorecen la eutrofización; sustancias que aportan exceso de acidez, alcalinidad o salinidad; contaminantes orgánicos traza; drogas y medicamentos; bifenilos policlorados; plaguicidas; residuos de petróleo; alcantarillado; residuos humanos y animales; materia orgánica medida como demanda bioquímica de oxígeno;

microorganismos patógenos; detergentes; compuestos químicos carcinógenos; sustancias que dan sabor, olor y color (Manahan, 2006).

Desde el punto de vista microbiológico, una de las principales fuentes de contaminación del agua es el vertido de residuos fecales humanos y animales. Como se desprende de los estudios de la microbiota intestinal realizados mediante técnicas de metagenómica (Qin et al., 2010), el intestino de los animales es uno de los ecosistemas más densamente poblados de la Tierra. Siendo así, no es de extrañar que los vertidos de residuos fecales den lugar a la contaminación de las aguas continentales con una amplia variedad de microorganismos, entre los cuales se encuentran, por supuesto, los microbios patógenos. En particular, los principales grupos de organismos causantes de enfermedades infecciosas debido a la contaminación fecal del agua son las bacterias (como por ejemplo *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* patogénicas, *Campylobacter*, *Vibrio cholera*, *Yersinia pestis*, *Clostridium botulinum*, etc.), los virus (como *Enterovirus*, *Rotavirus*, *Adenovirus*, *Norovirus*, *Virus de la Hepatitis A*, etc.), las formas de resistencia de los protozoos (como *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Entamoeba*, etc.) y los huevos de helmintos parásitos (como *Taenia*, *Ascaris*, *Anisakis*, etc.).

1.2. Control de la calidad microbiológica del agua

Tal y como indica la Organización Mundial de la Salud, “*la salubridad y la calidad del agua son fundamentales para el desarrollo y el bienestar humanos*” (WHO, 2017). Teniendo en cuenta el papel de los microorganismos como causantes de enfermedades, el control de la calidad microbiológica del agua se vuelve una herramienta imprescindible para garantizar el desarrollo y el bienestar de la humanidad. Sin embargo, debido a la gran variedad de patógenos de transmisión hídrica existente y a la falta de métodos efectivos de extracción, concentración y detección, la monitorización de los mismos con el objetivo de vigilar y controlar la calidad del agua se vuelve una tarea ardua y poco eficaz. En este sentido, la utilización de microorganismos modelos que sustituyan a los patógenos es una herramienta válida que, aun contando con ciertas limitaciones, resulta muy útil a la hora de controlar la calidad microbiológica del agua. La presencia de microorganismos modelos en el agua sugiere la existencia de contaminación con materia fecal y, por ello, la posible presencia de patógenos. Los microorganismos modelos pueden tener dos funciones y cumplir con una, otra o las dos al mismo tiempo (IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology, 1991; Jofre, 2007):

1. Función índice: la presencia del microorganismo implica la presencia del patógeno o la existencia de contaminación fecal. Ejemplo: *E. coli* se utiliza como microorganismo índice para *Salmonella*.
2. Función indicadora: el microorganismo posee características de comportamiento similares al patógeno y su resistencia al estrés ambiental o a los tratamientos es igual o superior a la del patógeno. Los microorganismos indicadores se utilizan

para valorar la eficiencia de los tratamientos o la variación en las concentraciones de los patógenos en ambientes específicos. Ejemplo: el bacteriófago MS2 se utiliza para valorar la eficiencia del tratamiento de ultrafiltración.

Un buen microorganismo indicador de contaminación fecal debe no ser un patógeno en sí mismo y debe cumplir los siguientes criterios (WHO, 2011):

1. Encontrarse en grandes cantidades en las heces de humanos y animales.
2. No multiplicar en aguas naturales.
3. Persistir en el agua de un modo similar a los patógenos fecales.
4. Estar presente en mayores cantidades que los patógenos fecales.
5. Responder a los tratamientos de forma similar a los patógenos fecales.
6. Ser detectado de forma sencilla, rápida y barata por medios de cultivo.

Sin embargo, el indicador universal no existe, ya que ningún microorganismo puede, de forma individual, predecir significativamente la presencia de todos los patógenos en el agua (Wu et al., 2011). Por eso, una correcta valoración de la contaminación fecal requiere la utilización de una batería de microorganismos indicadores que se adecúen a los distintos tipos de muestras y propósitos. A la hora de elegir esa batería hay que tener en cuenta las características propias de cada tipo de indicador, que serán útiles para una u otra finalidad concreta.

A su vez, los microorganismos indicadores pueden clasificarse atendiendo a su grado de resistencia frente a los tratamientos o de persistencia en el medio, distinguiéndose microorganismos conservativos, semi-conservativos y no conservativos dependiendo de si su resistencia o persistencia es alta, media o baja.

Otra aproximación de utilidad a la hora de controlar la calidad del agua es la elección de patógenos de referencia que representen grupos de patógenos (bacterias, virus, protozoos y helmintos), teniendo en cuenta las variaciones en las características, comportamiento y susceptibilidades de cada grupo hacia los diferentes tipos de tratamiento. En este sentido, las características deseables en un buen patógeno de referencia son (WHO, 2011):

1. El agua debe ser una de sus vías de transmisión establecidas.
2. Deben existir suficientes datos para realizar una evaluación de QMRA, incluyendo datos sobre las relaciones dosis-respuesta en humanos y sobre la carga de morbilidad.
3. Debe estar presente en el agua de origen.
4. Debe persistir en el medio.
5. Debe ser resistente a la inactivación o eliminación mediante tratamientos.

6. La infectividad, incidencia y severidad de la enfermedad debe ser similar a la del grupo que representa.

Por otro lado, la calidad microbiológica del agua debe ser vigilada a lo largo de su ciclo completo, teniendo en cuenta, en cada momento, las interacciones de este preciado recurso con su entorno y entendiendo el ciclo como un todo, bajo la perspectiva del concepto de “*One Health*” (una sola salud). La iniciativa de “*One Health*” se define como el esfuerzo colaborativo de múltiples disciplinas que trabajan local, nacional y globalmente con el fin de proteger al mismo tiempo la salud humana, ambiental y animal (AVMA, 2008) (Fig. 3).

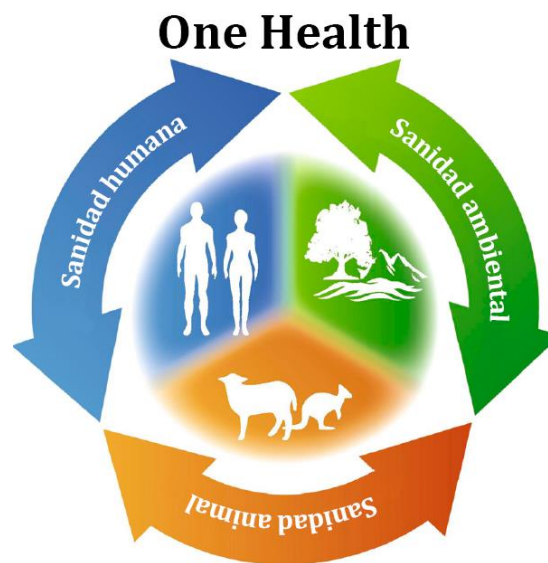


Figura 3. Concepto de One Health. Fuente: adaptado de Powell (2016).

Esta idea se basa en las interacciones existentes entre las personas, los animales y el medioambiente, lo cual da lugar a que la salud de cada grupo se encuentre profundamente interconectada con la de los otros dos. En cuanto al control de las enfermedades infecciosas, la interdependencia se ve claramente reflejada, por ejemplo, en el hecho de que gran cantidad de los patógenos que afectan a la humanidad de un modo global han tenido un origen zoonótico, como el VIH, el Virus del Ébola o el Virus de la Hepatitis E.

Asimismo, los problemas de índole ambiental pueden generar las condiciones favorables para el desarrollo de enfermedades infecciosas. De esta manera, la baja calidad del agua de un río pondrá en peligro el ecosistema natural al que pertenece y, a la vez, supondrá la realización de un esfuerzo extra a la hora de su potabilización, aumentando el riesgo de transmisión de enfermedades hídricas si el tratamiento no es el adecuado. En cambio, un buen proceso de depuración del agua residual generará unos lodos de depuradora de mala calidad, los cuales deberán ser tratados convenientemente antes de su reutilización como fertilizantes en agricultura (Fig. 4).



Figura 4. El ciclo urbano del agua, mostrando el agua como recurso interactuando con su entorno. Fuente: Ciudad (2016).

1.3. La relación de los microorganismos con los sólidos en el ciclo del agua

Según la RAE un cuerpo sólido es aquél que, debido a la gran cohesión de sus moléculas, mantiene forma y volumen constantes. La relación de los microorganismos con los sólidos lleva décadas siendo estudiada en ámbitos tan variados como aguas naturales continentales o marinas (Guerrero et al., 1993; John and Rose, 2005), suelos (Chenu, 1993), sedimentos (Anderson et al., 2005), lodos de depuradora (Rao et al., 1986), alimentos (Koopmans et al., 2002), fómites (Warnes y Keevil, 2011), medicina (Huang et al., 2011), sistemas de tuberías (Wingender y Flemming, 2011) o deterioro de monumentos (Crispim y Gaylarde, 2005). La adhesión de un microorganismo a una partícula sólida le confiere ventajas tan diversas como protección frente a depredadores o condiciones ambientales desfavorables, mejor acceso a los nutrientes, transporte, optimización de aspectos fisiológicos, facilidad de eliminación de productos de deshecho, inactivación de sustancias tóxicas, creación de sinergias con otros microorganismos o protección de la pared celular al reducir las fuerzas de cizallamiento (Bar-Or, 1990; De Brauwere et al., 2014; Fletcher, 1984; Fletcher, 1996; Ng et al., 2016). Debido a ello, las interfases sólido-líquido, líquido-gas o, incluso, sólido-gas habitualmente hospedan altas concentraciones de microorganismos (Fletcher, 1996) (Fig. 5), aunque, obviamente, existen también microbios cuyo hábitat natural consiste, por ejemplo, en permanecer flotando en un líquido.

Al margen de las ventajas que ofrece la vida en la interfase, la acumulación de microorganismos en dichas zonas también se ve claramente influenciada por factores físico-químicos (Bar-Or, 1990; Hassard et al., 2016; van Loosdrecht et al., 1989). De este modo, la hidrofobicidad de la pared celular y el arrastramiento debido a burbujas

facilitarán la acumulación de microbios en la superficie de un ecosistema acuático y factores como pH o fuerza iónica determinarán el grado de unión de los virus a partículas sólidas o a otros virus en ríos, aguas subterráneas o aguas residuales (Rao et al., 1986; Young y Sharp, 1977). La habilidad para deshacer la unión con el sólido y liberarse también es importante cuando las condiciones ambientales empeoran o la comunidad microbiana alcanza un máximo de población (Bar-Or, 1990).

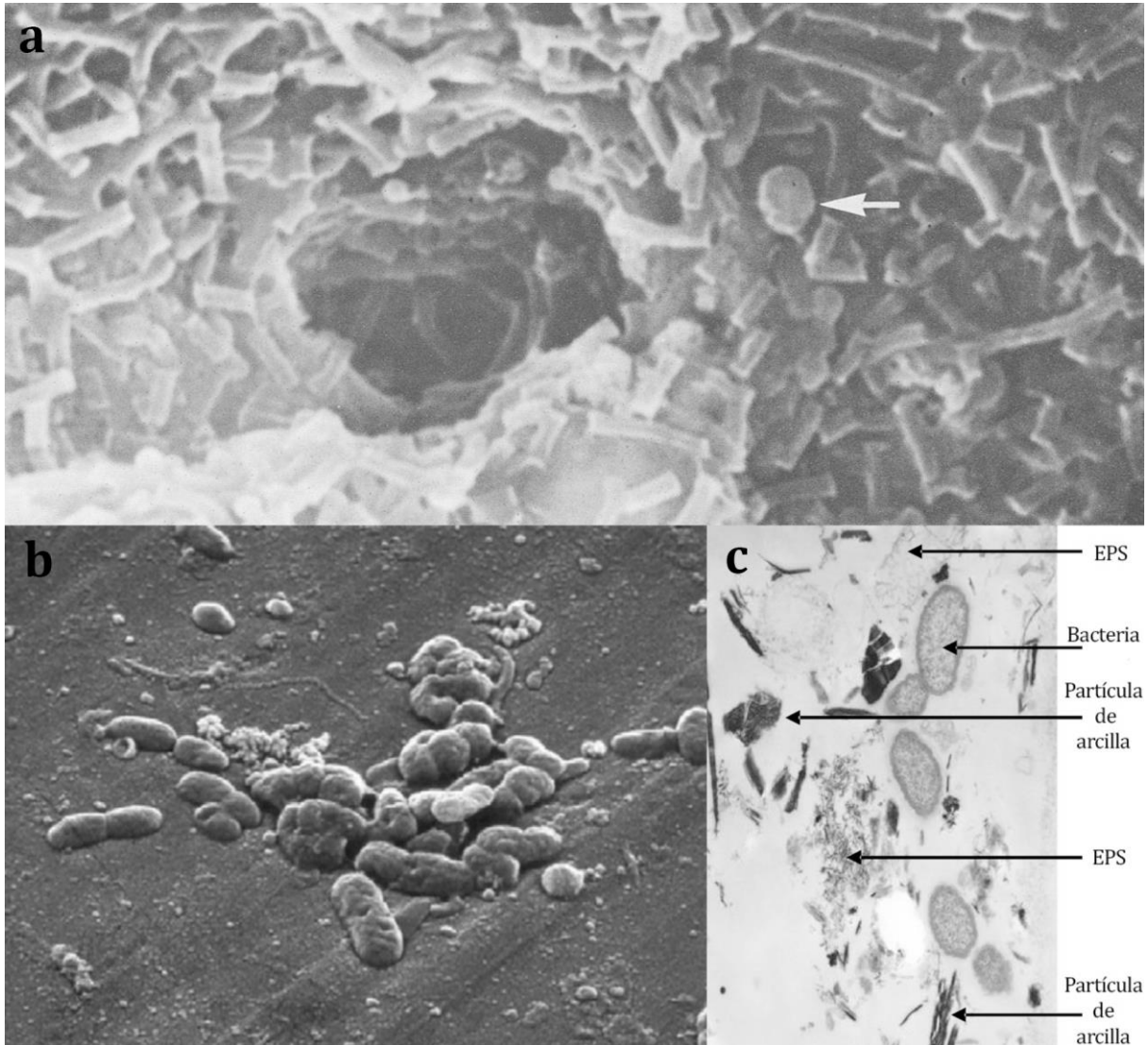


Figura 5. Microorganismos adheridos a sólidos en distintos ambientes. a) Bacilos con bordes angulares y cocos (flecha) formando parte de un gránulo de lodo en un reactor anaerobio. b) Microcolonia adherida a la superficie de acero de una tubería de agua potable. c) Partículas de sedimento de río formando un flóculo junto con bacterias y sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Fuente: adaptado de Droppo et al. (2009), MacLeod et al. (1990) y Wingender y Flemming (2011).

El presente trabajo de investigación se centrará en el estudio de dos grandes grupos de sólidos relevantes en el ciclo del agua por su potencial para actuar como reservorios de microorganismos patógenos, concretamente los lodos de depuradora (incluyendo los biosólidos derivados de su tratamiento) y los sedimentos fluviales. Con respecto a los lodos de depuradora se espera que el aumento de población, la continua optimización en

los tratamientos del agua residual que se lleva a cabo en las EDARs a lo largo del mundo, así como el acceso a los tratamientos por parte de zonas geográficas que actualmente no disponen de ellos, previsiblemente dará lugar a un aumento en la producción de este tipo de sólidos provocando, de este modo, el consiguiente desafío de la correcta eliminación y/o reutilización de los mismos. Por otro lado, los sedimentos fluviales de aquellos ríos sometidos a altas presiones poblacionales albergan considerables concentraciones de patógenos susceptibles de ser resuspendidos en la columna de agua durante los eventos de lluvias torrenciales, constituyendo así un riesgo para la salud, tanto humana como ambiental y animal.

1.4. Lodos de depuradora y biosólidos

Una de las directivas europeas más importantes de aplicación a la producción de los lodos de depuradora es la Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas (CEE, 1991). Dicha Directiva considera aguas residuales urbanas tanto a las aguas residuales domésticas como a la mezcla de las mismas con aguas residuales industriales y/o pluviales. Durante el tratamiento del agua residual urbana en una EDAR se lleva a cabo la eliminación, transformación o la simple separación de los contaminantes presentes en la misma con el fin de obtener una agua tratada que disponga de la calidad suficiente para su posterior reutilización o liberación al medio natural y que cumpla con las normativas vigentes en cada caso (Fig. 4). El residuo semisólido generado durante ese proceso constituye los lodos de depuradora. Por lo tanto, los microorganismos presentes en los lodos serán básicamente todos aquellos que estaban presentes en el agua residual de la cual proceden y que han sido capaces de soportar los tratamientos aplicados, siendo arrastrados finalmente hasta los lodos. De hecho, se produce un efecto de concentración desde el agua hacia los lodos dando lugar a un importante aumento de las concentraciones de microorganismos medidas por unidad de volumen. A mayor efectividad del tratamiento de las aguas residuales retirando contaminantes, mayor producción de lodos y peor calidad de los lodos generados. Se estima que una disminución de 1 kg en la DQO del agua residual se corresponde con la formación de 0,4 kg de lodos (Weemaes y Verstraete, 2001).

Durante el tratamiento del agua residual se generan tres grandes tipos de lodos de depuradora (Fig. 6). El tratamiento físico-químico permite la separación de la materia sedimentable y en suspensión, dando así lugar a la generación del lodo primario, mientras que el lodo secundario, también llamado activado o biológico, se produce como consecuencia de la oxidación de la materia orgánica mediante un tratamiento biológico. La posterior eliminación de nitrógeno y fósforo, así como de aquellos compuestos más recalcitrantes, dará lugar al lodo terciario.

Al tratarse de residuos que además de materia orgánica contienen metales pesados, patógenos y contaminantes orgánicos, los lodos de depuradora requieren de un tratamiento adecuado previo a su eliminación o reutilización, pudiendo dar lugar, de este modo, a su transformación en biosólidos. Según las *“Directrices para la gestión de los*

biosólidos” del estado de Australia del Oeste (Government of Western Australia, 2012), se consideran biosólidos los lodos de depuradora que han sido convenientemente tratados para reducir significativamente las concentraciones de patógenos y de materia orgánica volátil, resultando en un material estabilizado apto para un uso beneficioso.

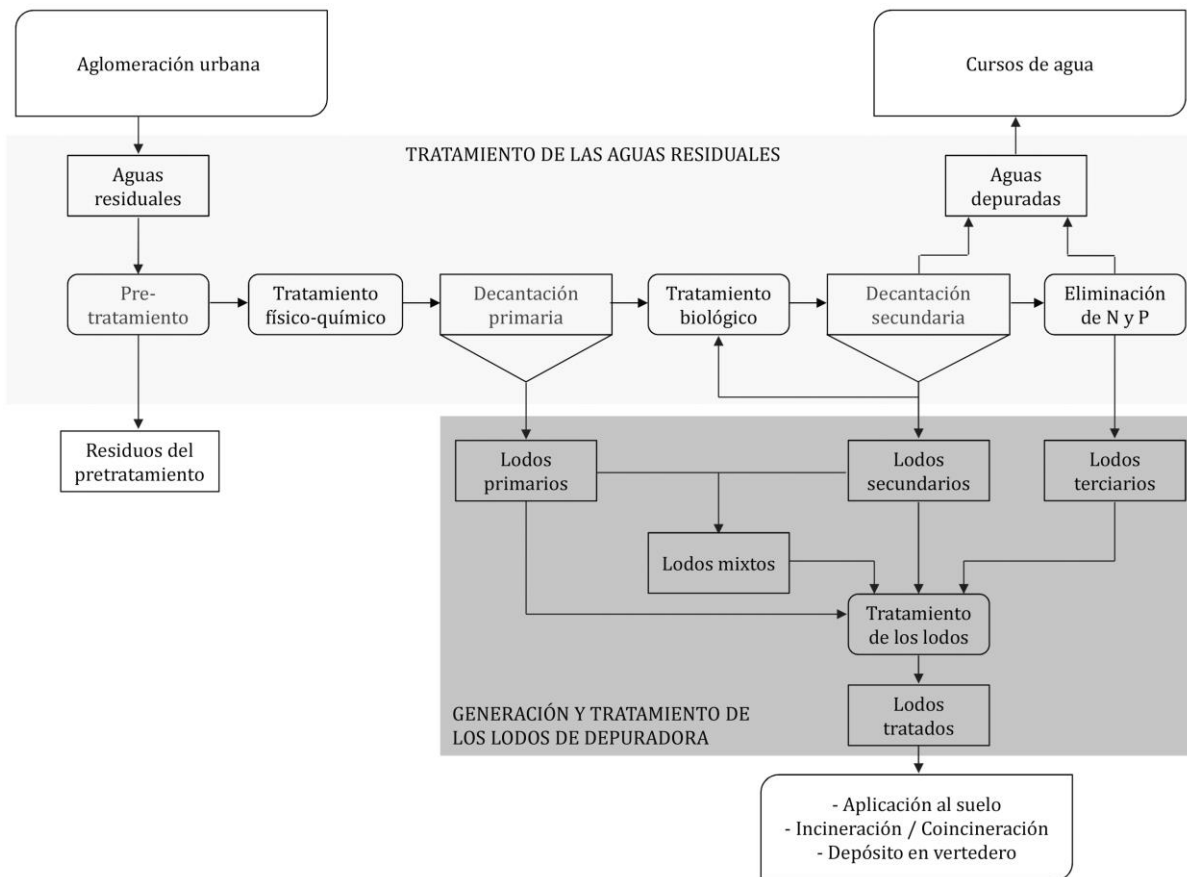


Figura 6. Esquema general de las líneas de tratamiento de aguas residuales y lodos de depuradora que se llevan a cabo en una EDAR. N = nitrógeno, F = fósforo. Fuente: adaptado de Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medioambiente (2017).

La anteriormente citada Directiva 91/271/CEE (CEE, 1991) indica el nivel de tratamiento al que debe someterse el agua residual antes de ser liberada al medio natural. En ese sentido, obliga a utilizar colectores de aguas residuales en todas aquellas aglomeraciones de población que superen los 2000 h.e. Por su parte, obliga a aplicar un tratamiento secundario (tratamiento biológico) a todas aquellas aglomeraciones que superen los 2000 h.e. y descarguen en aguas dulces o estuarios y a aquellas que superen los 10000 h.e. y descarguen en aguas costeras. Las fechas límite para aplicar la Directiva 91/271/CEE eran 2005 para la UE-15 y 2015 o 2018 para los 13 países que entraron a formar parte de la Unión Europea a partir de 2004. Como consecuencia se ha producido un incremento de aproximadamente el 50% en la producción anual de lodos de depuradora en la UE-15, desde 6,5 millones de Tm, en peso seco, de 1992 hasta 9,8 millones en 2005 (Kelessidis y Stasinakis, 2012). Por otro lado, la producción anual de lodos de depuradora en los 13 países de reciente adhesión fue estimada en

aproximadamente 1,1 millones Tm (peso seco) en 2005, resultando en un total de 10,9 millones Tm (peso seco) para el conjunto de la Unión Europea. La aplicación de la Directiva 91/271/CEE por parte de los 13 nuevos estados miembros causará un importante incremento de la producción anual durante los próximos años. Se estima que entre 2005 y 2020, la producción aumente en aproximadamente un 20% en la UE-15 y sobre un 100% en el resto (Milieu Ltd. et al., 2010), excediendo así los 13 millones Tm (peso seco) en 2020. En España, por su parte, el aumento entre 2005 y 2012 ha sido de un 146%, pasando de una producción de 1,1 millones Tm (peso seco) a 2,7 millones, situándose así como uno de los grandes productores de lodos de depuradora de la Unión Europea (Eurostat, 2016). Es evidente, por lo tanto, que Europa deberá enfrentarse al reto que supone el manejo de semejante producción durante los próximos años. Según Ruiz-Hernando (2015) y utilizando datos del Eurostat, en 2010 (año más reciente para el que se dispone de datos completos) las vías de gestión de lodos de depuradora preferidas por la UE-15 fueron la aplicación en agricultura (53%) y la incineración (29%) (Fig. 7). Ya que la producción de la UE-15 supone casi el 90% de la producción total de la Unión Europea, los datos pueden extrapolarse al resto de la Unión (Kelessidis y Stasinakis, 2012).

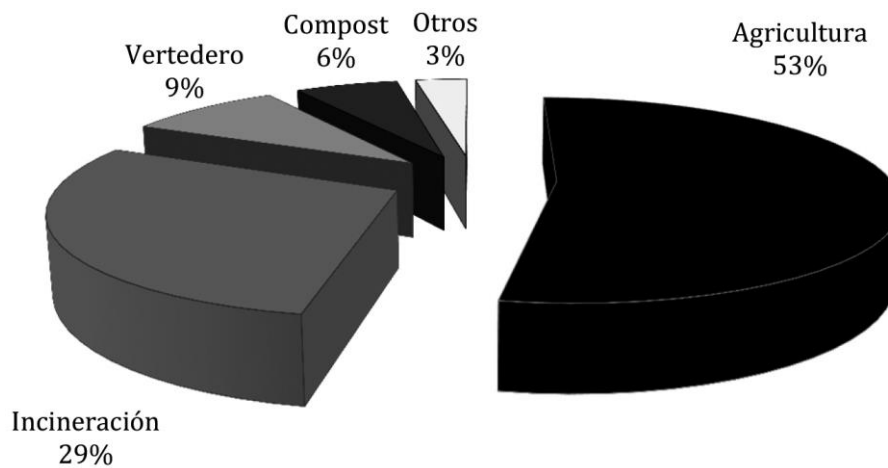


Figura 7. Vías de gestión de los lodos de depuradora para la UE-15 en el año 2010. Fuente: adaptado de Ruiz-Hernando (2015).

Otra de las normativas de aplicación relevante para los lodos de depuradora es la Directiva 2008/98/CE (CE, 2008) sobre residuos. En ella se establece que la gestión de los residuos debe seguir la siguiente jerarquía, con el fin de disminuir su impacto sobre el medio natural: 1) prevención; 2) preparación para la reutilización; 3) reciclaje; 4) otro tipo de valorización, por ejemplo, valorización energética; 5) eliminación. En este sentido, las vías preferentes de gestión de lodos de depuradora son la aplicación en agricultura y la generación de compost (reciclaje), seguidas por la incineración (valorización energética), siendo el depósito en vertedero (eliminación) la opción menos deseada. De esta manera, el conjunto de la Unión Europea parece cumplir con la jerarquía establecida en la Directiva 2008/98/CE. En muchos de los países europeos el depósito en vertedero es una opción en progresiva disminución (Kelessidis y Stasinakis,

2012). Sin embargo, la distribución de las vías de gestión varía ampliamente entre los distintos estados miembros, siendo la incineración la opción preferida en Bélgica, Eslovenia y Países Bajos, el depósito en vertedero la única forma de gestión en Malta, la agricultura y la incineración las opciones preferentes en Alemania, la aplicación en agricultura la elección mayoritaria en Portugal, Reino Unido, Irlanda y España y el compostaje la estrategia escogida con mayor relevancia en Finlandia, Estonia y Eslovaquia (Fig. 8).

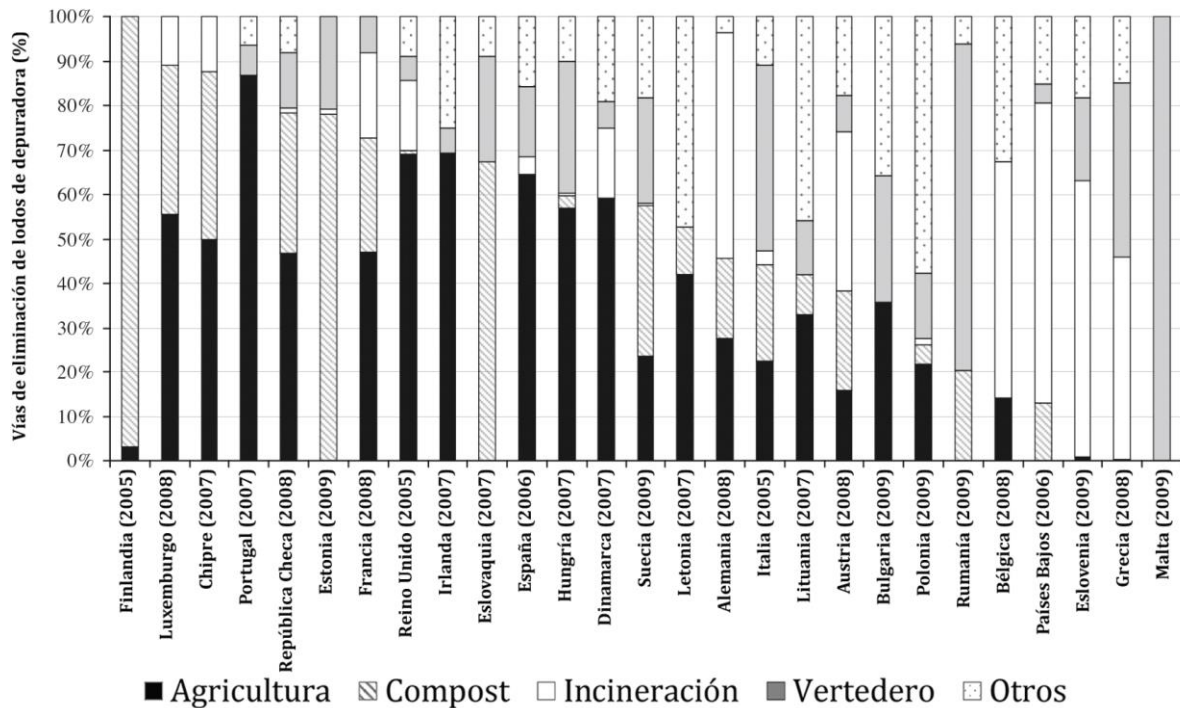


Figura 8. Vías de gestión de lodos de depuradora en los 27 estados miembros de la Unión Europea (antes de la adhesión de Croacia en 2013). Los estados se encuentran ordenados descendientemente teniendo en cuenta la jerarquía de gestión establecida en la Directiva 2008/98/CE. Entre paréntesis, el año de procedencia de los datos. Fuente: Kelessidis y Stasinakis (2012).

Aunque el reciclaje de los lodos de depuradora mediante su utilización como fertilizantes en agricultura, ya sea directamente o previa transformación en compost, es la opción de gestión del residuo más deseable, no se encuentra exento de riesgos y debe, por lo tanto, ser regulado convenientemente. De ello se encarga la Directiva 86/278/CEE (CEE, 1986) sobre la utilización de los lodos como fertilizantes en agricultura, adoptada con los propósitos de promover dicha vía de gestión y de proteger la salud y el medio ambiente. Para ello, la directiva fija niveles máximos de metales pesados permitidos tanto en lodos como en suelos y establece métodos de muestreo y análisis de los mismos. Sin embargo, los niveles máximos permitidos parecen ser tan laxos que numerosos países europeos han adaptado la norma para establecer cotas más restrictivas, no siendo este el caso de España. Además, la directiva no incluye ninguna limitación con respecto a la presencia de microorganismos patógenos o indicadores en los lodos o el suelo. Con el fin de solventar dichos inconvenientes, la Dirección General de Medio Ambiente de la Comisión Europea propuso, en el año 2000, un Borrador para

implementar la directiva (DG Environment, 2000), redefiniendo nuevos límites de metales pesados y contaminantes orgánicos, indicando el tipo de tratamiento que debe aplicarse a los lodos dependiendo de su posterior destino e incluyendo límites para *Salmonella* y *E. coli* que garanticen un grado de higienización adecuado previo a la aplicación al suelo. No obstante, las directrices del Borrador continúan a día de hoy sin haber sido trasladadas a ninguna normativa europea común, ya sea nueva o existente, por falta de acuerdo entre los estados miembros, por lo que su cumplimiento es voluntario y la directiva vigente sigue siendo la 86/278/CEE. Muy probablemente, las razones para dicha falta de acuerdo se encuentren relacionadas con la gran variedad de vías de gestión de los lodos existente en la Unión Europea (Mininni et al., 2015) y los distintos intereses de cada estado.

1.5. Sedimentos fluviales

Los sedimentos son aquellos materiales procedentes de la destrucción de las rocas de la superficie terrestre por la meteorización, la erosión, o ambos y que son depositados a veces in situ o, más frecuentemente, a distancia, después de ser transportados por un agente geológico externo como el viento, el hielo o el agua (Junta de Andalucía, 2017). Gran parte de los sedimentos fluviales se forman en la propia cuenca del río y son transportados por la corriente aguas abajo. Su formación y transporte están determinados por la hidrología, la geología, la topografía y el uso de la tierra. Idealmente, un sistema fluvial se divide en tres zonas (Díaz-Molina, 1984; Kondolf, 1994) (Fig. 9):

- Zona de erosión: cuenca de drenaje, tramo en el que se producen los sedimentos. Es el tramo alto del sistema fluvial.
- Zona de transferencia: sector donde se lleva a cabo el transporte de los sedimentos. Se corresponde con el tramo medio.
- Zona de sedimentación: área donde los sedimentos son depositados. Puede ser un abanico aluvial, una llanura fluvial, un delta o aguas más profundas y se corresponde con el tramo bajo.

Aunque la erosión, transporte y depósito de sedimentos ocurren en mayor o menor medida en las tres zonas, cada una de ellas se encuentra normalmente dominada por uno de los procesos. En conjunto, los ríos actúan como una especie de cintas transportadoras de sedimentos, trasladándolos desde los tramos altos hacia las desembocaduras y, en última instancia, hacia el mar (Fig. 9).

Los sedimentos son transportados en los sistemas fluviales de dos formas distintas: disueltos en la columna de agua, considerándose partículas disueltas aquellas que traspasan un filtro con tamaño de poro de 0,45 mm; o no disueltos, en cuyo caso están sujetos a sedimentación y resuspensión dependiendo de factores como la velocidad de caudal, el tamaño y forma de la propia partícula o la morfología del cauce. Los

sedimentos finos, de tamaño inferior a $63 \mu\text{m}$ (el conjunto de limos y arcillas) son los más relevantes en cuanto a la movilización de contaminantes, ya que su alta capacidad de intercambio de iones y su mayor superficie expuesta en comparación con tamaños de grano superiores, facilitan la adsorción a los mismos de los contaminantes introducidos en el sistema fluvial.

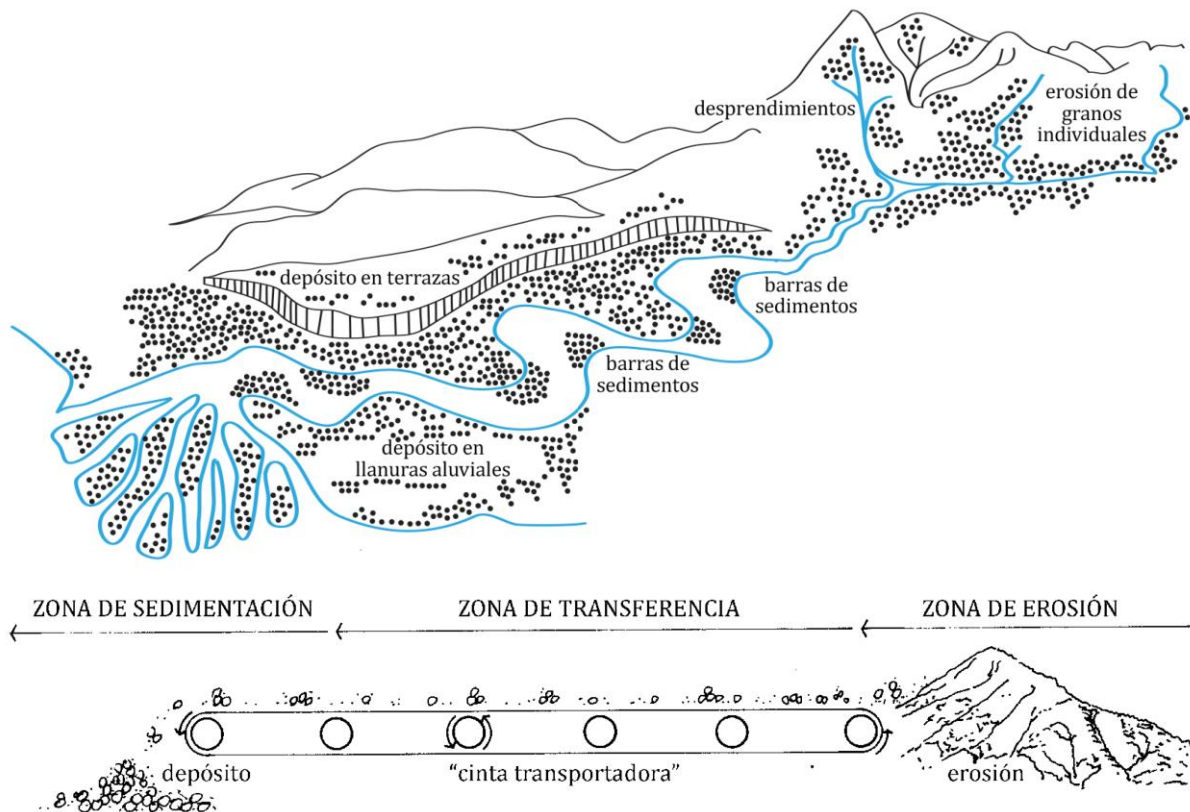


Figura 9. Las tres zonas que componen un sistema fluvial. Fuente: adaptado de Kondolf (1994) y Salomons et al. (2004).

Uno de los factores que más afecta al transporte natural de los sedimentos fluviales es la utilización de presas para formar embalses. Aunque existen embalses a lo largo de todo el territorio europeo, la mayor densidad se encuentra en las cuencas del Mediterráneo, concretamente en España, Grecia y el sur de Italia. Los pantanos frenan el transporte de los sedimentos, llegando a suponer la retención de más del 90% de los mismos cuando el tiempo de residencia del agua supera los dos meses (Salomons et al., 2004). En este sentido, los contaminantes adheridos a esos sedimentos quedan también retenidos en los embalses, ejerciendo un efecto protector de la contaminación sobre las zonas del río que quedan aguas abajo.

Existen diversas fuentes de contaminación que afectan a los sistemas fluviales y, como parte constituyente de ellos, a los sedimentos de río. Puede establecerse una división entre fuentes puntuales y fuentes difusas. Las fuentes puntuales son concretas e identificables y, en una escala de tiempo de años, son estables en cantidad y calidad. La magnitud de la contaminación producida no se ve influenciada por factores

meteorológicos. Las principales fuentes de contaminación puntuales son los efluentes de las EDARs municipales e industriales. En cambio, las fuentes difusas tienen una distribución espacial amplia y su magnitud está fuertemente relacionada con factores meteorológicos. Se incluyen en esta denominación la escorrentía superficial producida a consecuencia de precipitaciones, las aguas subterráneas, la erosión (que introduce sedimentos en el curso del río) o la escorrentía procedente de zonas urbanas (que arrastra contaminación procedente del pavimento, de la corrosión de materiales de construcción o del desbordamiento por sobrecarga de los sistemas de alcantarillado unitarios) (Salomons et al., 2004).

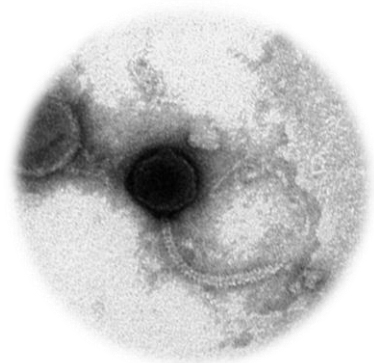
De esta forma, teniendo en cuenta la variedad de fuentes de contaminación que deterioran la calidad del agua de los ríos, así como la dinámica de transporte de sólidos que ocurre en los sistemas fluviales y la capacidad para retener contaminantes que poseen las partículas de sedimento, se hace fácil entender por qué los sedimentos fluviales son considerados importantes reservorios de contaminantes. Asimismo, resulta sencillo también entender cómo la calidad de los sedimentos de los ríos se verá afectada, directa o indirectamente, por normativas relacionadas con la calidad de los suelos, la prevención de la erosión, la mejora del tratamiento de las aguas residuales y el control de fuentes puntuales de contaminación a nivel industrial (Salomons et al., 2004).

Una de las normativas de aplicación en Europa más relevante en cuanto a la calidad de los sedimentos fluviales es la Directiva Marco del Agua 2000/60/CE, que *“establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas”*. Dicha norma tiene como objetivo la protección de las aguas superficiales continentales, las aguas de transición, las aguas costeras y las aguas subterráneas. Su ámbito de aplicación incluye ríos, estuarios, aguas costeras y cuerpos de agua artificiales como canales y muelles, situados dentro del territorio de la Unión Europea. La directiva supone un enfoque integrado del agua al abordar su gestión desde el punto de vista de la cuenca hidrográfica como unidad geográfica e hidrológica natural, no dependiendo de fronteras políticas o administrativas. Aunque este enfoque es beneficioso para la calidad de los sedimentos de río, a los que considera parte esencial del sistema fluvial, la regulación no trata los sedimentos específicamente.

Sin embargo, la capacidad de los sedimentos fluviales para actuar como reservorios de contaminantes los convierte, a la vez, en causa y consecuencia de la contaminación del río, mereciendo, por lo tanto, una atención adecuada. Los contaminantes presentes en una corriente de agua son susceptibles de sedimentar y quedar retenidos en los sedimentos fluviales. Asimismo, un evento de lluvias torrenciales, un aumento repentino de caudal, un cambio en la turbulencia de la corriente o la influencia de las actividades humanas o de la fauna del lugar pueden dar lugar a la resuspensión de esos contaminantes en la columna de agua. La correcta caracterización y cuantificación de los riesgos asociados permitirá adoptar medidas preventivas con suficiente antelación para reducir o evitar dichos riesgos.

En este contexto, la utilización de programas que modelicen el comportamiento de los contaminantes en los sistemas fluviales desde el punto de vista de la cuenca completa puede ser de gran utilidad. Este tipo de modelos ofrecen resultados para el punto escogido sobre la carga de contaminantes, nutrientes, pesticidas, etc. en agua, sedimentos y suelos, así como datos de hidrología y calidad del agua, integrando toda la información disponible sobre el conjunto de la cuenca. Ejemplos de ello son el HSPF (Hydrological Simulation Program - FORTRAN) (US Environmental Protection Agency, 1993), que tiene en cuenta tanto las fuentes de contaminación puntuales como las difusas; el EUROSEM (European Soil Erosion Model) (Morgan et al., 1998), que simula el transporte de sedimentos en pequeñas cuencas; o el SWAT (Soil and Water Assessment Tool) (Arnold et al., 1993), que predice el impacto de la gestión del agua, sedimentos y químicos agrícolas sobre cuencas grandes y complejas. Alguno de estos modelos se encuentra en continuo proceso de actualización y adaptación por parte de la comunidad científica. El módulo microbiológico del SWAT, por ejemplo, ha sido adaptado por Kim et al. (2010) para introducir la distinción entre bacterias disueltas en la columna de agua y aquellas adheridas a partículas de sedimento; Cho et al. (2012), por su parte, añadieron la inactivación producida debida a la radiación solar. En general, la fiabilidad de las predicciones realizadas por los modelos será mayor cuanto más precisa y completa sea la información de partida. De esta manera, el aporte continuo de nuevos datos obtenidos de forma rigurosa favorece el refinamiento de los modelos y amplía sus capacidades, aumentando así su utilidad. En concreto, la generación de datos que indiquen el comportamiento de los microorganismos contaminantes con respecto a los sedimentos fluviales y sus interacciones con las partículas de sólidos será de gran ayuda a la hora de monitorizar su entrada, permanencia y dinámica en los sistemas fluviales y, por lo tanto, a la hora de disminuir y controlar los riesgos asociados, proporcionando información valiosa para mejorar la gestión y la toma de decisiones que afectan a las aguas continentales.

2. Objetivos



2. Objetivos

Este trabajo de investigación pretende profundizar en el estudio de la utilidad de los bacteriófagos y otros microorganismos indicadores de la contaminación fecal en el contexto de dos tipos de muestras ambientales sólidas: los lodos de depuradora y los sedimentos fluviales. Es asimismo propósito de esta investigación el estudio del comportamiento de enterovirus y otros patógenos de referencia relevantes en los referidos tipos de muestras. Para ello, el trabajo se ha dividido en tres bloques diferenciados, conformados por seis publicaciones científicas.

El primer bloque comprende los artículos 1, 2 y 3 y está dedicado a evaluar la higienización producida por los tratamientos que son aplicados sobre distintos tipos de lodos de depuradora, incluyendo tanto metodologías habitualmente aplicadas en las EDARs como nuevas propuestas para la mejora del tratamiento y la gestión de los lodos, prestando especial atención a la revalorización de los lodos como fertilizantes en agricultura. Específicamente, se ha pretendido:

- Comparar el efecto de tres pretratamientos para la digestión anaerobia del lodo secundario (ultrasonidos, térmico y alcalino) sobre la reología, higienización y potencial de biometanización (producción de CH₄), con el fin de valorar diferentes escenarios de gestión. La higienización se evaluó utilizando tres microorganismos indicadores de proceso: *E. coli*, SOMCPH y SSRC.
- Evaluar la capacidad de los SOMCPH para actuar como modelos del patógeno enterovirus a lo largo de las vías de tratamiento y gestión de los lodos de depuradora propuestas por el proyecto de la Comisión Europea "Routes", que fue ejecutado durante los años 2011-2014.
- Revisar, adaptar y aplicar una RT-qPCR (Monpoeho et al., 2000) para la detección de enterovirus en muestras ambientales sólidas.
- Investigar en profundidad el comportamiento de las esporas de clostridios reductores de sulfito durante el pretratamiento (ultrasonidos y alcalino) y digestión anaerobia del lodo secundario y evaluar sus capacidades y limitaciones para actuar como indicadores de huevos de helmintos y formas de resistencia de los protozoos en lodos de depuradora y biosólidos.

El segundo bloque comprende los artículos 4 y 5 y está dedicado a valorar la dinámica y comportamiento de varios microorganismos indicadores de contaminación fecal, patógenos y marcadores de MST en los sedimentos fluviales de un río mediterráneo durante episodios de lluvias torrenciales y periodos de sequía. Específicamente, se ha pretendido:

- Valorar la presencia, persistencia y movilización de varios indicadores de la contaminación fecal (cEC, SOMCPH y SSRC), patógenos (SAL y GCEV) y marcadores de MST (GA17PH, SFBIF y TBIF) en los sedimentos.

Objetivos

- Evaluar la utilización de qPCR para la detección de tEC en los sedimentos.
- Desarrollar microcosmos a nivel de laboratorio aptos para valorar la persistencia y movilización de varios indicadores de contaminación fecal (cEC, SFBIF, SOMCPH, GA17PH, tEC y SSRC) en los sedimentos.
- Generar información útil para su inclusión en programas de modelización de microorganismos en cuencas fluviales.

El tercer y último bloque comprende el artículo 6 y está dedicado a la valoración de distintas metodologías de extracción de enterovirus en muestras ambientales sólidas, para su posterior detección mediante RT-qPCR. Específicamente, se ha pretendido:

- Comparar la eficiencia de varios métodos indirectos de extracción de enterovirus basados en la elución con tampón glicina a pH básico seguida de concentración mediante ultracentrifugación y un método directo formado por un kit comercial.
- Comparar dos kits comerciales de extracción de ARN, con respecto a su eficiencia de extracción y su capacidad de eliminación de inhibidores de la RT-qPCR.
- Elaborar un método de extracción flexible válido para diferentes tipos de muestras y concentraciones víricas.

3. Evaluación de la higienización de lodos de depuradora y biosólidos



3. Evaluación de la higienización de lodos de depuradora y biosólidos

3. 1. Estrategias para el tratamiento de los lodos de depuradora

El lodo primario es producido en las EDARs debido al tratamiento físico-químico, cuando la materia sedimentable y en suspensión presente en el agua residual es separada mediante sedimentación por gravedad (decantación primaria) (Fig. 6). Este tipo de lodo está compuesto por agregados de materia orgánica y materia inorgánica y se caracteriza por ser putrescible y fácil de deshidratar en comparación con el secundario (Fig. 10a). El lodo secundario, por su parte, se produce durante el tratamiento biológico o proceso de lodos activados, tratamiento aeróbico que oxida la materia orgánica produciendo CO_2 , NH_4^+ y nueva biomasa celular. Las células microbianas forman flóculos que serán sedimentados (decantación secundaria), generando así dicho lodo secundario. Una parte de este lodo se recircula hacia el proceso de lodos activados para mantener la población bacteriana del reactor, mientras que el resto pasa a la línea de tratamiento de lodos de la EDAR (Fig. 6). Los flóculos que forman el lodo secundario consisten en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares en la que se encuentran embebidos los microorganismos y otra materia orgánica e inorgánica (Fig. 10b) (Ruiz-Hernando, 2015).

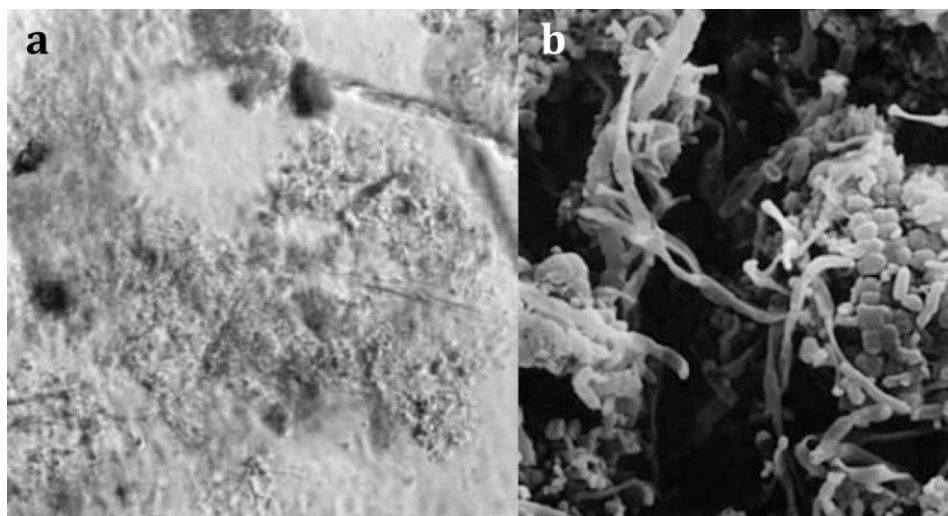


Figura 10. Estructura de los lodos primario y secundario: a) lodo primario mostrando los agregados de materia orgánica e inorgánica (aumentos: 400×); b) lodo secundario mostrando los flóculos de bacterias filamentosas y bacterias cocoides, unidos por sustancias poliméricas extracelulares (aumentos: 5000×). Fuente: Chu y Lee (2004) y Li (2005).

La línea habitual de tratamiento de lodos de depuradora incluye espesado, estabilización y secado de los mismos. Durante el espesado se incrementa el contenido en sólidos mediante la retirada de agua, utilizando para ello espesadores por gravedad, centrífugas, filtros de prensa y sistemas de flotación por aire disuelto. De este modo se disminuye el volumen, lo que facilita el procesamiento posterior al reducir el tamaño de la maquinaria e instalaciones requeridas. El objetivo de la estabilización es la reducción de

patógenos, la eliminación de malos olores y la reducción o eliminación del potencial de putrefacción. El método de estabilización más ampliamente utilizado en la actualidad a nivel mundial es la digestión anaerobia. Durante la misma, los microorganismos producen la descomposición de la materia orgánica en condiciones de estricta anaerobiosis. Como consecuencia, se reduce el volumen de los lodos y se genera biogás (principalmente CH_4 y CO_2) que puede reutilizarse como fuente de energía. Por último, se lleva a cabo el secado, cuyo objetivo es el de reducir el contenido de agua de los lodos por debajo del 10%, permitiendo así su posterior incineración o procesado para la obtención de fertilizante. Normalmente consta de dos pasos: deshidratación mecánica para eliminar el agua libre y posterior evaporación térmica que elimina prácticamente todo el agua restante, incluyendo la superficial, capilar e intracelular (Ruiz-Hernando, 2015).

La conversión de materia orgánica en biogás durante la digestión anaerobia es un proceso que implica diversas reacciones y diferentes grupos de microorganismos. Consta de cuatro fases esenciales (Astals, 2013; Shah et al., 2014):

1. **Hidrólisis:** durante este primer paso un consorcio de bacterias hidrolíticas degradan la materia orgánica compleja, a menudo insoluble, (proteínas, carbohidratos y lípidos) en monómeros solubles (aminoácidos, azúcares simples y ácidos grasos), utilizando para ello enzimas extracelulares, como las celulasas, proteasas y lipasas. Debido a la gran proporción de materia orgánica insoluble que debe ser solubilizada para digerir los materiales de desecho sólidos y semisólidos, se considera que la hidrólisis es la fase limitante de la digestión anaerobia de este tipo de materiales.
2. **Acidogénesis o fermentación:** los compuestos solubles generados durante la hidrólisis son transportados al interior de las bacterias fermentadoras facultativas, donde se convertirán en ácidos grasos volátiles (acetato, butirato, propionato, valerato), así como en ácido láctico, etanol, piruvato, NH_4^+ , H_2S , H_2 y CO_2 . Es la fase más rápida de la digestión anaerobia.
3. **Acetogénesis:** las bacterias acetogénicas convierten los ácidos grasos volátiles (excepto el acetato) y otros productos procedentes de la fase previa en acetato, H_2 y CO_2 .
4. **Metanogénesis:** durante esta última fase los microorganismos metanogénicos transforman los productos de los pasos anteriores en biogás, principalmente CH_4 . El 70% del CH_4 es generado por las arqueas metanógenas acetoclásticas, que rompen el acetato en CH_4 y CO_2 . El 30% restante del CH_4 es producido por bacterias hidrogenotróficas, que combinan H_2 y CO_2 para formar CH_4 y agua.

El proceso de digestión anaerobia puede realizarse en un rango de temperaturas de entre 10°C y 65°C , sin embargo, en la mayoría de los casos se realiza en condiciones mesófilas (alrededor de 35°C) o termófilas (alrededor de 55°C).

Aunque generalmente lodos primarios y secundarios son mezclados en las EDARs formando los llamados lodos mixtos y son así procesados de forma conjunta durante la digestión anaerobia, la separación de los mismos puede suponer importantes ventajas. El lodo primario, debido a su estructura y composición, es más fácil de espesar, digerir y deshidratar por separado, que al ser mezclado con lodo secundario. En cambio, el lodo secundario, al contener el doble de nutrientes y una carga de contaminantes orgánicos y patógenos significativamente menor (Bagnuolo et al., 2009) es más apropiado para su revalorización como fertilizante en agricultura. Sin embargo, también es más difícil de deshidratar debido a los materiales coloidales y a las sustancias poliméricas extracelulares que retienen el agua existente y más difícil de digerir mediante digestión anaerobia debido a las redes de peptidoglicano de las paredes celulares microbianas. En este sentido, la aplicación de pretratamientos es una estrategia útil que provoca la rotura de los flóculos y las células y produce así la liberación del agua intersticial e intracelular y de la materia orgánica intracelular, mejorando las posteriores deshidratación y digestión del lodo secundario (Ruiz-Hernando, 2015).

Los sistemas de tratamiento de los lodos de depuradora se encuentran bajo continua revisión y actualización, incorporándose nuevas estrategias que aumentan la calidad de los lodos y disminuyen los costes de producción. Los objetivos globales de una línea de tratamiento se basan en la reducción de la materia orgánica y el agua para disminuir así la masa y el volumen de los lodos, la disminución del material biodegradable para evitar la generación de malos olores y la eliminación de patógenos, metales pesados y otros contaminantes (Carrère et al., 2010). Se generan de esta forma sistemas de tratamiento más o menos complejos que incluyen combinaciones de digestiones anaerobias y aerobias, mesófilas y termófilas, aplicación de compuestos alcalinos como la cal y la sosa, pasteurización, gasificación, desintegración mediante ultrasonidos, aplicación de tratamientos térmicos, pirólisis, incineración, etc. (Kelessidis y Stasinakis, 2012).

3.2. La necesidad de higienización

Una amplia variedad de patógenos e indicadores se encuentra presente en los lodos, habitualmente a altas concentraciones, tal y como se puede observar en la Tabla 1.

Por otro lado, las concentraciones de patógenos e indicadores habitualmente presentes en el lodo secundario son algo menores que las que se encuentran en el primario (Tabla 2).

Los lodos pueden suponer importantes beneficios para los suelos agrícolas, ya que contienen macronutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio y azufre y micronutrientes como cobre, zinc, calcio, magnesio, hierro, boro, molibdeno y manganeso. Sin embargo, las altas concentraciones de microorganismos patógenos son inaceptables para su reutilización como fertilizantes en agricultura.

Tabla 1. Concentraciones de patógenos e indicadores encontradas en lodos de depuradora. 1 = por gramo de peso seco, 2 = por gramo de peso húmedo, 3 = por litro de lodo, ND = no detectado. Fuente: Sidhu y Toze (2009).

| Microorganismo | Concentración | | Referencia |
|---|--|------------------------|--|
| | Rango | Media | |
| Virus entéricos | 0,004 – 12,51 | 6,26 | ² Payment et al., (2001) |
| | 4,4 – 7 · 10 ² | 3,5 · 10 ² | ¹ Soares et al., (1992) |
| | 4,5 · 10 ³ – 2,5 · 10 ⁴ | | ¹ Pourcher et al., (2005) |
| | 15 – 80 | | ¹ Pourcher et al., (2005) |
| | 1,2 · 10 ² – 1,3 · 10 ⁴ | 6,5 · 10 ³ | ¹ Gibbs et al., (1994) |
| Colifagos somáticos | | 7,0 · 10 ⁴ | ² Lasobras et al., (1999) |
| | | 1,58 · 10 ² | ² Mocé-Llivina et al., (2003) |
| Bacteriófagos F-RNA | | 6,30 · 10 ¹ | ² Mocé-Llivina et al., (2003) |
| | | 2,9 · 10 ⁴ | ² Lasobras et al., (1999) |
| Bacteriófagos de <i>Bacteroides fragilis</i> | | 5,6 · 10 ⁴ | ² Lasobras et al., (1999) |
| Coliformes totales | 1,9 · 10 ⁸ – 1,1 · 10 ¹⁰ | 5,6 · 10 ⁹ | ¹ Soares et al., (1992) |
| Coliformes fecales | 9,2 · 10 ⁷ – 1,7 · 10 ⁹ | 8,9 · 10 ⁸ | ¹ Soares et al., (1992) |
| | 9,3 · 10 ⁶ – 1,7 · 10 ⁹ | 8,5 · 10 ⁸ | ¹ Gibbs et al., (1994) |
| | 7 · 10 ¹ – 1,1 · 10 ⁵ | 3,4 · 10 ⁴ | ² Payment et al., (2001) |
| | | 3,6 · 10 ⁷ | ¹ Dahab y Surampalli, (2002) |
| | | 3,4 · 10 ⁶ | ² Lasobras et al., (1999) |
| <i>E. coli</i> | 3 · 10 ² – 6,2 · 10 ⁴ | 1,5 · 10 ⁴ | ² Payment et al., (2001) |
| | 4,4 · 10 ⁵ – 1,1 · 10 ⁶ | | ¹ Pourcher et al., (2005) |
| Estreptococos fecales | 3,7 · 10 ⁵ – 6,6 · 10 ⁷ | 1,5 · 10 ⁷ | ¹ Soares et al., (1992) |
| | 3,5 · 10 ⁵ – 1,0 · 10 ⁸ | 5 · 10 ⁷ | ¹ Gibbs et al., (1994) |
| | 3 · 10 ² – 1 · 10 ⁴ | 5,1 · 10 ³ | ² Payment et al., (2001) |
| | | 2,1 · 10 ⁷ | ¹ Dahab y Surampalli, (2002) |
| | | 1,5 · 10 ⁵ | ² Lasobras et al., (1999) |
| Enterococos | | 1,58 · 10 ⁴ | ² Mocé-Llivina et al., (2003) |
| | 7,2 · 10 ⁵ – 2,6 · 10 ⁶ | | ¹ Pourcher et al., (2005) |
| <i>Salmonella</i> | 1,1 · 10 ¹ – 5,9 · 10 ³ | 2,9 · 10 ³ | ¹ Gibbs et al., (1994) |
| | 1,2 – 1,3 | | ¹ Pourcher et al., (2005) |
| <i>Aeromonas spp.</i> | | 6,2 · 10 ² | ¹ Dahab y Surampalli, (2002) |
| | 1 · 10 ⁵ – 1,10 · 10 ⁶ | 6 · 10 ⁵ | ³ Chauret et al., (1999) |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 3,30 – 4,10 · 10 ³ | 2 · 10 ³ | ³ Chauret et al., (1999) |
| | 4,5 · 10 ⁴ – 8,1 · 10 ⁴ | | ¹ Pourcher et al., (2005) |
| | 1 · 10 ¹ – 4,5 · 10 ² | 2,3 · 10 ² | ² Payment et al., (2001) |
| <i>Listeria spp.</i> | 3,8 – 5,2 · 10 ² | | ¹ Pourcher et al., (2005) |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 3,8 – 3,8 · 10 ² | | ¹ Pourcher et al., (2005) |
| | 60 – 80 | | ¹ Horan et al., (2004) |
| | 4 · 10 ¹ – 6,3 · 10 ³ | | ¹ Garrec et al., (2003) |
| <i>Salmonella enterica</i> serovar. Senftenberg | 20 – 40 | | ¹ Horan et al., (2004) |
| <i>Giardia</i> | 0,007 – 0,56 | 0,28 | ² Payment et al., (2001) |
| | 1 · 10 ¹ – 2,10 · 10 ² | 1,1 · 10 ² | ³ Chauret et al., (1999) |
| | 0,10 – 9,20 | 4,65 | ² Payment et al., (2001) |
| | 3,1 · 10 ⁴ – 8,1 · 10 ⁴ | 5,6 · 10 ⁴ | ¹ Gibbs et al., (1994) |
| | 7,7 · 10 ¹ – 3,3 · 10 ³ | 1,7 · 10 ³ | ¹ Soares et al., (1992) |

Tabla 2. Concentraciones de patógenos e indicadores encontradas en lodos primarios y secundarios. Resultados por gramo de peso seco. Fuente: Lepeuple et al. (2004) y Mignotte et al. (1999).

| Grupo | Microorganismo | Lodo primario | Lodo secundario |
|------------------|--|---------------|-----------------|
| Bacterias | Coliformes totales | $10^8 - 10^9$ | $7 \cdot 10^8$ |
| | Coliformes fecales | $10^7 - 10^8$ | $8 \cdot 10^6$ |
| | <i>Enterococci</i> | $10^6 - 10^7$ | $2 \cdot 10^2$ |
| | <i>Salmonella</i> spp. | $10^2 - 10^3$ | $9 \cdot 10^2$ |
| | <i>Clostridium</i> spp. | 10^6 | - |
| | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 10^6 | - |
| Virus | Virus entéricos | $10^2 - 10^4$ | $3 \cdot 10^2$ |
| | Colifagos somáticos | $10^4 - 10^5$ | $10^3 - 10^4$ |
| | Bacteriófagos F-RNA específicos | $10^2 - 10^3$ | $10^0 - 10^3$ |
| | Bacteriófagos de <i>Bacteroides fragilis</i> | $10^0 - 10^3$ | 10^1 |
| Protozoos | <i>Giardia</i> spp. | $10^2 - 10^3$ | $10^2 - 10^3$ |
| Helmintos | <i>Ascaris</i> spp. | $10^2 - 10^3$ | 10^3 |
| | <i>Trichuris vulpis</i> | 10^2 | $< 10^2$ |
| | <i>Toxocara</i> spp. | $10^1 - 10^2$ | $3 \cdot 10^2$ |

Se hace imprescindible, por lo tanto, la aplicación de tratamientos de higienización que reduzcan las concentraciones hasta niveles seguros para la salud y el medio natural. En este aspecto, el Borrador elaborado por la Comisión Europea (DG Environment, 2000) para completar la Directiva 86/278/CEE incluye los requisitos mínimos de tratamiento a los que deberían someterse los lodos de depuradora antes de ser aplicados al suelo y los divide en:

- Tratamientos avanzados: capacitan a los lodos para ser aplicados al suelo sin restricciones en todos los ámbitos contemplados en el Borrador, excepto los bosques. El tratamiento debe ser capaz de reducir en al menos 6 unidades logarítmicas la concentración de un indicador de proceso previamente inoculado, como *Salmonella enterica* serovar. Senftenberg W 775. Los lodos tratados no deben contener *Salmonella* spp. en 50 g (peso húmedo) y durante el tratamiento debe producirse una reducción de al menos 6 unidades logarítmicas de la concentración de *E. coli* hasta un máximo de $5 \cdot 10^2$ CFU/g (peso húmedo).
- Tratamientos convencionales: sólo se permite la aplicación en algunos ámbitos y se requiere tomar medidas adicionales como la espera de un tiempo determinado antes de sembrar o cosechar alimentos o restringir el acceso del público durante un tiempo concreto cuando los lodos son aplicados en parques. El tratamiento debe ser capaz de reducir en al menos 2 unidades logarítmicas la concentración de *E. coli*.

Ya fuera de la Unión Europea, Estados Unidos sí dispone de una directiva vigente que establece límites para patógenos e indicadores en los lodos cuyo destino es la aplicación

al suelo. Dicha norma, la 40 CFR Part 503, Subpart D (US Environmental Protection Agency, 2003) sobre control de patógenos y atracción de vectores en lodos de depuradora, clasifica los biosólidos en dos categorías:

- Biosólidos de clase A: pueden ser aplicados al suelo sin restricciones. Deben cumplir con los límites máximos de 3 MPN de *Salmonella* spp., 1 PFU de virus entéricos y 1 huevo viable de helmintos por 4 g (materia seca).
- Biosólidos de clase B: sólo se permite su aplicación en determinados ámbitos y se requieren medidas adicionales de control. Deben cumplir con los límites máximos de $2 \cdot 10^6$ MPN o CFU de coliformes fecales por 1 g (materia seca).

3.3. Indicadores de contaminación fecal y patógenos de referencia para valorar la higienización de lodos de depuradora

Las bacterias se han utilizado como indicadoras de la calidad sanitaria del agua desde que en 1885 Percy y Grace Frankland comenzaron realizando los primeros análisis bacteriológicos de agua en la ciudad de Londres. Concretamente, las primeras bacterias que se relacionaron con las heces humanas fueron *Klebsiella* (Von Fristch en 1880) y *E. coli* (Escherich en 1885) (Ashbolt et al., 2001). Desde entonces, la utilización de bacterias coliformes se ha generalizado hasta el punto de ser el grupo de indicadores fecales por excelencia, incluido en la mayoría de normativas sobre calidad microbiológica. No obstante, los coliformes totales e incluso varios géneros de coliformes termotolerantes pueden ser encontrados en ambientes naturales no contaminados con materia fecal, por lo que se considera que *E. coli* (presente a concentraciones muy altas en heces humanas y animales y raramente encontrada en otros ámbitos) es la especie de coliformes más adecuada como indicadora de la contaminación fecal (WHO, 2011). En el caso de los lodos de depuradora, la inclusión de *E. coli* en la gran mayoría de regulaciones al respecto y, en concreto, en el Borrador elaborado por la Comisión Europea (DG Environment, 2000), la convierten en indicador imprescindible para valorar tanto la calidad de los lodos como los tratamientos de higienización. Sin embargo, la baja resistencia de *E. coli* al estrés ambiental y a los tratamientos habitualmente aplicados en las EDARs (Astals et al., 2012; Grabow, 2001; Mocé-Llivina et al., 2003; Payment y Franco, 1993) hacen que este indicador no conservativo no sea adecuado a la hora de valorar el comportamiento de patógenos más resistentes, como los virus entéricos, los huevos de helmintos y las formas de resistencia de los protozoos.

Con respecto a los virus entéricos, los colifagos muestran características similares a este tipo de patógenos, además de compartir origen fecal (Ashbolt et al., 2001; IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology, 1991; Jofre et al., 2016; WHO, 2011), por lo que se convierten en buenos candidatos para ser utilizados como indicadores en lodos. Aunque no existe una correlación numérica exacta entre las concentraciones de virus entéricos y colifagos en distintos tipos de muestras e incluso se

han detectado virus entéricos en muestras que carecían de colifagos (WHO, 2011), sí que hay consenso a la hora de afirmar que su capacidad para actuar como indicadores de virus entéricos es muy superior a la de las bacterias (Mocé-Llivina et al., 2005). En este sentido, controlar la concentración de colifagos puede ayudar a predecir el riesgo potencial asociado a los virus entéricos (Guzmán et al., 2007a; Rezaeinejad et al., 2014). Se pueden considerar indicadores semi-conservativos. Otra de sus ventajas como indicadores sobre las bacterias es que al igual que los virus patógenos, sólo disponen de dos estados, infecciosos y no infecciosos, evitando así el problema de detección que supone el estado de “*viable pero no cultivable*” (VBNC) de las bacterias. Dentro de su grupo, los colifagos somáticos son de especial interés para su utilización en muestras de lodos debido a su abundancia, a la resistencia que presentan a los tratamientos (Lucena et al., 2005), a la existencia de métodos estandarizados de detección (ISO, 2000; Rice et al., 2012; US Environmental Protection Agency, 2001a; US Environmental Protection Agency, 2001b) y a su facilidad y rapidez de detección, pudiéndose obtener resultados incluso en 4 horas (Blanch et al., 2017; Muniesa et al., 2017; WHO, 2011). Por último, la replicación de los colifagos somáticos en el ambiente ha demostrado ser prácticamente inexistente (Jofre et al., 2016; Muniesa et al., 2003). Por todo ello, últimamente están siendo incluidos en distintas normativas a lo largo del mundo en ámbitos como las aguas regeneradas (North Carolina Administration, 2011; Queensland Government, 2005), aguas subterráneas (NHMRC, 2011; US Environmental Protection Agency, 2006), biosólidos para aplicación en agricultura (República de Colombia, 2014; Western Australia Government, 2012) y acuicultura (FDA/Interstate Shellfish Sanitation Commission, 2015). Se está estudiando también su inclusión en el control de la calidad de aguas de baño y aguas superficiales recreacionales (US Environmental Protection Agency, 2015; US Environmental Protection Agency, 2016).

Con respecto a los patógenos fecales más resistentes (huevos de helmintos y formas de resistencia de los protozoos), las esporas de clostridios reductores de sulfito y, en concreto, de *Clostridium perfringens* han sido propuestas y utilizadas durante años como indicadores en distintos tipos de aguas (Agulló-Barceló et al., 2013; Ashbolt et al., 2001; Hill y Sobsey, 1998; Payment y Franco, 1993). Su uso como indicadores presenta ventajas tales como su abundancia en muestras ambientales contaminadas con materia fecal, su alta resistencia frente a tratamientos intensivos y la existencia de métodos de detección sencillos, rápidos y estandarizados (Guzmán et al., 2007b; Lepeuple et al., 2004; Warnes y Keevil, 2004). En ese sentido, su utilidad como indicador conservativo en la valoración de la higienización de los lodos puede ser de significativa importancia.

Aunque las bajas concentraciones de algunos patógenos detectadas en los lodos de depuradora que aún no han sido tratados (Tablas 1 y 2) dificultan su utilización para valorar los tratamientos de higienización, el estudio de su prevalencia sí resulta de gran importancia a la hora de estimar los riesgos y determinar los requerimientos más apropiados que se deben aplicar a los indicadores. Además, gran parte de las regulaciones incluyen la monitorización de patógenos de referencia (WHO, 2011). Las

bajas dosis mínimas infectivas, así como su presencia y resistencia frente a los tratamientos, revelan la importancia de los virus entéricos. *Rotavirus*, *Enterovirus* y *Norovirus* han sido propuestos como patógenos de referencia (WHO, 2011). El género *Enterovirus* es el agente causante de diversas infecciones gastrointestinales y del tracto respiratorio y de enfermedades como meningitis, miocarditis, parálisis flácida aguda, enfermedad de la mano-pie-boca, fallo multiorgánico neonatal, etc. Se dispone de modelos de dosis-respuesta y de métodos de cultivo celular estandarizados para la detección de partículas infecciosas (US Environmental Protection Agency, 2003). La Tabla 3 muestra las concentraciones de enterovirus normalmente encontradas a lo largo del tratamiento de los lodos de depuradora. Teniendo en cuenta los bajos niveles (en MPNCU) encontrados en lodos sometidos a digestión anaerobia mesófila es fácil entender la dificultad de detección del patógeno cuando se aplican tratamientos más intensos. Para solucionar este inconveniente, la utilización de técnicas moleculares como la RT-qPCR puede ser una opción. De hecho, la Tabla 3 muestra cómo los niveles de enterovirus encontrados utilizando esta técnica son suficientemente altos como para valorar el efecto de los tratamientos de los lodos. Sin embargo, la sensibilidad de esta técnica radica en la detección de genomas y, por lo tanto de partículas víricas totales, ya sean infecciosas o no, por lo que su utilidad real para valorar la efectividad de inactivación de los tratamientos queda reducida a casos concretos en los que el tratamiento no sólo inactive el virus, sino que a la vez destruya su material genético. Otra opción es la utilización de RT-qPCR en combinación con colorantes de viabilidad, como el PMA o el EMA, pero son técnicas que aún requieren de un mayor desarrollo antes de poder ser aplicadas de modo rutinario (Elizaquível et al., 2014; van Frankenhuyzen et al., 2011).

Tabla 3. Concentraciones de enterovirus encontradas a lo largo del tratamiento de los lodos de depuradora. 1 = Resultados en MPNCU o PFU/100 ml o 100 g. 2 = Resultados en GC/100 g. Fuente: Lucena et al. (2005).

| Lodo primario | Lodo secundario | Lodo primario espesado | Lodo digerido (digestión anaerobia mesófila) | Reducciones logarítmicas (\log_{10}) | Referencia |
|------------------|------------------|------------------------|--|--|---------------------------------------|
| $2,3 \cdot 10^3$ | $8,2 \cdot 10^2$ | - | $2,2 \cdot 10^2$ | ≈ 1 | ¹ Berman et al., (1981) |
| $1,5 \cdot 10^3$ | $1,4 \cdot 10^2$ | - | $8,0 \cdot 10^1$ | $\approx 1 - 2$ | ¹ Berman et al., (1981) |
| - | - | $2,5 \cdot 10^2$ | $2,8 \cdot 10^1$ | ≈ 1 | ¹ Safferman et al., (1988) |
| $4,2 \cdot 10^4$ | - | - | $5,1 \cdot 10^2$ | ≈ 2 | ¹ Lewis et al., (1983) |
| - | $3,3 \cdot 10^3$ | - | $1,6 \cdot 10^2$ | ≈ 1 | ¹ Soares et al., (1994) |
| $4,6 \cdot 10^3$ | $2,9 \cdot 10^2$ | - | $7,0 \cdot 10^1$ | $\approx 1 - 2$ | ¹ Monpoeho et al., (2000) |
| $1,4 \cdot 10^6$ | $9,4 \cdot 10^4$ | - | $4,8 \cdot 10^5$ | ≈ 1 | ² Monpoeho et al., (2000) |

Por último, aunque algunas normativas y propuestas de normativas, como el Borrador elaborado por la Comisión Europea (DG Environment, 2000), valoran la efectividad de un tratamiento utilizando cepas microbianas concretas previamente inoculadas en los lodos, esta técnica consta de algunas desventajas importantes. Por un lado, los microorganismos cultivados en laboratorio muestran una capacidad de adaptación y

resistencia al estrés inferior a las de aquellos microorganismos indígenas presentes en los lodos, por lo que pueden dar lugar a una sobreestimación del efecto del tratamiento. Por otro lado, la complejidad de la estructura de los lodos y las grandes cantidades que se manejan normalmente en una EDAR dificultan la aplicación homogénea del inóculo. Debido a ello, la monitorización de microorganismos indígenas y de los efectos del tratamiento sobre ellos es una aproximación más realista y más sencilla de llevar a cabo (Lucena et al., 2005).

3.4. Artículo 1: Efecto de los pretratamientos de ultrasonidos, térmico a baja temperatura y alcalino sobre la reología, higienización y potencial de biometanización del lodo secundario

3.4.1. Resumen

La mayor concentración de nutrientes y la menor carga de patógenos y contaminantes orgánicos que posee el lodo secundario con respecto al primario hacen que su procesamiento por separado sea una estrategia prometedora a la hora de obtener un biosólido apto para su utilización como fertilizante. Sin embargo, la digestión anaerobia del lodo secundario es difícil de llevar a cabo debido a la gran cantidad de microorganismos presente en los flóculos y la dificultad para degradar sus paredes celulares. En este contexto, la aplicación de pretratamientos pretende mejorar la biodegradabilidad del lodo secundario al producir la desintegración de los flóculos y la rotura de las células microbianas, liberando así su contenido y haciéndolo accesible para su degradación mediante digestión. El efecto positivo de un pretratamiento se verá reflejado, asimismo, en un aumento del potencial de biometanización, es decir, una mayor producción de CH₄.

El pretratamiento mediante ondas de ultrasonidos (≥ 20 kHz) se basa en el proceso de cavitación para producir la desintegración de la estructura del lodo. El pretratamiento térmico a bajas temperaturas ($\leq 100^\circ\text{C}$), por su parte, es capaz de reducir la viscosidad del lodo y liberar la materia orgánica intracelular. El pretratamiento alcalino produce, entre otros efectos, la saponificación de los lípidos de las paredes celulares y la subsecuente lisis celular. Por otro lado, los pretratamientos tienen la potencialidad de inactivar los patógenos presentes en el lodo, y pueden ser útiles a la hora de higienizar, pudiéndose utilizar también como post-tratamientos después de la digestión anaerobia. La higienización producida puede valorarse utilizando *E. coli*, SOMCPH y SSRC como indicadores de proceso. Finalmente, el adecuado control de los tratamientos aplicados requiere del estudio de la reología asociada, con el fin de comprender los efectos producidos en la viscosidad y filtrabilidad del lodo.

El objetivo de este artículo fue el de comparar el efecto de tres tipos de pretratamientos (ultrasonidos, térmico y alcalino) sobre la reología, higienización y potencial de biometanización del lodo secundario, con la intención de ofrecer una visión general sobre las distintas opciones de tratamiento y gestión del lodo producido en las EDARs.

Para ello, inicialmente se ensayaron varias condiciones para cada pretratamiento y se escogió, en cada caso, la condición óptima en base a la reología y la higienización. Las condiciones ensayadas para cada pretratamiento fueron:

- Ultrasonidos: energías específicas de 5000, 11000 y 27000 kJ/kg ST.
- Térmico: 80°C durante 10, 15 y 30 min.
- Alcalino: aplicación de 35,3, 70,6 y 157 g NaOH/kg ST con un tiempo de contacto de 24 h.

Ninguna de las condiciones de ultrasonidos redujo los niveles de los indicadores analizados. Durante el tratamiento térmico las concentraciones de *E. coli* cayeron por debajo del límite de detección a los 15 min; los SOMCPH fueron inactivados en mayor grado al aumentar el tiempo de tratamiento, pero siempre dentro de niveles detectables; las concentraciones de SSRC permanecieron constantes. El tratamiento alcalino redujo las concentraciones de los tres microorganismos consiguiendo para *E. coli* y a la dosis de 157 g NaOH/kg ST los niveles de higienización exigidos por la EPA para biosólidos de clase B y por el Borrador de la Comisión Europea. Sin embargo, la dosis de 35,3 g NaOH/kg ST produjo aumentos inesperados de 1,04 log₁₀ en las concentraciones de SSRC y 0,87 log₁₀ en las de *E. coli*. Las condiciones óptimas escogidas, teniendo en cuenta estos resultados y la reología, fueron: 27000 kJ/kg ST para ultrasonidos, 80°C durante 15 min para térmico y 157 g NaOH/kg ST para alcalino. En el caso del tratamiento de ultrasonidos, el óptimo se seleccionó en base a criterios reológicos (disminución de la viscosidad).

A continuación, el lodo fue pretratado con las condiciones óptimas de cada tratamiento y sometido a digestión anaerobia a 37 ± 1°C durante 35 días, con el fin de evaluar la mejora en la biodegradabilidad y en el potencial de biometanización producida por los pretratamientos. Con respecto a la microbiología, las concentraciones de *E. coli* se redujeron por debajo del límite de detección en todos los casos ensayados, incluyendo el lodo pretratado mediante ultrasonidos, lo que indica que el efecto de la digestión por sí solo ya es suficiente para rebajar los niveles de la bacteria hasta cumplir con las exigencias del Borrador de la Comisión Europea y de la EPA. Los niveles de SOMCPH se vieron afectados de forma similar con las tres configuraciones ensayadas, alcanzando reducciones de entre 2,32 y 2,47 log₁₀. Las concentraciones de SSRC se mantuvieron sin cambios antes y después de la digestión del lodo sometido a pretratamiento térmico. Sin embargo, los niveles de SSRC en el lodo pretratado mediante ultrasonidos y el pretratado mediante NaOH experimentaron importantes incrementos al ser sometidos a digestión anaerobia, específicamente 1,62 (ultrasonidos) y 1,80 log₁₀ (NaOH). Así, desde el punto de vista de la higienización, la configuración de pretratamiento térmico y digestión anaerobia produjo los mejores resultados. Sin embargo, con respecto a la biodegradabilidad y el potencial de biometanización, los mejores resultados se obtuvieron mediante la configuración de pretratamiento alcalino y digestión anaerobia.

En tercer lugar, se estudió la capacidad de higienización de los tres tratamientos (en las condiciones óptimas escogidas) al actuar como post-tratamientos. Para ello, el lodo sin tratar fue sometido a digestión anaerobia y a la posterior acción de los tratamientos. De nuevo, las concentraciones de *E. coli* cayeron por debajo del límite de detección debido al efecto de la digestión por sí solo. La digestión redujo los niveles de SOMCPH en 1,88 \log_{10} y el post-tratamiento de ultrasonidos no produjo ningún efecto adicional; la digestión y posteriores tratamientos térmico y alcalino dieron lugar a reducciones de 3,42 y 2,56 \log_{10} , respectivamente. Las concentraciones de SSRC permanecieron constantes. Así, la configuración de digestión seguida de post-tratamiento térmico resultó ser la más efectiva en cuanto a higienización del lodo.

Finalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se estudiaron los diferentes escenarios de procesamiento del lodo secundario que podrían llevarse a cabo en una EDAR.

Se pudo concluir, por lo tanto, lo siguiente:

- Las condiciones estudiadas de ultrasonidos como pretratamiento no fueron capaces de higienizar el lodo secundario, mientras que los pretratamientos térmico y alcalino sí lo hicieron, en distinto grado dependiendo de la intensidad aplicada.
- La digestión anaerobia mesófila del lodo secundario produjo un lodo final que cumple con los límites de *E. coli* establecidos por el Borrador de la Comisión Europea y la EPA, fue capaz de reducir los niveles de SOMCPH y no produjo efecto alguno sobre las concentraciones de SSRC. La aplicación de post-tratamientos térmico y alcalino fueron útiles para completar la acción de la digestión.
- Las concentraciones iniciales de *E. coli* en el lodo secundario no fueron lo suficientemente altas como para valorar las reducciones producidas por los distintos procesos. La aplicación de 35,3 g NaOH/kg ST incrementó las concentraciones de la bacteria.
- Las concentraciones de SOMCPH fueron capaces de reflejar la intensidad de los tratamientos aplicados al lodo, siendo lo suficientemente altas en el lodo secundario sin tratar como para seguir siendo detectables en el lodo sometido a tratamiento.
- La aplicación de 35,3 g NaOH/kg ST incrementó las concentraciones de SSRC. La digestión del lodo y su posterior tratamiento con 157 g NaOH/kg ST o con 27000 kJ/kg ST también incrementó sus concentraciones. Este hecho puso en duda la capacidad de las SSRC para actuar como indicadores de huevos de helmintos y formas de resistencia de los protozoos.
- Los SOMCPH son un buen candidato a incluir en las normativas que regulan la higienización de los lodos de depuradora.

3.4.2. Informe sobre el factor de impacto

El artículo *“Effect of ultrasound, low-temperature thermal and alkali pre-treatments on waste activated sludge rheology, hygienization and methane potential”* ha sido publicado por la revista *“Water Research”* en el año 2014. En ese mismo año, según el *“InCites Journal Citation Report”*, la revista se encontraba dentro del primer cuartil (Q1) de las áreas temáticas de *“Water Resources”* y *“Environmental Sciences”*, con un factor de impacto de 5,528.

3.4.3. Informe de participación

La doctoranda Julia Martín Díaz ha llevado a cabo todos los análisis microbiológicos incluidos en el artículo *“Effect of ultrasound, low-temperature thermal and alkali pre-treatments on waste activated sludge rheology, hygienization and methane potential”*. Asimismo, ha contribuido de forma activa en la elaboración del diseño experimental y en la discusión de los resultados obtenidos. Por último, la doctoranda ha participado activamente en la redacción del artículo y en la preparación de las tablas y las figuras.

El artículo ha sido utilizado por la coautora Maria Ruiz Hernando para la elaboración, en 2015, de su tesis doctoral titulada *“Effect of ultrasound, low-temperature thermal and alkali treatments on physicochemical and biological properties of waste activated sludge”*.

Barcelona, junio de 2017

Dr. Francisco Lucena Gutiérrez



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres



Effect of ultrasound, low-temperature thermal and alkali pre-treatments on waste activated sludge rheology, hygienization and methane potential



M. Ruiz-Hernando^a, J. Martín-Díaz^{b,c}, J. Labanda^{a,c,*}, J. Mata-Alvarez^{a,c},
J. Llorens^{a,c}, F. Lucena^{b,c}, S. Astals^{a,d}

^a Department of Chemical Engineering, University of Barcelona, C/Martí i Franquès 1, 6th Floor, 08028 Barcelona, Spain

^b Department of Microbiology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

^c The Water Research Institute, University of Barcelona, Av. Diagonal 684, 08034 Barcelona, Spain

^d Advanced Water Management Centre, The University of Queensland, St Lucia, QLD 4072, Australia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 February 2014

Received in revised form

8 May 2014

Accepted 11 May 2014

Available online 22 May 2014

Keywords:

Waste activated sludge

Anaerobic digestion

Pre-treatment

Rheology

Hygienization

Post-treatment

ABSTRACT

Waste activated sludge is slower to biodegrade under anaerobic conditions than is primary sludge due to the glycan strands present in microbial cell walls. The use of pre-treatments may help to disrupt cell membranes and improve waste activated sludge biodegradability. In the present study, the effect of ultrasound, low-temperature thermal and alkali pre-treatments on the rheology, hygienization and biodegradability of waste activated sludge was evaluated. The optimum condition of each pre-treatment was selected based on rheological criteria (reduction of steady state viscosity) and hygienization levels (reduction of *Escherichia coli*, somatic coliphages and spores of sulfite-reducing clostridia). The three pre-treatments were able to reduce the viscosity of the sludge, and this reduction was greater with increasing treatment intensity. However, only the alkali and thermal conditioning allowed the hygienization of the sludge, whereas the ultrasonication did not exhibit any notorious effect on microbial indicators populations. The selected optimum conditions were as follows: 27,000 kJ/kg TS for the ultrasound, 80 °C during 15 min for the thermal and 157 g NaOH/kg TS for the alkali. Afterward, the specific methane production was evaluated through biomethane potential tests at the specified optimum conditions. The alkali pre-treatment exhibited the greatest methane production increase (34%) followed by the ultrasonication (13%), whereas the thermal pre-treatment presented a methane potential similar to the untreated sludge. Finally, an assessment of the different treatment scenarios was conducted considering the results together with an energy balance, which revealed that the ultrasound and alkali treatments entailed higher costs.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Department of Chemical Engineering, University of Barcelona, C/Martí i Franquès 1, 6th Floor, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: jlabanda@ub.edu (J. Labanda).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.012>

0043-1354/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mesophilic anaerobic digestion (AD) of sewage sludge, which is a mixture of primary and waste activated sludge (WAS), is a commercial reality, due to the high biodegradability of primary sludge. However, WAS, which is primarily formed by microorganisms, is more difficult to degrade through AD due to the glycan strands present in the microbial cell walls (Appels et al., 2008). Accordingly, numerous disintegration methods (e.g., ultrasound, thermal or alkali) have been employed for pre-treatment under the assumption that these methods are capable of disrupting cell walls and therefore to release the intracellular organic material into the liquid phase (Appels et al., 2008; Farno et al., 2014). The hydrolysis produced by ultrasound conditioning is due to the generation of cavitation gas-bubbles (Tiehm et al., 2001), which grow to a critical size and violently collapse, producing significant hydro-shear strength, intense local heating and high pressures in the mass of the liquid surrounding the bubbles (Bougrier et al., 2006). Additionally, cavitation generates free radicals that contribute to cell wall disruption (Foladori et al., 2007). Thermal pre-treatment has also been used to facilitate the digestion of WAS to methane because it results in the breakdown of the gel structure of the sludge and the subsequent release of the intracellular organic matter (Neyens and Baeyens, 2003). Alkali pre-treatment is also considered an appropriate method for enhancing the biodegradation of complex organic matter (Lopez-Torres and Espinosa-Lloréns, 2008). The basis of this pre-treatment is that the alkali added to the sludge reacts with the cell walls in several ways, including a saponification of the lipids in the cell walls, which causes the disruption of the microbial cells (Neyens et al., 2003).

These pre-treatments may also have effects on sludge hygienization and therefore could be used as both pre-treatment and post-treatment, depending on the requirements of the wastewater treatment plant (WWTP). It is well-known that temperature (Mocé-Llivina et al., 2003; Ziembra and Peccia, 2011; Astals et al., 2012a) and alkali compounds (Allievi et al., 1994; Bujockzek et al., 2002) are capable in reducing the pathogen load of the sludge. In contrast, the effect of the ultrasonication is difficult to predict due to the complexity and several factors involving this treatment (Pilli et al., 2011). However, it has been reported that conventional bacterial indicators may not provide a precise indication of the fate of viruses and protozoa during sludge treatments because such pathogens survive the environmental stresses more successfully than the conventional indicators (Lucena et al., 1988; Payment and Franco, 1993). Therefore, the availability of new microorganisms able to overcome the limitations of conventional indicators is of major importance. Spores of sulfite-reducing clostridia (SSRC) have been proposed as alternative indicators of protozoan oocysts in water treatment (Payment and Franco, 1993) while bacteriophages of enteric bacteria (as somatic coliphages; SOMCPH) have been proposed as surrogates of waterborne viruses in water quality control processes (IAWPRC, 1991).

The aforementioned pre-treatments may also play an important role on WAS viscosity and filterability (Bougrier

et al., 2006; Pham et al., 2010; Ruiz-Hernando et al., 2013). Accordingly, a proper understanding of the rheology, which is the discipline that addresses the deformation of fluids, is essential to control sludge treatment processes. WAS is considered a non-Newtonian fluid behaving as a pseudo-plastic fluid (Seyssiecq et al., 2007), which means that the viscosity decreases with the applied shear rate. The Ostwald-de Waele model is commonly used to represent the non-Newtonian behavior of sludge, most likely due to its simplicity and good fitting (Bougrier et al., 2006; Ratkovich et al., 2013). Other models, such as the Herschel-Bulkley model, the Bingham model or the Casson model are also valid (Estiaghi et al., 2013; Ratkovich et al., 2013). In contrast to the Ostwald-de Waele equation, these models are characterized by the presence of yield stress, below which the sample to analyze is not flowing. However, one fundamental problem with the concept of yield stress is the difficulty in determining the true yield stress (Labanda et al., 2007) because its determination is not univocal and can vary over a wide range depending on the equation used.

The aim of the present study is to compare the effect of ultrasound, low-temperature thermal and alkali pre-treatments on WAS rheology, hygienization and methane potential, in order to provide an overall view of feasible scenarios for WAS management. First, preliminary assays were conducted to obtain the optimum condition of each pre-treatment based on rheology (i.e., the reduction of steady state viscosity) and hygienization (i.e., the reduction of *Escherichia coli*, SOMCPH and SSRC). Next, biomethane potential tests and the hygienization of the digested sludge were analyzed under the optimum conditions. The untreated digested sludge, obtained after 35 days of anaerobic digestion, was post-treated at the same optimum conditions applied to the pre-treatments. Finally, the economic feasibility of each treatment was conducted, and the various scenarios for sludge management were discussed.

2. Materials and methods

2.1. Waste activated sludge and inoculum origin

The WAS and inoculum (i.e., digested sludge) samples used in this study were collected from a municipal WWTP in the Barcelona metropolitan area (Spain). At the WWTP, the WAS was thickened by centrifugation after leaving the secondary tank. The WAS samples were collected weekly to guarantee the reliability of the microbiological tests. Samples were stored below 4 °C until their utilization.

2.2. Pre-treatments conditions

The pre-treatments studied in this research were ultrasound, low-temperature thermal and alkali. The ultrasonic apparatus used was an HD2070 Sonopuls Ultrasonic Homogenizer equipped with a MS 73 titanium microtip probe (Bandelin, Berlin, Germany; 20 kHz). The beaker containing the samples was submerged in an ice bath to prevent increases of sludge temperature due to the thermal effect of the cavitation phenomenon. The ultrasonic waves were applied at constant

power and different application times to provide different specific energies (E_s): 5,000, 11,000 and 27,000 kJ/kg total solids (TS). The thermal pre-treatment was performed in a heating bath (Huber Polystat CC2) at two fixed temperatures, 70 and 80 °C. The exposure times were 10, 20 and 30 min at 70 °C, and 10, 15 and 30 min at 80 °C. The time required to reach both temperatures were 10 min and was included in the exposure time, i.e., the exposure time of 15 min corresponds to 10 min heating ramp up +5 min heating at 80 °C. The reagent used for alkali conditioning was NaOH because it is cheaper and more efficient for sludge disintegration than KOH or Ca(OH)₂ (Li et al., 2008; Uma-Rani et al., 2012). The alkali pre-treatment was conducted at room temperature (approximately 25 °C) by adding different doses of NaOH and a contact time of 24 h. Samples were subsequently neutralized with HCl_{35%} to reach a pH range of 6.5–7.5. The concentrations studied were 35.3, 70.6 and 157 g NaOH/kg TS. The effect of dilution due to the reagents was corrected by adding deionized water to the alkali-treated sludge samples in order to maintain a constant volume. The increase in salinity due to the alkali addition was not corrected.

The effect of the optimum condition of each pre-treatment on WAS solubilization was determined by: (i) the soluble chemical oxygen demand (sCOD) to total chemical oxygen demand (tCOD) percentage ratio (sCOD/tCOD × 100) and (ii) the COD solubilization degree (SD) (Eq. (1); Table 1).

$$SD (\%) = \frac{sCOD_f - sCOD_0}{tCOD_0 - sCOD_0} \cdot 100 \quad (1)$$

where sCOD_f is the soluble COD after the pre-treatment, sCOD₀ is the soluble COD before the pre-treatment and tCOD₀ is the total COD before the pre-treatment.

2.3. Microbiological tests

The occurrence and levels of two bacterial indicators (*E. coli* and SSRC) and one viral indicator (SOMCPH) were controlled in this research, by evaluating their indigenous populations in the sludge during the different treatment processes.

2.3.1. Bacterial enumeration

5 to 10 g of sludge were mixed in a 1:10 (W/V) ratio with phosphate buffered saline (PBS) solution at pH 7.2, homogenized with a wrist action shaker at 900 osc/min for 30 min at room temperature and centrifuged at 300 g for 3 min at 4 °C. The resulting supernatant was utilized for analyzing both the *E. coli* and the SSRC present in the sample. For this purpose, serial dilutions were made. *E. coli* was tested by the pour plate procedure on Chromocult agar (Merck, Germany) supplemented with *E. coli*/coliforms-Selective Supplement (Merck, Germany). Plates were incubated at 44 °C overnight (O/N), and dark-blue/purple *E. coli* colonies were counted. For the SSRC present in the sample, the supernatant and dilutions were subjected to a thermal shock of 80 °C for 10 min. Then, the samples were anaerobically cultured by mass inoculation in *Clostridium perfringens* selective agar (Scharlab, Spain) and finally incubated at 44 °C O/N. The typical black spherical colonies with black halos were counted as SSRC. The analyses were performed in duplicate.

2.3.2. Bacteriophages enumeration

SOMCPH were extracted from sludge as described by Guzmán et al. (2007). Briefly, 5–10 g of the sludge sample was mixed in a 1:10 (W/V) ratio with a solution (pH 7.2) containing 10% beef extract powder (Becton Dickinson, France) and homogenized with a wrist action shaker at 900 osc/min for 30 min at room temperature. Next, the sample was centrifuged at 4000 g for 30 min at 4 °C. The supernatant was filtered through a 0.22 μm pore size polyethersulfone non-protein binding membrane filter (Millipore, USA). The permeate was analyzed for the presence of SOMCPH as indicated in the ISO 10705-2 standard (Anonymous, 2000). The analyses were performed in duplicate.

2.4. Rheological study

The rheometer used was a Haake RS300 control stress rheometer equipped with HAAKE Rheowin Software. The geometry used was a 4° cone and a flat stationary 35 mm-

Table 1 – Characterization of the raw and pre-treated WAS. Errors represent standard deviations.

| | Units | WAS | US-WAS | T-WAS | NaOH-WAS |
|--|---------------------|------------|------------|-------------------|-------------------------|
| <i>Waste characterization</i> | | | | | |
| TS | g/L | 64.2 ± 0.2 | 65.7 ± 0.1 | 64.6 ± 0.1 | 72.3 ± 0.1 |
| VS | g/L | 52.9 ± 0.2 | 53.9 ± 0.1 | 53.0 ± 0.1 | 49.5 ± 0.2 |
| tCOD | g O ₂ /L | 80.9 ± 0.4 | 80.5 ± 0.3 | 81.6 ± 0.5 | 75.7 ^a ± 0.4 |
| sCOD | g O ₂ /L | 0.9 ± 0.1 | 10.3 ± 0.2 | 9.6 ± 0.2 | 12.1 ^b ± 0.1 |
| pH | – | 6.5 ± 0.1 | 6.4 ± 0.2 | 6.4 ± 0.2 | 7.5 ± 0.1 |
| VFA | mg/L | 223 ± 10 | 952 ± 16 | 293 ± 21 | 560 ± 18 |
| Acetate | mg/L | 165 ± 4 | 634 ± 5 | 249 ± 18 | 481 ± 14 |
| Propionate | mg/L | 22 ± 5 | 197 ± 9 | 25 ± 8 | 22 ± 3 |
| Butyrate | mg/L | 23 ± 1 | 53 ± 4 | 19 ± 2 | 31 ± 2 |
| Valerate | mg/L | 13 ± 1 | 68 ± 1 | n.d. ^c | 26 ± 2 |
| <i>Pre-treatment solubilization efficiency</i> | | | | | |
| sCOD/tCOD | % | 1.1 ± 0.1 | 12.8 ± 0.2 | 11.7 ± 0.2 | 16.0 ± 0.2 |
| SD | % | – | 11.8 ± 0.4 | 10.8 ± 0.6 | 14.0 ± 0.6 |

^a Obtained by multiplying the SV by 1.53 g COD/g VS due to chloride interference in the COD analysis.

^b Obtained after removing the chloride COD determined in tCOD analysis.

^c n.d. non-detected (<10 mg/L).

diameter plate. Measurements were conducted at 22.0 ± 0.1 °C. The rheological behavior of the sludge under flow conditions was analyzed by shear rate step test, which consisted of shearing the sludge at a fixed shear rate for 15 min, time enough to reach the steady-state value (equilibrium value). The applied shear rates were: 5, 30, 125 and 300 s^{-1} . Steady-state shear stress, τ_e (Pa), was determined following a first-order kinetic equation with the shear rate step test (Ruiz-Hernando et al., 2010). The experimental shear stresses were fitted to the Ostwald-de Waele equation:

$$\tau_e = K\dot{\gamma}^n \quad (2)$$

where $\dot{\gamma}$ is the shear rate (s^{-1}), K is the consistency index (Pa s^n) and n is the power law index (–).

Finally, the steady state viscosity was determined following Newton's equation ($\eta_e = \tau_e/\dot{\gamma}$).

2.5. Chemical analytical methods

Analyses of the total fraction were performed directly on the samples or dilutions. For analyses of the soluble fraction, the samples were centrifuged at 1252 g for 10 min and the supernatant was filtered through a regenerated cellulose 0.45 μm filter (CHM[®] SRC045025Q). TS, volatile solids (VS), tCOD and sCOD were determined following the guidelines given by the standard methods 2540G and 5220D (APHA, 2005). The losses of volatile fatty acids (VFA) compounds during the solids determination were taken into account and combined to give the final TS and VS values (Astals et al., 2012a). The pH was measured with a Crison 5014T pH probe. Individual VFA (acetate, propionate, butyrate and valerate) were analyzed by an HP 5890-Series II chromatograph equipped with a capillary column (Nukol[™]) and a flame ionization detector (Astals et al., 2012b). The ionic profiles were determined in an 863 Advanced Compact IC Metrohm ionic chromatographer using Metrosep columns.

2.6. Biomethane potential tests

Biomethane potential (BMP) tests were carried out at mesophilic temperature conditions following the stages defined by Angelidaki et al. (2009). The BMP tests were performed in 115 mL serum bottles, closed with a PTFE/butyl septum, which was fixed by an aluminum crimp cap. The bottles were filled in with 60 mL of inoculum and 13 mL of WAS sample (untreated or treated), which met an inoculum to substrate ratio of 2 in VS-basis considering the untreated WAS VS value. A control blank with only inoculum was measured to determine the background effect of the inoculum. Before sealing the bottles, all digesters were flushed with nitrogen for one minute (3 L/min). Finally, digesters were placed in a water bath at 37 ± 1 °C. The bottles were manually mixed by swirling twice daily. All samples were tested in triplicate.

The biogas production during the running test was measured by using a vacuumeter (Ebro – VAM 320) after discarding the overpressure generated during the first hour. The methane content of the biogas accumulated in the bottle headspace was analyzed at each sampling event by a Shimadzu GC-2010 + gas chromatograph equipped with a

capillary column (Carboxen[®]-1010 PLOT) and a thermal conductivity detector. Finally, methane production over time was obtained by multiplying the biogas production, subtracting the vapor pressure and converted to standard temperature and pressure conditions (i.e., converted to 0 °C and 1 atm) by the percentage of methane in the biogas.

2.7. Model implementation and data analysis

Mathematical analysis of the BMPs was based on the IWA Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1; Batstone et al., 2002). WAS degradation was modeled using first-order kinetics because the hydrolysis step is considered the rate-limiting step during WAS degradation (Appels et al., 2008) (Eq. (3)).

$$r_{\text{was}} = f_{\text{was}} \cdot k_{\text{hyd,was}} \cdot X_{\text{was}} \quad (3)$$

where r_{was} is the process rate (mL $\text{CH}_4/\text{L}\cdot\text{day}$), f_{was} is the substrate biodegradability (–), $k_{\text{hyd,was}}$ is the first order hydrolysis rate constant of the WAS (day^{-1}), and X_{was} is the WAS concentration (g COD/L).

The model was implemented in Aquasim 2.1d. Parameter estimation and uncertainty analysis were simultaneously estimated, with a 95% confidence limit, as was the case for Batstone et al. (2003, 2009). Uncertainty parameters (f_{was} and $k_{\text{hyd,was}}$) were estimated based on a one-tailed t-test with standard error around the optimum, and non-linear confidence regions were also tested to confirm that the linear estimate was representative of true confidence (Jensen et al., 2011). The objective function was the sum of squared errors (χ^2) of averaged data from triplicate experiments.

3. Results and discussion

3.1. Effect of the pre-treatments on the higienization and rheological profile of the WAS

An initial set of assays was carried out to determine appropriate conditions of each treatment for further biomethanization studies. This selection was performed based on the higienization and rheological characterization of sludge. Different microbiological results were obtained with the three pre-treatments conducted (Fig. 1). For the ultrasound, small changes in the levels of microbial indicators were found, even at the highest E_s applied (27,000 kJ/kg TS). Thus, the ultrasonication conditions tested in this research were not effective enough to achieve higienization. Because the effect of temperature was nullified by the ice bath, the disinfection mechanism was exclusively related to cell wall disruption due to cavitation, a phenomenon that is influenced by several factors (Pilli et al., 2011). According to Foladori et al. (2007) and Cui et al. (2011), ultrasonication appeared to have two effects: a first step, in which the sludge flocs were dissipated, and the microbial cells attached to the solids were released; and a second step, in which the walls of the exposed cells were disrupted. Thus, it is conceivable that the specific energies applied were effective enough to dissipate sludge flocs but not for killing bacteria and spores or for inactivating bacteriophages. However, to confirm this, more research is

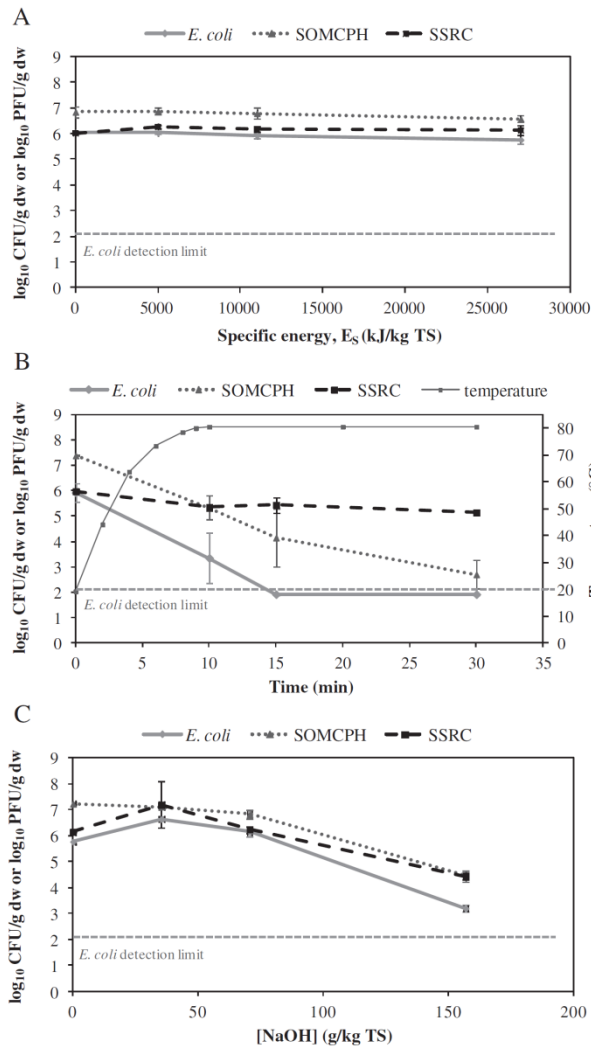


Fig. 1 – Effect of the ultrasound, low-temperature thermal and alkali treatments on indicator populations (*E. coli*, SOMCPH, and SSRC). A: ultrasound conditions; B: thermal conditions; C: alkali conditions. Error bars represent standard deviations.

required. For thermal treatments, better results were obtained at 80 °C compared with 70 °C (data not shown for 70 °C). At 80 °C, the three microbial indicators behaved differently: there was a slight reduction for SSRC (0.84 log₁₀ of reduction), approximately 5 log₁₀ of reduction for SOMCPH and a very high grade of hygienization for *E. coli* (>4.01 log₁₀ of reduction). In fact, after 15 min, the *E. coli* population significantly dropped below the detection limit of the technique (2.02 log₁₀ CFU/g dw or 4.00 CFU/g ww), satisfying normal levels accepted by the EPA (US Environmental Protection Agency, 2003) and the 3rd official draft from the EU (Environment DG, EU, 2000) for land application of the biosolids. These behaviors are similar to those described by Mocé-Llivina et al. (2003), showing a great sensitivity of *E. coli*, a moderate sensitivity of SOMCPH and a good resistance of SSRC toward thermal treatment. In this context, the use of the three microbial indicators may

offer a complete interpretation of the effect of thermal treatments on the microbial population of the WAS. For alkali pretreatment, the disinfecting effect of high pH was previously confirmed (Allievi et al., 1994; Bujoczek et al., 2002). In the present work, a similar pattern of inactivation in the three indicators was found after alkali treatment. The highest concentration of NaOH (157 g/kg TS) exhibited an extreme pH (approximately 12) during the 24 h treatment and was lethal for all three microorganisms. Therefore, the required hygienization levels for *E. coli* were accomplished, with a value of 3.20 log₁₀ CFU/g dw (95.6 CFU/g ww) for a reduction of 2.57 log₁₀. Likewise, SOMCPH and SSRC levels were reduced by 2.79 and 1.72 log₁₀, respectively. Unexpectedly, increases in SSRC and *E. coli* levels (1.04 log₁₀ and 0.87 log₁₀, respectively) were observed with the application of 35.3 g NaOH/kg TS. This reproducible result is not described in this study and is currently being investigated. It is important to note that bacteria could experience multiple physiological states; this fact may prevent the measurement of actual concentrations. In contrast, viruses can only be infective or not infective, simplifying their use as indicators. Additionally, the levels of the three parameters as a mean of 8 replicates were calculated for the untreated WAS: 5.99 log₁₀ CFU/g dw of *E. coli* (s = 0.22); 7.02 log₁₀ PFU/g dw of SOMCPH (s = 0.34); and 6.07 log₁₀ CFU/g dw of SSRC (s = 0.16).

For rheological characterizations, all pre-treatments were conducted on the same WAS sample (45.9 ± 0.2 g TS/L) because rheological properties of sludge are highly conditioned by the TS content (Pollice et al., 2006; Laera et al., 2007). All of the analyzed WAS samples (untreated and treated) exhibited pseudoplastic behavior. Fig. 2 shows the evolution of the steady state shear stress as a function of shear rate for the untreated and three treated sludges, together with their respective fittings to the Ostwald-de Waele model (Eq. (2)). The good fit of the experimental data showed the capability of the model to reproduce the pseudoplastic response of the WAS. Fig. 3 shows variations in the steady state viscosity when increasing treatment intensities at a shear rate of 300 s⁻¹. The steady state viscosity was significantly reduced with the treatments because the treatments changed the overall sludge properties, including the composition, structure, strength and size of the sludge flocs (Neyens and Baeyens,

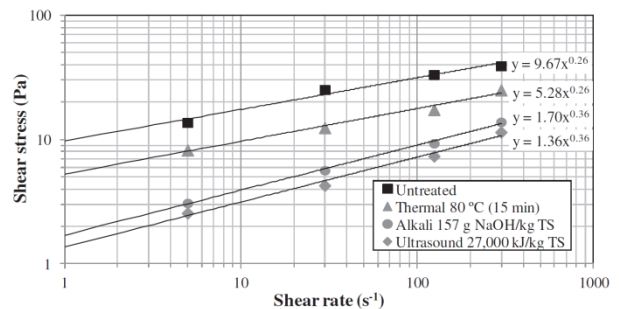


Fig. 2 – Steady state shear stress as a function of shear rate for the untreated and three treated sludges (ultrasound: 27,000 kJ/kg TS; thermal: 80 °C for 15 min; alkali: 157 g NaOH/kg TS). The solid lines correspond to the fit to the Ostwald-de Waele power-law model.

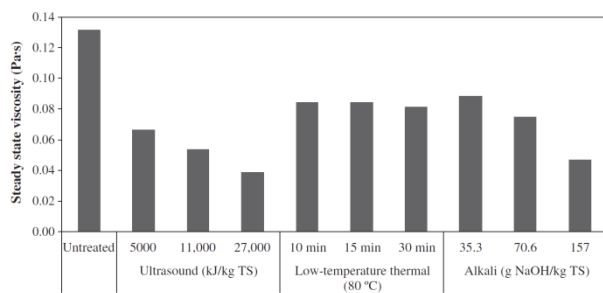


Fig. 3 – Steady state viscosity at a shear rate of 300 s⁻¹.

2003; Bougrier et al., 2006; Pham et al., 2010; Ruiz-Hernando et al., 2013; Farno et al., 2014). The greatest reduction of the steady state viscosity was observed (71% reduction) after ultrasonication at an E_S of 27,000 kJ/kg TS. Thermal treatment is known to degrade cell wall membranes due to pressure difference, resulting in a lower viscosity and in an improvement of the filterability (Bougrier et al., 2008). However, for the thermal conditions evaluated in this study (80 °C for 10, 15 and 30 min) the reduction of the steady state viscosity was lower than after ultrasonication, likely due to the shorter heating exposure times. Additionally, no significant differences in viscosity reduction were observed between the three heating exposure times. To be specific, after a contact time of 10 min, the steady state viscosity was reduced by 35%, which was not significantly different from that of the exposure times of 15 (36%) and 30 min (38%). For low doses of NaOH, the alkali treatment exhibited the lowest reduction of the steady state viscosity (33%), whereas at higher doses the reduction was greater (65%).

The selection of the optimum condition of each treatment is detailed below. Because no ultrasonication condition resulted in a noticeable reduction of microbial indicators, the optimum condition for this treatment responded exclusively to rheological criteria. Accordingly, an optimum E_S of 27,000 kJ/kg TS was selected because it displayed the maximum reduction in viscosity. The optimum condition for the low-temperature thermal treatment was 80 °C for 15 min because it resulted in sludge hygienization. Moreover, very little difference in viscosity reduction was detected between 15 and 30 min of heating exposure time at 80 °C. For alkali treatments, the optimum condition selected was 157 g NaOH/kg TS (252 meq/L; pH 12.4) because it allowed the hygienization of the sludge and noticeably reduced the viscosity. The optimum conditions are abbreviated as US-WAS (ultrasonicated WAS), T-WAS (low-temperature thermally treated WAS) and NaOH-WAS (alkali-treated WAS).

3.2. Biomethane potential tests

To determine the effect of the pre-treated WAS on AD, the previously determined optimum conditions for each pre-treatment and the untreated WAS were analyzed by physicochemical characterization (Table 1) and biomethane potential tests (Fig. 4a). As shown by the sCOD/tCOD ratio and the SD (Table 1), all pre-treatments were able to solubilize particulate organic matter from the WAS. Specifically,

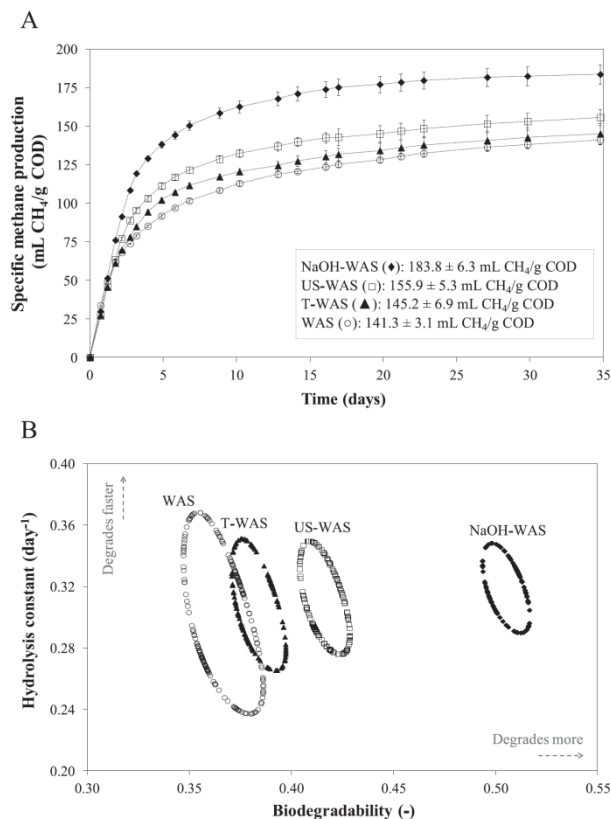


Fig. 4 – Results obtained from the BMP tests: (A) Cumulative methane production curves and (B) Confidence regions for biodegradability (f_{was}) and hydrolysis constant ($k_{hyd, was}$). Error bars represent standard deviations.

ultrasound and low-temperature thermal pre-treatments presented similar efficiencies (approximately 11%) which were lower than the efficiency obtained by the alkali pre-treatment (approximately 15%). Nevertheless, the alkali pre-treatment presented a loss of 5 g COD/L due to organic matter mineralization, a phenomenon not detected in the ultrasound and low-temperature thermal pre-treatments. The SD obtained by ultrasound pre-treatment is in agreement with that reported by Kim et al. (2013a) when dosing at a similar E_S (approximately 25,000 kJ/kg TS) but is lower than that reported by Bougrier et al. (2006), who used a lower E_S (6250 and 9350 kJ/kg TS) and reached an SD of 15 ± 3%. The differences between the SD values may be related to the pre-treatment performance (e.g., no cooling during ultrasonication) and the sludge TS concentration (Carrère et al., 2010). Regarding the low-temperature thermal pre-treatment, the SD reached in the present study is lower than that reported by Kim et al. (2013b), likely due to the lower exposure time. The authors reported an SD of 23 and 27% when pre-treating WAS for 6 h at 60 and 75 °C, respectively. The SD achieved through alkali pre-treatment was significantly lower than the values found in the literature, where an SD of approximately 30% was reported for WAS pre-treated with alkali at pH 12 and room temperature. Specifically, 1 h after dosing with 65 meq KOH/L (at a sample pH 12), Valo et al. (2004), recorded an SD of 31%.

This value is similar to the result reported in Navia et al. (2002), in which an observed SD of 32% was obtained after dosing with 80 meq/L NaOH for 24 h (WAS from a kraft mill). Similarly, Jiang et al. (2010), evaluated the effect of the treatment time and pH on WAS solubilization. At pH 12, the authors recorded increases of the SD of 21 and 33% after 0.5 h and 24 h, respectively, of pre-treatment time.

Although the optimum pre-treatment conditions, in terms of methane production, may be those that present a high COD solubilization and low organic matter mineralization, increased solubilization does not always lead to an enhanced methane potential (Kim et al., 2013a). Therefore, BMP tests are needed to assess the effect of the pre-treatments on AD. The effect of the pre-treatments on methane production was evaluated through the modeling of the BMP tests (Fig. 4b). The 95% confidence region for biodegradability (x-axis) and apparent hydrolysis rate (y-axis) indicated that each pre-treatment had a different effect on WAS biodegradability. T-WAS (0.38 ± 0.1) presented similar biodegradability as WAS (0.37 ± 0.3), whereas US-WAS (0.42 ± 0.2) and NaOH-WAS (0.49 ± 0.1) presented increases of 13% and 34%, respectively, on WAS biodegradability and their final methane potential. The low increase of WAS biodegradability after pre-treatment, when compared with the literature, may be related to the selection of the pre-treatment conditions. In the present study, the strength and exposure time of each pre-treatment was based on rheological and hygienization criteria, rather than on the increase of the methane yield. For instance, through low-temperature thermal pre-treatments (60–80 °C), increases of the biogas production by 20–40% have been reported when pre-treating WAS over 0.5–1.5 h (Hiraoka et al., 1984; Li and Noike, 1992; Wang et al., 1997). Likewise, increases of the biogas production between 40 and 50% have been achieved through ultrasound pre-treatment, even though lower E_s (5000–9350 kJ/kg TS) were applied (Bougrier et al., 2006; Braguglia et al., 2008). This may be related to the TS concentration (64.2 ± 0.2 g/L) and viscosity of the WAS because increased viscosity (linked to a higher TS concentration) hinders the formation of cavitation bubbles (Carrère et al., 2010). Moreover, in the present study, the WAS sample was cooled down during ultrasonication, thereby avoiding the thermal effect. The literature is less consistent regarding the effect of alkali pre-treatment on the biogas potential at room temperature. Penaud et al. (1999) demonstrated an increase in biodegradability by approximately 40% after adding 125 meq NaOH/L. In contrast, Valo et al. (2004), reached a pH of 12 after adding 65 meq KOH/L, but did not observe any significant improvement on WAS biodegradability.

Similar SDs, but different biodegradabilities, reached by T-WAS and US-WAS showed that some parts of the cell wall were weakened but not solubilized during the pre-treatments. However, because the pre-treatment conditions applied to the WAS did not affect the hydrolysis rate, it can be understood that most of the methane production still came from the particulate organic matter (Fig. 4b). Finally, a possible inhibitory effect due to a high sodium concentration (3.6 g Na^+ /L) on NaOH-WAS digestion, which is reported within the moderate inhibition sodium concentrations for mesophilic methanogens (Chen et al., 2008), may have been masked by the dilution effect (approximately 1/4) of the inoculum.

3.3. Hygienization effect of the mesophilic anaerobic digestion aided by pre- and post-treatments

Although AD has been designed for increasing biogas production and solids destruction, it also plays a role in pathogen inactivation (Ziemba and Peccia, 2011), and pre-treatment optimization may help in this purpose. The occurrence of indicators after the BMP tests in the pre-treated sludges is shown in Fig. 5. It is worth remembering that, in order to perform the BMP tests, the untreated and the pre-treated WAS were mixed with digested sludge and therefore the microbiological tests were made on these mixtures. For *E. coli*, the reductions achieved by the entire processes (i.e., pre-treatments + mesophilic AD) provided results below the detection limit of the technique (<2.02 \log_{10} CFU/g dw or <4.00 CFU/g ww), successfully overcoming the levels of hygienization established by the EPA and EU. Specifically, for ultrasound pre-treatment, *E. coli* reduction

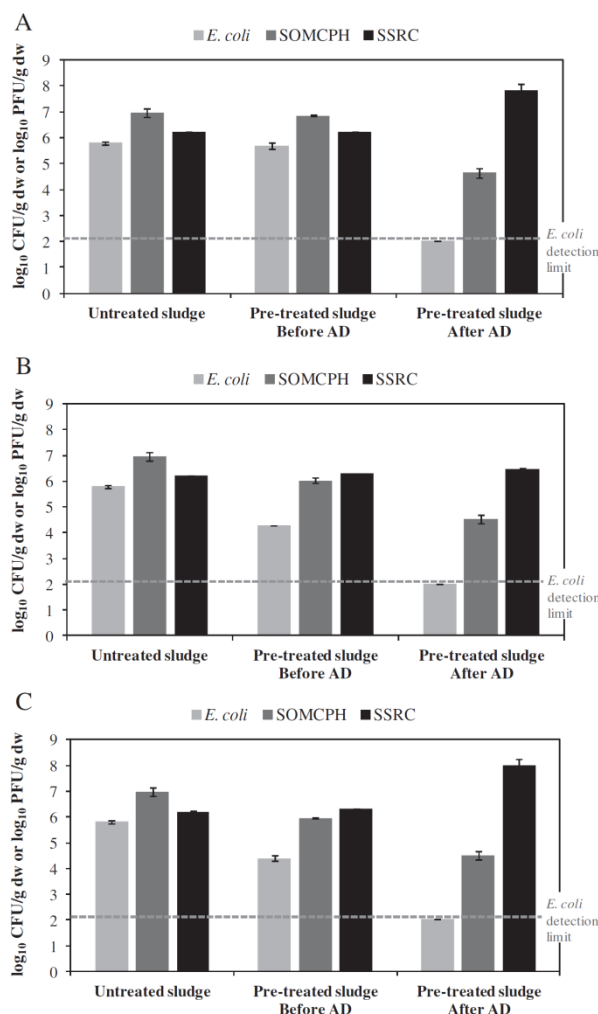


Fig. 5 – Effect of different pre-treatments and the AD on the microbial populations present in sludge. A: ultrasound pre-treatment; B: low-temperature thermal pre-treatment; C: alkali pre-treatment. Error bars represent standard deviations.

was due to the single effect of the AD because this pre-treatment did not sanitize the sludge (relevant data corresponding to the single effect of AD are shown in Fig. 6). For the SOMCPH, the three configurations generated similar results: 2.32, 2.45 and 2.47 \log_{10} reductions for ultrasound, low-temperature thermal and alkali, respectively. Finally, as was observed in the preliminary assays (Section 3.1), unexpected results for SSRC were found after digestion of the ultrasonicated and alkali pre-treated sludge, resulting in an increase of 1.62 \log_{10} and 1.80 \log_{10} , respectively. However, SSRC did not experience similar changes with the low-temperature thermal pre-treatment. As for preliminary assays, this increase in the SSRC concentration after AD is currently being investigated. From the three configurations studied in this section, the thermal pre-treatment followed by mesophilic AD seems to be the best option in terms of hygienization.

The effectiveness of post-treatments in the sanitation of digested sludge has been thoroughly studied in the literature (Allievi et al., 1994; Bujoczek et al., 2002; Astals et al., 2012a). The microbiological results for the three post-treatments applied after mesophilic AD are displayed in Fig. 6. The digestion was sufficient to meet the *E. coli* requirements established by the normative, reaching reductions of more than 3.78 \log_{10} . These results were below the detection limit of the technique, making impossible to evaluate the *E. coli* reductions achieved by the assayed post-treatments. In contrast, the SSRC levels were not changed due to the mesophilic AD or post-treatments. A single mesophilic AD reduced SOMCPH levels by 1.88 \log_{10} , and the combination of AD followed by the low-temperature thermal and alkali post-treatments resulted in reductions of 3.42 \log_{10} and 2.56 \log_{10} , respectively. However, no additional effect was observed with ultrasound post-treatment with respect to a single AD. Taking into account that *E. coli* levels decayed below detection limits and that SSRC levels remained unchanged, the level of SOMCPH was the parameter that allowed the evaluation of the efficacy of post-treatments. Therefore, as was the case for pre-treatments, the low-temperature thermal post-treatment seems to be the best option for hygienization.

3.4. Assessment of the feasibility of the treatments in a WWTP

By considering an energy balance with the assessment of the different treatment scenarios an estimate can be made to

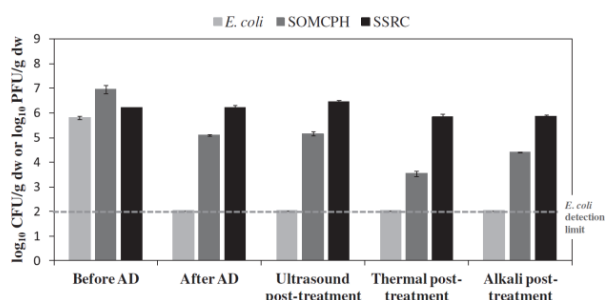


Fig. 6 – Effect of the anaerobic digestion and different post-treatments on the microbial populations present in sludge. Error bars represent standard deviations.

determine whether the energy (i.e., electricity and heat) required by the pre-treatment can be recovered through the improved methane production. However, these estimates rely exclusively on laboratory data; therefore, the results would not be entirely conclusive for an operational WWTP. Moreover, it should be considered that the heat balance is highly influenced by the solid concentration; therefore, a concentrated WAS will lead to a better balance, while a diluted sludge will lead to a worse balance (Carrère et al., 2012). The assessment is based on a novel WWTP approach, where the primary sludge and WAS are digested separately to increase the opportunities to use digested WAS in agriculture.

Ultrasound treatment (27,000 kJ/kg TS) was able to solubilize organic matter and improve WAS specific methane production, but was not able to disinfect the WAS. Therefore, the most reasonable configuration for ultrasonication would be to use it as a pre-treatment prior to AD and composting or thermal post-treatment (if the digestate is intended for use as fertilizer). The electricity balance of the ultrasound pre-treatment shows that an increase in methane production (15 mL CH₄/g COD) results in an increased electrical production of 240 kJ/kg TS, which is very low when compared to the supplied energy (27,000 kJ/kg TS). Nevertheless, on an industrial scale, this difference would be lower due to the higher efficiency of commercial ultrasonic devices.

Low-temperature pre-treatments (<100 °C) are characterized by a low energy demand, which may be supplied by a combined heat and power (CHP) unit fueled with biogas (Passos et al., 2013). On the one hand, the heat required to increase the WAS from 15 to 80 °C were estimated to be 4.6 MJ/kg TS, assuming a WAS specific heat of 4.18 kJ/kg/°C, a density of 1000 kg/m³, and 8% of the process heat losses (Astals et al., 2012a). On the other hand, the heat produced by the CHP unit after burning the biogas was 3.6 MJ/kg TS, which represents the energy required to increase the WAS temperature from 15 to approximately 65 °C. The value was obtained assuming a 35,800 kJ/kg TS methane caloric value and a 0.55 CHP unit yield for heat generation (Astals et al., 2012a; Passos et al., 2013). However, if an 80 °C pre-treatment is required, it would be necessary to install a sludge-to-sludge heat exchanger, where the pre-treatment effluent would be used to pre-heat WAS. The energy recovered in the sludge exchanger should be at least the 23% of the heat contained by the pre-treated WAS, which is below than the 80–85% efficiency reported for this type of unit (Astals et al., 2012a; Carrère et al., 2012). As shown in the BMP tests, the low-temperature thermal pre-treatment scarcely increased the biodegradability of the WAS, possibly due to the shorter contact time. It is likely that a longer exposure time would result in an increase of the methane production and induce an improvement of the energy balance (Li and Noike, 1992). Nonetheless, a higher capital cost would be required due to the larger digester volume. Additionally, both the thermal pre-treatment and the post-treatment were successful in reducing the microbiological parameters. However, the pre-treatment does not guarantee hygienization after the AD. Therefore, the configuration for this treatment seems to depend on the final destination of the sludge: if the sludge is intended for agriculture, it should undergo post-treatment to satisfactorily meet the current microbiological levels for land application. If the sludge is not intended for

agriculture, it may be appropriate to perform a pre-treatment (the effect of the exposure time should be further investigated) to enhance the AD.

Alkali conditioning (157 g NaOH/kg TS) has been successful in improving methane production, and has reduced the levels of *E. coli* below the limits established by the EPA and EU. However, as a pre-treatment, it unexpectedly increased the levels of SSRC after AD and required neutralization prior to AD. In addition, it resulted in a negative economic balance. The selling price of industrial NaOH and HCl are highly variable, but average at 300 and 200 €/ton, respectively (Solvay, 2013). Consequently, dosing 157 g NaOH/kg TS and 218 g HCl_{35%}/kg TS for their subsequent neutralization requires 0.094 €/kg TS and 0.044 €/kg TS, respectively. The sum of the reagents cost (0.138 €/kg TS) was much larger than the incomes generated through the extra methane production. Specifically, 43 mL CH₄/g COD will represent an extra electricity production of 680 kJ/kg TS that, at a tariff of 0.10 €/kWh, will lead to a revenue of 0.019 €/kg TS. Another drawback linked to alkali pre-treatment is the rising sodium concentration in the digester, which can drive the AD process to inhibition (Mouneimne et al., 2003; Carrère et al., 2012); therefore, the use of NaOH as a pre-treatment is rather limited.

Finally, it is worthwhile to note that the treatments reduced the energy of pumping due to the decrease on WAS viscosity. Specifically, ultrasound, thermal and alkali treatments reduce the energy of pumping from 14 kJ/kg TS (no treatment) to 1.8, 6.0 and 2.5 kJ/kg TS, which corresponds to a reduction of approximately 90, 60 and 80%, respectively. This approach was obtained assuming a sludge flow velocity of 0.2 m/s, a pipeline length of 500 m and a pipeline internal diameter of 150 mm. These specifications are obtained from a WWTP with a capacity of two million population equivalents (420,000 m³/day). Clearly, the energy required for pumping the untreated sludge (14 kJ/kg TS) is considerably lower than the cost of the discussed treatments. On the other hand, although it was not quantified, it is conceivable that the decrease in viscosity improved the mixing in the digester and allowed the realization of high solids AD, thus enhancing the final biogas production and the energy balance.

4. Conclusions

Waste activated sludge was pre-treated and post-treated through ultrasound, low-temperature thermal and alkali conditioning to provide an overall view of feasible scenarios for waste activated sludge management. The selection of the optimum condition of each pre-treatment was based on hygienization and rheological results. On the one hand, the three treatments reduced the viscosity of the sludge, and this reduction was greater when increasing the treatment intensity. On the other hand, the low-temperature thermal and alkali treatments but not ultrasound treatment allowed the hygienization of the sludge. The effects of the three optimum treatment conditions were compared in terms of the anaerobic digestion improvements and hygienization. Ultrasound increased the sludge biodegradability and the specific methane production (13%), but did not succeed in hygienization, suggesting that the most appropriate configuration for

ultrasonication is as a pre-treatment before treatment in the anaerobic digester. The low-temperature thermal treatment barely increased the sludge biodegradability, but allowed hygienization, which suggests that it would be more suitable as a post-treatment. However, the use of longer contact times would increase the chances for use as a pre-treatment. Alkali treatment increased the methane production (34%) and was successful in hygienization because it reduced the levels of *E. coli* below the limits established by the EPA and EU. However, when used as a pre-treatment, it resulted in a high amount of sodium because of the high concentrations of NaOH required, which may inhibit anaerobic digestion. The energy balance revealed that under the tested conditions, the ultrasound and alkali treatments required higher operating costs. Finally, it is noteworthy that SOMCPH was an appropriate microbial indicator for evaluating the different sludge treatments and would be a suitable candidate to complement *E. coli* measurements.

Acknowledgments

The research was carried out within the framework of the NOVEDAR Consolider-Ingenio 2010 Project (CSD2007-00055), the European Union (ROUTES-FP7-ENV-2010-265156) and the Spanish Government (CTM2011-24897, CTQ2009-11465, CGL2011-25401, BES-2012-054179).

REFERENCES

- Allievi, L., Colombi, A., Calcaterra, E., Ferrari, A., 1994. Inactivation of fecal bacteria in sewage sludge by alkaline treatment. *Bioresour. Technol.* 49, 25–30.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., Van Lier, J.B., 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Sci. Technol.* 59, 927–934.
- Anonymous, 2000. ISO 10705-2: Water Quality – Detection and Enumeration of Bacteriophages – Part 2: Enumeration of Somatic Coliphages. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington, ISBN 978-0-87553-047-5.
- Appels, L., Baeyens, J., Degreè, J., Dewil, R., 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 755–781.
- Astals, S., Nolla-Ardèvol, V., Mata-Alvarez, J., 2012b. Anaerobic co-digestion of pig manure and crude glycerol at mesophilic conditions: biogas and digestate. *Bioresour. Technol.* 110, 63–70.
- Astals, S., Venegas, C., Peces, M., Jofre, J., Lucena, F., Mata-Alvarez, J., 2012a. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Res.* 46, 6218–6227.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T., Siegrist, H., Vavilin, V.A., 2002. The IWA anaerobic digestion model No 1 (ADM1). *Water Sci. Technol.* 45, 65–73.
- Batstone, D.J., Pind, P.F., Angelidaki, I., 2003. Kinetics of thermophilic, anaerobic oxidation of straight and branched chain butyrate and valerate. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 195–204.

- Batstone, D.J., Tait, S., Starrenburg, D., 2009. Estimation of hydrolysis parameters in full-scale anaerobic digesters. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 1513–1520.
- Bougrier, C., Albasi, C., Delgenès, J.P., Carrère, H., 2006. Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability. *Chem. Eng. Process.* 45, 711–718.
- Bougrier, C., Delgenès, J.P., Carrère, H., 2008. Effects of thermal treatments on five different waste activated sludge. *Chem. Eng. J.* 139, 236–244.
- Braguglia, C.M., Mininni, G., Gianico, A., 2008. Is sonication effective to improve biogas production and solids reduction in excess sludge digestion? *Water Sci. Technol.* 57 (4), 479–483.
- Bujoczek, G., Oleszkiewicz, J.A., Danesh, S., Sparling, R.R., 2002. Co-processing of organic fraction of municipal solid waste and primary sludge – stabilization and disinfection. *Environ. Technol.* 23, 227–241.
- Carrère, H., Dumas, C., Battimelli, A., Batstone, D.J., Delgenès, J.P., Steyer, J.P., Ferrer, I., 2010. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: a review. *J. Hazard. Mater.* 183, 1–15.
- Carrère, H., Raftai, Y., Battimelli, A., Torrijos, M., Delgenès, J.P., Motte, C., 2012. Improving methane production during the codigestion of waste-activated sludge and fatty wastewater: impact of thermo-alkaline pretreatment on batch and semi-continuous processes. *Chem. Eng. J.* 210, 404–409.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresour. Technol.* 99, 4044–4064.
- Cui, X., Talley, J.W., Liu, G., Larson, S.L., 2011. Effects of primary sludge particulate (PSP) entrapment on ultrasonic (20 kHz) disinfection of *Escherichia coli*. *Water Res.* 45, 3300–3308.
- Environment DG, EU, 2000. Working Document on Sludge, 3rd Official Draft. Brussels. URL: http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/sludge_en.pdf.
- Eshtiagi, N., Markis, F., Yap, S.D., Baudez, J.C., Slatter, P., 2013. Rheological characterisation of municipal sludge: a review. *Water Res.* 47, 5493–5510.
- Farno, E., Baudez, J.C., Parthasarathy, R., Eshtiagi, N., 2014. Rheological characterisation of thermally-treated anaerobic digested sludge: impact of temperature and thermal history. *Water Res.* 56, 156–161.
- Foladori, P., Laura, B., Gianni, A., Giuliano, Z., 2007. Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry – fecal indicators, wastewater and activated sludge. *Water Res.* 41, 235–243.
- Guzmán, C., Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., 2007. Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil and treated biowaste. *J. Virol. Meth.* 144, 41–48.
- Hiraoka, M., Takeda, N., Sakai, S., Yasuda, A., 1984. Highly efficient anaerobic digestion with thermal pretreatment. *Water Sci. Technol.* 17, 529–539.
- IAWPRC, 1991. Study group on health related water microbiology. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.* 25, 529–545.
- Jensen, P.D., Ge, H., Batstone, D.J., 2011. Assessing the role of biochemical methane potential tests in determining anaerobic degradability rate and extent. *Water Sci. Technol.* 64, 880–886.
- Jiang, J.Q., Zhao, Q.L., Wang, K., Wei, L.L., Zhang, G.D., Zhang, J.N., 2010. Effect of ultrasonic and alkaline pretreatment on sludge degradation and electricity generation by microbial fuel cell. *Water Sci. Technol.* 61, 2915–2921.
- Kim, D.H., Cho, S.K., Lee, M.K., Kim, M.S., 2013a. Increased solubilization of excess sludge does not always result in enhanced anaerobic digestion efficiency. *Bioresour. Technol.* 143, 660–664.
- Kim, J., Yu, Y., Lee, C., 2013b. Thermo-alkaline pretreatment of waste activated sludge at low-temperatures: effects on sludge disintegration, methane production, and methanogen community structure. *Bioresour. Technol.* 144, 194–201.
- Labanda, J., Sabaté, J., Llorens, J., 2007. Rheology changes of Laponite aqueous dispersions due to the addition of sodium polyacrylates of different molecular weights. *Coll. Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 301, 8–15.
- Laera, G., Giordano, C., Pollice, A., Saturno, D., Mininni, G., 2007. Membrane bioreactor sludge rheology at different solid retention times. *Water Res.* 41, 4197–4203.
- Li, H., Jin, Y., Mahar, R.B., Wang, W.Z., Nie, Y., 2008. Effects and model of alkaline waste activated sludge treatment. *Bioresour. Technol.* 99, 5140–5144.
- Li, Y.-Y., Noike, T., 1992. Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by thermal pretreatment. *Water Sci. Technol.* 26, 857–866.
- Lopez-Torres, M., Espinosa-Lloréns, M.C., 2008. Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of solid wastes. *Waste Manag.* 28, 2229–2234.
- Lucena, F., Bosch, A., Ripoll, J., Jofre, J., 1988. Faecal pollution in Llobregat river: interrelationship of viral, bacterial and physico-chemical parameters. *Water Air Soil Pollut.* 39, 15–25.
- Mocé-Llivina, L., Muniesa, M., Pimenta-Vale, H., Lucena, F., Jofre, J., 2003. Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (3), 1452–1456.
- Mouneimne, A.H., Carrère, H., Bernet, N., Delgenès, J.P., 2003. Effect of saponification on the anaerobic digestion of solid fatty residues. *Bioresour. Technol.* 90, 89–94.
- Navia, R., Soto, M., Vidal, G., Bornhardt, C., Diez, M.C., 2002. Alkaline pretreatment of kraft mill sludge to improve its anaerobic digestion. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 869–876.
- Neyens, E., Baeyens, J., 2003. A review of thermal sludge pretreatment processes to improve dewaterability. *J. Hazard. Mater.* B98, 51–67.
- Neyens, E., Baeyens, J., Creemers, C., 2003. Alkaline thermal sludge hydrolysis. *J. Hazard. Mater.* 97, 295–314.
- Passos, F., García, J., Ferrer, I., 2013. Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. *Bioresour. Technol.* 138, 79–86.
- Payment, P., Franco, E., 1993. Clostridium perfringens and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2418–2424.
- Penaud, V., Delgenès, J.P., Moletta, R., 1999. Thermo-chemical pretreatment of a microbial biomass: influence of sodium hydroxide addition on solubilization and anaerobic biodegradability. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 258–263.
- Pham, T.T.H., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2010. Influence of ultrasonication and Fenton oxidation pretreatment on rheological characteristics of wastewater sludge. *Ultrason. Sonochem.* 17, 38–45.
- Pilli, S., Bhunia, P., Yan, S., Leblanc, R.J., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2011. Ultrasonic pretreatment of sludge: a review. *Ultrason. Sonochem.* 18, 1–18.
- Pollice, A., Giordano, C., Laera, G., Saturno, D., Mininni, G., 2006. Rheology of sludge in a complete retention membrane bioreactor. *Environ. Technol.* 27, 723–732.
- Ratkovich, N., Horn, W., Helmus, F.P., Rosenberger, S., Naessens, W., Nopens, I., Bentzen, T.R., 2013. Activated sludge rheology: a critical review on data collection and modelling. *Water Res.* 47, 463–482.
- Ruiz-Hernando, M., Labanda, J., Llorens, J., 2010. Effect of ultrasonic waves on the rheological features of secondary sludge. *Biochem. Eng. J.* 52, 131–136.
- Ruiz-Hernando, M., Martínez-Elorza, G., Labanda, J., Llorens, J., 2013. Dewaterability of sewage sludge by ultrasonic, thermal and chemical treatments. *Chem. Eng. J.* 230, 102–110.

- Seysiecq, I., Marrot, B., Djerroud, D., Roche, N., 2007. In situ triphasic rheological characterization of activated sludge in an aerated bioreactor. *Chem. Eng. J.* 142, 40–47.
- Solvay, 2013. URL: <http://www.solvaychemicals.com/EN/Home.aspx>.
- Tiehm, A., Nickel, K., Zellhorn, M., Neis, U., 2001. Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization. *Water Res.* 35, 2003–2009.
- Uma-Rani, R., Kaliappan, S., Adish-Kumar, S., Rajesh-Banu, J., 2012. Combined treatment of alkaline and disperser for improving solubilization and anaerobic biodegradability of dairy waste activated sludge. *Bioresour. Technol.* 126, 107–116.
- US Environmental Protection Agency, 2003. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. Under 40 CFR Part 503. EPA 625/R-92/013. Cincinnati.
- Valo, A., Carrère, H., Delgenès, J.P., 2004. Thermal, chemical and thermo-chemical pre-treatment of waste activated sludge for anaerobic digestion. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79, 1197–1203.
- Wang, Q., Noguchi, C., Hara, Y., Sharon, C., Kakimoto, K., Kato, Y., 1997. Studies on anaerobic digestion mechanism: influence of pretreatment temperature on biodegradation of waste activated sludge. *Environ. Technol.* 18, 999–1008.
- Ziemba, C., Peccia, J., 2011. Net energy production associated with pathogen inactivation during mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Res.* 45, 4758–4768.

3.5. Artículo 2: Los colifagos somáticos como indicadores de enterovirus en tratamientos de higienización de los lodos de depuradora

3.5.1. Resumen

La utilización de los lodos de depuradora como fertilizantes en agricultura es la vía de gestión más deseable para este residuo, ya que supone la revalorización del mismo. En este sentido, para evitar riesgos para la salud y el medio ambiente, los lodos deben ser adecuadamente higienizados antes de su aplicación al suelo. El Borrador elaborado por la Comisión Europea (DG Environment, 2000) para complementar la Directiva 86/278/CEE (CEE, 1986) propone la inoculación de *Salmonella enterica* serovar. Senftenberg W 775 en los lodos para valorar la capacidad de higienización de los tratamientos, así como una reducción de 6 log₁₀ de la concentración de *E. coli*. Sin embargo, la inoculación homogénea de lodos con un microorganismo cultivado en laboratorio es un proceso complejo y puede sobreestimar los efectos de los tratamientos. En cuanto a la *E. coli*, las concentraciones encontradas en distintos tipos de lodos hacen imposible con frecuencia detectar una reducción de 6 log₁₀.

De entre los patógenos presentes en los diferentes tipos de lodos, la presencia de virus entéricos adquiere especial importancia en los países desarrollados, debido a sus bajas dosis mínimas infectivas, su prevalencia y su persistencia en el medio. El género *Enterovirus* es uno de los principales grupos de virus entéricos, causante de una gran variedad de enfermedades y buen candidato para actuar como patógeno de referencia. Ante las limitaciones de las bacterias indicadoras para simular el comportamiento de los virus entéricos frente a los tratamientos, la utilización de los bacteriófagos y, en concreto, de los SOMCPH, puede ser una alternativa muy interesante para complementar las normativas.

En este artículo, las concentraciones de SOMCPH y de enterovirus, tanto infecciosos (INFEV), como detectados mediante RT-qPCR (GCEV) fueron evaluadas a lo largo de las líneas de tratamiento de lodos de depuradora propuestas en el proyecto europeo "Routes". Se estudiaron, asimismo, sus relaciones y la capacidad de los SOMCPH y de los GCEV para indicar el comportamiento de los INFEV. Para la detección de GCEV, una RT-qPCR anteriormente descrita fue revisada, adaptada y aplicada.

A lo largo del estudio se analizaron 47 muestras de lodos que fueron agrupadas, según la intensidad del tratamiento, en "sin tratar o pretratadas", "tratamiento convencional" y "tratamiento intensivo". El alto porcentaje de muestras negativas para INFEV y los bajos niveles encontrados en las muestras con resultado positivo imposibilitaron la evaluación de la higienización utilizando este patógeno de referencia. Al contrario, el alto porcentaje de muestras positivas, así como las altas concentraciones encontradas hicieron posible utilizar los SOMCPH para valorar la intensidad de los tratamientos. Las concentraciones de GCEV se mantuvieron constantes a lo largo de todo el proceso, indicando cómo los tratamientos no producen la destrucción del genoma vírico y se

encontraron altos porcentajes de muestras negativas en los tres tipos de lodos, sugiriendo un fuerte proceso de inhibición que no pudo resolverse diluyendo las muestras.

Se encontró un ratio de $4,60 \pm 1,63 \log_{10}$ entre las concentraciones de SOMCPH e INFEV a lo largo de los distintos procesos y se observó que, cuando las concentraciones de SOMCPH eran inferiores a $4 \log_{10}$ (PFU/g dw), los niveles de INFEV detectados eran muy bajos o se encontraban por debajo del límite de detección (0,01 PFU/g ww).

Se evaluaron tres posibles propuestas para complementar las normativas sobre higienización en lodos: "SOMCPH como modelos de INFEV", "GCEV como modelos de INFEV" y "SOMCPH como modelos de INFEV, incluyendo ausencia de INFEV cuando la concentración de SOMCPH es inferior a $4 \log_{10}$ (PFU/g dw)". Teniendo en cuenta las proporciones de verdaderos negativos, verdaderos positivos, falsos negativos y falsos positivos, la propuesta que mejor resultados obtuvo fue la tercera.

Con estos resultados en mente, las conclusiones del artículo fueron:

- Las bajas concentraciones de INFEV encontradas en los lodos impidieron su utilización para controlar la efectividad de los tratamientos de higienización ensayados.
- La alta resistencia del genoma de *Enterovirus* a los tratamientos aplicados y el alto porcentaje de muestras negativas obtenidas mediante RT-qPCR no permitieron evaluar los tratamientos de higienización mediante la monitorización de GCEV.
- Las concentraciones de SOMCPH indígenas encontradas en los lodos a lo largo de los procesos ensayados, su comportamiento frente a los tratamientos y el establecimiento de un ratio entre las concentraciones de SOMCPH y las de INFEV demostraron que los SOMCPH son buenos indicadores de la higienización de los lodos.
- Se propuso la inclusión de los SOMCPH en el Borrador de la Comisión Europea (DG Environment, 2000) para complementar los requisitos de *E. coli* y *Salmonella* establecidos.
- Se revisó, adaptó y aplicó satisfactoriamente una técnica previamente descrita de RT-qPCR para la detección de enterovirus.

3.5.2. Informe sobre el factor de impacto

El artículo *“Somatic coliphages as surrogates for enteroviruses in sludge hygienization treatments”* ha sido publicado por la revista *“Water Science & Technology”* en el año 2016. En el año 2015, según el *“InCites Journal Citation Report”*, la revista se encontraba dentro del tercer cuartil (Q3) del área temática de *“Water Resources”* y del cuarto cuartil (Q4) del área temática de *“Environmental Sciences”*, con un factor de impacto de 1,064.

3.5.3. Informe de participación

La doctoranda Julia Martín Díaz, como coautora del artículo *“Somatic coliphages as surrogates for enteroviruses in sludge hygienization treatments”*, ha realizado la puesta a punto y aplicación de la técnica de detección de enterovirus en las muestras analizadas. Asimismo, ha llevado a cabo el procesamiento, organización y discusión de los resultados obtenidos y se ha encargado de la redacción del artículo y de la preparación de las tablas y las figuras. Finalmente, la doctoranda ha contribuido a la difusión de los resultados generados.

Ninguno de los coautores ha utilizado los datos expuestos en el artículo para la elaboración de su tesis doctoral.

Barcelona, junio de 2017

Dr. Francisco Lucena Gutiérrez

Somatic coliphages as surrogates for enteroviruses in sludge hygienization treatments

Julia Martín-Díaz, Raquel Casas-Mangas, Cristina García-Aljaro,
Anicet R. Blanch and Francisco Lucena

ABSTRACT

Conventional bacterial indicators present serious drawbacks giving information about viral pathogens persistence during sludge hygienization treatments. This calls for the search of alternative viral indicators. Somatic coliphages' (SOMCPH) ability for acting as surrogates for enteroviruses was assessed in 47 sludge samples subjected to novel treatment processes. SOMCPH, infectious enteroviruses and genome copies of enteroviruses were monitored. Only one of these groups, the bacteriophages, was present in the sludge at concentrations that allowed the evaluation of treatment's performance. An indicator/pathogen relationship of 4 log₁₀ (PFU/g dw) was found between SOMCPH and infective enteroviruses and their detection accuracy was assessed. The obtained results and the existence of rapid and standardized methods encourage the inclusion of SOMCPH quantification in future sludge directives. In addition, an existing real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) for enteroviruses was adapted and applied.

Key words | enterovirus, hygienization, indicator microorganism, quantitative polymerase chain reaction (qPCR), sludge treatment, somatic coliphages

Julia Martín-Díaz
Raquel Casas-Mangas
Cristina García-Aljaro
Anicet R. Blanch
Francisco Lucena (corresponding author)
Department of Microbiology,
University of Barcelona,
Av. Diagonal 643,
Barcelona 08028,
Spain
and
The Water Research Institute,
University of Barcelona,
Av. Diagonal 684,
Barcelona 08034,
Spain
E-mail: flucena@ub.edu

INTRODUCTION

High amounts of hazardous sewage sludge are generated worldwide. In the European Union, total sewage sludge production was estimated at about 10 Mt of dry matter in 2007 (Mininni *et al.* 2014). Different approaches are being accomplished to properly manage this situation as landfilling, incinerating or land spreading. The reuse of biosolids through land spreading may result in important benefits to soil, by means of fertilizing. Nevertheless, the management and recycling of this residue without the properly preventive measures involves an evident risk for human and animal health due to the high levels of pathogen microorganisms present. Bacteria, viruses and parasites are detected at elevated concentrations throughout the sewage sludge treatment (Sidhu & Toze 2009). In particular, enteric viruses are of major importance in developed countries due to their low minimal infective doses, the prevalence and their persistence in the environment. These facts make necessary the application of hygienization treatments before the utilization of sludge as land fertilizer.

The European Directive 86/278/EEC regulates the reuse of sludge by land spreading. In spite of the evident

health risk associated with the management of this residue, the directive does not contain specific regulation with respect to microbiological parameters. To complement this directive, the European Union developed the EU Working Document on Sludge, 3rd draft (EC 2000), which constituted a suggestion for the updating of the directive. This document states that the sludge to be used without restrictions in agriculture must be subjected to an advanced treatment. This treatment shall be initially validated through a 6 log₁₀ reduction of a test organism such as *Salmonella enterica* serotype Senftenberg W 775. Likewise, the treated sludge shall not contain *Salmonella* spp. in 50 g and the treatment shall achieve at least a 6 log₁₀ reduction in *Escherichia coli* to <5 × 10² CFU/g. However, inoculation of complex matrices, like sludge, with allochthonous microorganisms for validation is not easy to carry out in terms of a homogeneous distribution of the inoculum, as well as in terms of standardization. Besides, the initial levels of the proposed bacteria in different types of sludge are, frequently, <6 log₁₀ (Mocé-Llivina *et al.* 2003; Ruiz-Hernando *et al.* 2014). Therefore, the

feasibility and reliability of this procedure are seriously questioned.

Moreover, conventional bacterial indicators present limitations predicting the fate of pathogenic viruses because such viruses survive better in the environment than bacteria (Grabow 2001). As a result, there is an urgent necessity of new indicator microorganisms as surrogates of pathogenic viruses. Bacteriophages of enteric bacteria (as somatic coliphages, SOMCPH) have been proposed as indicators of waterborne viruses in water quality control processes, as well as in different types of sludge (Grabow 2001; Jofre 2003; Mocé-Llivina *et al.* 2003; Guzmán *et al.* 2007a). Although there is not a clear consensus on the relationship between SOMCPH and enteric viruses in different types of water and sludge, the concentration of SOMCPH may help to predict the potential risk associated to enteric viruses (Guzmán *et al.* 2007b; Rezaeinejad *et al.* 2014). The genus *Enterovirus* (family *Picornaviridae*, order *Picornavirales*) is one of the principal groups of pathogens of concern in sewage sludge and are causative agents of many gastrointestinal and respiratory tract infections (other than those caused by bacteria), as well as other diseases such as meningitis, encephalitis, myocarditis or acute flaccid paralysis.

In this context, the aim of the present research was to assess the suitability of SOMCPH as surrogates for enteroviruses throughout the new sludge hygienization treatments that were proposed in the Routes European Project (2011–2014). To accomplish this objective, reduction in the levels of infectious SOMCPH, infectious enteroviruses (INFEV) and genome copies of enteroviruses (GCEV) were monitored in different steps of the sludge treatment processes. Additionally, an existing real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) for enteroviruses (Monpoeho *et al.* 2000) was reviewed, adapted and applied.

METHODS

Sewage sludge samples

Forty-seven single sludge samples were analyzed. They were produced in laboratory scale prototypes of four different treatment processes. In the first treatment process, secondary sludge was subjected to thermal hydrolysis pre-treatment and to thermophilic digestion. In the second treatment process, secondary sludge was subjected to sonication pre-treatment and to a two-phase anaerobic digestion (mesophilic and thermophilic conditions). In the third treatment

process, mixed or secondary sludge was subjected to sequential digestion (mesophilic anaerobic digestion and aerobic digestion at room temperature). Finally, in the fourth treatment process, mixed sludge was subjected to hydrodynamic cavitation pre-treatment and to a two-phase anaerobic digestion (mesophilic conditions and thermophilic conditions). Detailed protocols of the first, second and third treatment processes were described in Levantesi *et al.* (2014). Samples were taken at different time intervals and were divided into the three following groups, depending on treatment intensity: 'untreated or pre-treated' for 20 samples that were not subjected to any digestion, 'conventional treatment' for 11 samples subjected to a single digestion and 'intensive treatment' for 16 samples that were subjected to the entire treatment processes.

Bacteriophages extraction and enumeration

SOMCPH were extracted from a 5–10 g sludge sample as described by Guzmán *et al.* (2007a), method in process of standardization by the European Committee for Standardization. Viral extracts were analyzed for the presence of SOMCPH as indicated in the ISO 10705-2 standard (Anonymous 2000). The detection limit of this technique was 1 PFU/g ww (wet weight).

Enteroviruses extraction

Enteroviruses were extracted from a 100 g sample following the US EPA standard (EPA 2003). Viruses were finally resuspended in 25 mL of 0.15 M Na₂HPO₄.

Enteroviruses cell culturing

Twenty mL of the viral extracts were analyzed for the enumeration of total culturable enteroviruses following the US EPA standard (EPA 2003) by the plaque assay system. The detection limit of this technique was 0.01 PFU/g ww.

Viral RNA extraction and RT-qPCR for enteroviruses

Viral RNA extractions were made with the QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Germany), following the manufacturer's instructions. An aliquot of 140 µL of each viral extract was used for this purpose, obtaining a final volume of 60 µL of purified RNA solution that was stored at –80 °C.

An adaptation of a previously described RT-qPCR method (Monpoeho *et al.* 2000) was used for the detection of total genome copies (GC) of enteroviruses. The target

region was a 148 bp fragment of the conserved 5' non coding region (5'NCR) of enteroviruses. The following oligonucleotides were used: primer Ev1 (5'-GATTGTCAC-CATAAGCAGC-3'), primer Ev2 (5'-CCCCTGAATGCGG-CTAATC-3') and Ev-probe (5'-FAM-CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT-BHQ1-3'). The specificity of primers and hydrolysis probe was tested *in silico* through sequence alignment with the human *Enterovirus* (A, B, C and D) genomes obtained from the GenBank database (accession numbers NC_001612.1, M16560.1, NC_002058.3 and NC_001430.1, respectively). Likewise, the lack of a correct alignment with the rest of *Enterovirus* species (E, F, G and H) was confirmed (accession numbers NC_001859.1, NC_021220.1, NC_004441.1 and NC_003988.1, respectively).

RNA samples were run using the RNA Ultrasense™ One-step Quantitative RT-PCR System kit (Life Technologies, CA, USA). A final reaction volume of 25 µL was achieved, comprising 5 µL of test sample and 20 µL of reaction mixture. The reaction mixture was prepared as follows: 500 nM of Ev1 primer, 400 nM of Ev2 primer, 120 nM of Ev probe, 1.25 µL of RNA UltraSense™ Enzyme Mix, 5 µL of RNA UltraSense™ 5X Reaction Mix, 0.5 µL of ROX Reference Dye, 2% of polyvinylpyrrolidone, PVP-40 (Alfa Aesar, Germany), 1.5 µg of T4 gene 32 protein (New England BioLabs, MA, USA) and DEPC-treated water to complete total volume. Reactions were performed by the Step One™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) using the following thermocycling conditions: 50 °C for 45 min; 95 °C for 2 min; and 45 cycles of 94 °C for 15 s, 60 °C for 1 min.

The main difference with the method previously described by Monpoeho was the utilization of a cDNA standard, instead of RNA. The target sequence was amplified through RT-PCR from a human coxsackievirus B3 stock (species *Enterovirus B*), using the primers described above. The PCR product was purified with the DNA Pure Link™, Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit (Life Technologies, CA, USA), cloned into the pGEM T-Easy plasmid (Promega, WI, USA) and transformed into JM109 High Efficiency Competent Cells (Cat.# L2001) following manufacturer's instructions. The plasmid was extracted and purified using the DNA Pure Link™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Life Technologies, CA, USA). Then, the plasmid was cut with the restriction enzyme GsuI (BpmI) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and purified again with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany). Finally, the plasmid solution was fluorometrically quantified with a Qubit® 3.0 Fluorometer (Life Technologies, CA, USA). Taking in account the molecular mass of the plasmid-

target sequence construct and the Avogadro's number, the concentration in GC/µL was calculated. Serial decimal dilutions were made in Tris-EDTA buffer, pH 8.0 to the final concentrations of: 1×10^0 to 1×10^7 GC/µL. Standard dilutions were aliquoted to avoid freeze-thaw cycles and stored at -80 °C.

Determination of limit of detection and limit of quantification of the RT-qPCR

The limit of detection (LOD) of a qPCR is the smallest number of nucleic acid targets in a given template volume that was detected in at least 95% of the replicas. Limit of quantification (LOQ) refers to the lowest concentration of nucleic acid targets that can be determined with acceptable precision and accuracy. The method used by Blanchard *et al.* (2012) was followed to calculate the LOD_{PCR} and the LOQ_{PCR}. For the LOD_{PCR}, dilutions of cDNA standard were made to obtain the following concentrations: 50, 20, 10, 5, 2, 1 and 0.1 GC/5 µL of standard analyzed in the RT-qPCR. Twenty-four replicas of each dilution level were tested, in four independent trials (six replicas per trial). For the LOQ_{PCR}, the cDNA standard was used to create calibration curves as follows. Three independent trials were performed on three independent standard dilution series, ranging from 5 to 5×10^7 GC/5 µL of standard dilution analyzed in the qPCR. Two replicas were tested for each dilution level in each trial. Thus, three calibration curves, with their corresponding linear regression lines were created. Linearity was assessed through the calculation of mean bias, standard deviation (SD) and linearity uncertainty (U_{LINi}) for each dilution level. Finally, combined linearity uncertainty (U_{LIN}) was obtained. The amplification efficiency of the PCR was calculated with the slope of the linear regression lines using the equation $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$.

RT-qPCR samples analysis

For quantifying samples, two replicas of the standard dilutions were added to each qPCR plate with at least five dilution levels, including the LOQ. Only regression lines with $R^2 > 0.990$ and efficiencies between 90 and 110% were accepted for calculations. Threshold was automatically set by software in each trial. A positive control and a non-template control were included. Direct samples and ten-fold dilutions were tested in order to avoid possible PCR inhibitors.

RESULTS AND DISCUSSION

Total solids content of samples was comprised between 0.92 and 4.98%. These data were used to express results per gram of dry weight (dw).

Somatic coliphages and infectious enteroviruses

The effect of treatments in the initial levels of SOMCPH and INFEV was calculated. For INFEV, concentrations were very low, as much in untreated/pre-treated sludge as in samples subjected to conventional or intensive treatments. Anyway, these results were in accordance with previous studies (Monpoeho *et al.* 2001; Lucena *et al.* 2005; Sidhu & Toze 2009). Fifty-seven percent of samples were below the detection limit and the total mean value was $0.16 \log_{10}$ (PFU/g dw). This fact made it impossible to evaluate the hygienization performance of the assayed treatments by means of this pathogen. Nevertheless, 100% of untreated/pre-treated sludge samples contained SOMCPH at concentrations over $5 \log_{10}$ (PFU/g dw), with a mean value (\pm SD) of $5.96 \pm 1.29 \log_{10}$ (PFU/g dw), which was also in accordance with previous works (Lucena *et al.* 2005; Sidhu & Toze 2009). Eighty-five percent of the treated sludge samples were positive for SOMCPH, with values of 4.95 ± 1.46 and $3.13 \pm 0.84 \log_{10}$ (PFU/g dw) for conventional and intensive treatments, respectively. Thus, reductions caused by treatments could be measured using the SOMCPH naturally present in sludge without the need of spiking allochthonous bacteria. The removal obtained was dependent on the treatment intensity and fluctuated from 1.33 to $3.72 \log_{10}$ (PFU/g dw).

RT-qPCR performance

For the LOD_{PCR} , 100% of replicas of 5 GC/reaction dilution level gave a positive result. Thus, LOD_{PCR} of the quantitative real time RT-PCR was determined in 5 GC/reaction. The efficiency of the 3 standard curves tested was very high, from 94.22 to 97.56% and R^2 was between 0.999 and 1.000. For each dilution level, SD was below $0.5 \log_{10}$ (from 0.01 to 0.06), absolute value bias $\leq 0.25 \log_{10}$ (0.00–0.16) and U_{LIN} corresponded to $0.04 \log_{10}$, resulting in a good performance of the linear regression. Therefore, LOQ_{PCR} was coincident with LOD_{PCR} , giving a result of 5 GC/reaction and the dynamic range of the technique covered from 5 to 5×10^7 GC/reaction. Then, results below 5 GC/reaction were considered as negatives.

Genome copies of enteroviruses

In terms of data processing, the value corresponding to the quantification limit of the method (5 GC/reaction) was assigned both for samples that gave a negative result as well as for those that gave an undetermined result. This value corresponds with 1.07×10^2 GC/g ww and with variable numbers per g dw, depending on each sample.

Few differences in GCEV concentrations were found throughout the phases of the treatment processes assayed, ranging from $4.46 \pm 0.77 \log_{10}$ (GC/g dw) in untreated/pre-treated sludge samples to $4.05 \pm 0.55 \log_{10}$ (GC/g dw) and $4.40 \pm 0.55 \log_{10}$ (GC/g dw), in samples subjected to conventional treatments and samples subjected to intensive treatments, respectively. In addition, percentages of positive samples were not good indicators of treatments efficacy either: 75% for untreated/pre-treated samples, 50% for conventional treatments and 69% for intensive treatments. Therefore, monitoring of GCEV was not a useful tool to assess hygienization performances of the sludge treatment processes studied. The described GCEV values were always above INFEV levels and were similar to data corresponding to other enteric viruses in sludge (Sidhu & Toze 2009). However, studies have pointed out that is difficult to establish a constant relationship between infectious viral particles and GC detected by qPCR (Monpoeho *et al.* 2001). There are many affecting variables and environmental conditions, including time from the initial release from the host (EFSA 2012). The latter is especially important in the sewage sludge treatment processes, as is the capability of PCR of detecting even partially damaged genomes.

Comparison of infectious enteroviruses vs. somatic coliphages

From the average numbers of SOMCPH and INFEV obtained in this research, the following ratio indicator/pathogen of $4.60 \pm 1.63 \log_{10}$ was found. In addition, it was detected that INFEV levels were very low or below detection limits when SOMCPH numbers were below $4 \log_{10}$ (PFU/g dw), Figure 1(a). This result agrees with a previous work in which Gantzer *et al.* (1998) found a threshold of 10^4 PFU/L below which no INFEV were detected in wastewater samples. The result obtained also agrees with a thorough study conducted previously in our laboratory (Lucena *et al.* 2005) within the European Project Horizontal. Large amounts of data from various publications were analyzed and an average ratio of 10^4 – 10^5 was constantly found in sewage, primary sludge and

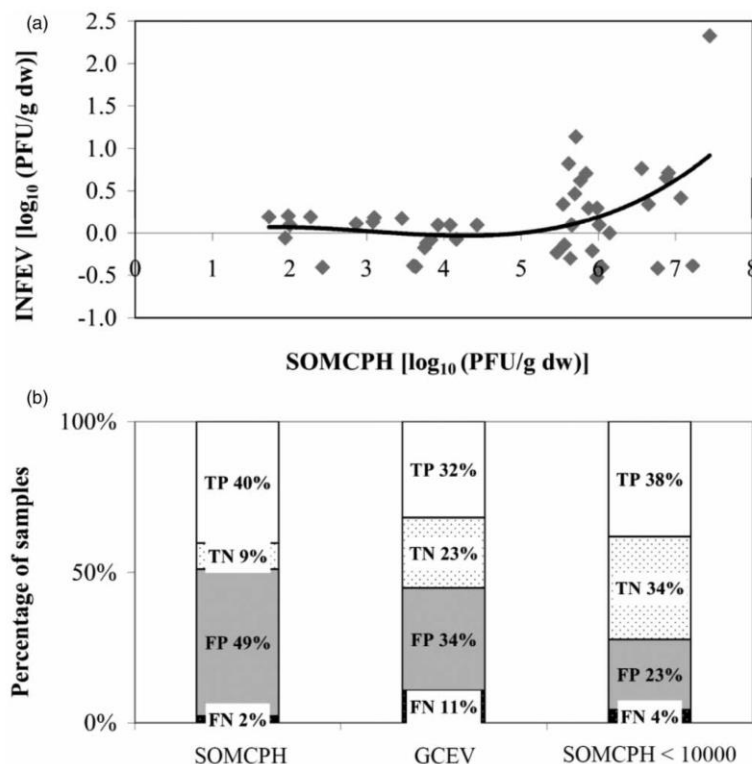


Figure 1 | Evaluation of indicators' performances in the 47 sludge samples analyzed. (a) SOMCPH vs. INFEV. (b) Distribution of true positive (TP), true negative (TN), false positive (FP) and false negative (FN) for the three proposals 'SOMCPH as surrogates for INFEV', 'GCEV as surrogates for INFEV' and 'SOMCPH as surrogates for INFEV including absence of INFEV when SOMCPH levels 10^4 PFU/g dw'.

secondary sludge. In contrast, no threshold was found for GCEV.

Somatic coliphages as model microorganisms for monitoring sludge treatment processes and as sludge quality indicators

A large number of studies suggest that conventional bacterial indicators are not the most adequate as surrogate for viral pathogens. Bacteriophages have been repeatedly proposed as microbiological quality indicators and for the evaluation of hygienization treatment processes in different matrices, as food, natural or treated waters, sludge and bio-solids (Gantzer *et al.* 1998; Grabow 2001; Jofre 2003; Guzmán *et al.* 2007b; Sidhu & Toze 2009; Bertrand *et al.* 2012). Phages have only two physiological stages, active and inactive, and this supposes an advantageous characteristic over bacteria when assessing hygienization performances. The use of bacteriophages as indicators avoids problematic bacterial stages as the viable but

non-culturable state, which could lead to possible regrowth or misleading results (Pascual-Benito *et al.* 2015).

SOMCPH is a group of bacteriophages that has proved to be a good viral indicator. Relationships were even found between them and viral pathogens (Costán-Longares *et al.* 2008). The structure, morphology and size of these phages are similar to those of enteric viruses. Simple and rapid standardized detection methods have been developed to date (Anonymous 2000; Guzmán *et al.* 2007a). Furthermore, this group has been shown to behave well as model microorganisms in sludge treatment processes, in particular when intensive thermal treatment is applied (Mocé-Llivina *et al.* 2003; Ruiz-Hernando *et al.* 2014).

Despite the fact that qPCR sensitivity and specificity are clearly higher to those of cellular culture based techniques, this molecular approach still has important drawbacks, as the inability to distinguish between infectious and non-infectious viral particles. Some progress has been made in this area through the use of viability dyes as propidium monoazide (PMA) and ethidium monoazide (EMA), but

more research is needed. Great efforts are needed to accomplish standardization, including the validation technique as well as the interpretation of results (Bustin et al. 2009).

Three indicator-pathogen proposals were evaluated in order to choose an adequate option for further consideration in sludge guidelines. Percentage of true negative (TN), true positive (TP), false negative (FN) and false positive (FP) samples were obtained taking in account the indicator ability to detect pathogen. The proposals were: 'SOMCPH as surrogates for INFEV', 'GCEV as surrogates for INFEV' and 'SOMCPH as surrogates for INFEV including absence of INFEV when SOMCPH levels $<10^4$ PFU/g dw' (Figure 1(b)). On the one hand, higher percentage of TN will indicate better detection of negative samples, whereas a higher percentage of TP will mean a higher capability for detecting positive samples. On the other hand, it is desirable to have a lower percentage of FN, in order to avoid underestimation of the risk, whereas a lower percentage of FP will mean reduction of risk overestimation. 'SOMCPH' obtained the best results for FN, but the worst results for TN. 'SOMCPH $<10^4$ ' kept a good result for FN while giving the best percentages for FP and TN. Nevertheless, 'GCEV' behaved worse than 'SOMCPH $<10^4$ ' in all cases. Then, the following characteristics of 'SOMCPH $<10^4$ ' proposal were calculated: sensitivity, $Se = TP/(TP + FN)$, specificity, $Sp = TN/(TN + FP)$ and negative predictive value, $NPV = TN/(TN + FN)$. The results obtained, expressed in percentage, were: $Se = 90\%$, $Sp = 59\%$, $NPV = 89\%$.

With this in mind, a limit of $<10^4$ PFU SOMCPH/g dw for unrestricted use of sludge in agriculture will be in agreement with current regulations (EPA 2003) that establish a limit for enteroviruses of <1 PFU/4 g dw. Thus, in the present study, 100% of samples subjected to intensive treatments would fulfill the SOMCPH restriction proposed, while only 18% and 10% of samples subjected to conventional treatments and untreated/pre-treated samples, respectively, would fulfill.

Finally, the achievement of *E. coli* and *Salmonella* limits pointed out in the European regulations (EC 2000) was assessed in a previous study (Levantesi et al. 2014). The 6 \log_{10} *E. coli* removal proposed for the evaluation of advanced treatment performances could not be determined due to the low levels of this microorganism found in the untreated/pre-treated samples.

Taking into consideration the results obtained in this research as well as the results obtained in previous studies, we suggest SOMCPH being included as indicator microorganisms to complement the European regulations (EC 2000) for sludge quality. Other national regulations already include SOMCPH in sludge hygienization treatments

(Anonymous 2012, 2014). Therefore, an alternative text for future EU regulations supported by the Routes project results could be the following: 'sludge to be used in agriculture without restrictions, should comply with these requirements: ... being treated by an advanced process that achieves 6 \log_{10} reduction of a test organism such as *Salmonella* Senftenberg, or 4 \log_{10} reduction of indigenous SOMCPH', '... and fulfilling the limits of *E. coli* <500 CFU/g, *Salmonella* $<1/50$ g and SOMCPH $<10,000$ PFU/g'.

CONCLUSIONS

The levels of SOMCPH, INFEV and GCEV were monitored throughout different hygienization treatment processes for sewage sludge. The high SOMCPH concentration present in the analyzed sludge samples allowed the evaluation of the hygienization ability of all the treatment processes assayed. Reductions were greater when increasing the treatment intensity. On the contrary, INFEV levels were low in treated samples as well as in non-treated samples. In addition, an existing RT-qPCR for human enteroviruses was revised and adapted satisfactorily. GC data obtained clearly exceeded those of INFEV and they remained at similar levels in different samples. It was found that sludge with SOMCPH levels lower than 10^4 PFU/g dw contained INFEV levels that were very low or below detection limits. Ability of SOMCPH for acting as model microorganisms in sludge treatment processes was assessed. The obtained results encourage the inclusion of SOMCPH quantification in future sludge directives. This study suggests that new regulations should consider a 4 \log_{10} reduction of indigenous SOMCPH. Our results also support the implementation of the European Directive by adding to the current limits established in the sanitized sludge regulation (*E. coli* at <500 CFU/g and *Salmonella* at <1 CFU/50 g) a limit for SOMCPH of $<10,000$ PFU/g.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the European Union (ROUTES-FP7-ENV-2010-265156) and the Spanish Government (BES-2012-054179).

REFERENCES

Anonymous 2000 ISO 10705-2: Water Quality – Detection and Enumeration of Bacteriophages – Part 2: Enumeration of

- Somatic Coliphages*. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- Anonymous 2012 *Western Australian Guidelines for Biosolids Management*. Department of Environment and Conservation, Perth, Australia.
- Anonymous 2014 *Decreto 1287, Criterios para el uso de los biosólidos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales (Criteria for the use of biosolids generated in municipal wastewater treatment plants)*. Ministerio de Vivienda, Ciudad y Territorio, Colombia.
- Bertrand, I., Schijven, J. F., Sánchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., Muscillo, M., Verani, M., Nasser, A., Roda Husman, A. M., Myrme, M., Sellwood, J., Cook, N. & Gantzer, C. 2012 The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *Journal of Applied Microbiology* **112**, 1059–1074.
- Blanchard, P., Regnault, J., Schurr, F., Dubois, E. & Ribière, M. 2012 Intra-laboratory validation of chronic bee paralysis virus quantitation using an accredited standardised real-time quantitative RT-PCR method. *Journal of Virological Methods* **180**, 26–31.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. & Wittwer, C. T. 2009 The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* **55** (4), 611–622.
- Costán-Longares, A., Montemayor, M., Payán, A., Méndez, J., Jofre, J., Mujeriego, R. & Lucena, F. 2008 Microbial indicators and pathogens: removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. *Water Research* **42**, 4439–4448.
- EC 2000 *Working Document on Sludge, 3rd Official Draft*. European Commission, Brussels, Belgium. <http://www.ewa-online.eu/comments.html> (accessed 4 April 2015).
- EFSA 2012 Scientific Opinion on Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. *EFSA Journal* **10** (1), 2500.
- EPA 2003 *EPA/625/R-92/015, Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge*. US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, USA.
- Gantzer, C., Maul, A., Audic, J. M. & Schwartzbrod, L. 1998 Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (11), 4307–4312.
- Grabow, W. 2001 Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. *Water SA* **27** (2), 251–268.
- Guzmán, C., Jofre, J., Blanch, A. R. & Lucena, F. 2007a Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil and treated biowaste. *Journal of Virological Methods* **144**, 41–48.
- Guzmán, C., Jofre, J., Montemayor, M. & Lucena, F. 2007b Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 2420–2429.
- Jofre, J. 2003 Bacteriophages as indicators. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology* (B. Gabriel, ed.). John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, USA, pp. 354–363.
- Levantesi, C., Beimfohr, C., Blanch, A. R., Carducci, A., Gianico, A., Lucena, F., Tomei, M. C. & Mininni, G. 2014 Hygienization performances of innovative sludge treatment solutions to assure safe land spreading. *Environmental Science and Pollution Research* **22** (10), 7237–7247.
- Lucena, F., Blanch, A. R. & Jofre, J. 2005 Critical review on Methods for bacteriophages (and viruses) to be monitored in EU in sludges, soils and treated biowastes. University of Barcelona – HORIZONTAL-HYG, DL 2/4.2 Report. <https://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/D2.42%20Bacteriophages%20Critical%20Review.pdf> (accessed 4 April 2015).
- Mininni, G., Blanch, A. R., Lucena, F. & Berselli, S. 2014 EU Policy on sewage sludge utilization and perspectives on new approaches of sludge management. *Environmental Science and Pollution Research* **22** (10), 7361–7374.
- Mocé-Llivina, L., Muniesa, M., Pimenta-Vale, H., Lucena, F. & Jofre, J. 2003 Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (3), 1452–1456.
- Monpoeho, S., Dehée, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J. C., Billaudel, S. & Ferré, V. 2000 Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *BioTechniques* **29**, 88–93.
- Monpoeho, S., Maul, A., Mignotte-Cadiergues, B., Schwartzbrod, L., Billaudel, S. & Ferré, V. 2001 Best viral elution method available for quantification of enteroviruses in sludge by both cell culture and reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (6), 2484–2488.
- Pascual-Benito, M., García-Aljaro, C., Casanovas-Massana, S., Blanch, A. R. & Lucena, F. 2015 Effect of hygienization treatment on the recovery and/or regrowth of microbial indicators in sewage sludge. *Journal of Applied Microbiology* **118**, 412–418.
- Rezaeinejad, S., Vergara, G. G. R. V., Woo, C. H., Lim, T. T., Sobsey, M. D. & Gin, K. Y. H. 2014 Surveillance of enteric viruses and coliphages in a tropical urban catchment. *Water Research* **58**, 122–131.
- Ruiz-Hernando, M., Martín-Díaz, J., Labanda, J., Mata-Alvarez, J., Llorens, J., Lucena, F. & Astals, S. 2014 Effect of ultrasound, low-temperature thermal and alkali pre-treatments on waste activated sludge rheology, hygienization and methane potential. *Water Research* **61**, 119–129.
- Sidhu, J. P. S. & Toze, S. G. 2009 Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. *Environment International* **35**, 187–201.

First received 25 October 2015; accepted in revised form 19 January 2016. Available online 5 February 2016

3.6. Artículo 3: Evaluación de la utilidad de las esporas de clostridios para valorar la higienización de lodos de depuradora

3.6.1. Resumen

Las SSRC han sido propuestas y utilizadas durante años como indicadores de los patógenos más resistentes (huevos de helmintos y formas de resistencia de los protozoos) en el contexto del tratamiento de las aguas. El traslado hacia su uso para el tratamiento de los lodos de depuradora implica varias ventajas: se pueden encontrar a altas concentraciones en los lodos, muestran gran resistencia a los tratamientos de higienización y se dispone de métodos de detección sencillos, rápidos y estandarizados. Sin embargo, los resultados obtenidos en algunos estudios previos muestran algunas debilidades de estos indicadores, como una excesiva resistencia a los tratamientos y aumentos en las concentraciones de SSRC bajo condiciones en que no se espera el mismo comportamiento para los patógenos que indican.

El objetivo de este artículo fue el de estudiar en profundidad los aumentos inesperados de las concentraciones de SSRC y *E. coli* obtenidos, bajo ciertas condiciones de tratamiento, en el “Artículo 1” de la presente investigación. Se valoró, al mismo tiempo, la capacidad de las SSRC para actuar como indicadoras de proceso en la higienización de los lodos de depuradora. Para ello, se repitieron las condiciones de tratamiento que dieron lugar al aumento de las concentraciones de los indicadores en el “Artículo 1”:

- Pretratamiento alcalino con 35,3 g NaOH/kg ST, que produjo un aumento de las concentraciones de SSRC y de *E. coli*.
- Pretratamiento alcalino con 157 g NaOH/kg ST seguido de digestión anaerobia, que produjo un aumento en los niveles de SSRC.
- Pretratamiento de ultrasonidos con 27000 kJ/kg ST seguido de digestión anaerobia, que produjo un aumento en las concentraciones de SSRC.

Se monitorizaron los niveles de *E. coli*, SSRC y TSRC durante dichos procesos, así como en las heces humanas y en distintos puntos del tratamiento de las aguas residuales y los lodos de depuradora y se estudió en profundidad el comportamiento de los indicadores frente a los tratamientos descritos y frente a otros relacionados.

Se confirmó así la reproducibilidad del efecto de los pretratamientos sobre las SSRC, se comprobó que producían un efecto similar sobre los TSRC y se descartó la esporulación como causa. Sin embargo, el aumento de *E. coli* observado en el “Artículo 1” al aplicar 35,3 g NaOH/kg ST no se repitió esta vez, por lo que fue considerado un hecho aislado. Se descartó el efecto del pH y una posible disipación de flóculos que hiciera aumentar el recuento de CFU.

Con respecto a la configuración de pretratamientos seguidos de digestión anaerobia, se confirmó la reproducibilidad de los resultados y se constató que también se producía un aumento en las concentraciones de TSRC.

Se aportaron datos de niveles de SSRC, TSRC y *E. coli* en heces humanas, agua residual y lodo mixto antes y después de digestión anaerobia mesófila en una EDAR, comprobándose cómo ese tipo de digestión rutinaria no producía aumento de los niveles de indicadores.

Se establecieron tres posibles hipótesis para explicar el porqué del aumento de las concentraciones observado, sugiriendo un efecto de recrecimiento debido a las condiciones favorables generadas por los procesos ensayados.

Se pudo concluir, por lo tanto, lo siguiente:

- Ciertas condiciones de pretratamiento o de pretratamiento seguido de digestión anaerobia mesófila del lodo secundario dan lugar, de manera reproducible, a un aumento de las concentraciones de clostridios reductores de sulfito, tanto de su forma esporulada, como de la forma vegetativa.
- Se descartaron como causa la esporulación, la disipación de flóculos y cambios en el pH y se establecieron tres posibles hipótesis que sugieren un recrecimiento como respuesta a la mejora de las condiciones producida por los pretratamientos. No se descartó un posible efecto de resucitación desde el estado de VBNC.
- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y el papel activo que juega el género *Clostridium* en los procesos de digestión anaerobia, se puso en duda su utilización como indicadores de higienización durante el tratamiento de los lodos de depuradora, especialmente en aquellos procesos que incluyan digestión anaerobia.

3.6.2. Informe sobre el factor de impacto

El artículo *“Assessing the usefulness of clostridia spores for evaluating sewage sludge hygienization”* ha sido publicado por la revista *“Bioresource Technology”* en el año 2017. En el año 2015, según el *“InCites Journal Citation Report”*, la revista se encontraba dentro del primer cuartil (Q1) del área temática de *“Biotechnology and Applied Microbiology”*, con un factor de impacto de 4,917.

3.6.3. Informe de participación

La doctoranda Julia Martín Díaz ha realizado todos los análisis experimentales correspondientes al artículo *“Assessing the usefulness of clostridia spores for evaluating sewage sludge hygienization”*, así como la recogida y transporte de muestras. Asimismo, ha participado activamente en el procesamiento, organización y discusión de los resultados obtenidos. Por último, la doctoranda se ha encargado de la redacción del artículo y de la preparación de las tablas y las figuras.

Ninguno de los coautores ha utilizado los datos expuestos en el artículo para la elaboración de su tesis doctoral.

Barcelona, junio de 2017

Dr. Francisco Lucena Gutiérrez



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech



Assessing the usefulness of clostridia spores for evaluating sewage sludge hygienization



Julia Martín-Díaz^{a,b,*}, Maria Ruiz-Hernando^c, Sergi Astals^{c,d}, Francisco Lucena^{a,b}

^a Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

^b The Water Research Institute, University of Barcelona, C/ Montalegre 6, 08001 Barcelona, Spain

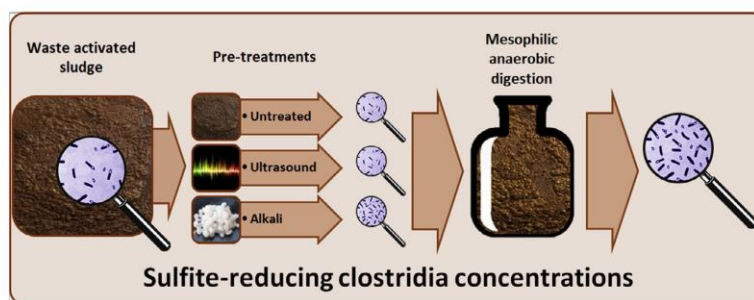
^c Department of Chemical Engineering, University of Barcelona, C/ Martí i Franquès 1, 6th Floor, 08028 Barcelona, Spain

^d Advanced Water Management Centre, The University of Queensland, St Lucia, QLD 4072, Australia

HIGHLIGHTS

- Clostridia and *E. coli* were monitored during sewage sludge anaerobic digestion.
- Results question the usefulness of clostridia as sewage sludge treatment indicators.
- Alkali pre-treatment (35.3 g NaOH/kg TS; 24 h) increased clostridia levels.
- Clostridia also increased after digesting NaOH or ultrasound pre-treated sludge.
- *E. coli* levels did not increase under any of the tested conditions.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2016

Received in revised form 13 November 2016

Accepted 19 November 2016

Available online 22 November 2016

Keywords:

Clostridium spores
Anaerobic digestion
Sewage sludge
Hygienization treatment
Indicator

ABSTRACT

The capability of clostridia spores to act as pathogen indicators in sewage sludge treatment was investigated. Sulfite-reducing clostridia and *E. coli* levels were monitored during waste activated sludge pre-treatments (alkali and ultrasound) and its subsequent mesophilic anaerobic digestion. *E. coli* was maintained or reduced depending on treatment type and intensity. However, alkali pre-treatment (35.3 gNaOH/kg TS) by itself and alkali (157 gNaOH/kg TS) and ultrasound (27,000 kJ/kg TS) pre-treatments followed by anaerobic digestion provoked reproducible clostridia increases. Specifically, up to 2.7 log₁₀ after 35.3 gNaOH/kg TS pre-treatment and up to 1.9 and 1.1 log₁₀ after digesting the 157 gNaOH/kg TS and 27,000 kJ/kg TS pre-treated sludge, respectively. Having rejected the hypotheses of sporulation and floc dissipation, the most plausible explanation for these clostridia increases is re-growth. These results question the suitability of clostridia spores as indicators of sludge treatment and other biological treatments where clostridia may have a role.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ever more solutions are being used worldwide to manage the sewage sludge produced in wastewater treatment plants

(WWTPs), including biological, mechanical, thermal and chemical treatments, and a combination of these. Treatment processes convert sewage sludge into biosolids, a stabilized product suitable for beneficial use. However, due to the high levels of pathogens naturally present in sludge (Guzmán et al., 2007; Lepeuple et al., 2004), only some treatments (or more specifically, only some treatment conditions) guarantee the safe levels required for use of biosolids as fertilizer, the preferred management option. In this context,

* Corresponding author at: Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: juliamadi@hotmail.com (J. Martín-Díaz).

the use of indicator microorganisms is an excellent tool to evaluate the microbiological risk associated with these practices, since they can indicate the hygienization capacity of treatment processes. Current regulations and regulation proposals already include some pathogens (e.g. *Salmonella*, enteric viruses) and/or indicator microorganisms (e.g. *Escherichia coli*, fecal coliforms) to assess sludge microbiological quality (European Commission, 2000; The Council of European Communities, 1986; US Environmental Protection Agency, 2003). However, conventional fecal indicator bacteria such as *Escherichia coli* (*E. coli*) or *Enterococcus* are not suitable to determine the behavior of pathogens that are highly resistant to intensive treatment processes, such as protozoa oocysts or helminth ova. To overcome these limitations, the spores of sulfite-reducing clostridia (SSRC) have been proposed and used for years as alternative indicators in water treatment processes (Agulló-Barceló et al., 2013; Hill and Sobsey, 1998; Lepeuple et al., 2004; Marti et al., 2011; Payment and Franco, 1993). The use of SSRC as indicators in sludge has several advantages: (i) they are present in large numbers, (ii) they exhibit high resistance to intensive treatments, and (iii) there are easy, rapid and standardized detection methods (Guzmán et al., 2007; Lepeuple et al., 2004; Warnes and Keevil, 2004). Nonetheless, they can exhibit excessive resistance to treatment (Lepeuple et al., 2004) and concentrations may even increase after treatment (Rainisalo et al., 2011; Ruiz-Hernando et al., 2014; Salsali et al., 2008). This latter is a major drawback and calls into question the suitability of clostridia spores as indicators in sewage sludge treatment, since concentration increases are not expected for the pathogens they are indicating, i.e., protozoa oocysts and helminth ova. The nature of these unexpected increases has not yet been studied in depth and it still remains unknown whether they are due to reactivation, sporulation processes, re-growth or some other cause. Conversely, the reactivation of *E. coli* from a viable but non culturable state in response to certain treatments is well-known (Erkan and Sanin, 2013; Pascual-Benito et al., 2015).

Anaerobic digestion (AD) is one of the most common sewage sludge treatment processes at WWTPs, since it degrades organic matter, produces energy in the form of methane and kills pathogens. A mixture of primary sludge and waste activated sludge (WAS) is typically fed to WWTP anaerobic digesters. However, WAS has a relatively low biodegradability due to its microbial biomass and extracellular polymeric substances (EPSs) composition (Carrere et al., 2016; Ruiz-Hernando et al., 2015). The introduction of pre-treatments before AD can be used to improve WAS biodegradability. Moreover, these treatments may act on pathogens and may even be used as post-treatments after AD to achieve sludge hygienization (Astals et al., 2012).

Ruiz-Hernando et al. (2014) assessed the hygienization capacity of ultrasound, low-temperature thermal and alkali treatments on WAS and their combination as mesophilic AD pre- or post-treatments. During these processes, bacterial and bacteriophage indicators were monitored (i.e., *E. coli*, somatic coliphages and SSRC). Although *E. coli* was the most sensitive microorganism, apparently being suitable to indicate enteric bacteria, alkali treatment increased *E. coli* levels under one of the specific conditions assayed (35.3 g NaOH/kg TS). Similarly, although SSRC were the most resistant microorganisms, apparently being suitable to indicate protozoa oocysts and helminth ova, unexpected results were obtained under several of the conditions assayed. Specifically, high increases in SSRC levels were observed (i) during alkali pre-treatment (35.3 g NaOH/kg TS), (ii) after mesophilic AD of alkali pre-treated WAS (157 g NaOH/kg TS) and (iii) after mesophilic AD of ultrasound pre-treated sludge (27,000 kJ/kg TS).

The aim of the present research was to further investigate the results obtained in the previous study (Ruiz-Hernando et al., 2014) and to conduct an in-depth assessment of the capacity of

SSRC to act as indicators in sewage sludge treatments. To this end, all the treatments and conditions involved were repeated and carefully examined. The concentrations of *E. coli*, SSRC and total culturable cells of sulfite-reducing clostridia (TSRC) were closely monitored. Additionally, data for these indicators were obtained from raw wastewater, human feces and sludge samples.

2. Materials and methods

2.1. Sludge and wastewater origin

Sludge samples were taken from two municipal WWTPs (WWTP₁ and WWTP₂) in the Barcelona metropolitan area (Spain). WWTP₁ treats about 420,000 m³ wastewater/day and serves a population of 2,275,000 equivalent inhabitants. At WWTP₁, WAS is thickened by centrifugation after leaving the secondary tank. Afterwards, a mixture of 50% primary sludge and 50% WAS is subjected to mesophilic AD with a hydraulic retention time of 37–42 days. WWTP₂ has a treatment capacity of 64,000 m³ wastewater/day and serves a population of 385,000 equivalent inhabitants. At WWTP₂, a mixture of 60% primary sludge and 40% WAS is anaerobically digested under mesophilic conditions with a hydraulic retention time of 20–24 days. The WAS samples used in this study were collected from WWTP₁, whereas the digested sludge used as inoculum came from WWTP₂. The total solids (TS) content of the WAS samples was 54.9 ± 11.6 g/L (mean ± standard deviation). The TS content of the inoculum sample was 23.1 g/L. In addition, sludge samples were taken from both WWTPs before and after AD, as well as raw wastewater. The TS and volatile solids were determined following the guidelines given by the standard methods 2540G (APHA, 2005).

2.2. Human feces origin

Two human feces samples were collected from healthy individuals to evaluate the sulfite-reducing clostridia and *E. coli* concentrations typically present in these types of sample. The TS content was calculated as described in Section 2.1 and was 275.7 ± 15.8 g/L (mean ± standard deviation).

2.3. Pre-treatment conditions

The pre-treatments studied in this research were ultrasound and alkali. The ultrasonic apparatus used was an HD2070 Sonoplus Ultrasonic Homogenizer equipped with a MS 73 titanium microtip probe (Bandelin, Berlin, Germany; 20 kHz). The beaker containing the samples was submerged in an ice bath to prevent an increase in sludge temperature due to the thermal effect of the cavitation phenomenon. The specific energies (E_s) applied were 27,000, 40,000 and 60,000 kJ/kg TS (named as 27,000-US, 40,000-US and 60,000-US, respectively). E_s were calculated as follows:

$$E_s = \frac{P \cdot t}{V \cdot TS} \quad (1)$$

where P is the ultrasonic power of the ultrasonic homogenizer (kW), t is the application time (s), V is the sample volume (L) and TS is the concentration of total solids (g/L).

The alkali pre-treatment was conducted at room temperature (approximately 25 °C) by adding different doses of NaOH with a contact time of 24 h. Samples were subsequently neutralized with HCl_{35%} to reach a pH range of 6.5–7.5. The concentrations studied were 35.3 and 157 g NaOH/kg TS (named 35.3-NaOH and 157-NaOH, respectively).

Another alkali pre-treatment was conducted using a glycine buffer to isolate the effect of pH (named GLY). The glycine buffer (0.25 M, pH 10.5) was prepared and 10 g of the WAS samples

was diluted in a 1:10 (W/V) ratio with this buffer. Samples were then periodically acidified through the addition of HCl_{35%} during the 24 h treatment, with the aim of reproducing the pH drop in the 35.3-NaOH pre-treatment. Untreated sludge was monitored and used as control.

2.4. Mesophilic anaerobic digestion

AD was evaluated through biomethane potential (BMP) tests carried out under mesophilic conditions using batch tests. The procedure was the same as that described in a previous study (Ruiz-Hernando et al., 2014). Briefly, the BMP tests were performed in 115 mL serum bottles sealed with a PTFE/butyl septum, which was fixed by an aluminum crimp cap. The bottles were filled with 50 mL of inoculum and 8.7 mL of WAS sample (untreated or treated), which met an inoculum to substrate ratio of 2 in volatile solid basis considering the untreated WAS volatile solid value (52.7 g VS/L). Before sealing the bottles, all digesters were flushed with nitrogen for 1 min (3 L/min). Finally, digesters were placed in a water bath at 37 ± 1 °C. The bottles were manually mixed by swirling twice a day. Digestion lasted 35 days and samples were taken at the beginning, after 15 days and at the end of the treatment.

2.5. Detection and enumeration of *E. coli* and sulfite-reducing clostridia

Five to ten grams of sludge was mixed in a 1:10 (W/V) ratio with phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2, homogenized with a wrist action shaker at 900 osc/min for 30 min at room temperature and then centrifuged at 300g for 3 min at 4 °C. The resulting supernatant was used to analyze the *E. coli* and sulfite-reducing clostridia present in the sample. For *E. coli*, samples were cultured in Chromocult agar plates (Merck, Germany) supplemented with *E. coli*/coliform-selective supplement (Merck, Germany) using the pour plate procedure. Plates were incubated at 44 °C overnight, and dark-blue/purple *E. coli* colonies were counted. For sulfite-reducing clostridia, TSRC were directly tested from the supernatant, while SSRC were tested after subjecting the supernatant to a thermal shock of 80 °C for 10 min. Clostridia were cultured by mass inoculation in *Clostridium perfringens* selective agar (Scharlab, Spain), followed by incubation in anaerobic conditions at 44 °C overnight. The typical black spherical colonies were counted as clostridia. According to the manufacturer's instructions, about 90% of the colonies can be attributed to *C. perfringens*. Since no confirmation of results was conducted, the colonies obtained were counted as sulfite-reducing clostridia.

2.6. Experimental design

The initial stage of the study aimed to assess the impact of different pre-treatments on microbial indicators. First, the pre-treatment conditions from Ruiz-Hernando et al. (2014) that produced unexpected results by themselves or in combination with AD, were repeated to confirm data. They were 35.3-NaOH, 157-NaOH and 27,000-US. Second, 35.3-NaOH was studied in greater depth and a complementary alkali strategy, GLY, was applied to isolate the effect of pH. Later on, two more ultrasound pre-treatment conditions were tested, i.e., 40,000-US and 60,000-US. In a second stage, untreated and pre-treated WAS samples were subjected to mesophilic AD to confirm Ruiz-Hernando et al. (2014) results. In the final stage, the study was complemented with (i) data from the WWTPs: raw wastewater and sewage sludge before and after mesophilic AD and (ii) data from human feces. All samples assayed in this study were tested in duplicate and the

means and standard deviations were calculated. Fresh samples were collected for each experiment.

3. Results and discussion

3.1. Impact of pre-treatments on indicators

The unexpected clostridia increases obtained in Ruiz-Hernando et al. (2014) may suggest a sporulation process in response to adverse conditions. In this scenario, vegetative clostridia cells would have transformed into the resistant form (spores) thus increasing the number of SSRC detected. To test this hypothesis, the pre-treatments involved were repeated and TSRC were monitored together with SSRC.

As shown in Fig. 1, it was found an increase of 2.73 log₁₀ (CFU/g TS) in TSRC levels and 1.78 log₁₀ in SSRC levels for 35.3-NaOH as compared with untreated sludge. The pH at the beginning of this pre-treatment reached 10.3, however, the buffer capacity of the sludge itself steadily reduced the pH to 7.0 after 24 h. Consequently, it was not necessary to add HCl_{35%} for neutralization. Contrariwise, for 157-NaOH, where the pH rose to more than 12 and it maintained for 24 h, both clostridia populations were similarly reduced, i.e., 1.61 log₁₀ for TSRC and 1.63 log₁₀ for SSRC. A smaller effect was observed for 27,000-US, with increases of 0.33 and 0.28 log₁₀ for TSRC and SSRC respectively, in comparison with the untreated sludge. These results were similar to those obtained in the previous study, confirming their reproducibility for the pre-treatment conditions assayed. Furthermore, it is important to highlight the simultaneous increase in both spores and total cultivable cells, suggesting that the effect of sporulation alone is insufficient to explain the increase in clostridia levels.

Due to the notable increases observed in clostridia (TSRC and SSRC) after 35.3-NaOH pre-treatment in Ruiz-Hernando et al. (2014) and in the present study, this pre-treatment was repeated and further analyzed by monitoring pH and microbial concentrations during the 24 h of treatment contact time. Results are presented in Fig. 2. For the untreated WAS, the pH varied between 6.67 and 6.37 and sulfite-reducing clostridia levels were maintained. Specifically, mean values of 6.12 ± 0.16 and 6.09 ± 0.17 log₁₀ (CFU/g TS) were obtained for TSRC and SSRC, respectively. For the alkali pre-treated sample, the initial pH value was 10.4, which decreased to 6.92 after 24 h. Regarding *E. coli*, no effect was observed this time after treating the sample and concentrations were maintained from 5.72 ± 0.05 to 5.79 ± 0.02 log₁₀ (CFU/g TS) for the untreated sample and from 5.80 ± 0.01 to 5.96 ± 0.01 for the 35.3-NaOH sample. Thus, it appeared that the increase observed for this bacterium in the previous study (Ruiz-Hernando et al., 2014) was not a reproducible

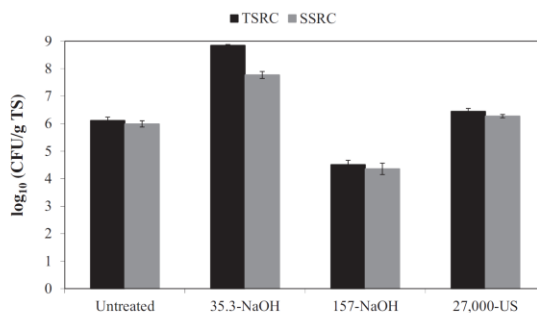


Fig. 1. Effect of pre-treatments on sulfite-reducing clostridia concentrations. Error bars represent standard deviation.

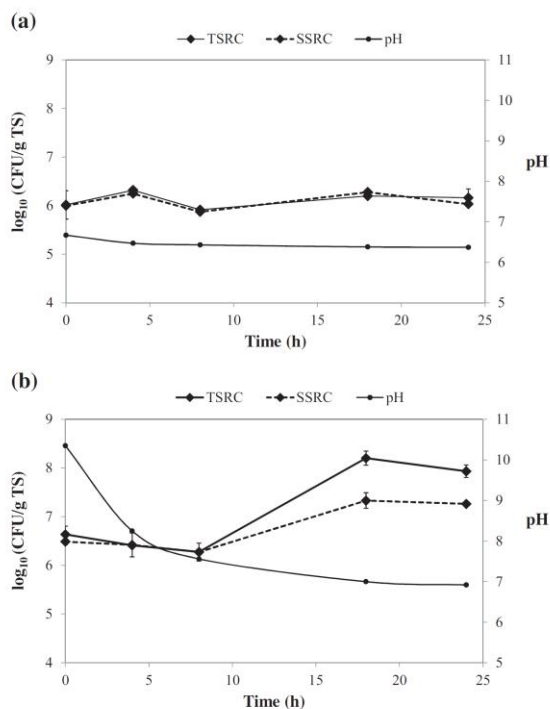


Fig. 2. Variations in sulfite-reducing clostridia levels over 24 h in (a) untreated WAS, and (b) 35.3-NaOH treated WAS. Error bars represent standard deviation.

outcome. Contrarily, a considerable increase in sulfite-reducing clostridia levels was observed for the 35.3-NaOH sample, resulting in 1.29 \log_{10} for TSRC and 0.77 \log_{10} for SSRC. These increases took place during the mid to late phase of the treatment. Under optimal nutrient, temperature and pH conditions, reported doubling times for some *Clostridium* species are below 10 min (Labbe and Huang, 1995; McClane, 2003). In addition, a previous study has shown that alkali treatment of WAS induces carbohydrate and protein solubilization together with volatile fatty acids formation (Chen et al., 2007). Thus, 35.3-NaOH may have provided clostridia with these products during the initial phases of the pre-treatment and clostridia could have used them to grow during the mid to late phase, when the pH was favorable. Contrarily, the higher pH during 157-NaOH may have prevented clostridia re-growth under these pre-treatment conditions and the pre-treatment was so intense that reduced its concentrations (Fig. 1). However, re-growth may not be the only explanation for this increase in clostridia levels. It is widely known that colony forming unit (CFU) counts increase when cell flocs in a sample are dissipated. These flocs, which are naturally found in the sludge matrix, contain bacterial aggregates that are counted as a single CFU; thus masking the real cultivable bacteria numbers. Since floc dissipation may occur due to pH changes and sonication, the hypothesis of floc dissipation was launched.

The effect of pH on SSRC was tested through an alkali treatment using a glycine buffer (GLY) instead of NaOH. As shown in Table 1, the pH curve for 35.3-NaOH was satisfactorily reproduced. However, in this case, no differences in clostridia levels were found when comparing the untreated and the GLY-treated samples. Specifically, SSRC concentrations varied from 7.01 ± 0.02 to

$7.14 \pm 0.03 \log_{10}$ (CFU/g TS) for the untreated sample and from 6.87 ± 0.09 to $6.94 \pm 0.04 \log_{10}$ (CFU/g TS) for the GLY sample. Accordingly, the posited floc dissipation did not occur. From this experiment, it may be concluded that pH is not the causal agent of clostridia increases or, at least, it is not the only factor implicated. It is conceivable that the reagents and conditions used to cause this pH trend were also important factors. To determine the impact of sonication on CFU counts WAS samples were subjected to more intense ultrasound treatments, specifically to 40,000-US and 60,000-US. The aim was to increase treatment intensity to such an extent that it produced floc dissipation and a consequent increase in clostridia and *E. coli* counts (Foladori et al., 2007). The results are shown in Fig. 3. Neither the 40,000-US nor the 60,000-US treatment produced increases in TSRC or SSRC levels. Nevertheless, these treatments were sufficiently intense to produce *E. coli* death, resulting in decreases of 0.77 and 1.35 \log_{10} for 40,000-US and 60,000-US, respectively.

3.2. Impact of mesophilic anaerobic digestion on indicators

To analyze sulfite-reducing clostridia (TSRC and SSRC) behavior during mesophilic AD a new WAS sample was pre-treated, i.e., 35.3-NaOH, 157-NaOH and 27,000-US. Then, 8.7 mL of untreated or pre-treated WAS were mixed with 50 mL of inoculum. The larger volume and the higher sulfite-reducing clostridia concentrations ($7.07 \pm 0.17 \log_{10}$ of TSRC/g TS and $7.17 \pm 0.04 \log_{10}$ of SSRC/g TS) made inoculum the major contributor of sulfite-reducing clostridia in the digestion media (Fig. 4). This contribution can be observed comparing the untreated samples in Fig. 1 and Fig. 4. After 35 days of digestion, TSRC and SSRC levels in the untreated and 35.3-NaOH-treated samples remained similar to the beginning, while 157-NaOH and 27,000-US resulted in TSRC and SSRC increases. These increments in sulfite-reducing clostridia were already visible after 15 days and more remarkable after 35 days of digestion (Fig. 4). For 157-NaOH, TSRC concentrations increased by 1.97 \log_{10} and SSRC by 1.45 \log_{10} , while for 27,000-US, TSRC concentrations increased by 1.16 \log_{10} and SSRC by 0.49 \log_{10} . These results are similar to those obtained in Ruiz-Hernando et al. (2014) and confirm that the combination of some pre-treatments (or more specifically, some pre-treatment conditions) followed by digestion increase clostridia numbers. These increases in TSRC and SSRC concentrations cannot be linked to pH changes since pH remained constant (7.13–7.41) throughout the entire digestion process. The paragraphs that follow consider a number of possible explanations for the unexpected sulfite-reducing clostridia behavior, and conclude with a plausible hypothesis.

Pre-treatments kill sulfite-reducing clostridia competitors in WAS favoring them numerically

The sludge cell disruption and solubilization is a well-known phenomenon for most WAS pre-treatments (Carrere et al., 2016). Therefore, it can be expected that pre-treatments could have impacted on some WAS bacterial populations in a greater extent than sulfite-reducing clostridia, favoring them numerically when mixed with inoculum. This hypothesis implies that the contribution of WAS to the active biomass in a BMP test is relevant. However, the inoculum contribution to clostridia abundance in the digestion media was 1000 and 10 times higher than the 157-NaOH and 27,000-US pre-treated WAS contribution, respectively. Furthermore, this hypothesis cannot explain the sulfite-reducing clostridia increases reported after digesting 27,000-US-treated WAS. In Ruiz-Hernando et al. (2014) this pre-treatment condition did not kill SSRC, *E. coli* or somatic coliphages; and therefore it is unlikely that it disrupted other bacteria.

Table 1
pH measurements during GLY treatment in comparison with 35.3-NaOH.

| | Time (h) | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|----------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 24 |
| Untreated | 7.15 | 6.94 | 6.95 | 6.93 | 6.93 | 6.94 | 6.96 | 6.98 | 7.00 | 7.00 | 7.00 | 7.06 | 7.06 | 7.06 | 6.96 |
| GLY | 10.50 | 10.05 | 8.99 | 8.51 | 8.00 | 7.98 | 7.98 | 7.51 | 7.47 | 7.46 | 7.46 | 7.45 | 7.42 | 7.02 | 7.01 |
| 35.3-NaOH | 10.35 | | | | 8.25 | | | | | 7.56 | | | | | 6.92 |

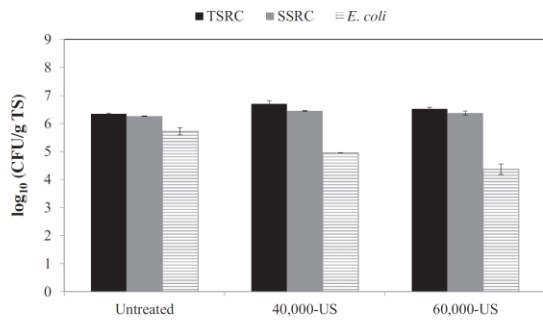


Fig. 3. Effect of high energy ultrasound treatments (40,000-US and 60,000-US) on sulfite-reducing clostridia and *E. coli* concentrations. Error bars represent standard deviation.

Sulfite-reducing clostridia use soluble compounds and cell debris released during WAS pre-treatments to grow during digestion

The visualization of TSRC and SSRC levels increasing under favorable pH conditions during the 35.3-NaOH pre-treatment (see Section 3.1) gave rise to the hypothesis that sulfite-reducing clostridia from the 157-NaOH sample could have increased during

digestion as a result of the better pH conditions and the large amount of easily biodegradable compounds. Recent studies using molecular techniques have revealed the multifaceted role of *Clostridium* on AD, which can take part of most AD steps prior to methanogenesis (i.e., hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and acetate-oxidation) (Shah et al., 2014; Stiborova et al., 2015; Tian et al., 2015; Yuan et al., 2015). Interestingly, Jang et al. (2014) and Park et al. (2014) reported the growth of some groups of *Clostridium* after subjecting thermal and alkali pre-treated sludge to mesophilic AD. The presence of easily biodegradable compounds should have also favored sulfite-reducing clostridia re-growth during sonication (27,000-US); however, this may have not been observed due to the short treatment time (7–8 min depending on sample TS). Nonetheless, this hypothesis cannot explain why in Ruiz-Hernando et al. (2014) sulfite-reducing clostridia did not grow after digesting low-temperature pre-treated WAS (80 °C and 15 min); sample that showed similar solubilization degrees than 157-NaOH and 27,000-US.

Pre-treatment derived inhibitory compounds promote sulfite-reducing clostridia re-growth over other bacteria

The last hypothesis is related to the presence of inhibitory compounds in the digestion media from WAS pre-treatments, which could have favored sulfite-reducing clostridia re-growth over other

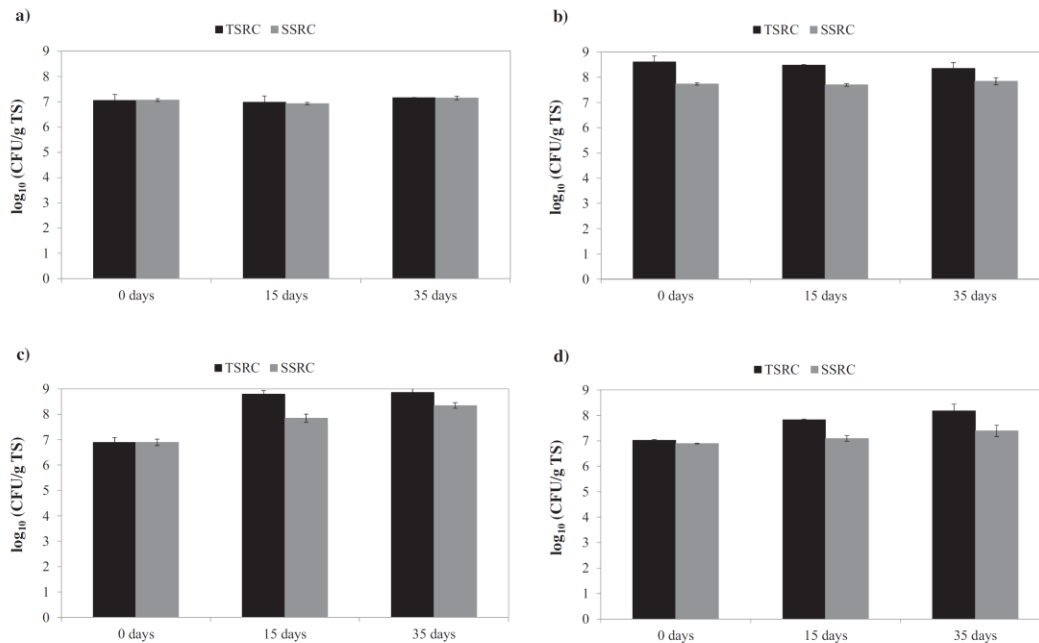


Fig. 4. Effect of digestion on sulfite-reducing clostridia concentrations after 0, 15 and 35 days: (a) Untreated, (b) 35.3-NaOH, (c) 157-NaOH, (d) 27,000-US. Error bars represent standard deviation.

Table 2

Sulfite-reducing clostridia and *E. coli* data for WWTP digestion, raw wastewater and human feces. Mean \pm standard deviation. Data in \log_{10} (CFU/g TS)^a or \log_{10} (CFU/mL)^b. Analyses were performed twice.

| | Human feces | | WWTP ₁ | | | WWTP ₂ | | |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | A ^a | B ^a | Raw wastewater ^b | Sludge before AD ^a | Sludge after AD ^a | Raw wastewater ^b | Sludge before AD ^a | Sludge after AD ^a |
| TSRC | 4.14 \pm 0.02 | 4.31 \pm 0.21 | 3.35 \pm 0.10 | 7.23 \pm 0.03 | 7.19 \pm 0.14 | 3.34 \pm 0.02 | 6.75 \pm 0.32 | 7.08 \pm 0.11 |
| SSRC | 3.73 \pm 0.13 | 4.48 \pm 0.17 | 3.44 \pm 0.06 | 6.78 \pm 0.07 | 6.75 \pm 0.05 | 3.43 \pm 0.04 | 6.77 \pm 0.05 | 7.04 \pm 0.19 |
| <i>E. coli</i> | 6.22 \pm 0.13 | 6.49 \pm 0.18 | 4.26 \pm 0.04 | 6.50 \pm 0.04 | 5.40 \pm 0.01 | 4.73 \pm 0.05 | 7.35 \pm 0.06 | 4.79 \pm 0.04 |
| SSRC/ <i>E. coli</i> | 0.60 | 0.69 | 0.81 | 1.04 | 1.25 | 0.73 | 0.92 | 1.47 |

anaerobic bacteria. In this scenario, the Na⁺ introduced during the alkali pre-treatments or the inhibitory compounds generated during sonication (Peces et al., 2015) could have favored sulfite-reducing clostridia re-growth by limiting the growth of other bacteria. However, the addition of 157 g NaOH/g TS only represents an extra load of 0.74 g Na⁺/L, giving a final digestion media concentration of 1 g Na⁺/L when mixed with the inoculum. This Na⁺ concentration is known as not inhibitory for acetoclastic methanogens and therefore, even less likely to be inhibitory for bacteria (Astals et al., 2015). Indeed, in Ruiz-Hernando et al. (2014) no inhibition (rate and extent) was observed during 157-NaOH and 27,000-US BMP testing. However, a change in bacteria populations caused by the presence of inhibitors cannot be detected by this technique. This hypothesis can explain why in Ruiz-Hernando et al. (2014) no sulfite-reducing clostridia re-growth was observed after low-temperature pre-treated (80 °C and 15 min) WAS digestion; since this pre-treatment conditions do not generate inhibitory compounds (Carrere et al., 2016; Carrère et al., 2010).

Overall, it is likely that sulfite-reducing clostridia increased during digestion as a response to favorable conditions generated by the pre-treatments assayed. Although it is not completely clear which are the dominating mechanisms behind TSRC and SSRC increases, results seem to indicate that re-growth is the most plausible explanation. However, reactivation from a viable but non culturable state cannot be completely discarded.

3.3. Sulfite-reducing clostridia and *E. coli* behavior in the wastewater treatment process

TSRC, SSRC and *E. coli* levels found in human feces and during the wastewater treatment process conducted at two full-scale WWTPs are shown in Table 2. The findings obtained do not expect to be an exhaustive analysis of the microbial concentrations present in the different samples studied, since the number of samples was limited. However, they can be useful to reflect the general assumed behavior of sulfite-reducing clostridia and *E. coli* during the wastewater treatment process. *E. coli* is a non-conservative indicator with low resistance to treatment, whereas SSRC are conservative, capable of resisting high intensity treatments. *E. coli* concentrations in fresh human feces greatly exceeded sulfite-reducing clostridia levels and similar results were found in wastewater. As treatment progressed, clostridia concentrations were maintained due to their higher resistance, whereas *E. coli* levels dropped. A calculation of the SSRC/*E. coli* ratio clearly reflects this tendency. After AD, clostridia concentrations in sludge were significantly higher than those for *E. coli*. Wéry et al. (2008) found a similar trend throughout wastewater treatment processes, including composting.

As shown in Fig. 4, sulfite-reducing clostridia levels did not increase when the digesters were fed with untreated WAS. Likewise, a study of AD routinely performed at the two WWTPs (Table 2), where the sludge is not pre-treated to enhance digestion, revealed a similar behavior. This agrees with previous studies

(Bagge et al., 2005; Guzmán et al., 2007; Sahlström et al., 2004) and suggests that sulfite-reducing clostridia and *E. coli* populations are not generally increased by the effect of AD alone.

Taken together, the findings of this study confirm that some pre-treatments or combinations of pre-treatments followed by AD led to increases in sulfite-reducing clostridia from WAS. Further studies including the use of a molecular method, such as qPCR, would clarify whether these increases are due to re-growth, reactivation or simple increases in colony counts. Nevertheless, the hypotheses of sporulation and floc dissipation have been rejected. Other authors have found similar increases in *C. perfringens* or sulfite-reducing clostridia during storage of composted mixtures of sludge and plant wastes (Rainisalo et al., 2011) or in digested sludge subjected to different temperatures, volatile fatty acid concentrations and pHs (Salsali et al., 2008). In addition, recent studies (Shah et al., 2014; Stiborova et al., 2015; Tian et al., 2015; Yuan et al., 2015) have revealed the *Clostridium* multifaceted role in AD. All this information suggests that the use of SSRC or *C. perfringens* spores as indicators of protozoa oocysts and helminth ova may not be the most suitable choice for sewage sludge samples subjected to AD, since the indicator behavior does not reflect the pathogen behavior.

4. Conclusions

The capability of clostridia spores to act as pathogen indicators in sewage sludge treatment was examined. Sulfite-reducing clostridia (spores and culturable cells) and *E. coli* were monitored in waste activated sludge subjected to alkali and ultrasound pre-treatments and their combination with mesophilic anaerobic digestion. Some treatment conditions reduced *E. coli*. However, alkali pre-treatment (35.3-NaOH) and alkali and ultrasound pre-treatments (157-NaOH; 27,000-US) followed by anaerobic digestion repeatedly increased clostridia. Having rejected sporulation and floc dissipation, the most plausible explanation is re-growth. Considering the multifaceted role of *Clostridium* in anaerobic digestion, results question the suitability of clostridia spores as sludge treatment indicators.

Acknowledgements

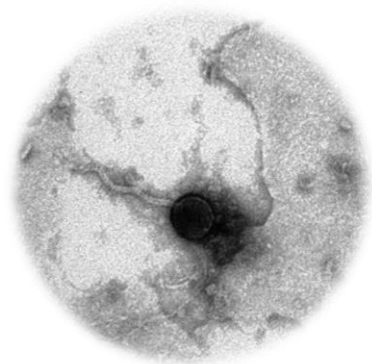
This work was supported by the NOVEDAR Consolider-Ingenio 2010 Project (CSD2007-00055), the European Union (ROUTES-FP7-ENV-2010-265156) and the Spanish Government (CTM2011-24897, CTQ2009-11465, CGL2011-25401 and BES-2012-054179). Sergi Astals is grateful to The University of Queensland (Australia) for his fellowship (UQFEL1608109). The authors are also grateful to Miriam Peces from The University of Queensland (Australia) for her scientific contribution.

References

- Agulló-Barceló, M., Oliva, F., Lucena, F., 2013. Alternative indicators for monitoring *Cryptosporidium* oocysts in reclaimed water. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 4448–4454. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-012-1400-4>.

- APHA, 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. APHA-AWWA-WEF, Washington D.C.
- Astals, S., Venegas, C., Peces, M., Jofre, J., Lucena, F., Mata-Álvarez, J., 2012. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Res.* 46, 6218–6227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.035>.
- Astals, S., Batstone, D.J., Tait, S., Jensen, P.D., 2015. Development and validation of a rapid test for anaerobic inhibition and toxicity. *Water Res.* 81, 208–215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.063>.
- Bagge, E., Sahlström, L., Albin, A., 2005. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Res.* 39, 4879–4886. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2005.03.016>.
- Carrère, H., Dumas, C., Battimelli, A., Batstone, D.J., Delgenès, J.P., Steyer, J.P., Ferrer, I., 2010. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability : a review. *J. Hazard. Mater.* 183, 1–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.06.129>.
- Carrere, H., Antonopoulou, G., Affes, R., Passos, F., Battimelli, A., Lyberatos, G., Ferrer, I., 2016. Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: from lab-scale research to full-scale application. *Bioresour. Technol.* 199, 386–397. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.007>.
- Chen, Y., Jiang, S., Yuan, H., Zhou, Q., Gu, G., 2007. Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Res.* 41, 683–689. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.07.030>.
- Erkan, M., Sanin, F.D., 2013. Can sludge dewatering reactivate microorganisms in mesophilically digested anaerobic sludge? Case of belt filter versus centrifuge. *Water Res.* 47, 428–438. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.028>.
- European Commission, 2000. Working Document on Sludge, 3rd Official Draft. European Commission, Brussels, Belgium <<http://www.ewa-online.eu/comments.html>> (last accessed 25.10.16).
- Foladori, P., Laura, B., Gianni, A., Giuliano, Z., 2007. Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry – fecal indicators, wastewater and activated sludge. *Water Res.* 41, 235–243. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.08.021>.
- Guzmán, C., Jofre, J., Montemayor, M., Lucena, F., 2007. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2420–2429. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03487.x>.
- Hill, V., Sobsey, M., 1998. Microbial indicator reductions in alternative treatment systems for swine wastewater. *Water Sci. Technol.* 38, 119–122. [http://dx.doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00811-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00811-7).
- Jang, H.M., Cho, H.U., Park, S.K., Ha, J.H., Park, J.M., 2014. Influence of thermophilic aerobic digestion as a sludge pre-treatment and solids retention time of mesophilic anaerobic digestion on the methane production, sludge digestion and microbial communities in a sequential digestion process. *Water Res.* 48, 1–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.041>.
- Labbe, R.G., Huang, T.H., 1995. Generation times and modeling of enterotoxin-positive and enterotoxin-negative strains of *Clostridium perfringens* in laboratory media and ground Beef. *J. Food Prot.* 58, 1303–1306.
- Lepeuple, A.S., Gaval, G., Jovic, M., Roubin, M.R., De, 2004. Horizontal Work Package 3, Task 6: Literature Review on Levels of Pathogens and their Abatement in Sludges, Soil and Treated Biowaste.
- Marti, E., Monclús, H., Jofre, J., Rodríguez-Roda, I., Comas, J., Balcázar, J.L., 2011. Removal of microbial indicators from municipal wastewater by a membrane bioreactor (MBR). *Bioresour. Technol.* 102, 5004–5009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.068>.
- McClane, B.A., 2003. *Clostridium perfringens*. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W. (Eds.), *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker Inc, New York (U.S.A.), Basel (Switzerland), pp. 91–104.
- Park, S.K., Jang, H.M., Ha, J.H., Park, J.M., 2014. Sequential sludge digestion after diverse pre-treatment conditions: sludge removal, methane production and microbial community changes. *Bioresour. Technol.* 162, 331–340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.152>.
- Pascual-Benito, M., García-Aljaro, C., Casanovas-Massana, S., Blanch, A.R., Lucena, F., 2015. Effect of hygienization treatment on the recovery and/or regrowth of microbial indicators in sewage sludge. *J. Appl. Microbiol.* 118, 412–418. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12708>.
- Payment, P., Franco, E., 1993. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2418–2424.
- Peces, M., Astals, S., Mata-Álvarez, J., 2015. Effect of moisture on pretreatment efficiency for anaerobic digestion of lignocellulosic substrates. *Waste Manage.* 46, 189–196. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2015.08.022>.
- Rainisalo, A., Romantschuk, M., Kontro, M.H., 2011. Evolution of clostridia and streptomycetes in full-scale composting facilities and pilot drums equipped with on-line temperature monitoring and aeration. *Bioresour. Technol.* 102, 7975–7983. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.087>.
- Ruiz-Hernando, M., Martín-Díaz, J., Labanda, J., Mata-Álvarez, J., Llorens, J., Lucena, F., Astals, S., 2014. Effect of ultrasound, low-temperature thermal and alkali pretreatments on waste activated sludge rheology, hygienization and methane potential. *Water Res.* 61, 119–129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.012>.
- Ruiz-Hernando, M., Cabanillas, E., Labanda, J., Llorens, J., 2015. Ultrasound, thermal and alkali treatments affect extracellular polymeric substances (EPSs) and improve waste activated sludge dewatering. *Process Biochem.* 50, 438–446. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.01.001>.
- Sahlström, L., Aspan, A., Bagge, E., Danielsson-Tham, M.L., Albin, A., 2004. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Res.* 38, 1989–1994. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.031>.
- Salsali, H., Parker, W.J., Sattar, S.A., 2008. The effect of volatile fatty acids on the inactivation of *Clostridium perfringens* in anaerobic digestion. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 659–665. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-007-9514-4>.
- Shah, F.A., Mahmood, Q., Shah, M.M., Pervez, A., Asad, S.A., 2014. Review article. Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. *Sci. World J.* 183752, 1–21. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/183752>.
- Stiborova, H., Wolfram, J., Demnerova, K., Macek, T., Uhlik, O., 2015. Bacterial community structure in treated sewage sludge with mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. *Folia Microbiol. (Praha)* 60, 531–539. <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-015-0396-9>.
- The Council of European Communities, 1986. Council directive 86/278/EEC on protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *Off. J. Eur. Communities* 4, 6–12.
- Tian, Z., Zhang, Y., Li, Y., Chi, Y., Yang, M., 2015. Rapid establishment of thermophilic anaerobic microbial community during the one-step startup of thermophilic anaerobic digestion from a mesophilic digester. *Water Res.* 69, 9–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.001>.
- US Environmental Protection Agency, 2003. Environmental regulations and technology control of pathogens and vector attraction in sewage sludge control of pathogens and vector attraction. *Environ. Protect.* [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-1882\(99\)80035-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-1882(99)80035-4).
- Warnes, S.L., Keevil, C.W., 2004. Horizontal Work Package 3, Task 4: Desk Studies on Feasibility of Horizontal Standard Rapid Methods for Detection of *Clostridium perfringens* and Enterococci in Sludges, Soil, Soil Improvers, Growing Media and Biowastes.
- Wéry, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenès, J.P., Godon, J.J., 2008. Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Res.* 42, 53–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.048>.
- Yuan, Y., Wang, S., Liu, Y., Li, B., Wang, B., Peng, Y., 2015. Long-term effect of pH on short-chain fatty acids accumulation and microbial community in sludge fermentation systems. *Bioresour. Technol.* 197, 56–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.025>.

4. Evaluación del comportamiento de indicadores y patógenos en los sedimentos fluviales



4. Evaluación del comportamiento de indicadores y patógenos en los sedimentos fluviales

4.1. El papel protector de los sedimentos

Los microorganismos de origen fecal, como el resto de contaminantes, pueden entrar a formar parte de los sistemas fluviales a través de fuentes difusas y fuentes puntuales. Una vez dentro, su comportamiento y supervivencia dependen de una gran variedad de factores externos (relacionados con el medio en el que se encuentran) e internos (relacionados con el propio microorganismo). De esta forma, van a ser factores determinantes, entre otros, tanto el pH, la temperatura, la radiación ultravioleta, el grado de humedad, la fuerza iónica o las condiciones redox, como la cantidad de materia orgánica, los niveles de nutrientes, la presencia o no de biofilms, la diversidad y ecología microbiana del medio o las características físico-químicas de los sedimentos (mineralogía y distribución del tamaño del grano). No obstante, el tipo de microorganismo, su tamaño, forma y composición e, incluso, su estado y actividad metabólica son elementos igualmente importantes.

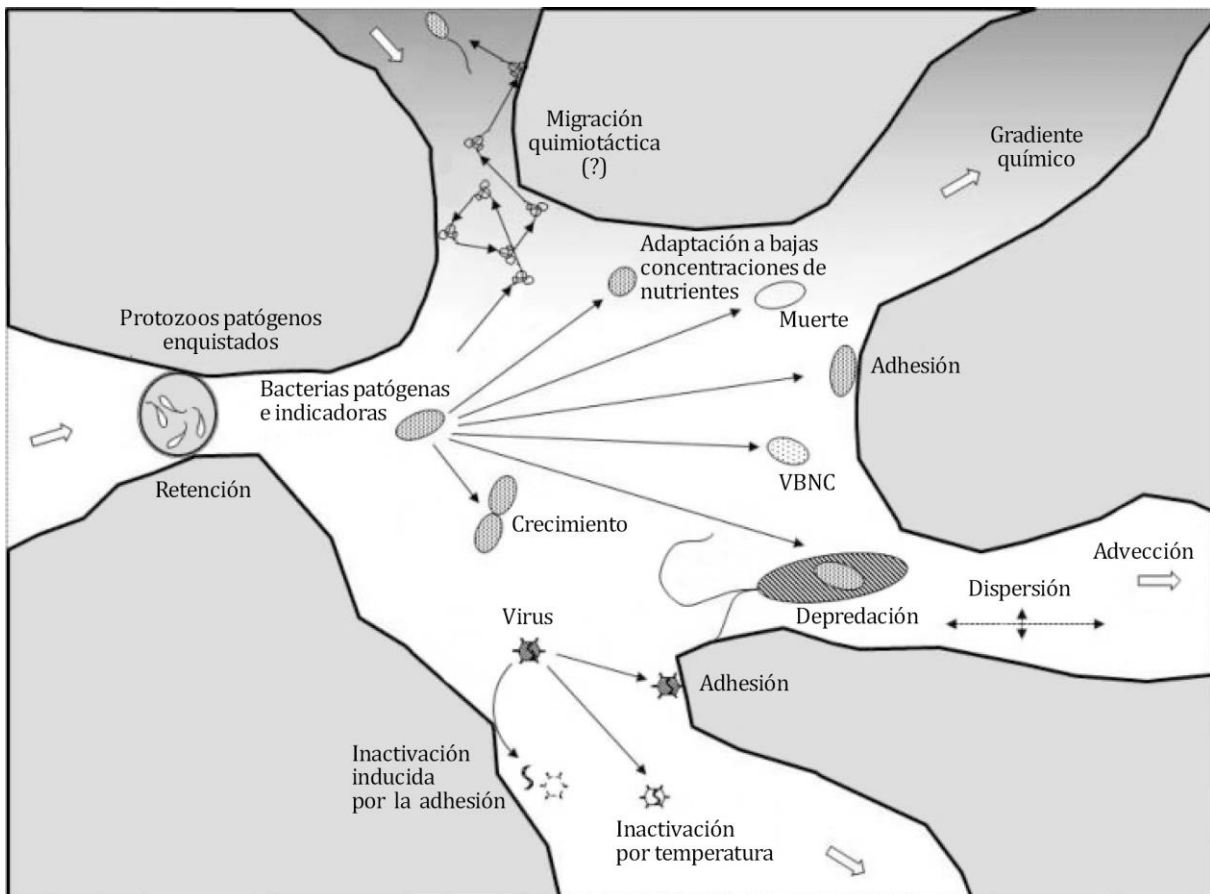


Figura 11. Relación de los patógenos e indicadores con las partículas sólidas de sedimento en un sistema fluvial. Fuente: adaptado de Bradford et al. (2013).

La mayoría de los patógenos e indicadores presentes en los sistemas acuáticos se encuentran generalmente adheridos a las partículas de sedimento, que contienen

nutrientes y les confieren protección de los depredadores y la radiación ultravioleta (De Brauwere et al., 2014; Jamieson, et al., 2005), pudiendo de esta manera permanecer activos incluso semanas después de haber sido liberados al medio. La supervivencia en los sedimentos se ve, por lo tanto, incrementada con respecto a la columna de agua (Craig et al., 2004; Walters et al., 2014). Sin embargo, la relación de los microbios con las partículas del sedimento es diversa y compleja (Fig. 11).

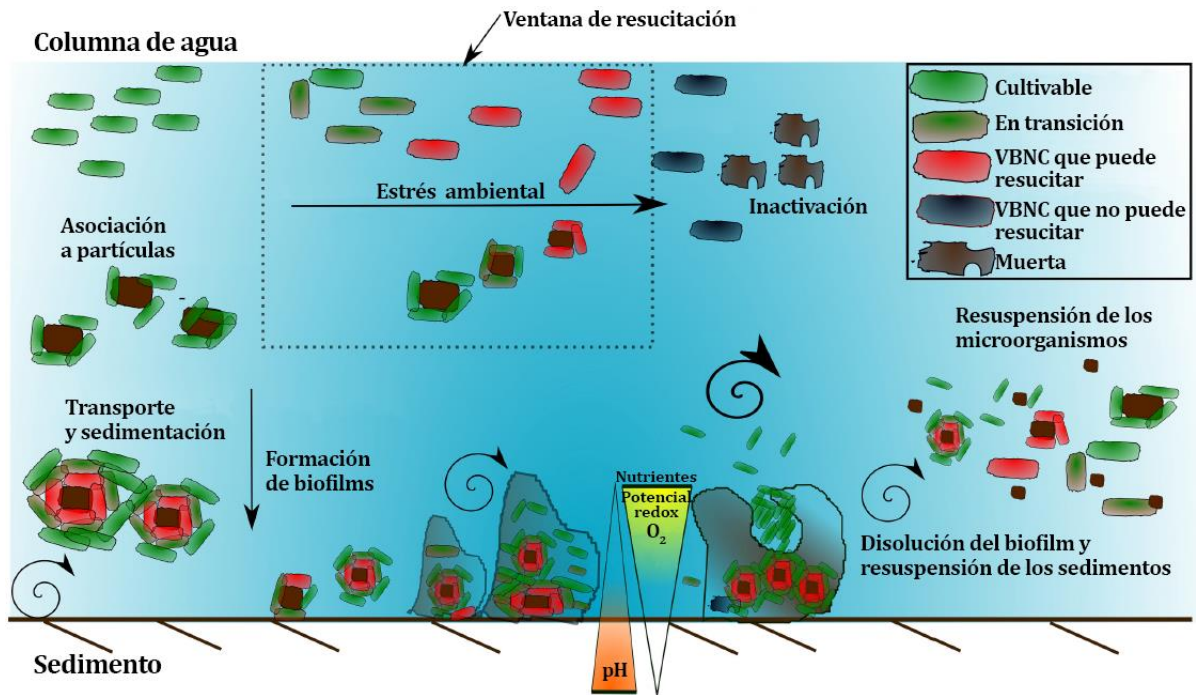


Figura 12. Comportamiento de las bacterias en la interfase sedimento-agua de un sistema fluvial. Fuente: adaptado de Hassard et al. (2016).

La depredación por protozoos (De Brauwere et al., 2014), la falta de humedad y la radiación ultravioleta son algunas de las principales causas de muerte que afectan a las bacterias en los ambientes acuáticos naturales. En ese sentido, la adhesión a partículas de sedimento ofrece importantes beneficios. Por otro lado, la escasez de nutrientes en un medio tan hostil en comparación con el tracto gastrointestinal del cual proceden implica la necesidad de adaptación a la nueva situación. Otra estrategia interesante es la disminución de la actividad metabólica hasta entrar en el estado de VBNC, llamado así por la imposibilidad de las técnicas de cultivo para detectar las bacterias que se encuentran en esa fase. El tiempo y/o la capacidad de la bacteria para resistir las condiciones adversas (ventana de resucitación) determinarán si el estado de VBNC se vuelve irreversible, llevando finalmente a la muerte de la bacteria o si ésta consigue recuperar su estado inicial (Fig. 12). Por el contrario, si las condiciones son lo suficientemente favorables, las bacterias fecales podrían incluso llegar a multiplicarse (Bradford et al., 2013). Con respecto a los virus entéricos, su adhesión a partículas sólidas del sedimento puede resultar un hecho ventajoso al proporcionar protección frente a la radiación ultravioleta o puede resultar una amenaza al producir su

inactivación, todo ello dependiendo de la composición del virus y del sólido y de condiciones como el pH o la fuerza iónica (Fig. 11). La temperatura, por su parte, es un factor altamente inactivante tanto en el caso de los virus como en el de los protozoos patógenos. Por otro lado, el gran tamaño de los quistes que forman estos últimos puede ser el causante de su retención irreversible por parte de las partículas de sedimento (Bradford et al., 2013) (Fig. 11).

La asociación de los microorganismos de origen fecal con los sólidos del sistema fluvial también será un hecho determinante de su movilidad en el medio, ya que al adherirse a partículas de sedimento se verán sometidos a los mismos procesos físicos que dichas partículas, dando lugar, por ejemplo, a procesos de sedimentación (Fig. 12). La unión microorganismo-partícula parece deberse, inicialmente, a las fuerzas físico-químicas descritas en la teoría extendida de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) (Hassard et al., 2016; van Loosdrecht et al., 1989). En un principio, se producen uniones débiles a consecuencia de las interacciones electrostáticas y las fuerzas de van der Waals, que superan las fuerzas de repulsión y provocan la aproximación del microbio y la partícula. En ese momento, la presencia de apéndices y polisacáridos extracelulares puede dar paso a uniones mucho más fuertes y permanentes. La reversibilidad o irreversibilidad de la unión, finalmente, se verá influenciada por distintos factores, como la rugosidad de la partícula sólida, la carga de la superficie microbiana o, incluso, el estado metabólico del microorganismo (De Brauwere et al., 2014; Hassard et al., 2016; Jamieson et al., 2005; van Loosdrecht et al., 1989).

La sedimentación del microorganismo puede suponer el primer paso antes de entrar a formar parte del biofilm presente en la interfase agua-sedimento (Fig. 12). La capacidad de los patógenos e indicadores para generar biofilms y para integrarse en los ya existentes ha sido descrita en distintos ambientes naturales y artificiales (Hassard et al., 2016). Este hecho puede dar lugar a un aumento de la supervivencia, al proporcionarles protección frente a las condiciones ambientales externas.

En cualquier caso, la capacidad de los sedimentos fluviales para actuar como reservorios de microorganismos es un hecho y la resuspensión de los mismos en la columna de agua debido a distintas causas implica también la resuspensión de los microorganismos asociados, pudiendo acarrear los consiguientes riesgos.

4.2. Presencia de microorganismos fecales en los sedimentos fluviales

La bibliografía indicando concentraciones de microorganismos fecales en los sedimentos fluviales es heterogénea y poco extensa. Los resultados se encuentran influenciados por la diversidad de localizaciones, la variedad de sedimento muestreado, el distinto grado de contaminación de cada sistema fluvial y los métodos de detección utilizados. Todo ello dificulta las comparaciones. En la Tabla 4 se recogen algunos ejemplos que muestran las concentraciones de indicadores y patógenos, tanto bacterianos como víricos, encontrados en sedimentos fluviales. Tradicionalmente, sin embargo, los

sedimentos de playas, bahías y estuarios han sido estudiados más en profundidad, existiendo mayor cantidad de datos (Hassard et al., 2016; Pachepsky y Shelton, 2011).

Tabla 4. Concentraciones de microorganismos fecales en varios tipos de sedimentos fluviales. dw = peso seco; ww = peso húmedo; * = muestras obtenidas filtrando agua del río después de provocar la resuspensión de los sedimentos en la columna de agua; LOD = límite de detección.

| Microorganismo | Tipo de sedimento | Concentración | Referencia |
|----------------------------------|-----------------------------|--|----------------------------|
| <i>E. coli</i> | Sedimento fluvial | $2,1 \cdot 10^2 - 2,2 \cdot 10^5$ CFU/g dw | Ouattara et al. (2011) |
| Enterococos intestinales | Sedimento fluvial | $1,0 \cdot 10^2 - 3,8 \cdot 10^5$ CFU/g dw | Ouattara et al. (2011) |
| <i>E. coli</i> | Sedimento del lecho del río | $1,3 \cdot 10^5$ CFU/ml* | Droppo et al. (2009) |
| <i>Salmonella</i> spp. | Sedimento del lecho del río | $1,2 \cdot 10^5$ CFU/ml* | Droppo et al. (2009) |
| Coliformes fecales | Sedimento del fondo del río | $4 - 1,66 \cdot 10^4$ CFU/g dw | Niewolak (1998) |
| <i>E. coli</i> | Sedimento de arroyo | $3,9 \cdot 10^2 - 1,2 \cdot 10^4$ CFU/g dw | Giddings y Oblinger (2004) |
| Coliformes fecales | Sedimento de río urbano | $8,0 \cdot 10^1 - 1,2 \cdot 10^4$ CFU/g ww | Donovan et al. (2008) |
| Norovirus humanos (genogrupo II) | Sedimento del fondo del río | <LOD | Miura et al. (2011) |
| Enterovirus | Sedimento del fondo del río | < LOD - $2,4 \cdot 10^2$ GC/ g ww | Miura et al. (2011) |

4.3. Ríos mediterráneos, lluvias y resuspensión

Los sistemas fluviales de la región mediterránea se consideran especialmente sensibles en cuanto al deterioro de la calidad de sus aguas se refiere, debido, en gran parte, a las particularidades climáticas a las que se encuentran sometidos. En el clima mediterráneo, los patrones anuales de temperatura y precipitación siguen una fuerte estacionalidad, con veranos secos y cálidos e inviernos fríos y húmedos. Los eventos de lluvias a lo largo del año se concentran en pocos días muy lluviosos alternados con largos periodos secos. Se produce también una alta variabilidad interanual de las precipitaciones, siendo típica la alternancia de años secos, normales y húmedos (Bonada y Resh, 2013; Martín-Vide et al., 2016).

En este sentido, los patrones de precipitación se ven reflejados en el caudal de los ríos mediterráneos, altamente variable a lo largo del año. Durante el periodo seco, la falta de lluvias y la evapotranspiración producen importantes reducciones del caudal, mientras que los periodos de lluvias dan lugar a drásticos aumentos del mismo, siendo comunes las inundaciones. De esta forma, aunque los momentos de año en que se producen sequías y lluvias son predecibles, la intensidad de las mismas no lo es en absoluto. Los ciclos secuenciales de sequías e inundaciones, el impacto antropogénico derivado de una alta densidad poblacional y la consiguiente competencia entre los usos agrícolas,

domésticos y ambientales, hacen que los sistemas fluviales mediterráneos estén sometidos a un nivel de estrés extremadamente alto (Bonada y Resh, 2013).

El río Llobregat se sitúa en Cataluña, realiza un recorrido de 165 km y su cuenca ocupa un área de 4948 km². Nace en la Sierra del Cadí, a 1259 m de altitud y desemboca al mar Mediterráneo en forma de delta en El Prat de Llobregat (Barcelona), después de atravesar varias zonas con elevadas presiones demográficas. Los dos principales afluentes de los que bebe son el Cardener y el Anoia. La descarga de agua media en la desembocadura es de 603 hm³ al año o 19 m³/s. Sin embargo, como buen representante de los ríos mediterráneos, se producen variaciones extremas de caudal a nivel estacional, interanual e incluso diario, pudiendo pasar de menos de 5 m³/s a 300 m³/s durante un mismo día después de un evento de fuertes lluvias. Con respecto a la escala anual, durante el mes de mayo se produce normalmente una subida de caudal, coincidiendo con la época de deshielo. Interanualmente, los caudales medios sufren variaciones de entre 6 m³/s y 40 m³/s. Frecuentemente las precipitaciones se producen en la zona de la cabecera, lejos de las regiones donde el uso del agua es más intensivo (tramos medio y bajo), por lo que la retención del agua en embalses se vuelve esencial a la hora de regular el caudal. Cuatro embalses principales se distribuyen a lo largo de la cuenca: La Baells en el río Llobregat, La Llosa del Cavall y Sant Ponç en el río Cardener y Sant Martí de Tous en el río Anoia (Marcé et al., 2012).

El agua del Llobregat se emplea principalmente en actividades humanas, alcanzándose una utilización del 30% del caudal que se reparte en usos agrícolas, industriales y abastecimiento urbano de agua potable. La mayor ETAP que opera en el río se sitúa en Sant Joan Despí, cerca de la desembocadura y abastece a gran parte de la ciudad de Barcelona, pudiendo llegar a dejar el cauce del río prácticamente vacío en épocas de sequía, por lo que el refuerzo procedente de pozos y de una desaladora en funcionamiento desde 2009 (Roger, 2009) es esencial para garantizar el abastecimiento municipal. La calidad del agua en el punto de captación de la ETAP se ve altamente impactada por los efluentes de las 64 EDARs que se encuentran distribuidas a lo largo de la cuenca, por las actividades agrícolas realizadas en la zona del río Anoia y por las minas de potasa situadas en el río Cardener, así como por las múltiples captaciones, conexiones, ramificaciones y retornos existentes. Esta gran variedad de estructuras se ha ido complementando y mejorando a lo largo del tiempo con el fin de compatibilizar los distintos usos con el mantenimiento de una calidad del agua aceptable. Todo ello hace que, de los 600 hm³ de agua que aproximadamente llegan al último tramo del río (donde se sitúa la ETAP de Sant Joan Despí), 205 hm³ hayan sido ya previamente utilizados, tratados y devueltos al Llobregat (Marcé et al., 2012).

Las peculiaridades climáticas y demográficas de los ríos mediterráneos y, en concreto, del río Llobregat, los convierten en potenciales modelos para el estudio de los escenarios futuros predichos por los expertos en cambio climático. Con respecto a la calidad microbiológica del agua, los eventos de lluvias torrenciales habituales en la cuenca del

Llobregat dan lugar a flujos turbulentos y crecidas de caudal que pueden provocar la resuspensión de los sedimentos fluviales y la consiguiente entrada en la columna de agua de los patógenos e indicadores fecales que se encontraban adheridos a los mismos. Por otro lado, los periodos de sequía producen la disminución del caudal y, como consecuencia, la concentración de los patógenos en el agua.

4.4. Indicadores de contaminación fecal y patógenos de referencia para valorar los riesgos microbiológicos asociados a la resuspensión de los sedimentos fluviales

Los riesgos sanitarios y ambientales que supone la movilización de los patógenos desde los sedimentos hacia el agua del río pueden controlarse y reducirse si se conoce el tipo y extensión de la misma. La generación de datos microbiológicos sobre presencia, persistencia y dinámica de los patógenos *in situ* y su inclusión en modelos hidrológicos predictivos que actúen a nivel de la cuenca completa puede ser de gran ayuda. Otro modo de obtención de datos es la creación de microcosmos, dispositivos experimentales a escala de laboratorio que permiten investigar la respuesta de los microorganismos a condiciones ambientales específicas y determinar sus ratios de inactivación (De Brauwere et al., 2014).

A la hora de seleccionar los indicadores y patógenos de referencia más adecuados para su utilización en el contexto de los sedimentos fluviales es importante tener en cuenta la variedad y complejidad de los procesos que afectan a la presencia, supervivencia y movilidad de los mismos. Como ya se explicó anteriormente, *E. coli* parece ser el indicador no conservativo más adecuado para valorar la contaminación fecal y está presente en la gran mayoría de las regulaciones. Su detección mediante técnicas tradicionales de cultivo aporta información sobre los niveles de bacterias viables presentes en los sedimentos, pero infravalora la concentración real al ser incapaz de detectar las bacterias que se encuentran en el estado de VBNC. De esta forma, la detección de copias genómicas mediante qPCR puede ser una opción a tener en cuenta. Por otro lado, como ya se explicó, las características de los colifagos somáticos y de las esporas de clostridios reductores de sulfito les convierten en buenos indicadores del comportamiento de virus entéricos y de huevos de helmintos y formas de resistencia de los protozoos, respectivamente.

En cuanto a los patógenos de referencia, *Salmonella* cumple con los requisitos deseables para representar a las bacterias fecales patógenas y cuenta con la existencia de modelos de dosis-respuesta. Aunque las especies no tifoideas raramente causan brotes transmitidos por el agua, *Salmonella enterica* serovar. Thyphi sí causa importantes y devastadores brotes de fiebres tifoideas (WHO, 2011). Como representante de los virus entéricos, la idoneidad del género *Enterovirus* ya ha sido explicada anteriormente. Sin embargo, las concentraciones de partículas infecciosas detectadas en el ámbito de los sistemas fluviales a menudo son bajas (Hassard et al., 2016; Miura et al., 2011), por lo que la detección mediante RT-qPCR puede ser de gran ayuda.

La Directiva 2004/35/CE de la Unión Europea sobre responsabilidad medioambiental establece el principio de “*quien contamina paga*”, por el cual una empresa que cause daños medioambientales es responsable de los mismos, debe tomar las medidas preventivas o reparadoras necesarias y sufragar todos los costes relacionados (CE, 2004). En el ámbito de los sistemas fluviales la variedad de fuentes de contaminación puntuales y difusas que pueden actuar sobre los mismos dificulta su identificación, por lo que la utilización de microorganismos marcadores de MST puede ser de gran ayuda a la hora de discriminar el origen de la contaminación fecal (humano o de distintas especies animales) y, en última instancia, de exigir responsabilidades. Los representantes del género *Bifidobacterium* se encuentran a altas concentraciones en las heces humanas y animales y su condición de anaerobios, junto con sus complejos requerimientos nutricionales y la incapacidad de multiplicarse a temperaturas inferiores a 30°C reducen al mínimo sus posibilidades de crecimiento fuera del tracto gastrointestinal (Bonjoch et al., 2005). Las especies de *Bifidobacterium* capaces de fermentar sorbitol suelen encontrarse en concentraciones más altas en las muestras de procedencia humana que en las de procedencia animal, por lo que la utilización de un ratio entre bifidobacterias fermentadoras de sorbitol y bifidobacterias totales puede actuar como herramienta de MST (Bonjoch et al., 2005). El género *Bacteroides* también forma parte de la microbiota intestinal de humanos y animales de sangre caliente, estando presente en las heces a concentraciones muy altas. De la misma forma que las bifidobacterias, la replicación fuera del tracto gastrointestinal es muy improbable, debido a los requerimientos de anaerobiosis y de ciertos nutrientes. Algunas cepas se encuentran más frecuentemente y en más altas concentraciones en heces de algunas especies animales concretas o en heces humanas. Asimismo, muchos de los bacteriófagos que infectan cepas de *Bacteroides* muestran una alta especificidad por sus hospedadores (Jofre et al., 2014). En este sentido, la utilización de los bacteriófagos que infectan la cepa GA17 de *Bacteroides thetaiotaomicron* como trazadores de la contaminación fecal humana (MST) es una herramienta prometedora que está mostrando buenos resultados. En concreto, el uso de un ratio relacionando la abundancia de estos bacteriófagos y la de colifagos somáticos parece ser de especial utilidad (Jofre et al., 2014; Muniesa et al., 2012).

4.5. Artículo 4: Movilización de indicadores microbianos, marcadores de MST y patógenos después de eventos de lluvias

4.5.1. Resumen

Los eventos de fuertes lluvias han estado frecuentemente asociados con brotes de enfermedades infecciosas en relación con el agua de bebida procedente de masas superficiales o subterráneas, así como en relación con aguas de uso recreativo y con el consumo de crustáceos y moluscos. Con respecto a los sistemas fluviales, las dos causas principales parecen ser la sobrecarga de los sistemas unitarios de alcantarillado (y la consiguiente incapacidad de las EDARs para depurar todo el volumen de agua recibido) y la movilización de los patógenos desde los sedimentos fluviales hacia la columna de agua. El aumento en la frecuencia e intensidad de los eventos de lluvias torrenciales predicho por las proyecciones de futuro de los expertos en cambio climático da lugar a que el estudio de dichos eventos y los riesgos asociados adquiera un grado de importancia máximo. En este sentido, las particularidades de los ríos mediterráneos los convierten en buenos modelos para llevar a cabo esas investigaciones.

Este artículo tuvo como objetivo el estudio de las dinámicas de varios indicadores de contaminación fecal (cEC, tEC, SOMCPH y SSRC), dos patógenos (SAL y GCEV) y tres indicadores de MST (GA17PH, SFBIF y TBIF) en el agua y los sedimentos del tramo medio-bajo del río Llobregat, en los alrededores de la ETAP de Sant Joan Despí.

Para ello, se recogieron 52 muestras de agua y sedimentos durante periodos de sequía e inmediatamente después de eventos de fuertes lluvias y se analizaron parámetros físico-químicos (turbidez, caudal, peso seco y tamaño de partícula), así como microbiológicos. Dos tipos de sedimentos fueron analizados: próximos (A, en contacto con la columna de agua) y distantes (B, en la zona del cauce natural que únicamente queda cubierta por el agua durante las crecidas).

Los resultados de turbidez y caudal reflejaron el carácter mediterráneo del río, mostrando grandes diferencias entre los muestreos en periodos de lluvias y en periodos secos. El peso seco de las muestras de sedimento reflejó el distinto grado de humedad de los tipos A y B. No se encontraron diferencias significativas en el tamaño de partícula.

Inicialmente en la columna de agua no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de indicadores en los periodos secos y después de lluvias; sin embargo, al expresar los resultados por unidad de tiempo, teniendo en cuenta el caudal, sí se encontraron diferencias para todos los indicadores menos uno (tEC), siendo mayores los niveles después de lluvias.

En ambos tipos de sedimentos las concentraciones encontradas después de lluvias fueron superiores a las de los periodos secos para todos los microorganismos, excepto para SSRC, reflejando el nuevo aporte de contaminación fecal producido durante las

fuertes lluvias y la inactivación producida en ausencia de lluvias. De hecho, la inactivación fue mayor en el sedimento B que en el A, lo que muestra la importancia del grado de humedad para la supervivencia de los microorganismos. Las SSRC, como buen indicador conservativo, apenas sufrieron inactivación.

Los niveles de tEC fueron superiores a los de cEC en los sedimentos, mientras que en la columna de agua las diferencias no fueron significativas. No se encontró correlación entre ambos, lo que indica que los resultados obtenidos mediante qPCR deben ser tratados con cautela, ya que incluyen bacterias viables y no viables.

En cuanto a los patógenos, SAL fue detectada en el 80% de las muestras de agua y en el 100% de las de sedimentos, aunque siempre en menor concentración que su indicador, la cEC. Los GCEV, sin embargo, sólo fueron detectados en el 50% y 20% de las muestras de agua de lluvias y de tiempo seco, respectivamente, entre el 38% y el 75% de las muestras de sedimento de lluvias y entre el 20% y el 40% de las de sedimento de tiempo seco. Ya que se trataba de detección mediante RT-qPCR, se espera que el número de muestras positivas para partículas infecciosas fuera aún menor. Las concentraciones de SOMCPH, el indicador vírico, fueron siempre superiores a las de GCEV.

Con respecto a los marcadores de MST, tanto el ratio SFBIF/TBIF como el ratio SOMCPH/GA17PH obtenidos en la columna de agua apuntaron claramente a contaminación fecal de origen humano, lo cual concuerda con las principales fuentes de contaminación descritas para el río Llobregat.

Las conclusiones de este artículo fueron las siguientes:

- La presencia de SFBIF en el agua y los sedimentos después de los periodos de fuertes lluvias indica contaminación fecal humana reciente en el tiempo, ya que se trata de un indicador no conservativo. Este tipo de contaminación probablemente esté relacionada con la sobrecarga de los sistemas de alcantarillado. Sin embargo, la presencia de altas concentraciones de indicadores y patógenos fecales en los sedimentos fluviales, incluso durante los periodos de ausencia de lluvias alertan sobre el riesgo de su resuspensión en la columna de agua a consecuencia de fuertes lluvias.
- Aunque tEC es un indicador aceptado por diversas regulaciones, su utilización como sustituto de cEC debe ser realizada con cautela, ya que sobreestima la concentración de bacterias viables. El uso de GCEV puede producir el mismo tipo de sobreestimación en el caso de los enterovirus.
- cEC y SOMCPH demostraron ser buenos indicadores de la presencia de SAL y GCEV, respectivamente, encontrándose siempre en mayores concentraciones que el patógeno que indican.
- Los resultados negativos obtenidos para SFBIF en la mayoría de las muestras de agua durante los periodos secos impidieron el cálculo del ratio SFBIF/TBIF, lo

que reduce su ámbito de utilización. El ratio SOMCPH/GA17PH, en cambio, sí pudo ser calculado en la mayoría de las muestras y los resultados obtenidos demostraron la robustez de su aplicación.

- Los datos obtenidos durante esta investigación pueden ser de gran utilidad para ser incluidos en modelos predictivos que evalúen los efectos de las lluvias torrenciales sobre la salud y el medio natural.

4.5.2. Informe sobre el factor de impacto

El artículo *“Mobilisation of microbial indicators, microbial source tracking markers and pathogens after rainfall events”* ha sido publicado por la revista *“Water Research”* en el año 2017. En el año 2015, según el *“InCites Journal Citation Report”*, la revista se encontraba dentro del primer cuartil (Q1) de las áreas temáticas de *“Water Resources”* y *“Environmental Sciences”*, con un factor de impacto de 5,991.

4.5.3. Informe de participación

La doctoranda Julia Martín Díaz, como coautora del artículo *“Mobilisation of microbial indicators, microbial source tracking markers and pathogens after rainfall events”*, ha realizado todos los análisis correspondientes a SOMCPH, GCEV, peso seco y turbidez. Asimismo, ha llevado a cabo la recogida y transporte de muestras y ha participado activamente en el procesamiento, organización y discusión de los resultados obtenidos.

Ninguno de los coautores ha utilizado los datos expuestos en el artículo para la elaboración de su tesis doctoral.

Barcelona, junio de 2017

Dr. Francisco Lucena Gutiérrez



Contents lists available at ScienceDirect

Water Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres



Mobilisation of microbial indicators, microbial source tracking markers and pathogens after rainfall events



Cristina García-Aljaro*, Julia Martín-Díaz, Enric Viñas-Balada, William Calero-Cáceres, Francisco Lucena, Anicet R. Blanch

Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 November 2016
Received in revised form
31 January 2017
Accepted 1 February 2017
Available online 2 February 2017

Keywords:
Microbial source tracking
Global change
Pathogen ecology
Growth and survival
Modelling

ABSTRACT

Climate change is expected to affect the Mediterranean region by causing an increase in the number of heavy rainfall events. The aim of this study was to assess the effect of extreme river flow variations due to rainfall on the persistence and mobilisation of various microorganisms. These included faecal pollution indicators (*Escherichia coli* (EC), somatic coliphages (SOMCPH) and sulphite reducing clostridia spores (SRC)), microbial source tracking indicators (*Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 strain phages (GA17PH) and sorbitol fermenting bifidobacteria (SFBIF)), and two pathogens (*Salmonella* spp and *Enterovirus*). Water and sediment samples were taken at different distances from the river before and after heavy rainfall events. The microbial load was higher in sediment samples closer to the river course. The concentration of some faecal indicators (EC and SFBIF) increased in sediments and river water after rainfall events, whereas the most conservative parameter (SRC) showed almost no variation. After rainfall, the indicators persisted at a different rate. *Salmonella* spp and *Enterovirus* were detected in some samples but always at lower concentrations than the microbial indicators. In conclusion, sediments are reservoirs of faecal and MST indicators and pathogens and could therefore pose a risk of pathogen dissemination.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Heavy rainfall events have frequently been associated with outbreaks linked to drinking water obtained from surface water, groundwater, bathing waters and shellfish consumption (MacKenzie et al., 1994; Curriero et al., 2001; Hruday et al., 2003; Thomas et al., 2006; Nichols et al., 2009; Drayna et al., 2010; Chen et al., 2012; Tornevi et al., 2013). Increased amounts of faecal-oral waterborne pathogens and microbial indicators have even been reported in finished tap water after rainfall events. The cause of this increase is not clear; some authors have related it to mobilisation of pathogens previously entrapped in sediments (Jamieson et al., 2005), while others have suggested that wastewater treatment plant (WWTP) failures after heavy rainfall events are the main source of this faecal contamination (Curriero et al., 2001). Although water treatment plants are designed to protect human health, they can become overloaded after heavy rainfall events and unable to cope with the subsequent increase in the

number of pathogens (Curriero et al., 2001). For example, the 1993 cryptosporidiosis outbreak in Milwaukee was attributed to post-rainfall runoff containing high levels of *Cryptosporidium* which the treatment plant could not remove (MacKenzie et al., 1994), while the 2000 outbreak in Walkerton (Canada) was linked to *E. coli* O157 contamination of the water supply after a heavy rainfall event (Hruday et al., 2003). Research on this topic is therefore of extreme importance to develop predictive models that help reduce the overall associated risk to humans within the future scenario predicted by climate change experts, namely an increased number of heavy rainfall events in the Mediterranean region (Confalonieri et al., 2007).

The Mediterranean climate is characterised by irregular distribution of rainfall periods, with a higher concentration of heavy rainfall events in autumn, and to a lesser extent, in spring. This uneven distribution of precipitation leads to significant flow regime variations in Mediterranean rivers over the course of the year, typically ranging from 5 m³/s up to 1000 m³/s after rainfall events or snowmelt, according to data from the Catalan Water Agency. Mediterranean rivers thus present suitable environments for studying microorganism mobilisation in order to develop predictive models within the future climate change scenario.

* Corresponding author.
E-mail address: cr_garcia@ub.edu (C. García-Aljaro).

It is too expensive to identify individual faecal pathogens for water quality monitoring, and therefore global practice is to detect microbial indicators instead. In recent years, some countries have incorporated new microbial indicators such as bacteriophages in their regulations, including Colombia (Republica de Colombia, 2014), Australia (Queensland Government, 2005; Australian Government, 2006; Western Australia Government, 2012), Canada (Anonymous, 2001b) and the USA (USEPA, 2006; North Carolina Administration, 2011). Many studies have assessed the usefulness of the main bacterial indicators such as *E. coli* or enterococci after heavy rainfall events, but little is known about the dynamics of these “alternative” indicators in such events. In addition, alternatives to traditional indicator detection methods, such as quantification of enterococci by qPCR, have also recently been accepted for recreational water monitoring in the USA (USEPA, 2012), but little information is available on the detection of indicators by qPCR to predict the associated human risk in rainfall events.

The aim of this research was to study the dynamics of different microbial indicators, including *E. coli* (EC), somatic coliphages (SOMCPH) and sulphite reducing clostridia spores (SRC), and two pathogens, *Salmonella* spp (SAL) and *Enterovirus* (ENTV), in the presence of rainfall events in a Mediterranean river used as model to assess microorganism mobilisation after these events. The use of a molecular target, EC detection by qPCR, was also assessed. In addition, two microbial source tracking indicators (*Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 strain phages (GA17PH), and sorbitol fermenting bifidobacteria (SFBIF)) were assessed in order to evaluate their behaviour in heavy rainfall events. The data obtained on the persistence and mobilisation of these microorganisms will be useful for microbial risk assessment in the future.

2. Material and methods

2.1. Sampling

The sampling site was located in the Spanish Mediterranean basin, near the end of the Llobregat river course and close to the catchment point of a drinking water treatment plant. The Llobregat river mainly receives contamination of human origin in its lower transect (Casanovas-Massana et al., 2015), and has an annual mean river flow of 12 m³/s, although this can vary from 3 m³/s to 1200 m³/s during a heavy rainfall event and/or during snowmelt from the mountains.

Samples (n = 52) of river water and sediment (1 cm deep), were taken after heavy rainfall (wet sampling campaign) and during a period of at least 15 days without rainfall events (dry sampling campaign), over one year. Sediment samples were divided into two categories according to contact with river water: A, sediments in permanent contact with river water; and B, sediments which were occasionally (rainfall event) covered by river water. Samples were taken aseptically in sterile containers, transferred to the laboratory at 4 °C and analysed within 4 h. Particle size was analysed with a Beckman Coulter LS Particle Size Analyser.

2.2. Enumeration of microorganisms by culturable methods

Enumeration of the bacterial indicators was performed as follows. Briefly, sediment samples were mixed at a 1:10 ratio in phosphate buffered saline (pH 7.0) (PBS), homogenised by shaking for 30 min at room temperature and centrifuged at 300 × g for 3 min. The supernatant was collected and used for subsequent analyses. In the case of river water samples, the water was analysed without any pre-treatment. EC were enumerated using the pour plate method in Chromocult agar (Merck, Germany) (Astals et al.,

2012). SRC were enumerated using mass inoculation in SPS agar and incubated for 24 h at 44 °C, as previously described (Ruiz-Hernando et al., 2014). TBIF and SBIF were enumerated using HBSA selective medium, which enables differentiation of sorbitol fermenting bifidobacteria, some of which may have a human origin (Mara and Oragui, 1983). SAL was quantified by the MPN method using presence/absence tests on 10, 1 and 0.1 g of sediment as previously described (Guzman et al., 2007a).

SOMCPH and GA17PH were extracted from sediments as described previously (Guzman et al., 2007b). In the case of river water samples, they were filtered through 0.22 µm pore size polyethersulphone non-protein binding membrane filters (Millipore, USA). Bacteriophages were counted using the double layer agar method (Anonymous, 2000, 2001a).

2.3. Enumeration of microorganisms by molecular methods

Total EC were enumerated by quantification of a fragment of 16S rRNA gene by a qPCR TaqMan[®] assay using the TaqMan[®] Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems, Barcelona, Spain) as previously described (Pascual-Benito et al., 2015). Briefly, DNA was extracted from 0.25 g of sediment sample using a PowerSoil[®] DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) and eluted in 100 µl elution buffer provided in the kit. In the case of river water samples, DNA was extracted from 1 ml of sample using a QIAamp DNA blood minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and eluted in 200 µl elution buffer provided in the kit. Samples were analysed in duplicate and the absence of PCR inhibitors in the samples was assessed by diluting the samples at a 1:10 ratio in PCR-grade water.

For ENTV detection, 2 L of river water samples was filtered through 3 µm pore size cellulose nitrate membrane filters. Viral particles were released by agitation with 0.25 M glycine +3% beef extract solution (pH 9.5). After adjusting pH to 7, samples were filtered through 0.22 µm pore size low protein binding polyethersulphone membrane filters. Sediment samples were mixed at a 1:10 ratio in 0.25 M glycine solution (pH 9.5) and homogenised by shaking at room temperature. Samples were then clarified by centrifugation at 1800 × g. Subsequently, two ultracentrifugation cycles at 80,000 × g for 1 h were applied and viral particles were recovered in 140 µl PBS. ENT were quantified by RT-qPCR using a previously described method (Martín-Díaz et al., 2016). All the quality and inhibition controls described in Martín-Díaz et al. (2016) were followed.

2.4. Statistical analyses

The values obtained were log₁₀ transformed to perform statistical analysis. The Kruskal Wallis test was performed to assess indicator distribution differences. Kendall's Tau coefficient was used to study the correlation between cultivable *E. coli* (cEC) and total *E. coli* (tEC).

3. Results

3.1. Descriptive characteristics of the samples

The characteristics of the analysed samples are shown in Table 1. The dry weight content of the samples increased significantly with distance to the river (B > A, $p = 0.0283$ and $p = 0.0055$ in dry and wet sampling campaign samples, respectively). The river flow presented a maximum of 120 m³/s, with average values ranging from 5.6 m³/s to 37.0 m³/s in dry and after rainfall measurements, respectively. Turbidity increased up to 1994.0 NTU after rainfall, with an average of 38.4 NTU and 503.6 NTU in dry and wet

Table 1
Physicochemical characteristics of the samples analysed in the study.

| | Dry sampling campaign | | | | Wet sampling campaign | | | |
|------|-----------------------|------|----------------|---|-----------------------|------|----------------|-----|
| | Sediment A | | Sediment B | | Sediment A | | Sediment B | |
| | (dry weight %) | | (dry weight %) | | (dry weight %) | | (dry weight %) | |
| Mean | 57.9 | 84.3 | 38 | 6 | 47.2 | 64.5 | 504 | 37 |
| SD | 7.8 | 11.9 | 24 | 1 | 14.3 | 8.9 | 579 | 30 |
| Min | 47.8 | 62.0 | 10 | 4 | 23.0 | 49.6 | 14 | 6 |
| Max | 68.2 | 95.1 | 68 | 7 | 62.3 | 87.3 | 1994 | 120 |

NTU, Nephelometric Turbidity Unit; SD, Standard Deviation.

sampling campaign samples, respectively.

No statistically significant differences were observed between the particle diameter size in sediment samples A and B, which presented an average value of 86.07 μm (SD = 69.24) and 64.94 μm (SD = 44.28), respectively.

3.2. Enumeration of indicators

As shown in Fig. 1, the faecal and MST indicators were detected in most of the samples collected throughout the study period. No significant differences between dry and wet sampling campaigns were detected in the indicators in the water column when the loads

were expressed as CFU per 100 ml (Fig. 1a). Nevertheless, when the results were expressed taking river water discharge into consideration (Fig. 1b), all the indicators analysed showed statistically significant differences between dry and wet sampling campaigns ($p < 0.05$), except tEC. In this latter case, it should be noted that in almost half of the samples, it was below the limit of detection (4.67×10^4 GC/100 ml).

In the absence of rainfall, the different microorganisms in the sediments (Figs. 1c and 2d) were partially inactivated at different rates depending on distance to the river, whereby the greater the distance, the higher the inactivation, which was positively correlated to sample dry weight content. Accordingly, there was a

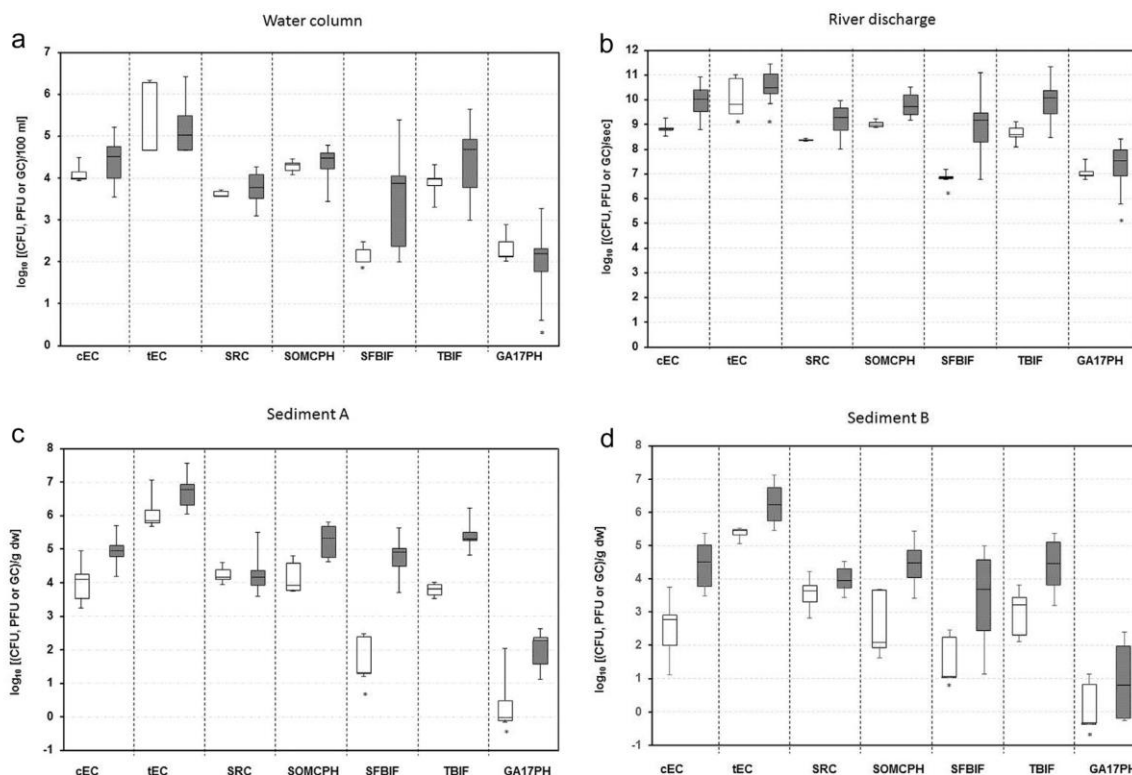


Fig. 1. Box plot representation of the concentration of indicator microorganisms in: a) water column; b) taking river discharge into consideration; c) sediment A; d) sediment B. Box range is the 25th-75th percentile. Whisker range is the maximum and minimum values. The median is represented by solid horizontal lines in each box. Light and dark boxes indicate samples after dry and rainfall events, respectively. cEC, culturable *E. coli*; tEC, total *E. coli* as measured by qPCR; SRC, sulphite reducing clostridia; SOMCPH, somatic coliphages; SFBIF, sorbitol fermenting bifidobacteria; TBIF, total bifidobacteria; GA17PH, bacteriophages infecting *B. thetaiotaomicron* GA17 strain; *, indicates that some samples were below the limit of detection.

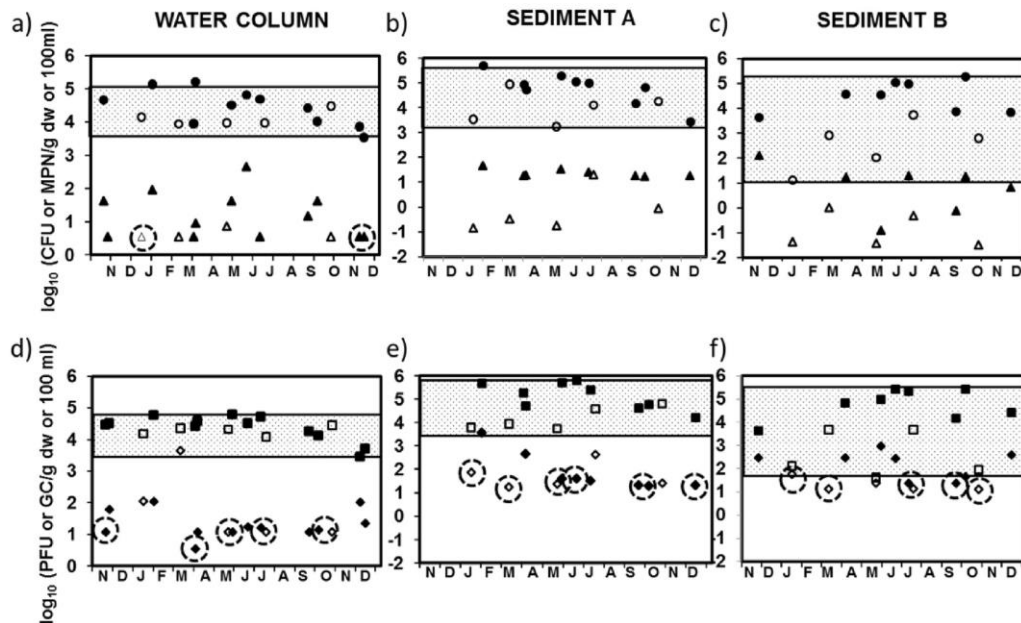


Fig. 2. Levels of indicators and pathogens in the different samples; *E. coli* and *Salmonella* are represented by circles and triangles, respectively (a, b, c). Somatic coliphages and *Enterovirus* are represented by squares and diamonds, respectively (d, e, f). Open and filled symbols indicate samples after dry and rainfall events, respectively. Circled samples indicate samples below the limit of detection.

reduction of around 2 \log_{10} units for cEC and SOMCPH in sediment B samples, compared to a reduction of around 1 \log_{10} units in sediment A samples. This pattern was not observed for the anaerobic indicators, which showed a similar reduction in both sediment samples of around 3 and 2 \log_{10} units for SBIF and TBIF, respectively, and tEC, which showed a reduction of 1 \log_{10} units, in both sediment samples between dry and wet campaigns samples. Nevertheless, the different microorganisms persisted at high concentration levels throughout the study period.

Microorganism concentrations in sediments were higher than in the water column in all samples from both sampling campaigns, taking into consideration the average value for total suspended solids (TSS) reported for the Llobregat river (average TSS <500 mg/l) (Liquete et al., 2009). This is in agreement with previous studies in streams in temperate climates, where sediments showed faecal indicator bacteria at higher concentrations than in the overlying water (Schultz-Fademrecht et al., 2008; Rehmann and Soupir, 2009).

3.3. Enumeration of tEC by qPCR

No statistically significant differences between dry and wet sampling campaigns were observed for tEC quantified by qPCR in either the water column or in sediment A. A correlation test between tEC and cEC could not be performed in water column samples since this was below the limit of detection in around half of the samples. Kendall's τ coefficient (τ) was 0.87 ($p = 0.0016$) and 0.61 ($p = 0.00055$) in samples from sediments A and B, respectively, during the wet sampling campaign. Notably, τ was 0.66 and 0.32 in sediments A and B, respectively, during the dry campaign but this finding was not statistically significant ($p > 0.05$).

The concentration of tEC was higher than that of cEC in all samples except water column samples. In sediment A, there was

around 1 and 2 \log_{10} units difference in dry and wet sampling campaign samples, respectively, although the difference was more significant in dry samples from sediment B (up to 3 \log_{10} units).

3.4. Correlation between indicators and pathogens

SAL and/or ENTV were detected in sediments after rainfall events, but also during the dry period in most of the samples taken throughout the year (Fig. 2). SAL was detected in the river water in around 80% of both sampling campaign samples, but always at a lower concentration than cEC. Similarly to the faecal indicators, SAL concentrations were generally higher after rainfall events. Meanwhile, all sediments were positive for SAL in both dry and wet sampling campaign samples, although concentrations were higher in wet sampling campaign samples. However, SAL concentrations were always below those of cEC in the samples studied.

ENTV were detected in river water in 50% of wet sampling campaign samples, and 20% of dry sampling campaign samples, but concentrations were always lower than those of the surrogate indicator, SOMCPH. Sediment ENTV followed a similar trend, being detected in 38% and 40% of sediment A samples from the wet and dry sampling campaigns, respectively, and in 75% and 20% of sediment B samples from the wet and dry sampling campaigns samples. However, pathogen concentrations (SAL and ENTV) were always lower than their corresponding microbial indicators, suggesting the validity of these indicators to predict the presence of pathogens in rainfall events.

3.5. MST markers

The same trend described above for the microbial indicators was observed for the MST markers, which also presented higher

concentrations in wet sampling campaign samples compared to dry sampling campaign samples.

The SFBIF/TBIF ratio has been proposed as an MST marker to track human contamination in water samples (Bonjoch et al., 2005). As regards the robustness of this MST marker under changing environmental conditions, most of the water samples analysed during dry conditions were below the limit of detection for SFBIF, and therefore this ratio was not informative. After rainfall events, the ratio was close to 0.2, suggesting human contamination.

Additionally, the ratio between the \log_{10} (SOMCPH/GA17PH) was also determined. As previously reported (Muniesa et al., 2012), a ratio close to 2 is an indicator of mostly human contamination in water samples. Under our experimental conditions, the ratio was close to 2 for both dry and wet samples, suggesting the robustness of these markers to predict human contamination in storm events.

4. Discussion

The assessment and prediction of faecal transport is of utmost importance given the predicted climate change scenario in which the number of extreme precipitation events is expected to increase in the Mediterranean region. In this study, the impact of heavy rainfall events on the presence of different faecal indicator and microbial source tracking microorganisms and their correlation with two selected pathogens (SAL and ENTV) was assessed.

The general increase in pathogens and indicator microorganisms, especially SFBIF, in both the water column and sediments after rainfall events suggests recent faecal pollution discharge into the river after such events. This may be largely due to storm-water runoff, the quality of which may resemble that of raw sewage under circumstances. This run-off tends to run into the river untreated via non-point sources, treatment plant overflows and bypasses, etc. However, as the number of rainfall events increases, the load of faecal organisms in the run-off may be expected to decrease. Once enteric bacteria reach a water body, they become inactivated due to several biotic and abiotic factors. The principal abiotic factor contributing to the inactivation of enteric bacteria is UV sunlight, especially in shallow surface waters (Sinton et al., 2007; Schultz-Fademrecht et al., 2008). In the case of SFBIF, they are obligate anaerobes and therefore their increase could be related to a recent contamination event since they decline rapidly outside the gut ($T_{90} = 10$ h in summer and 29 h in winter (Bonjoch et al., 2009)). Another factor influencing the decline of allochthonous microorganisms in water bodies is the association of bacteria with soil particles followed by sedimentation, which has been reported to play a significant role in reducing microorganism concentrations in the water column (Jamieson et al., 2005). In our study, there was always a higher concentration of microorganisms in sediment samples than in the water column, suggesting that besides a recent contamination event, the resuspension of microorganisms in sediments should not be ruled out when developing predictive models. In fact, turbidity, which is an indirect measure of suspended solids, also increased significantly after rainfall events. These observations are in accordance with previous studies, in which resuspension of microorganisms in sediment was the principal factor influencing their increased presence in the water column (McCarthy et al., 2008; Walters et al., 2014).

As regards the survival of the indicators analysed in the sediments studied, soil particles have been observed to interfere with UV radiation. For example, it has been reported that *E. coli* attached to large particles inactivates more slowly than those associated with smaller particles ($\leq 12 \mu\text{m}$) (Walters et al., 2014). In this study, sediment particles presented a larger mean size, which may explain the high persistence of indicators in sediment samples between rainfall events.

As reported above, indicator levels increased in all samples after heavy rainfall events. The only exception to this was SRC, which only increased in the water column. SRC is a conservative parameter with reported mortality rates of 0.0013–0.0025 per year (Robles, 2000). Therefore, their high persistence in the environment may have been responsible for this. The finding that the most conservative parameter, SRC, remained at high concentration levels in all samples with no significant variations suggests that pathogens with a similar environmental behaviour may also be present.

The lower concentration of indicators in sediment samples collected at a greater distance from the river was related to an increase in sample dry weight content, which accounted for a higher inactivation rate. Nonetheless, the indicators and pathogens persisted between rainfall events, posing a risk of pathogen mobilisation.

It should be noted that water column samples showed higher variability than sediment samples after rainfall events. This may be related to uncertainty when sampling under these circumstances, since it has been reported that indicator levels after rainfall events present higher uncertainty (McCarthy et al., 2008).

The survival of various indicator organisms and pathogens in river sediments varies substantially, which should be taken into consideration when interpreting their detection. In this study, cEC as an indicator of the presence of SAL and SOMCPH as an indicator of ENTV were assessed. SAL was detected in most water column samples as well as in sediment samples in both sampling campaigns. ENTV was detected in 50% and 20% samples in both the water column in wet and dry sampling campaigns, respectively, around 40% of sediment A samples in both sampling campaigns and 75% and 20% in sediment B in wet and dry sampling campaigns, respectively. Levels of the corresponding bacterial or viral indicator were always higher than those of the pathogen analysed, confirming the usefulness of these indicators in storm events. It should be noted that we adopted a conservative approach when performing the analysis, using the limit of detection value for negative samples. Moreover, ENTV was assessed using a molecular approach, and therefore the number of infectious viruses in positive samples is expected to even be lower. Although cEC is used worldwide as an indicator, some countries are also adopting bacteriophages as a viral indicator for water reclamation (Queensland Government, 2005; North Carolina Administration, 2011), groundwater (USEPA, 2006) and biosolids applied in agriculture (Western Australia Government, 2012; Republica de Colombia, 2014). This study provides new data and reinforces the usefulness of SOMCPH to track faecal contamination in storm events.

The use of a molecular marker as an alternative indicator of cEC has been accepted in several regulations. In this study, no correlation was observed between cEC and tEC, and therefore its use to monitor *E. coli* and develop predictive microbial risk assessment models after rainfall events should be approached with caution. This is not surprising because the two methods detect rather different things: whereas cEC detects viable and culturable *E. coli* cells, tEC detects non-colony forming *E. coli* as well as *E. coli* nucleic acid residues, which according to definition for water quality purposes are not *E. coli*. Of particular importance is the difference between the levels of cEC and tEC observed in sediment A compared to sediment B samples. As stated above, presence of the indicator was higher in samples with a higher wet content, but the molecular marker had a higher persistence rate, which complicates its universal acceptance as an alternative indicator to cEC.

The ratio between SFBIF and TBIF has previously been reported as a marker of human or non-human origin of contamination, where a score higher than 0.2 is related to human origin and lower than 0.05 is related to animal origin (Bonjoch et al., 2005). Although this ratio was around 0.2 samples after rainfall events, it could not

be calculated in dry sampling campaign water samples because it was nearly always below the limit of detection, and it was therefore of limited use. However, the ratio between the \log_{10} of SOMCPH and GA17PH was around 2 in samples from both sampling campaigns, which is an indicator of mostly human contamination, reflecting the robustness of this ratio even in storm events.

5. Conclusions

The presence of pathogens in sediments may pose a human health risk since they persist and can be mobilised after heavy rainfall events although the concentration of the microbial indicators analysed in this study was always informative. Particularly, SOMCPH, which have been included in recent regulations proved efficient for assessing the occurrence of ENTV. The use of a molecular marker such as tEC quantified by qPCR to predict faecal contamination in these scenarios should be used cautiously since the ratio between tEC and cEC varied depending on the sample type. The robustness of the \log_{10} ratio between SOMCPH and GA17PH was demonstrated to be used after rainfall events. Data on the persistence and dynamics of these pathogens and indicators in these environments in different conditions are of extreme importance to develop future predictive models for microbial risk assessment to help water managers when making decisions about risks to human health within the climate change scenario.

Acknowledgements

This study was supported by the Generalitat de Catalunya (SGR-2014-007) and the Spanish Government (CGL2011-25401, CGL2014-59977-C3-3-R, BES-2012-054179). W. Calero-Cáceres is recipient of PhD fellowship SENESCYT 2012 from the Republic of Ecuador Government.

References

- Anonymous, 2000. ISO 10705–2. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Anonymous, 2001a. ISO 10705–4. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Anonymous, 2001b. Loi sur la qualité de l'environnement: règlement sur la qualité de l'eau potable c. Q-2, r. 18.1.1. Gazette Officielle du Québec 24, 3561. Government of Quebec, Montreal, Quebec, Canada.
- Astals, S., Venegas, C., Peces, M., Jofre, J., Lucena, F., Mata-Alvarez, J., 2012. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Res.* 46, 6218–6227.
- Australian Government, 2006. National Water Quality Management Strategy. Australian Drinking Water Guidelines 6. 2011. Version 3.2, Updated February 2016. National Health and Medical Research Council. Natural Resource Management Ministerial Council.
- Bonjoch, X., Ballesté, E., Blanch, A.R., 2005. Enumeration of bifidobacterial populations with selective media to determine the source of waterborne fecal pollution. *Water Res.* 39, 1621–1627.
- Bonjoch, X., Lucena, F., Blanch, A.R., 2009. The persistence of bifidobacteria populations in a river measured by molecular and culture techniques. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1178–1185.
- Casanovas-Massana, A., Gómez-Doñate, M., Sánchez, D., Belanche-Muñoz, L.A., Muniesa, M., Blanch, A.R., 2015. Predicting fecal sources in waters with diverse pollution loads using general and molecular host-specific indicators and applying machine learning methods. *J. Environ. Manage* 151, 317–325.
- Chen, M.J., Lin, C.Y., Wu, Y.T., Wu, P.C., Lung, S.C., Su, H.J., 2012. Effects of extreme precipitation to the distribution of infectious diseases in Taiwan, 1994–2008. *PLoS One* 7, e34651.
- Confalonieri, U., Menne, B., Akhtar, R., Ebi, K.L., Hauengue, M., Kovats, R.S., Revich, B., Woodward, A.J., 2007. Human Health. Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (UK Cambridge).
- Curriero, F.C., Patz, J.A., Rose, J.B., Lele, S., 2001. The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948–1994. *Am. J. Public Health* 91, 1194–1199.
- Drayna, P., McLellan, S.L., Simpson, P., Li, S.-H., Gorelick, M.H., 2010. Association between rainfall and pediatric emergency department visits for acute gastrointestinal illness. *Environ. Health Perspect.* 118, 1439–1443.
- Guzman, C., Jofre, J., Montemayor, M., Lucena, F., 2007a. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2420–2429.
- Guzman, C., Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., 2007b. Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil and treated biowaste. *J. Virol. Methods* 144, 41–48.
- Hrudey, S.E., Payment, P., Huck, P.M., Gillham, R.W., Hrudey, E.J., 2003. A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Sci. Technol.* 47, 7–14.
- Jamieson, R., Joy, D.M., Lee, H., Kostaschuk, R., Gordon, R., 2005. Transport and deposition of sediment-associated *Escherichia coli* in natural streams. *Water Res.* 39, 2665–2675.
- Liquete, C., Canals, M., Ludwig, W., Arnau, P., 2009. Sediment discharge of the rivers of Catalonia, NE Spain, and the influence of human impacts. *J. Hydrol.* 366, 76–88.
- MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., Davis, J.P., 1994. Massive waterborne outbreak of *Cryptosporidium* infection associated with a filtered public water supply, Milwaukee, Wisconsin, March and April 1993. *N. Engl. J. Med.* 331, 161–167.
- Mara, D.D., Oragui, J.I., 1983. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. *J. Appl. Bacteriol.* 55, 349–357.
- Martin-Diaz, J., Casas-Mangas, R., García-Aljaro, C., Blanch, A.R., Lucena, F., 2016. Somatic coliphages as surrogates for enteroviruses in sludge hygienization treatments. *Water Sci. Technol.* 73, 2182–2188.
- McCarthy, D.T., Deletic, A., Mitchell, V.G., Fletcher, T.D., Diaper, C., 2008. Uncertainties in stormwater *E. coli* levels. *Water Res.* 42, 1812–1824.
- Muniesa, M., Lucena, F., Blanch, A.R., Payán, A., Jofre, J., 2012. Use of abundance ratios of somatic coliphages and bacteriophages of *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 for microbial source identification. *Water Res.* 46, 6410–6418.
- Nichols, G., Lane, C., Asgari, N., Verlander, N.Q., Charlett, A., 2009. Rainfall and outbreaks of drinking water related disease and in England and Wales. *J. Water Health* 7, 1–8.
- North Carolina Administration, 2011. North Carolina Administrative Code 15A NCAC 2U. North Carolina Department of Environmental Quality, Raleigh, USA.
- Pascual-Benito, M., García-Aljaro, C., Casanovas-Massana, S., Blanch, A.R., Lucena, F., 2015. Effect of hygienization treatment on the recovery and/or regrowth of microbial indicators in sewage sludge. *J. Appl. Microbiol.* 118, 412–418.
- Queensland Government, 2005. Queensland Water Recycling Guidelines. Queensland Environmental Protection Agency, Brisbane, Australia.
- Rehmann, C.R., Soupir, M.L., 2009. Importance of interactions between the water column and the sediment for microbial concentrations in streams. *Water Res.* 43, 4579–4589.
- Republica de Colombia, 2014. Decreto no 1287. Criterios para el uso de biosólidos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales. Gobierno de Colombia. Minist. Vivienda Ciudad Territ. Bogotá, 15 pp.
- Robles, S., 2000. Sulfite-reducing clostridia in the sediment of a high mountain lake (Laguna Grande, Cerdos, Spain) as indicators of fecal pollution. *Int. Microbiol.* 3, 187–191.
- Ruiz-Hernando, M., Martín-Díaz, J., Labanda, J., Mata-Alvarez, J., Llorens, J., Lucena, F., Astals, S., 2014. Effect of ultrasound, low-temperature thermal and alkali pre-treatments on waste activated sludge rheology, hygienization and methane potential. *Water Res.* 61, 119–129.
- Schultz-Fadenrecht, C., Wichern, M., Horn, H., 2008. The impact of sunlight on inactivation of indicator microorganisms both in river water and benthic biofilms. *Water Res.* 42, 4771–4779.
- Sinton, L., Hall, C., Braithwaite, R., 2007. Sunlight inactivation of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica*, compared with *Escherichia coli*, in seawater and river water. *J. Water Health* 5, 357–365.
- Thomas, K.M., Charron, D.F., Waltner-Toews, D., Schuster, C., Maarouf, A.R., Holt, J.D., 2006. A role of high impact weather events in waterborne disease outbreaks in Canada, 1975–2001. *Int. J. Environ. Health Res.* 16, 167–180.
- Tornevi, A., Axelsson, G., Forsberg, B., 2013. Association between precipitation upstream of a drinking water utility and nurse advice calls relating to acute gastrointestinal illnesses. *PLoS One* 8, e69918.
- USEPA, 2006. National Primary Drinking Water Regulations: Groundwater Rule. Final Rule; 40 CFR Parts 9, 141 and 142. Federal register, vol. 71. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- USEPA, 2012. Recreational water criteria. <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/health/recreation/index.cfm> (Accessed 16 November 2014).
- Walters, E., Schwarzwälder, K., Rutschmann, P., Müller, E., Horn, H., 2014. Influence of resuspension on the fate of fecal indicator bacteria in large-scale flumes mimicking an oligotrophic river. *Water Res.* 48, 466–477.
- Western Australia Government, 2012. Western Australia Guidelines for Biosolids Management. Department of Environmental Conservation (Perth, Australia).

4.6. Artículo 5: Utilización de microcosmos para evaluar la persistencia y movilización de indicadores microbianos en sedimentos fluviales durante eventos de lluvias

4.6.1. Resumen

Habitualmente, una gran proporción de los microorganismos presentes en los cuerpos de agua continentales se encuentran asociados a partículas sólidas. En ese sentido, los sedimentos fluviales actúan como reservorios de microorganismos, a los que confieren protección. Se produce así un aumento de la supervivencia con respecto a la columna de agua. La resuspensión de estos sedimentos debido a eventos de lluvias torrenciales puede dar lugar a la movilización de los microorganismos y, entre ellos, de los patógenos, causando el deterioro de la calidad del agua y aumentando los riesgos de transmisión de enfermedades infecciosas. De esta forma, la caracterización de la carga microbiana, los ratios de supervivencia y los patrones de transporte de los patógenos presentes en los sistemas fluviales aportará información esencial para manejar esos riesgos de cara a las proyecciones climáticas de futuro. Teniendo en cuenta las peculiaridades de los ríos mediterráneos, su utilización como modelos para la obtención de datos microbiológicos puede ser de gran ayuda.

El objetivo de este artículo fue la generación de microcosmos capaces de simular la resuspensión de los sedimentos fluviales en el agua provocada por los eventos de fuertes lluvias que afectan a los ríos mediterráneos. Dichos microcosmos fueron utilizados para estudiar la movilización y los ratios de inactivación sufridos por varios indicadores de la contaminación fecal (cEC, tEC, SOMCPH y SSRC) e indicadores de MST (SFBIF y GA17PH) presentes en el agua y los sedimentos fluviales.

Se encontraron distintos patrones de resuspensión para bacterias, virus y esporas, lo que probablemente estuvo relacionado con sus diferentes ratios de inactivación, pero también con diferencias en el modo de sedimentación y con su tipo y grado de adhesión a las partículas del sedimento.

Las concentraciones de indicadores presentes en la columna de agua se redujeron significativamente a lo largo del tiempo. Sin embargo, 42 días después del comienzo del experimento la mayoría de los indicadores todavía pudieron ser detectados en el agua de aquellos microcosmos que simulaban eventos de lluvias, indicando su supervivencia en el sedimento y la movilización hacia el agua.

En conjunto, las inactivaciones sufridas por los indicadores analizados fueron menores en el sedimento cubierto por agua que en el sedimento no cubierto, lo cual quedó reflejado en los resultados de T_{90} . Se pudo observar, de esta forma, el efecto protector de la columna de agua. De todos modos, el alto porcentaje de humedad del sedimento no cubierto (26.6% - 36.2%) probablemente fue la causa de que las diferencias no fueran muy acusadas.

El estudio, a lo largo del tiempo, de los microcosmos sometidos a agitación mostró cómo la evolución de las concentraciones de indicadores fue similar en el agua y en los sedimentos cubiertos. Teniendo en cuenta el alto aporte de microorganismos que cada evento de agitación produjo en el agua, parece lógico pensar que los patrones de inactivación observados en el sedimento se verán reflejados en la columna de agua que lo cubre.

De esta manera, se pudo concluir lo siguiente:

- Los microcosmos creados fueron útiles para evaluar el efecto de la resuspensión de los sedimentos fluviales en la columna de agua a consecuencia de eventos de lluvias torrenciales.
- La metodología aplicada permitió calcular en los sedimentos las T_{90} de los seis indicadores microbianos analizados.
- Atendiendo a su grado de resistencia, de menor a mayor, los indicadores se clasificaron de la siguiente forma: SFBIF < cEC < GA17PH < SOMCPH < tEC < SSRC.
- Se observaron distintos patrones de resuspensión y sedimentación entre bacterias y bacteriófagos, probablemente relacionado con el tamaño, la composición y las asociaciones entre microorganismos y partículas de sedimento.
- Bajo las condiciones ensayadas, cinco de los seis indicadores analizados fueron aún detectados en los sedimentos 42 días después del comienzo del experimento.
- Los datos generados pueden ser de gran utilidad para su inclusión en modelos de evaluación de los efectos del cambio climático en la calidad de las aguas superficiales.

4.6.2. Informe sobre el factor de impacto

El artículo *“Microcosms for evaluating microbial indicator persistence and mobilization in fluvial sediments during rainfall events”* se encuentra actualmente en proceso de revisión por parte de la revista *“Water Research”*. En el año 2015, según el *“InCites Journal Citation Report”*, la revista se encontraba dentro del primer cuartil (Q1) de las áreas temáticas de *“Water Resources”* y *“Environmental Sciences”*, con un factor de impacto de 5,991.

4.6.3. Informe de participación

La doctoranda Julia Martín Díaz, como coautora del artículo *“Microcosms for evaluating microbial indicator persistence and mobilization in fluvial sediments during rainfall events”*, ha realizado todos los análisis correspondientes a SOMCPH, peso seco y turbidez. Asimismo, ha llevado a cabo la recogida y transporte de muestras y ha participado activamente en el procesamiento, organización y discusión de los resultados obtenidos. Finalmente, la doctoranda se ha encargado de la redacción del artículo y de la preparación de las tablas y las figuras y ha contribuido a la difusión de los resultados.

Ninguno de los coautores ha utilizado los datos expuestos en el artículo para la elaboración de su tesis doctoral.

Barcelona, junio de 2017

Dr. Francisco Lucena Gutiérrez

Microcosms for evaluating microbial indicator persistence and mobilization in fluvial sediments during rainfall events

Julia Martín-Díaz^{a,b,*}, Cristina García-Aljaro^{a,b}, Míriam Pascual-Benito^{a,b}, Belén Galofré^c, Anicet R. Blanch^{a,b}, Francisco Lucena^{a,b}

^aDepartment of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

^bThe Water Research Institute, University of Barcelona, C/ Montalegre 6, 08001 Barcelona, Spain

^cAigües de Barcelona, EMGCIA, C/ General Batet 1-7, 08028 Barcelona, Spain

*Corresponding author: Tel.: +34 934021484; fax: +34 934110592. Email address: juliamadi@hotmail.com (J. Martín-Díaz).

ABSTRACT

Mediterranean rivers, which are subject to long, dry periods and heavy rainfall events, could be particularly useful for understanding future climate scenarios. This study generated microcosms that reproduced riverbank sediment resuspension into the water of a typical Mediterranean river as a consequence of heavy rainfall. The mobilization and inactivation of six fecal pollution indicators and microbial source tracking markers were evaluated. The T_{90} values in the sediments were: 4 days for sorbitol-fermenting *Bifidobacterium*, 11 days for culturable *E. coli*, 36 days for bacteriophages infecting *Bacteroides thetaiotaomicron* strain GA17 and more than 42 days for qPCR-detected *E. coli*, somatic coliphages and sulfite-reducing clostridia spores. Bacteriophages and bacteria showed different resuspension and sedimentation patterns. The data obtained could be used in predictive models to assess the effects of climate change on surface water quality. Pathogen mobilization into the water column poses a risk for humans, animals and the natural environment, and breaches the One Health approach.

Keywords: fecal pollution; inactivation; microbial source tracking; climate change; One Health; mesocosms

1. INTRODUCTION

Climate change and demographic evolution are expected to increase the intensity and frequency of heat waves and extreme precipitation events in several places on Earth (IPCC, 2014). Although uncertainty still exists, the Mediterranean region is expected to see an increase in water scarcity and heavy rainfall events during the 21st century (Giorgi and Lionello, 2008). Rivers in this area are typically characterized by medium-to-low water flow that increases during rainfall events until flooding occurs, thereby causing the resuspension of nearby sediments into the water column. The majority of microorganisms present in water bodies are usually attached to sediment particles that contain nutrients and provide them with protection from predators and UV light (De Brauwere et al., 2014; Jamieson et al., 2005). This fact increases survival rates in sediments compared to water (Craig et al., 2004; Walters

et al., 2014) and allows microorganisms to remain active even after weeks of being released into the environment. Resuspension of these sediments due to heavy rainfall events involves pathogen mobilization that causes a deterioration in water quality and subsequent problems in the purification process, and thus a potential increase in outbreaks of waterborne diseases (Craig et al., 2004; Jamieson et al., 2005; Nichols et al., 2009; Walters et al., 2014). In addition, deterioration of water quality poses a risk to animal health and degrades the natural environment, thereby breaching the One Health concept. This approach is based on an interdisciplinary analysis of all aspects of human, animal and environmental health (AVMA, 2008). Despite the attention traditionally paid to surface water quality monitoring, several questions concerning bacterial and viral survival and transport remain unanswered (Walters et al., 2014). The characterization of microbial loads, survival rates and transport patterns for pathogens present in surface waters would therefore lead to the proper management of these situations and a reduction in the associated impact on health. Numerous systems to simplify the study of environmental conditions affecting waterborne pathogens have been developed (Ahmed et al., 2014; Anderson et al., 2005; Craig et al., 2004; Jamieson et al., 2005; Mocé-Llivina et al., 2005; Stocker et al., 2015; Walters et al., 2014). However, each situation comes with specific variables, dynamics and scientific questions, and therefore requires its own specific system (De Brauwere et al., 2014). The development of microcosms that simulate Mediterranean rivers would be very helpful for enhancing predictive models for understanding waterborne pathogen behavior in relation to climate change. Examples of predictive models are the Soil and Water Assessment Tool (SWAT) and the Hydrological Simulation Program - FORTRAN (HSPF) (De Brauwere et al., 2014; Kim et al., 2010). Microcosms may simulate conditions as varied as a calm river, rain falling on soil or water flowing inside a flume (Anderson et al., 2005; Durán et al., 2002; Stocker et al., 2015; Walters et al., 2014). These systems allow physical, chemical or microbiological data, among others, to be obtained easily under controlled conditions and examined in order to gain a better understanding of real situations. A wide range of pathogens could be present in environmental samples and the lack of effective extraction, concentration and detection methods makes their monitoring difficult and cumbersome. In this context, the use of fecal indicators is an appropriate tool for the study of waterborne pathogen behavior. Ideal characteristics for fecal indicators include the following: (i) they should not be pathogens themselves; (ii) they should be universally present in large numbers in human and animal feces; (iii) they should not multiply in natural waters; (iv) they should persist in water in a similar manner to fecal pathogens; (v) they should be present in higher numbers than fecal pathogens; (vi) they should respond to treatment processes in a similar fashion to fecal pathogens; and (vii) they should be readily detected by simple, inexpensive culture methods (WHO, 2011). A universal indicator does not exist, however, since no individual microorganism can significantly predict the presence of all pathogens in water (Wu et al., 2011). The most adequate approach is the control of a group of microorganisms that represent a broad pathogen spectrum such as bacteria, viruses and parasites. It is also important to include non-conservative, semi-conservative and conservative microorganisms that indicate pathogens with low, medium or high resistance to natural inactivating factors. In addition, the inclusion of microbial source tracking (MST) markers is helpful for discriminating between

different fecal pollution origins. Regarding detection methods, molecular techniques such as qPCR are fast, sensitive and useful since it is only necessary to detect part of a microorganism to indicate pollution. Nevertheless, the detection of culturable microorganisms continues to be essential for indicating the infectious capacity of pathogens and, therefore, the real health risk associated with the pollution.

Microcosms were created as part of this study in order to evaluate indicator persistence and mobilization in fluvial sediments from a typical Mediterranean river. Flow, turbidity and *E. coli* data for the Llobregat River (NE Spain) were evaluated over a 14-year period. Microcosms were generated to mimic the natural conditions and six fecal pollution indicators were monitored under simulated rainfall events and calm periods. Two indicators that signify bacterial contamination were analyzed in the microcosms: *E. coli*, both culturable (cEC) and total *E. coli* detected by qPCR (tEC), and sorbitol-fermenting *Bifidobacterium* (SFBIF). cEC is a traditional, non-conservative indicator that features in the great majority of water regulations worldwide. By contrast, *E. coli* detected by qPCR is a conservative indicator, since DNA can persist for much longer periods. SFBIF is a non-conservative indicator that acts as a MST marker of human fecal pollution (Bonjoch et al., 2005). As representatives of enteric viruses, two semi-conservative indicators were analyzed: somatic coliphages (SOMCPH) and bacteriophages infecting *Bacteroides thetaiotaomicron* strain GA17 (GA17PH). While SOMCPH are related to general fecal pollution, GA17PH is a human-specific MST marker (Jofre et al., 2014). Finally, the spores of sulfite-reducing clostridia (SSRC), as a representative of the most conservative pathogens (sporulating bacteria, protozoa oocysts and helminth ova), were analyzed (Agulló-Barceló et al., 2013). To obtain a better understanding of indicator behavior in the natural environment, all microorganisms tested were indigenous to the samples collected. This approach is more realistic than spiking samples with laboratory microorganisms, since it eliminates the need for cumbersome mixing and better reflects the natural inactivation kinetics and microorganism-sediment associations.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Experimental design

This study was divided into three parts. In the initial phase, the river was characterized by analyzing the flow, turbidity and *E. coli* data collected over a period of 14 years. In the second phase, microcosms were generated and their capacity to reproduce rainfall events was evaluated through the analysis of the turbidity and *E. coli* results obtained. In the final phase, the entire 42-day microcosm experiments were conducted in duplicate in order to study persistence and mobilization in water and sediments for the six fecal indicators analyzed.

2.2. Sample origin

Sediment and water samples were collected from the final stretch of the Llobregat River (NE Spain), downstream from a drinking water treatment plant. According to the regional water authority (Catalan Water Agency), this river runs through a heavily urbanized area and is mainly subjected to the influence of several effluents from sewage treatment plants. This

watercourse is a typical Mediterranean river and undergoes both long, dry periods and heavy rainfall events, combined with occasional severe droughts. As a first step, the natural conditions of the river at the sampling point were studied and analyzed. Daily information about the mean flow and mean turbidity over a period of 14 years (2000 to 2013) was collected. A total of 4,836 flow and turbidity data records were used in this study. Weekly information about the cEC levels of the river water over a period of 7 years, from January 2005 to February 2012, was also collected, for a final count of 352 data records. Arithmetic mean, standard deviation, minimum and maximum values were calculated for river flow, turbidity and cEC. These three parameters were analyzed to search for a possible relationship between them. Statistical analyses were performed using Statgraphics Centurion XVII.

River water and fluvial sediments were collected from the sampling point in sterile plastic containers the day after a rainfall event to ensure high indicator concentrations in the sediments used to create the microcosms. Riverbank sediments in contact with water were sampled and only the layer in the upper 2 cm was collected, since this is where the highest indicator concentrations are expected (Hassard et al., 2016). Samples were maintained at 4°C until the experiments started within a 48-hour period. Sediment particle size was determined by granulometry using a Beckman Coulter LS 230, VSM Plus Instrument (Beckman Coulter Inc., CA, USA). Particle size results were used to calculate sorting using the following equation:

$$S_o = \frac{P75}{P25} \quad (1)$$

where $P75$ is the 75th percentile and $P25$ is the 25th percentile. Sediment samples were classified as: very well sorted ($S_o < 2.5$), well sorted ($2.5 < S_o < 3.5$), moderately sorted ($3.5 < S_o < 4.5$) and poorly sorted ($S_o > 4.5$).

2.3. Microcosms

Microcosms were created in accordance with the scheme shown in Figure 1. Since flooding leads to the resuspension of sediment in the riverbank, sediment and water samples were used to simulate the Llobregat water column covering the riverbank sediments. This system was evaluated under two different conditions: heavy rainfall events and calm periods without rainfall. At the same time, the sediment sample was also used to simulate the riverbank sediment not covered by the water column, and this system was studied during a calm period. Erlenmeyer flasks with a capacity of 500 ml were used to create the microcosms. One hundred grams of fluvial sediments were placed in the bottom of the flasks to form a 2.5 cm-thick layer. To guarantee that all indicators studied (including molecular detection) were indigenous to the sediment sample, river water was subjected to five regular autoclave cycles. A 400 ml sample of this sterilized river water was used to cover the sediments, which constituted a 5 cm-thick upper layer. In order to simulate heavy rainfall events, the Erlenmeyer flasks filled with water and sediments were agitated by orbital shaking for 2 h at 250 rpm. The aim was to achieve turbidity results similar to those found in natural conditions. For the non-covered sample, 100 g of fluvial sediments were placed in plastic containers.

Before starting the microcosm experiments, their capacity to simulate the heavy rainfall events that naturally affect the river was evaluated. To achieve this, three sampling campaigns were carried out and three microcosm replicas were created from each sampling campaign. Turbidity results and cEC concentrations in the water phase before and immediately after each agitation event were recorded. Turbidity and cEC data were analyzed in order to search for a possible relationship between them. A total of 18 turbidity and cEC measurements were recorded.

The microcosm experiments were conducted as follows: firstly, all flasks were agitated under the conditions described, thereby simulating an initial heavy rainfall event for all samples. After this, the flask and container caps were loosened to guarantee oxygen exchange and samples were maintained at $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ in the dark. The day after this simulation represented time 0 and the first sampling. Samples were taken regularly from both the water and sediment phases of the microcosms over a six-week period. The day before each sampling, two Erlenmeyer flasks and one plastic container were taken. One of the flasks was subjected to agitation to simulate a heavy rainfall event and the other was not agitated to simulate calm conditions. The three samples were maintained at 4°C until analysis the next day, which represented a 24 h decantation period for the agitated flask. The outcomes obtained for the agitated microcosms therefore corresponded to those expected for a fictitious sampling campaign in the river the day after a rainfall event. The entire six-week microcosm experiment was performed twice, to constitute two replicas. Turbidity and pH were recorded for the microcosm water phase in each sampling. Figure 1 shows the different sediment phases obtained in the microcosms: agitated (AW) and non-agitated (NW) water, agitated (AS) and non-agitated (NS) covered sediments, and non-covered sediments (NCS).

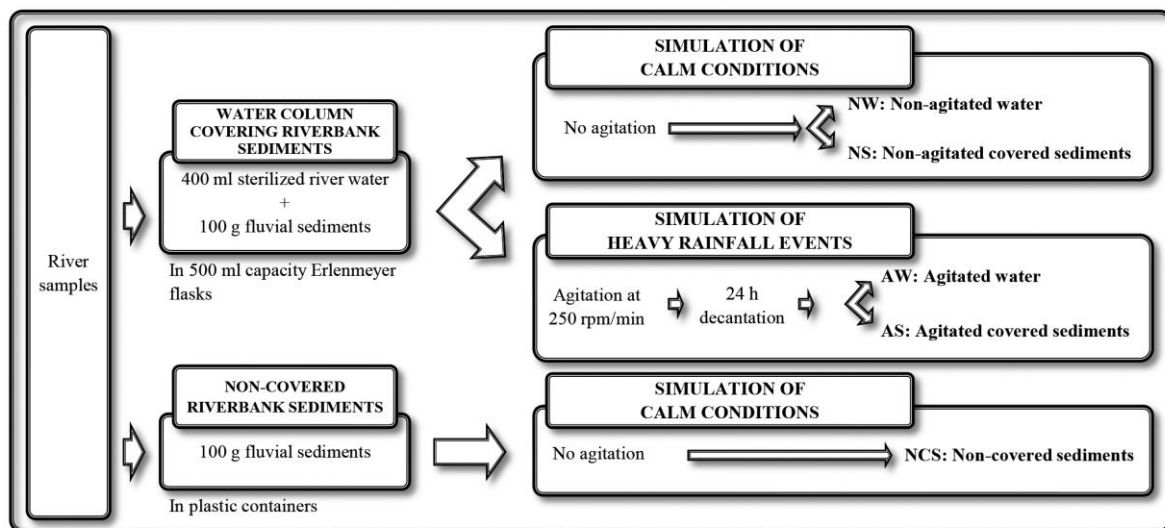


Figure 1. Microcosm diagram.

2.4. Bacterial detection and enumeration

Sediment samples were mixed at a ratio of 1:10 in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, and homogenized for 30 min at room temperature and 900 osc/min, using a wrist action

shaker. Samples were then subjected to centrifugation at $300 \times g$ for 3 min at 4°C and the supernatant was used for the quantification of bacteria. cEC was enumerated using the pour plate method in ChromoCult agar supplemented with *E. coli*/coliform-selective supplement (Merck, Darmstadt, Germany). Plates were incubated at 44°C overnight and dark-blue/purple cEC colonies were counted (Astals et al., 2012). For SSRC, the supernatant was subjected to thermal shock at 80°C for 10 min. Samples were then anaerobically cultured by mass inoculation in *Clostridium perfringens* selective agar (Scharlab, Barcelona, Spain) and incubated at 44°C overnight (Ruiz-Hernando et al., 2014). The typical black spherical colonies with black halos were counted as SSRC. SFBIF were incubated in human bifidobacteria sorbitol-fermenting agar (HBSA) (Mara and Oragui, 1983) for 48 h at 37°C under anaerobic conditions (GasPak Jar, BBL, Hampshire, UK) with CO_2 atmosphere generators (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Germany). DNA for the enumeration of tEC was directly extracted from sediment samples (0.25 g) using the Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. A qPCR protocol was then applied and all the quality and inhibition controls described were followed (Pascual-Benito et al., 2015). Water samples were directly analyzed with the culture and qPCR methods described.

2.5. Bacteriophage detection and enumeration

SOMCPH and GA17PH were extracted from sediments as previously described (Guzmán et al., 2007), a method in the process of standardization by the European Committee for Standardization (CEN, 2007). Water samples were filtered using polyethersulfone non-protein-binding membrane filters with a $0.22 \mu\text{m}$ pore size (Millipore, MA, USA). Bacteriophages from sediments and water were then counted using the double agar layer method indicated in ISO standards 10705-2 and 10705-4 (ISO, 2000, 2001). For the detection of human-specific bacteriophages, the latter method was modified by using *Bacteroides thetaiotaomicron* strain GA17 (Muniesa et al., 2012).

2.6. Calculation of resuspension parameters

The quantity of each indicator that was resuspended in the water phase of the microcosms after each agitation event was calculated using the following equation:

$$\text{Log}_{10}(Q_{AW} - Q_{NW}) \quad (2)$$

where Q_{AW} is the total quantity of microorganisms (CFU or PFU) present in the AW (in 400 ml) and Q_{NW} is the total quantity present in the NW (in 400 ml). The contribution (in percentage) of each agitation event to the microbial load in the water column was calculated as follows:

$$\frac{C_{AW} - C_{NW}}{C_{AW}} \cdot 100 \quad (3)$$

where C_{AW} is the concentration in the AW (CFU/100 ml or PFU/100 ml) and C_{NW} is the concentration in the NW (CFU/100 ml or PFU/100 ml).

2.7. Calculation of inactivation parameters

Inactivation rates in sediments were calculated for each indicator assuming the first order exponential model, defined by the equation:

$$k = \frac{\text{Log}_{10} (N_t/N_0) \cdot 2.303}{t} \quad (4)$$

where N_t and N_0 are microorganism concentrations (in CFU or PFU/g dw) at the time t and the initial time (in days), respectively, and k is the decay rate coefficient (in day⁻¹). In order to calculate the inactivation parameters, $\text{Log}_{10} (N_t/N_0)$ was plotted versus t for each sampling point and the regression line was generated. The slope of this line was used to calculate k , as follows:

$$\text{slope} = \frac{k}{2.3} \quad (5)$$

Finally, T_{90} or the time required to reduce the microorganism concentration by 1 log₁₀ unit, was isolated as follows:

$$T_{90} = -2.3/k \quad (6)$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. River characterization

In the initial phase of the study, the natural conditions of the river at the sampling point were determined. Figure 2 shows the flow and turbidity data in chronological order, represented as logarithms for better visualization. The mean river flow during the 2000-2013 period was 11 m³/s (Figure 2a). The alternation between drought periods and heavy rainfall events gave rise to a minimum of 0 m³/s, a maximum of 314 m³/s and a standard deviation of 17 m³/s, the typical variability of a Mediterranean river. Since the sampling point was located at the final stretch of the river, the factors that may determine flow include rainfall events throughout the river basin and snowmelt phenomena in spring. In addition, the presence of four reservoirs in the Llobregat basin affects and regulates the flow. However, the effect of these latter two factors should be a gradual increase in flow. The most important factor in sudden flow increases was therefore expected to be heavy rainfall events produced somewhere upstream of the sampling point and downstream of the reservoirs. The largest concentration of rainfall in the area occurs between October and March (García-Herrera et al., 2007). It is therefore not surprising that flow data higher than 28 m³/s (mean + standard deviation) were mostly distributed throughout this period and spring, when snowmelt takes place. River flow data lower than 1 m³/s corresponded to occasional events (lasting 1 to 6 days) in 2000, 2007 and 2008, and to a long period during the severe drought that affected the Iberian Peninsula in 2005. Indeed, the 2004-2005 hydrological year represented one of the worst droughts ever recorded on the Iberian Peninsula (García-Herrera et al., 2007).

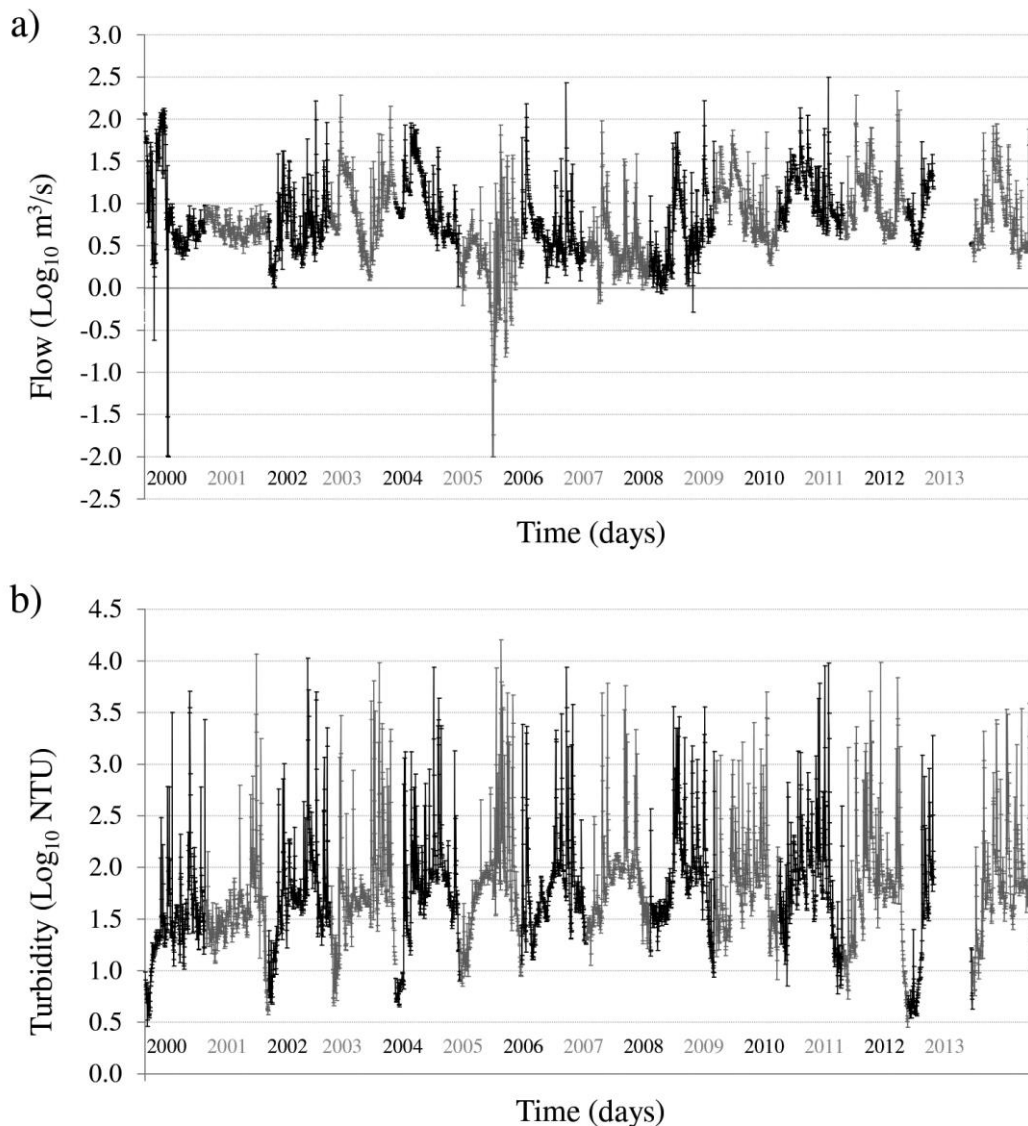


Figure 2. Chronological parameters observed during a 14- year period (2000 - 2013) in the Llobregat River: a) Flow b) Turbidity.

The mean river turbidity value recorded in the 2000-2013 period was 181 NTU (Figure 2b). As occurred with flow, extreme variability was detected, with a maximum of 16,083 NTU, a minimum of 3 NTU and a standard deviation of 677 NTU. However, in contrast to river flow, turbidity showed a marked periodicity, with the lowest values (less than 10 NTU) corresponding to winter every year, and more specifically to December and January. These low turbidity results were always accompanied by flows below the mean, i.e., less than 11 m³/s, except for January in 2000, which recorded higher flow values. One may expect that the concentration of suspended solids in the water column would produce a rise in turbidity when the river flow is low. However, this phenomenon was not observed. On the other hand, turbidity values higher than the mean, i.e., 181 NTU, corresponded to short events (lasting 1 to 5 days) and were mostly accompanied by marked increases in short-duration flow. In addition, extreme turbidity values of more than 858 NTU (mean + standard deviation) always occurred within those events. Therefore, although it was not possible to rule out snowmelt and

water release in the reservoirs as the causal agents, the short-duration flow-turbidity increases were most likely due to rainfall events throughout the river basin. Thus, a heavy rainfall event would produce a sudden increase in river flow. This would lead to sediment resuspension accompanied by an abrupt rise in turbidity. In fact, the majority of flow results higher than 50 m³/s were accompanied by turbidity values higher than 858 NTU.

Indeed, a positive and statistically significant relationship between river flow and turbidity was found. In that regard, a linear regression was generated, defined by the following equation, with a p-value of 0.0000.

$$\text{Log}_{10} \text{ turbidity} = 1.41565 + 0.427544 \cdot \text{Log}_{10} \text{ flow} \quad (7)$$

where *turbidity* was expressed in NTU and *flow* in m³/s.

The weekly results for cEC concentrations in the Llobregat River over a seven year period are shown in Figure 3. The mean was 3.42 log₁₀ (CFU/100 ml) and the standard deviation was 0.71 log₁₀ (CFU/100 ml), with minimum and maximum values of 1.20 log₁₀ (CFU/100 ml) and 5.97 log₁₀ (CFU/100 ml), respectively. Sediment resuspension produced as a consequence of a heavy rainfall event was expected to lead to water quality deterioration and therefore increase pathogen and indicator concentrations. In fact, some authors have recognized bacteria resuspension as a potentially significant but extremely variable and poorly understood source of fecal indicator bacteria (De Brauwere et al., 2014; Jamieson et al., 2005). In that regard, a positive and statistically significant correlation was found between cEC and turbidity. A linear regression, represented by the following equation, was generated, with a p-value of 0.000.

$$\text{Log}_{10} \text{ cEC} = 2.71379 + 0.399123 \cdot \text{Log}_{10} \text{ turbidity} \quad (8)$$

where *cEC* was expressed in CFU/100 ml and *turbidity* in NTU.

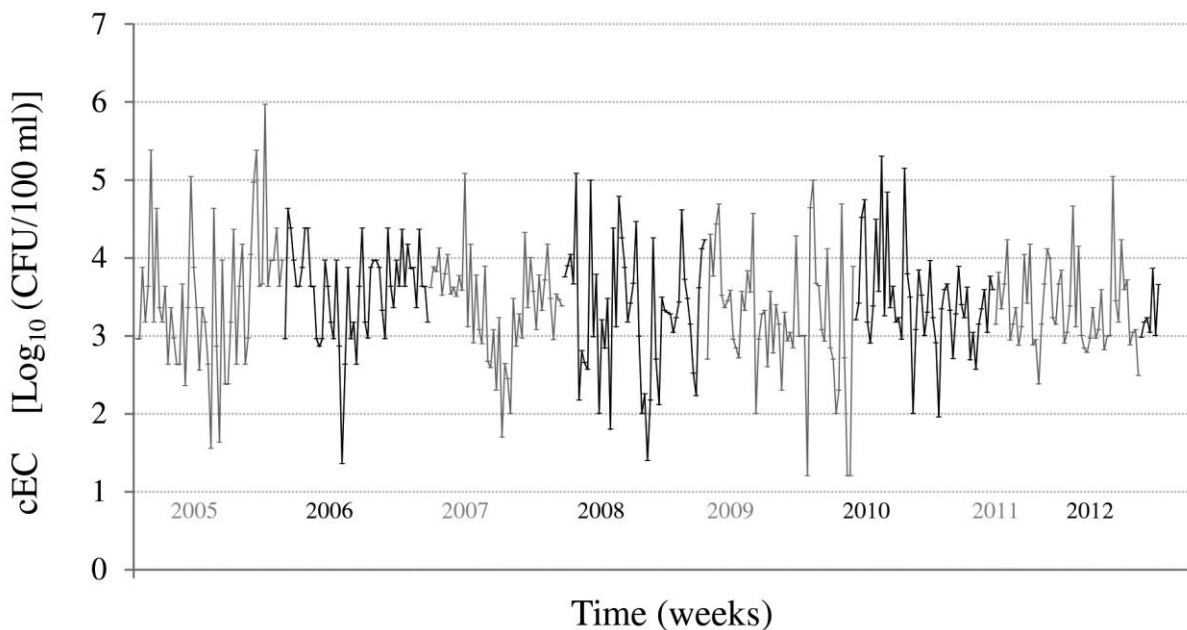


Figure 3. Weekly distribution of culturable *E. coli* (cEC) levels over a seven-year period in the Llobregat River (NTU). Results in log₁₀ (CFU/100 ml)

3.2. Microcosm evaluation

In order to evaluate the performance of the microcosms, turbidity and cEC concentrations were analyzed in the water phase before and immediately after each agitation. Turbidity results obtained before the agitation were between 6 and 47 NTU, with a mean value of 28 NTU and a standard deviation of 15 NTU. These results, always below the mean value of 181 NTU obtained in the river, satisfactorily reflected calm conditions. After the agitation, turbidity was between 253 and 2100 NTU, with a mean value of 802 NTU and a standard deviation of 703 NTU. These results were always above the mean in the river and showed how the microcosms satisfactorily reproduced the turbidity values reached in the river after rainfall events and the consequent sediment resuspension. Again, a positive and statistically significant relationship was found between turbidity and cEC in microcosms, as occurred with the natural river conditions. A linear regression, represented by the following equation, was generated, with a p-value of 0.0446.

$$\text{Log}_{10} \text{cEC} = 2.80954 + 0.367735 \cdot \text{Log}_{10} \text{turbidity} \quad (9)$$

where *cEC* was expressed in CFU/ml and *turbidity* in NTU.

3.3. Microcosm experiments

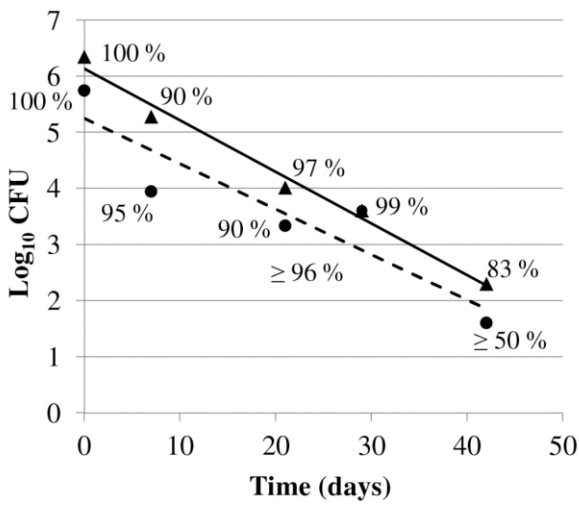
Turbidity results for the water phase of the microcosms in each sampling (for both the AW and the NW) are shown in Table 1. Each agitation produced an abrupt rise in turbidity due to the sediment resuspension and the turbidity decreased steadily over the following hours until the sampling event. It is important to remark that the samplings took place after the 24 h decantation period in order to simulate the river conditions the day after a heavy rainfall event. In that regard, the turbidity results obtained for the AW ranged between 36 and 334 NTU, with a mean of 152 NTU, and therefore satisfactorily reflected the natural conditions after rainfall event. In fact, results higher than 181 NTU (the mean obtained in the river) were still detected in 40% of the AW samples. By contrast, the turbidity results obtained for the NW ranged between 9 and 82 NTU, with a mean of 39 NTU. These results, which were always under 181 NTU, satisfactorily reflected the effects of calm conditions in the water column after the simulation of the first rainfall event. Although the conditions applied for each agitation were exactly the same (250 rpm, 24 h decantation) and the sediment sample was the same for each microcosm, the turbidity results obtained were heterogeneous. The factors affecting this are complex and diverse. Theoretically, particle sedimentation speed could be calculated using Stokes' law. However, the real behavior of sediment particles floating in the AW is difficult to predict, since the particles may be frequently present in the form of mineral-organic matter aggregates, with different densities and diameters than separated particles. In addition, sorting values for the sediments used in both microcosm experiments were higher than 4.5, i.e., poorly sorted, thus indicating that very different particle sizes were present in the same sample. All of this could explain the turbidity results obtained throughout the microcosm experiments. For the pH, the results were similar for the AW and the NW and were between 7.4 and 8.0.

Table 1. Turbidity values reached in the non-agitated water (NW) and the agitated water (AW) during microcosm experiments. Results in NTU. * NW data for day 0 do not exist since all flasks were agitated at the beginning of the microcosm experiments.

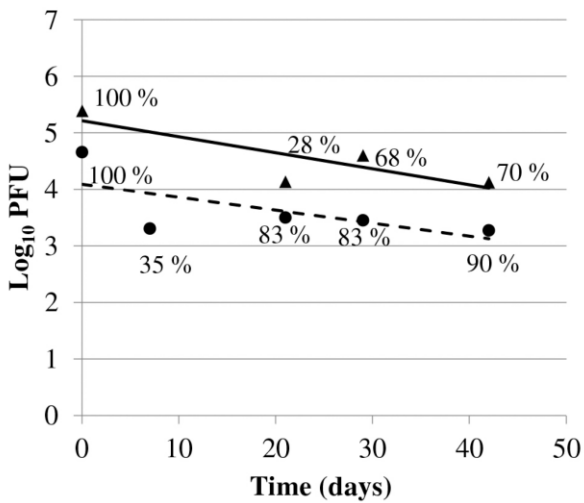
| | | Day 0 | Day 7 | Day 21 | Day 29 | Day 42 |
|-------------|----|-------|-------|--------|--------|--------|
| Microcosm 1 | NW | * | 49 | 58 | 18 | 10 |
| | AW | 165 | 334 | 172 | 201 | 182 |
| Microcosm 2 | NW | * | 35 | 49 | 82 | 9 |
| | AW | 223 | 109 | 50 | 49 | 36 |

Initial indicator concentrations in the sediments used to create the microcosms were the following, expressed as \log_{10} [(CFU, FPU or GC/g dw)]: 4.94 cEC, 6.11 tEC, 4.59 SSRC, 4.34 SFBIF, 5.27 SOMCPH and 2.30 GA17PH for microcosm 1 and 4.54 cEC, 6.04 tEC, 4.08 SSRC, 3.71 SFBIF, 4.61 SOMCPH and 1.21 GA17PH for microcosm 2. For all indicators, higher levels were found in the first microcosm than in the second. In order to study the microbial resuspension produced in the microcosm experiments, cEC, SOMCPH and SSRC were chosen as models for non-conservative, semi-conservative and conservative indicators, respectively. Figure 4 shows the resuspension patterns for the three indicators. These results represent the quantity of each microorganism that was resuspended from sediments into the water column after each agitation event, calculated using equation 2; the trend lines generated are also shown. As time passed, the quantity of cEC and SOMCPH resuspended in the water phase decreased due to the inactivation affecting these indicators. By contrast, the quantity of SSRC that was resuspended was similar for all agitation events, which indicates high resistance throughout the entire six-week experiment. These differences associated with the resistance to inactivation were reflected in the trend lines that were generated. In fact, despite differences in the initial concentrations in sediments for microcosms 1 and 2, the slopes were very similar for each indicator analyzed. Figure 4 also represents the contribution of each agitation event to the microbial load present in the water column, calculated using equation 3 and expressed as percentages. Obviously, 100% of the microbial load in the water column after the first agitation event came from sediments, as the water was initially sterilized. After this, each indicator was affected by sedimentation to a different degree. As a consequence, the indicator concentrations detected in the AW after a new agitation event were the sum of the microorganisms that had not settled since the previous agitation and those that were mobilized from sediments into the water column due to this new agitation. In general, more than 80%-90% of the cEC and SSRC detected in the AW came from resuspension. However, the contribution of agitation to SOMCPH concentrations in the AW was lower and more heterogeneous, and ranged from 28% to 90%. These behavioral differences between bacteria cells or spores and bacteriophages could be explained by differences in microbial size and composition that would influence sedimentation. In addition, microbes attached to sediment particles and floating in the water phase were subjected to different sedimentation patterns than those freely floating. Attached microorganisms undergo the same physical processes as the material they are attached to (De Brauwere et al., 2014). However, it is often assumed that free microorganisms do not settle at all, but some authors believe that this is not the case (De Brauwere et al., 2014). In any case, since bacteria-sediment and bacteriophage-sediment associations are expected to be different, this should also apply to sedimentation patterns.

- a) ▲ cEC 1 $y = -0.0919x + 6.1335$; $R^2 = 0.9853$
 ● cEC 2 $y = -0.0807x + 5.2454$; $R^2 = 0.8413$



- b) ▲ SOMCPH 1 $y = -0.0283x + 5.2165$; $R^2 = 0.6998$
 ● SOMCPH 2 $y = -0.0228x + 4.0909$; $R^2 = 0.4427$



- c) ▲ SSRC 1 $y = 0.0033x + 5.8901$; $R^2 = 0.3532$
 ● SSRC 2 $y = -0.0011x + 4.7693$; $R^2 = 0.0115$

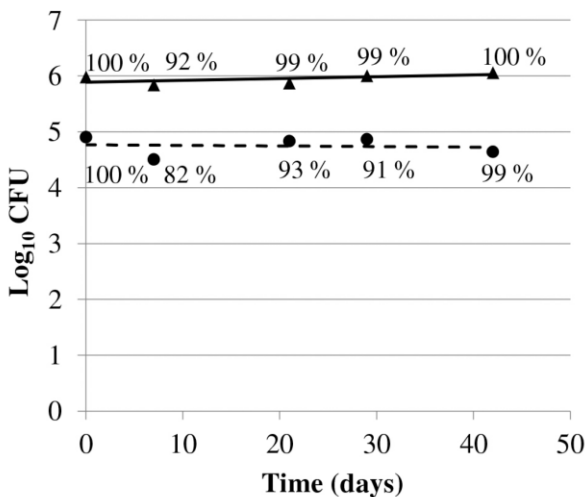


Figure 4. Resuspension patterns and indicator mobilization in microcosms 1 and 2 for: a) culturable *E. coli*, cEC, b) somatic coliphages, SOMCPH and c) spores of sulfite-reducing clostridia, SSRC.

Table 2 summarizes the indicator levels detected in microcosms for the three simulations: the water column covering riverbank sediments subjected to both calm conditions and heavy rainfall events, and the non-covered riverbank sediments subjected to calm conditions. Results in the water column and the sediments at the initial time and after 42 days are shown for all indicators analyzed. Different inactivation patterns were obtained for each microorganism and sample type. In the NW, the factors affecting the quantity of microorganisms detected were: (i) death or inactivation due to nutrient exhaustion and predators coming from sediments (water was sterilized in order to create the microcosms), (ii) sedimentation, related to microbial size and density, the microorganism-sediment particle association and the microorganism-microorganism association. Grazing by protozoa has been reported as the most important cause of death among bacteria in natural water (De Brauwere et al., 2014). Some authors (Anderson et al., 2005) have not taken the effects of sedimentation into account when analyzing the water phase in microcosms, while others have (Craig et al., 2004), thus revealing the importance of this factor. Solar radiation and high temperatures have been reported to inactivate microorganisms in nature (De Brauwere et al., 2014); however, in order to simplify the number of factors that influence inactivation, the present study was carried out in the dark at a constant temperature of $20\pm 2^\circ\text{C}$. Craig et al. (2004) found higher inactivation rates for cEC in microcosms containing only marine water than in the water phase of microcosms that reproduce the water column covering the underlying sediments. For this reason, the microcosms in the present study were designed to reproduce this natural scheme.

Table 2. Indicator levels detected in microcosms 1 and 2 at the initial time (t_0) and after 42 days (t_{42}). Results in \log_{10} [CFU, PFU or GC / 100 ml of water or 1 g of sediments (dry weight)]. NW = non-agitated water, AW = agitated water, NS = non-agitated covered sediments, AS = agitated covered sediments, NCS = non-covered sediments. cEC = culturable *E. coli*, tEC = total *E. coli*, SSRC = spores of sulfite-reducing clostridia, SFBIF = sorbitol-fermenting *Bifidobacterium*, SOMCPH = somatic coliphages, GA17PH = bacteriophages infecting *Bacteroides thetaiotaomicron* strain GA17.

| MICROCOSM 1 | | | | | | | | | | | | |
|-------------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|--------|----------|--------|----------|
| | cEC | | tEC | | SSRC | | SFBIF | | SOMCPH | | GA17PH | |
| | t_0 | t_{42} | t_0 | t_{42} | t_0 | t_{42} | t_0 | t_{42} | t_0 | t_{42} | t_0 | t_{42} |
| NW | 5.75 | < 1 | 5.27 | <4.67 | 5.38 | 2.93 | 5.04 | < 2 | 4.79 | 3.15 | 2.79 | <0.60 |
| AW | 5.75 | 1.78 | 5.27 | 4.71 | 5.38 | 5.46 | 5.04 | < 2 | 4.79 | 3.67 | 2.79 | 0.20 |
| NS | 4.94 | 1.20 | 5.16 | 4.73 | 4.59 | 4.81 | 4.34 | <1.39 | 5.27 | 4.16 | 2.30 | 1.60 |
| AS | 4.89 | 1.47 | 5.49 | 4.94 | 4.83 | 4.96 | 4.55 | <1.48 | 4.84 | 4.13 | 1.31 | 0.59 |
| NCS | 4.94 | 1.14 | 5.16 | 4.60 | 4.59 | 5.03 | 4.34 | <1.17 | 5.27 | 2.58 | 2.30 | -0.26 |
| MICROCOSM 2 | | | | | | | | | | | | |
| | cEC | | tEC | | SSRC | | SFBIF | | SOMCPH | | GA17PH | |
| | t_0 | t_{42} | t_0 | t_{42} | t_0 | t_{42} | t_0 | t_{42} | t_0 | t_{42} | t_0 | t_{42} |
| NW | 5.15 | < 1 | 4.77 | <4.67 | 4.30 | 2.18 | 3.78 | < 2 | 4.06 | 1.70 | 1.20 | <0.60 |
| AW | 5.15 | 1.30 | 4.77 | <4.67 | 4.30 | 4.04 | 3.78 | < 2 | 4.06 | 2.72 | 1.20 | <0.60 |
| NS | 4.54 | 0.33 | 5.11 | 3.86 | 4.08 | 3.90 | 3.71 | <1.39 | 4.61 | 3.79 | 1.21 | -0.07 |
| AS | 4.60 | 1.48 | 4.93 | 3.93 | 4.40 | 4.06 | 2.66 | <1.48 | 4.33 | 3.74 | 1.64 | 0.00 |
| NCS | 4.54 | 0.87 | 5.11 | 3.39 | 4.08 | 3.60 | 3.71 | <1.17 | 4.61 | 2.96 | 1.21 | -0.25 |

Forty-two days after the beginning of the experiments, the only two indicators detected in the NW were SSRC and SOMCPH. Therefore, it seems that a significant number of these bacteriophages and spores were not affected by sedimentation and that these indicators

resisted inactivation more satisfactorily than the others. On the other hand, SFBIF were not detected in any of the microcosm phases, even after 21 days, and thus represent the most sensitive indicator. Since *E. coli* was the most abundant microorganism in the NW at the initial time, a positive detection using qPCR could be expected at time 42. However, the tEC detection limit in the water phase was $4.67 \log_{10}$ (GC/100 ml), which clearly influenced this result. By contrast, the low GA17PH levels found at the initial time, compared with the other indicators, would explain the negative result obtained for this indicator at time 42 in the NW. Indeed, GA17PH was found to resist inactivation even better than SOMCPH in marine-water microcosms (Mocé-Llivina et al., 2005). In the AW, as explained earlier in this section, the indicator levels detected were strongly related to resuspension from sediments and, therefore, to indicator survival in those sediments. In fact, the majority of the indicators were still detected in the AW after 42 days, which serves as a warning about the capacity of fluvial sediments to act as pathogen reservoirs. Thus, under the conditions assayed in this study, resuspension from sediments led to deterioration of the water quality, even six weeks after microbial depositions in the riverbank. Indicator inactivation patterns in the NCS, NS, AW and AS phases are discussed in greater detail in the following sections.

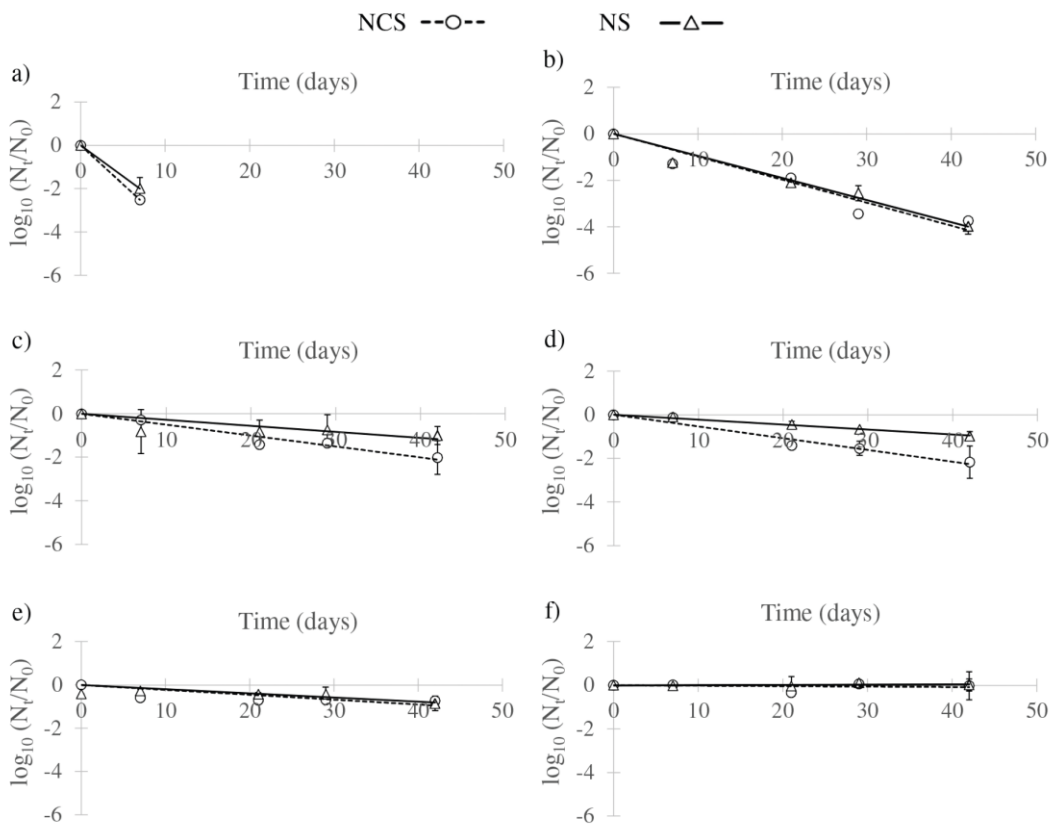


Fig. 5. Inactivation patterns in the non-covered sediments (NCS) and the non-agitated covered sediments (NS) for a) SFBIF, sorbitol-fermenting *Bifidobacterium*, b) cEC, culturable *E. coli*, c) GA17PH, bacteriophages infecting *Bacteroides thetaiotaomicron* strain GA17, d) SOMCPH, somatic coliphages, e) tEC, total *E. coli*, f) SSRC, spores of sulfite-reducing clostridia. Mean values for the two microcosms tested. Error bars represent standard deviation.

Regarding the sediment phases of the microcosms, the particle sizes were classified as follows: particles with a diameter smaller than 4 μm were defined as clay, particle diameters between 4 and 63 μm were defined as silt, and particle diameters greater than 63 μm were defined as sand. For microcosm 1, the particle size distribution for the sediment was 20.7% clay, 26.6% silt and 52.7% sand; for microcosm 2, it was 21.0% clay, 49.9% silt and 29.1% sand. Indicator resistance to inactivation was compared in the NCS with respect to the NS to evaluate the protection that the water column conferred to the microbes present in the riverbank sediments. Those pathogens with the capacity to resist the environmental conditions that affect riverbank sediments over time could potentially mobilize from sediments into the water during the subsequent rainfall event. Inactivation results for NCS and NS are shown in Figure 5 and Table 3.

Table 3. Inactivation parameters obtained in the non-covered sediments (NCS) and the non-agitated covered sediments (NS). R^2 and slopes corresponded to the regression lines showed in Figure 5 and defined by the equation " $\log_{10} (N_t/N_0) = \text{slope} \cdot \text{time}$ ". SFBIF = sorbitol-fermenting *Bifidobacterium*, cEC = culturable *E. coli*, GA17PH = bacteriophages infecting *Bacteroides thetaiotaomicron* strain GA17, SOMCPH = somatic coliphages, tEC = total *E. coli*, SSRC = spores of sulfite-reducing clostridia.

| | SFBIF | cEC | GA17PH | SOMCPH | tEC | SSRC | |
|-----|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| NCS | Slope | -0.3595 | -0.0986 | -0.0501 | -0.0537 | -0.0225 | -0.002 |
| | R^2 | 1.0000 | 0.9076 | 0.943 | 0.9573 | 0.2321 | -0.036 |
| | k (days ⁻¹) | -0.83 | -0.23 | -0.12 | -0.12 | -0.15 | 0.00 |
| | T ₉₀ (days) | 3 | 10 | 20 | 19 | > 42 | > 42 |
| NS | Slope | -0.2846 | -0.0948 | -0.0278 | -0.0225 | -0.019 | 0.001 |
| | R^2 | 1.0000 | 0.9581 | 0.1981 | 0.9887 | -0.153 | 0.1522 |
| | k (days ⁻¹) | -0.66 | -0.22 | -0.06 | -0.05 | -0.14 | 0.00 |
| | T ₉₀ (days) | 4 | 11 | 36 | > 42 | > 42 | > 42 |

In general, the indicators studied in this research behaved differently in each sediment phase. Inactivation was slightly higher for non-covered sediments than for those covered by the water column. Although dryness is a key inactivation factor in the microbial world, the moisture percentage of the NCS appeared to be high enough to confer good protection for the indicators analyzed. The moisture percentage was between 26.6% and 36.2%. For the NS this percentage was between 49.6% and 69.1%. The more resistant indicators were SSRC and tEC. SSRC remained unaltered throughout the whole experiment in both sediment phases, which was expected for these spore-forming bacteria. For tEC, a slight decay was observed, although the T₉₀ values were higher than 42 days in the two phases. On the other hand, the more sensitive indicators in this study were culturable bacteria, i.e. cEC and SFBIF. The cEC concentrations decreased by 1 log₁₀ after 10 and 11 days for the NCS and the NS, respectively. Similar results for cEC were found in sediments subjected to simulated rainfalls and maintained at 18°C (Stocker et al., 2015). On the contrary, the microcosms developed by Anderson et al. (2005) showed lower resistance to inactivation for fecal coliforms. This was probably due to the fact that their microcosms were incubated outdoors and were therefore subjected to weather variations. Similarly, T₉₀ values of between 2.04 and 4.55 days have been obtained for cEC in water-covered sediments incubated at 20°C (Craig et al., 2004). However, these authors used laboratory-grown *E. coli* strains, which are known to present less resistance than environmental microorganisms. In addition, several studies (Craig et al., 2004;

Jamieson et al., 2005; Walters et al., 2014) have found that microorganisms resist for longer in sediments with small particle sizes such as silt and clay than in sandy sediments. In that regard, the sediments used by Craig et al. (2004) had high percentages of sand. With respect to SFBIF, their levels reduced to 10% in barely 3 days in the NCS and just 4 days in the NS. This behavior was consistent with the nature of obligate anaerobes that rapidly decline outside the gut (Bonjoch et al., 2009). This indicator is therefore useful for detecting recent pollution events. Finally, bacteriophages showed intermediate resistance to inactivation in the microcosms and remained detectable throughout the entire experiment. In this case, T_{90} values clearly differed between covered and uncovered sediments. Twenty days were needed to reduce the GA17PH concentrations in the NCS by 1 \log_{10} , and this value was 36 days for the NS. Regarding SOMCPH, T_{90} values were 19 and more than 42 days for the NCS and the NS, respectively. These inactivation results were similar for both groups of bacteriophages studied. As with the water phase of the microcosms, nutrient exhaustion and grazing are expected to be the most important causes of microbial death or inactivation in the sediment phase. On the other hand, the positive effect of sedimentation could be neglected in this case, since the quantity of microorganisms resuspended into the water column during the first agitation event was insignificant compared to the quantity that remained in the sediments (Table 2). Indeed, several studies conducted under both environmental and laboratory conditions have shown that greater numbers of microorganisms are attached to sediments than float free in the water column (Craig et al., 2004). The nature and proportion of particle attachment is still under study and appears to depend on the properties of both the solid particles and the microorganisms studied (De Brauwere et al., 2014), in addition to temperature, salinity and other environmental factors. Studies have reported percentages of fecal indicator bacteria attached to particles of 38%, 30%, 50%, 80%, between 30 and 55%, and percentages varying according to the season (De Brauwere et al., 2014).

Indicator behavior in the agitated phases of microcosms (AW and AS) are shown in Figure 6. Detection in the AS was strongly related to indicator resistance to inactivation. Thus, the conservative indicators (SSRC and tEC) showed lower levels of decay over time than the semi-conservative bacteriophages (SOMCPH and GA17PH) or the non-conservative bacteria (cEC and SFBIF). Since the microorganisms present in the water phase mobilized due to the sediment resuspension produced in each agitation event, the AS and the AW were clearly interrelated (Figure 6). It is important to highlight the presence of almost all indicators in the sediments after 42 days and how the sediment resuspension with the consequent microbial mobilization led to deterioration of the water quality.

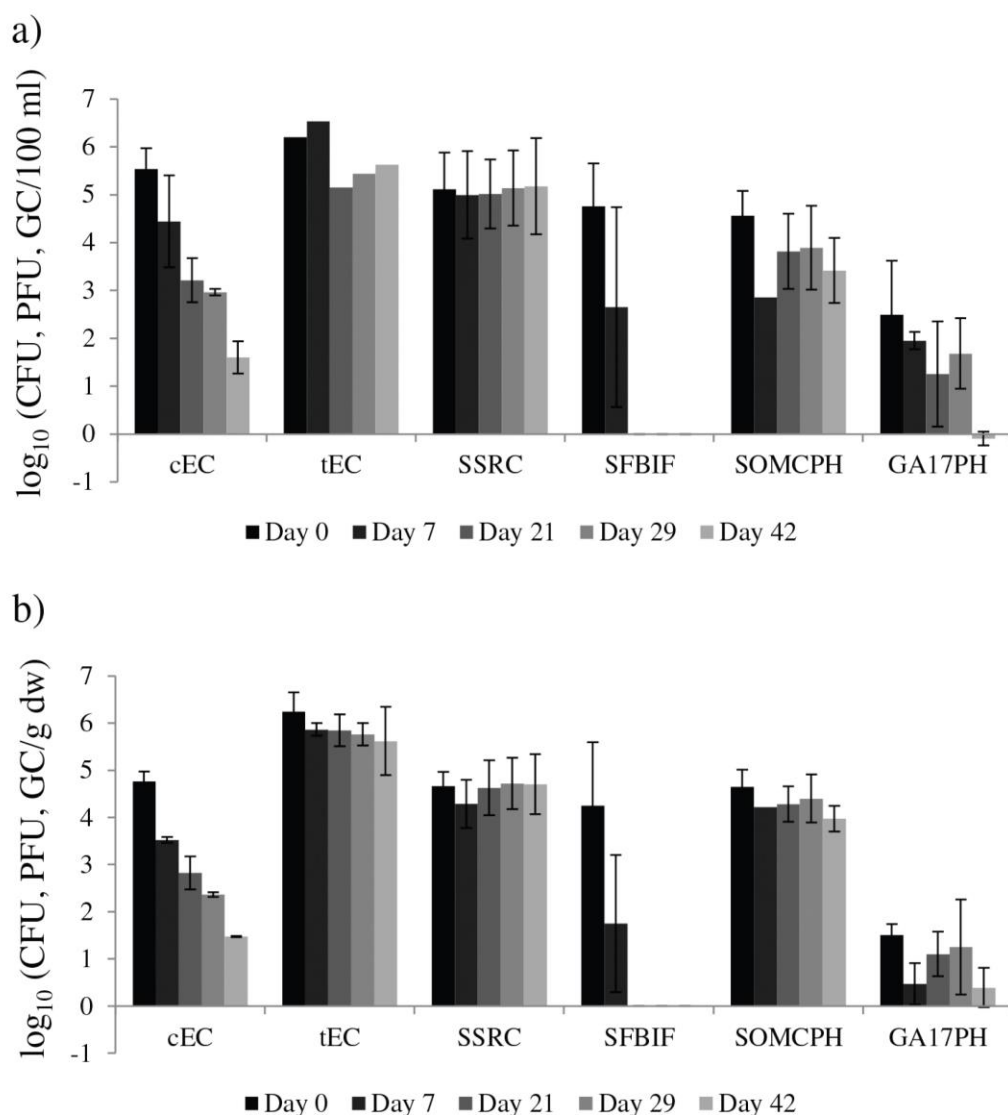


Figure 6. Indicator concentrations found during the 42-day-microcosms in a) the agitated water, AW and b) the agitated covered sediments, AS. Mean values for the two microcosms tested. Error bars represent standard deviation. No standard deviation is shown for tEC in the AW and for SOMCPH at time 7 in the AW and AS. Data shown for these parameters correspond to microcosm 1.

4. CONCLUSIONS

The experimental microcosms created in this study satisfactorily reproduced the resuspension of fluvial sediments into the water column produced as a consequence of heavy rainfall events. This methodology made it possible to calculate the T_{90} for six fecal pollution indicators and MST markers in the sediments and study their mobilization to sediment resuspension.

- The inactivation patterns obtained in water and sediments during the 42-day simulation were determined, and were as follows: cEC and SFBIF were the most sensitive, SOMCPH and GA17PH showed intermediate resistance and SSRC and tEC were the most resistant.

- Bacteriophages and bacteria showed different resuspension and sedimentation patterns, probably related to microbial size and composition and to different microorganism-sediment particle and microorganism-microorganism associations.
- Five out of the six indicators were still detected in the sediments after 42 days, which serves as a warning about the risk of pathogen mobilization due to rainfalls.
- The present study has generated valuable data about waterborne pathogen behavior for inclusion in predictive models that evaluate the effects of climate change on surface water quality.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Spanish government (CGL2011-25401, CGL2014-59977-C3-3-R and BES-2012-054179).

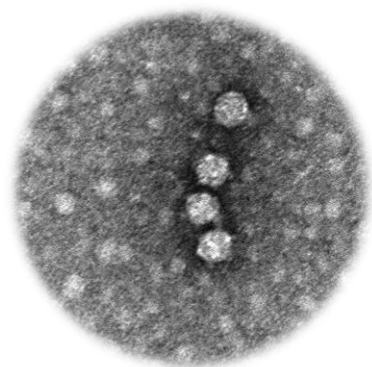
REFERENCES

- Agulló-Barceló, M., Oliva, F., Lucena, F., 2013. Alternative indicators for monitoring *Cryptosporidium* oocysts in reclaimed water. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 4448–4454. doi:10.1007/s11356-012-1400-4
- Ahmed, W., Gyawali, P., Sidhu, J.P.S., Toze, S., 2014. Relative inactivation of faecal indicator bacteria and sewage markers in freshwater and seawater microcosms. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 348–354. doi:10.1111/lam.12285
- Anderson, K.L., Whitlock, J.E., Harwood, V.J., 2005. Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3041–3048. doi:10.1128/AEM.71.6.3041-3048.2005
- Astals, S., Venegas, C., Peces, M., Jofre, J., Lucena, F., Mata-Álvarez, J., 2012. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Res.* 46, 6218–6227. doi:10.1016/j.watres.2012.07.035
- AVMA, 2008. One health: A new professional imperative, One Health Initiative Task Force: Final Report.
- Bonjoch, X., Ballesté, E., Blanch, A.R., 2005. Enumeration of bifidobacterial populations with selective media to determine the source of waterborne fecal pollution. *Water Res.* 39, 1621–1627. doi:10.1016/j.watres.2005.01.018
- Bonjoch, X., Lucena, F., Blanch, A.R., 2009. The persistence of bifidobacteria populations in a river measured by molecular and culture techniques. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1178–1185. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04297.x
- CEN, 2007. Soils, sludges and treated bio-wastes — Extraction of bacteriophages from sludge, soils and treated biowastes. Horizontal D2_4.5_HOR-HYG. https://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/D2_4.5_HOR-HYG_Bact.pdf (Last accessed: 4th March 2017).
- Craig, D.L., Fallowfield, H.J., Cromar, N.J., 2004. Use of microcosms to determine

- persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. *J. Appl. Microbiol.* 96, 922–930. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02243.x
- De Brauwere, A., Ouattara, N.K., Servais, P., 2014. Modeling Fecal Indicator Bacteria Concentrations in Natural Surface Waters : A Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 44, 2380–2453. doi:10.1080/10643389.2013.829978
- Durán, A.E., Muniesa, M., Méndez, X., Valero, F., Lucena, F., Jofre, J., 2002. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J. Appl. Microbiol.* 92, 338–347. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01536.x
- García-Herrera, R., Paredes, D., Trigo, R.M., Trigo, I.F., Hernández, E., Barriopedro, D., Mendes, M.A., 2007. The Outstanding 2004/05 Drought in the Iberian Peninsula: Associated Atmospheric Circulation. *J. Hydrometeorol.* 8, 483–498. doi:10.1175/JHM578.1
- Giorgi, F., Lionello, P., 2008. Climate change projections for the Mediterranean region. *Glob. Planet. Change* 63, 90–104. doi:10.1016/j.gloplacha.2007.09.005
- Guzmán, C., Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., 2007. Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil and treated biowaste. *J. Virol. Methods* 144, 41–48. doi:10.1016/j.jviromet.2007.03.017
- Hassard, F., Gwyther, C.L., Farkas, K., Andrews, A., Jones, V., Cox, B., Brett, H., Jones, D.L., McDonald, J.E., Malham, S.K., 2016. Abundance and Distribution of Enteric Bacteria and Viruses in Coastal and Estuarine Sediments—a Review. *Front. Microbiol.* 7, 1692. doi:10.3389/fmicb.2016.01692
- IPCC, 2014. *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Geneva (Switzerland).
- ISO, 2000. International Standard ISO 10705-2: Water quality - Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2: Enumeration of somatic coliphages.
- ISO, 2001. International Standard ISO 10705-4: Water quality - Detection and enumeration of bacteriophages. Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*.
- Jamieson, R., Joy, D.M., Lee, H., Kostaschuk, R., Gordon, R., 2005. Transport and deposition of sediment-associated *Escherichia coli* in natural streams. *Water Res.* 39, 2665–2675. doi:10.1016/j.watres.2005.04.040
- Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., Muniesa, M., 2014. Bacteriophages infecting *Bacteroides* as a marker for microbial source tracking. *Water Res.* 55, 1–11. doi:10.1016/j.watres.2014.02.006
- Kim, J.-W., Pachepsky, Y.A., Shelton, D.R., Coppock, C., 2010. Effect of streambed bacteria release on *E. coli* concentrations : Monitoring and modeling with the modified SWAT. *Ecol. Modell.* 221, 1592–1604. doi:10.1016/j.ecolmodel.2010.03.005

- Mara, D.D., Oragui, J.I., 1983. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. *J. Appl. Bacteriol.* 55, 349–357.
- Mocé-Llivina, L., Lucena, F., Jofre, J., 2005. Enteroviruses and bacteriophages in bathing waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6838–6844. doi:10.1128/AEM.71.11.6838-6844.2005
- Muniesa, M., Lucena, F., Blanch, A.R., Payán, A., Jofre, J., 2012. Use of abundance ratios of somatic coliphages and bacteriophages of *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 for microbial source identification. *Water Res.* 46, 6410–6418. doi:10.1016/j.watres.2012.09.015
- Nichols, G., Lane, C., Asgari, N., Verlander, N.Q., Charlett, A., 2009. Rainfall and outbreaks of drinking water related disease and in England and Wales. *J. Water Health* 7, 1–8. doi:10.2166/wh.2009.143
- Pascual-Benito, M., García-Aljaro, C., Casanovas-Massana, S., Blanch, A.R., Lucena, F., 2015. Effect of hygienization treatment on the recovery and/or regrowth of microbial indicators in sewage sludge. *J. Appl. Microbiol.* 118, 412–418. doi:10.1111/jam.12708
- Ruiz-Hernando, M., Martín-Díaz, J., Labanda, J., Mata-Alvarez, J., Llorens, J., Lucena, F., Astals, S., 2014. Effect of ultrasound, low-temperature thermal and alkali pre-treatments on waste activated sludge rheology, hygienization and methane potential. *Water Res.* 61, 119–129. doi:10.1016/j.watres.2014.05.012
- Stocker, M.D., Pachepsky, Y.A., Hill, R.L., Shelton, D.R., 2015. Depth-Dependent Survival of *Escherichia coli* and Enterococci in Soil after Manure Application and Simulated Rainfall. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 4801–8. doi:10.1128/AEM.00705-15
- Walters, E., Kätzl, K., Schwarzwälder, K., Rutschmann, P., Müller, E., Horn, H., 2014. Persistence of fecal indicator bacteria in sediment of an oligotrophic river: Comparing large and lab-scale flume systems. *Water Res.* 61, 276–287. doi:10.1016/j.watres.2014.05.007
- WHO, 2011. Guidelines for Drinking-water Quality. Fourth edition. doi:10.1016/S1462-0758(00)00006-6
- Wu, J., Long, S.C., Das, D., Dorner, S.M., 2011. Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. *J. Water Health* 9, 265–278. doi:10.2166/wh.2011.117

5. Evaluación de diversas metodologías de extracción de enterovirus en muestras ambientales sólidas para su posterior detección mediante RT-qPCR



5. Evaluación de diversas metodologías de extracción de enterovirus en muestras ambientales sólidas para su posterior detección mediante RT-qPCR

La extracción y detección de virus entéricos en matrices sólidas sigue unas pautas muy similares en muestras tan diferentes como alimentos, sedimentos, muestras clínicas y lodos de depuradora. Tradicionalmente se han elaborado técnicas para la extracción de virus y la posterior detección mediante cultivo celular (Metcalf et al., 1980), más tarde se buscó compatibilizar esas técnicas con la detección molecular (Le Guyader et al., 1994; Monpoeho et al., 2001; Puig et al., 1994) y en los últimos años, con el desarrollo de la qPCR, se ha investigado para refinar los métodos de extracción más apropiados para compatibilizarlos con la detección de ácidos nucleicos (Knight et al., 2013; Miura et al., 2011; Stals et al., 2012). En este ámbito, en los últimos años están comenzando a aparecer normas estandarizadas sobre la extracción y detección de virus mediante qPCR, como la ISO 15216-1:2017 (ISO, 2017) para la detección de virus de la hepatitis A y de norovirus en alimentos o la NF U 47-600-2 (AFNOR, 2015) sobre exigencias y recomendaciones para el desarrollo y la validación de la PCR en sanidad animal.

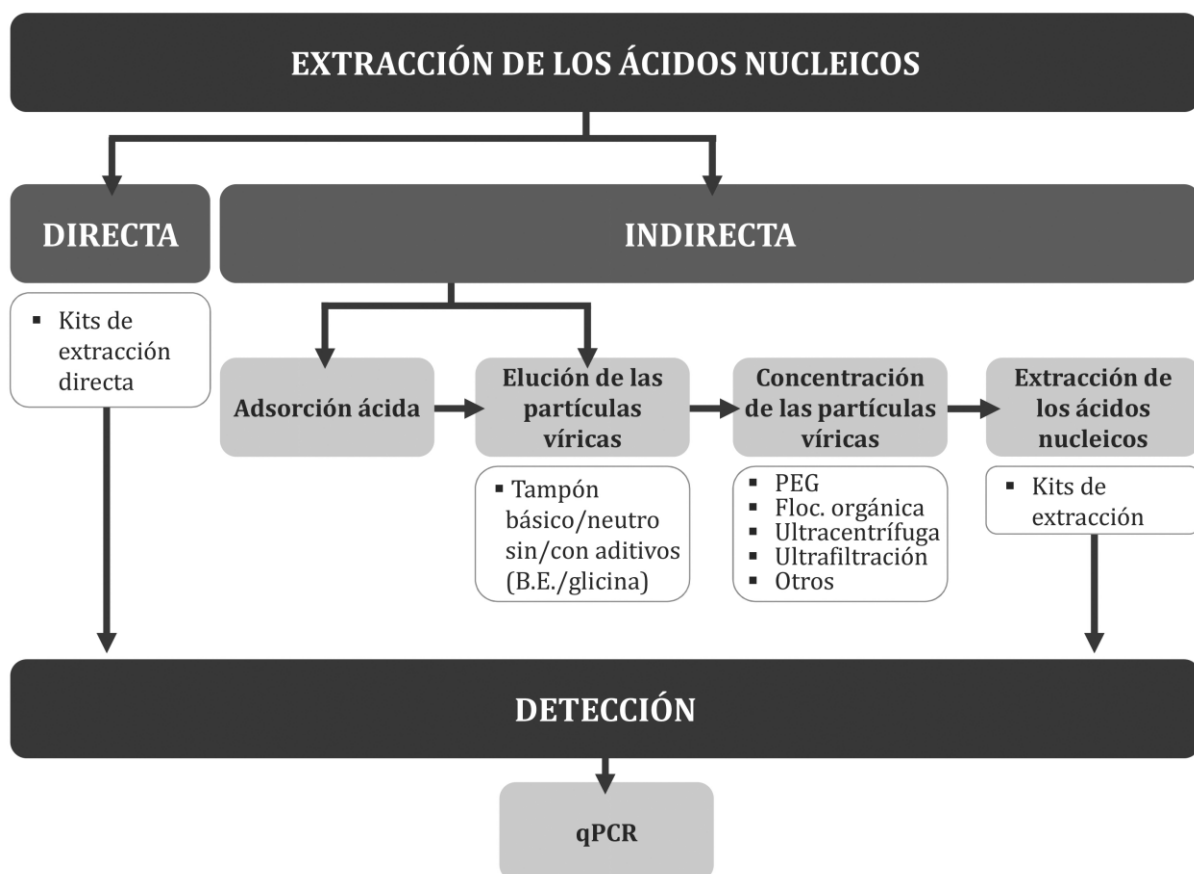


Figura 13. Métodos de extracción y detección mediante qPCR de virus entéricos en muestras sólidas. B.E. = extracto de carne de ternera (beef extract). PEG = polietilenglicol.

En el caso de enterovirus, las bajas concentraciones de partículas víricas infecciosas detectadas frecuentemente en ciertos tipos de muestras ambientales sólidas mediante cultivo celular hacen que la RT-qPCR adquiera importancia como técnica alternativa

(Monpoeho et al., 2001). Además, la línea celular utilizada para la detección de partículas infecciosas, las células BGM, no es específica para el género *Enterovirus*, detectando también virus de la familia *Reoviridae*. Finalmente, el cultivo celular es una técnica que requiere de hasta dos semanas para obtener resultados. Por supuesto, las técnicas moleculares también muestran inconvenientes, como la dificultad para distinguir partículas infecciosas de las no infecciosas o los problemas de inhibición de la reacción. Por otro lado, ante la escasez de métodos estandarizados de extracción y detección de enterovirus en muestras sólidas mediante RT-qPCR, normalmente se utilizan adaptaciones de métodos para cultivo celular, como el de la EPA (US Environmental Protection Agency, 2003) o alguno de los variados procedimientos descritos en la bibliografía (Miura et al., 2011; Monpoeho et al., 2001). Sin embargo, los métodos existentes a menudo son largos y tediosos y dan lugar a porcentajes de recuperación extremadamente variables, frecuentemente por debajo del 10% (Hassard et al., 2016; Miura et al., 2011).

Existen dos tipos de aproximaciones habituales a la hora de extraer virus entéricos en muestras sólidas para su detección mediante PCR cuantitativa: la extracción directa de los ácidos nucleicos desde la muestra de origen y la extracción indirecta, en la que las partículas víricas son previamente eluidas y concentradas antes de extraer los ácidos nucleicos (Fig. 13). El objetivo de ambas es conseguir un ácido nucleico lo más puro posible, a una concentración adecuada para su detección y con la menor cantidad de inhibidores posible.

5.1. Extracción directa

La extracción directa se basa, normalmente, en la utilización de derivados fenólicos o reactivos de isotiocianato de guanidina para extraer y separar los ácidos nucleicos directamente desde la matriz sólida. A continuación, se llevan a cabo varios pasos de purificación con el objetivo de retirar posibles inhibidores. Actualmente se encuentran disponibles diferentes kits comerciales adaptados para cada tipo de muestra. La mayor ventaja es la rapidez y sencillez de los métodos. A modo de inconveniente, su capacidad de concentración suele ser limitada, por lo que pueden ser más adecuados para muestras con un alto nivel de contaminación.

5.2. Extracción indirecta

La extracción indirecta suele estar formada por la elución de las partículas víricas (a veces precedida por adsorción ácida), la posterior concentración de las mismas y la extracción final de los ácidos nucleicos. Para cada uno de los pasos se encuentran disponibles diferentes técnicas y la elección de las mismas dependerá del tipo concreto de muestra a analizar, de su concentración vírica y de los medios disponibles en el laboratorio.

La adsorción ácida consiste en provocar la adhesión de los virus a las partículas del sólido utilizando una solución a pH ácido, seguido de centrifugación y el posterior descarte del sobrenadante. Durante la elución se utiliza una solución tampón alcalina (pH entre 9,0 y 10,5) o neutra para separar los virus del sólido, en combinación con el uso de fuerza mecánica en forma de agitación. El tiempo y sistema de agitación aplicados varían ampliamente, dependiendo de las instalaciones del laboratorio y del tipo de muestra. El ambiente alcalino favorece la elución y, en muchos casos, la solución incluye aditivos proteicos o aminoácidos (extracto de carne, glicina o proteína de soja) que compiten con las cápsides víricas por los sitios de unión a la matriz sólida, facilitando el intercambio. Sin embargo, algunos estudios sugieren que, en concreto, el extracto de carne puede interferir con los métodos moleculares de detección, dando lugar a procesos de inhibición de la reacción (Goyal y Aboubakr, 2016; Knight et al., 2013; Miura et al., 2011; Rodríguez-Lázaro et al., 2013; Stals et al., 2012). La proporción entre la muestra y el tampón utilizado es otro factor a tener en cuenta: una mayor cantidad de tampón favorecerá la elución, pero provocará una mayor dilución de los virus.

Con respecto a la concentración de partículas víricas, los pasos más comúnmente utilizados como parte de los métodos indirectos son la precipitación con polietilenglicol, la floculación orgánica, la ultracentrifugación y la ultrafiltración (Goyal y Aboubakr, 2016; Knight et al., 2013; Miura et al., 2011; Rodríguez-Lázaro et al., 2013; Stals et al., 2012; US Environmental Protection Agency, 2003):

- El polietilenglicol, a pH neutro (7,0-7,4) y junto con una alta concentración iónica, permite la precipitación de las partículas víricas, evitando al mismo tiempo la co-precipitación de otro tipo de materia orgánica.
- La floculación orgánica se basa en la utilización de extracto de carne a concentraciones de entre el 1% y el 3% y pH ácido para, mediante agitación magnética, generar flóculos compuestos por el extracto proteico y las partículas víricas. Una posterior centrifugación formará un pellet que podrá ser resuspendido en un volumen pequeño. El éxito de la técnica depende en gran medida de la calidad del extracto de carne que se vaya a utilizar, variando incluso entre diferentes lotes.
- La ultracentrifugación requiere un paso previo de purificación (centrifugación convencional o filtración con poro de 0,22 o 0,45 μm) para evitar que los restos de la muestra interfieran en el proceso. Se trata de una técnica muy consistente que produce la precipitación de los virus utilizando fuerzas centrífugas de hasta 235.000 $\times g$, pero puede dar lugar a grandes pellets difíciles de resuspender y el equipo que se utiliza tiene un elevado coste.
- En la ultrafiltración, se hace pasar la muestra a través filtros que retienen los virus y dejan pasar aquellas partículas de peso molecular inferior a 50-100 kDa, entre las cuales se encuentran algunos de los inhibidores de la qPCR. Para evitar la obstrucción de los filtros, se requiere un paso previo de purificación.

- Otros métodos, como la separación catiónica y la inmuno-concentración, también son utilizados para concentrar las partículas víricas.

Finalmente, se realiza la extracción de los ácidos nucleicos, normalmente utilizando métodos que combinan soluciones de isotiocianato de guanidina (que desnaturaliza las proteínas de la cápside) y columnas con membranas de sílice (que retienen los ácidos nucleicos). Dependiendo del tipo de muestra a analizar se encuentran disponibles diferentes kits (Goyal y Aboubakr, 2016; Knight et al., 2013; Miura et al., 2011; Rodríguez-Lázaro et al., 2013; Stals et al., 2012).

Generalmente, los métodos indirectos permiten realizar una mayor concentración de las partículas víricas que los métodos directos, por lo que, cuando el nivel de contaminación de la muestra es bajo, pueden ser de gran utilidad. También pueden resultar efectivos a la hora de eliminar sustancias inhibitoras. No obstante, al constar de una mayor cantidad de pasos, las posibilidades de pérdida de muestra se ven aumentadas. De hecho, uno de los factores importantes a tener en cuenta cuando se desarrolla un protocolo de extracción y detección de microorganismos consiste en evitar la realización de numerosos pasos que alarguen el proceso y disminuyan la efectividad.

5.3. Detección mediante RT-qPCR

La PCR cuantitativa permite la detección y cuantificación de ácidos nucleicos de forma rápida y mostrando una sensibilidad y especificidad altas, por lo que, desde que en 1993 Russ Higuchi y sus colaboradores describieran la técnica, su utilización se ha hecho extensiva en campos como el diagnóstico molecular, las ciencias biológicas, la agricultura y la medicina (Huggett et al., 2015; Bustin et al., 2009). Aunque se trata de una técnica con un alto potencial, la falta de estandarización a la hora de aplicar el método y de interpretar los resultados dificulta la comparación de los datos obtenidos en distintos trabajos y disminuye la fiabilidad. Con el fin de asegurar la correcta interpretación, repetitividad, precisión y relevancia de los experimentos realizados utilizando PCR cuantitativa, Bustin et al. (2009) y Huggett et al. (2013) publicaron las “*Guías MIQE*” sobre los requisitos mínimos a tener en cuenta cuando se presentan resultados obtenidos mediante qPCR y qPCR digital, respectivamente.

Una vez diseñado un ensayo de qPCR, cada laboratorio donde se vaya a utilizar debe llevar a cabo la validación del mismo en términos de especificidad y eficiencia, con el fin de verificar que los estándares de calidad se cumplan y que el ensayo pueda ser utilizado rutinariamente de modo fiable. Esta validación inicial debe realizarse siempre, incluso si el ensayo ya ha sido publicado en la bibliografía o si se trata de una técnica comercial (IDT, 2012).

1. Validación de la especificidad: comprobación de que la técnica detecta y amplifica exclusivamente la secuencia de interés. Para ello, se analiza el tamaño del producto de la PCR o, de forma más precisa, se realiza su secuenciación.

2. Validación de la eficiencia: se valora el comportamiento de la curva de estándares que se utilizará para la cuantificación, se calcula el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), así como el rango dinámico lineal (mínimo de 4 órdenes de magnitud) y, finalmente, la eficiencia de la técnica (habitualmente se considera que debe estar entre el 90% y el 110%).

La cuantificación mediante qPCR requiere de la utilización de controles de calidad que indiquen que los resultados obtenidos tienen la fiabilidad suficiente. Cada experimento debe considerarse como un hecho independiente sobre el cual tiene efecto una gran cantidad de factores que pueden introducir errores, desde el pipeteo hasta el comportamiento del termociclador, pasando por el estado de los reactivos (Bustin et al., 2009; IDT, 2012). De esta forma, la inclusión de una curva de calibración en cada experimento realizado permite valorar la eficiencia y controlar que se mantenga dentro de los límites aceptables. Asimismo, la inclusión de controles positivos y negativos es útil a la hora de detectar posibles contaminaciones y otro tipo de inconvenientes (Bustin et al., 2009; IDT, 2012; Thermo Scientific, 2011). Es importante, por otro lado, realizar el análisis de varias réplicas de cada muestra, con el objetivo de aumentar la fiabilidad del resultado final (Bustin et al., 2009; IDT, 2012).

Por último, la inhibición está reconocida como uno de los factores que más negativamente afecta al desarrollo de la técnica, ya que puede reducir parcial o totalmente la sensibilidad de la misma, llegando a producir falsos resultados negativos (Bustin et al., 2009; Miura et al., 2011; Schrader et al., 2012). Las sustancias inhibidoras de la PCR cuantitativa son numerosas, de estructura muy variada y con distintos mecanismos de acción que pueden afectar a casi cualquiera de las fases del análisis (Fig. 14) (Schrader et al., 2012). A menudo, inhibidores y partículas víricas comparten ciertas características físicas, como son el peso molecular y el punto isoeléctrico, hecho que dificulta la discriminación entre ambos durante el procesamiento de la muestra y, por lo tanto, la efectiva eliminación de las sustancias inhibidoras sin producir la pérdida de las partículas víricas (Miura et al., 2011). Su procedencia también es muy variada y cualquier tipo de muestra ambiental es susceptible de contener inhibidores, por lo que es imprescindible realizar algún tipo de vigilancia de la inhibición durante la realización de una qPCR (Bustin et al., 2009; Miura et al., 2011), como la adición de un control (interno o externo) o la comprobación mediante la dilución de los ácidos nucleicos (Schrader et al., 2012). Los lodos de depuradora y los sedimentos fluviales, en concreto, son matrices complejas en las que es frecuente la presencia de ácidos húmicos y fúlvicos, sales biliares, lípidos, polisacáridos complejos, urato, iones metálicos y polifenoles, entre otros (Schrader et al., 2012). Aunque se dispone de una gran variedad de estrategias dirigidas a eliminar o reducir la acción de los inhibidores, se requiere de más investigación en este sentido para conseguir superar este inconveniente.

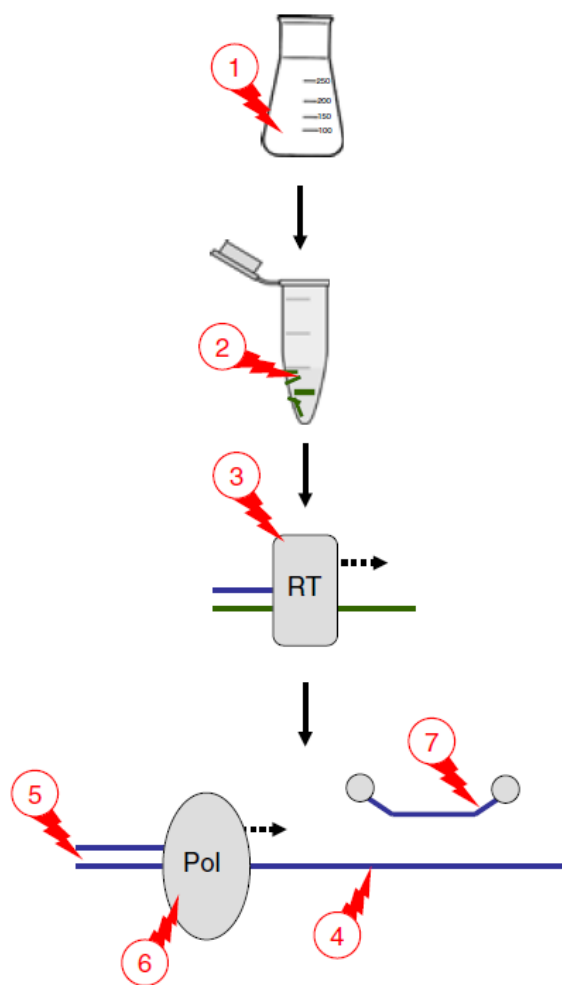


Figura 14. Modos de acción de los inhibidores de la RT-qPCR. Los ácidos nucleicos pueden unirse a las paredes del recipiente (1). Los inhibidores pueden reaccionar con los ácidos nucleicos durante el procesamiento de la muestra y la extracción (2). Otras sustancias inhiben la retrotranscripción (3) y degradan o modifican el ADN molde (4). Asimismo, la hibridación de los primers con el ADN molde puede verse obstaculizada (5) y la ADN polimerasa, degradada, inhibida o alterada (6). Finalmente, algunas sustancias interfieren en la unión de la sonda o alteran los fluoróforos (7). Fuente: Schrader et al. (2012).

Partiendo de este contexto, en el caso concreto de la detección de enterovirus mediante RT-qPCR, cabe destacar varias peculiaridades:

- Al tratarse de virus de ARN, la qPCR requiere de un paso previo de retrotranscripción (RT), por lo que la fiabilidad del resultado depende tanto de la eficiencia de la polimerasa, como de la retrotranscriptasa.
- Se requiere especial cuidado a la hora de manipular y conservar las muestras, con el fin de evitar la degradación producida por contaminaciones con ARNasas.
- La mayoría de RT-qPCR diseñadas para detectar enterovirus tienen como diana la región 5'NCR del genoma. Esta región posee una estructura secundaria compleja que dificulta el acceso de las enzimas de la reacción (Monpoeho et al., 2000; Witwer et al., 2001). La adición de la proteína 32 del fago T4 (T4 gp 32) a la mezcla de reacción de la qPCR facilita dicho acceso y mejora la amplificación y la sensibilidad (Deboosere et al., 2012; Monpoeho et al., 2000).
- La región 5'NCR se trata de una zona del genoma muy conservada dentro del género de *Enterovirus*, aunque existen diferencias inter-específicas. Este hecho dificulta el diseño de primers y sondas que detecten específicamente enterovirus que infecten a humanos o a animales.

5.4. Artículo 6: Extracción y detección de enterovirus mediante RT-qPCR en muestras ambientales sólidas: método flexible para diferentes tipos de muestras y concentraciones víricas

5.4.1. Resumen

Aunque tradicionalmente los enterovirus han sido detectados mediante técnicas de cultivo celular, el desarrollo de la qPCR ha dado lugar a métodos de detección más rápidos y específicos, cuya utilización no deja de aumentar. Asimismo, algunas normativas ya los incluyen. Sin embargo, los métodos de extracción para muestras ambientales sólidas disponibles en la actualidad a menudo dan lugar a bajos porcentajes de recuperación y muestran dificultades a la hora de retirar sustancias inhibidoras. Por ello, la búsqueda y mejora de metodologías de extracción adecuadas para la posterior detección mediante RT-qPCR continúa bajo desarrollo.

El objetivo de este artículo fue la elaboración de un método sencillo y versátil de extracción de enterovirus en muestras ambientales sólidas para su detección posterior mediante RT-qPCR. Para ello, se compararon cuatro métodos (tres indirectos y uno directo) y se valoró su capacidad de recuperación de partículas víricas y su efectividad para retirar inhibidores de la RT-qPCR, a partir de distintas muestras de lodos de depuradora y de sedimentos fluviales. Los métodos indirectos (M_1 , M_2 y M_3) se basaron en la elución con tampón glicina a pH básico y la posterior concentración mediante ultracentrifugación. El método directo (M_4) consistió en la utilización de un kit comercial. El mejor de los cuatro métodos fue comparado con la metodología descrita por la EPA para la recuperación de virus en lodos de depuradora. Se compararon también dos kits comerciales de extracción de ARN. Por otro lado, se valoró la especificidad de detección de la RT-qPCR, mediante el análisis de muestras de procedencia humana y animal.

Utilizando muestras artificialmente contaminadas con enterovirus, el M_4 resultó ser menos efectivo retirando inhibidores que los otros tres, por lo que fue descartado. Se eligió el kit de extracción de ARN que recuperó mayores cantidades de ácido nucleico sin necesidad de emplear β -mercaptoetanol. En la comparación con muestras ambientales naturales el M_3 mostró mayor porcentaje de negativos y menor porcentaje de positivos, por lo que se continuó la valoración de métodos con M_1 y M_2 . Se evaluaron distintas alternativas de ultracentrifugación, incluyendo la omisión de dicho paso cuando las concentraciones de virus fueron suficientemente altas. Se obtuvieron mejores resultados en muestras de lodos de depuradora al aplicar el M_1 que utilizando el método descrito por la EPA.

Con respecto a la especificidad de la RT-qPCR, fue capaz de detectar enterovirus en las muestras de procedencia humana y porcina, pero no en las muestras que procedían de ganado bovino y de pollo.

Se pudo concluir, por lo tanto, lo siguiente:

- Los métodos indirectos ensayados fueron más efectivos retirando inhibidores de la RT-qPCR que el método directo.
- La concentración mediante ultracentrifugación doble incluyendo un paso intermedio de limpieza con tampón glicina, aunque es un proceso más largo, da lugar a mayores recuperaciones de virus que la ultracentrifugación simple.
- Los pasos de ultracentrifugación producen pérdidas de partículas víricas, por lo que deben evitarse cuando las concentraciones de virus en la muestra son suficientemente altas. En cambio, cuando las concentraciones son bajas demostraron ser útiles aumentando la capacidad de recuperación de partículas víricas.
- Los resultados obtenidos permitieron desarrollar un método flexible de extracción y detección de enterovirus cuyo protocolo se adapta, dependiendo del tipo de muestra a analizar y de la concentración de virus esperada, para optimizar la recuperación de partículas víricas y la retirada de sustancias inhibitoras de la RT-qPCR.

5.4.2. Informe sobre el factor de impacto

El artículo *“Extraction and RT-qPCR detection of enteroviruses from solid environmental samples: flexible method for different sample types and viral concentrations”* se encuentra actualmente en la fase final de preparación y será próximamente enviado para su publicación en la revista *“Journal of Virological Methods”*. En el año 2015, según el *“InCites Journal Citation Report”*, la revista se encontraba dentro del tercer cuartil (Q3) del área temática de *“Biotechnology and Applied Microbiology”* y del cuarto cuartil (Q4) del área temática de *“Virology”*, con un factor de impacto de 1,508.

5.4.3. Informe de participación

La doctoranda Julia Martín Díaz ha realizado todos los análisis experimentales correspondientes al artículo *“Extraction and RT-qPCR detection of enteroviruses from solid environmental samples: flexible method for different sample types and viral concentrations”*, así como la recogida y transporte de muestras. Asimismo, ha participado activamente en el procesamiento, organización y discusión de los resultados obtenidos. Por último, la doctoranda se ha encargado de la redacción del artículo y de la preparación de las tablas y las figuras.

Ninguno de los coautores ha utilizado los datos expuestos en el artículo para la elaboración de su tesis doctoral.

Barcelona, junio de 2017

Dr. Francisco Lucena Gutiérrez

Extraction and RT-qPCR detection of enteroviruses from solid environmental samples: flexible method for different sample types and viral concentrations

Julia Martín-Díaz^{a,b,*} and Francisco Lucena^{a,b}

^aDepartment of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

^bThe Water Research Institute, University of Barcelona, C/ Montalegre 6, 08001 Barcelona, Spain

*Corresponding author: Tel.: +34 934021484; fax: +34 934110592. Email address: juliamedi@hotmail.com (J. Martín-Díaz).

ABSTRACT

Enteric viruses are among the pathogens of most concern in environments contaminated by fecal material. They are highly prevalent in solid environmental samples such as sediments, soils and sewage sludge. Quantitative RT-PCR methods (RT-qPCR) are becoming increasingly desirable for their detection; however, these methods are not free from limitations. Effective methodologies that allow the extraction of high quality RNA ready for molecular quantification continue to be evaluated. In the present study, four different methods for viral extraction from solid environmental samples were compared in terms of viral recovery and inhibitor removal. Three indirect methods based on glycine elution and concentration by ultracentrifugation, and one commercial direct method were tested. Two commercial RNA extraction kits were also evaluated. The results obtained allowed the development of a flexible indirect method with three versions that are suitable for different samples and viral concentrations.

KEYWORDS

Enteric viruses, Sediment, Sewage sludge, Soil, Quantitative PCR, Viral elution

HIGHLIGHTS

- Comparison of four methods for enterovirus extraction from solid environmental sample
- Two RNA extraction methods and one RT-qPCR were also evaluated
- Viral recovery and inhibitor removal capacity were tested
- Indirect methods (glycine elution + ultracentrifugation) performed better than direct
- A flexible method with three versions depending on viral concentration was developed

1. INTRODUCTION

Enteric pathogens are released into the environment through fecal material, and once there, they can pose a risk to human and animal health. Among the pathogens usually found in feces, enteric viruses are of major importance in developed countries due to their low minimal infective doses, together with both their prevalence and persistence. *Adenovirus*, *Astrovirus*, *Norovirus*, *Enterovirus*, *Hepatovirus* and *Rotavirus* are some of the principal genera of concern in environments that have been contaminated with fecal material. Viral infections produced by members of the genus *Enterovirus* (family *Picornaviridae*, order *Picornavirales*) may be asymptomatic or they may result in mild febrile illness or respiratory disorders. However, this genus is also the cause of important diseases and symptoms such as meningitis and encephalitis in children; pneumonia; hand, foot and mouth disease; paralysis; hemorrhagic conjunctivitis; and myocarditis (US Environmental Protection Agency, 2012; World Health Organization, 2011). Enteroviruses replicate within the gastrointestinal tract of humans and other animals and they are excreted in large quantities by infected patients; they can then be spread via the fecal-oral route. The genus meets the requirements for use as a reference pathogen in water-related regulations (World Health Organization, 2011).

Sewage sludge is an inherent consequence of wastewater treatment and large quantities of it are produced every day in treatment plants worldwide. One of the preferred options for sewage sludge disposal is applying it to land as organic fertilizer since this reuses this residual matter in an environmentally friendly way. Nonetheless, sewage sludge contains large amounts of fecal pathogens, including bacteria, viruses and parasites (Lepeuple et al., 2004; Sidhu and Toze, 2009) and therefore adequate hygienization treatments are required to prevent infectious diseases spreading into the environment. Some regulations require the control of enteroviruses as reference pathogens before land application (Milieu Ltd. et al., 2010; US Environmental Protection Agency, 2003). River, coastal and estuarine sediments are also known to be important reservoirs of fecal pathogens due to the great variety of contamination sources (both diffuse and point sources) feeding into them, their capacity to retain microorganisms (De Brauwere et al., 2014; Hassard et al., 2016) and the risk of pathogen mobilization into the water column due to sediment resuspension (Crabill et al., 1999; Craig et al., 2004; García-Aljaro et al., 2017; Jamieson et al., 2005; Nichols et al., 2009). Particularly, enteroviruses have been found in different sediment types (Hassard et al., 2016; LaBelle et al., 1980; Lewis et al., 1985). In addition, soils may also be contaminated with fecal pathogens due to a variety of causes (Bradford et al., 2013; Santamaría and Toranzos, 2003).

Traditionally, enteroviruses have been detected using methods based on cell cultures, whereby samples are placed in contact with cultures of the Buffalo Green Monkey kidney (BGM) cell line (US Environmental Protection Agency, 2003). Although the method performs well, a number of enteroviruses do not replicate in BGM cells and the cell line not only detects this genus, but also some members of the family *Reoviridae*. In addition, confirmation of results often requires more than one or two weeks and cells are subjected to cytotoxicity effects that complicate the process. All these issues, together with the small

numbers usually detected in certain types of environmental samples, have increased the desirability of molecular detection methods and some water regulations already include them (Hassard et al., 2016; Martín-Díaz et al., 2016; Sidhu and Toze, 2009; US Environmental Protection Agency, 2012; Wyn-Jones and Sellwood, 2001). The molecular detection of enteric viruses in solid or semisolid matrixes follows very similar protocols in samples as different as food, sediments, sewage sludge and clinical samples (Knight et al., 2013; Miura et al., 2011; Monpoeho et al., 2001; Stals et al., 2012). Direct methods consist in the extraction of nucleic acids directly from the sample. The general scheme for indirect methods consists in the elution of viral particles (preceded or not by acid adsorption), followed by a concentration step and then finally the extraction of nucleic acids (Miura et al., 2011; Stals et al., 2012). During acid adsorption, an acid buffer is used to promote the association between viral and solid particles; after this, the sample is centrifuged and the supernatant is discarded. In the elution step, viral particles are detached from solids by the combination of an alkaline or neutral buffer and mechanical forces. Magnetic stirring, shaking, vortexing and homogenization with stomacher are frequently used methods, and the selection of one of them often depends on the facilities available or the sample characteristics (Goyal and Aboubakr, 2016; Guzmán et al., 2007). In addition, the buffer is frequently supplemented with proteins or amino acids such as glycine, beef extract or soya protein that exchange for viruses adsorbed to the solid matrix, thereby favoring viral elution. However, it is probable that beef extract interferes with the subsequent molecular detection (Stals et al., 2012). The proportion of sample and elution buffer is another factor to consider: larger quantities of elution buffer are expected to be more effective than smaller ones, but they will produce higher dilution of viral particles. For the concentration step, the most commonly used methods are polyethylene-glycol (PEG) precipitation, organic flocculation, ultracentrifugation and ultrafiltration. The main difficulties affecting extraction and molecular detection of enteric viruses in solid samples are: (i) low or very low recovery rates, which have been described as usually less than 10% (Hassard et al., 2016; Miura et al., 2011); (ii) the high number of steps in the protocol, which leads to higher risk of viral losses; (iii) the fact that they do not distinguish between infectious and non-infectious viral particles; (iv) the great variety of inhibitory substances present in environmental samples (Schrader et al., 2012); and (v) the lack of standardization in molecular methods which hinders accuracy, repeatability and interpretation of results (Bustin et al., 2009).

The present study aimed at developing a simple and versatile method for the extraction and quantitative RT-PCR (RT-qPCR) detection of enteroviruses in solid environmental samples. To this end, three indirect methods and one direct method for viral recovery from sewage sludge and fluvial sediments were examined and compared. The indirect methods were based on glycine elution under high pH conditions followed by viral concentration using ultracentrifugation. For the direct method, a commercial kit was used. The best option was chosen and compared with the indirect method recommended by the US Environmental Protection Agency (EPA) for virus recovery from sewage sludge (US Environmental Protection Agency, 2003). Nucleic acid extraction was also evaluated by examining two commercial kits. Taking all the information obtained into account, useful recommendations

were devised for choosing the best protocol depending on sample type and the level of viral contamination.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Solid environmental samples

Sludge samples were collected from two municipal wastewater treatment plants in the Barcelona metropolitan area (Spain). Plant 1 treats about 420,000 m³ wastewater/day and serves a population of 2,275,000 equivalent inhabitants. In this plant, a mixture of 50% primary and 50% secondary (waste activated) sludge is subjected to mesophilic anaerobic digestion. Plant 2 has a treatment capacity of 64,000 m³ wastewater/day and serves a population of 385,000 equivalent inhabitants. In this plant, a mixture of 60% primary and 40% secondary sludge is anaerobically digested under mesophilic conditions. Different sludge samples were taken from the entire treatment process, including: primary and secondary sludge, untreated mixed sludge, digested mixed sludge and digested mixed sludge subjected to dewatering. Raw wastewater samples were also taken. Fluvial sediment samples were collected from the final stretch of the Llobregat River (NE Spain), downstream from a drinking water treatment plant. This river runs through a heavily urbanized area and is subjected to the influence of effluent from several sewage treatment plants. Sediments were taken at different distances from the water, in the four seasons of a year, and under dry and wet weather conditions. For the evaluation of the RT-qPCR specificity, animal fecal samples were collected from different slaughterhouses that process cattle, pigs and poultry.

2.2. Viral strain

The viral strain used for sample inoculation and for positive control in RT-qPCR experiments was human coxsackievirus B3 (genus *Enterovirus*, family *Picornaviridae*, order *Picornavirales*).

2.3. Sediment sample inoculation

To obtain a homogeneous distribution of the viral inoculum in the sediment samples, the method used was as follows. First, 500 ml of distilled water was inoculated with human coxsackievirus B3 at a high titer and this water was placed in an Erlenmeyer flask. Next, 100 g of sediment was added and the flask was agitated with an orbital shaker at 250 rpm for 2 h. After 24 h of decantation at 4°C to allow viral attachment to sediment particles, the water was removed and the sediment was collected for analysis.

2.4. Viral extraction methods

Three indirect methods (M₁, M₂ and M₃) and one direct method (M₄) were assayed. For the indirect methods, a glycine buffer solution was prepared by diluting glycine (Sigma-Aldrich, MO, USA) at 0.25 M in double-distilled sterile water. The pH of the buffer was adjusted to 9.0 or 9.5 by adding NaOH.

M₁. A) Viral elution: 5 g of sample was diluted in a 1/10 ratio with 45 ml of glycine buffer solution, pH 9.5. Viruses attached to solid particles were subsequently eluted by agitation with a wrist-action shaker for 20 minutes at 900 osc/min. The sample was clarified with centrifugation at 1,800 ×g for 15 min. The pellet was discarded and the pH of the supernatant was adjusted to 7.0 by slowly adding 1M HCl. The supernatant was filtered using 0.22 µm pore-size polyethersulfone non-protein-binding membrane filters (Millipore, MA, USA) and this constituted the viral extract. B) Viral particle concentration: viruses were concentrated from the viral extract using a Beckman Coulter Optima L-90K ultracentrifuge and a 70.1 Ti rotor (Beckman Coulter, CA, USA). For this, 12.5 ml of viral extract was centrifuged at 100,000 ×g for 1 h at 4°C. The resulting pellet was resuspended in 3.5 ml of glycine buffer, pH 9.5 and was maintained on ice for 30 min, with periodical manual shaking. The pH was then neutralized by the addition of 3.5 ml of doubly concentrated phosphate buffer saline (PBS 2×), pH 7.2. The sample was then centrifuged at 1,800 ×g. The supernatant was subjected to a new ultracentrifugation at 100,000 ×g for 1 h at 4°C. Finally, the pellet containing viral particles was resuspended in phosphate buffer saline (PBS 1×), pH 7.2 to a final volume of 140 µl, constituting the viral concentrate.

M₂. A) Viral elution: identical to M₁. B) Viral particle concentration: modification of M₁ in which all the supernatant obtained after the 1,800 ×g clarification (approximately 45 ml of viral extract) was subjected to the subsequent ultracentrifugation steps.

M₃. A) Viral elution: 5 g of sample was diluted in a 1/5 ratio in 20 ml of glycine buffer solution, pH 9.0. Viruses attached to solid particles were subsequently eluted by agitation with a wrist-action shaker for 15 minutes at 900 osc/min. The homogenate was then maintained on ice for 30 min, with periodical manual shaking. The pH was neutralized by the addition of 20 ml PBS 2×, pH 7.2. The sample was then clarified by centrifugation at 9,100 ×g for 15 min at 4°C. The resulting supernatant constituted the viral extract. B) Viral particle concentration: the entire viral extract (approximately 45 ml) was subjected to concentration by ultracentrifugation at 100,000 ×g for 1 h at 4°C. Finally, the pellet containing viral particles was resuspended in PBS 1×, pH 7.2 to a final volume of 140 µl, constituting the viral concentrate.

M₄. The commercial kit used was: RNA PowerSoil Total RNA isolation kit (MoBio Labs., CA, USA). The manufacturer's instructions were followed. Briefly, cell and viral particle lysis, and nucleic acid extraction were performed on 5 g of sample using SDS, phenol:chloroform:isoamyl alcohol, a bead solution and shaking forces. After centrifugation, the upper layer containing the nucleic acids was separated. Proteins, cellular debris and inhibitory substances were removed. The nucleic acids were then concentrated by isopropanol precipitation and the RNA was purified using RNA capture columns. The RNA was finally resuspended in 60 µl of RNase-free water.

Method EPA. Protocol recommended by the US EPA (US Environmental Protection Agency, 2003) for the extraction of viruses from sewage sludge. This indirect method was developed to generate viral extracts ready for total culturable assay using cell culture. 100 g of sewage

sludge was analyzed. Briefly, acid adsorption of viral particles was accomplished with 0.0005 M AlCl_3 at pH 3.5. After centrifugation at 2,500 $\times g$ for 15 min, the supernatant was discarded. Viral elution was performed using 10% beef extract at pH 7.0. Finally, organic flocculation with 3% beef extract was used to concentrate the viral particles and 16 ml of viral concentrate was obtained.

Wastewater samples were analyzed either directly or after the viral particle concentration described in M_1 .

2.5. RNA extraction methods

Two commercial kits for RNA extraction from viral concentrates were compared: QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) (K_1) and Power Viral Environmental RNA/DNA Isolation kit (MoBio, CA, USA) (K_2). The manufacturer's instructions were followed. Briefly, K_1 used guanidinium thiocyanate to produce viral lysis. After the addition of the RNA carrier, the RNA was entrapped in a silica membrane using spin columns. Two washing steps were then applied and finally the RNA was eluted from the membrane with 60 μl of RNase-free water containing 0.04% sodium azide. K_2 produced viral lysis using β -mercaptoethanol and a MoBio proprietary lysis buffer. After this, an inhibitor removal solution was added and the RNA was entrapped in a membrane using spin columns. After two washing steps, the RNA was eluted from the membrane with 100 μl of RNase-free water. The RNA extracts from both kits were stored at -80°C until analysis.

2.6. RT-qPCR analysis

A previously described (Monpoeho et al., 2000) and adapted (Martín-Díaz et al., 2016) RT-qPCR protocol was applied for enterovirus quantification. As stated there, the LOD and LOQ of this protocol coincided, with a result of 5 GC/reaction, and the linear dynamic range covered was from 5 to $5 \cdot 10^7$ GC/reaction. The samples were analyzed exactly as described in Martín-Díaz et al. (2016), and all quality and inhibition controls described there were followed. Polyvinylpyrrolidone (PVP) and T4 gene 32 protein (gp32) were added to the reaction mixture to remove inhibitors. In addition, serial tenfold dilutions of the RNA extracts were made for each sample until the inhibition was below 25%. If inhibition continued after diluting the sample below the detection limit, the inhibition was declared unsolved.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Comparison of methods

Artificially contaminated sediment samples were tested with methods 1 to 4 in order to find the best option (Table 1). The four methods showed similar performance in terms of viral recovery. However, M_4 had less capacity to remove inhibiting substances; hence, it was necessary to dilute the RNA extract until dilution -3. In natural samples (not inoculated with high concentrations of viral particles), such a dilution level would produce the loss of the RNA molecules, thereby generating a negative result for the RT-qPCR. Due to this, the direct

M₄ method was eliminated from further consideration during this study. A similar in-house-method was analyzed by Miura et al. (2011), resulting in a recovery rate of 0.09%.

Table 1. Comparison of the four viral extraction methods (M₁, M₂, M₃ and M₄). Three independent experiments were performed (A, B and C). Results are in GC/g. For M₁, M₂ and M₃, RNA was extracted with the commercial kit K₁.

| | | | | | |
|-------------------|---|---|--|--|--|
| Recovery | A | $M_4 (4.20 \cdot 10^7) > M_1 (1.48 \cdot 10^7) \approx M_2 (1.14 \cdot 10^7) \approx M_3 (1.06 \cdot 10^7)$ | | | |
| | B | $M_4 (1.47 \cdot 10^7) \approx M_1 (1.39 \cdot 10^7) > M_3 (6.13 \cdot 10^6) > M_2 (3.91 \cdot 10^6)$ | | | |
| | C | $M_1 (6.61 \cdot 10^6) \approx M_3 (6.06 \cdot 10^6) > M_2 (4.95 \cdot 10^6) > M_4 (3.18 \cdot 10^6)$ | | | |
| Inhibitor removal | A | $M_1 (-2) = M_2 (-2) > M_3 (-3) = M_4 (-3)$ | | | |
| | B | $M_1 (-2) = M_2 (-2) = M_3 (-2) > M_4 (-3)$ | | | |
| | C | $M_1 (-2) = M_2 (-2) = M_3 (-2) > M_4 (-3)$ | | | |

Two commercial RNA extraction kits (K₁ and K₂) were compared. For this, 5 artificially contaminated sediment samples and 6 natural wastewater samples were analyzed. RNA recovery using K₁ was 0.63 log₁₀ higher, on average, than using K₂. Inhibitor removal was similar for both kits, although K₂ performed better with two of the samples. Considering these results and the fact that K₂ required the use of β-mercaptoethanol for the lysis step, K₁ was selected.

Table 2. Comparison of the two RNA extraction methods (K₁ and K₂). Results are in GC/g or GC/100 ml. Samples 1 to 5 were sediments artificially contaminated with human coxsackievirus B3. Samples 6 to 11 were natural wastewater, without viral inoculation. ND = not detected.

| | RNA recovery | Inhibitor removal |
|-----------|---|-----------------------|
| Sample 1 | $K_1 (3.84 \cdot 10^7) > K_2 (1.80 \cdot 10^7)$ | $K_1 (-1) = K_2 (-1)$ |
| Sample 2 | $K_1 (1.54 \cdot 10^7) > K_2 (5.88 \cdot 10^6)$ | $K_1 (-1) = K_2 (-1)$ |
| Sample 3 | $K_1 (4.81 \cdot 10^7) > K_2 (1.98 \cdot 10^7)$ | $K_1 (-1) = K_2 (-1)$ |
| Sample 4 | $K_1 (1.36 \cdot 10^8) > K_2 (6.67 \cdot 10^7)$ | $K_2 (-1) > K_1 (-2)$ |
| Sample 5 | $K_1 (6.36 \cdot 10^7) > K_2 (4.41 \cdot 10^7)$ | $K_2 (-1) > K_1 (-2)$ |
| Sample 6 | $K_1 (1.82 \cdot 10^4) > K_2 (3.27 \cdot 10^3)$ | Unsolved |
| Sample 7 | $K_1 (1.38 \cdot 10^4) > K_2 (ND)$ | Unsolved |
| Sample 8 | $K_1 (1.20 \cdot 10^4) > K_2 (1.90 \cdot 10^3)$ | Unsolved |
| Sample 9 | $K_1 (1.87 \cdot 10^4) > K_2 (9.43 \cdot 10^2)$ | Unsolved |
| Sample 10 | $K_1 (1.17 \cdot 10^4) > K_2 (1.96 \cdot 10^3)$ | Unsolved |
| Sample 11 | $K_1 (1.84 \cdot 10^4) > K_2 (3.07 \cdot 10^3)$ | Unsolved |

Once the RNA extraction kit was selected, further comparisons between the three indirect viral extraction methods were made. It is known that microorganisms in environmental samples establish a complex interrelationship with solid particles (De Brauwere et al., 2014; Hassard et al., 2016). Therefore, although the study of samples inoculated with laboratory strains may be useful to evaluate extraction and detection methods, the use of naturally contaminated samples is a more realistic approach. Table 3 shows the results for 41 natural fluvial sediment samples that were analyzed using M₁, M₂ and M₃. Due to the heterogeneity of the samples and sampling campaigns, different contamination levels were observed in the sediments, ranging from negative results to 3.98 log₁₀ (GC/g). M₃ produced the lowest percentage of positive samples and the highest percentage of negative samples. In contrast, M₂ showed the best performance, with 41% positive samples and the lowest percentage of negative samples. Although the three methods concentrated viral particles using ultracentrifugation, M₁ and M₂ were probably more effective at recovering viruses due to a number of factors. Firstly, these two methods included a filtration step with 0.22 µm pore-size filters in order to remove cellular debris and large particles present in the sample that could interfere in the ultracentrifugation process (Stals et al., 2012) or produce membrane clogging during the subsequent RNA extraction with K₁. In fact, the viral concentrates obtained with M₃ were more turbid and contained larger particles than those obtained with the other two methods. Secondly, the clarification step at 9,100 ×g in M₃ was probably very intense and could have resulted in viral losses due to the pelleting of those viruses attached to solid particles. Finally, the sample to glycine buffer proportion (1/5) used during the elution step of M₃ may be less effective than that of M₁ and M₂ (1/10). Taking these results into account, M₃ was eliminated for further consideration in this study.

Table 3. Comparison between M₁, M₂ and M₃ for viral extraction in natural sediment samples (n=41). Results in log₁₀ (GC/g).

| | | M ₁ | M ₂ | M ₃ |
|------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| Negative samples | | 76% | 59% | 87% |
| | Percentage | 24% | 41% | 13% |
| Positive samples | Geometric mean | 2.26 | 2.10 | 1.82 |
| | Standard deviation | 0.69 | 0.77 | 0.44 |

The double ultracentrifugation protocol performed in M₁ and M₂ appeared to be effective at concentrating viral particles from solid environmental samples. However, the inclusion of an excessive number of steps may be counter-productive as it could result in viral losses. In this context, the performance of the double ultracentrifugation protocol was compared with a single ultracentrifugation. To this end, twelve sewage sludge samples were analyzed using the entire M₁ and a modification that included only the first ultracentrifugation. All the samples gave results below the detection limit after being processed with the modified protocol, while the double ultracentrifugation protocol gave results between $1.22 \cdot 10^2$ GC/g and $2.64 \cdot 10^3$

GC/g. Therefore, it seems that the additional elution step performed with glycine buffer between the first and the second ultracentrifugation enhanced virus detachment from solid particles and/or inactivated inhibitory substances.

Ultracentrifugation is a very consistent method for concentrating viruses (Stals et al., 2012), however, at the same time it may lead to viral losses. In order to determine the extent of these losses, 16 sewage sludge samples were analyzed using the entire M_1 and a modification consisting in the direct analysis of viral extracts. Also, 6 wastewater samples were analyzed following the ultracentrifugation protocol from M_1 or by direct analysis of wastewater samples. The results, ordered by concentrations obtained with direct analysis, are shown in Table 4. For those samples with high viral titers, the ultracentrifugation produced important viral losses, from less than 1 \log_{10} to more than 2.5 \log_{10} . However, as the virus concentration reduced, the ultracentrifugation became increasingly important. For samples with viral titers near the detection limit of the direct assay ($4.29 \cdot 10^4$ GC/100 ml for wastewater and $4.29 \cdot 10^3$ GC/g for sewage sludge), the results were similar for both methods. Finally, under the detection limit of the direct assay, the ultracentrifugation protocol was still effective at recovering viruses and the concentration effect compensated the viral losses.

Table 4. Sludge samples (SL): comparison between M_1 elution followed by direct analysis (Direct) and M_1 including ultracentrifugation (UC) (results are in GC/g). Wastewater samples (WW): comparison between direct analysis (Direct) and ultracentrifugation (UC) (results are in GC/100 ml). ND = not detected.

| Sample | Direct | UC | Sample | Direct | UC |
|--------|-------------------|-------------------|--------|-------------------|-------------------|
| SL1 | $9.96 \cdot 10^4$ | $3.37 \cdot 10^3$ | SL12 | ND | $1.37 \cdot 10^3$ |
| SL2 | $6.07 \cdot 10^4$ | $9.50 \cdot 10^1$ | SL13 | ND | $1.17 \cdot 10^2$ |
| SL3 | $4.52 \cdot 10^4$ | ND | SL14 | ND | $1.02 \cdot 10^2$ |
| SL4 | $4.42 \cdot 10^4$ | $1.34 \cdot 10^3$ | SL15 | ND | $1.10 \cdot 10^3$ |
| SL5 | $4.40 \cdot 10^4$ | $1.15 \cdot 10^3$ | SL16 | ND | $1.10 \cdot 10^2$ |
| SL6 | $4.02 \cdot 10^4$ | $3.54 \cdot 10^3$ | WW1 | $9.57 \cdot 10^5$ | $6.40 \cdot 10^3$ |
| SL7 | $1.07 \cdot 10^4$ | $9.30 \cdot 10^2$ | WW2 | $5.35 \cdot 10^5$ | ND |
| SL8 | $8.31 \cdot 10^3$ | $1.84 \cdot 10^3$ | WW3 | $2.81 \cdot 10^5$ | $1.70 \cdot 10^4$ |
| SL9 | $7.83 \cdot 10^3$ | $1.11 \cdot 10^3$ | WW4 | $1.22 \cdot 10^5$ | $3.67 \cdot 10^3$ |
| SL10 | $4.76 \cdot 10^3$ | ND | WW5 | $9.02 \cdot 10^4$ | $3.23 \cdot 10^3$ |
| SL11 | ND | $2.06 \cdot 10^3$ | WW6 | ND | $2.22 \cdot 10^4$ |

The standardized method recommended by the EPA for the extraction of viruses from sewage sludge (US Environmental Protection Agency, 2003) was compared with M_1 in terms of viral recovery. For this, 6 sewage sludge samples previously analyzed with M_1 were also analyzed

following the EPA method. This protocol already includes virus concentration by organic flocculation with 3% beef extract. However, the effect produced by the additional application of ultracentrifugation was also tested. For this, 12.5 ml of the viral concentrate obtained were subjected to the ultracentrifugation steps from M₁. The results are shown in Table 5. M₁ produced better viral recoveries than the EPA method. The latter was developed for viral detection using cell culture and it is likely that its use for quantitative PCR is less effective due to the suspected inhibitory effects of beef extract (Miura et al., 2011; Stals et al., 2012).

Table 5. Comparison between M₁ and Method EPA for sewage sludge samples. UC = ultracentrifugation; Direct = direct analysis. Results in GC/g. ND = not detected.

| | UC | | Direct | |
|------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | M ₁ | Method EPA | M ₁ | Method EPA |
| SL11 | $9.30 \cdot 10^2$ | $1.83 \cdot 10^1$ | $1.07 \cdot 10^4$ | ND |
| SL12 | $3.54 \cdot 10^3$ | $2.43 \cdot 10^1$ | $4.02 \cdot 10^4$ | $1.67 \cdot 10^4$ |
| SL13 | $1.84 \cdot 10^3$ | $1.41 \cdot 10^1$ | $8.31 \cdot 10^3$ | ND |
| SL14 | $3.37 \cdot 10^3$ | $4.17 \cdot 10^1$ | $9.96 \cdot 10^4$ | $1.02 \cdot 10^1$ |
| SL15 | $1.34 \cdot 10^3$ | $3.26 \cdot 10^1$ | $4.42 \cdot 10^4$ | $9.40 \cdot 10^0$ |
| SL16 | $1.11 \cdot 10^3$ | $2.46 \cdot 10^1$ | $7.83 \cdot 10^3$ | $1.28 \cdot 10^1$ |

Regarding RT-qPCR inhibition, the high diversity of inhibitory substances usually present in environmental samples and the similarities between viral particles and those substances (Miura et al., 2011; Schrader et al., 2012) makes it difficult to remove them completely. In order to reduce their effects, measures were taken in the present study throughout the entire extraction and detection processes. However, further research is needed to overcome this limitation and to improve the use of molecular methods for environmental samples (Miura et al., 2011; Schrader et al., 2012).

3.2. Method decision map: selection of the most appropriate version

M₁ and M₂ described herein have been shown to be valid methods for enterovirus extraction and the subsequent molecular detection in solid environmental samples, such as sewage sludge, sediments and soil. Furthermore, the methods described in combination with the proper qPCR method could be valid for other enteric viruses. Taking all this into account, a method decision map with three versions was developed. The most adequate version is selected based on the expected viral concentration in the sample to be analyzed (Figure 1).

The quantification of viral indicators, such as bacteriophages, may be useful at this point for predicting viral pathogen titers in the sample. In particular, somatic coliphages have been shown to perform well as indicators of viral load in solid environmental samples (García-Aljaro et al., 2017; Martín-Díaz et al., 2016). Since the ultracentrifugation steps may lead to

viral losses, those samples that are expected to contain high viral titers should be subjected to the glycine elution protocol described in M_1 and the subsequent direct analysis of the viral extract (140 μ l) using RT-qPCR. This would probably be the case of untreated sewage sludge samples. When the sample to be analyzed is expected to contain medium to low viral titers, or when direct analysis gives a negative result, then the entire M_1 , including the concentration steps, should be applied. This would probably be the case of digested sewage sludge samples. This version could be particularly useful when the number of samples to be analyzed is high, since the small volume of viral extract subjected to ultracentrifugation (12.5 ml) allows analysis of several samples at the same time. Finally, when the samples to be analyzed are expected to contain low viral titers, or when M_1 gives a negative result, the most adequate approach would be to apply M_2 , which concentrates all the viral extract (\approx 45 ml). This version has been shown to be useful, for example, in the case of sediment samples (Table 3). Finally, it is important to remark that each version has a different detection limit and this should be kept in mind for the comparison of results.

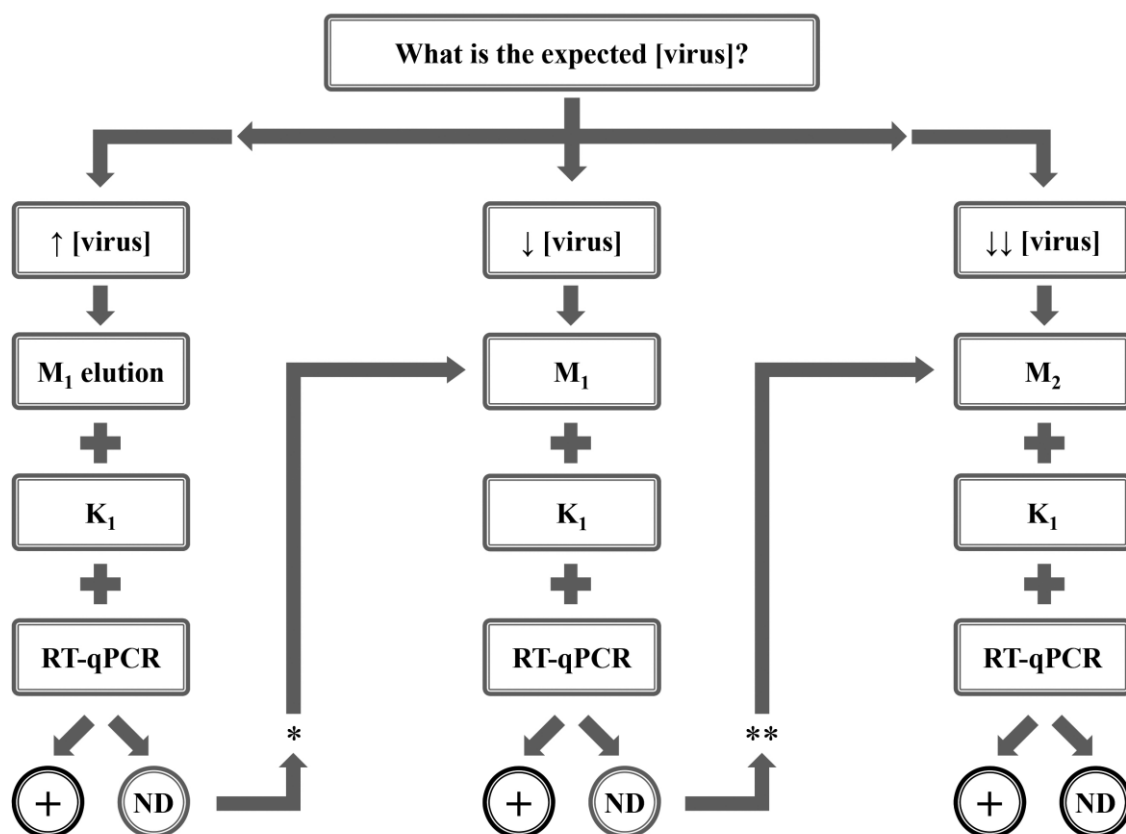


Figure 1. Method decision map, with three versions based on the viral concentration expected for the sample. [] = concentration; + = positive result; ND = not detected; M_1 elution = elution step from M_1 ; K_1 = RNA extraction method 1. * = When a ND result is obtained, it is not necessary to apply the entire M_1 , only to continue subjecting the viral extract (12.5 ml) to the concentration steps. ** = When a ND result is obtained, it is not necessary to apply the entire M_2 , only to continue subjecting the rest of the viral extract to the concentration steps.

4. CONCLUSIONS

Three indirect and one direct viral extraction methods for use with solid environmental samples were compared in terms of viral recovery and removal of RT-qPCR inhibitors. Different types of fluvial sediments and sewage sludge samples were analyzed. The indirect

methods, based on glycine viral elution and viral particle concentration by ultracentrifugation, showed better results than the commercial direct method assayed. The ultracentrifugation steps produced viral losses in samples with high viral titers. In contrast, for samples with low titers, the ultracentrifugation was very useful in concentrating viruses. Two commercial RNA extraction methods were also evaluated and the better option was chosen. The linear dynamic range of the RT-qPCR covered was from 5 to $5 \cdot 10^7$ GC/reaction. Different measures were taken to overcome RT-qPCR inhibition during the entire extraction and detection protocols. The results allowed the development of a flexible indirect method with three versions based on the expected viral concentration in the sample to be analyzed.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Spanish Government (CGL2011-25401, CGL2014-59977-C3-3-R and BES-2012-054179) and the *Generalitat de Catalunya* regional authorities (SGR-2014-007).

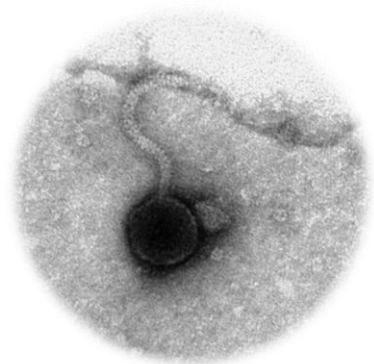
References

- Bradford, S.A., Morales, V.L., Zhang, W., Harvey, R.W., Packman, A.I., Mohanram, A., Welty, C., 2013. Transport and Fate of Microbial Pathogens in Agricultural Settings. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 43, 775–893. doi:10.1080/10643389.2012.710449
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Crabill, C., Donald, R., Snelling, J., Foust, R., Southam, G., 1999. The impact of sediment fecal coliform reservoirs on seasonal water quality in Oak Creek, Arizona. *Water Res.* 33, 2163–2171. doi:10.1016/S0043-1354(98)00437-0
- Craig, D.L., Fallowfield, H.J., Cromar, N.J., 2004. Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. *J. Appl. Microbiol.* 96, 922–930. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02243.x
- De Brauwere, A., Ouattara, N.K., Servais, P., 2014. Modeling Fecal Indicator Bacteria Concentrations in Natural Surface Waters : A Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 44, 2380–2453. doi:10.1080/10643389.2013.829978
- García-Aljaro, C., Martín-Díaz, J., Viñas-Balada, E., Calero-Cáceres, W., Lucena, F., Blanch, A.R., 2017. Mobilisation of microbial indicators, microbial source tracking markers and pathogens after rainfall events. *Water Res.* 112, 248–253. doi:10.1016/j.watres.2017.02.003
- Goyal, S.M., Aboubakr, H.A., 2016. Methods for virus recovery from foods., in: Goyal, S.M., Cannon, J.L. (Eds.), *Viruses in Foods. Food Microbiology and Food Safety Research and Development.* Springer.

- Guzmán, C., Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., 2007. Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil and treated biowaste. *J. Virol. Methods* 144, 41–48. doi:10.1016/j.jviromet.2007.03.017
- Hassard, F., Gwyther, C.L., Farkas, K., Andrews, A., Jones, V., Cox, B., Brett, H., Jones, D.L., McDonald, J.E., Malham, S.K., 2016. Abundance and Distribution of Enteric Bacteria and Viruses in Coastal and Estuarine Sediments—a Review. *Front. Microbiol.* 7, 1692. doi:10.3389/fmicb.2016.01692
- Jamieson, R., Joy, D.M., Lee, H., Kostaschuk, R., Gordon, R., 2005. Transport and deposition of sediment-associated *Escherichia coli* in natural streams. *Water Res.* 39, 2665–2675. doi:10.1016/j.watres.2005.04.040
- Knight, A., Li, D., Uyttendaele, M., Jaykus, L.-A., 2013. A critical review of methods for detecting human noroviruses and predicting their infectivity. *Crit. Rev. Microbiol.* 39, 295–309. doi:10.3109/1040841X.2012.709820
- LaBelle, R.L., Gerba, C.P., Goyal, S.M., Melnick, J.L., Cech, I., Bogdan, G.F., 1980. Relationships between environmental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 588–596.
- Lepeuple, A.S., Gaval, G., Jovic, M., Roubin, M.R. De, 2004. Horizontal Work Package 3, Task 6: Literature review on levels of pathogens and their abatement in sludges, soil and treated biowaste.
- Lewis, G.D., Loutit, M.W., Austin, F.J., 1985. A method for detecting human enteroviruses in aquatic sediments. *J. Virol. Methods* 10, 153–162. doi:10.1016/0166-0934(85)90101-6
- Martín-Díaz, J., Casas-Mangas, R., García-Aljaro, C., Blanch, A.R., Lucena, F., 2016. Somatic coliphages as surrogates for enteroviruses in sludge hygienization treatments. *Water Sci. Technol.* 73, 2182–2188. doi:10.2166/wst.2016.066
- Milieu Ltd., WRc, Risk & Policy Analysts Ltd. (RPA), 2010. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. Final Report Part III: Project Interim Reports.
- Miura, T., Masago, Y., Sano, D., Omura, T., 2011. Development of an effective method for recovery of viral genomic RNA from environmental silty sediments for quantitative molecular detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3975–3981. doi:10.1128/AEM.02692-10
- Monpoeho, S., Dehé, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J.-C., Billaudel, S., Ferré, V., 2000. Quantification of Enterovirus RNA in Sludge Samples Using Single Tube Real-Time RT-PCR. *Biotechniques* 29, 88–93.
- Monpoeho, S., Maul, A., Mignotte-Cadiergues, B., Schwartzbrod, L., Billaudel, S., Ferré, V., 2001. Best Viral Elution Method Available for Quantification of Enteroviruses in Sludge by Both Cell Culture and Reverse Transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2484–2488. doi:10.1128/AEM.67.6.2484-2488.2001

- Nichols, G., Lane, C., Asgari, N., Verlander, N.Q., Charlett, A., 2009. Rainfall and outbreaks of drinking water related disease and in England and Wales. *J. Water Health* 7, 1–8. doi:10.2166/wh.2009.143
- Santamaría, J., Toranzos, G.A., 2003. Enteric pathogens and soil: A short review. *Int. Microbiol.* 6, 5–9. doi:10.1007/s10123-003-0096-1
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1014–1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- Sidhu, J.P.S., Toze, S.G., 2009. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environ. Int.* 35, 187–201. doi:10.1016/j.envint.2008.07.006
- Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2012. Extraction of food-borne viruses from food samples: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 1–9. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.014
- US Environmental Protection Agency, 2012. Method 1615 - Measurement of Enterovirus and Norovirus occurrence in water by culture and RT-qPCR. USA.
- US Environmental Protection Agency, 2003. Environmental Regulations and Technology. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. USA.
- World Health Organization, 2011. Guidelines for Drinking-water Quality, Fourth Edi. ed. Geneva, Switzerland.
- Wyn-Jones, A.P., Sellwood, J., 2001. A Review: Enteric viruses in the aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.* 91, 945–962. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01470.x

6. Discusión



6. Discusión

La presente investigación ha pretendido explorar la utilidad de los bacteriófagos y otros microorganismos indicadores de la contaminación fecal en relación a dos grandes tipos de sólidos relevantes en el ciclo del agua, los lodos de depuradora (y biosólidos derivados) y los sedimentos fluviales. Se ha realizado asimismo el estudio del comportamiento de enterovirus y otros patógenos de referencia en el mismo ámbito. Ambos tipos de sólidos poseen la potencialidad de actuar como reservorios de microorganismos patógenos, los lodos debido a su origen y a su propia composición y los sedimentos debido al aporte de contaminación fecal que reciben. Ambos poseen también la potencialidad de dispersar esos patógenos en el medio provocando los consiguientes riesgos para la salud humana, animal y ambiental, los lodos a través de su aplicación como fertilizantes en agricultura y los sedimentos a través de su estrecho contacto con la columna de agua del río.

6.1. Higienización de lodos de depuradora y biosólidos

A lo largo del primer bloque de la presente investigación se ha valorado la capacidad de varios microorganismos para actuar como indicadores de la higienización producida durante el tratamiento de los lodos de depuradora. Aunque *E. coli* lleva décadas siendo utilizada como bacteria indicadora de la contaminación fecal en numerosos ámbitos y está incluida en la mayoría de normativas que exigen un control microbiológico, su utilidad para indicar el comportamiento de patógenos más resistentes presenta ciertas limitaciones que pueden superarse incluyendo en los análisis rutinarios otro tipo de indicadores (Ashbolt et al., 2001; Payment y Franco, 1993; WHO, 2011). Por ello, la higienización se ha valorado utilizando tres grupos de microorganismos indicadores indígenas con distinta resistencia a los tratamientos: *E. coli*, SOMCPH y SSRC. Se ha utilizado también enterovirus, detectado mediante cultivo celular y RT-qPCR, como patógeno de referencia.

E. coli se ha comportado, a lo largo del presente estudio, como un indicador de proceso no conservativo, mostrándose sensible a los pretratamientos alcalino y térmico, así como a la digestión anaerobia mesófila, tal y como ya se ha mostrado en investigaciones previas (Astals et al., 2012; Mocé-Llivina et al., 2003). Su alta sensibilidad a los tratamientos de higienización ha mostrado su utilidad para indicar el comportamiento de bacterias patógenas entéricas como *Salmonella*. En cambio, no ha podido utilizarse para valorar la intensidad de los tratamientos debido a que, en la mayoría de los casos, sus concentraciones cayeron por debajo del límite de detección, no pudiéndose así calcular su capacidad para reducir los 6 log₁₀ requeridos por el Borrador de la Comisión Europea (DG Environment, 2000) para tratamientos avanzados. Por otro lado, tanto los pretratamientos alcalino y térmico, como la digestión anaerobia mesófila fueron suficientemente intensos como para cumplir con los límites de *E. coli* establecidos en dicho Borrador (5·10² CFU/g) y en la normativa de la EPA (US Environmental Protection

Agency, 2003). Sin embargo, los niveles de SOMCPH y de SSRC detectados en el mismo tipo de muestras advierten sobre la mayor capacidad de resistencia que pueden mostrar virus, huevos de helmintos y formas de resistencia de los protozoos.

Los SOMCPH fueron útiles para la valoración de los tratamientos estudiados en los lodos de depuradora. La reducción de sus concentraciones reflejó la intensidad de los tratamientos y pudieron ser detectados en el 100% de los lodos no tratados y pretratados y en más del 85% de los lodos sometidos a tratamiento, permitiendo así su utilización como indicadores de proceso. Se valoró su capacidad para actuar como indicadores de virus entéricos, observándose que los lodos que contenían menos de 10^4 PFU/g dw mostraban unas concentraciones de enterovirus muy bajas o por debajo del límite de detección. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en el ámbito de los lodos y las aguas residuales (Gantzer et al., 1998; Lucena et al., 2005). Teniendo en cuenta esta cifra y los resultados de “verdaderos negativos”, “verdaderos positivos”, “falsos negativos” y “falsos positivos” obtenidos, los SOMCPH se comportaron mejor que los GCEV a la hora de indicar el comportamiento de enterovirus infecciosos frente a los tratamientos de higienización.

Las SSRC mostraron una alta resistencia a los diferentes procesos estudiados y sus concentraciones sólo se redujeron al aplicar el pretratamiento alcalino. De esta forma, aparecían como buenos candidatos para representar el comportamiento de los patógenos más resistentes, como los huevos de helmintos y las formas de resistencia de los protozoos (Agulló-Barceló et al., 2013; Payment y Franco, 1993). Sin embargo, la aplicación de los siguientes tratamientos dio lugar a importantes aumentos reproducibles en las concentraciones de SSRC: pretratamiento alcalino con 35,3 g NaOH/kg ST, pretratamiento alcalino con 157 g NaOH/kg ST seguido de digestión anaerobia mesófila y pretratamiento de ultrasonidos con 27000 kJ/kg ST seguido de digestión anaerobia mesófila. El estudio en profundidad de estos aumentos descartó que se debieran a procesos de esporulación o a la disipación de flóculos. Estos resultados, junto con el papel activo que juega el género *Clostridium* en los procesos de digestión anaerobia (Shah et al., 2014; Stiborova et al., 2015; Tian et al., 2015; Yuan et al., 2015), ponen en duda la capacidad de las SSRC para actuar como indicadores de proceso durante el tratamiento de los lodos de depuradora, ya que no se espera que los patógenos a los que representan sigan el mismo comportamiento.

La revisión, adaptación y aplicación de la RT-qPCR para enterovirus descrita por Monpoeho y colaboradores (Monpoeho et al., 2000) se realizó de forma satisfactoria durante el presente estudio. Siguiendo la norma francesa (AFNOR, 2015; Blanchard et al., 2012) se realizaron las validaciones oportunas, que dieron lugar a eficiencias de entre el 94% y el 97%. El LOD y el LOQ fueron coincidentes, resultando en 5 GC/reacción, lo que demostró una alta sensibilidad de la técnica. El rango dinámico lineal permitió la cuantificación de entre 5 y $5 \cdot 10^7$ GC/reacción. Aunque para la mayoría de concentraciones de la curva estándar se espera una distribución normal, para las

concentraciones más bajas se espera que los datos se ajusten a una distribución de Poisson, por lo que cuantificaciones por debajo de 3 GC/reacción no son posibles utilizando qPCR convencional y se requiere, en estos casos la aplicación de qPCR digital (Applied Biosystems y Life Technologies, 2011; Bustin et al., 2009). El 57% de las muestras de lodos analizadas a lo largo de los diferentes tratamientos dieron lugar a resultados de INFEV por debajo del límite de detección o a valores muy bajos, con una media de 0,16 log₁₀ (PFU g ST). De esta forma, la detección de este patógeno mediante técnicas moleculares puede ser una buena alternativa. Sin embargo, la técnica de la qPCR no aporta información sobre la infectividad de los virus y, debido a ello, no es de utilidad a la hora de indicar el efecto de higienización (a excepción de aquellos tratamientos que provocan la degradación de los ácidos nucleicos). Se están realizando avances en este campo (Elizaquível et al., 2014; Knight et al., 2013), pero aún se requiere investigación al respecto. Por otro lado, la qPCR presenta alta sensibilidad a la gran variedad de inhibidores presente en las muestras ambientales (Schrader et al., 2012), llegando a dar lugar a resultados falsos negativos (Bustin et al., 2009; Miura et al., 2011; Schrader et al., 2012), por lo que se hace indispensable la utilización de estrategias para su reducción y control. Durante la presente investigación se ha añadido T4 gp 32 y polivinilpirrolidona (PVP) a la mezcla de reacción para mitigar los efectos de las sustancias inhibidoras (Deboosere et al., 2012; Monpoeho et al., 2000). Por otro lado, la dilución de los extractos de ARN ha demostrado su efectividad para valorar y reducir la inhibición, aunque su utilidad está sujeta a la superación del límite de detección de la RT-qPCR. La adición de controles de la amplificación, competitivos o no competitivos, puede ser de ayuda en este sentido (Schrader et al., 2012), sin embargo, no resuelve la inhibición, tan solo indica la cantidad de inhibición que afecta a la muestra.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, se propone la inclusión de los SOMCPH en las normativas sobre aplicación de lodos y biosólidos en agricultura, con el objetivo de complementar los parámetros microbiológicos ya existentes y garantizar así una mejor higienización.

6.2. Comportamiento de indicadores y patógenos en los sedimentos fluviales

Durante el segundo bloque se ha pretendido evaluar el comportamiento y las capacidades de varios indicadores de la contaminación fecal, patógenos y marcadores de MST en los sedimentos de un río típicamente mediterráneo, el Llobregat, bajo condiciones de fuertes lluvias alternadas con periodos de sequía.

La carga microbiológica fecal tanto de sedimentos como de la columna de agua aumentó justo después de cada evento de lluvias (excepto las SSRC, cuya concentración aumentó sólo en el agua), reflejando dos posibles aportes de contaminación: uno reciente en el tiempo, proveniente de la sobrecarga de los sistemas unitarios de alcantarillado, las EDARs y otras fuentes (Curriero et al., 2001); otro más extendido en el tiempo, debido a la resuspensión de los microorganismos presentes en los sedimentos (Crabill et al., 1999). De esta forma, las altas concentraciones de indicadores y patógenos encontradas

en los sedimentos fluviales durante periodos secos a lo largo de la presente investigación alertan sobre los peligros de su resuspensión en la columna de agua. En cuanto al experimento de microcosmos, al cabo de 42 días los únicos indicadores detectados en el agua sin agitar fueron SSRC y SOMCPH. Sin embargo, al someter los microcosmos a agitación se produjo la resuspensión de microorganismos en el agua, dando a lugar a resultados positivos para todos los indicadores excepto SFBIF, incluso pasados 42 días. Depredación, radiación ultravioleta, temperatura y falta de humedad son factores conocidos por comprometer la supervivencia de los microorganismos presentes en los sedimentos (De Brauwere et al., 2014). De hecho, tanto en la naturaleza como en los microcosmos, las inactivaciones fueron generalmente superiores en el sedimento con menor porcentaje de agua, que en el sedimento más saturado o en el cubierto por la columna de agua. Los microcosmos generados demostraron ser útiles simulando la resuspensión de sedimentos producida por los eventos de lluvias naturales, alcanzándose datos de turbidez similares a los encontrados en el río. Se encontró asimismo que los patrones de sedimentación y resuspensión variaban entre bacterias, virus y esporas, hecho probablemente relacionado con diferencias en la composición y tamaño de los mismos, así como con sus distintos tipos y grados de adhesión a partículas sólidas (De Brauwere et al., 2014). Por otro lado, cada uno de los microorganismos analizados a lo largo del presente estudio mostró un grado de supervivencia distinto, lo cual debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados de su detección.

La bacteria *E. coli* fue analizada tanto mediante técnicas tradicionales de cultivo (cEC) como mediante detección molecular con qPCR (tEC). Durante los periodos de sequía la supervivencia de cEC en el sedimento se vio afectada por el grado de humedad, siendo casi $2 \log_{10}$ menor en los sedimentos más alejados del río (una media de 15,7% de humedad) que en aquellos más cercanos (42,1%). En los experimentos de microcosmos, las diferencias entre sedimento cubierto y no cubierto fueron menos acusadas (T_{90} de 11 y 10 días, respectivamente); no hay que olvidar, sin embargo, que en este caso las diferencias en el porcentaje de humedad también fueron menores (54,0% en el cubierto y 32,2% en el no cubierto). cEC mostró una buena capacidad para indicar el comportamiento del patógeno SAL, reaccionando de modo similar al estrés ambiental, pero manteniendo en todo caso concentraciones significativamente más altas. Con respecto a tEC, su utilización como indicador alternativo a cEC ya se incluye en algunas normativas, aunque los resultados deberían ser interpretados con precaución, ya que la detección de un fragmento del genoma de la bacteria no aporta información sobre la infectividad de la misma, ni sobre la inactivación producida en el medio natural. En este sentido, no se encontró correlación entre cEC y tEC a lo largo de la presente investigación.

Las concentraciones de las SSRC apenas mostraron cambios en los sedimentos a lo largo de todo el estudio. Las T_{90} obtenidas en los microcosmos fueron superiores a la duración del experimento (42 días), concordando así con otros trabajos que han constatado la alta

resistencia de las esporas de clostridios en los sedimentos (Robles et al., 2000). Parecen, por lo tanto, ser buenas indicadores del comportamiento de los patógenos más resistentes en los sedimentos fluviales.

Con respecto a los bacteriófagos analizados, las concentraciones de SOMCPH fueron de, aproximadamente, 2-3 \log_{10} superiores a las de GA17PH. En los microcosmos los patrones de inactivación fueron similares para ambos grupos de fagos, resultando en T_{90} en el sedimento cubierto de >42 y 36 días para SOMCPH y GA17PH, respectivamente y en el sedimento no cubierto, de 19 y 20 días, respectivamente. La capacidad de los SOMCPH para indicar el comportamiento de enterovirus fue evaluada comparando las concentraciones del indicador con las del patógeno detectado mediante PCR cuantitativa. Los niveles de SOMCPH fueron siempre superiores a los de GCEV, pero el alto porcentaje de muestras negativas para GCEV dificultó las comparaciones. Teniendo en cuenta que la detección se realizó mediante técnicas moleculares, se espera que las concentraciones de INFEV fueran aún menores.

La gran variedad de fuentes de contaminación que afecta a los sistemas fluviales revela la importancia de disponer de herramientas que discriminen el origen de la contaminación fecal, aportando así información de utilidad de cara a identificar responsables y tomar las medidas oportunas. En el caso concreto del río Llobregat y según indica la Agència Catalana de l'Aigua, el aporte de contaminación fecal mayoritario es de origen humano. Con relación a este aspecto, el cálculo de un ratio entre las concentraciones de bacteriófagos ha sido propuesto para distinguir entre contaminación fecal de origen humano o animal en distintos tipos de aguas. El ratio se calcula mediante la fórmula $\log_{10} (\text{SOMCPH}/\text{GA17PH})$ y supone contaminación de origen humano cuando el resultado se encuentra en torno a 2 y de origen animal cuando es mayor de 4 (Muniesa et al., 2012). Los resultados obtenidos estuvieron en torno a 2 tanto para las muestras de agua recogidas en periodos secos, como para aquellas correspondientes a eventos de lluvias, valores en concordancia con la alta presión poblacional a la que se encuentra sometido el río.

Las bacterias del género *Bifidobacterium* también han sido propuestas para su utilización como marcadores de MST (Bonjoch et al., 2005). El ratio propuesto se calcula mediante la fórmula SFBIF/TBIF y supone contaminación de origen humano cuando el resultado es mayor de 0,2 y de origen animal cuando es menor de 0,2. Aunque para las muestras de agua recogidas durante periodos secos el ratio no pudo ser calculado debido al alto porcentaje de resultados negativos obtenidos para SFBIF, en las muestras recogidas durante eventos de lluvias los ratios indicaron mayoritariamente contaminación de origen humano. Las bifidobacterias, por otro lado, son de utilidad para indicar contaminación fecal reciente en el tiempo ya que, al ser anaerobias estrictas, muestran altas tasas de inactivación fuera del tracto gastrointestinal. De hecho, sólo el 16% de las muestras de sedimento recogido después de lluvias dio un resultado negativo para SFBIF, frente a un 64% de las recogidas en periodos de sequía. De la

misma manera, las T_{90} obtenidas para SFBIF en los microcosmos fueron de 4 y 3 días, respectivamente, para sedimentos cubiertos y no cubiertos, resultando ser el indicador que más rápidamente fue inactivado.

De esta forma, los resultados microbiológicos obtenidos durante el estudio de los sedimentos fluviales son de interés para su incorporación a los programas sobre modelización de cuencas, pudiendo ser útiles así para la mejora de la gestión de los recursos hídricos.

6.3. Metodologías de extracción de enterovirus en muestras ambientales sólidas para su posterior detección mediante RT-qPCR

En el último bloque de la presente investigación se ha realizado la valoración de distintas metodologías de extracción de enterovirus en muestras ambientales sólidas. La detección de este patógeno de referencia mediante métodos moleculares no deja de adquirir importancia con el desarrollo de la PCR cuantitativa en las últimas décadas, debido a su rapidez y especificidad. Aunque se dispone de una buena diversidad de métodos de extracción (Goyal y Aboubakr, 2016; Miura et al., 2011; Monpoeho et al., 2001; Rodríguez-Lázaro et al., 2013), los porcentajes de recuperación son, a menudo, muy bajos, por lo que aún se requiere de investigación al respecto. Por otro lado, muchos de los protocolos disponibles se desarrollaron para detectar virus infecciosos utilizando cultivo celular, por lo que su adaptación a la detección mediante métodos moleculares no siempre es posible (Miura et al., 2011). Por ello, la elección del método más adecuado se realizó, durante la presente investigación, teniendo en cuenta tanto la capacidad de recuperación del RNA viral como la habilidad para retirar sustancias inhibitoras de la RT-qPCR.

Para el paso de elución de los tres métodos indirectos ensayados se eligió el tampón glicina a pH básico, en contraposición al extracto de carne, del cual algunos autores sospechan efectos inhibitorios de la PCR cuantitativa (Goyal y Aboubakr, 2016; Knight et al., 2013; Miura et al., 2011; Rodríguez-Lázaro et al., 2013; Stals et al., 2012). Probablemente ese fue uno de los motivos por los cuales las muestras analizadas siguiendo el protocolo de la EPA (US Environmental Protection Agency, 2003) dieron lugar a peores resultados que al aplicar los protocolos con tampón glicina. La agitación se realizó utilizando un agitador de acción de muñeca, debido a su alta capacidad de homogenización, su disponibilidad en el laboratorio y su facilidad de uso. El sistema de concentración de partículas víricas elegido para los métodos indirectos fue la ultracentrifugación, por su alta capacidad de repetitividad y su consistencia (Stals et al., 2012). El método directo ensayado constó de un kit comercial especialmente diseñado para la extracción de ARN de muestras ambientales.

Bajo las condiciones testadas, en las que varias muestras de sedimento fueron artificialmente contaminadas con enterovirus, los métodos indirectos resultaron ser más efectivos retirando inhibidores que el método directo. Con este tipo de muestras, los tres

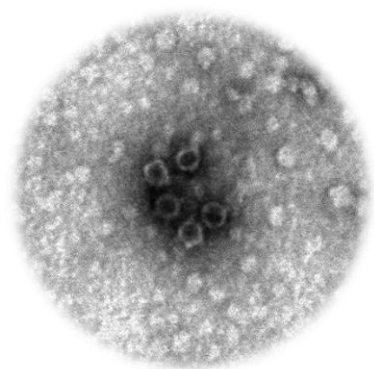
métodos dieron lugar a recuperaciones similares. En cambio, al testarlos frente a muestras naturales en las que las concentraciones víricas son bajas, los métodos M₁ y M₂ resultaron más efectivos que el M₃.

A menudo, el exceso de pasos durante los protocolos da lugar a la pérdida de partículas víricas. Este efecto se vio reflejado en la utilización de ultracentrifugación cuando las concentraciones de virus eran altas. En esos casos, la detección directa partiendo del extracto viral produjo recuperaciones más altas que al realizar los pasos de concentración. Sin embargo, la utilidad de la ultracentrífuga quedó plasmada al analizar muestras con bajas concentraciones de enterovirus.

Los alineamientos de sonda y primers con las secuencias de enterovirus extraídas del GenBank que fueron realizados en el Artículo 2 del presente estudio sugerían una preferencia de la RT-qPCR por los enterovirus que infectan a humanos, en comparación con aquellos que han sido aislados de especies animales. El posterior análisis de muestras fecales realizado en el artículo 6 mostró cómo la técnica era capaz de detectar enterovirus en muestras de procedencia humana y porcina, pero no en aquellas procedentes de ganado bovino y de pollos. Estos resultados indican la similitud y, a la vez, las pequeñas variaciones existentes entre los distintos tipos de enterovirus.

Teniendo en cuenta todos los análisis realizados al respecto, se pudo elaborar un método sencillo y flexible de extracción y detección de enterovirus, con distintas versiones adaptadas al tipo de muestra a analizar y a la concentración de virus esperada en las mismas.

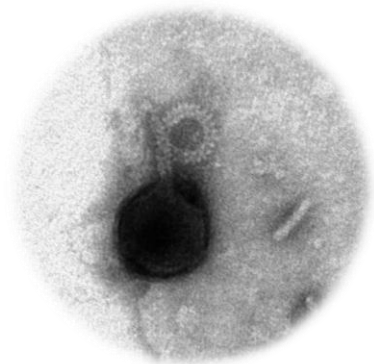
7. Conclusiones



7. Conclusiones

- La vigilancia y control de microorganismos indicadores es una herramienta de gran utilidad para evaluar los riesgos microbiológicos asociados a la generación, tratamiento y reutilización de los lodos de depuradora.
- Durante la presente investigación se ha propuesto la complementación de las normativas europeas actuales mediante la inclusión del control de los SOMCPH indígenas en los lodos de depuradora y biosólidos que se van a utilizar como fertilizantes en agricultura, garantizando así una mejor evaluación de su higienización.
- En el ámbito de los sistemas fluviales mediterráneos la monitorización de un conjunto de indicadores de la contaminación fecal con diversas funciones permite valorar la calidad microbiológica del agua y los sedimentos, aportando información valiosa de cara a los futuros escenarios afectados por el cambio climático.
- La generación de microcosmos ha demostrado ser útil a la hora de obtener datos de persistencia y movilización de indicadores fecales en los sedimentos fluviales.
- La aplicación y posterior comparación de diversas metodologías ha permitido el desarrollo de un método flexible de extracción de enterovirus en muestras ambientales sólidas, con tres versiones basadas en el tipo de muestra y la concentración de virus esperada. Asimismo se ha revisado, adaptado y aplicado satisfactoriamente una RT-qPCR para su detección.
- Los SOMCPH poseen varias virtudes que los convierten en buenos indicadores microbianos en el ámbito de las muestras ambientales sólidas: comparten un gran número de características con los virus entéricos patógenos; en contraposición a las bacterias sólo poseen dos estados, infecciosos y no infecciosos; existen métodos estandarizados de extracción y detección, rápidos, sencillos y económicos; sus altas concentraciones en los lodos de depuradora y su moderada resistencia a los tratamientos permiten cuantificar la higienización sin necesidad de inocular microorganismos alóctonos; su presencia y persistencia en los sedimentos fluviales permiten valorar el grado de contaminación fecal de los mismos.

8. Bibliografía



8. Bibliografía

- AFNOR (2015) Méthodes d'analyse en santé animale — PCR (réaction de polymérisation en chaîne) — Partie 2 : Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale. [en línea]
<https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-u47-600-2/methodes-d-analyse-en-sante-animale-pcr-reaction-de-polymerisation-en-chaîne-partie-2-exigences-et-recommandations-pour-/article/814080/fa182883> (Consultado el 15/04/2017).
- Agulló-Barceló, M., Oliva, F., y Lucena, F. (2013) Alternative indicators for monitoring *Cryptosporidium* oocysts in reclaimed water. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(7), 4448-4454.
- Anderson, K. L., Whitlock, J. E., y Harwood, V. J. (2005) Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. *Applied and environmental microbiology*, 71(6), 3041-3048.
- Applied Biosystems y Life Technologies (2011) Real-Time PCR: Understanding Ct. [en línea] <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/pcr-understanding-ct-application-note.html> (Consultado el 03/05/2017).
- Arnold, J. G., Allen, P. M., y Bernhardt, G. (1993) A comprehensive surface-groundwater flow model. *Journal of Hydrology*, 142, 47-69.
- Ashbolt, N. J., Grabow, W. O. K., y Snozzi, M. (2001) «Indicators of microbial water quality» en WHO, L. Fewtrell, y J. Bartram (eds.), *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. London, IWA Publishing, 289-316.
- Astals, S., Venegas, C., Peces, M., Jofre, J., Lucena, F., y Mata-Álvarez, J. (2012) Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Research*, 46(19), 6218-6227.
- Astals, S. (2013) *Optimització i modelització de processos avançats de digestió anaeròbia*, Tesis Doctoral. Departament d'Enginyeria Química. Universitat de Barcelona. [en línea] <http://tesisenred.net/handle/10803/123571> (Consultado el 15/04/2017).
- AVMA (2008) *One health: A new professional imperative*, [en línea] https://www.avma.org/KB/Resources/Reports/Documents/onehealth_final.pdf (Consultado el 12/03/2017).
- Bagnuolo, G., Braguglia, C. M., Gianico, A., Mascolo, G., Miladinovic, N., Mininni, G., y Weemaes, M. (2009) Neptune Project. Deliverable 1.3 Strategies for a sustainable and safe sludge management. [en línea] http://www.eu-neptune.org/Publications and Presentations/NEPTUNE_Deliverable_D1_3_final_.pdf (Consultado el 08/03/2017).
- Bar-Or, Y. (1990) The effect of adhesion on survival and growth of microorganisms. *Experientia*, 46, 823-826.
- Berman, D., Berg, G., y Safferman, R. S. (1981) A method for recovering viruses from sludges. *Journal of Virological Methods*, 3(5), 283-291.

- Blanch, A. R., Lucena, F., Varela, X., Llopart-Mascaró, A., Chesa, M. J., y Jofre, J. (2017) «Use of Somatic Coliphages Measured in Real Time (4 hours) in the Prediction of Fecal Contamination in Recreational Mediterranean Waters» en International Symposium on Health Related Water Microbiology del HRWM (IWA). Celebrado del 15 al 19 de mayo de 2017 en The University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA.
- Blanchard, P., Regnault, J., Schurr, F., Dubois, E., y Ribière, M. (2012) Intra-laboratory validation of chronic bee paralysis virus quantitation using an accredited standardised real-time quantitative RT-PCR method. *Journal of Virological Methods*, 180(1-2), 26-31.
- Bonada, N. y Resh, V. H. (2013) Mediterranean-climate streams and rivers: Geographically separated but ecologically comparable freshwater systems. *Hydrobiologia*, 719, 1-29.
- Bonjoch, X., Ballesté, E., y Blanch, A. R. (2005) Enumeration of bifidobacterial populations with selective media to determine the source of waterborne fecal pollution. *Water Research*, 39(8), 1621-1627.
- Bradford, S. A., Morales, V. L., Zhang, W., Harvey, R. W., Packman, A. I., Mohanram, A., y Welty, C. (2013) Transport and Fate of Microbial Pathogens in Agricultural Settings. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43, 775-893.
- De Brauwere, A., Ouattara, N. K., y Servais, P. (2014) Modeling Fecal Indicator Bacteria Concentrations in Natural Surface Waters: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44, 2380-2453.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., y Wittwer, C. T. (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622.
- Carrère, H., Dumas, C., Battimelli, A., Batstone, D. J., Delgenès, J. P., Steyer, J. P., y Ferrer, I. (2010) Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review. , 183(1-3), 1-15.
- CE (2000) 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. DOUE L, 327(de 22.12.2000), 1-93.
- CE (2004) Directiva 2004/35/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de abril de 2004, sobre responsabilidad ambiental en relación con la prevención y reparación de daños medioambientales. DOUE L, 143(de 30.4.2004), 56-75.
- CE (2008) Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas. DOCE L, 312(de 22.11.2008), 3-30.
- CEE (1986) Directiva 86/278/CEE del Consejo, de 12 de junio de 1986, relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura. DOCE L, 181(de 4.7.86), 6-12.

- CEE (1991) Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. DOCE L, 135(de 30.5.91), 40-52.
- Chauret, C., Springthorpe, S., y Sattar, S. (1999) Fate of Cryptosporidium oocysts, Giardia cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. *Canadian Journal of Microbiology*, 45, 257-262.
- Chenu, C. (1993) Clay or sand polysaccharide associations as models for the interface between micro-organisms and soil: water related properties and microstructure. *Geoderma*, 56, 143-156.
- Cho, K. H., Pachepsky, Y. A., Kim, J. H., Kim, J. W., y Park, M. H. (2012) The modified SWAT model for predicting fecal coliforms in the Wachusett Reservoir Watershed, USA. *Water Research*, 46, 4750-4760.
- Chu, C. P. y Lee, D. J. (2004) Effect of pre-hydrolysis on floc structure. *Journal of Environmental Management*, 71, 285-292.
- Cidad, E. (2016) El ciclo urbano del agua. [en línea] <http://aguaecosocial.com/ciclo-urbano-del-agua/> (Consultado el 03/04/2017).
- Crabill, C., Donald, R., Snelling, J., Foust, R., y Southam, G. (1999) The impact of sediment fecal coliform reservoirs on seasonal water quality in Oak Creek, Arizona. *Water Research*, 33(9), 2163-2171.
- Craig, D. L., Fallowfield, H. J., y Cromar, N. J. (2004) Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 922-930.
- Crispim, C. A. y Gaylarde, C. C. (2005) Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: A review. *Microbial Ecology*, 49, 1-9.
- Curriero, F. C., Patz, J. A., Rose, J. B., y Lele, S. (2001) The Association Between Extreme Precipitation and Waterborne Disease Outbreaks in the United States , 1948 – 1994. *American Journal of Public Health*, 91(8), 1194-1199.
- Dahab, M. F. y Surampalli, R. Y. (2002) Effects of aerobic and anaerobic digestion systems on pathogen and pathogen indicator reduction in municipal sludge. *Water Science and Technology*, 46(10), 181-187.
- Deboosere, N., Horm, S. V., Delobel, A., Gachet, J., Buchy, P., y Vialette, M. (2012) Viral elution and concentration method for detection of influenza A viruses in mud by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 179, 148-153.
- DG Environment (2000) Working Document on Sludge. 3rd Draft. [en línea] <http://www.ewa-online.eu/comments.html> (Consultado el 03/03/2017).
- Díaz-Molina, M. (1984) *Sedimentación fluvial*, Madrid (España), Instituto Geológico y Minero de España.
- Donovan, E. P., Staskal, D. F., Unice, K. M., Roberts, J. D., Haws, L. C., Finley, B. L., y Harris,

Bibliografía

- M. A. (2008) Risk of gastrointestinal disease associated with exposure to pathogens in the sediments of the Lower Passaic River. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1004-1018.
- Droppo, I. G., Liss, S. N., Williams, D., Nelson, T., Jaskot, C., y Trapp, B. (2009) Dynamic existence of waterborne pathogens within river sediment compartments. Implications for water quality regulatory affairs. *Environmental Science and Technology*, 43, 1737-1743.
- Elizaquível, P., Aznar, R., y Sánchez, G. (2014) Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *Journal of Applied Microbiology*, 116, 1-13.
- Eurostat (2016) Sewage sludge production and disposal. [en línea] http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=env_ww_spd&lang=en (Consultado el 28/04/2017).
- FAO (2015) Global population and water withdrawal over time. AQUASTAT Database. [en línea] http://www.fao.org/nr/water/aquastat/water_use/ (Consultado el 15/03/2017).
- FAO (2016a) Water Uses. AQUASTAT website. [en línea] http://www.fao.org/nr/water/aquastat/water_use/index.stm (Consultado el 15/03/2017).
- FAO (2016b) Water withdrawal by sector, around 2010. AQUASTAT Database. [en línea] <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/data/query/index.html?lang=en> (Consultado el 15/03/2017).
- FAO (2016c) Water withdrawal by sector. AQUASTAT Database. [en línea] <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/data/query/results.html?regionQuery=true&yearGrouping=SURVEY&showCodes=false&yearRange.fromYear=1958&yearRange.toYear=2017&varGrpIds=4250%2C4251%2C4252%2C4253%2C4257&cntIds=®Ids=9805%2C9806%2C9807%2C9808%2C9809&edit> (Consultado el 15/03/2017).
- FDA/Interstate Shellfish Sanitation Commission (2015) *National Sanitation Program. Guide for the Control of Molluscan Shellfish*, USA.
- Fletcher, M. (1984) «Comparative physiology of attached and free-living bacteria» en K. C. Marshall (ed.), *Microbial Adhesion and Aggregation: Report of the Dahlem Workshop on Microbial Adhesion and Aggregation Berlin 1984, January 15-20. Berlin (Germany)*.
- Fletcher, M. (1996) *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*, John Wiley & Sons.
- van Frankenhuyzen, J. K., Trevors, J. T., Lee, H., Flemming, C. A., y Habash, M. B. (2011) Molecular pathogen detection in biosolids with a focus on quantitative PCR using propidium monoazide for viable cell enumeration. *Journal of Microbiological Methods*, 87, 263-272.
- Gantzer, C., Maul, A., Audic, J. M., y Schwartzbrod, L. (1998) Detection of infectious

- enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4307-4312.
- Garrec, N., Picard-Bonnaud, F., y Pourcher, A. M. (2003) Occurrence of *Listeria* SP. and *L. Monocytogenes* in sewage sludge used for land application: Effect of dewatering, liming and storage in tank on survival of *Listeria* species. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35(3), 275-283.
- Gibbs, R., Hu, C., Ho, G., Unkovich, I., y Phillips, P. (1994) Die-off of human pathogens in stored wastewater sludge and sludge applied to land. UWRRA Research Project no. [55-51 (91/58)].
- Giddings, E. M. y Oblinger, C. J. (2004) «Fecal-indicator bacteria in the Newfound Creek watershed, western North Carolina, during a high and low streamflow condition, 2003» en U. S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2004-5257. USGS. [en línea] <https://pubs.usgs.gov/sir/2004/5257/> (Consultado el 15/04/2017).
- Government of Western Australia (2012) *Western Australian guidelines for biosolids management*, Australia.
- Goyal, S. M. y Aboubakr, H. A. (2016) «Methods for virus recovery from foods.» en S. M. Goyal y J. L. Cannon (eds.), *Viruses in Foods. Food Microbiology and Food Safety Research and Development*. Springer.
- Grabow, W. O. K. (2001) Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. *Water SA*, 27(2), 251-268.
- Guerrero, R., Urmeneta, J., y Rampone, G. (1993) Distribution of types of microbial mats at the Ebro Delta, Spain. *BioSystems*, 31(2-3), 135-144.
- Gutiérrez-Aragón, Ó. (2014) *Aspectos ambientales de la gestión empresarial del suelo*, Tesis Doctoral. Departamento de Dirección y Economía de la Empresa. Universidad de León.
- Gutiérrez-Aragón, Ó. (2016) *Fundamentos de Administración de Empresas (2ª edición)*, Madrid (España), Ediciones Pirámide (Anaya).
- Le Guyader, F., Dubois, E., Menard, D., y Pommepuy, M. (1994) Detection of Hepatitis A Virus, Rotavirus, and Enterovirus in Naturally Contaminated Shellfish and Sediment by Reverse Transcription-Seminested PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3665-3671.
- Guzmán, C., Jofre, J., Montemayor, M., y Lucena, F. (2007a) Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2420-2429.
- Guzmán, C., Jofre, J., Blanch, A. R., y Lucena, F. (2007b) Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil and treated biowaste. *Journal of Virological Methods*, 144(1-2), 41-48.
- Hassard, F., Gwyther, C. L., Farkas, K., Andrews, A., Jones, V., Cox, B., Brett, H., Jones, D. L.,

Bibliografía

- McDonald, J. E., y Malham, S. K. (2016) Abundance and Distribution of Enteric Bacteria and Viruses in Coastal and Estuarine Sediments—a Review. *Frontiers in Microbiology*, 7(November), 1692.
- Hill, V. y Sobsey, M. (1998) Microbial indicator reductions in alternative treatment systems for swine wastewater. *Water Science and Technology*, 38(12), 119-122.
- Horan, N. J., Fletcher, L., Betmal, S. M., Wilks, S. A., y Keevil, C. W. (2004) Die-off of enteric bacterial pathogens during mesophilic anaerobic digestion. *Water Research*, 38, 1113-1120.
- Huang, R., Li, M., y Gregory, R. L. (2011) Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, 2(5), 435-444.
- Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., Hellemans, J., Kubista, M., Mueller, R. D., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T., y Bustin, S. A. (2013) The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 59(6), 892-902.
- Huggett, J. F., O'Grady, J., y Bustin, S. (2015) qPCR, dPCR, NGS – A journey. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, A1-A5.
- IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology (1991) Bacteriophages As Model Viruses in Water Quality Control. *Water Research*, 25(5), 529-545.
- IDT (2012) *Prime Time - qPCR Application Guide: Experimental Overview, Protocol, Troubleshooting. Third Edition*, Integrated DNA Technologies, Inc. [en línea] <http://www.idtdna.com/pages/landing/qpcr/guide> (Consultado el 09/05/2017).
- INE (2008) Estadísticas e indicadores del agua. Cifras INE, Boletín Informativo del Instituto Nacional de Estadística, 1. [en línea] www.ine.es/revistas/cifraine/0108.pdf (Consultado el 15/03/2017).
- INE (2016a) Encuesta sobre el Suministro y Saneamiento del Agua, año 2014. Notas de Prensa INE, Boletín Informativo del Instituto Nacional de Estadística, (4 de octubre). [en línea] www.ine.es/prensa/np992.pdf (Consultado el 12/03/2017).
- INE (2016b) Encuesta sobre el uso del agua en el sector agrario. Año 2014. Notas de Prensa INE, Boletín Informativo del Instituto Nacional de Estadística, (18 de octubre). [en línea] www.ine.es/prensa/np993.pdf (Consultado el 12/03/2017).
- IPCC (2014) *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Core Writing Team, R. K. Pachauri, y L. A. Meyer, eds.), Geneva (Switzerland).
- ISO (2000) International Standard ISO 10705-2: Water quality - Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2: Enumeration of somatic coliphages.
- ISO (2017) International Standard ISO 15216-1:2017 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real

time RT-PCR - Part 1: Method for quantification.

- Jamieson, R., Joy, D. M., Lee, H., Kostaschuk, R., y Gordon, R. (2005) Transport and deposition of sediment-associated *Escherichia coli* in natural streams. *Water Research*, 39(12), 2665-2675.
- Jofre, J. (2007) «Indicators of waterborne enteric viruses» en A. Bosch (ed.), *Human Viruses in Water (Series Perspectives in Medical Virology)*. London (UK), Elsevier.
- Jofre, J., Blanch, A. R., Lucena, F., y Muniesa, M. (2014) Bacteriophages infecting *Bacteroides* as a marker for microbial source tracking. *Water Research*, 55, 1-11.
- Jofre, J., Lucena, F., Blanch, A. R., y Muniesa, M. (2016) Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. *Water (Switzerland)*, 8(199), 1-21.
- John, D. y Rose, J. B. (2005) Review of Factors Affecting Microbial Survival in Groundwater. *Environmental Science and Technology*, 39(19), 7345-7356.
- Junta de Andalucía (2017) Glosario. [en línea]
http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/pls/wwwcma/consulta_glosario.pagina_2?fuente=1&titulo1=&S_TITULO=Y&titulo2=&num_fila=770 (Consultado el 15/04/2017).
- Kelessidis, A. y Stasinakis, A. S. (2012) Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Management*, 32, 1186-1195.
- Kim, J.-W., Pachepsky, Y. A., Shelton, D. R., y Coppock, C. (2010) Effect of streambed bacteria release on *E. coli* concentrations: Monitoring and modeling with the modified SWAT. *Ecological Modelling*, 221, 1592-1604.
- Knight, A., Li, D., Uyttendaele, M., y Jaykus, L.-A. (2013) A critical review of methods for detecting human noroviruses and predicting their infectivity. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(3), 295-309.
- Kondolf, G. M. (1994) Geomorphic and environmental effects of instream gravel mining. *Landscape and Urban Planning*, 28, 225-243.
- Koopmans, M., Bonsdorff, C.-H. von, Vinjé, J., Medici, D. de, y Monroe, S. (2002) Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 187-205.
- Lasobras, J., Dellunde, J., Jofre, J., y Lucena, F. (1999) Occurrence and levels of phages proposed as surrogate indicators of enteric viruses in different types of sludges. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 723-729.
- Lepeuple, A. S., Gaval, G., Jovic, M., y Roubin, M. R. De (2004) *Horizontal Work Package 3, Task 6: Literature review on levels of pathogens and their abatement in sludges, soil and treated biowaste*, [en línea]
https://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/hor6_pathogens.pdf (Consultado el 25/04/2017).

- Lewis, M. A., Nath, M. W., y Johnson, J. C. (1983) A multiple extraction-centrifugation method for the recovery of viruses from waste water treatment plant effluents and sludges. *Canadian Journal of Microbiology*, 29, 1661-1670.
- Li, J. (2005) Effects of Fe(III) on floc characteristics of activated sludge. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 313-319.
- van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W., y Zehnder, A. J. B. (1989) Bacterial adhesion: A physicochemical approach. *Microbial Ecology*, 17, 1-15.
- Lucena, F., Blanch, A. R., y Jofre, J. (2005) *Horizontal standards on hygienic parameters for implementation of EU directives on sludge, soil and treated bio-waste. Critical review on: Methods for bacteriophages (and viruses) to be monitored in EU in sludges, soils and treated biowastes (DL 2/4.2)*, [en línea]
[http://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/D2.42 Bacteriophages Critical Review.pdf](http://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/D2.42_Bacteriophages_Critical_Review.pdf) (Consultado el 03/05/2017).
- MacLeod, F. A., Guiot, S. R., y Costerton, J. W. (1990) Layered Structure of Bacterial Aggregates Produced in an Upflow Anaerobic Sludge Bed and Filter Reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1598-1607.
- Malthus, T. R. (1798) *An essay on the principle of population*, London (UK), J. Johnson, in St. Paul's Church-Yard.
- Manahan, S. E. (2006) *Introducción a la química ambiental*, Reverte.
- Marcé, R., Honey-Rosés, J., Manzano, A., Moragas, L., Catllar, B., y Sabater, S. (2012) «The Llobregat river basin: a paradigm of impaired rivers under climate change threats» en S. Sabater, A. Ginebreda, y D. Barceló (eds.), *The Llobregat. The story of a polluted Mediterranean river*. Berlin / Heidelberg (Germany), Springer-Verlag.
- Martín-Vide, J., Puig-Godes, O., Queralt-Bassa, A., Ros-Aragonès, J., y Samitier-Martí, S. (2016) *Tercer informe sobre el canvi climàtic a Catalunya*, Barcelona (España), Generalitat de Catalunya, Institut d'Estudis Catalans. [en línea]
<http://cads.gencat.cat/ca/detalls/detallarticle/Tercer-informe-sobre-el-canvi-climatic-a-Catalunya-00003> (Consultado el 17/05/2017).
- Metcalf, T. G., Moulton, E., y Eckerson, D. (1980) Improved Method and Test Strategy for Recovery of Enteric Viruses from Shellfish. , 39(1), 141-152.
- Mignotte, B., Maul, A., y Schwartzbrod, L. (1999) Comparative study of techniques used to recover viruses from residual urban sludge. *Journal of Virological Methods*, 78, 71-80.
- Milieu Ltd., WRc, y Risk & Policy Analysts Ltd. (RPA) (2010) *Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. Final Report Part III: Project Interim Reports*, [en línea]
ec.europa.eu/environment/archives/waste/sludge/pdf/part_iii_report.pdf (Consultado el 02/04/2017).
- Mill, J. S. (1857) *Principios de economía política*, México D.C. (México), Fondo de Cultura Económica.

- Mininni, G., Blanch, A. R., Lucena, F., y Berselli, S. (2015) EU policy on sewage sludge utilization and perspectives on new approaches of sludge management. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(10), 7361-7374.
- Ministerio de Agricultura y Pesca Alimentación y Medioambiente (2017) Lodos de depuración de aguas residuales. [en línea] <http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/lodos-depuradora/> (Consultado el 15/04/2017).
- Miura, T., Masago, Y., Sano, D., y Omura, T. (2011) Development of an effective method for recovery of viral genomic RNA from environmental silty sediments for quantitative molecular detection. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 3975-3981.
- Mocé-Llivina, L., Muniesa, M., Pimenta-Vale, H., Lucena, F., y Jofre, J. (2003) Survival of Bacterial Indicator Species and Bacteriophages after Thermal Treatment of Sludge and Sewage. , 69(3), 1452-1456.
- Mocé-Llivina, L., Lucena, F., y Jofre, J. (2005) Enteroviruses and bacteriophages in bathing waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6838-6844.
- Monpoeho, S., Dehée, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J.-C., Billaudel, S., y Ferré, V. (2000) Quantification of Enterovirus RNA in Sludge Samples Using Single Tube Real-Time RT-PCR. *BioTechniques*, 29(1), 88-93.
- Monpoeho, S., Maul, A., Mignotte-Cadiergues, B., Schwartzbrod, L., Billaudel, S., y Ferré, V. (2001) Best Viral Elution Method Available for Quantification of Enteroviruses in Sludge by Both Cell Culture and Reverse Transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2484-2488.
- Morgan, R. P. C., Quinton, J. N., Smith, R. E., Govers, G., Poesen, J. W. A., Auerswald, K., Chisci, G., Torri, D., y Styczen, M. E. (1998) The European Soil Erosion Model (Eurosem): A Dynamic Approach for Predicting Sediment Transport From Fields and Small Catchments. *Earth Surface Processes and Landforms*, 23, 527-544.
- Muniesa, M., Mocé-Llivina, L., Katayama, H., y Jofre, J. (2003) Bacterial host strains that support replication of somatic coliphages. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83, 305-315.
- Muniesa, M., Lucena, F., Blanch, A. R., Payán, A., y Jofre, J. (2012) Use of abundance ratios of somatic coliphages and bacteriophages of *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 for microbial source identification. *Water Research*, 46(19), 6410-6418.
- Muniesa, M., Ballesté, E., Imamovic, L., Pascual-Benito, M., Blanch, A., Lucena, F., y Jofre, J. (2017) «A Fast Method for the Detection of Somatic Coliphages, Used as Indicators of Viral Fecal Pollution in Water» en International Symposium on Health Related Water Microbiology del HRWM (IWA). Celebrado del 15 al 19 de mayo de 2017 en The University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA.
- Ng, D. H. P., Kumar, A., y Cao, B. (2016) Microorganisms meet solid minerals: interactions and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 6935-6946.

Bibliografía

- NHMRC (2011) *Australian Drinking Water Guidelines. Paper 6 National Water Quality Management Strategy*, Canberra (Australia).
- Niewolak, S. (1998) Total viable count and concentration of enteric bacteria in bottom sediments from the Czarna Hańcza River, Northeast Poland. *Polish Journal of Environmental Studies*, 7(5), 295-306.
- North Carolina Administration (2011) *North Carolina Administrative Code 15A NCAC 2U*, Raleigh (USA).
- Ouattara, N. K., Passerat, J., y Servais, P. (2011) Faecal contamination of water and sediment in the rivers of the Scheldt drainage network. *Environmental Monitoring and Assessment*, 183, 243-257.
- Pachepsky, Y. A. y Shelton, D. R. (2011) *Escherichia Coli and Fecal Coliforms in Freshwater and Estuarine Sediments. Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41, 1067-1110.
- Payment, P. y Franco, E. (1993) *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), 2418-2424.
- Payment, P., Plante, R., y Cejka, P. (2001) Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 188-193.
- Pourcher, A. M., Morand, P., Picard-Bonnaud, F., Billaudel, S., Monpoeho, S., Federighi, M., Ferré, V., y Moguedet, G. (2005) Decrease of enteric micro-organisms from rural sewage sludge during their composting in straw mixture. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 528-539.
- Powell, D. (2016) Hong Kong: City University's plan to include food safety in a veterinary course. [en línea] <http://barfblog.com/2016/09/hong-kong-city-universitys-plan-to-include-food-safety-in-a-veterinary-course/> (Consultado el 04/04/2017).
- Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G., y Girones, R. (1994) Detection of Adenoviruses and Enteroviruses in Polluted Waters by Nested PCR Amplification. , 60(8), 2963-2970.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Paslier, D. Le, Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Consortium, M., Bork, P., Ehrlich, S. D., y Wang, J. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(4 March 2010), 59-67.
- Queensland Government (2005) *Queensland Water Recycling Guidelines*, Brisbane (Australia).

- Rao, V. C., Metcalf, T. G., y Melnick, J. L. (1986) Human viruses in sediments, sludges, and soils. *Bulletin of the World Health Organization*, 64(1), 1-14.
- República de Colombia (2014) *Decreto no 1287. Criterios para el uso de biosólidos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales*, Bogotá (Colombia).
- Rezaeinejad, S., Vergara, G. G. R. V., Woo, C. H., Lim, T. T., Sobsey, M. D., y Gin, K. Y. H. (2014) Surveillance of enteric viruses and coliphages in a tropical urban catchment. *Water Research*, 58, 122-131.
- Ricardo, D. (1817) *On the principles of political economy and taxation*, London (UK), Jon Murray.
- Rice, E. W., Baird, R. B., Eaton, A. D., y Clesceri, L. S. (2012) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.
- Robles, S., Rodríguez, J. M., Granados, I., y Guerrero, M. C. (2000) Sulfite-reducing clostridia in the sediment of a high mountain lake (Laguna Grande, Gredos, Spain) as indicators of fecal pollution. *International Microbiology*, 3, 187-191.
- Rodríguez-Lázaro, D., Kovac, K., y Hernández, M. (2013) «Molecular detection of viruses in foods and food-processing environments» en N. Cook (ed.), *Viruses in Food and Water: Risks, Surveillance and Control*. Elsevier.
- Roger, M. (2009) Barcelona ya bebe agua procedente de la desalinizadora de El Prat. *El País*, 21-julio-2009. [en línea]
http://elpais.com/diario/2009/07/21/catalunya/1248138442_850215.html (Consultado el 15/05/2017).
- Ruiz-Hernando, M. (2015) *Effect of ultrasound, low-temperature thermal and alkali treatments on physicochemical and biological properties of waste activated sludge*, Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universitat de Barcelona. [en línea] <http://www.tesisenred.net/handle/10803/301434> (Consultado el 22/03/2017).
- Safferman, R. S., Rohr, M.-E., y Goyke, T. (1988) Assessment of Recovery Efficiency of Beef Extract Reagents for Concentrating Viruses from Municipal Wastewater Sludge Solids by the Organic Flocculation Procedure. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(2), 309-316.
- Salomons, W., Brils, J., SedNet Contractors, SedNet Stakeholders Panel, y SedNet Participants (2004) *Contaminated Sediments in European River Basins*, [en línea] <http://sednet.org/work/contaminated-sediments-in-european-river-basins/> (Consultado el 04/03/2017).
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., y Johne, R. (2012) PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026.
- Shah, F. A., Mahmood, Q., Shah, M. M., Pervez, A., y Asad, S. A. (2014) Review article. Microbial ecology of anaerobic digesters: The key players of anaerobiosis. *The Scientific World Journal*, 183752, 1-21.

Bibliografía

- Sidhu, J. P. S. y Toze, S. G. (2009) Human pathogens and their indicators in biosolids : A literature review. *Environment International*, 35(1), 187-201.
- Smith, A. (1776) *La Riqueza de las Naciones*, Madrid (España), Alianza Editorial. [en línea] https://my.oregonstate.edu/bbcswebdav/pid-5050176-dt-content-rid-35142642_2/xid-35142642_2 (Consultado el 04/04/2017).
- Soares, A., Gerba, C., Josephon, K., y Pepper, I. (1992) «Effect of anaerobic digestion on the occurrence of enteroviruses, Giardia cysts and indicator bacteria in sewage sludge» en IAWPRC Conference 1992. Washington D.C. (USA).
- Soares, A. C., Straub, T. M., Pepper, I. L., y Gerba, C. P. (1994) Effect of anaerobic digestion on the occurrence of enteroviruses and giardia cysts in sewage sludge. *Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology*, 29(9), 1887-1897.
- Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., y Uyttendaele, M. (2012) Extraction of food-borne viruses from food samples: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2), 1-9.
- Stiborova, H., Wolfram, J., Demnerova, K., Macek, T., y Uhlik, O. (2015) Bacterial community structure in treated sewage sludge with mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. *Folia Microbiologica*, 60(6), 531-539.
- Thermo Scientific (2011) The Future of qPCR Webinar Q&A - Best Practices, Standardization and the MIQE Guidelines.
- Tian, Z., Zhang, Y., Li, Y., Chi, Y., y Yang, M. (2015) Rapid establishment of thermophilic anaerobic microbial community during the one-step startup of thermophilic anaerobic digestion from a mesophilic digester. *Water Research*, 69, 9-19.
- UNESCO (2012) *The United Nations World Water Development Report 4: Managing Water under Uncertainty and Risk*, Paris (France). [en línea] <http://www.unwater.org/publications/publications-detail/en/c/202715/> (Consultado el 04/04/2017).
- US Environmental Protection Agency (1993) *Hydrological Simulation Program - FORTRAN. User's manual for release 10*, USA.
- US Environmental Protection Agency (2001a) *Method 1601: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Two-step Enrichment Procedure*, USA. [en línea] [https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P1002D33.txt?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=2011 Thru 2015%7C1995 Thru 1999%7C1981 Thru 1985%7C2006 Thru 2010%7C1991 Thru 1994%7C1976 Thru 1980%7C2000 Thru 2005%7C1986 Thru 1990%7C+Prior+to+1976%7C+Hardcopy+Publica](https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P1002D33.txt?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=2011+Thru+2015%7C1995+Thru+1999%7C1981+Thru+1985%7C2006+Thru+2010%7C1991+Thru+1994%7C1976+Thru+1980%7C2000+Thru+2005%7C1986+Thru+1990%7C+Prior+to+1976%7C+Hardcopy+Publica) (Consultado el 04/05/2017).
- US Environmental Protection Agency (2001b) *Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure*, USA. [en línea] <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P1002D21.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=2006+Thru+2010&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=>

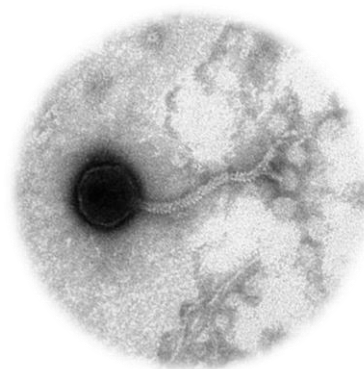
&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=
(Consultado el 05/05/2017).

- US Environmental Protection Agency (2003) *Environmental Regulations and Technology. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge.*, USA. [en línea] <https://www.epa.gov/biosolids/control-pathogens-and-vector-attraction-sewage-sludge> (Consultado el 22/02/2017).
- US Environmental Protection Agency (2006) *National Primary Drinking Water Regulations: Groundwater rule. Final Rule; 40 CFR Parts 9, 141 and 142. Federal register, vol. 71.*, Washington D.C. (USA).
- US Environmental Protection Agency (2015) *Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for ambient water quality. EPA 820-R-15-098.*, Washington D.C. (USA).
- US Environmental Protection Agency (2016) *2016 Coliphage Experts Workshop: Discussion Topics and Findings. Office of Water. EPA 823-F-16F001*, USA.
- Walters, E., Kätzl, K., Schwarzwälder, K., Rutschmann, P., Müller, E., y Horn, H. (2014) Persistence of fecal indicator bacteria in sediment of an oligotrophic river: Comparing large and lab-scale flume systems. *Water Research*, 61, 276-287.
- Warnes, S. L. y Keevil, C. W. (2004) *Horizontal Work Package 3, Task 4: Desk studies on feasibility of horizontal standard rapid methods for detection of Clostridium perfringens and enterococci in Sludges, Soil, Soil Improvers, Growing Media and Biowastes*, [en línea] https://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/hor4_enter_clos.pdf (Consultado el 25/04/2017).
- Warnes, S. L. y Keevil, C. W. (2011) Mechanism of copper surface toxicity in vancomycin-resistant enterococci following wet or dry surface contact. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6049-6059.
- Weemaes, M. y Verstraete, W. (2001) «Other treatment techniques» en L. Spinosa y P. A. Vesilind (eds.), *Sludge into Biosolids*. London (UK), IWA Publishing, 364-383.
- Western Australia Government (2012) *Western Australia Guidelines for Biosolids Management*, Perth (Australia).
- WHO (2011) *Guidelines for Drinking-water Quality. Fourth edition.* [en línea] http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf (Consultado el 03/05/2017).
- WHO (2017) *Salubridad y calidad del agua.* [en línea] http://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/es/ (Consultado el 28/05/2017).
- Wingender, J. y Flemming, H. C. (2011) Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 417-423.
- Witwer, C., Rauscher, S., Hofacker, I. L., y Stadler, P. F. (2001) Conserved RNA secondary

Bibliografía

- structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic Acids Research*, 29(24), 5079-5089.
- Wu, J., Long, S. C., Das, D., y Dorner, S. M. (2011) Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. *Journal of Water and Health*, 9(2), 265-278.
- Young, D. C. y Sharp, D. G. (1977) Poliovirus aggregates and their survival in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(1), 168-177.
- Yuan, Y., Wang, S., Liu, Y., Li, B., Wang, B., y Peng, Y. (2015) Long-term effect of pH on short-chain fatty acids accumulation and microbial community in sludge fermentation systems. *Bioresource Technology*, 197, 56-63.

9. Anexos



9. Anexos

9.1. Otras publicaciones

Se detallan a continuación otras publicaciones en las que la autora de la presente tesis ha participado.

1. Calero-Cáceres, W., Méndez, J., Martín-Díaz, J. y Maite Muniesa. 2017. The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environmental Pollution*, 223, 384-394.
2. Oviedo-Mossos, A., Cruz, A., Martín-Díaz, J., Agulló-Barceló, M., Sans, C. y Lucena, F. Indigenous somatic coliphages going through advanced water treatments and identification of a coliphage fairly resistant to photocatalytic-inactivation. Artículo en preparación.

[Environmental Pollution 223 \(2017\) 384–394](#)



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol



The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment[☆]



William Calero-Cáceres, Javier Méndez, Julia Martín-Díaz, Maite Muniesa*

Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, E-08028 Barcelona, Spain

9.2. Participaciones en congresos científicos

Se detallan a continuación las participaciones en congresos científicos.

1. Presentación de póster: Martín-Díaz, J., García-Aljaro, C., Pascual-Benito, M., Calero-Cáceres, W., Galofré, B., Blanch, A.R. y Lucena, F. Microcosms for evaluating microbial indicator persistence and mobilisation in fluvial sediments during rainfall events. 7th Congress of European Microbiologists. 7-9 de julio de 2017, Valencia, España. Federation of European Microbiological Societies (FEMS).
2. Presentación oral: García-Aljaro C., Martín-Díaz J., Viñas-Balada E., Calero-Cáceres W., Lucena F. y Blanch A. R. Mobilisation of microbial indicators, microbial source tracking markers and pathogens after rainfall events. 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. 13-19 de septiembre de 2015, Lisboa, Portugal. International Water Association (IWA).
3. Presentación oral: Calero-Cáceres W., Méndez J., Martín-Díaz J. y Muniesa M. 2017 The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their

persistence in the riverbed sediment. 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. 13-19 de septiembre de 2015, Lisboa, Portugal. International Water Association (IWA).

4. Presentación de póster: Martín-Díaz J., García-Aljaro C., Agulló-Barceló M., Pascual-Benito M., Blanch A.R. y Lucena, F. Mesocosms for evaluating microbial indicators persistence in fluvial sediments during rainfall events. 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. 13-19 de septiembre de 2015, Lisboa, Portugal. International Water Association (IWA).
5. Presentación oral: Blanch A. R., Martín-Díaz J., Casas Mangas R., García-Aljaro C. y Lucena F. Somatic coliphages as surrogates for enteroviruses in sludge hygienization treatments. Residuals and Biosolids Conference 2015: The Next Generation of Science, Technology, and Management. 7-9 de junio de 2015, Washington, USA. Water Environment Research Foundation (WERF) e International Water Association (IWA).
6. Presentación oral: Martín-Díaz J., Casas-Mangas R., García-Aljaro C., Blanch A.R. y Lucena F. Comparación de los niveles de colifagos somáticos y enterovirus en nuevos procesos de higienización de biosólidos. X Congreso SEM de Microbiología del Medio Acuático. 7-9 de septiembre de 2014, Elche/Orihuela, España. Sociedad Española de Microbiología (SEM).
7. Presentación de póster: Martín-Díaz J., Agulló-Barceló M. y Lucena F. Estudio de la morfología de los colifagos somáticos resistentes a tratamientos avanzados de aguas. XXIV Congreso de Microbiología SEM. 10-13 de julio de 2013, L'Hospitalet de Llobregat, España. Sociedad Española de Microbiología (SEM).

9.3. Becas, premios y otros méritos

1. Organización y coordinación científica: Martín-Díaz, J. y Sala-Comorera, L. II Jornada de Jóvenes Investigadores del Instituto de Investigación del Agua (IdRA). 25 de mayo de 2017, Barcelona. Instituto de Investigación del Agua de la Universitat de Barcelona (IdRA).
2. Organización y coordinación científica: Martín-Díaz, J. y Sala-Comorera, L. I Jornada de Jóvenes Investigadores del Instituto de Investigación del Agua (IdRA). 13 de mayo de 2016, Barcelona. Instituto de Investigación del Agua de la Universitat de Barcelona (IdRA).
3. Beca Formación de Personal Investigador (FPI). Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España, 2012.
4. Premio Microkit a la Comunicación oral más innovadora: Comparación de los niveles de colifagos somáticos y enterovirus en nuevos procesos de higienización de biosólidos. X Congreso SEM de Microbiología del Medio Acuático, 2014.

5. Ayudas a la movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centros de I+D 2015. Realización de estancia de 120 días de duración en The University of Queensland, Brisbane, Australia durante el año 2016. Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España, 2015.