



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Determinación de la contaminación microbiológica del agua de riego aplicando nuevas estrategias de análisis

Yexenia Irina Cárdenas Youngs

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

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

**Determinación de la contaminación microbiológica del agua de riego  
aplicando nuevas estrategias de análisis**

Memoria presentada por Yexenia Irina Cárdenas Youngs para optar al grado  
de doctora por la Universidad de Barcelona

Programa de doctorado de Biotecnología

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Rosa María Araujo Boira en el  
departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la facultad de Biología  
de la Universidad de Barcelona

Directora y tutora

La doctoranda

Rosa M<sup>a</sup>. Araujo Boira

Yexenia I. Cárdenas Youngs

Barcelona, mayo 2018



Beca doctoral otorgada por el Gobierno de la República de Panamá

SENACYT-2014 Convocatoria Doctorados o Posdoctorado de Investigación





# Dedicatoria



A mis padres,  
mis hermanos y mis bellos sobrinos,  
los amo profundamente.



“Quien fuere capaz de resolver los problemas del agua, será merecedor de dos premios Nobel, uno por la Paz y el otro por la Ciencia”

John F. Kennedy



# Abreviaturas



## Abreviaturas

ACA	Agencia Catalana del Agua
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
AS/NZS	Australian-New Zeland Standard
ATCC	American Type Culture Collection
Anneling	Emparejamiento de pares de bases
Bact. Tot.	Bacterias totales
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract Agar
BCYE/GVPC	BCYE con Glicina, polimixina, vancomicina, ciclohexamida
BOE	Boletín Oficial del Estado
°C	Grados Celsius
CEN	Comité Europeo de Normalización
CENELEC	Comité Europeo de Normalización Electrónica
COPANT	Comisión Panamericana de Normas Técnicas
Clamps	Secuencia
CG/Rx	copias genómicas por reacción
cm	Centímetro
Conc.	Concentración
CT	Umbral de ciclo
DNasa; RNasa	Endonucleasa
dNTP	Deoxirribonucleótidos
DO600	Densidad óptica a 600 nm
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganism und Zellkulturen
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
ERA	Estación regeneradora de agua
ETSI	Instituto Europeo de Normas de Telecomunicaciones
FLA	Amebas de vida libre "Free-Living Amoeba"
Fwd.	Forward, cebador directo
g	Fuerza centrífuga, o g: gramo

gBlocks	Double-stranded gBlocks gene fragments
IEC	Comisión electrotécnica Internacional
ISO	International Organization for Standardization
NTU	Nephelometric Turbidity Unit
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
pb	Pares de bases
PBS	Búfer salino de fosfato
PCA	Plate Count Modified Agar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o PCR en tiempo real
Rev.	Reverse, cebador inverso
sg.	Serogrupo
TSA	Agar tripticasa de soya
TSB	Caldo tripticasa de soya
Ufc	Unidades formadoras de colonias
u.m.a.	Unidades de masa atómica
UV	Ultravioleta
UNE	Asociación Española de Normalización
UNESCO	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura

## Tabla de contenido

Abreviaturas .....	i
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Disponibilidad a nivel mundial del agua.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. <i>Estadísticas mundiales</i> .....	1
1.1.2. <i>Situación en España y en Panamá</i> .....	5
1.1.3. <i>Diferentes usos que se le da al agua</i> .....	8
<b>1.2. Agua de riego: fuentes, riesgos y control .....</b>	<b>9</b>
1.2.1. <i>Agua depurada y regenerada</i> .....	13
□ Aguas depuradas.....	14
□ Aguas regeneradas.....	14
□ Normativa del agua de riego .....	15
1.2.2. <i>Plantas de tratamiento de aguas residuales</i> .....	16
1.2.2.1. Etapas del proceso de tratamiento de las aguas residuales ...	18
1.2.2.2. Etapas en el proceso de regeneración del agua.....	20
□ Regeneración del agua en Granollers.....	22
1.2.3. <i>Control de la calidad del agua de riego</i> .....	22
1.2.3.1. Métodos microbiológicos de control de la calidad de las aguas de riego	23
1.2.3.2. Métodos de concentración de microorganismos.....	26
1.2.3.2.1. Concentración por filtración con membrana género <i>Legionella</i> y amebas de vida libre (FLA) (protozoos).....	27
1.2.3.2.2. Concentración por filtración con una membrana monolítica de adsorción (MAF) .....	28
1.2.3.2.3. Concentración orgánica con leche desnatada (SMF) ....	28
1.2.3.3. Métodos para la detección y cuantificación de microorganismos	29
1.2.3.3.1. Métodos de cultivo .....	29
□ Cultivo en placa.....	30
□ Número más probable (NMP) .....	30
1.2.3.3.2. Citometría de Flujo “CytoFlex S” .....	30
1.2.3.3.3. PCR en tiempo real o PCR cuantitativa “qPCR” .....	33
1.2.4. <i>Comunidades microbianas de las aguas de riego</i> .....	36
1.2.4.1. Microorganismos heterótrofos en el agua de riego .....	37
1.2.4.1.1. Microorganismos indicadores de contaminación fecal....	38
□ <i>Escherichia coli</i> .....	39
□ <i>Enterococcus</i> .....	39
1.2.4.1.2. Microorganismos patógenos a considerar en el agua de riego	40
□ <i>Legionella</i> .....	40
□ Amebas de vida libre (Protozoos) .....	42
<b>1.3. Objetivos .....</b>	<b>45</b>
<b>2. Materiales y métodos.....</b>	<b>47</b>
<b>2.1. Cepas y métodos de cultivo .....</b>	<b>47</b>
<b>2.2. Detección y cuantificación de los microorganismos .....</b>	<b>49</b>
2.2.1. <i>Cuantificación mediante técnicas de cultivo: heterótrofos totales, Legionella spp. y amebas de vida libre (FLA)</i> .....	49
2.2.1.1. Cuantificación de heterótrofos totales .....	49

2.2.1.2. Detección, aislamiento, identificación y cuantificación de <i>Legionella</i> .....	50
2.2.1.2.1. Protocolo para el aislamiento e identificación del género <i>Legionella</i> .....	50
<input type="checkbox"/> Cultivo directo del filtrado.....	51
<input type="checkbox"/> Cultivo posterior al tratamiento con calor .....	51
<input type="checkbox"/> Cultivo posterior al tratamiento con tampón ácido .....	51
<input type="checkbox"/> Cultivo posterior al tratamiento combinado de calor-ácido.....	52
<input type="checkbox"/> Identificación de las cepas de <i>Legionella</i> .....	52
<input type="checkbox"/> Detección por método molecular.....	53
2.2.1.3. Cuantificación de células viables-cultivables .....	53
2.2.2. Protocolo para detectar la presencia o ausencia de amebas de vida libre	53
2.2.2.1. Cultivo en Agar No Nutritivo (NNA).....	53
2.2.3. Cuantificación por citometría de flujo .....	54
2.2.4. Determinación y cuantificación mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR o PCR cuantitativa) .....	56
2.2.4.1. Protocolos de extracción de ácidos nucleicos.....	56
Extracción con QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) .....	56
Extracción con Power Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc.).....	58
2.2.4.2. Cuantificación por PCR en tiempo real o qPCR.....	60
2.2.4.2.1. PCR en tiempo real para bacterias totales	61
<input type="checkbox"/> Estándar para elaborar la curva patrón a partir de segmentos de doble cadena de ADN gBlocks.....	61
<input type="checkbox"/> Concentración y secuencias de iniciadores y sondas.....	63
<input type="checkbox"/> Programa de temperaturas y ciclos de amplificación para la qPCR de bacterias totales.....	64
2.2.4.2.2. Cuantificación por PCR en tiempo real de <i>E. coli</i> y <i>E. faecalis</i>	65
Elaboración de las curvas patrón para ambos microorganismos... ..	66
<input type="checkbox"/> Estándar para elaborar la curva patrón a partir de células.....	66
<input type="checkbox"/> Estándar para elaborar la curva patrón a partir de segmentos de doble cadena “gBlocks” .....	67
<input type="checkbox"/> Concentración y secuencias de iniciadores y sondas.....	68
<input type="checkbox"/> Programas de temperaturas y ciclos de amplificación para las qPCRs de <i>E. coli</i> y <i>E. faecalis</i> .....	69
2.2.4.2.3. Cuantificación por PCR en tiempo real de <i>Legionella</i> spp.	70
<input type="checkbox"/> Estándar a partir de células para las qPCRs de <i>Legionella</i> spp. y <i>Legionella pneumophila</i> .....	70
<input type="checkbox"/> Concentración y secuencias de iniciadores y sondas.....	71
<input type="checkbox"/> Programa de las temperaturas y ciclos de amplificación para la qPCR de <i>Legionella</i> spp.....	72
2.2.4.2.4. Cuantificación por PCR en tiempo real de <i>Legionella pneumophila</i> .....	72
<input type="checkbox"/> Estándar para la elaboración de la curva patrón a partir de células.....	73

□	Estándar de la curva patrón elaborada a partir de gBlocks para la qPCR de <i>Legionella pneumophila</i> .....	73
□	Concentraciones de iniciadores y sondas.....	73
□	Programa de las temperaturas y los ciclos de amplificación para la qPCR de <i>Legionella pneumophila</i> .....	74
<b>2.3.</b>	<b>Procesamiento de las muestras .....</b>	<b>75</b>
<b>2.4.</b>	<b>Métodos de concentración de las muestras .....</b>	<b>75</b>
2.4.1.	<i>Floculación orgánica con leche desnatada (SMF)</i> .....	75
2.4.1.1.	Condicionamiento del agua.....	76
2.4.1.2.	Obtención de los flóculos. Concentración del sedimento.....	77
2.4.1.3.	Conservación de los concentrados .....	78
2.4.2.	<i>Filtración con una columna monolítica de adsorción (MAF)</i> .....	78
2.4.2.1.	Construcción de la columna.....	78
2.4.2.2.	Preparación de los tampones para la concentración con MAF	79
□	Tampón de elución.....	79
□	Tampón fosfato-solución salina.....	80
2.4.2.3.	Filtración .....	80
2.4.2.4.	Elución .....	80
2.4.2.5.	Ultrafiltración centrífuga .....	81
2.4.2.6.	Limpieza.....	81
2.4.2.7.	Conservación de los concentrados .....	81
<b>2.5.</b>	<b>Tipos de muestras .....</b>	<b>81</b>
<b>3.</b>	<b>Puesta a punto de los métodos moleculares para la determinación de las bacterias presentes en el agua mediante qPCR.....</b>	<b>83</b>
<b>3.1.</b>	<b>Mejoramiento y puesta a punto de las PCRs en tiempo real de <i>E. coli</i>, <i>E. faecalis</i>, bacterias totales, <i>Legionella</i> spp., y de <i>Legionella pneumophila</i> .....</b>	<b>83</b>
□	qPCR de <i>E. coli</i> .....	84
□	qPCR de <i>E. faecalis</i> .....	86
□	Programas de temperaturas y ciclos de amplificación para las qPCRs de <i>E. coli</i> y <i>E. faecalis</i> .....	87
□	qPCR de <i>Legionella</i> spp. ....	87
□	qPCR de <i>Legionella pneumophila</i> .....	89
□	qPCR de bacterias totales .....	90
<b>3.2.</b>	<b>Comparativa entre la cuantificación por cultivo en placa de TSA, la citometría de flujo, y por qPCR, utilizando dos cepas bacterianas .....</b>	<b>91</b>
<b>4.</b>	<b>Métodos de concentración para bacterias .....</b>	<b>97</b>
<b>4.1.</b>	<b>Métodos de concentración de diferentes microorganismos por floculación orgánica con leche desnatada (SMF).....</b>	<b>97</b>
4.1.1.	<i>Estudio de la recuperación de células viables-cultivables concentradas mediante por floculación orgánica (SMF)</i> .....	98
4.1.2.	<i>Estudio de la recuperación del ADN bacteriano posterior al proceso de floculación orgánica</i> .....	99
4.1.2.1.	Comparación según el método de extracción .....	99
4.1.2.1.	Recuperación de los genomas.....	100
<b>4.2.</b>	<b>Concentración de diferentes microorganismos por SMF para comparar la cuantificación genómica de <i>E. coli</i> mediante qPCR .....</b>	<b>102</b>
4.2.1.	<i>Cuantificación del ADN mediante qPCR para <i>E. coli</i></i> .....	102

4.3.	Prueba comparativa entre la floculación orgánica con leche desnatada (SMF) y la filtración con una columna monolítica de adsorción (MAF), cómo métodos para la concentración de microorganismos....	104
5.	Calidad microbiológica del agua de riego .....	109
5.1.	Cuantificación y detección de bacterias y amebas de vida libre en agua de riego .....	109
5.1.1.	Río FLuvià.....	110
5.1.2.	Agua del pozo en una granja avícola .....	112
5.1.3.	Agua de un pozo en una granja porcina.....	113
5.1.4.	Agua de pozo almacenada en una balsa para el riego de huertos	115
5.1.5.	Agua residual del afluente de la EDAR de Granollers.....	117
5.1.6.	Agua del secundario de la EDAR de Granollers .....	119
5.1.7.	Agua del tratamiento terciario-humedal de la EDAR de Granollers	121
5.1.8.	Agua de salida del terciario de la EDAR de Granollers Filtrada-clorada .....	123
5.1.9.	Agua de lagunaje posterior al tratamiento de la EDAR de Granollers	124
5.1.10.	Comparativa de la calidad del agua de riego de los distintos puntos de muestreo .....	126
5.1.10.1.	Características fisicoquímicas de las diferentes puntos de muestreo .....	126
5.1.10.2.	Características microbiológicas de los diferentes tipos de agua de riego	127
6.	Discusión de resultados.....	131
7.	Conclusiones .....	151
8.	Bibliografía .....	153
9.	Artículo publicados .....	165
10.	Anexos .....	181

# 1. Introducción



## **1. Introducción**

### **1.1. Disponibilidad a nivel mundial del agua**

#### **1.1.1. Estadísticas mundiales**

El agua no es sólo vital para los seres vivos desde el punto de vista biológico, sino que, además, es el punto central para el desarrollo sostenible de los diferentes países, ya que es fundamental para el desarrollo socioeconómico, el energético y de producción alimentaria, es la base para mantener a los ecosistemas saludables y, por ende, para la supervivencia del ser humano. Vincula a la sociedad con el medioambiente. Sin embargo, a nivel mundial a medida que las poblaciones crecen se acentúa más la brecha existente entre el recurso y la forma como disponemos de él.

La falta de recursos hídricos para satisfacer la demanda de la población humana es un problema ampliamente difundido a nivel mundial. Pareciera correcto pensar, que este problema solo lo enfrentan aquellos países con una baja disponibilidad de agua, como ocurre en muchas zonas de España. Sin embargo, vemos cómo países con abundancia de agua, enfrentan los mismos problemas que aquellos en los cuales el recurso escasea, como sería el caso de Panamá.

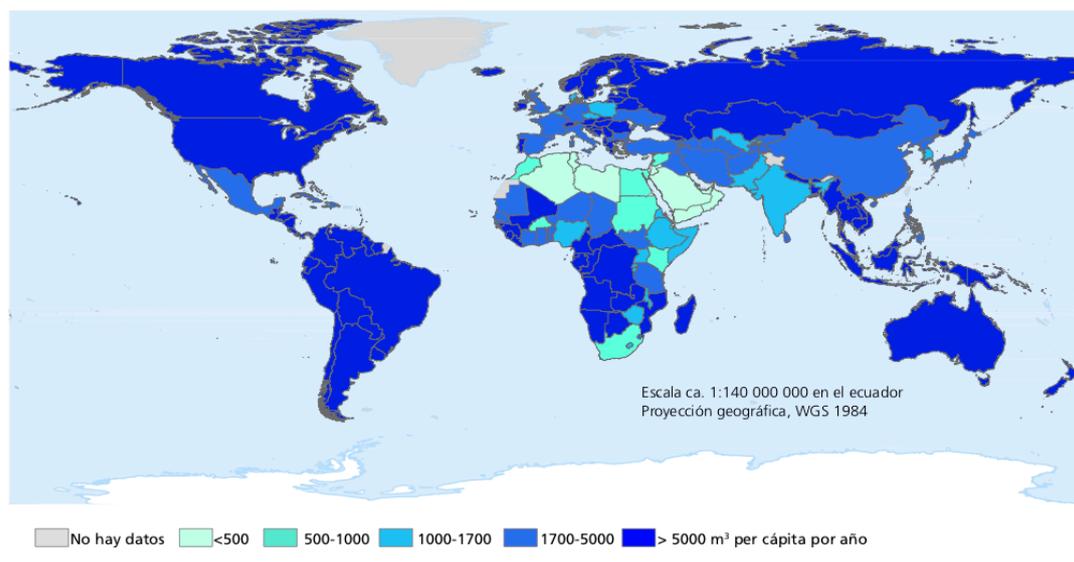
Esta deficiencia, en cuanto a disponibilidad del recurso, pareciera utópica cuando revisamos los números que nos hablan de la gran cantidad de agua que hay en el planeta Tierra. Desde siempre, nos han enseñado que 3/4 parte de nuestro planeta está cubierto de agua, lo cual nos hizo pensar, que este era un recurso infinito o con pocas probabilidades de presentar problemas en cuanto a su disponibilidad y distribución, ya que es considerado un recurso renovable (excepto ciertas aguas subterráneas), hoy en día sabemos que a pesar de la gran cantidad de agua existen muchos problemas para disponer de ella.

Los esfuerzos que se hacen hoy en día a través de diversas organizaciones internacionales, entre las que podemos destacar la OMS, FAO, UNESCO, ONU, etc. buscan reducir drásticamente la proporción de agua que es desperdiciada y aumentar su reciclaje y saneamiento, lo que va ligado a garantizar la seguridad alimentaria y reducir los riesgos de desastres y de enfermedades asociadas al consumo de agua contaminada.

La calidad el agua, no sólo la del agua que utilizamos para tomar y para realizar las diferentes actividades humanas, sino la del agua de todo el planeta Tierra, está comprometida por el uso insostenible y desmesurado de este recurso.

Está sostenibilidad sólo es alcanzable, a través del trabajo conjunto de todos los sectores que intervienen en su uso y protección, ya que, si no unimos esfuerzos para obtener dicha sostenibilidad, parecerá poco el esfuerzo individual de ciertos sectores (aquellos relacionados directamente con el agua), y la consecución de las metas de sostenibilidad del recurso planteadas desde 1992 en la Conferencia Internacional sobre el agua y el medio ambiente. A este esfuerzo conjunto de una variedad programas, políticas, leyes e investigaciones de múltiples sectores colaborando por lograr mejores resultados en la salud pública, la cual está íntimamente ligada con el agua, es lo que conocemos como “One Health” (OMS 2017).

La Figura 1.1. nos muestra a través del indicador “agua renovable per cápita” la escasez de agua en las diferentes regiones del mundo, según el informe de la UNESCO de 2016 sobre el agua y empleo (UNESCO-WWDR 2016).



**Figura 1.1:** Total de recursos hídricos renovables (m<sup>3</sup> per cápita por año), 2014. Fuente: FAO (2015a, [http://www.fao.org/nr/water/aquastat/maps/TRWR.Cap\\_eng.pdf](http://www.fao.org/nr/water/aquastat/maps/TRWR.Cap_eng.pdf)). Un área o país está bajo estrés hídrico cuando los suministros hídricos renovables caen por debajo de 1700 m<sup>3</sup> per cápita al año; sufren escasez de agua crónica cuando el suministro cae por debajo de los 1000 m<sup>3</sup> per cápita por año, y sufren escasez absoluta si el suministro cae por debajo de 500 m<sup>3</sup> per cápita por año.

Sabemos que, aunque es mucha el agua que hay en el planeta, la gran mayoría de ella está distribuida de forma desigual y su accesibilidad es difícil para el ser humano. Un total del 71% de la superficie terrestre es cubierta con agua, y aunque esto suponga una gran cantidad de agua, sólo una pequeña cantidad es utilizable para el consumo humano. Del total de agua existente en el planeta, el 96,5 % es agua salada, y sólo el 3,5 % es agua dulce. De esta cantidad de agua dulce, el 68,6 % está congelada, el 30,1 % es agua subterránea y el 1,3 % es agua dulce superficial y almacenada en otros tipos de recursos. La principal fuente de agua para todos los usos humanos y ecosistemas es la precipitación (Fernández-Jáuregui 1999) (PNUMA-ONU 2002) y (National Geographic en Español Abril 2010).

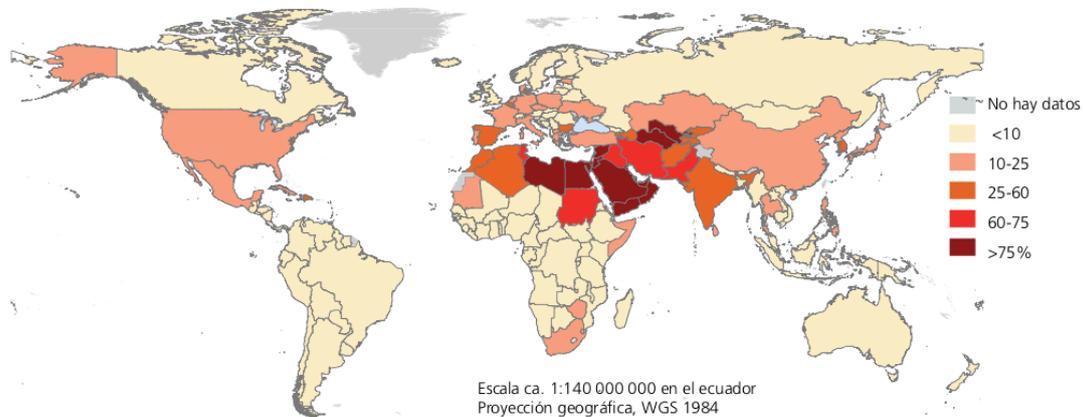
En la siguiente figura (Figura 1.2.) se muestran la distribución en porcentajes del agua dulce en cada región y el porcentaje de la población a la que suplen en las diferentes zonas del mundo, evidenciando lo antes mencionado sobre la desigual distribución del agua, y la alta demanda con respecto a la oferta que hay en la mayoría de las regiones.



**Figura 1.2:** Distribución porcentual de la población en diferentes zonas del mundo y el porcentaje de agua dulce con el cual cuentan para su abastecimiento. Fuente de datos: PNUMA, Perspectivas del medio ambiente mundial. 2002.

De este porcentaje de agua que posee cada región, hay regiones que utilizan una gran proporción de ella, y otros, que, por su bajo desarrollo debido a su

economía, no logran utilizarlas en diferentes actividades ni todos sus habitantes tienen acceso a ella. La siguiente figura (Figura 1.3.) nos proporciona una idea general de cuánta agua es utilizada por cada región.



**Figura 1.3:** Porcentaje de recursos hídricos renovables consumidos. Fuente: FAO (2015a, [http://www.fao.org/nr/water/aquastat/maps/MDG\\_eng.pdf](http://www.fao.org/nr/water/aquastat/maps/MDG_eng.pdf)).

El mal uso, la deficiencia en los sistemas de distribución y de saneamiento, lo que ha provocado en el mismo problemas de contaminación, han convertido este recurso renovable, en un recurso escaso por la alta demanda de este y la baja oferta, provocando en algunos casos conflicto social. Es por ello que en la actualidad a este recurso se conoce como el “oro azul” del siglo XXI (Martínez, A. 2016) y es considerado por muchos como un recurso natural crítico, por su baja disponibilidad natural o económica, su desigual distribución y el poder que genera la tenencia del mismo (Fernández-Jáuregui 1999).

Desde la década de los setenta, las Naciones Unidas se ha encargado de difundir ampliamente la preocupación por la crisis mundial que se enfrentaba en este recurso, debido al insuficiente abastecimiento de agua, aunado a la creciente demanda de esta, para las diferentes actividades humanas cotidianas, las comerciales y las agrícolas. Así lo hicieron saber en “La conferencia de las Naciones Unidas sobre el Agua (1977), en el Decenio Internacional del Agua Potable y del Saneamiento ambiental (1981-1990), la Conferencia Internacional sobre el agua y el medio ambiente (1992) y en la Cumbre para la Tierra (1992), lo que contribuyó a que más de mil millones de personas lograran conseguir acceso a agua potable en los países en desarrollo.

En el siguiente decenio (Decenio Internacional de Acción “Agua para la Vida” del 2005-2015) se logró que miles de millones de personas, en los países en desarrollo, obtuvieran agua potable e impulsó el progreso en materia de saneamiento como parte del esfuerzo por alcanzar los Objetivos de Desarrollo del Milenio. Aún así, aún hay mucho camino por recorrer en cuanto a este tema, y los desafíos se plantean en algunas agendas para el desarrollo Sostenible, la disminución de los riesgos de desastres, sobre la financiación para el desarrollo y los acuerdos sobre el Cambio Climático llevados a cabo en Paris en el 2015, marcando el 2015 como el inicio del decenio Internacional para la Acción “Agua para el desarrollo sostenible”.

Todos estos acuerdos y agendas están fundamentados en la relación existente entre el agua, el saneamiento y la higiene como vías para erradicar la pobreza extrema y las enfermedades en los países más pobres del mundo, además de allanar el camino hacia el crecimiento económico de un país o región (UNESCO-WWDR 2016).

La Organización Mundial para la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) afirman que hay 2,5 billones de personas que no disponen de instalaciones básicas de saneamiento, y más de 1000 millones beben agua que se distribuye a través de sistemas vulnerables a la contaminación.

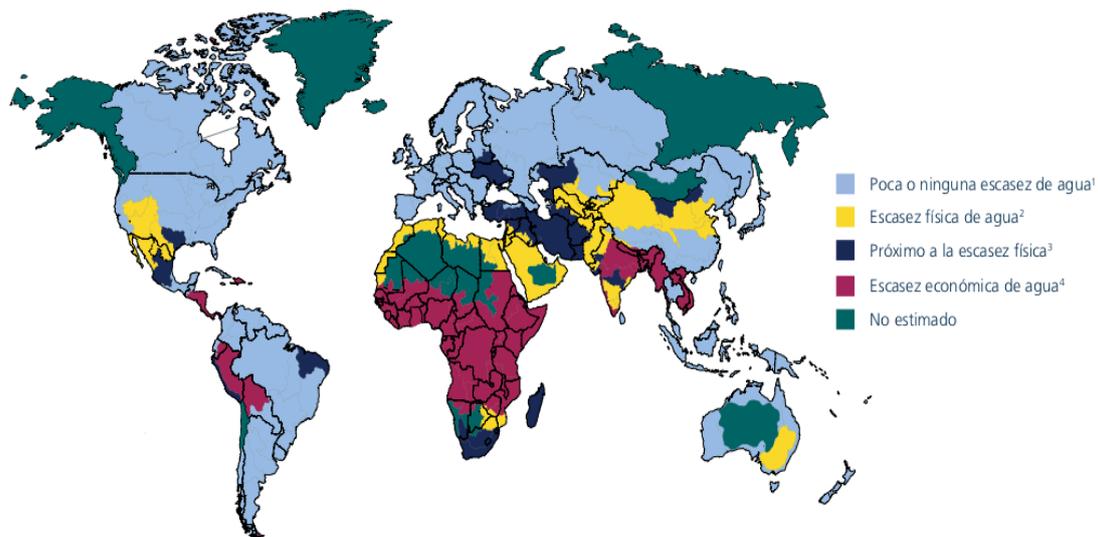
El agua no potable y la falta de saneamiento, son los dos factores que contribuyen en mayor grado a la mortalidad infantil, causando la muerte de 1,5 millones de niños al año (PNUMA-ONU 2002), además de las grandes pérdidas a nivel de sectores como el agrícola, el industrial y el minero, debido a que estos se ven afectados cuando la salud de su fuerza laboral se ve afectada por el uso de agua no potable (UNESCO-WWDR 2016).

### **1.1.2. Situación en España y en Panamá**

La escasez de agua es un fenómeno influenciado tanto por la naturaleza como por la actividad humana. Su distribución desigual, su desperdicio y contaminación, aunado a la mala gestión que se hace del recursos en algunas

regiones, ha producido efectos perjudiciales para la humanidad, uno de ellos la escasez que sufren muchas regiones mundiales actualmente.

La escasez del agua que enfrentan algunas regiones se debe a la falta del recurso, pero en otras regiones, la escasez se debe a la insuficiente infraestructura para llevar el vital líquido a toda su población, en otras palabras, debido a la economía del país o región. El siguiente mapa (Figura 1.4.) se representa la escasez de agua a nivel mundial.



**Figura 1.4:** Mapa físico y económico de la escasez de agua a nivel mundial. Fuente: WWDR: Informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo 2016, Agua y empleo (pág. 32 de 164).

De acuerdo con estos datos, publicados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación, encontramos que Panamá cuenta con una precipitación anual de 2928 mm anuales, encontrándose en la posición número 5 de la lista con mayor precipitación, y en el lugar número 126, con 636 mm de precipitación anual se encuentra España.

En España, la carencia de agua es uno de los problemas territoriales más importantes y el más crítico en relación con otros recursos naturales dentro del país. Esto evidencia la baja disponibilidad de agua en España, frente a la abundante disponibilidad de esta en Panamá.

No obstante, cuando hablamos de los porcentajes de la población que tienen acceso al agua de consumo humano, tenemos que decir que apenas el 88 % de

la población en Panamá tiene acceso al recurso de forma segura y un bajo porcentaje tiene acceso al saneamiento del agua residual (sólo en las capitales de las diferentes provincias 20 - 30 %), en cambio en España, más del 91 % de la población tiene acceso a agua potable y al saneamiento de las aguas residuales producidas (UNESCO-WWDR 2017), siendo el país de la Unión Europea con mayor capacidad de reutilización de las aguas residuales (Raso 2013).

Panamá, un país rico en abundancia de agua, presenta escasez debido a la insuficiencia económica del país y la mala distribución de la riqueza, esto se ve reflejado en la falta de la infraestructura necesaria para transportar el agua desde los ríos y acuíferos a la población, y luego de ser utilizadas, infraestructuras que permitan canalizar y sanear adecuadamente las aguas residuales antes de ser devueltas al ambiente.

Sin embargo, en España, un país con baja proporción de agua por precipitación, no presenta escasez en la disponibilidad del recurso para su población (Moreno 2006). Para solventar los problemas de disponibilidad del agua en España se están creando diferentes programas y legislaciones, como la establecida en el Plan Hidrológico Nacional. De acuerdo con la Ley 10/2001 del Plan Hidrológico Nacional (PHN), España es un país en el que el agua es un recurso escaso, marcado por graves desequilibrios debidos a su irregular distribución. Esta fue modificada por la Ley 11/2005. Estas diferencias, en cuanto a punto de vista, si considerar o no a España como un país con problemas críticos en la disponibilidad del agua, se debe a que al hacer el balance entre las precipitaciones de las regiones con suficiente disponibilidad de agua y los que tienen escasez de agua compensa numéricamente los valores reportados para el país, pero al ver la disponibilidad de agua por regiones se notan los números rojos en cuanto a disponibilidad en algunas zonas. La variabilidad estacional, que determina el régimen fluvial es muy marcada, concentrando las lluvias principalmente durante el otoño y la primavera, sin embargo, en las zonas montañosas el régimen fluvial es mas uniforme. Los períodos de sequias también son variables, por lo que puede que se presente sequía en ciertas

cuencas, y en otras o se da muy leve o no se da (Agència Catalana de l'Aigua 2016).

### 1.1.3. Diferentes usos que se le da al agua

En los últimos 100 años, la demanda del recurso hídrico a nivel mundial ha aumentado dos veces más que la tasa de crecimiento de la población. Esto ha provocado escasez hídrica en ciertas regiones del mundo, principalmente por la mala distribución de esta, el desperdicio que se hace en su utilización, a la contaminación de esta y la forma insostenible en que se gestiona en muchas regiones.

La utilización que se le da a los recursos hídricos va en aumento con la cantidad de agua disponible para cada población. En la actualidad se utilizan alrededor del 54 % del agua dulce que hay en disponibilidad, para el 2025 se espera que este porcentaje haya aumentado al 70 %, y dentro de 25 años se espera que el ser humano este utilizando mas del 90 % del agua disponible, dejando solo el 10 % para el resto de las especies que habitan el planeta.

Cuando hablamos de utilización del agua, los porcentajes que se usan para las diferentes actividades humanas varían de acuerdo a la región de la cual se esté hablando (Banco Mundial 2011), y también va ligada al nivel de ingresos de cada región. Por ejemplo, según el Banco Mundial, para el 2001, el uso alternativo que se le daba al agua era el siguiente (Tabla 1.1.):

**Tabla 1.1:** Usos alternativos del agua según los niveles de ingresos de los países estudiados.

Uso	Mundo (general) %	Países de ingresos elevados	Países de ingresos medios y bajos
<b>Agrícola</b>	70 %	30 %	82 %
<b>Industrial y minería</b>	22 %	59 %	10 %
<b>Doméstico</b>	8 %	11 %	8 %

Fuente: Banco Mundial, 2001. De acuerdo con los indicadores de desarrollo. (WDI).

De acuerdo a estos datos, podemos decir de forma general, que la mayor cantidad del agua dulce que es utilizable por el ser humano se utiliza en la agricultura y la ganadería, seguido por el agua utilizada por la industria y la

minería, y finalmente, la menor cantidad del agua tiene uso doméstico (Acosta and Martínez 2010). Cuando analizamos las variaciones existentes entre el pertenecer a un grupo donde la población tiene altos ingresos y pertenecer a un grupo de medios y bajos ingresos, podemos decir que, aunque en el consumo doméstico se mantienen similar entre los dos grupos. Cuando hablamos de las áreas agrícola e industrial, las diferencias son marcadas, ya que, por ejemplo, en los países con altos ingresos, la mecanización de la agricultura y la ganadería ha llevado a que el agua necesaria para este sector sea menor para producir grandes cantidades de alimentos en contraposición a los de ingresos medios y bajos en donde para producir los alimentos se necesitan grandes cantidades de agua, debido a la ineficiencia de los sistemas de cultivo utilizados. Los países con altos ingresos están altamente industrializados provocando el aumento de la cantidad de agua que se necesita para este sector, sin embargo, en los países con medios y bajos ingresos el desarrollo de la industria y la minería es poca, por lo cual el agua usada en estas actividades es menor.

## **1.2. Agua de riego: fuentes, riesgos y control**

El ser humano a lo largo del tiempo ha aprendido a suplir la escasez de agua para producir alimentos o para mejorar zonas recreativas, entre otras actividades, con sistemas de riego. Estos sistemas suplen la escases de agua con la cantidad de agua necesaria para el cultivo de las plantas (sean de productos alimenticios o arboles maderables, grama, etc.), para el uso en la industria u otras actividades.

Los diferentes recursos que son utilizados como fuentes de agua para regadíos son los ríos, los acuíferos subterráneos, el agua potable, el agua de lagos, embalses, manantiales, el agua procedente de estaciones depuradoras de agua residual, inclusive el agua desalinizada (sólo que este tipo de recurso amerita una gran inversión de capital ya que el proceso de desalinización es costoso, además que conlleva el riesgo de salinización de las tierras). El agua de los ríos y los freáticos son la fuente principal del agua que se utiliza para el riego. Sin embargo, la actual escasez del agua ha llevado a algunos países a utilizar el agua regenerada, producto del tratamiento de las aguas residuales y su

desinfección, como agua para el riego, inclusive algunas zonas utilizan las aguas residuales no tratadas, o poco tratadas para regar campos de cultivo.

En muchos países la promoción y/o la inversión en sistemas de riego constituye una de las principales inversiones del sector público. Sin embargo, aunque son muchas las ventajas del correcto uso de los sistemas de riego para la producción agrícola o para la jardinería, también existen riesgos asociados al uso de aguas de riego contaminadas, por lo cual necesitamos asegurarnos de que el agua utilizada para el riego es segura.

El uso de aguas de riego está asociado a que haya una mayor incidencia de enfermedades transmitidas o relacionadas con el uso de aguas de riego contaminadas (Ruiz 2004), aumento de la cantidad de plagas y enfermedades agrícolas ya que durante la temporada seca se suelen eliminar de forma natural muchas de las plagas agrícolas, el uso desmesurado de las tierras en la agricultura ha causado la erosión de los suelos, y con ello los problemas asociados con la recuperación de los mismos, la contaminación con plaguicidas las aguas superficiales y las aguas subterráneas aledañas a las explotaciones agrícolas, lo que además provoca el deterioro de la calidad del agua, la salinización y saturación de los suelos, entre otros problemas.

Todos estos riesgos asociados al uso de las diferentes fuentes de agua en los regadíos nos han llevado a plantearnos legislaciones que contemplen las pautas a seguir para el correcto uso del recurso hídrico en los regadíos, normas que promuevan la calidad de estas aguas de riego para lograr la sostenibilidad del recurso además de la inocuidad de este al ser devuelto al medio ambiente.

Las diferentes actividades humanas desarrolladas por los seres humanos utilizando el agua dulce, generan aguas residuales, las cuales deben ser gestionadas adecuadamente para poder alcanzar el objetivo de dar un uso sostenible del recurso hídrico. En los países en vías de desarrollo, este objetivo está lejos de ser alcanzado en el próximo decenio, debido a la carencia de la infraestructura necesaria para realizar este trabajo, a la insuficiencia de recursos económicos que atraviesan la mayoría de estos países, y a las deficiencias técnicas e institucionales que padecen.

En los países en desarrollo se estima que más del 80 % del total de las aguas residuales industriales y municipales se liberan al medio ambiente sin ningún tratamiento previo. En los países desarrollados, a pesar de décadas de regulación y de grandes inversiones para reducir la contaminación del agua de fuentes puntuales, los desafíos de la calidad del agua perduran como resultado de una regulación insuficiente de las fuentes difusas de contaminación (UNESCO-WWDR 2018).

La motivación para llevar adelante tratamientos avanzados de las aguas residuales esta fundamentado en el deseo de mantener la calidad del medio ambiente y/o de contar con una fuente de agua alternativa a la hora de enfrentar la escasez hídrica, además de reducir de forma significativa los riesgos para la salud que acarrea el contacto de los humanos con los excrementos a lo largo de la cadena de saneamiento. Por cada dólar que se invierte en el saneamiento de los desechos humanos, se estima que retorna a la sociedad 5,5 dólares. Hoy por hoy, el agua residual regenerada es utilizada en muchos países desarrollados como agua para regadíos, tanto agrícolas, como urbanos y recreativos, e incluso en muchos países es utilizada de forma directa o indirecta para el consumo humano. Esto se debe a que su uso contribuye a reducir la demanda de agua, a reciclar nutrientes, mejorar la salud del suelo y reducir la cantidad de contaminantes que se vierten en los cursos de agua (Hanjra et al. 2012).

El aumento en los vertidos de las aguas residuales sin tratar, junto con la escorrentía que se producen en las tierras utilizadas en la agricultura y las aguas residuales industriales que han sido tratadas inadecuadamente, han llevado al deterioro de la calidad del agua en el mundo entero. Esta situación pone en riesgo la salud humana y de los ecosistemas.

El 70 % de las aguas residuales municipales e industriales que se generan en los países de ingresos altos reciben tratamiento. Pero cuando hablamos de los países con ingresos medio-altos, este porcentaje se reduce al 38 %, y se reduce aún más, en los países con ingresos medios-bajos, a un 28 %. La situación lejos de mejorar, se agrava más cuando hablamos de los países de ingresos bajos, en donde el porcentaje de aguas residuales que reciben tratamiento es de sólo el 8 % (UNESCO-WWDR 2013).

El uso de las aguas residuales como una fuente de agua y abono en la agricultura involucra grandes riesgos para la población, no sólo para las personas que tengan contacto directo con estas aguas en los campos de cultivo, sino también, para aquellas que consuman los productos que han sido regados con este tipo de agua. Esto se debe a que, aunque algunos microorganismos y virus son inactivados al ser expuestos a la luz solar por ciertos períodos de tiempo, muchos son capaces de sobrevivir a condiciones realmente desfavorables, lo que los convierte, en posibles agentes causales de enfermedades asociadas al consumo de productos que han sido regados con aguas residuales. Inclusive, el uso de aguas de ríos o aguas subterráneas contaminadas debido a la actividades humanas cercanas a sus orígenes, son fuentes de riesgos para la salud humana y de los ecosistemas (Becerra-Castro et al. 2015).

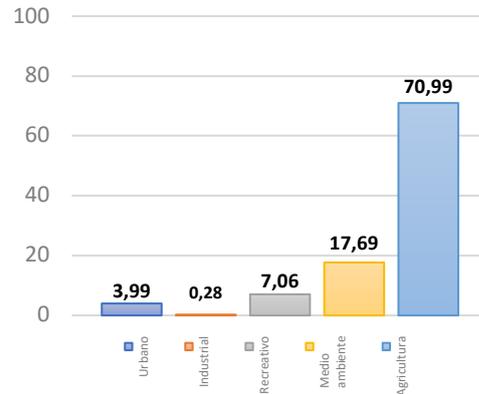
El riego con agua residuales tratadas tiene serias implicaciones al ser utilizadas ya que estas pueden alterar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del suelo, y / o introducir y contribuir a la acumulación de contaminantes químicos y biológicos en el suelo y en las plantas regadas con estas aguas. Ambos factores deben ser tratados con cuidado pues pueden suponer un riesgo para la salud humana y ambiental, además de los efectos en la productividad agrícola del suelo (Becerra-Castro et al. 2015) (Mapanda et al. 2005) y (Hanjra et al. 2012).

Uno de los aspectos a tomar en cuenta a la hora de seleccionar el tipo de agua que se utiliza para el riego, y la calidad que debe reunir la misma, es el del tipo de sistema de riego que se vaya a utilizar. Los sistemas de riego más comunes son: riego por surcos o arroyamiento, riego por inundación, riego por aspersión, riego por infiltración o canales, el riego por goteo o riego localizado y el riego por drenaje, entre otros.

En España del total de agua residual que se depura y se regenera a través de las ERAs, la mayor parte es utilizada para la agricultura. En la siguiente tabla (Tabla 1.2.) podemos ver en porcentajes los diferentes usos que se le da al agua reutilizada (Iglesias et al. 2010).

**Tabla 1.2:** Usos que se le da al agua regenerada en España.

Usos	Cantidad Hm <sup>3</sup>	Porcentaje
Urbano	14689	3,99
Industrial	1014	0,28
Recreativo	25980	7,06
Medio ambiente	65148	17,69
Agricultura	261368	70,99
<b>Total</b>	<b>368199</b>	<b>100</b>



No toda el agua depurada pasa a ser regenerada en España, pero del total regenerado en este país, cómo se puede apreciar en esta tabla 1.2, el mayor porcentaje se utiliza en la agricultura como agua de riego, casi el 71%.

### 1.2.1. Agua depurada y regenerada

La utilización de sistemas de tratamiento para el saneamiento de las aguas residuales con el fin de producir aguas depuradas y aguas regeneradas que puedan ser devueltas a los sistemas hídricos naturales, es una acción que se va implementando y promoviendo cada día con mayor auge, no sólo a nivel de los países desarrollados, sino también, de los que están en desarrollo. Sin embargo, la producción de aguas depuradas y regeneradas debe estar legislada claramente para garantizar así la calidad de estas antes de ser utilizadas o vertidas al medio ambiente. Sólo el 26 % de los servicios de saneamiento y aguas residuales urbanos y el 34 % de los rurales previenen de forma eficaz el contacto humano con heces a lo largo de toda la cadenas de saneamiento, y por tanto se puede considerar manejada de forma segura.

En el caso de la legislación española, cuando hablamos de aguas depuradas y aguas regeneradas hay que tener en cuenta que, aunque parezcan similares ambos conceptos, son diferentes. Para apreciar claramente las diferencias entre el agua depurada y el agua regenerada, plantearemos ambos conceptos como están definidos en el RD 1620/2007 (Boletín Oficial del Estado 2007):

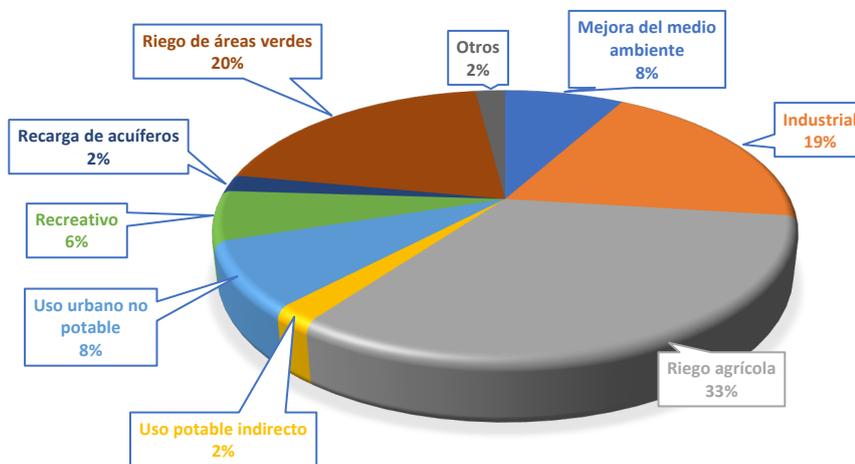
- **Aguas depuradas**

son aquellas aguas residuales que han sido sometidas a un proceso de tratamiento que permite adecuar su calidad a la normativa de vertidos aplicable, (RD 509/1996 por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas). No siempre opta por ser reutilizada, sino que su destino es el de ser vertida al dominio hidráulico o al marino, según convenga.

- **Aguas regeneradas**

son aquellas *aguas residuales depuradas* que han sido sometidas a un proceso de tratamiento adicional o complementario que permite adecuar su calidad al uso al que se destinan. El objetivo de este tratamiento es obtener un agua que va a ser utilizada nuevamente.

A nivel mundial, el uso que se le da al agua regenerada en porcentajes es el que se presenta en la figura 1.5.:



**Figura 1.5:** Usos del agua reutilizada a escala mundial. Fuente: Revista Agua y Territorio N° 8, (Prats-Rico 2016).

Según los datos expresados en esta gráfica más del 50 % del agua regenerada a nivel mundial es utilizada como agua para regadíos, ya sean en la agricultura o en la jardinería.

- **Normativa del agua de riego**

Muchas enfermedades gastrointestinales son adquiridas por el consumo de alimentos que han sido regados con aguas que no cumplían con las normativas establecidas que aseguran la calidad de estas y su inocuidad para el hombre y el medio ambiente. En muchos países en desarrollo, incluso en los países desarrollados no es poco común la utilización de aguas residuales, depuradas o no, para el riego de cultivos. Y, aunque se visualicen muchos beneficios en la utilización de las aguas de riego, ya sean provenientes de ríos, pozos, residuales depuradas o regeneradas, por el alto riesgo que simboliza no sólo para el medio ambiente sino para la salud de las personas que entran en contacto con ellas, su producción y calidad debe estar regida por normas y leyes exigentes.

El RD 509/1996 de 15 marzo, habla sobre las normas aplicables al tratamiento de aguas residuales urbanas, de la definición de zonas sensibles y zonas menos sensibles. Y cómo ya hemos mencionado anteriormente, también encontramos la regulación de las aguas depuradas regeneradas para el uso en diferentes tipos de actividades reglamentadas en el RD 1620/2007. Igualmente, en la Norma ISO 16075:2015 se encuentran las directrices para el desarrollo e implantación de proyectos de aguas residuales depuradas, así como una serie de temas de interés asociados a los mismos, tales como la calidad del agua, los tipos de cultivos que se pueden regar, los riesgos asociados y los principales componentes del proyecto. En la norma UNE-EN ISO 11731:2017 se especifican los métodos de análisis aplicables a todo tipo de muestras de agua, incluyendo potables, industriales, residuales y naturales, los cuales también pueden aplicarse a matrices relacionadas con el agua, como por ejemplo, películas biológicas, sedimentos, etc.

En España, la legislación que se ocupa de las aguas depuradas y regeneradas es el Real Decreto 1620/2007 del 7 de diciembre por el cual se establece el régimen jurídico de reutilización de las aguas depuradas, además de los criterios sanitarios que se toman en cuenta para demostrar la calidad del agua depurada que se utilizan para el riego en España.

De acuerdo con el Real Decreto 1620/2007 los usos que se le pueden dar a las aguas depuradas son los siguientes: usos urbanos, agrícolas, industriales, recreativos y ambientales.

Si la utilidad que se le dará a las aguas depuradas es su vertido en el ambiente, sus criterios de cumplimiento se establecen en la Directiva 91/271/CEE del Real Decreto español 509/1996, de 15 de marzo. Esta norma exige el tipo de tratamiento en función de las zonas en la que se realizará el vertido (normal, sensible o menos sensible) y también en función de la población urbana considerada. Esta norma se refiere en particular a las zonas con peligro de eutrofización y las zonas marinas o medios en donde el vertido de las aguas residuales no tenga efectos negativos en el medio.

En el caso de Panamá, su reglamentación se ve reflejada en el Reglamento Técnico DGNTI-COPANIT 24-99, Agua, reutilización de las aguas residuales (MICI Panamá 2000).

Con respecto a la normativa panameña, DGNTI-COPANIT 24-99, en ella se reúnen los requisitos que deben reunir las aguas destinadas a recreación y estética, consumo de animales (DGNTI-COPANIT 395), agua de riego, agua para la vida acuática y acuicultura, para uso urbano (riego de áreas verdes, viveros, cementerios, fabricación de concreto, lavado de autos, etc.), agua destinada a la recuperación de hábitat, recarga de acuíferos y aguas para el uso industrial y comercial.

En el Anexo I A, I B y I C encontramos las normativas permitidas por el RD 1620/2007 para España, y las normativas contenidas en el Reglamento Técnico DGNTI-COPANIT 24-99 para Panamá en el Anexo I D. En ambas normas se contemplan los requisitos que deben reunir las aguas depuradas al ser reutilizadas en diferentes actividades en donde haya el riesgo de contaminación del medio ambiente y riesgo para la salud humana.

### **1.2.2. Plantas de tratamiento de aguas residuales**

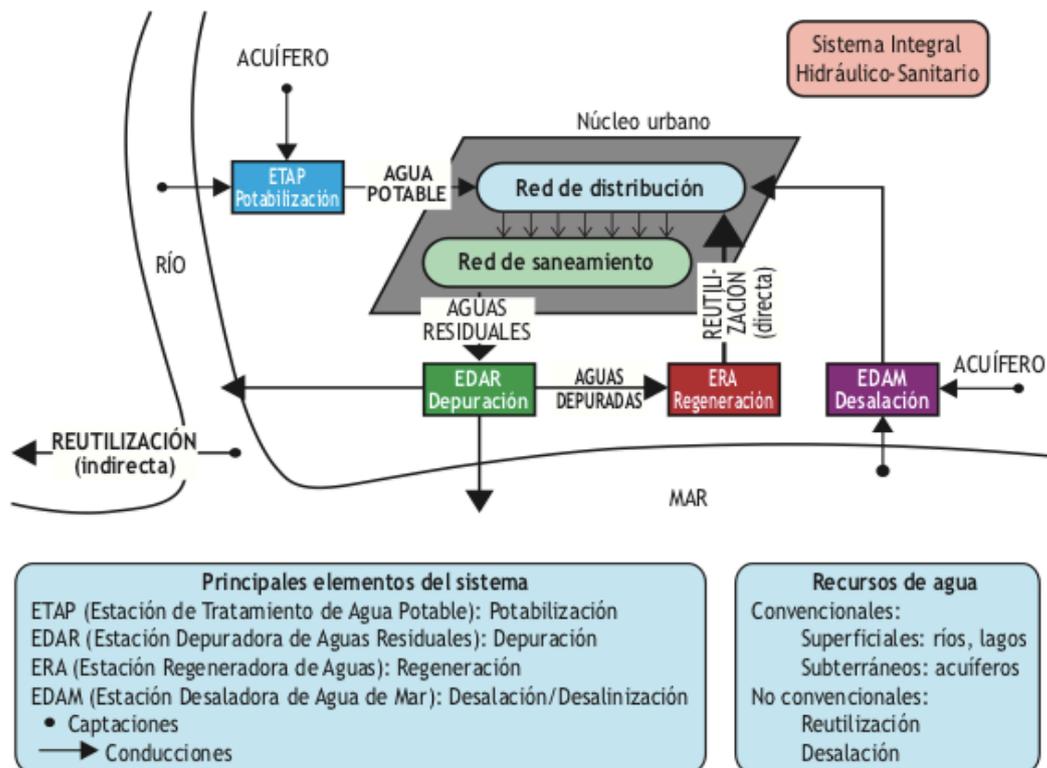
Desde el año 97 en la antigua Roma, se vislumbraba la importancia que le otorgaban las poblaciones organizadas al suministro adecuado del agua. En la

actualidad, se tienen claras evidencias de que el uso inadecuado de este recurso renovable puede provocar problemas no sólo de tipo sanitario, sino que también puede ocasionar problemas socioeconómicos y ambientales. Es por ello por lo que se han ideado sistemas que nos permitan su utilización segura desde sus fuentes naturales hasta sistemas que nos faciliten la captación de las aguas que han sido utilizadas por una población, depurarlas y sanearlas de forma sostenible, para ser reutilizadas nuevamente en otras actividades o devolverlas al ambiente.

Se entiende por depuración, o tratamiento de las aguas residuales, al conjunto de operaciones encaminadas a eliminar o reducir los agentes contaminantes presentes en el agua residual. Este proceso ocurre en la naturaleza en los cursos de agua mediante mecanismos de autodepuración, pero este proceso es lento y la alta demanda que hacen las poblaciones humanas del mismo, impiden que este proceso se de forma natural con la rapidez necesaria para la regeneración natural del agua (Arrojo 2009).

La depuración de las aguas residuales, actualmente, se lleva a cabo por sistemas de depuración con alto rendimiento en cuanto a calidad fisicoquímica y microbiológica. Estos sistemas aceleran o intensifican los procesos de autodepuración de los medios receptores, forzándolos en un tiempo y espacios mínimos. La depuración de las aguas residuales consiste en una serie de procesos fisicoquímicos y biológicos cuyo objetivo principal es obtener un agua depurada con los niveles de contaminantes físicos, químicos y biológicos que estén establecidos en las normas que rigen las aguas depuradas según su uso posterior para determinada región o país. Este proceso se lleva a cabo en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR). En este trabajo de investigación trabajaremos con diferentes muestras procedentes de la EDAR de Granollers, desde el agua de entrada al sistema hasta el agua de salida de este, enfocándonos principalmente en la calidad del agua de salida del sistema, ya que esta es el agua que se regenerará para luego ser utilizada en el riego. La información técnica referente a esta EDAR se encuentra publicada en la página [www.iagua.es/data/infraestructuras/edar/granollers](http://www.iagua.es/data/infraestructuras/edar/granollers).

Una vez que se ha dado el proceso de tratamiento de las aguas residuales, se ha avanzado en el nivel de tratamiento llevando los efluentes depurados a regenerarse, sometiéndolos a tratamientos complementarios para adecuar su calidad a la normativa de reutilización. Estos tratamientos se llevan a cabo en Estaciones Regeneradoras de Aguas (ERA), esto es un conjunto de instalaciones donde las aguas residuales depuradas se someten a los procesos de tratamiento adicional que puedan ser necesarios para adecuar su calidad al uso previsto (reutilización) (Trapote-Jaume 2016).



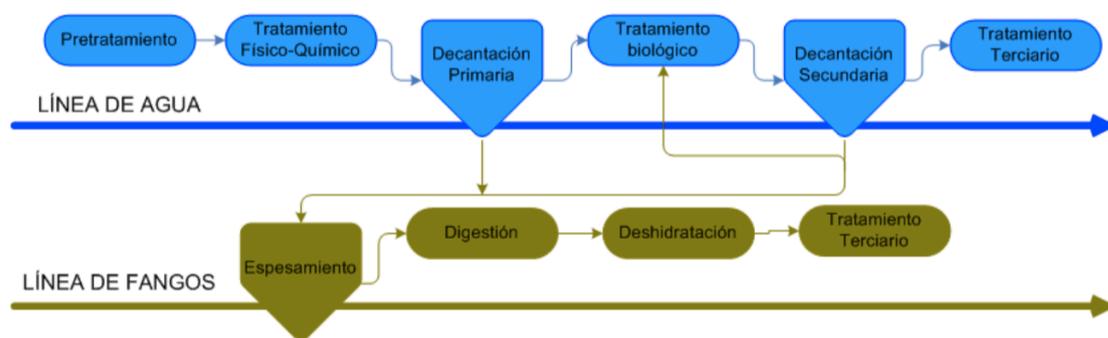
**Figura 1.6:** Esquema del ciclo hídrico urbano (Trapote-Jaume 2016).

### 1.2.2.1. Etapas del proceso de tratamiento de las aguas residuales

El proceso de depuración de las aguas residuales, de diferente índole, es un proceso ampliamente difundido, que busca depurar de las aguas tratadas los diferentes contaminantes que encontramos en ellas y que pueden ser causantes de enfermedades en la población. Los principales microorganismos que encontramos en este tipo de aguas son los procariotas, y son los principales

responsables de las transformaciones que puedan sufrir otros contaminantes del agua como el nitrógeno, el fósforo y carbono.

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales consisten en la utilización de técnicas intensivas, que necesitan para poderse llevar a cabo poca superficie de terreno y tiempos de retención hidráulicos pequeños. Generalmente, en las EDARs se diferencian dos líneas de tratamientos: el tratamiento a la línea de agua y el tratamiento a la línea de fangos.



**Figura 1.7:** Esquema básico de una depuradora de aguas residuales (Abzazou 2016).

El tratamiento en la línea de agua se divide en 4 etapas: pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario, las cuales describiremos brevemente (Trapote-Jaume 2016):

**Pretratamiento:** tiene como objetivo separar del agua residual las materias groseras, que por su naturaleza o tamaño podrían causar problemas de operación y / o mantenimiento en las instalaciones (maquinaria, conducciones, etc.) y unidades de depuración posteriores. Tales son los casos de los grandes sólidos, materias flotantes de gran tamaño, gravas, arenas y sólidos de pequeño tamaño, aceites, grasas y flotantes de pequeño tamaño. Las operaciones y técnicas que comprende el pretratamiento son: el desbaste (mediante rejillas y / o tamices), el desarenado y el desengrasado.

**Tratamiento primario:** su objetivo es separar del agua residual los sólidos suspendidos sedimentables por gravedad. La operación más frecuente

es la decantación o sedimentación primaria, que se realiza en decantadores primarios.

**Tratamiento secundario:** este tratamiento tiene como objetivo eliminar la mayor parte de la materia orgánica (disuelta y coloidal) y de los sólidos suspendidos no sedimentables. En la depuración de las aguas residuales urbanas se utilizan principalmente procesos de tipo biológico, motivo por el cual a este tratamiento se le suele llamar tratamiento biológico.

Los sistemas de tratamientos pueden ser de biomasa suspendida y de biomasa fija. Los de biomasa suspendida encontramos el sistema típico de fangos activos, y entre los segundos, el de lechos bacterianos.

Este tipo de procesos se encuentran dentro de las denominadas tecnologías duras o intensivas (el más difundido a nivel mundial es el de fangos activados), por contraposición a las conocidas como tecnologías blandas, naturales o extensivas (lagunajes, humedales artificiales, filtros verdes, etc.).

Las instalaciones de las líneas de agua (pretratamiento, tratamiento primario y tratamiento secundario) y las líneas de fangos corresponden a lo que llamamos una EDAR.

#### **1.2.2.2. Etapas en el proceso de regeneración del agua**

**Tratamiento terciario:** está constituido por los procesos que se aplican a las aguas residuales, después del tratamiento secundario, para obtener mejores rendimientos en la eliminación de la materia orgánica (DBO<sup>5</sup>) y los sólidos suspendidos. Uno de sus principales objetivos es el de adaptar la calidad de las aguas residuales a las normas establecidas según el posterior uso del efluente (tratamiento de regeneración para reutilización) o del destino del medio receptor, por lo que también suelen denominarse *tratamientos complementarios*, de afino o avanzados. Incluye la eliminación de nutrientes (fundamentalmente fósforo y nitrógeno, para evitar la eutrofización de las aguas), de metales etc. y la reducción de cargas excepcionales de tipo puntual o estacional.

En el caso concreto del tratamiento terciario de regeneración para reutilización, su objetivo es mejorar la calidad del efluente depurado en la EDAR para cumplir con los requisitos de calidad de las aguas regeneradas conforme el Real Decreto de reutilización. Para ello, es necesario complementar las instalaciones de tratamiento previas con procesos avanzados que reduzcan la carga contaminante residual hasta valores admisibles para el uso al que vaya destinada el agua producto y eliminen los microorganismos patógenos para garantizar la adecuada calidad sanitaria del agua. Desde este punto de vista, el objetivo principal del tratamiento de regeneración es reducir la cantidad de agentes patógenos que hayan sobrevivido a los tratamientos de depuración, así como reducir el nivel de sólidos en suspensión y turbidez, a fin de adaptarse a calidades mínimas exigidas para su utilización, conforme con el Real Decreto de reutilización.

Este tratamiento se lleva a cabo en una ERA, que puede implantarse como una ampliación o mejora de la propia EDAR o diseñarse “*ex novo*” conjuntamente con esta.

Entre los procesos de tratamiento terciario de regeneración más utilizados se pueden mencionar los siguientes: fisicoquímicos (como la coagulación + floculación + decantación lamelar), filtración (sobre lecho granular, filtros de discos, filtros de telas), nitrificación - desnitrificación (para eliminar el nitrógeno), ósmosis inversa (en el caso de las aguas salinas o salobres) y la desinfección (como la cloración, ozonización, y/o radiación UV). La definición del tipo de tratamiento terciario que se aplicará dependerá de la calidad del efluente depurado, el uso posterior del agua regenerada, de aspectos económicos y de la disponibilidad del espacio, entre otros (Hidalgo, Montano, and Sandoval 2005).

Aunque se ha hecho esfuerzo en la promoción de la utilización sostenible del agua, y se han implementado normas que tienen como objetivo asegurar que las aguas regeneradas para el uso posterior cumplen con los requisitos necesarios para que sean inocuas a la salud humana y no contaminantes del medio ambiente, aún existe renuencia por parte de los agricultores en la utilización de estas aguas para el riego de cultivos debido a los riesgos asociados a su uso. Es por ello por lo que se han implementado el proceso de regeneración de agua

posterior al proceso de tratamiento de las aguas residuales en las ERA, buscando disminuir los riesgos a niveles bajos (o a niveles de riesgo asumible).

- **Regeneración del agua en Granollers**

La estación depuradora de aguas residuales de Granollers realiza los siguientes tipos de tratamiento a las aguas residuales que recibe: tratamiento primario, secundario, eliminación de nitrógeno y de fósforo.

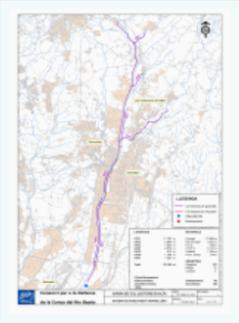


**Figura 1.8:** Vista satelital de la EDAR de Granollers Fuente: <http://besos-tordera.cat/que-fem/sistemes-de-sanejament/sistema-granollers/>

Esta EDAR, situada en el término municipal de Granollers, trata las aguas residuales procedentes de los municipios de Canovelles, parte de Les Franqueses del Vallès y Granollers, así como de los asentamientos industriales implantados en la zona. Las aguas residuales son interceptadas y transportadas por una red de colectores en alta de aproximadamente 22 km de longitud hasta el emplazamiento de la EDAR. En 1992 se construyó la EDAR con una capacidad de tratamiento primario físico-químico para 32.000 m<sup>3</sup> / día. En 1998, se amplió dotándola de un proceso biológico para 25.000 m<sup>3</sup> / día con digestión anaerobia de los lodos producidos. En 2008, se amplía aumentando su capacidad hidráulica hasta 30.000 m<sup>3</sup> / día e incorporando la reducción de nitrógeno.

El esquema de funcionamiento es el siguiente:

- Línea de agua: bombeo de entrada / tamizado de hasta / desarenador-desengrasante / floculación - coagulación (en stand-by) / decantación primaria / reactor biológico / decantación secundaria (clarificadores).
- Línea de fangos: tamizado de fangos primarios / espesantes (gravedad) de fangos primarios / espesante (flotador) de lodos biológicos / digestores anaerobios / deshidratación de los fangos mediante centrifugas.
- Línea de gas: el biogás producido en los digestores es aprovechado para generar energía calorífica (mantenimiento de los digestores) y energía eléctrica mediante grupos de cogeneración.

Un mapa topográfico que muestra la ubicación de la EDAR de Granollers. Una línea roja indica el curso del río Cardener y la ubicación de la planta. El mapa incluye una leyenda con símbolos para la planta, el río y otros puntos de interés. Hay una escala y una brújula en la parte inferior del mapa.

**Figura 1.9:** Descripción y ubicación de la EDAR de Granollers. Fuente: <http://besos-tordera.cat/que-fem/sistemes-de-sanejament/sistema-granollers/>

### 1.2.3. Control de la calidad del agua de riego

El control sanitario del agua que se utilizará para el riego es de vital importancia para la conservación de la salud pública. La determinación, la composición y dinámicas de las comunidades microbianas en estos sistemas de agua son claves a la hora evaluar su calidad y de reconocer los puntos críticos en su utilización.

Este control es llevado a cabo por diferentes metodologías que nos permitirán determinar diferentes factores que afectan la calidad del proceso, como parámetros fisicoquímicos como el pH, la turbidez, la conductividad, la temperatura y parámetros microbiológicos entre ellos la determinación de microorganismos indicadores de contaminación fecal y algunos microorganismos patógenos (Samboni Ruiz, Carvajal Escobar, and Escobar 2007).

El contar con los protocolos de detección de los microorganismos indicadores de contaminación, y de los microorganismos patógenos, es de vital importancia, ya que de su correcta aplicación va a depender la seguridad y calidad de las aguas que se utilicen en las diferentes actividades humanas (entre ellas el agua de riego) y, por ende, tendrá repercusión en la salud de la población y de los ecosistemas naturales.

En nuestro trabajo, nos enfocaremos en las diferentes técnicas que se utilizan para monitorear la calidad de las aguas de riego.

#### **1.2.3.1. Métodos microbiológicos de control de la calidad de las aguas de riego**

La determinación de la calidad del agua ya sea para consumo humano o para las diferentes actividades humanas entre ellas la del agua que se utiliza para el riego, se hace en la actualidad por diferentes técnicas, unas dependientes del cultivo de los microorganismos y otras, no dependientes del cultivo. Entre las técnicas para análisis podemos citar: observación en el microscopio, identificación de protozoos y bacterias filamentosas, técnicas de cultivo como la determinación de heterótrofos totales, coliformes fecales, cultivo de microorganismos indicadores de contaminación fecal como *E. coli* y *E. faecalis*,

algunos patógenos como *Legionella*, *Salmonella* y de protozoos, u de otras técnicas no dependientes del cultivo como la PCR, qPCR, citometría de flujo, etc.(Arcos Pulido et al. 2005).

La Tabla 1.3. nos brinda una visión general sobre las diferentes técnicas disponibles para caracterizar las comunidades microbianas, sean dependientes o no del cultivo.

**Tabla 1.3:** Algunas técnicas disponibles para la caracterización de comunidades microbianas.

Estudio de las comunidades bacterianas				
Enumeración y detección		Caracterización e identificación		Actividad microbiológica/genés funcionales
Cultivables	No cultivables	Cultivables	No cultivables	No cultivables
Heterótrofos totales	PCR, qPCR, citometría de flujo,	API, MALDI-TOF MS, etc.	DGGE, TGGE, NGS, PLFA, RAPD, RFLP, PFGE, SSCP, MLSA, ARISA	ATP, AOC, Metatranscriptónica, proteómica, microarrays.
Coliformes fecales	Recuentos en microscopia:			
<i>E. coli</i>	DAPI, Yoduro de propidio,			
<i>E. faecalis</i> , etc.	naranja de acridina, FISH, etc.			

Esquema de las técnicas disponibles para caracterizar las comunidades microbianas. Tabla modificada parcialmente (Sala-Comorera 2016) HPC: recuento de heterótrofos en placa, PCR: reacción en cadena de la polimerasa, qPCR: PCR a tiempo real, FISH: hibridación fluorescente in situ, MALDI- TOF MS: espectrometría de masas de desorción / ionización mediante láser asistida por matriz, acoplada a un analizador de tiempo de vuelo, DGGE: electroforesis en gel en gradiente desnaturante, TGGE: electroforesis en gel en gradiente de temperatura, NGS: secuenciación masiva, PLFA: análisis de los ácidos grasos fosfolípidos, RAPD: amplificación aleatoria de ADN polimórfico, RFLP: polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, PFGE: electroforesis en gel de campo pulsado, SSCP: polimorfismo de conformación de cadena simple, MLSA: análisis multilocus de las secuencias, ARISA: análisis automatizado de espaciadores ribosomales intergénicos, ATP: test de detección de trifosfato de adenosina, AOC: medidas del carbono.

Con el fin de ordenar y mejorar las distintas actividades científicas, industriales o económicas de un país o región, se hizo necesario elaborar, aplicar y mejorar las normas (técnicas y metodologías) que se aplicaban para el desarrollo de las diferentes actividades y así lograr un consenso en cuáles serían los requisitos exigidos para todos los participantes, todo esto de forma voluntaria. Este proceso

es lo que conocemos como normalización. A nivel de cada región o país existían organismos (UNE, CEN, CENELEC, ETSI, COPANT, ISO y IEC) que regulaban los requisitos que eran necesarios para poder competir en el mercado. Estos están basados en el resultado de la experiencia y el desarrollo tecnológico. A continuación, citamos algunas de las normas estandarizadas para el análisis microbiológico del agua:

- ✓ *Escherichia coli* y microorganismos coliformes: ISO 9308-1: 2014 Detección y enumeración de coliformes y *E. coli* - Parte 1: Método de filtración por membrana (ISO, 2014) o ISO 9308-2: 2012 Detección y enumeración de coliformes y *E. coli* - Parte 2: Método del número más probable (ISO, 2012).
- ✓ *Enterococcus*: ISO 7899-2: 2000 Detección y enumeración de enterococos intestinales - Parte 2: Método de filtración por membrana (ISO, 2000).
- ✓ *Legionella* spp.: ISO 11731: 2017 Detección y enumeración de *Legionella* spp. – Método de filtración por membrana de Nylon (ISO, 8199); Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la Legionelosis. (Para Nueva Zelanda es AS/NZS 3896:1998 Waters-Examination for legionellae including *Legionella pneumophila*). Otras normativas en Cataluña: Decreto 352/2004, de 27 de julio de 2004, establece las condiciones higiénico-sanitarias para la prevención y control de la legionelosis.

Sin embargo, aunque existen normas para la detección y enumeración de diferentes microorganismos que serán tomados en cuenta a la hora de evaluar la calidad del agua, para poder aplicarlas es necesario una infraestructura administrativa que se encargue de velar por el cumplimiento de ellas. Su creación y regularización se encuentran en las siguientes normativas:

- ✓ Real decreto 2210/95, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
- ✓ Ordenanza Municipal de Actividades y de intervenciones integrales de la administración ambiental de Barcelona: BOP N° 113,11-05-2001, p. 44)

- ✓ Ordenanza General del Medio Ambiente Urbano: BOP N° 143, Anexo I; 16-06-1999, p. 3)

En el caso de Panamá, además de los reglamentos DGNTI-COPANIT 24-99 cuyos lineamientos se encuentran en el Anexo I D; para el correcto funcionamiento de los laboratorios de ensayos y de calibración se sigue la Norma ISO 17025 y para el análisis de aguas se aplica el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

El control microbiológico de la calidad de un producto, en este estudio, las aguas de riego, muchas veces es difícil debido a la reducida cantidad de microorganismos cultivables, a la baja concentración que en numerosas ocasiones se encuentran los microorganismos en el medio, o a las limitaciones del método de cuantificación que se utiliza, nos hemos visto en la necesidad de aplicar métodos de concentración de microorganismos para poder cuantificarlos.

#### **1.2.3.2. Métodos de concentración de microorganismos**

Las técnicas utilizadas tradicionalmente para el estudio de los microorganismos son dependientes del cultivo, y son comúnmente utilizadas para monitorear la calidad de los diferentes tipos de aguas. Sin embargo, cuando utilizamos este tipo de técnicas para monitorear la diversidad microbiana tenemos que ser conscientes del bajo número de microorganismos que son cultivables. Según Reisenfeld, Schloss y Handelsman, menos del 1% de los microorganismos que encontramos en una muestra ambiental son cultivables por técnicas tradicionales de cultivos, es por ello que se sugieren diferentes técnicas moleculares que nos permitan tener una visión más global de la comunidad real en las muestras, y así poder estudiar sus interacciones (Reisenfeld, Schloss, and Handelsman 2004). Sin embargo, en las técnicas moleculares, muchas veces por los límites de cuantificación de la técnica utilizada, es necesario hacer concentración de los microorganismos a estudiar.

Aunado a la dificultad para ser cultivados, algunas muestras ambientales presentan una concentración de microorganismos baja, por lo que para su estudio y la caracterización de los microorganismos que encontramos en ella

necesitamos utilizar métodos de concentración. Cabe destacar que cuando hablamos de concentración de microorganismos, los métodos utilizados tienen que ser escogidos basándose en el tipo de microorganismo que deseamos estudiar de la muestra, ya que el tamaño, las características fisicoquímicas y fisiológicas de los mismos pueden tener efecto en la eficacia de este para concentrar nuestros microorganismos.

A la hora de escoger el método de concentración que deseamos utilizar tomamos en cuenta diferentes características como el que sea un método simple de aplicar, rápido, asequible, adecuado para los microorganismos estudiados y proveer una alta concentración de patógenos sin el uso de contaminantes que pueden ser inhibitorios e interferir con la detección posterior.

En nuestro trabajo los métodos de concentración que utilizamos para el estudio de los microorganismos presentes en las muestras fueron: la filtración con membranas (para microorganismos como *Legionella* y para protozoos), la filtración con una membrana monolítica de adsorción (MAF) y la floculación orgánica con leche desnatada (SMF).

#### **1.2.3.2.1. Concentración por filtración con membrana género *Legionella* y amebas de vida libre (FLA) (protozoos)**

El método de filtración por membrana es un método aplicado por muchos años. En el caso de *Legionella* las normativas ISO recomiendan la filtración por membrana, en nuestro grupo la filtración se realiza con membrana de Nylon de poros de 0,45  $\mu\text{m}$  y una vez concentramos la muestra procedemos a utilizarlo para el cultivo, aislamiento y detección de *Legionella*. Para esta técnica se filtra 1 L de agua y se resuspende el material retenido en la membrana en 5 mL de Ringer  $\frac{1}{4}$  (o en el agua filtrada) para su posterior análisis. En el caso de la concentración para la detección y aislamiento de protozoos (en nuestro caso de amebas de vida libre) utilizamos la filtración de 10 mL de la muestra a analizar con filtros con poros de 3,0  $\mu\text{m}$ . Ambas filtraciones las realizamos en trampas de filtración al vacío.

#### **1.2.3.2.2. Concentración por filtración con una membrana monolítica de adsorción (MAF)**

El MAF es un sistema de adsorción-elución rápido y efectivo basado en la filtración monolítica (MAF) y la ultrafiltración centrífuga. Este método utiliza la concentración y purificación de microorganismos (tanto virus como bacterias) que encontramos en el agua (Peskoller, Niessner, and Seidel 2009) (Lee et al. 2011) y (Hjelmsø et al. 2017).

Esta columna de filtración esta hecha de un polímero basado en epoxi macroporoso hidrolizado. Tiene una estructura mesoporosa con un tamaño de poro de 20  $\mu\text{m}$ , en el cual se puede aumentar el caudal de filtración hasta 1 L/min. El tamaño del poro permite el paso de virus y bacterias , pero la retención se basa en la interacción iónica e hidrofóbica (Masini and Svec 2017) (Xie et al. 1999). Al acidificar las muestras hasta un pH de 3 se mejoran estas interacciones (Zou et al. 2002) (Jungbauer and Hahn 2008).

La adsorción se revierte por elución con un tampón que contiene extracto de carne de vacuno al 3% a pH de 9,5. La ultrafiltración centrífuga se usa como un segundo paso para concentrar aun más la muestra a 1 mL y de ese modo aumentar la sensibilidad de la detección subsiguiente logrando un factor de concentración mayor (Kunze et al. 2015).

La concentración mediante MAF se realiza haciendo pasar la muestra a investigar a través de una columna monolítica de adsorción contenida en una carcasa de soporte. Una vez pasada la muestra a través de la columna de filtración se procede a la elución con un búfer de elución que ayuda a la recuperación de los microorganismos atrapados en la columna de filtración. Luego, los concentrados se pueden guardar para su posterior análisis.

#### **1.2.3.2.3. Concentración orgánica con leche desnatada (SMF)**

La floculación orgánica con leche desnatada es un método de concentración que hasta el momento se aplicaba para la concentración de virus, ya que los mismos, al igual que otros microorganismos se encuentran en bajas concentraciones en

las muestras de agua ambientales, especialmente en agua de mar, río y lago (Calgua de León 2013) y (Hjelmsø et al. 2017).

Para la realización de este método de concentración de microorganismos se debe adecuar la muestra de agua a las condiciones físico químicas necesarias (pH 3,5 y conductividad superior a los 14000  $\mu$ S) ya que estas condiciones favorecen que los flóculos de leche desnatada permanezcan formados durante todo el proceso. Se deja un tiempo estipulado para que los microorganismos se adhieran a los flóculos, después de lo cual la muestra se concentra por centrifugación y se resuspenden el flóculo en búfer fosfato para su posterior análisis.

### **1.2.3.3. Métodos para la detección y cuantificación de microorganismos**

Clásicamente, los métodos que se han utilizado para cuantificar e identificar los diferentes microorganismos han sido los cultivos, ya sea cultivo en placa o por la técnica del número más probable (NMP). Sin embargo, el conocimiento de que muchos microorganismos que hay en las muestras no crecen en los medios diseñados o que crecen mucho más lentamente, con todos los problemas de contaminación que esto conlleva, nos ha llevado a los microbiólogos a utilizar otros métodos independientes de cultivo como pueden ser la citometría de flujo y la qPCR. El uso combinado de ambos grupos nos permitirá tener más información sobre las comunidades microbianas que encontramos en las muestras ambientales, y así poder sugerir soluciones a los diferentes problemas que sean más amigables con el medio ambiente.

A continuación, explicaremos algunos de los métodos para la detección y cuantificación de microorganismos que hemos utilizado en este trabajo.

#### **1.2.3.3.1. Métodos de cultivo**

Las normas internacionales ISO sugieren para la cuantificación de microorganismos por cultivo dos métodos, aunque no los señalen como excluyentes de otros: la cuantificación por cultivo en PCA, y la cuantificación por cultivo en la técnica de NMP.

- **Cultivo en placa**

Para el cultivo en placa se utilizan diluciones decimales de la muestra debidamente homogenizada, de la cual se extiende en cada placa 100  $\mu$ L de cada dilución en cada placa. Cada placa se incuba hasta que las colonias son apreciables para su recuento (Corral-Lugo et al. 2012). El número de diluciones que se necesiten dependerán de la muestra que se este analizando. Se siembran por triplicado, en placas con medio de cultivo (generalmente, Plate Count Agar), y se incuban a 37 °C y 22 °C, durante 24-48 horas.

- **Número más probable (NMP)**

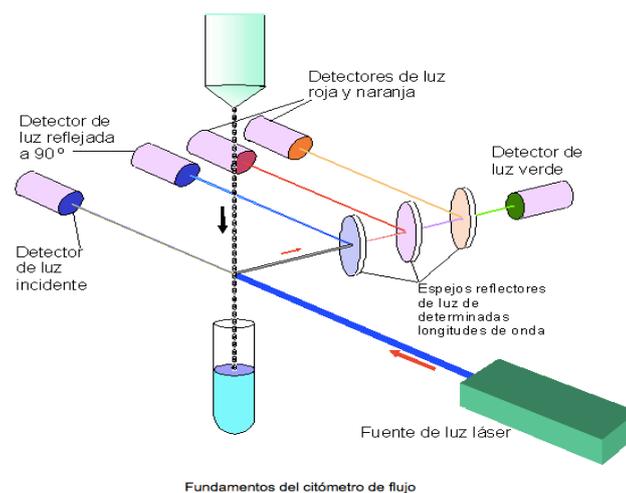
El método de NMP es una estrategia eficiente de estimación de la población microbiana especialmente cuando la evaluación cuantitativa de células individuales no es factible o es difícil de realizar. Esta técnica se basa en la presencia/ ausencia de un atributo característico (en este caso de un grupo bacteriano) en réplicas de diluciones consecutivas. Es utilizada para el análisis de muestras de aguas, de suelo u otros ambientes. Para obtener los valores probables de cuantificación se necesita el uso de una tabla probabilística.

#### **1.2.3.3.2. Citometría de Flujo “CytoFlex S”**

La cuantificación de microorganismos a través de metodologías convencionales como el cultivo en placa, muchas veces nos genera problemas de cuantificación al hacer difícil, sino imposible, poder enumerar los microorganismos cuando están en bajas cantidades o cuando por ejemplo se encuentran en estado viable pero no cultivable. En este tipo de circunstancias, es bueno tener acceso a tecnologías que nos permitan cuantificar los microorganismos independientemente de su capacidad de crecer en medios de cultivos en laboratorios, además de poder evaluar su estado fisiológico. Este es el caso de la citometría de flujo, que es una técnica que nos permite obtener información sobre una población celular ( en nuestro caso de microorganismos), a partir de un estudio individualizado de un gran número de células representativas de la población entera que se encuentran diluidas. Además nos permite un mejor monitoreo de la calidad del agua en comparación con técnicas convencionales

como el recuento en placa, que diversos autores citan como desventajoso (Van Nevel et al. 2017).

Las células que vamos a estudiar se suspenden en una solución como el Ringer  $\frac{1}{4}$ . Esta suspensión de células se hace pasar a través de un pequeño orificio de modo que cuando salen lo hacen una a una, formando parte de una corriente continua o flujo cilíndrico. Sobre esta corriente de células se hace incidir un haz de luz láser, cuya dispersión y reflexión son analizados en duración, intensidad y espectro.

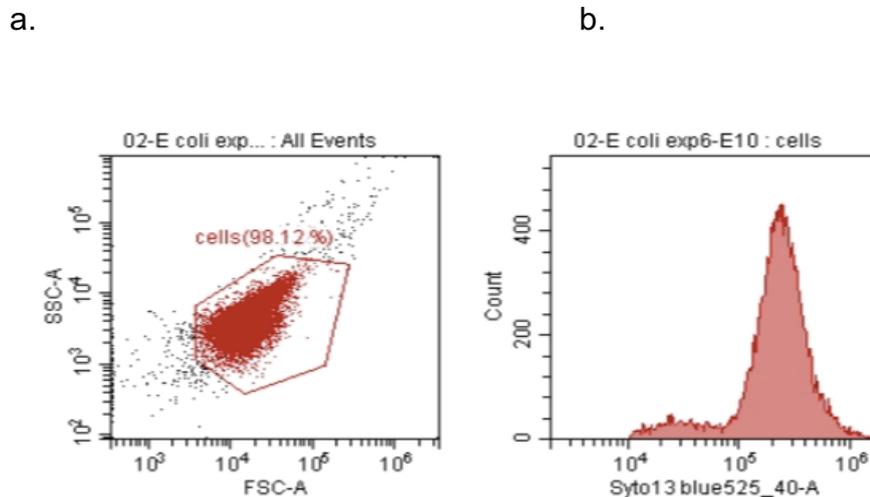


**Figura 1.10:** Esquema de los componentes básicos en un citómetro de flujo. Fuente: [http://wwwuser.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic\\_en/Review/citometria\\_de\\_flujo.htm](http://wwwuser.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic_en/Review/citometria_de_flujo.htm)

El análisis digital de las características celulares se basa principalmente en:

- ✓ el aspecto morfológico y la composición estructural de las células (estos aspectos se miden en dos ángulos mediante dos detectores de las dispersiones de la luz lateral (“*Side scatter*”) y las dispersiones de la luz frontal (“*Forward scatter*”) causadas por la célula);
- ✓ el aspecto óptico de las células, donde las células son excitadas mediante (láser y lentes) de enfoque. La luz emitida se recoge con un lente de colección y pasa a través de un sistema de espejos ópticos (dicróicos) y filtros (paso de banda, paso corto, o paso largo), que desvían las longitudes de onda de luz específica a detectores ópticos designados. Esto se logra mediante la óptica de recogida.

Los datos obtenidos son almacenados en la memoria de un ordenador y desde allí pasados a archivos binarios que posteriormente pueden ser analizados con detenimiento. Los datos obtenidos a través de un citómetro de flujo se pueden presentar en forma de histogramas y/o en gráficas de dispersión.



**Figura 1.11:** Ejemplo del análisis de citometría de flujo: a. gráfica de puntos que representa la clasificación de las células en función de la dispersión de la luz lateral (SSC-A) y la frontal (FSC-A); b. histograma que representa el recuento de las células de E. coli en función de la intensidad relativa de fluorescencia (LIVE/DEAD).

La técnica de citometría se puede combinar con la utilización de técnicas de marcaje molecular, como es el caso de la Tinción Live/Dead que es un marcaje de los ácidos nucleicos mediante los fluorocromos SYTO13 y Ioduro de propidio (IP).

En nuestro caso, hemos utilizado la serie CytoFlex S (BECKMAN COULTER Life Science, USA) (azul, roja, violeta y amarillo-verde (o infrarroja opcional)) que tiene la capacidad para 15 parámetros, incluidos 13 para la detección de fluorescencia. El instrumento totalmente activado incluye cuatro canales de láser de 488 nm (azul), tres del láser 638 nm (rojo), cuatro del láser de 405 nm (violeta) y dos del láser de 561 nm (amarillo-verde).

El láser infrarrojo proporciona canales fluorescentes intactos con una superposición espectral mínima en los canales tradicionales.

La óptica integrada fija y el diseño de celda de flujo de cuarzo permite la portabilidad. Los detectores de fotodiodos de avalancha (APD) proporcionan una

sensibilidad del color rojo incomparable y un flujo de trabajo de compensación único.

Este citómetro presenta las siguientes ventajas en el manejo de las muestras:

- Carga semiautomática de tubo único con tubos de 12 x 75 mm o 1,2 mL;
- Cargador de placas opcional para placas de 96 pocillos;
- Mediciones volumétricas con flujo continuo; y,
- Los fluidos proporcionan flujos continuos y mediciones volumétricas integradas en la huella compacta.

En el caso del software CytExpert tiene una interfaz que permite que el software externo realice operaciones como métodos de ejecución y control básico del cargador de placas.

#### Sensibilidad y resolución

- ✓ Detecta partículas > 200 nm usando la dispersión violeta VSSC (función que es opcional);
- ✓ Los detectores APD (fotodiodos de avalancha) proporcionan una sensibilidad excepcional en todo el espectro visible.

#### Límites de detección celular

El límite de detección celular esta entre rangos superiores a  $10^2$  células/mL y por debajo de  $10^7$  células/mL, lo que nos sitúa en una cuantificación celular entre  $10^3$  células/mL y  $10^6$  células/ mL. Durante nuestros ensayos realizamos medidas con fluidos con  $10^2$  células/mL y con  $10^7$  células/mL y los valores obtenidos mostraron mucha variabilidad.

#### **1.2.3.3.3. PCR en tiempo real o PCR cuantitativa “qPCR”**

La necesidad de comprender la ecología de los microorganismos presentes en los diferentes medios, su caracterización y la necesidad de cuantificarlos nos llevaron a desarrollar diferentes metodologías que nos permitieran lograr tales

finés. Inicialmente, este estudio se hizo a través de la observación microscópica, luego se han utilizado técnicas de cultivo, las cuales están ampliamente difundidas. Sin embargo, sabemos, que no todos los microorganismos presentes en una muestra ambiental son cultivables, una baja proporción de ellos presentan esta característica, también hay otro tipo de microorganismos que crecen lentamente como es el caso de *Legionella*, incluso sabemos que hay microorganismos que están agregados o ubicados dentro de protozoos por lo que tampoco los vemos por métodos de cultivo. Este tipo de problemas nos ha llevado a la necesidad de desarrollar otras técnicas que nos permitieran detectar y cuantificar de forma confiable y segura los microorganismos de una muestra.

Desde el desarrollo de la técnica de PCR “Reacción en cadena de la polimerasa” por Kary Mullis en 1983, se ha avanzado mucho en el estudio molecular de los microorganismos a través de técnicas independientes de cultivo. Este tipo de técnicas, nos han permitido lograr una mejor comprensión de la ecología de los microorganismos y de la realidad sobre la diversidad microbiana existente en el medio ambiente.

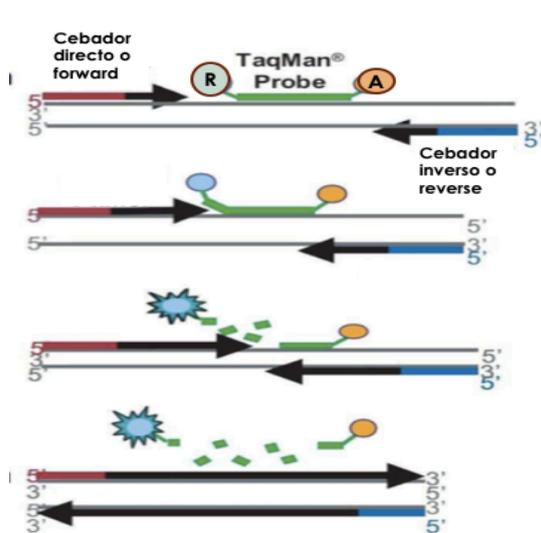
Hoy en día, son cada vez más utilizadas las técnicas moleculares, como la qPCR. Esta técnica, una variante de la PCR desarrollada por Higuchi et al. en 1992, se enfoca en la utilización de la amplificación de un fragmento de ácido nucleico, junto con la detección en ciclos de este producto mediante la utilización de una sonda marcada con fluorocromos. Se utiliza para cuantificar de manera absoluta la cantidad de ácido nucleico presente en una muestra. Cada vez que se forma un producto de la reacción se produce una fluorescencia que es detectada por un sensor. A medida que se forma el producto de la reacción la señal de fluorescencia también se aumenta. Los resultados obtenidos a través de esta técnica son confiables, se obtienen en poco tiempo y son fáciles de analizar.

La PCR en tiempo real, al igual que la PCR, se realiza en una plantilla de ADN, que puede ser de cadena sencilla o doble. También se necesitan dos cebadores de oligonucleótidos que flanqueen la secuencia de ADN a amplificar, dNTPs, que son los cuatro nucleótidos trifosfatos, una polimerasa termoestable e iones de magnesio en el tampón. Es común comprar una mezcla maestra que contiene

los dNTPs, la polimerasa Taq, el magnesio + y un tampón. El agua utilizada para este tipo de técnica es agua de uso molecular, lo que quiere decir que está libre de nucleasas.

La reacción se realiza en un termociclador (especifico para qPCR) mediante ciclos de temperatura. Se aplica alta temperatura para separar (fundir) las hebras del ADN de doble hélice (entre 94 – 95 °C), luego se baja la temperatura (entre 50 – 60 °C) para permitir que los cebadores se emparejen con la plantilla, y finalmente la temperatura se fija alrededor de 68 – 72 °C, que es óptima para la polimerasa que extiende los cebadores incorporando los dNTPs.

Los métodos para detectar los productos amplificados pueden ser no específicos como es el caso de la sonda SYBR Green, o específicos como las sondas TaqMan. En nuestro caso utilizamos sondas TaqMan.



fluorocromo reportero (**R**) en el extremo 5' y un fluorocromo extintor o aceptor (**A**) en el extremo 3'. **A** absorbe la fluorescencia emitida por **R** mientras ambos permanecen unidos entre sí. Cuando la sonda se hibrida con el ADN diana específico para ella, el fluorocromo **R** del extremo 5' se desprende por la acción exonucleasa de la ADN polimerasa Taq a medida que esta copia la cadena complementaria. La separación de **R** provoca un aumento de la señal fluorescente que es proporcional a la cantidad de productos de amplificación que se genera en la mezcla de reacción. La actividad exonucleasa de la polimerasa Taq depende específicamente de la doble cadena, por lo que la sonda TaqMan libre permanece intacta y no se observa la fluorescencia del **R** (M. Johnson et al. 2010).

**Figura 1.12:** Bioquímica del ensayo TaqMan. La sonda TaqMan (Probe) tiene un

Este método parte del principio conocido como “*transferencia de energía de resonancia fluorescente*” (FRET) para generar la señal. Este método consiste en transferir energía desde un donador o “reportero” fluorescente a un aceptor o “quencher” (o extintor). La ocurrencia de este proceso puede ser por hibridación (por ejemplo, las sondas moleculares beacons) o por hidrólisis.

En nuestro caso, al utilizar las sondas TaqMan el proceso de fluorescencia se da por hidrólisis. En la fluorescencia por hidrólisis los oligonucleótidos utilizados para la sonda están etiquetados con un reportero fluorescente y un “quencher”, los cuales se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco o diana. Una vez hibridada la sonda al ADN plantilla ocurren cambios conformacionales en el reportero y el “quencher” (o extintor), lo que permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa Taq rompa la unión del reportero a la sonda, liberándolo y provocando su fluorescencia la cual es capturada por el equipo. Este tipo de métodos son seguros, ya que mientras no haya unión de la sonda a su diana, no habrá amplificación y, por ende, no habrá fluorescencia. Esto le da al método una alta especificidad.

Para detectar la fluorescencia producida es necesario tener un termociclador con la tecnología necesaria para recolectar esta señal de fluorescencia, un termociclador de PCR en tiempo real. Esta tecnología tiene que excitar al reportero, capturar la señal de emisión de este y realizar el análisis cuantitativo. La excitación del reportero se logra con un láser o con un diodo de emisión (luz LED), luego la señal es colectada a través de un filtro que permite el paso de la longitud de onda correspondiente, la cual llega a un foto detector que captura la información que proviene de la muestra, esta información recolectada es analizada por el software del equipo.

El software del aparato genera una serie de gráficos que nos permiten saber si la reacción fue exitosa. En este tipo de metodología, la cantidad de ADN encontrado en la muestra se compara con una curva patrón elaborada ya sea con ADN extraído de células o con segmentos de gBlocks preparados. Esta curva patrón tiene puntos de concentraciones conocidas de ADN en diluciones seriadas.

#### **1.2.4. Comunidades microbianas de las aguas de riego**

El estudio microbiológico de las aguas de riego envuelve muchos microorganismos distintos, algunos que pueden ser de riesgo para la salud humana y ambiental, y otros no. En este trabajo nos dedicaremos a estudiar algunos de ellos.

#### **1.2.4.1. Microorganismos heterótrofos en el agua de riego**

El estudio y caracterización de los diferentes tipos de aguas no es algo que haya surgido recientemente como una forma de vigilar la calidad de estas. Desde Robert Koch, se vienen publicando artículos que hacen referencia a la vinculación existente entre el cultivo de los microorganismos que encontramos en el agua y la calidad de la misma (Bartram et al. 2003).

Se conocen como organismos heterótrofos a todos aquellos que requieren de carbono orgánico para su crecimiento (Bargellini et al. 2011). Este tipo de microorganismos se encuentran en diferentes ambientes, como el agua, suelo, la vegetación y los alimentos. Cuando hablamos de heterótrofos totales, nos estamos refiriendo a todos los microorganismos que son capaces de crecer por un método en particular con unas variables determinadas de temperatura y tiempo de incubación, y medio de cultivo empleado.

El cultivo de heterótrofos se realiza en medio con bajas concentraciones de nutrientes, ya que este tipo de medio favorecen el crecimiento de una mayor diversidad de heterótrofos en la placa de cultivo. Aunque se sugieren medios particulares en las Normas ISO para el cultivo de heterótrofos totales, hay estudios que demuestran que la diversidad del crecimiento de microorganismos heterótrofos está más relacionada con la temperatura de incubación que con el medio de cultivo utilizado (Gensberger et al. 2015).

Aunque la monitorización de los heterótrofos totales nos brinda información sobre la eficiencia de los diferentes procesos de depuración del agua residual para obtener aguas depuradas y/o aguas regeneradas, estos no nos indican la calidad de la misma (Bartram et al. 2003).

El recuento de heterótrofos totales juntamente con los indicadores de contaminación fecal, nos ayudan a tener una idea más clara sobre la calidad del agua y su caracterización. Cuando hay ausencia de indicadores de contaminación fecal en el tipo de muestra analizado, no existen evidencias clínicas y epidemiológicas que relacionen la presencia de heterótrofos totales con afectaciones a la salud humana. Sin embargo, se establecen valores

mínimos de recuentos para los heterótrofos ya que cuando estos se encuentran en grandes cantidades interfieren con la detección de coliformes fecales (uno de los indicadores de contaminación fecal).

El recuento en placas de heterótrofos totales o bacterias aerobias totales es uno de los parámetros más utilizados para monitorear la sanidad del agua. Hoy en día, además, se utiliza como un indicador de la calidad general del agua en los sistemas de distribución. Nos permite determinar el deterioro de la calidad del agua a través de los sistemas de distribución.

#### **1.2.4.1.1. Microorganismos indicadores de contaminación fecal**

El agua contaminada puede presentar algunos microorganismos patógenos de origen fecal que pueden provocar enfermedades como diarreas, fiebres, gastroenteritis, infecciones cutáneas y neumonías. Sin embargo, la detección de todos estos microorganismos en un laboratorio puede ser complicada, ya que es en algunos casos muy lenta y/o costosa (en el caso de que tratemos de determinarlos todos), y además su presencia puede ser no detectable por técnicas convencionales y no facilita el enfoque preventivo de una enfermedad.

Debido a esto, se ha hecho necesario la utilización de microorganismos que nos permitan determinar de forma oportuna el manejo inadecuado o la contaminación de un producto, agua de riego en este caso, que incrementan el riesgo de presencia de patógenos, y que nos permitan verificar las deficiencias de un sistema de tratamiento. Además, su detección suele ser más sencilla, rápida y/o económica. A lo largo de los años se han utilizado diferentes tipos de microorganismos con el propósito de determinar la calidad de un producto o la ineficiencia de un proceso. Cuando hablamos de indicadores microbianos, hoy en día se reconocen tres grupos de términos: indicadores microbianos de procesos (grupo de organismos que demuestran la eficacia de un proceso); indicadores fecales ( aquellos organismos que indican la contaminación fecal y que podrían indicar la presencia de patógenos), y los organismos índice y modelo, que incluyen un grupo de organismos o especie indicativa de presencia y comportamientos patógenos, respectivamente (Figueras and Borrego 2010).

Varios microorganismos patógenos de transmisión fecal-oral pueden estar presentes en el agua, entre ellos tenemos bacterias como *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Legionella* spp., coliformes fecales. Veamos algunos de ellos:

- ***Escherichia coli***

Es un bacilo Gram negativo estrecho que mide de 1,1 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 2 a 6  $\mu\text{m}$  de longitud, móviles por flagelos peritricos o inmóviles, anaerobio facultativo, con metabolismo respiratorio y fermentativo. Son coliformes capaces de producir indol a partir de triptófano, poseen la enzima  $\beta$ -galactosidasa, pero no son capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono.

Es considerado un indicador de contaminación fecal reciente, ya sea humana o animal, en el agua. Sin embargo, también presenta la desventaja de que se ha encontrado sistemáticamente en los sistemas acuáticos y vegetales de la selva tropical, así como en los suelos (Lasalde et al. 2005).

- ***Enterococcus***

Son un grupo de bacterias Gram negativas representadas principalmente por *Enterococcus faecalis*. Crecen a 10 °C y 45 °C, resistencia a 60 °C, crecen a pH 9,6, reducen el azul de metileno al 0,1%. Su presencia en una muestra evidencia la contaminación fecal de la misma, ya que estos microorganismos son abundantes en el tracto intestinal de animales y humanos. Lo encontraremos en cantidades menores que *E. coli* generalmente un orden de magnitud menor.

Su utilización como indicadores de la calidad microbiológica del agua, se debe a que, muestran una relación alta y estrecha con los riesgos para la salud asociados con el uso del agua, principalmente por síntomas gastrointestinales; siempre están presentes en las heces de los animales de sangre caliente; no pueden contaminarse en las aguas contaminadas con aguas residuales, y su muerte es menos rápida que la de los coliformes en el agua, además de que sus patrones de persistencias son muy similares a las de las bacterias patógenas transmitidas por el agua (Layton et al. 2010).

#### 1.2.4.1.2. Microorganismos patógenos a considerar en el agua de riego

En el agua de riego podemos encontrar con dos grupos de microorganismos patógenos, los patógenos de origen fecal cuyo comportamiento es el mismo que el de los indicadores de contaminación fecal, los cuales nos sirven para índice de su presencia; y los microorganismos patógenos que son endógenos del medio acuático como el género *Legionella* que siguen dinámicas en los ecosistemas distintas.

- ***Legionella***

Los miembros de este grupo bacteriano son Gram negativos, aerobios estrictos, no esporulados, de forma bacilar, no encapsulados, móviles debido a que poseen un flagelo polar o lateral, no formadores de esporas. Su tamaño oscila entre 0,3-1  $\mu\text{m}$  de ancho y entre 1,5-5  $\mu\text{m}$  de largo (Fields, Benson, and Besser 2002), (Cervero Aragón 2013).

En este grupo de microorganismos encontramos bacterias que pueden crecer en diferentes tipos de ambientes acuáticos naturales, en suelos húmedos y lodos, aunque no en tierras secas. Puede sobrevivir, en concentraciones bajas, a las variaciones de temperatura, pH y oxígeno disuelto, de forma simbiótica o parasita con otros agentes como algas, amebas o protozoos ciliados lo que le ayuda a soportar las variaciones ambientales (Suárez 2009). Esta bacteria también puede colonizar diferentes instalaciones acuáticas artificiales como lo son los sistemas de abastecimiento y distribución de agua en las ciudades, a través de las cuales se incorpora el agua sanitaria doméstica y a otros sistemas que requieran para agua para su funcionamiento y puedan generar aerosoles, como los sistemas de refrigeración. Colonizan de forma natural los ecosistemas acuáticos y viven libremente en ellos (Diederer et al. 2007), (Fields 1996), (Serrano-Suárez et al. 2013).

La capacidad de *Legionella* para sobrevivir en condiciones ambientales hostiles por largos períodos de tiempo, contribuye a su fácil difusión y aumenta las probabilidades de exposición humana a la misma. Hay una serie de factores que

propician la prevalencia de la *L. pneumophila*, entre ellos podemos mencionar el amplio rango de temperatura al que es capaz de sobrevivir y especialmente por su capacidad de crecer y proliferar intracelularmente dentro de los protozoos que juntamente con otros microorganismos forman los biofilms en los sistemas de agua dulce. Estos microorganismos son los que le proporcionan los nutrientes y el ambiente necesario para su mantenimiento y proliferación. Igualmente, influyen en la supervivencia de esta bacteria en las tuberías, la presencia de materiales de sedimentos, estancamiento del agua, la rugosidad de las superficies, el material del cual está hecha la superficie, la tasa de flujo y la concentración de desinfectantes. El descuidarse con estos factores es una forma de promover su proliferación, o evitar su erradicación. El entendimiento de los factores que afectan o ayudan a la colonización del género *Legionella* de las tuberías de agua y los sistemas de agua doméstica nos ayudarán a determinar cuáles son las estrategias necesarias para el control de este microorganismo y por tanto de la prevención de la legionelosis.

El estudio ecológico del género *Legionella* es esencial para la mejor comprensión de su prevalencia en los ambientes acuáticos naturales, su mecanismo de entrada en los sistemas acuáticos artificiales y los factores que permiten su supervivencia y crecimiento en los medios acuáticos (Borella et al. 2005), (Guerrieri et al. 2005).

Estas bacterias son las causantes de la enfermedad del Legionario y la fiebre Pontiac, lo que se conoce como legionelosis, no obstante, existen personas que son asintomáticas a la presencia de la bacteria. Si bien es una bacteria causante de neumonía grave que se transmite por la respiración de aerosoles en aire contaminado con agua contaminada no existe evidencia de que éstas se puedan transmitir persona a persona o por medio del contacto con algún reservorio animal y su diagnóstico solo es posible bajo un análisis microbiológico apropiado. Entre el 80 – 90 % de las infecciones son causadas por *Legionella pneumophila* y dentro de este porcentaje, *Legionella pneumophila* sg. 1 es el agente etiológico causante de estas infecciones. Sin embargo, no todas las especies del género *Legionella* están asociadas a medios acuáticos, la *Legionella longbeachae* se ha

detectado en muestras de suelo y en muestras de tierras de jardinería comercializadas.

El cultivo es el método de referencia para la detección de *Legionella* en muestras ambientales. El protocolo que se sigue para realizar este método lo encontramos en la norma estándar internacional ISO 11731:2017, en donde se incorporan las estrategias utilizadas en diversas instituciones para una recuperación y detección eficiente del género. La parte 2 de esta norma establece la filtración con membrana como el método para la concentración de *Legionella*.

La identificación se puede realizar por aglutinación con partículas látex conjugadas a anticuerpos. El test de serología por aglutinación permite la identificación de *Legionella pneumophila* serogrupo 1, y de los serogrupos 2-14, así como la de otras especies de *Legionella*.

- **Amebas de vida libre (Protozoos)**

Las amebas de vida libre (FLA, Free-Living Amoebae) son protozoos ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Estos microorganismos los encontramos colonizando algunos hábitats como los ríos, lodos, piscinas cloradas, lagos, suelo, agua corriente, aguas residuales y en la atmósfera (Hall 2012). Algunos de los integrantes de este grupo han sido estudiados debido a que están implicados en problemas causados a la salud humana. Algunos de los géneros más estudiados debido a esto son: *Harmanella*, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamutia*, *Sappinia*, y *Paravhalkampfia* (Garcia et al. 2013). El estudio de la relación endosimbiótica de algunas amebas de vida libre con las bacterias se hace cada vez más importantes, sin embargo, aún es un campo que tiene mucho por descubrir ya que los mecanismos que utilizan las bacterias para entrar y salir de estas amebas aun no son del todo claros. Especies de amebas, como por ejemplo *Acanthamoeba castellanii* son considerados importantes depredadores bacterianos, lo que les otorga un rol importante ambiental al controlar las comunidades microbianas. Sin embargo, algunas bacterias son capaces de evitar la digestión por parte de los protozoos y beneficiarse de esta relación simbiótica. Este hecho los convierte en reservorios de bacterias en el medio ambiente, proporcionándoles a las mismas protección contra las

condiciones desfavorable del medio, sean estas naturales o el productor de la desinfección como método eliminar posibles agentes patógenos (Mella et al. 2016) (Mengue et al. 2016) (Molmeret et al. 2005).



## 1.3. Objetivos



### 1.3. Objetivos

La escasez de agua limpia para el uso humano ha hecho que en muchas zonas se use agua contaminada para regar los campos de cultivo. En algunos países más del 80% de los recursos hídricos se dedican al agua de riego. Este hecho lleva asociado un riesgo por la transmisión de agentes infecciosos a la población a través de alimentos contaminados. Es por ello que asociaciones como la OMS, la ONU, la FAO o la EFSA reconocen la necesidad de definir la calidad del agua de riego. Sin embargo, existe poca información sobre el agua para objetivos agrícolas.

Los primeros estudios sobre la calidad del agua se realizaron utilizando técnicas de cultivo. En los distintos países fueron aplicando diferentes técnicas y parámetros para considerar la calidad del agua para distintos usos. Poco a poco se fue unificando qué parámetros se habían de analizar: coliformes fecales, coliformes totales, *E. coli*, Adenovirus, Bacteriófagos de Bacteroides, etc. y como analizarlos con técnicas estandarizables que permitan los análisis de los diferentes países puedan ser comparables.

Pero a partir de los últimos años del siglo pasado los ecosistemas acuáticos se empezaron a analizar con técnicas moleculares, lo que llega a la cúspide cuando se hacen los primeros estudios metagenómicos. Este enfoque molecular empieza a tener muchos datos e indican que muchos de los microorganismos que conocíamos sólo representan un porcentaje muy bajo de los realmente existen en los ecosistemas. Y que muchos de los seres vivos que forman parte de esos ecosistemas solo los podremos identificar si aplicamos estas nuevas técnicas. De hecho, muchos de los virus que actualmente se conocen solo se determinan con reacciones moleculares.

Y nos volvemos a encontrar con otra división (la primera era la no estandarización) cuando se determina la calidad microbiológica del agua las bacterias se cuantifican por métodos moleculares. Aunque en ambos casos utilizar lo “otros métodos” aporta información.

Es por ello, que el objetivo de este trabajo es identificar y cuantificar la presencia de bacterias patógenas, mediante el uso de indicadores de contaminación fecal y *Legionella* en aguas de riego aplicando métodos moleculares.

Para la consecución de este objetivo general, se han planteado una serie de sub-objetivos:

1. Implementar técnicas moleculares para cuantificar los indicadores de contaminación fecal y *Legionella* en el agua. Para ello se pondrán a punto 4 qPCR para cuantificar la presencia de los indicadores de contaminación fecal *E. coli*, y *E. faecalis*, y *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila*.
2. Definir un método de concentración para los distintos tipos de agua de riego y los microorganismos a analizar.
3. Determinación de la presencia de indicadores de contaminación fecal y *Legionella* en aguas de riego con los métodos determinados en los sub-objetivos 1 y 2.

## 2. Materiales y métodos



## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Cepas y métodos de cultivo

Para los diferentes ensayos realizados en este trabajo, se utilizaron las siguientes cepas bacterianas: *Escherichia coli* WG5 (ATCC 23725), *Bacillus cereus* (ATCC 27398), *Escherichia coli* (DSM 423), *Enterococcus faecalis* (OG1RF) y *Legionella pneumophila* sg. 1 (ATCC 33152).

Las cepas utilizadas para los diferentes ensayos eran cepas referenciadas, por lo cual considerábamos que habíamos utilizado cultivos puros.

Las dos primeras cepas (*Escherichia coli* WG5 ATCC 23725 y *Bacillus cereus* ATCC 27398) se utilizaron en los ensayos de concentración por Floculación orgánica con leche desnatada (SMF) para comparar porcentajes de recuperación de células viables cultivables, porcentajes de recuperación de genomas, y comparativa entre la cuantificación por qPCR de bacterias totales y qPCR de *E. coli*.

Estas cepas presentan colonias con características morfológicas distintivas después de su incubación en el medio de cultivo TSA (Agar de tripticasa-soja, Scharlau), las cuales nos permiten distinguir los dos géneros estudiados a la hora de la cuantificación de las colonias en placa tanto antes como después de su concentración, estas características fueron importantes inicialmente a la hora de escoger ambas cepas para la cuantificación de células viables-cultivables, ya que se necesitaban dos cepas bacterianas que a la hora de ser sembradas en la misma placa, posterior al proceso de concentración, las pudiéramos identificar fácilmente, y así poder obtener un número de células viables-cultivables.

Las cepas de *E. coli* ATCC 27398 y *B. cereus* ATCC 23725 fueron cultivadas en TSB (Tryptic Soy Broth, medio digerido de soja-caseína o caldo de tripticasa soja, Scharlau) primeramente durante toda la noche y a partir de este cultivo overnight se siembran nuevamente en TSB y se cultivan durante una hora y media para obtener un cultivo en fase exponencial. Una vez obtenido el crecimiento en TSB se centrifugó para descartar el medio TSB y quedarnos con el sedimento de células bacterianas, éstas se recogen de los cultivos centrifugados resuspendiendo en Ringer  $\frac{1}{4}$  y homogenizando el cultivo al utilizar un agitador automático. Se realiza una dilución con Ringer  $\frac{1}{4}$  hasta obtener una  $DO_{600\text{ nm}}$

entre 0,6 y 0,7, ya que en trabajos previos realizados con *E. coli* y *B. cereus* nos indican que suspensiones celulares con una  $DO_{600\text{ nm}}$  alrededor de estos valores corresponden a una concentración celular de  $\cong 10^8$  ufc/mL, este estimado fue corroborado por nosotros en muchas ocasiones.

En el caso de las cepas de *Escherichia coli* (DSM 423) y *Enterococcus faecalis* (OG1RF) utilizadas en los ensayos que se realizaron para poner a punto las qPCRs de *E. coli*, *E. faecalis*, para la comparativa entre la cuantificación por cultivo en placa, cuantificación por citometría y cuantificación por qPCR, para la comparativa entre los métodos de concentración de floculación orgánica con leche desnatada y filtración con una columna monolítica de adsorción, y para el ensayo correspondiente al muestreo de aguas de riego diferentes puntos en la región de Cataluña.

Estas cepas se cultivaron en LB (Luria low salt Broth, caldo de Luria, Scharlau) toda la noche (“overnight”) para obtener un cultivo en fase exponencial. Una vez obtenido el crecimiento en LB, se centrifugó para descartar el medio y quedarnos con las células bacterianas, éstas se recogieron de los cultivos centrifugados re suspendiéndolas en agua y homogenizando el cultivo utilizando un agitador automático. Se realizó una dilución con Ringer  $\frac{1}{4}$  hasta obtener una  $DO_{670\text{ nm}}$  de 0,03. Trabajos previos realizados nos indican que suspensiones celulares con una  $DO_{670\text{ nm}}$  de 0,03 corresponde a una concentración celular aproximada de  $2,3 \times 10^7$  células/mL. También hemos confirmado, para estas cepas, que concentraciones con  $DO_{600\text{ nm}}$  corresponden a una población bacterias  $\cong 10^8$  ufc/mL.

Y finalmente, la cepa de *Legionella pneumophila* sg.1 (cepa Philadelphia) (ATCC 33152) se utilizó para los ensayos de puesta a punto de las diferentes qPCR, en este caso la de *Legionella* spp. y la de *Legionella pneumophila*, y para el ensayo correspondiente al muestreo de aguas utilizadas para el riego de diferentes puntos de la región de Cataluña.

Esta cepa se cultivó en agar BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract Agar, Maim y Oxoid, bioMérieux, España) suplementado con  $\alpha$ -cetogluturato durante un período de  $3 \pm 1$  día antes de realizarse la puesta en marcha de los ensayos.

Una vez obtenido el crecimiento en BCYE se recogen las células de los cultivos de *Legionella* resuspendiendo en Ringer 1/40 y homogenizando el cultivo al utilizar el agitador automático. Se realiza una dilución con Ringer 1/40 hasta obtener una suspensión de células con una densidad óptica (DO) entre 0,7 – 0,8 medidos a una absorbancia de 450 nm. Trabajos previos realizados con este grupo de bacterias nos indican que suspensiones con una DO<sub>450</sub> alrededor de estos valores corresponden a una concentración celular de  $1 \times 10^8$  ufc/mL, además de haber sido confirmado por nosotros en diferentes ocasiones.

Para el aislamiento del género a partir de muestras de aguas ambientales, se utilizó el agar BCYE suplementado con Glicina, polimixina, vancomicina y ciclohexamida (GPVC) (Maim S.A., Vic, Cataluña y Oxoid bioMérieux, España); y posteriormente, para el aislamiento y obtención de cultivo puro, el agar BCYE suplementado con  $\alpha$ -cetogluturato.

Para la elaboración de los estándares celulares utilizados para las qPCRs de *E. coli*, *E. faecalis*, *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila*, una vez obtenidos los cultivos celulares y realizadas las extracciones de ADN, se procedió a cuantificar utilizando el Nanodrop la cantidad de ADN en ng/ $\mu$ L, valores que fueron utilizados para poder calcular la cantidad de genomas/mL que teníamos en cada estándar.

## **2.2. Detección y cuantificación de los microorganismos**

### **2.2.1. Cuantificación mediante técnicas de cultivo: heterótrofos totales, *Legionella* spp. y amebas de vida libre (FLA)**

#### **2.2.1.1. Cuantificación de heterótrofos totales**

Para el recuento en placa de microorganismos aerobios nos basamos en la Normativa ISO 6222: 1999, “Water quality- Enumeration of culturable micro-organism-colony count by inoculation in a nutrient agar culture médium”. Para lo cual utilizamos el PCA (Plate count medified Agar, Sharlab, España).

Para la cuantificación mediante el cultivo en placa de PCA (Plate Count Agar, Scharlau), una vez obtenida la muestra, se procedió a realizar una dilución decimal, de las cuales se sembraron por duplicado las diluciones

correspondientes a cada tipo de muestra: para la de agua residual se sembraron en PCA las diluciones -4, -5 y -6; para el agua del secundario de la EDAR de Granollers, las diluciones -3, -4 y -5; para la muestra del terciario humedal, las diluciones -1, -2 y -3; y para la muestra del terciario filtrada-clorada, y para las muestras de acuíferos naturales (pozo almacenada en balsa, pozo de granja porcina, pozo de granja avícola y río Fluvià se sembraron las diluciones 0, -1 y -2. Las placas una vez sembradas se incubaron a 37 °C durante 48 horas, posterior a lo cual se procedió al conteo de las colonias que habían crecido en la placa y así poder obtener las unidades formadoras de colonias/ mL (ufc/mL) de cada muestra. Este valor se extrapolaba a la cantidad de ufc/ 100 mL de muestra de agua por convención. La metodología que se utilizó esta basada en la ISO 17025:2005.

#### **2.2.1.2. Detección, aislamiento, identificación y cuantificación de *Legionella***

Para la detección, aislamiento, identificación y cuantificación del género *Legionella* se siguen lo establecido en la Norma ISO 11731. Según la cual, para el aislamiento e identificación de este género, es necesaria la filtración de un litro de agua de la muestra utilizando filtros de membrana de Nylon de poro de 0,22 µM (Filtro HNWP Millipore; Ireland). Sin embargo algunas muestras, por su naturaleza y constitución no fue posible filtrar esta cantidad de agua (1 litro).

##### **2.2.1.2.1. Protocolo para el aislamiento e identificación del género *Legionella***

Para realizar los protocolos establecidos para el aislamiento de muestras ambientales de *Legionella*, se filtró 1 L de agua con filtros de membrana de Nylon de 0,45 µM (Filtro HNWP Millipore; Ireland).

**Observación:** en algunos tipos de muestras se filtró menos cantidad de agua (entre 300 – 500 mL) debido a que estas tenían una gran cantidad de algas microscópicas, que aun habiendo pasado el agua primero por un tamiz de 50 µM, al ser filtradas saturaban los filtros de membrana de Nylon de 0,45 µM imposibilitando la filtración de más cantidad de agua.

Una vez filtrada el agua, se depositó el filtro en un recipiente limpio y estéril de plástico, y se agregaron 5 mL de Ringer 1/40 y se agitó vigorosamente el envase para re suspender el filtrado.

Los concentrados fueron cultivados de acuerdo a la Norma ISO 11731:2017 en placas BCYE/GVPC (MAIM S.A., Vic, Cataluña, y Oxoid, bioMérieux, España) de la siguiente forma:

- **Cultivo directo del filtrado**

De los 5 mL del filtrado, se sembraron 0,5 mL en 2 placas de agar BCYE/GVPC (MAIM S.A., Vic, Cataluña, y Oxoid, bioMérieux, España) y se incubaron a 37 °C por  $10 \pm 2$  días. Se observaron las placas para monitorear el crecimiento y observar si había crecimiento de colonias con morfología que sugirieran ser del género Legionella. Para las muestras de agua residual y agua del secundario se sembraron las diluciones -1 y -2. Para el resto de las muestras se sembró la directa y la dilución -1.

- **Cultivo posterior al tratamiento con calor**

Se tomó 1 mL del concentrado y se sometió a tratamiento térmico de 50 °C durante 30 minutos. Una vez recibido el tratamiento, se procedió a la siembra en placa de agar BCYE/GVPC (MAIM S.A., Vic, Cataluña, y Oxoid, bioMérieux, España). Se sembró la diluciones -2 para la muestra de agua residual y la directa y la dilución -1 para la muestra del secundario; y la directa para las muestras del terciario-humedal, terciario filtración-cloración, la de pozo almacenada en balsa, la de pozo de las granja porcina y avícola, y la del río Fluvià. Se incubaron las placas a a 37 °C por  $10 \pm 2$  días.

- **Cultivo posterior al tratamiento con tampón ácido**

Se tomó 0,9 mL de la muestra y se mezcló con 0,1 mL de tampón ácido (pH 2). Una vez transcurridos 5 minutos, se sembró en agar BCYE/GVPC (MAIM S.A., Vic, Cataluña, y Oxoid, bioMérieux, España). Para la muestra de agua residual se sembró la dilución -2, para la muestra del secundario, la dilución -1 y la directa,

y para el resto de las muestras se sembró directamente 0,5 mL después del tratamiento. Se incubaron las placas a 37 °C por 10 ± 2 días.

- **Cultivo posterior al tratamiento combinado de calor-ácido**

Se tomó 0,75 mL del concentrado y se sometió a tratamiento térmico de 50 °C durante 30 minutos. Una vez recibido el tratamiento térmico se aplica el tratamiento ácido, agregándole 0,75 del búfer ácido dejándolo actuar durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se siembran la dilución -1 y -2 para la muestra de agua residual; la dilución -1 y la directa para la muestra de agua del secundario; y para el resto de las muestras se siembran directamente 0,5 mL en la placa de agar BCYE/GVPC (MAIM S.A., Vic, Cataluña, y Oxoid, bioMérieux, España). Se incubaron las placas a 37 °C por 10 ± 2 días.

Después de la incubación en agar BCYE/GVPC, las colonias con características morfológicas propias del género que crecieron en este medio selectivo para *Legionella* eran presuntivamente *Legionella*. La confirmación de las colonias se realizó sub cultivando esas colonias aisladas en Agar BCYE (MAIM S.A., Vic, Cataluña) y en Agar Sangre (MAIM S.A., Vic, Cataluña). Aquellas colonias que crecieron en Agar BCYE pero no lo hicieron en Agar Sangre se les realiza el test bioquímico y serológico (*Legionella* látex, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) por aglutinación para la confirmación definitiva del género *Legionella* y del serogrupo al que pertenece la colonia aislada.

- **Identificación de las cepas de *Legionella***

- *Por serología*

Para la identificación de las especies de *Legionella* se requirió como primer paso, la obtención de un cultivo puro de *Legionella*. Este paso se logró sub cultivando repetidas veces (3) las colonias que fueron identificadas, aisladas y confirmadas por el crecimiento en Agar BCYE (MAIM S.A., Vic, Cataluña) y su confirmación de aquellas colonias que no crecieron en Agar Sangre (MAIM S.A., Vic, Cataluña) y su identificación mediante el test de aglutinación, siguiendo las instrucciones de manufactura. Este kit permite la diferenciación entre *Legionella*

*pneumophila* serogrupo (sg.) 1; *Legionella pneumophila* sg. Del 2 – 14 y 7 especies adicionales de *Legionella*.

- **Detección por método molecular**

La detección de *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila* se realizó mediante la qPCR de *Legionella* spp. y la qPCR de *Legionella pneumophila*, respectivamente.

### **2.2.1.3. Cuantificación de células viables-cultivables**

Se realizó la cuantificación de células viables cultivables para las cepas de *E. coli* ATCC 27398 y *B. cereus* ATCC 23725 después del proceso de concentración por floculación orgánica con leche desnatada. Para esta cuantificación de células viables cultivables se tomó una alícuota de 1,5 mL de los cuales se utilizó 1 mL para sembrar directamente en TSA (Scharlau) y para realizar la siembras de las diluciones -1, -2, -3, -4 se tomaron 100 µL para sembrar la dilución -1, y otros 100 µL para hacer una dilución decimal y poder sembrar la dilución -2, -3 y -4. Se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas. Se procedió al conteo de ufc/mL. Se sembró cada dilución por duplicado, haciendo un total de 3 réplicas para cada cepa bacteriana estudiada.

## **2.2.2. Protocolo para detectar la presencia o ausencia de amebas de vida libre**

### **2.2.2.1. Cultivo en Agar No Nutritivo (NNA)**

Para el cultivo de protozoos se utilizó el medio de cultivo Non Nutrient Agar (NNA, Scharlau). El aislamiento de amebas de vida libre de muestras de agua, ya sean naturales o residuales, es un trabajo arduo que conlleva varios días y pases a medios de cultivos bajos en nutrientes para evitar la proliferación de otros microorganismos.

Para determinar la presencia o ausencia de amebas en los diferentes tipos de agua muestreados se filtraron 10 mL de agua con un filtro de membrana con poros de 3 µM (Filtro Millipore; Ireland), posterior a lo cual se colocó el filtro sobre una placa de cultivo con agar no nutritivo (NNA, Non Nutrient Agar, Scharlau).

Se incubaron a 30 °C, y diariamente se observaban las placas para anotar si se podía observar la migración de las amebas fuera de la zona del filtro. Una vez que se tenía alguna ameba, o grupo de ellas, creciendo en los alrededores del filtro, se procedió a hacer un corte del agar en la zona donde se encontraban las amebas y se colocaban en una nueva placa de agar no nutritivo previamente inoculado con *E. coli* muertas para alimentar a las amebas y promover su multiplicación. Se realizaron varios pases hasta obtener cultivos puros.

### **2.2.3. Cuantificación por citometría de flujo**

Para realizar el recuento de las bacterias mediante el citómetro de flujo, estas células se tiñeron con la tinción Live/Dead (Invitrogen). El análisis por citometría de flujo, combinada con la tinción Live/Dead, es un método de cuantificación rápido que nos permite además de contar las células, determinar el estado fisiológico al momento de realizar el estudio, y así poder comparar estas mediciones con las realizadas por el cultivo en placa y la cuantificación por qPCR.

El kit de Live/Dead contiene el fluorocromo SYTO 9 que es una pequeña molécula que puede penetrar en las bacterias con membrana plasmática intacta, proporcionando una fluorescencia verde, y el fluorocromo IP (ioduro de propidio) que es una molécula que penetra a través de las membranas dañadas, células no viables, proporcionando fluorescencia de color rojo. Las células estresadas, se tiñen de un color naranja. El SYTO 9 que envía la casa comercial tiene una concentración inicial de 3,34 mM y el IP, viene a una concentración de 20 mM. Se prepararon soluciones de trabajo de ambos fluorocromos a 10 mM. Para la tinción celular de cada muestra de 200 µL, por recomendación de la casa comercial, se tiñen las células en una proporción SYTO 9:IP de 1:2, y una concentración final en el cultivo de 0,5 µM. Para ello, se colocaron 10 µL de SYTO 9, 20 µL de IP, de las soluciones de trabajo de cada fluorocromo, y el resto (170 µL) del cultivo bacteriano a analizar, haciendo un total de 200 µL. Se añaden los fluorocromos 15 minutos a temperatura ambiente antes de hacer las mediciones con el citómetro de flujo CytoFlex-S

El citómetro utilizado para nuestros análisis fue el CytoFlex-S (Beckman Coulter, USA) con capacidad para 15 parámetros (incluidos 13 para la detección de fluorescencia). Este citómetro totalmente activado incluye 4 canales de láseres (488 nm (Azul) laser, 638 nm (Rojo) laser, 405 nm (Violeta) laser y el de 561 nm (amarillo-verde). Tiene una óptica integrada fija y un diseño de flujo de cuarzo que permite la portabilidad. Tiene una alta sensibilidad, permitiendo la detección de partículas >200 nm.

En cuanto a la cuantificación de células bacterianas el límite de detección del aparato esta entre  $10^3$  a  $10^6$  células/mL, los valores inferiores o superiores a estos rangos originan mucha variabilidad entre las mediciones. Permite mediciones volumétricas con flujo continuo. Permite el uso de ajustes de compensación entre experimentos y tipos de muestras.

Para este estudio comparativo entre diferentes métodos de cuantificación partimos de dos cultivos puros de dos microorganismos de nuestra colección, la *Escherichia coli* (DSM 423) y *Enterococcus faecalis* (OG1RF).

A partir de un cultivo "overnight" de *Escherichia coli* (DSM 423) y *Enterococcus faecalis* (OG1RF) cultivadas de manera separada, se tomaron 100  $\mu$ L para inocular en 5 mL de TSB. Se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 1 hora 30 min, hasta obtener una  $DO_{600\text{ nm}}$  entre 0,6 – 0,7. Estudios anteriores nos demuestran que a esta DO obtenemos una población de microorganismos de  $\cong 10^8$  ufc/mL, lo cual hemos confirmado en reiteradas ocasiones. Una vez obtenido el cultivo a esta densidad óptica, se tomó 1 mL de este para hacer una dilución decimal re suspendiéndolo en Ringer  $\frac{1}{4}$  y obtener una serie desde  $10^2$  hasta  $10^7$  ufc/mL.

Para el análisis por citometría de flujo se tomaron 200  $\mu$ L del cultivo bacteriano de las diferentes diluciones ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$ ) en fase exponencial y se procedió a realizar la tinción Live/Dead según lo recomendado en el Kit Live/Dead (ThermoFisher Scientific). Se tiñeron las células con SYTO 13 e IP (Ioduro de propidio) a una concentración de 0,5  $\mu$ M y se dejaron actuar los colorantes durante 15 min, después se procedió a el análisis por citometría de flujo en el Cytotflex-S. Para ello configuramos el citómetro para contar nuestras

células y diferenciar entre las células teñidas con SYTO 13 (vivas) y las teñidas con IP (muertas). Las células con la membrana parcialmente dañada también fueron detectadas. El citómetro nos arroja los valores, cuantificándolos como eventos/ $\mu\text{L}$ . Este valor lo extrapolamos para obtener el valor de eventos/mL, siendo el equivalente a células/mL.

#### **2.2.4. Determinación y cuantificación mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR o PCR cuantitativa)**

Para poder realizar la cuantificación de los ácidos nucleicos mediante la técnica de PCR en tiempo real, es necesario contar con una muestra de los ácidos nucleicos de dicha muestra. A partir de esta cuantificación, se realizó el cálculo de la cantidad de microorganismos que había en la muestra. Estos ácidos nucleicos, para nuestros ensayos, fueron extraídos mediante dos kits de extracción de ADN diferentes. El QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, ref. 51304) y el Power Soil DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories Inc., ref. 12888-100), cuyos protocolos se detallan a continuación:

##### **2.2.4.1. Protocolos de extracción de ácidos nucleicos**

###### **Extracción con QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)**

Todos los pasos de extracción fueron llevados a cabo a temperatura ambiente (15-25 °C)

- Se colocaron 250  $\mu\text{L}$  del concentrado en un microtubo de micro centrifuga de 1,5 mL, se agregaron 180  $\mu\text{L}$  de buffer ATL al pellet y se agitaron con un agitador automático.
- Se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K, se agitó el microtubo con un agitador automático y se incubó a 56 °C hasta que el pellet estaba completamente lisado (o durante toda la noche). Se agitó ocasionalmente durante la incubación para dispersar la muestra. Para realizar este paso se utilizó un Thermomixer confort (ependorf).
- Se centrifugó brevemente el microtubo de micro centrifuga de 1,5 mL para remover las gotas del interior de la tapa.

- Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de buffer AL a la muestra, se mezcló con un agitador automático durante 15 segundos, y se incubó a 70  $^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Se centrifugó brevemente el microtubo de micro centrifuga de 1,5 mL para remover las gotas del interior de la tapa.
- Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de etanol (96 – 100 %) a la muestra, se mezcló mediante un agitador automático durante 15 segundos. Después de mezclar, se centrifuga brevemente el microtubo para remover las gotas del interior de la tapa.
- Cuidadosamente se aplicó la muestra del paso anterior (incluyendo el precipitado) al microtubo de 2 mL de recogida con la Mini columna de rotación sin mojar el borde. Se cerró la tapa y se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. Se colocó la Mini columna de rotación en un microtubo de recolección de 2 mL limpio y se desechó el microtubo que contenía el filtrado.
- Cuidadosamente se abrió la Mini columna de rotación y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de buffer AW1 sin mojar los bordes del microtubo. Se cerró la tapa, y se centrifugó a 600 x g (8000 rpm) por 1 min. Se colocó la Mini columna de rotación en un microtubo de recolección limpio y se descartó el microtubo de recolección conteniendo el filtrado.
- Cuidadosamente se abrió la Mini columna de rotación y se le agregaron 500  $\mu\text{L}$  de buffer AW2 sin mojar el borde el microtubo. Se cerró el microtubo y se centrifugó a máxima velocidad (20000 x g o 14000 rpm) durante 3 minutos.
- Se colocó la Mini columna de rotación en un microtubo de colección de 2 mL nuevo y se descartó el microtubo de colección viejo con el filtrado. Se cerró la tapa del microtubo y se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto.
- Se colocó la Mini columna de rotación en un microtubo limpio de 1,5 mL DNALoBind y se descartó el microtubo de colección anterior conteniendo el filtrado. Cuidadosamente se abrió la Mini columna de rotación y se le añadieron 100  $\mu\text{L}$  de buffer AE o agua destilada. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto.

- Se descartó la Mini columna de rotación y se conservó el filtrado (100  $\mu$ L de elución) los cuales contenían el ADN de nuestra muestra.

### **Extracción con Power Soil DNA Isolation Kit (Mo BioLaboratories, Inc.)**

Todos los pasos de extracción son llevados a cabo a temperatura ambiente (15-25 °C)

- Se colocaron 250  $\mu$ L del concentrado en un microtubo PowerBead provisto por el kit.
- Suavemente se agitó con un agitador automático o vortex para mezclar.
- Compruebe la solución C1. Si se precipita la Solución C1, se calienta la solución a 60 °C hasta que se disuelve antes de su uso.
- Se añadieron 60  $\mu$ L de la Solución C1 e agitó de suave y brevemente con el agitador automático.
- Se aseguró el microtubo PowerBead horizontalmente sobre una almohadilla de vórtice plana con cinta adhesiva. Se mezcló con un agitador automático a velocidad máxima durante 10 minutos.
- Asegúrese de que el microtubo PowerBead giran libremente en su centrífuga sin frotar. Se centrifugó el microtubo a 10000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. PRECAUCIÓN: Asegúrese de no exceder los 10000 x g o los microtubos pueden romperse.
- Se transfirió el sobrenadante a un microtubo de recogida limpio de 2 mL (suministrado por el kit).

Nota: Espere entre 400 y 500  $\mu$ L de sobrenadante. El sobrenadante puede contener todavía partículas de la muestra.

- Se agregaron 250  $\mu$ L de Solución C2 y se agitó durante 5 segundos. Se incubó a 4 °C durante 5 minutos.
- Se centrifugó el microtubo a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10000 x g.
- Se transfirieron hasta 600  $\mu$ L de sobrenadante (no más) a un microtubo de recogida de 2 mL limpio (proporcionado por el kit), evitando el sedimento (pellet).

- Se añadieron 200  $\mu$ L de Solución C3 y se agitó el microtubo con un agitador automático brevemente. Se incubó a 4 °C durante 5 minutos.
- Se centrifugaron el microtubo a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10000 x g.
- Evitando el pellet (o sedimento), se transfirieron hasta, pero no más de, 750  $\mu$ L de sobrenadante en un microtubo de recogida de 2 mL limpio. (proporcionado por el kit).
- Se agitó para mezclar la Solución C4 antes de usar. Se añadieron 1200  $\mu$ L de Solución C4 al sobrenadante y se agitó con un agitador automático por 5 segundos.
- Se cargaron aproximadamente 675  $\mu$ L en un Filtro Spin y se centrifugó a 10000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Se desechó el flujo filtrado y se agregaron 675  $\mu$ L adicionales de sobrenadante al filtro de centrifugado y se centrifugó a 10000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se cargó el sobrenadante restante en el filtro de centrifugado y se centrifugó a 10000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Nota: Se requieren un total de tres cargas para cada muestra procesada.

- Se añadieron 500  $\mu$ L de Solución C5 y se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10000 x g.
- Se desechó el flujo filtrado.
- Se centrifugó de nuevo a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10000 x g.
- Se colocó cuidadosamente el Spin filtro en un microtubo de recogida limpio de 2 mL (suministrado por el kit). Evitando salpicar con la solución C5 en el Spin filtro.
- Se añadieron 100  $\mu$ L de solución C6 al centro de la membrana filtrante blanca. Alternativamente, se puede usar agua estéril de uso para PCR libre de ADN para la elución de la membrana de sílice del Spin filtro en este paso.

- Se centrifugaron el microtubo a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10000 x g.
- Se desechó el Spin filtro. El ADN en el microtubo está ahora listo para cualquier aplicación posterior. No se requieren más pasos.

Una vez se obtienen las eluciones de ácidos nucleicos, se procede a realizar la cuantificación por PCR en tiempo real o qPCR.

Todas las PCRs en tiempo real diseñadas para nuestros ensayos son PCRs en tiempo real específicas basadas en las sondas comerciales TaqMan, las cuales tienen en común la señal de fluorescencia emitida para detectar los productos amplificados. En todas, se utilizó para su preparación, la FastStart Universal Probe Master (Rox) de Roche que está a una concentración 2X y agua grado molecular para la preparación de las soluciones de trabajo de cada iniciador y cada sonda, y como muestra añadida para los NTC (“Non template control”).

En el caso de todas las qPCR específicas para microorganismos, se realizaron BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) para verificar la similitud de los diferentes nucleótidos (cebadores y sondas) de cada qPCR con los genomas registrados en el NCBI GenBank. El BLAST de nucleótidos compara las secuencias suministradas con la base de genomas del NCBI GenBank.

Para este estudio, se han utilizado 5 qPCRs diferentes cuyos protocolos se detallan a continuación:

#### **2.2.4.2. Cuantificación por PCR en tiempo real o qPCR**

Dentro de las qPCRs que se manejaron en este trabajo, se contó con las qPCRs para dos indicadores de contaminación fecal, la qPCR de *E. coli* y la qPCR de *E. faecalis*, una qPCR de bacterias totales, que nos permitía tener una idea de la cantidad de ADN bacterial en total en la muestra, y dos qPCRs para *Legionella*, una de género *Legionella* spp. y la otra de especie *Legionella pneumophila*.

La cuantificación de ADN en tiempo real que utilizamos en nuestros ensayos está basada en una sonda de hidrólisis, TaqMan, por su alta sensibilidad. Estos requieren una única sonda generadora de señal que posee dos etiquetas. Una

de esas etiquetas es un colorante fluorescente informador (o “reporter”) en el extremo 5’ y la otra, es una etiqueta extintora (o “quencher”) que puede ser fluorescente u oscura en el extremo 3’. La señal emitida por la sonda queda prácticamente suprimida por la señal fluorescente del extintor fluorescente (“quencher”), ya que la fluorescencia del informador (“reporter”) es absorbida por el colorante extintor (“quencher”) debido a la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) (Giulietti et al. 2001). Pero cuando la sonda se hibrida con su secuencia diana es separada mediante la actividad exonucleasa 5’-3’ de la FastStart Taq polimerasa anulando la fluorescencia emitida por el informador (“reporter”). Este proceso se repite cada ciclo, acumulando las emisiones del colorante fluorescente, aumentando así la señal. (www.roche-applied-science). Para la realización de todos los ensayos de qPCR se utilizaron placas MicroAmp™ Fast optical 48-well reaction plate (ref. 4375816) y las filminas adhesivas MicroAmp™ 48-well Optical Adhesive Film (ref. 4375323) de Applied Biosystems, además de las sondas y cebadores específicos de cada qPCR y los reactivos de reacción mencionados al final de la sección 2.2.3.

#### **2.2.4.2.1. PCR en tiempo real para bacterias totales**

La qPCR de bacterias totales se basó en el artículo de G. Harms et al. (2003) con algunas modificaciones. Se ajustó la curva estándar de 372 a  $3,72 \times 10^8$  copias genómicas por reacción, utilizando como ADN diana para la curva estándar un Double-stranded gBlocks gene fragments. Con este fragmento se realizó una dilución decimal de una concentración conocida del fragmento para obtener las diluciones desde  $10^0$  hasta  $10^8$  copias genómicas por reacción. (Harms et al. 2003) y (Abzazou et al. 2018).

- **Estándar para elaborar la curva patrón a partir de segmentos de doble cadena de ADN gBlocks**

El curva estándar desarrollada para esta qPCR está basada en un segmento de ADN de doble cadena fabricado artificialmente mediante la técnica de “Double-stranded gBlocks gene fragments”, sintetizado por IDT (IDT, Integrated DNA Technologies). Ésta fue fabricada para este grupo de investigación, al igual que

los segmentos gBlocks de las curvas estándar a base de gBlocks de las PCRs en tiempo real de *E. coli*, *E. faecalis* y *Legionella pneumophila*.

La longitud del gBlock para la qPCR de bacterias totales es de 507 pb ( ya que el mismo codifica para dos secuencias dianas diferentes y posee una secuencia (clamps) de 35 pb entre ambas secuencias, la de bacterias totales y la correspondiente a *Nitrospira* spp.). Este segmento contiene la secuencia diana a cuantificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Esta secuencia diana pertenece a una sección conservada del gene 16S rDNA de los microorganismos.

La preparación de la concentración deseada del estándar se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante del segmento de ADN. Para la cuantificación del número de copias que teníamos en el tubo madre se utilizó la siguiente fórmula.

$$\text{Copias de ADN} = \frac{6,02 \times 10^{23} \text{ (copias mol}^{-1}\text{) x Cantidad de ADN (g)}}{\text{Longitud del ADN (pb) x } 660 \text{ (g mol}^{-1}\text{pb}^{-1}\text{)}}$$

En el caso del segmento de doble cadena de ADN pedido a IDT para bacterias totales:

$$\text{Copias de ADN} = \frac{(6,02 \times 10^{23} \text{ copias mol}^{-1}) \times (2,5 \times 10^{-7} \text{ g})}{(550 \text{ pb}) \times (660 \text{ g mol}^{-1} \text{pb}^{-1})}$$

Cantidad de ADN (g) =  $2,5 \times 10^{-7}$  g; esta cantidad es la enviada por la empresa IDT productora del segmento gBlocks. La empresa envía 250 ng, los cuales se resuspenden en 25  $\mu\text{L}$ , para obtener una concentración por  $\mu\text{L}$  de 10 ng.

Una vez obtenida la cantidad de copias de ADN que poseía el segmento, se procede a preparar una dilución decimal para obtener  $10^0$  a  $10^8$  copias genómicas por reacción. Con esta dilución decimal se elaboró los puntos de la curva estándar, y para cada ensayo en el que se empleó este estándar, los puntos de la curva se cuantificaron por duplicado. El estándar se ajustó de 372 a  $3,72 \times 10^8$  copias genómicas por reacción (CG/Rx).

- **Concentración y secuencias de iniciadores y sondas**

La preparación de la mezcla de la PCR en tiempo real para Bacterias Totales se realizó en un volumen total de 25  $\mu\text{L}$ , los cuales se prepararon utilizando FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche), teniendo una concentración de 0,6  $\mu\text{M}$  de cada iniciador (1055f, 1392r), 0,25  $\mu\text{M}$  de la sonda TaqMan 16sTaq1115 y 10  $\mu\text{L}$  de ADN molde de la muestra. Para cada muestra se cuantificaron dos réplicas del extracto de ADN molde directo y dos réplicas de una dilución 1/10 del ADN molde en agua estéril para uso molecular. Una vez preparada la placa con los reactivos necesarios para realizar la qPCR se procedió a su lectura en el StepOne™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific).

**Tabla 2.1:** Secuencia de Iniciadores y sondas utilizados en la qPCR de bacterias totales y sus respectivas concentraciones.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5' → 3')</b>	<b>Gen</b>	<b>Conc. inicial (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Conc. Final (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>1055f</b>	ATGGCTGTCGTCAGCT	<b>16S rDNA</b> multicopia	100	0,6
<b>1392r</b>	ACGGGCGGTGTGTAC		100	0,6
<b>16sTaq1115</b>	6-FAM- CAACGAGCGCAACCC- TAMRA		100	0,25

**Sol:** solución; **Conc:** concentración. El volumen de la solución de trabajo tanto de las sondas como de los cebadores (iniciadores) se ajustó a 50  $\mu\text{L}$  con agua libre de ADN-ARNasas, agua grado molecular. Se tomaron de la solución madre 7,5  $\mu\text{L}$  para los cebadores y 12,5  $\mu\text{L}$  para la sonda.

Para el 16S rDNA es un segmento de ADN que es multicopia dentro de las bacterias, y es específica la cantidad de replicas encontradas para cada bacteria en particular. Por ejemplo, en el caso de *E. coli*, son 7 copias, 3 en *Legionella*, por lo cual si no se trabaja con un microorganismos en especial, lo que se recomienda es trabajar con un promedio de 3,2 copias para esta qPCR.

**Tabla 2.2:** Proporción de la mezcla maestra “Master Mix” para la qPCR de bacterias totales.

qPCR Mezcla maestra	Cantidad (μL)
Environmental Master Mix 2X	12,5
Cebador directo <b>1055f</b>	1,0
Cebador inverso <b>1392r</b>	1,0
Sonda <b>16sTaq1115</b>	0,5
Volumen total de la mezcla maestra	15,0
Volumen de la muestra de ácido nucleico (ADN) a analizar	10,0

f: forward (directo); r: reverse (inverso). Los volúmenes aquí señalados para agregar, corresponden a volúmenes de la solución de trabajo preparada con las concentraciones señaladas en la Tabla 2.1.

- **Programa de temperaturas y ciclos de amplificación para la qPCR de bacterias totales**

El programa de temperaturas de amplificación que se utilizó para la qPCR de bacterias totales fue el sugerido por el autor Harms, G. et al. Este programa de amplificación se utilizó en el apartado 3.1., el 4.1.2. y el 4.2.

**Tabla 2.3:** Programa de temperaturas y número de ciclos de amplificación para la qPCR de bacterias totales con sus respectivos ciclos, temperaturas y tiempos. Este rango de temperaturas esta preparado para ser realizado en Applied Biosystems.

Microorganismo	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
<b>Bacterias Totales</b>	1	50	3:00
	1	95	10:00
	45	95	00:30
		50	1:00
		72	0:20

#### 2.2.4.2.2. Cuantificación por PCR en tiempo real de *E. coli* y *E. faecalis*

Las qPCRs de *E. coli* y de *E. faecalis* se diseñaron a partir de la publicación de Khan et al. (2007) y de Shannon et al. (2007) respectivamente, y en ambas qPCR se hicieron modificaciones (Khan et al. 2007a)(Shannon et al. 2007). Los programas de amplificación, la escogencia de los cebadores y la sonda de cada qPCR la realizó el grupo de investigación dirigido por el Dr. Michael Seidel, pertenecientes al Instituto de Química del agua y Balneología, y la Universidad Técnica de Munich, Alemania (TUM). Estas qPCRs se utilizaron para la cuantificación bacteriana en las secciones 3.1., 3.2., 4.2., 4.2.1., 4.3., y el capítulo 5.

Para la qPCR de *E. coli* se utilizó la sonda *E. coli* Probe 6-FAM-TTGCTGGTTTGTGAGTGAAAGTCGCC-BHQ-1 y los cebadores *E. coli* FWD 5'-CAATTTTCGTGTCCCCTTCG-3', como cebador directo y *E. coli* REV. 5'-CATCACCCGAAGATGAGTTTT-3', como cebador inverso. El cebador directo, *E. coli* FWD está basado en el artículo publicado por Khan et al.

En el caso de la qPCR de *E. faecalis*, de los cebadores y la sonda sugeridos por Shannon et al. en su artículo se pasó a utilizar la secuencia del cebador directo Efaecal-F TGTGGCAACAGGGATCAAGA (*E. faec*-FWD) tal cual la sugiere los autores. El cebador inverso o "reverse" y la sonda fueron diseñados por el grupo dirigido por el Dr. Michael Seidel de la Universidad Técnica de Munich, El cebador inverso o "reverse" utilizado fue *E. faec*-REV 5'-CATAACCAGCATTTTCAGCGAT-3'. En el caso de la sonda sugerida por los autores, se le hizo una pequeña modificación en la cola 3'. Se le adicionaron 3 nucleótidos a la secuencia establecida por los autores, pasando de utilizar Efaecal-PR TCGTTCGTGCATTAGA a utilizar Efaec-probe 6-FAM-TCGTTTCGTGCATTAGA**AGA**-BHQ1.

Una vez seleccionados los cebadores y la sonda de cada qPCR, se procedió a la elaboración de los puntos de la curva estándar, en primer lugar, a partir del ADN extraído de cada dilución decimal que se hizo de un cultivo celular del microorganismos estudiado en fase exponencial (*E. coli* o *E. faecalis*). Una vez

obtenidas estas diluciones se realizó la qPCR para estas diluciones y así poder obtener los puntos de referencia de la curva patrón, conociendo así los Cts a los que amplificaban cada dilución, con sus respectiva pendiente, % de eficiencia, coeficiente de determinación y el intercepto con el eje y. Una vez obtenidos estos valores se procedió a realizar los ajustes que fueran necesarios para validar estas qPCR y sus valores.

Para la confirmación de que los cebadores y sondas amplificaban para el microorganismo estudiado, en este caso *E. coli* y *E. faecalis* se realizó un “Nucleotide BLAST” para encontrar las regiones de similitud entre el genoma de la bacteria y los cebadores y la sonda utilizados. Esto se logró haciendo una comparación de las secuencias de los nucleótidos de los cebadores y la sonda con las secuencias de genomas existentes en el NCBI GenBank.

### **Elaboración de las curvas patrón para ambos microorganismos.**

La elaboración de las curvas patrón de ambas qPCR se realizó en primera instancia a partir de cultivo celular. Esto se hizo así, porque en sus inicios no se contó con los segmentos de ADN (gBlocks) ya que la elaboración de los mismos fue difícil para la empresa que los elabora, lo que retardó su llegada. Además, los demás grupos que participaban dentro del proyecto de investigación (Metawater JPI) estaban utilizando para la elaboración de la curva patrón el cultivo celular. Sin embargo, el grupo continuó con la validación de estas dos qPCR por lo cual se utilizó diferentes formas de elaboración de la curva patrón para así poder expresar valores de cuantificación lo más cercano posible a la realidad.

- **Estándar para elaborar la curva patrón a partir de células**

Para la preparación del estándar a partir de cultivo celular de las cepas *E. coli* (DSM 423) y *E. faecalis* (OG1RF), se procedió de la siguiente forma:

Se cultivó *E. coli* (DSM 423) (o *E. faecalis* OG1RF) en 10 mL de TSA o LB separadamente a 37 °C, midiendo su concentración por espectrofotometría hasta obtener una  $DO_{600\text{ nm}}$  entre 0,6 – 0,7. A esta DO sabemos que tenemos  $\cong 10^8$  ufc/mL. Se tomó 1 mL de este cultivo con una concentración de  $10^8$  ufc/mL

y se realizó una dilución decimal para obtener concentraciones celulares desde  $10^8$  hasta  $10^1$  ufc/mL. Una vez obtenida esta dilución, se toma 1 mL de cada concentración y se coloca en un microtubo de 1,5 mL. Se centrifugan a 10000 rpm y nos quedamos con el sedimento celular “pellet” de cada concentración por separado. Luego procedimos a realizar la extracción de los ácidos nucleicos siguiendo el protocolo establecido en la sección anterior (2.2.4.) para el kit de Qiagen. Los ácidos nucleicos obtenidos para cada concentración se analizaron por duplicado mediante la PCR en tiempo real específica para cada microorganismo, obteniendo de esta forma los puntos de nuestra curva estándar o patrón en ufc/mL.

- **Estándar para elaborar la curva patrón a partir de segmentos de doble cadena “gBlocks”**

Los segmentos de gBlocks para la qPCR de *E. coli* y *E. faecalis*, contiene la secuencia diana a cuantificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Esta secuencia diana pertenece a una sección conservada del gene *groEs* en el caso de *E. faecalis* y del ITS, en *E. coli*.

La preparación de la concentración deseada del estándar se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante del segmento de ADN. Para la cuantificación del número de copias que teníamos en el tubo madre se utilizó la fórmula citada en 2.2.4.2.1.

Una vez obtenida la cantidad de copias de ADN que poseía el segmento, se procede a preparar una dilución decimal para obtener  $10^0$  a  $10^8$  copias genómicas por reacción. Con esta dilución decimal se elaboró los puntos de la curva estándar, y para cada ensayo en el que se empleó este estándar, los puntos de la curva se cuantificaron por duplicado. El estándar se ajustó de 9,93 -  $9,93 \times 10^8$  copias genómicas por 10  $\mu$ L de reacción (CG/Rx) en el caso de *E. coli* y de 1,40 -  $1,40 \times 10^8$  CG/ 10  $\mu$ L de reacción para *E. faecalis*. En el caso del segmento utilizado para *E. coli* tiene una longitud de 190 pares de bases (pb), y el de *E. faecalis* tiene una longitud de 130 pb. Las secuencias de estos gBlocks se encuentran en el Anexo I K.

- **Concentración y secuencias de iniciadores y sondas**

En la siguiente tabla podemos observar los nombres, secuencias genes y las concentraciones de trabajo y las concentraciones finales de los cebadores y las sondas que se utilizaron para realizar las PCR en tiempo real de *E. coli* y *E. faecalis*.

**Tabla 2.4:** Secuencias de los cebadores y las sondas utilizadas para las PCR en tiempo real de *E. coli* y *E. faecalis*, las concentraciones de las soluciones de trabajo y finales utilizadas en estas qPCR, y los genes para los que codifican.

qPCR	Nombre	Secuencia (5' → 3')	Gen	Sol. de trabajo (μL)	Conc. Final (μM)
<i>E.coli</i>	E.coli-FWD	CAATTTTCGTGTCCCCTTCG	ITS multicopia  (148 pb)	22,5	0,9
	E.coli-REV	CATCACCCGAAGATGAGTTTT		22,5	0,9
	E.coli-probe	6-FAM- TTGCTGGTTTGTGAGTGAAAGTCGCC- BHQ-1		11,25	0,225
<i>E. faecalis</i>	E.faec-FWD	TGTGGCAACAGGGATCAAGA	groES  1 copia  (77 pb)	22,5	0,9
	E.faec-REV	CATAACCAGCATTTTCAGCGAT		22,5	0,9
	E.faec-probe	6-FAM-TCGTTTCGTGCATTAGAAGA- BHQ1		11,25	0,225

**FWD:** forward (directo); **REV:** reverse (inverso); **Sol:** solución; **Probe:** sonda; **Conc:** concentración. El volumen de la solución de trabajo tanto de las sondas como de los cebadores (iniciadores) se ajustó a 100 μL con agua libre de ADN-ARNasa, agua grado molecular. Se parte de que los cebadores y la sondas vienen a una concentración inicial de 100 μM.

Se añadieron 10 μL del ADN extraído a cada pocillo de la placa que contenga la mezcla maestra (15 μL) que contenía las proporciones de los reactivos para estas 2 qPCR (Tabla 2.5). Se cubrieron los pocillos con la película óptica (MicroAmp™ 48-well optical adhesive), asegurándonos que no hubiera líquido adherido a los lados de los pocillos ni en la lámina adhesiva que cubría la placa. Una vez preparada la placa con los reactivos necesarios para realizar la qPCR se procedió a su lectura en el StepOne™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific).

**Tabla 2.5:** Proporción de la mezcla maestra para las qPCRs de *E. coli* y *E. faecalis*.

qPCR Mezcla maestra	Cantidad (μL)
Environmental Master Mix 2X	12,5
Cebador directo (FWD)	1,0
Cebador inverso (REV)	1,0
Sonda (Probe)	0,5
Volumen total de la mezcla maestra	15,0
Volumen de la muestra de ácido nucleico (ADN) a analizar	10,0

**FWD:** forward (directo); **REV:** reverse (inverso); **Probe:** sonda. Los volúmenes aquí señalados para agregar, corresponden a volúmenes de la solución de trabajo preparada con las concentraciones señaladas en la Tabla 2.4.

- **Programas de temperaturas y ciclos de amplificación para las qPCRs de *E. coli* y *E. faecalis***

Al programa de temperaturas de amplificación para la qPCR de *E. coli* sugerido por Khan et al. se le realizaron algunas adaptaciones (Khan et al. 2007b). En el caso de la qPCR de *E. faecalis* sugerida por Shannon et al. A el programa sugerido por los autores también se le realizaron algunas modificaciones (Shannon et al. 2007). Las modificaciones realizadas al programa de temperaturas de amplificación se muestran en la Tabla 2.6. y fueron realizadas por el grupo de investigación de la Universidad Técnica de Munich, Alemania dirigido por el Dr. Michael Seidel.

**Tabla 2.6:** Programa de las temperaturas y ciclos de amplificación para las qPCRs de *E. coli* y *E. faecalis* con sus respectivos ciclos, temperaturas y tiempos.

Microorganismos	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos-segundos)
<i>E. coli</i> y <i>E. faecalis</i>	1	95	10:00
	45	95	00:15
	45	60	1:00

#### 2.2.4.2.3. Cuantificación por PCR en tiempo de *Legionella* spp.

La qPCR implementada para la cuantificación de *Legionella* spp. es una adaptación del protocolo de (Herpers et al. 2003), citados por (Declerck et al. 2007), (Cervero Aragón 2013) y (Fernandez-Cassi et al. 2016), a los cuales se les hizo modificaciones. Esta qPCR se utilizó en las secciones 3.1. y en el capítulo 5.

- **Estándar a partir de células para las qPCRs de *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila*.**

Para la preparación del estándar a partir de cultivo celular de las cepas *Legionella pneumophila* sg. 1 ATCC 33152, se procedió de la siguiente forma:

Se cultivó *Legionella pneumophila* sg. 1 ATCC 33152 (procedente de un cultivo fresco) en agar BCYE a 37 °C por 3 ± 2 días. Se resuspendieron las colonias en 2 mL de agua de uso molecular o agua destilada estéril. Se tomó 1 mL de este cultivo y se realizó la extracción de ADN por la técnica de choque térmico (Van Eys et al. 1994).

Para esta técnica se agita vigorosamente con un agitador automático la muestra durante 60 segundos, luego se deja a temperatura ambiente durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se calentó la muestra en el Thermomixer durante 10 minutos a 100 °C y de allí, se colocó la muestra a – 20 °C por 10 minutos, pasados los cuales, se agita nuevamente con el agitador automático por 30 segundos. A continuación, se centrifugó la muestra a 14000 rpm durante 5 minutos. Y, por último, se recuperó el sobrenadante, el cual contiene el ADN.

Una vez obtenido el sobrenadante, se mide con el Nanodrop la cantidad de ADN extraído de la muestra y se calcula la cantidad de moléculas de ADN/ mL de la muestra utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de ADN} = \frac{\text{pb genoma de la bacteria} \times 660 \text{ u.m.a.}}{1 \text{ molécula de } \textit{Legionella pneumophila}} \times \frac{\text{g}}{6,02 \times 10^{23}}$$

$$\text{Cantidad de ADN} = \frac{2,24 \times 10^9 \text{ u.m.a}}{1 \text{ molécula de Legionella}} \times \frac{\text{gramos}}{6,022 \times 10^{23}}$$

gramos: se obtiene este valor al medir la cantidad de ADN con el Nanodrop.

Una vez conocida la cantidad de moléculas de ADN/mL de muestra, se procede a realizar una dilución decimal para obtener concentraciones desde el  $10^7$  hasta  $10^1$  moléculas de ADN/ 5  $\mu$ L de reacción.

Los ácidos nucleicos obtenidos para cada concentración se analizaron por duplicado mediante la PCR en tiempo real específica para *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila*, obteniendo de esta forma los puntos de nuestra curva estándar o patrón.

- **Concentración y secuencias de iniciadores y sondas**

En la tabla 2.7. podemos observar los nombres, secuencias genes y las concentraciones de trabajo y las concentraciones finales de los cebadores y las sondas que se utilizaron para realizar las PCR en tiempo real de *Legionella* spp. Una vez preparada la placa con los reactivos necesarios para realizar la qPCR se procedió a su lectura en el StepOne™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific).

**Tabla 2.7:** Secuencias de los cebadores y la sonda utilizados para realizar la qPCR de *Legionella* spp. con sus respectivas concentraciones.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Gen	Sol. de trabajo ( $\mu$ L)	Conc. Final ( $\mu$ M)
<b>Leg-F</b>	CTAATTGGCTGATTGTCTTGAC	23S – 5S rDNA	10	0,9
<b>Leg-R</b>	GGCGATGACCTACTTTTCG		10	0,9
<b>Sonda Leg</b>	FAM-CGAACTCAGAAGTGAAAC-TAMRA		10	0,2

F: forward (directo); R: reverse (inverso); Sol: solución; Conc: concentración. El volumen de la solución de trabajo tanto de las sondas como de los cebadores (iniciadores) se ajustó a 100  $\mu$ L con agua libre de ADN-ARNasas, agua grado molecular. Partiendo de una concentración inicial de cebadores y sondas de 100  $\mu$ M.

**Tabla 2.8:** Proporción de la mezcla maestra utilizada para la qPCR de *Legionella* spp.

qPCR Mezcla maestra	Cantidad (μL)
Environmental Mix 2X	12,5
Cebador directo Leg-F	2,25
Cebador inverso Leg-R	2,25
Sonda Leg-Probe	0,5
Agua grado molecular	2,5
Volumen total de la mezcla maestra	20,0
Volumen de la muestra de ácido nucleico (ADN) a analizar	5,0

**F:** forward (directo); **R:** reverse (inverso); **Probe:** sonda. Los volúmenes aquí mostrados se basan en la solución de trabajo que se detalla en la Tabla 2.7

- **Programa de las temperaturas y ciclos de amplificación para la qPCR de *Legionella* spp.**

En la tabla 2.9. se muestra el programa de temperaturas de amplificación ajustado para la qPCR de *Legionella* spp.

**Tabla 2.9:** Programa de los ciclos, temperaturas y tiempos para la qPCR de *Legionella* spp.

Microorganismo	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
<i>Legionella</i> spp.	1	95	10:00
	50	95	00:15
		53	00:20
		60	00:40

#### **2.2.4.2.4. Cuantificación por PCR en tiempo real de *Legionella pneumophila***

La qPCR implementada para la cuantificación de *Legionella pneumophila* es una adaptación del protocolo de (Diederer et al. 2007), modificado por Serrano-Suárez, A., al cual también se le hizo modificaciones en el programa de la qPCR en estos ensayos (Serrano-Suárez et al. 2013). Esta qPCR se empleó para la cuantificación en las secciones 3.1. y el capítulo 5.

- **Estándar para la elaboración de la curva patrón a partir de células**

Para la elaboración de la curva estándar o patrón para qPCR de *Legionella pneumophila* se utilizó el mismo protocolo señalado en la sección 2.2.4.2.2.

- **Estándar de la curva patrón elaborada a partir de gBlocks para la qPCR de *Legionella pneumophila***

Se diseñó un segmento de gBlock para la qPCR de *Legionella pneumophila*, contiene la secuencia diana a cuantificar en una sección del gene Mip. Este segmento tiene una longitud de 146 pb. La preparación de la concentración deseada del estándar se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante del segmento de ADN. Para la cuantificación del número de copias que teníamos en el tubo madre se utilizó la fórmula citada en 2.2.3.1.1. La secuencia de este segmento de ADN fabricado por IDT se encuentra en el Anexo I K.

Una vez obtenida la cantidad de copias de ADN que poseía el segmento, se procede a preparar una dilución decimal para obtener  $1,29 \times 10^1$  a  $1,29 \times 10^8$  copias genómicas por reacción. Con esta dilución decimal se elaboró los puntos de la curva estándar, y para cada ensayo en el que se empleó este estándar, los puntos de la curva se cuantificaron por duplicado. El estándar se ajustó de 1 a  $10^8$  copias genómicas por 5  $\mu$ L de reacción (CG/Rx).

- **Concentraciones de iniciadores y sondas**

Las concentraciones de los cebadores y la sonda para la qPCR de *Legionella pneumophila* la encontramos en la Tabla 2.10. Una vez se tiene la mezcla maestra, se preparó la placa con esta mezcla maestra para qPCR y se procedió a su lectura con el StepOne™ Real-Time PCR System de Biosystems (ThermoFisher Scientific).

**Tabla 2.10:** Secuencia de Iniciadores y sondas utilizados en la qPCR de *Legionella pneumophila* y sus respectivas concentraciones.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Gen	Sol. de trabajo(μL)	Conc.Final (μM)
<b>Mip F1</b>	GCCAAGTGGTTTGCAATACAAA	Mip	10	0,3
<b>Mip R1</b>	CTCGACAGTGACTGTATCCGATTT		10	0,2
<b>Sonda Lpn mip</b>	FAM-5'- TAATCAATGCTGGAAATGGTGTAAACCCG- 3'-TAMRA		1	0,15

F: forward (directo); R: reverse (inverso); Sol: solución; Conc: concentración. El volumen de la solución de trabajo tanto de las sondas como de los cebadores (iniciadores) se ajustó a 100 μL con agua libre de ADN-ARNasas, agua grado molecular. Para la preparación de la solución de trabajo se partió de concentraciones iniciales de 100 μM.

**Tabla 2.11:** Proporción de la mezcla maestra utilizada para la qPCR de *Legionella pneumophila*.

qPCR Mezcla maestra	Cantidad (μL)
Environmental Mix 2X	12,5
Cebador directo Mip F	0,75
Cebador inverso Mip R	0,5
Sonda Lnp mip	3,75
Agua grado molecular	2,5
Volumen total de la mezcla maestra	20,0
Volumen de la muestra de ácido nucleico (ADN) a analizar	5,0

F: forward (directo); R: reverse (inverso). Los volúmenes añadidos a partir de la solución de trabajo de la Tabla 2.10.

- **Programa de las temperaturas y los ciclos de amplificación para la qPCR de *Legionella pneumophila***

En la Tabla 2.12. se muestra el programa de las temperaturas de amplificación de esta qPCR.

**Tabla 2.12:** Programa de los ciclos, temperaturas y tiempos para la qPCR de *Legionella pneumophila*.

Microorganismo	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
<b><i>Legionella spp.</i></b>	1	50	2:00
	1	95	10:00
	45	95	00:15
		59	1:00

### **2.3. Procesamiento de las muestras**

Una vez llegaban las muestras al laboratorio, se procedió a realizar la distribución de las diferentes alícuotas de cada muestra, de la siguiente forma: 2 mL se reservaron para la cuantificación de heterótrofos totales mediante el cultivo en placa de PCA (Plate Count Agar, Scharlau); una alícuota de 1,5 mL se congeló, una alícuota de 1 L se filtró (excepto las muestras de agua residual y agua del secundario de la EDAR de Granollers, que no necesitaban ser concentradas) para el protocolo de aislamiento e identificación de *Legionella* spp.); y 10 L se concentraron por floculación orgánica con leche desnatada (excepto las muestras de agua residual y la del secundario de la EDAR de Granollers), de las cuales solo se concentraron 500 mL) para la extracción de ADN.

### **2.4. Métodos de concentración de las muestras**

En este trabajo estudiaremos tres tipos diferentes de concentración: la concentración por floculación orgánica con leche desnatada, la concentración por filtración con una columna monolítica de adsorción y la concentración por filtración utilizando una membrana de nylon en una trampa de filtración.

#### **2.4.1. Floculación orgánica con leche desnatada (SMF)**

Para el ensayo en el que se comparan dos métodos de extracción de ADN, se utilizaron 3 muestras de agua de grifo de 10 L cada una, dispuestas en 3 depósitos de plástico. Para el ensayo en donde comparamos dos tipos de PCRs en tiempo real, se concentraron por floculación, 10 muestras de agua de grifo; y para el ensayo en donde se comparó la floculación orgánica con leche desnatada con la filtración mediante una columna monolítica de adsorción se dispusieron de 13 muestras de agua mineral Evian. El resto de las muestras, fueron muestras tomadas en diferentes puntos de la región de Cataluña y para su floculación se partió de 10 L de agua para las muestras de terciario-humedal, la de terciario filtración-cloración, la de pozo almacenada en embalse, la de pozo de una granja porcina, la de pozo de una granja avícola y la del río Fluvià, y de 500 mL para las muestras de agua residual directa y de agua del secundario de la EDAR de Granollers.

A continuación, describiremos el protocolo a seguir para la floculación orgánica con leche desnatada para una muestra de agua de 10 L como ejemplo:

#### **2.4.1.1. Condicionamiento del agua**

Se preparó previamente agua de mar artificial y se esterilizó mediante autoclave. Para ello se disolvieron en agua Mili Q, 3,33 g de Sal de mar artificial (Artificial seawater sea salts Sigma Ref. S9883).

Se prepararon 100 mL de Leche desnatada pre floculada, la que denominaremos de aquí en adelante PSM, por cada 10 L de muestra de agua que se analizó, los cuales se prepararon justo antes de ser usados. Para ello se pesó 1,0 g de leche desnatada (Difco-France) y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial (Artificial seawater sea salts Sigma) y luego se ajusta a un pH de 3,5 ( $\pm 0,1$ ) con HCl 1 N.

Se dispuso 1 depósito de plástico limpio y estéril con 10 L de agua de grifo previamente tratada con 100 mL Tiosulfato de sodio al 10% (w/v) para eliminar el cloro disuelto en la misma. Se midió la conductividad de la muestra, ajustándola si está estaba por debajo de 12000  $\mu\text{S}$  a una conductividad superior a 14000  $\mu\text{S}$ . En el depósito de plástico se colocó una barra magnética para facilitar su posterior agitación.

Se ajustó el pH de la muestra de agua a 3,5 ( $\pm 0,1$ ) añadiendo ácido clorhídrico 1N, dejándolo deslizar por las paredes del contenedor. Este paso es muy importante para la concentración de los microorganismos, por lo cual nos aseguramos de que el pH esté debidamente ajustado. Se mezcló bien el agua agitándola vigorosamente.

Agregamos 100 mL de leche desnatada pre floculada al 1% a los 10 L de muestra.

En este punto, en el caso de los ensayos cuya agua era proveniente del grifo de la Facultad de Biología, o el ensayo cuya agua era agua mineral embotellada Evian, las muestras a flocular se inocularon con una cantidad de microorganismos conocida, ya que, estos tipos de agua o no poseen

microorganismos o son escasos, por lo cual necesitábamos inocular una cantidad mayor de ellos, para poder evaluar el método u otras técnicas. Exceptuando los controles negativos o negativos de floculación, que no fueron inoculados con microorganismos.

Una vez preparada la muestra de agua con la leche desnatada pre floculada, se mantuvo en agitación el depósito durante un periodo de 8 – 10 horas para facilitar la adsorción de los microorganismos a los flóculos. Se utilizó un minuterero de apagado automático programándolo para que se apagara después de transcurridas 8 horas.

Una vez que se detiene la agitación, se deja sedimentar por gravedad durante un periodo de 8 a 10 horas.

#### **2.4.1.2. Obtención de los flóculos. Concentración del sedimento.**

Se removió el sobrenadante utilizando una bomba peristáltica y una pipeta de plástico conectada a un microtubo de plástico. Para las muestras inoculadas, el sobrenadante se recogió en una botella de centrifugación debidamente esterilizada por autoclave y desinfectada. En todos los casos se tuvo cuidado de no alterar el sedimento. Se utilizó una pipeta limpia y estéril para cada muestra.

Se recolectó el sedimento con el flóculo (aproximadamente 500 mL) en una botella de centrifugación (Scharlab, Ref 19573501). Se balancearon los recipientes añadiendo agua de mar artificial a pH 3,5.

Se centrifugaron las botellas de centrifugación a alta velocidad a una FCR (fuerza centrífuga relativa) de 8000 x g por 30 minutos a 4 °C. Tan pronto como la centrifuga se detiene, se removieron las botellas de centrifugación cuidadosamente de la centrifuga.

Se vertió muy cuidadosamente el sobrenadante y se desechó siguiendo las medidas apropiadas para el manejo de material infeccioso. Se agregaron 3 mL de buffer Fosfato a cada botella de centrifuga. Una vez se disolvieron los flóculos, se midió y agregó buffer fosfato hasta alcanzar un volumen total de 10 mL.

### **2.4.1.3. Conservación de los concentrados**

Se homogenizó el concentrado utilizando un agitador automático y se transfirieron los 10 mL a varios microtubos de 5 mL.

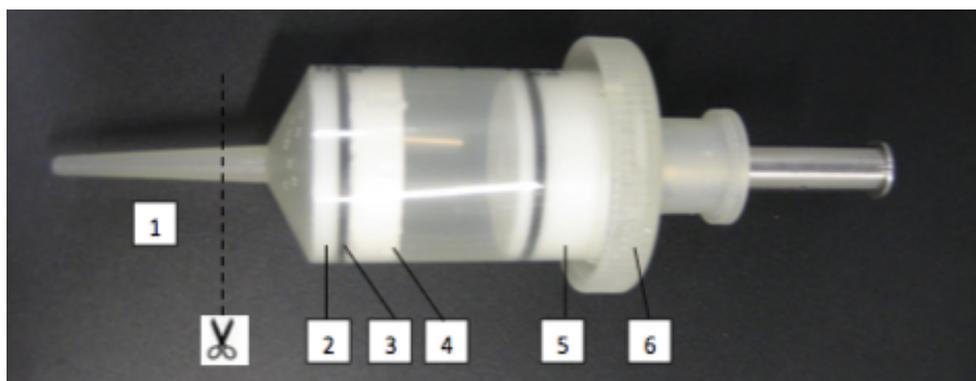
De estos 10 mL de concentrado, se tomó una alícuota de 1200  $\mu$ L para el cultivo en TSA (en el caso de la cuantificación de células viables-cultivables) y el resto (8,2 mL) se congelaron  $-80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  hasta que se necesitaron para el posterior análisis de cuantificación molecular.

### **2.4.2. Filtración con una columna monolítica de adsorción (MAF)**

El sistema de filtración a través de una columna monolítica de adsorción está formado por una columna cuyo principal componente es un disco de un polímero basado en epoxi macroporoso hidrolizado, con un tamaño de poro de 20  $\mu\text{m}$ , el cual basa su retención de virus y bacterias en la interacción iónica e hidrofóbica que se genera al acidificar las muestras a un pH de 3, y luego eluir el filtrado con un tampón de elución a un pH de 9,5. Este se combina con una ultrafiltración centrífuga. Este polímero fue desarrollado por el grupo de investigación dirigido por el Ing. Dennis Elsässer y el Dr. Michael Seidel de la Universidad Técnica de Munich, Alemania. En los anexos I E y I F se exponen el organigrama de la distribución, preparación y análisis de las muestras, y una fotografía del sistema MAF una vez está listo para su uso con las muestras.

#### **2.4.2.1. Construcción de la columna**

Para garantizar que la carcasa (1) aguante la presión durante la filtración, la punta de la carcasa se corta a una longitud de alrededor de 0,9 cm. Para construir la columna monolítica, el soporte de PTFE (2) se coloca en la carcasa. El anillo O (3) y el disco monolítico (4) se colocaron en la parte superior.



**Figura 2.1:** Componentes de la columna MAF: 1: carcasa, 2: soporte PTFE, 3: Anillo O, 4: disco monolítico, 5: accesorio de montaje (fitting), 6: adaptador

Después de colocados el disco monolítico, el accesorio (5) y el adaptador (6) se conectan a la bomba mediante un soporte de tubo PTFE. La bomba está conectada a una botella con agua ultra pura de pH 3 (ajustada con HCl) para equilibrar el disco de MAF. El bombeo se inicia a un caudal bajo (aproximadamente 200 ml / min) y el adaptador se sujeta en la parte superior de la carcasa hasta que la carcasa se llena con agua.

Una vez que la carcasa estaba llena, el adaptador empuja en la carcasa obligando el agua a pasar a través del disco MAF. Es importante no permitir que se formen burbujas de aire en el interior de la carcasa. Después el adaptador fue cerrado o bloqueado con el montaje accesorio del adaptador y el caudal que se hizo pasar a través del sistema de filtración aumentó hasta un valor final de 1 L/ minuto. Se hizo pasar 1 L de agua del grifo a través de la columna monolítica para equilibrarla. Una vez que se hizo pasar el litro de agua, se detiene el bombeo de agua y se cambia la conexión de la bomba a una muestra de agua, manteniendo la presión constante en el sistema MAF se mantiene la columna llena de agua todo el tiempo y se evitó la formación de burbujas de aire. Ahora el sistema está listo para la filtración de la primera muestra.

#### **2.4.2.2. Preparación de los tampones para la concentración con MAF**

- **Tampón de elución**

El tampón de elución se preparó añadiendo polvo de extracto de carne de vaca (3% p/v) y glicina (0,5 M) a agua ultra pura y se agita con un agitador magnético hasta que se disolvió. Se ajustó el pH a 9,5 mediante la adición de HCl. Se esterilizó mediante autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de su uso.

- **Tampón fosfato-solución salina**

Este tampón se elaboró añadiendo NaCl 145 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  70 mM que se mezclaron y se les ajustó el pH a 7,6. Se esterilizó en el autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de su uso.

#### **2.4.2.3. Filtración**

Para filtrar las muestras la columna se fijó sobre un recipiente de plástico. La bomba se conectó a la muestra, que se había ajustado a un pH de 3 con HCl. Se usa una velocidad de flujo de hasta 1 L por minuto hasta que toda la muestra haya pasado a través de la columna. Evitando la formación de burbujas tanto en la columna como en la manguera durante la filtración. Después de la filtración, la columna se vació. El bombeo de aire a través de la columna después de la filtración no afecta la elución de la muestra. Se desconectó el tubo de goma del accesorio y la salida de la carcasa fue cerrada.

#### **2.4.2.4. Elución**

Para la elución, el tubo de goma de la bomba está desconectado del accesorio, la salida está bloqueada (por ejemplo, por un trozo pequeño de tubo de goma que está bloqueado con una abrazadera o enchufe). Se añaden 20 ml de tampón de elución a la carcasa con una jeringa y una aguja larga. Luego, el tubo de goma se vuelve a conectar al accesorio y se abre la salida. El caudal de la bomba se establece en 150 ml / min para la elución. Después de que un tercio del búfer ha pasado a través de la columna, la bomba se apaga, la salida de la carcasa se bloquea nuevamente y el disco se incuba durante 2 minutos. Luego, la salida se abre de nuevo y otro tercio del buffer se bombea a través de la columna. La salida se cierra de nuevo y el disco se incuba durante otros 2 min. Luego, el último tercio del buffer pasa a través de la columna.

**Nota:** los discos de columna monolítica y la carcasa de la jeringa no pueden ser utilizadas para más de una muestra, para prevenir la contaminación cruzada.

#### **2.4.2.5. Ultrafiltración centrífuga**

Para una mayor concentración de la muestra a 1 mL se ultra filtró-centrifugó (Amicon Ultra- 15 Millipore) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente la muestra se rellenó hasta 5 mL con el búfer PBS y se analizó de acuerdo con las instrucciones del punto 2.3.2.2.2, 2.3.2.2.3 y 2.3.2.2.4 que se detallaron anteriormente.

#### **2.4.2.6. Limpieza**

Después de cada filtración, el accesorio, el adaptador y el soporte PTFE se limpian hirviéndolos (100 °C después se saca del fuego y se cambia el agua de cada muestra) durante 5 minutos. Posteriormente, las partes se dejaron enfriar en agua limpia y ultra pura y se utilizaron para la siguiente filtración.

El tubo de goma de la bomba también se reemplazó para cada muestra. Las partes desechables (carcasa y discos monolíticos) antes de ser descartadas se esterilizaron mediante autoclave.

#### **2.4.2.7. Conservación de los concentrados**

Se homogenizó el concentrado utilizando un agitador automático y se transfirieron los 5 mL a un microtubos de 5 mL.

De estos 5 mL de concentrado, se tomó una alícuota de 250  $\mu$ L para la extracción de ADN y el resto (4,75 mL) se congelaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **2.5. Tipos de muestras**

El agua utilizada para los ensayos de concentración por floculación orgánica realizados para comparar dos métodos de extracción de ácidos nucleicos y para comparar dos tipos de PCRs cuantitativas o PCR en tiempo real, fue agua del grifo. Para el ensayo comparativo entre la floculación orgánica con leche

desnatada y la filtración mediante una columna monolítica de adsorción se utilizó agua mineral Evian.

Para la aplicación de las diferentes técnicas y métodos seleccionadas en los ensayos comparativos, se utilizaron 8 puntos de muestreo con diferentes tipos de agua:

- 1 muestra de agua residual de entrada al sistema de depuración (o tratamiento), EDAR Granollers;
- 1 muestra de agua del secundario de la EDAR de Granollers;
- 3 muestras de agua de salida del sistema de depuración del agua;
- 3 muestras de agua de fuentes subterráneas; y
- 1 muestra de agua del río Fluvià.

Los puntos de muestreo antes mencionados están enmarcados dentro del proyecto de la Unión Europea Metawater JPI, en el cual nuestro grupo era uno de los participantes por parte de la Universidad de Barcelona, dirigido por la Dra. Rosina Girones.

Para su mejor análisis a la hora de comparativas, los hemos agrupado en muestras de agua que se utilizan para el riego convencionales, entre ellas, el agua del río Fluvià, el agua de pozo en una granja avícola, el agua de pozo de una granja porcina, el agua de pozo almacenado en balsa (que se utiliza para el regadío de huertos), y el grupo de muestras de aguas de riego no convencionales, como el agua residual afluyente EDAR Granollers, el agua del secundario EDAR Granollers, el agua del terciario-humedal EDAR Granollers, el agua del terciario filtración-cloración y el agua del terciario lagunaje para riego de huertos.

# Resultados



### **3. Puesta a punto de los métodos moleculares para la determinación de las bacterias presentes en el agua mediante qPCR**

#### **3.1. Mejoramiento y puesta a punto de las PCRs en tiempo real de *E. coli*, *E. faecalis*, bacterias totales, *Legionella* spp., y de *Legionella pneumophila***

En esta sección citamos las diferentes técnicas de qPCR utilizadas para la cuantificación de bacterias, tanto las nuevas qPCR implementadas como aquellas utilizadas con anterioridad en nuestro grupo, algunas de las cuales se les hizo modificaciones durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

Los protocolos utilizados para estas qPCR se citaron en la sección 2.2.4.2. Para la puesta a punto de estas qPCR se siguieron los siguientes pasos:

1. Cálculo de las concentraciones de los cebadores y sondas utilizadas; optimización de las temperaturas adecuadas en caso de ser necesario para aquellas qPCR ya establecidas en el grupo.
2. Programa de temperatura de amplificación para las diferentes fases de la qPCR y número de ciclos.
3. Preparación de las proporciones a utilizar en cada mezcla maestra para cada qPCR.
4. Elaboración de los estándares (de células o de gBlocks).
5. Corridas de las curvas estándares para verificar el correcto funcionamiento del protocolo de cada qPCR, incluyendo los controles negativos y positivos.
6. Verificación de las pendientes, el intercepto con el eje y, el  $R^2$  y el % de eficiencia de cada qPCR, para asegurarnos que las mismas se encontraban entre los rangos establecidos como aceptables en una qPCR.
7. Verificación de los controles negativos (NTC, y negativos con ADN procedente a otro microorganismo diferente al detectado por la qPCR).
8. Verificación de controles positivos para cada qPCR. Estos controles son ADN perteneciente al microorganismo detectado por la qPCR en cantidades conocidas previamente para valorar la sensibilidad de la misma.

En la siguiente tabla (Tabla 3.1.) resumimos los valores promedios encontrados para las qPCRs utilizadas en este trabajo en cuanto a su pendiente, intercepto con el Eje y, coeficiente de determinación  $R^2$  y el % de eficiencia de cada qPCR. Para todas ellas, los valores obtenidos se encuentran entre los límites recomendados (pendiente entre -3,2 y -3,5; coeficiente de determinación  $\geq 0,95$  y un % de eficiencia  $\geq 95,00$  %). Cada valor promedio se obtuvo a partir de los valores obtenidos en por lo menos 10 qPCR para cada grupo estudiado.

**Tabla 3.1:** Valores promedio para la pendiente, el intercepto con el Eje y, coeficiente de determinación  $R^2$  y % de eficiencia de la qPCR de bacterias totales, *E. coli*, *E. faecalis*, *Legionella* spp., y *Legionella pneumophila*.

qPCR	Pendiente	Int. Eje y	$R^2$	% Eficiencia
<b>Bacterias totales</b>	-3,31 $\pm$ 0,10	40,06 $\pm$ 1,55	0,951 $\pm$ 0,05	100,73 $\pm$ 4,16
<i>E. coli</i>	-3,31 $\pm$ 0,06	42,11 $\pm$ 2,60	0,99 $\pm$ 0,003	100,32 $\pm$ 2,62
<i>E. faecalis</i>	-3,35 $\pm$ 0,14	45,47 $\pm$ 2,03	0,99 $\pm$ 0,004	99,61 $\pm$ 5,63
<i>Legionella</i> spp.	-3,26 $\pm$ 0,18	41,47 $\pm$ 1,42	0,98 $\pm$ 0,007	103,11 $\pm$ 7,33
<i>Legionella pneumophila</i>	-3,38 $\pm$ 0,10	48,92 $\pm$ 7,51	0,99 $\pm$ 0,003	97,51 $\pm$ 4,25

Int.:intercepto de la curva con el eje de las y;  $R^2$ : coeficiente de determinación. Todos los valores promedio se han obtenido de las curvas estándares de al menos 10 qPCRs realizadas para cada qPCR específica.

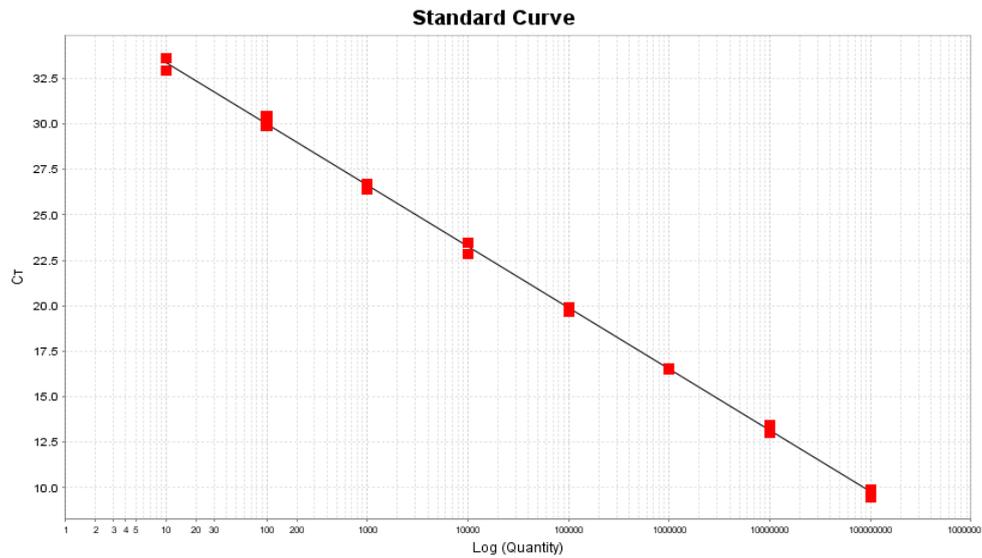
- **qPCR de *E. coli***

Esta qPCR está basada en el protocolo propuesto por Khan et al. al cual se le realizaron diferentes modificaciones. Para la qPCR de *E. coli* se pasó de utilizar una sonda SYBR GREEN a utilizar un sonda TaqMan, y se utilizó uno de los cebadores sugeridos en el artículo, el IEC-UP 5'- CAATTTTCGTGTCCCCTTCG -3' (*E. coli* FWD) y el cebador reverso (anti sentido) (*E. coli* REV). 5' - CATCACCCGAAGATGAGTTTT - 3' y la sonda *E coli* Probe 6-FAM-TTGCTGGTTTGTGAGTGAAAGTCGCC-BHQ-1 fue propuesto por el grupo de la Universidad Técnica de Munich (TUM).

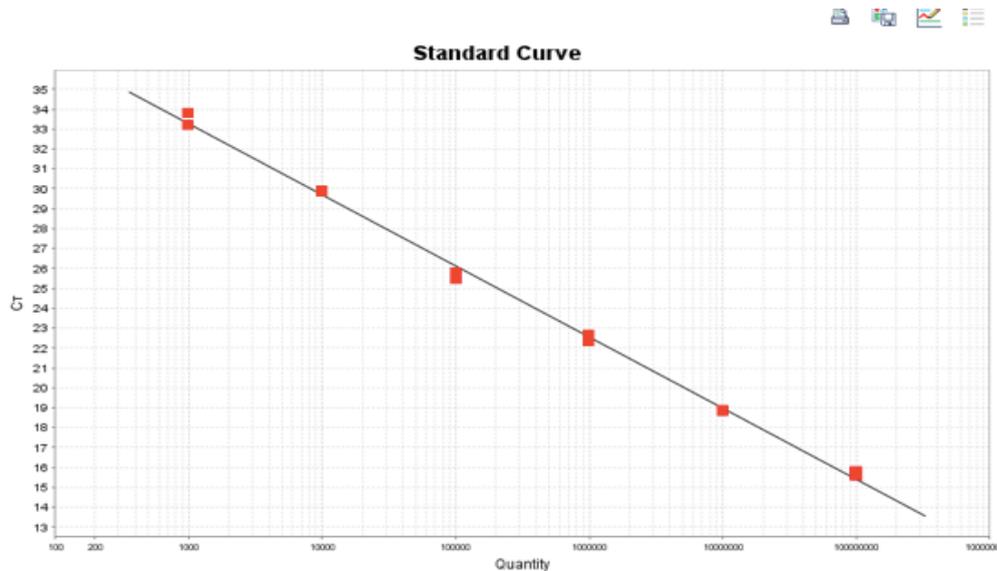
Al evaluar la curva estándar para la qPCR de *E. coli*, podemos decir que tiene un límite de detección entre  $10^1$  copias genómicas/mL y  $10^8$  copias genómicas/mL para el estándar a base de ADN celular, o  $10^2$ - $10^8$  y copias

genómicas (CG)/ 10 µL reacción para la qPCR con estándar a base de segmento gBlock. Su pendiente se ajusta a los valores recomendados teniendo una pendiente de  $-3,31 \pm 0,06$ ; intercepto con el eje y:  $42,11 \pm 2,61$ ; un  $R^2:0,99 \pm 0,003$  y un % eficiencia del  $100,32 \pm 2,62$  %.

En la figura 3.1. podemos observar la curva estándar para la qPCR de *E.coli*.



**Figura 3.1:** Curva estándar a base de ADN celular para la qPCR de *E. coli*. Pendiente:  $-3,31 \pm 0,06$ ; Int. Eje y:  $42,11 \pm 2,61$ ;  $R^2:0,99 \pm 0,003$ ; % efic. del  $100,32 \pm 2,62$  %.



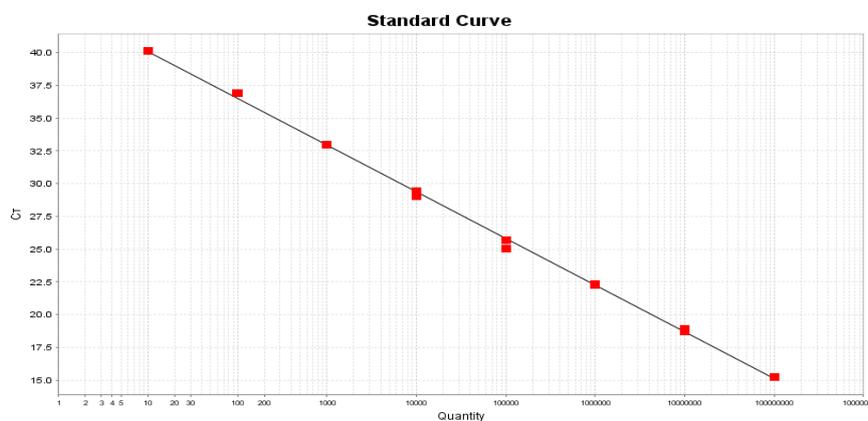
**Figura 3.2:** Curva estándar a base de segmento gBlocks para la qPCR de *E. coli*. Pendiente:  $-3,56 \pm 0,23$ ; Int. Eje y:  $45,44 \pm 0,94$ ;  $R^2:0,998 \pm 0,0007$ ; % efic. del  $95,89 \pm 3,39$  %.

- **qPCR de *E. faecalis***

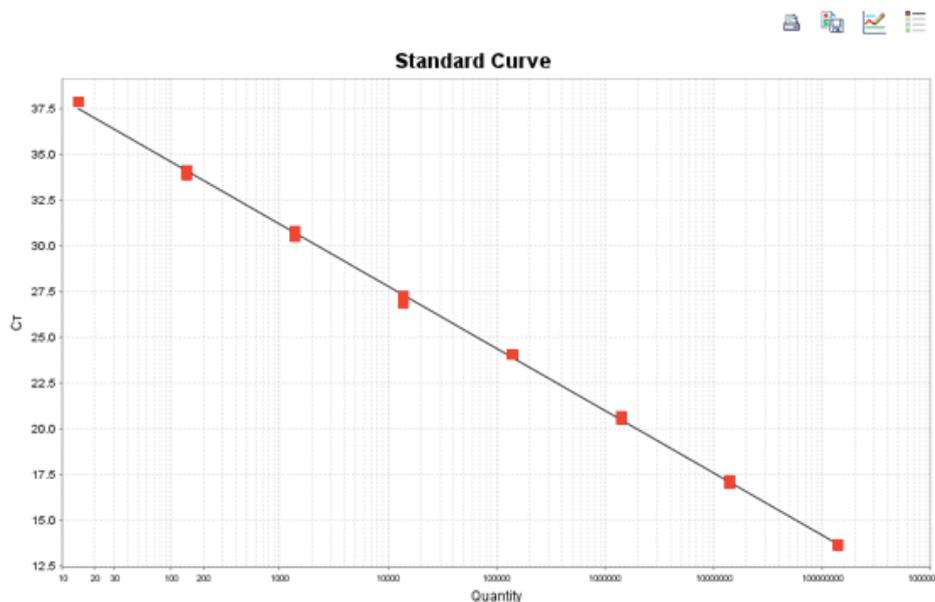
En el caso de la qPCR de *E. faecalis*, de los cebadores y la sonda sugeridos por Shannon et al. en su artículo se pasó a utilizar la secuencia del cebador con sentido Efaecal-F TGTGGCAACAGGGATCAAGA (E.faec-FWD) tal cual la sugiere los autores, el cebador inverso o “reverse” sugerido no se utilizó por no encontrarse este dentro de la secuencia completa para el gene groES de *Enterococcus faecalis* que aparecía en el NCBI (The National Center for Biotechnology Information). En el caso de la sonda sugerida por los autores, se le hizo una pequeña modificación en la cola 3'. Se le adicionaron 3 nucleótidos a la secuencia establecida por los autores, pasando de utilizar Efaecal-PR TCGTTCGTGCATTAGA a utilizar Efaecal-PR TCGTTCGTGCATTAGA**AGA**. Estas modificaciones y selección de los cebadores y la sonda fueron realizado por el grupo de la Universidad Técnica de Munich (TUM).

Al evaluar la curva estándar para la qPCR de *E. faecalis*, podemos decir que tiene un límite de detección entre  $10^1$  copias genómicas/mL y  $10^8$  copias genómicas/mL para ambos estándares, el elaborado a partir de ADN celular y el elaborado a partir de un segmento ADN gBlocks. Su pendiente se ajusta a los valores recomendados teniendo una pendiente de  $-3,35 \pm 0,14$ ; intercepto con el eje y:  $45,48 \pm 2,03$ ; un  $R^2: 0,99 \pm 0,004$  y un % eficiencia del  $99,61 \pm 5,63$  %.

En la figura 3.2. podemos observar la curva estándar para la qPCR de *E. faecalis*.



**Figura 3.3:** Curva estándar a base de ADN celular para la qPCR de *E. faecalis*. Pendiente:  $-3,35 \pm 0,14$ ; Int. Eje y:  $45,48 \pm 2,03$ ;  $R^2: 0,99 \pm 0,004$ ; % efic. del  $99,61 \pm 5,63$  %.



**Figura 3.4:** Curva estándar a base de segmento de gBlocks para la qPCR de *E. faecalis*. Pendiente:  $-3,43 \pm 0,039$ ; Int. Eje y:  $41,59 \pm 0,27$ ;  $R^2: 0,99 \pm 0,0009$ ; % efic. del  $95,77 \pm 1,55$  %.

- **Programas de temperaturas y ciclos de amplificación para las qPCRs de *E. coli* y *E. faecalis***

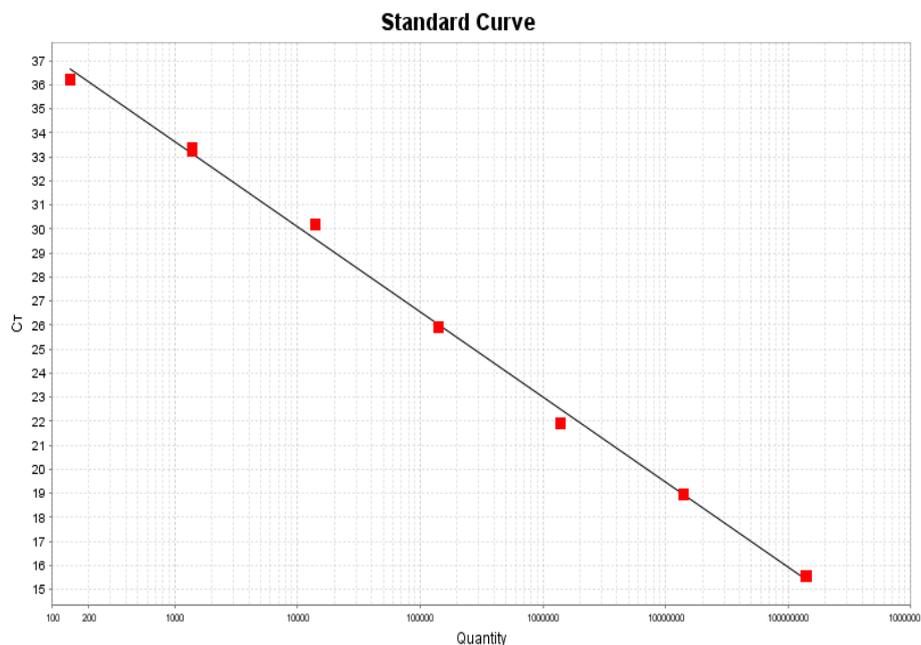
Al programa de temperaturas de amplificación para las qPCRs de *E. coli* sugerido por Khan et al. se le realizaron algunas adaptaciones. El programa sugerido en el artículo fue el siguiente: 94 °C por 2 minutos seguidos de 40 ciclos de amplificación los cuales envuelven 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C y 30 segundos a 72 °C (Khan et al. 2007b). En el caso de la qPCR de *E. faecalis* sugerida por Shannon et al. propone el siguiente programa de temperaturas de amplificación: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos seguidos por 45 ciclos a 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 60 segundos (Shannon et al. 2007). Las modificaciones realizadas al programa de temperaturas de amplificación se muestran en la tabla 2.6., estos cambios fueron hechos por el grupo de investigación dirigido por el Dr. Michael Seidel de la Universidad Técnica de Múnich.

- **qPCR de *Legionella* spp.**

La qPCR implementada para la cuantificación de *Legionella* spp. es una adaptación del protocolo de (Herpers et al. 2003), citados por (Declerck et al. 2007), (Cervero Aragón 2013) y (Fernandez-Cassi et al. 2016), al cual le hicimos

modificaciones en el fluorocromo reportero y el colorante extintor (quencher) ya que los fabricantes nos comunicaron que la combinación VIC – MGB para las sondas ya no la estaban utilizando. Inicialmente la sonda utilizaba el colorante reportero VIC y el extintor MGB, actualmente, se utilizan FAM y TAMRA en su lugar. Una vez se hacen estos cambios se tuvo que ajustar la temperatura de “annealing” de 56 °C a 53 °C, para que fuera adecuada a las temperaturas de “melting” (Tm) de los cebadores y la sonda actuales.

Al evaluar la curva estándar para la qPCR de *Legionella* spp., podemos decir que tiene un límite de detección entre  $10^1$  -  $10^8$  moléculas de ADN / 5  $\mu$ L reacción. Su pendiente se ajusta a los valores recomendados teniendo una pendiente de  $-3,26 \pm 0,18$ ; intercepto con el eje y:  $41,47 \pm 1,41$ ; un  $R^2:0,98 \pm 0,007$  y un % eficiencia del  $103,11 \pm 7,33$  %.

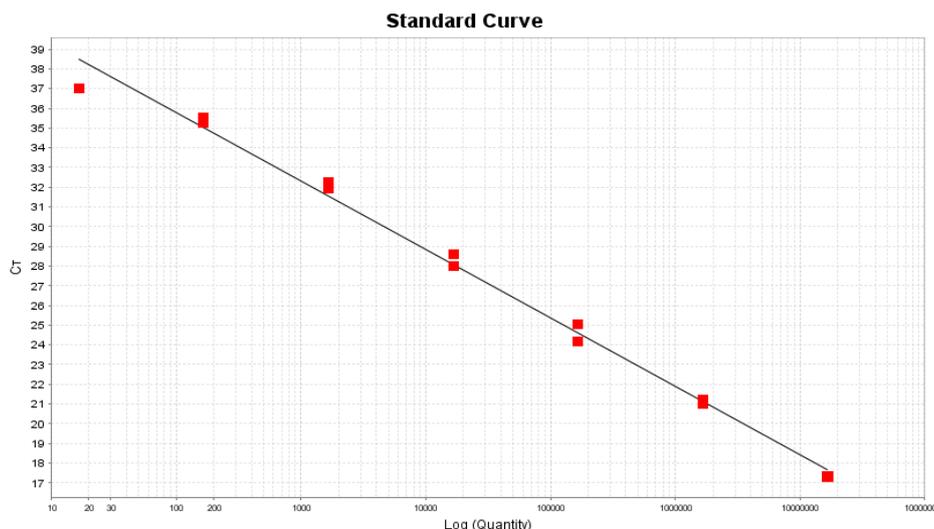


**Figura 3.5:** Curva estándar a base de ADN celular para la qPCR de *Legionella* spp. Pendiente:  $-3,26 \pm 0,18$ ; Int. Eje y:  $41,47 \pm 1,41$ ;  $R^2:0,98 \pm 0,007$ ; % efic. del  $103,11 \pm 7,33$  %.

- **qPCR de *Legionella pneumophila***

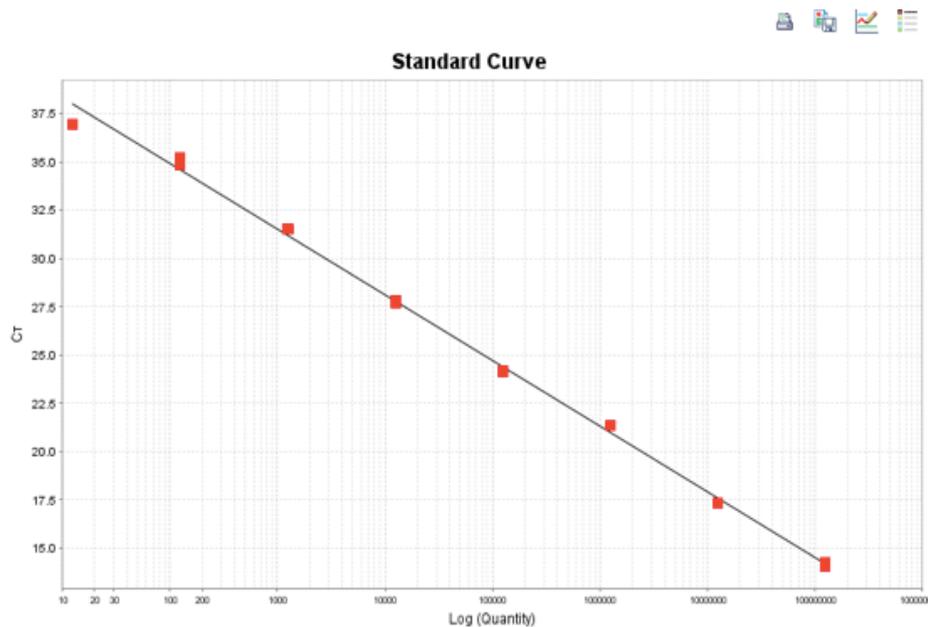
Esta qPCR está basada en el protocolo sugerido por Diederer et al. (2007), con modificaciones de Serrano, A. (2009). Partiendo de estas modificaciones anteriores, a esta qPCR se le realizaron nuevas modificaciones debido a que los valores obtenidos con anterioridad (en cuanto a pendiente, intercepto con el eje Y, coeficiente de determinación y % de eficiencia de esta qPCR) no se mantenían dentro de los rangos considerados como aceptables, variando mucho de una qPCR a otra, incluso el no obtener amplificaciones en la qPCR.

Para lograr una optimización de esta qPCR, se hizo una PCR en gradiente de temperatura para asegurarnos evitar la formación de dímeros por los cebadores. Al realizar la electroforesis en gel de los amplificados pudimos percatarnos de que la temperatura de “annealing” antes utilizada favorecía la formación de dímeros entre los cebadores. Una vez realizamos esta PCR pudimos seleccionar una nueva temperatura de “annealing” para esta qPCR. Se modificó el programa de temperaturas de esta qPCR (10 minutos a 95 °C; 45 ciclos: 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 57 °C y 30 segundos a 60 °C) por el siguiente programa de temperaturas: 2 minutos a 50 °C; 10 minutos a 95 °C; 45 ciclos con 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 59 °C.



**Figura 3.6:** Curva estándar a partir de ADN celular para la qPCR de *Legionella pneumophila*. Pendiente:  $-3,35 \pm 0,14$ ; Int. Eje y:  $45,48 \pm 2,03$ ;  $R^2: 0,99 \pm 0,004$ ; % efic. del  $99,61 \pm 5,63$  %.

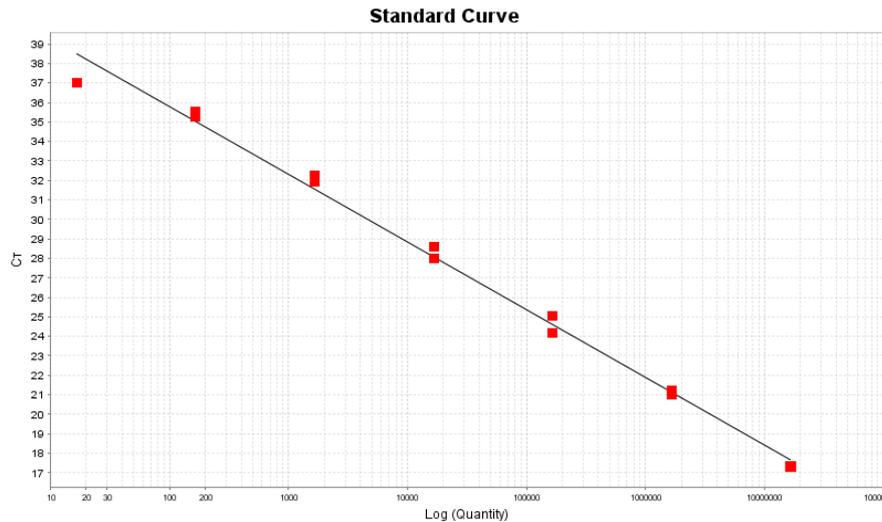
Al evaluar la curva estándar para la qPCR de *Legionella pneumophila*, podemos decir que tiene un límite de detección entre  $10^1$  y  $10^8$  moléculas de ADN/mL para el estándar elaborado a partir de ADN celular o  $10^2$ - $10^8$  copias genómicas (CG)/  $5 \mu\text{L}$  reacción, para el elaborado a partir de un segmento de ADN gBlock. Su pendiente se ajusta a los valores recomendados teniendo una pendiente de  $-3,38 \pm 0,10$ ; intercepto con el eje y:  $48,92 \pm 7,51$ ; un  $R^2:0,99 \pm 0,003$  y un % eficiencia del  $97,51 \pm 4,25$  %.



**Figura 3.7:** Curva estándar a partir de segmentos gBlocks para la qPCR de *Legionella pneumophila*. Pendiente:  $-3,304 \pm 0,1$ ; Int. Eje y:  $41,68 \pm 0,078$ ;  $R^2:0,995 \pm 0,0015$ ; % efic. del  $100,89 \pm 4,20$  %.

- **qPCR de bacterias totales**

Al evaluar la curva estándar para la qPCR de bacterias totales, podemos decir que tiene un límite de detección entre  $10^2$ - $10^8$  copias genómicas (CG)/reacción. Su pendiente se ajusta a los valores recomendados teniendo una pendiente de  $-3,31 \pm 0,10$ ; intercepto con el eje y:  $40,05 \pm 1,55$ ; un  $R^2:0,95 \pm 0,05$  y un % eficiencia del  $100,73 \pm 4,16$  %.



**Figura 3.8:** Curva estándar a partir de segmentos gBlocks para la qPCR de bacterias totales. Pendiente:  $-3,31 \pm 0,10$ ; Int. Eje y:  $40,05 \pm 1,55$ ;  $R^2: 0,95 \pm 0,05$ ; % efic. del  $100,73 \pm 4,16$  %.

Esta qPCR está basada en el artículo de G. Harms et al. (2003) con algunas modificaciones. Las mismas fueron realizadas por Abzazou et al. (2018). Se ajustó la curva estándar de 372 a  $3,72 \times 10^8$  copias genómicas por reacción, utilizando como ADN diana para la curva patrón un segmento de cadena doble de ADN (Double-stranded gBlocks gene fragments). A partir de esta fragmento se hizo una dilución decima a partir de una concentración conocida del fragmento para obtener diluciones desde  $10^0$  hasta  $10^8$  copias genómicas por reacción (Harms et al. 2003) y (Abzazou et al. 2018).

### **3.2. Comparativa entre la cuantificación por cultivo en placa de TSA, la citometría de flujo, y por qPCR, utilizando dos cepas bacterianas**

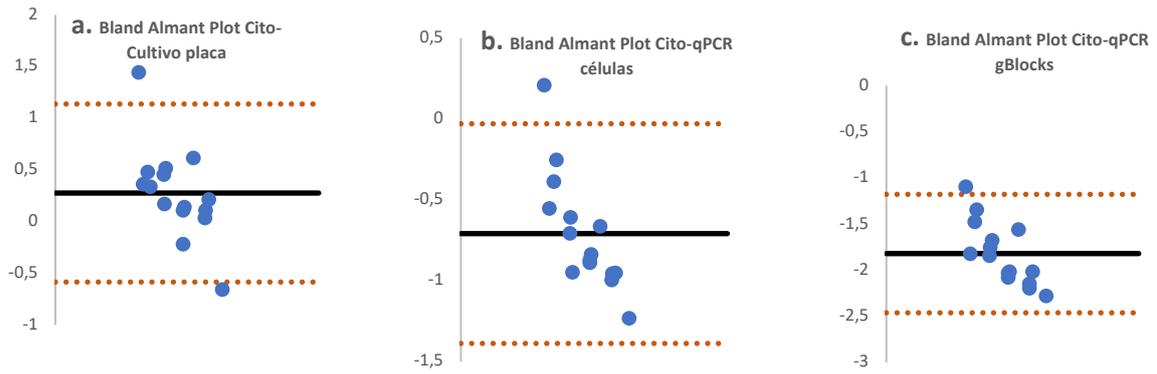
En este ensayo comparativo de cuantificación entre el cultivo en placa, la citometría de flujo y la cuantificación por qPCR, se partió de cultivos puros de *E. coli* y *E. faecalis* a una concentración inicial conocida ( $10^8$  ufc/mL). A partir de este cultivo madre se realizaron diluciones decimales para llegar a obtener concentraciones celulares entre  $10^7$  y  $10^2$  ufc/mL con Ringer  $\frac{1}{4}$ . Estas concentraciones se midieron por cultivo en placa, por citometría de flujo y por qPCR. Para ello se tomaron tres alícuotas para cada tipo de medición. De la cuantificación por los diferentes métodos se obtuvieron los resultados que aparecen en las Tablas 3.2. y 3.3.

De acuerdo a la Tabla 3.2. podemos decir que la correspondencia entre citometría de flujo y cuantificación por conteo en placa se mantienen dentro del mismo logaritmo de medición para valores superiores al  $10^3$  ufc/mL, sin embargo para las cuantificaciones inferiores a este logaritmo (debido al límite de detección del citómetro), el citómetro de flujo utilizado cuantifica números un logaritmo mayor a los cuantificados en placa (caso específico de la medición realizada para una dilución de  $10^2$  células de *E. coli*). También podemos decir que para *E. coli* la cuantificación por medio de PCR en tiempo real es dos logaritmos superior a las registradas por citometría y conteo en placa.

**Tabla 3.2:** Cuantificación por citometría de flujo, cultivo en placa y qPCR de muestras de *E.coli* a diferentes concentraciones.

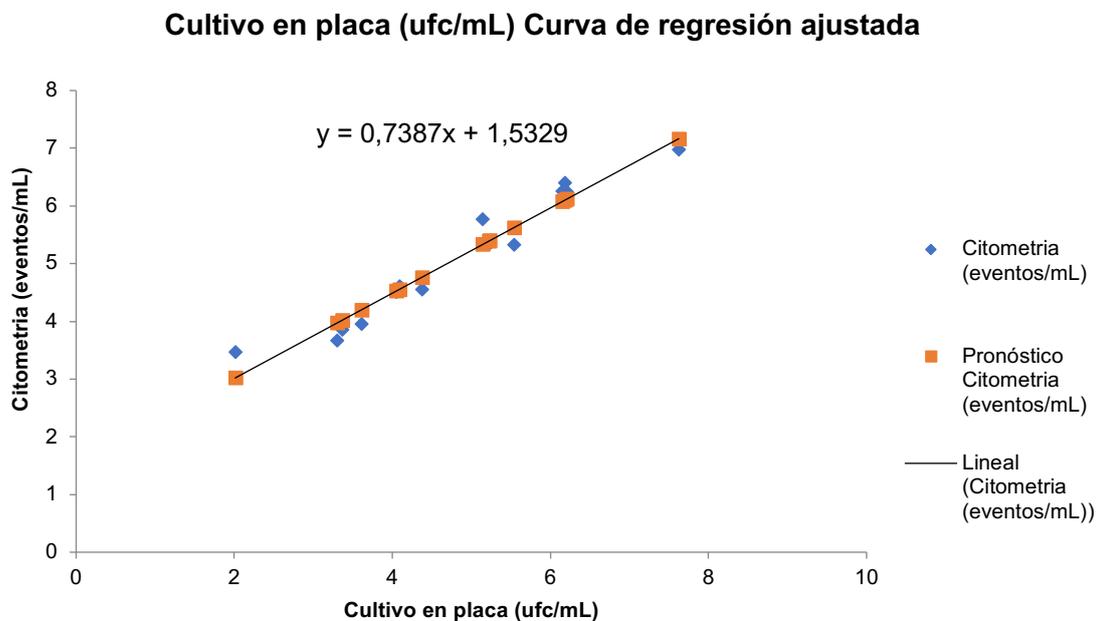
Citometría (eventos/mL)	Cultivo en placa (ufc/mL)	qPCR células (genomas/mL)	qPCR gBlocks (cg/mL)
$9,25 \times 10^6$	$4,20 \times 10^7$	$1,59 \times 10^8$	$1,76 \times 10^9$
$2,50 \times 10^6$	$1,52 \times 10^6$	$2,23 \times 10^7$	$2,57 \times 10^8$
$1,75 \times 10^6$	$1,60 \times 10^6$	$1,73 \times 10^7$	$2,74 \times 10^8$
$1,81 \times 10^6$	$1,41 \times 10^6$	$1,63 \times 10^7$	$2,53 \times 10^8$
$2,12 \times 10^5$	$3,48 \times 10^5$	$1,59 \times 10^6$	$2,26 \times 10^7$
$5,79 \times 10^5$	$1,39 \times 10^5$	$2,66 \times 10^6$	$2,09 \times 10^7$
$2,14 \times 10^5$	$1,65 \times 10^5$	$1,66 \times 10^6$	$2,56 \times 10^7$
$2,38 \times 10^5$	$1,71 \times 10^5$	$1,63 \times 10^6$	$2,47 \times 10^7$
$4,05 \times 10^4$	$1,22 \times 10^4$	$3,60 \times 10^5$	$1,93 \times 10^6$
$3,51 \times 10^4$	$2,35 \times 10^4$	$1,43 \times 10^5$	$1,99 \times 10^6$
$3,22 \times 10^4$	$1,12 \times 10^4$	$1,64 \times 10^5$	$2,23 \times 10^6$
$4,66 \times 10^3$	$2,01 \times 10^3$	$1,67 \times 10^4$	$3,07 \times 10^5$
$8,90 \times 10^3$	$4,05 \times 10^3$	$1,59 \times 10^4$	$1,96 \times 10^5$
$7,05 \times 10^3$	$2,32 \times 10^3$	$1,71 \times 10^4$	$2,11 \times 10^5$
$2,89 \times 10^3$	$1,03 \times 10^2$	$1,79 \times 10^3$	$3,60 \times 10^4$

\*\* Cuantificación de ADN en Nanodrop:  $3,85 \text{ ng}/\mu\text{L}$  (  $200 \mu\text{L}$  ) ; Moléculas de ADN/mL:  $\cong 2,60 \times 10^8$ .



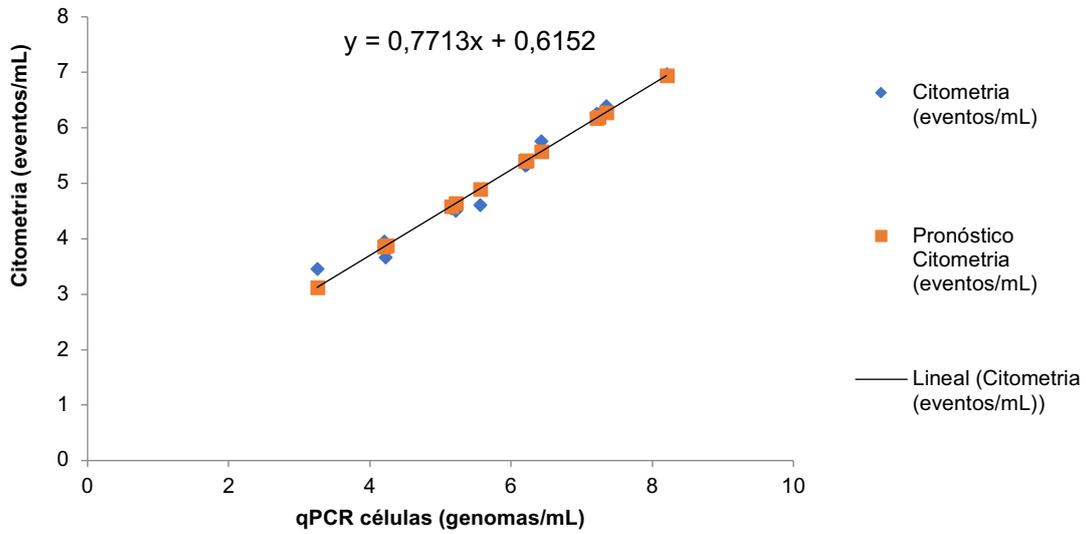
**Figura 3.9:** Gráficos comparativos de Bland Almant para *E. coli*. Comparación entre: a. cuantificación por citometría con cultivo en placa; b. cuantificación por citometría con qPCR de células, y c. cuantificación por citometría con qPCR de gBlocks.

Al observar los gráficos de Bland Almant (Figura 3.6.) realizados para comparar la citometría con los otros métodos de cuantificación, podemos observar que hay algunas mediciones atípicas en las hechas al comparar citometría con cultivo en placa, qPCR de células y qPCR de gBlocks, estos valores corresponden a las mediciones de la dilución  $10^2$  ufc/mL y el valor cercano al  $10^7$  ufc/mL del cultivo, que como habíamos mencionado anteriormente se salía de los límites de cuantificación del citómetro que utilizamos (entre  $10^2 - 10^6$ ).



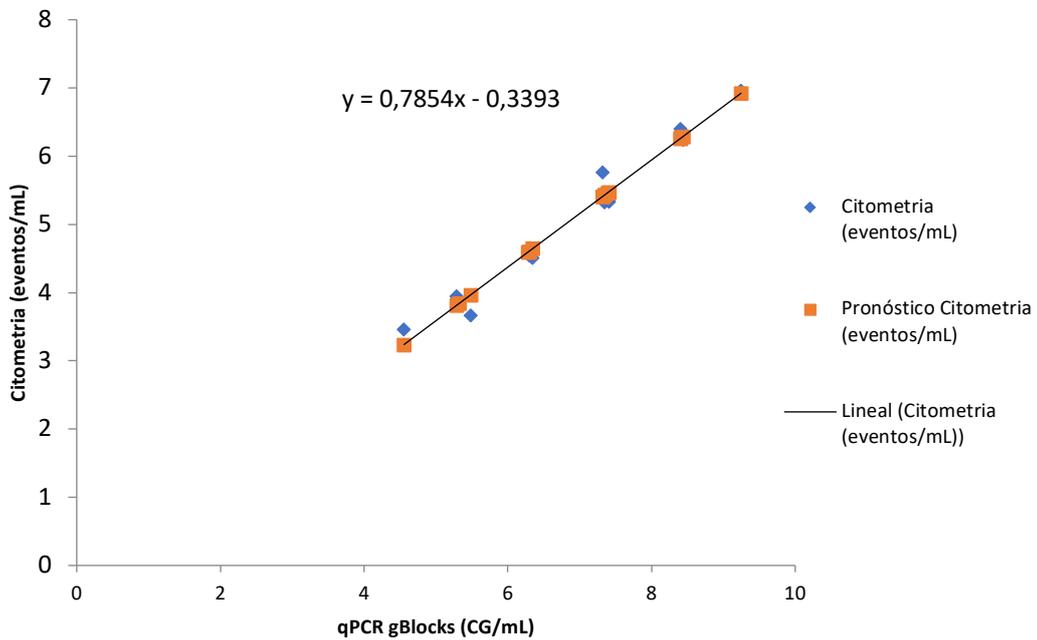
**Figura 3.10:** Curva de regresión ajustada para la cuantificación de *E. coli* por citometría y cultivo en placa.

### qPCR células (genomas/mL) Curva de regresión ajustada



**Figura 3.11:** Curva de regresión ajustada para la cuantificación de *E. coli* por citometría y qPCR de células.

### qPCR gBlocks (CG/mL) Curva de regresión ajustada



**Figura 3.12:** Curva de regresión ajustada para la cuantificación de *E. coli* por citometría y qPCR de células.

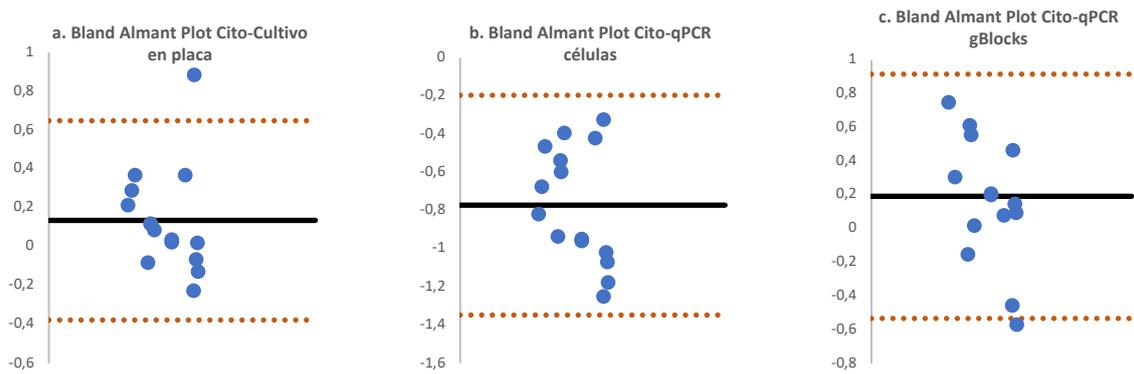
En la Tabla 3.3. se encuentran registradas las cuantificaciones para *E. faecalis* por las diferentes técnicas de cuantificación, la citometría, el cultivo en placa, la qPCR por estándar de células y la qPCR por estándar de gBlocks. En estos valores podemos observar que la cuantificación por citometría y cultivo en placa se mantiene dentro del mismo logaritmo, y la cuantificación por qPCR de células es un logaritmo superior. En cuanto a la qPCR de gBlocks, las cuantificaciones estuvieron en el mismo logaritmo que las hechas por citometría y cultivo en placa.

En la Figura 3.10.. observamos las gráficas de Bland Almant para las comparaciones entre la cuantificación por citometría con las cuantificaciones realizadas por cultivo en placa, por qPCR con estándar de células y la qPCR por estándar de gBlocks, de *E. faecalis* respectivamente. En estos gráficos podemos observar que en la grafica a. y en la c. hay un valor de cuantificación atípico, ya que se encuentra fuera del rango de confianza del 95 %.

**Tabla 3.3:** Cuantificación por citometría de flujo, cultivo en placa y qPCR de muestras de *E. faecalis* a diferentes concentraciones.

Citometría (eventos/mL)	Cultivo en placa (ufc/mL)	qPCR células (genomas/mL)	qPCR gBlocks (cg/mL)
9,17 x 10 <sup>5</sup>	1,54 x 10 <sup>6</sup>	1,63 x 10 <sup>7</sup>	2,61 x 10 <sup>6</sup>
1,42 x 10 <sup>6</sup>	1,90 x 10 <sup>6</sup>	2,12 x 10 <sup>7</sup>	5,26 x 10 <sup>6</sup>
1,35 x 10 <sup>6</sup>	1,29 x 10 <sup>6</sup>	1,58 x 10 <sup>7</sup>	1,08 x 10 <sup>6</sup>
1,19 x 10 <sup>6</sup>	1,38 x 10 <sup>6</sup>	1,24 x 10 <sup>7</sup>	8,45 x 10 <sup>5</sup>
9,54 x 10 <sup>5</sup>	1,24 x 10 <sup>5</sup>	2,00 x 10 <sup>6</sup>	3,25 x 10 <sup>5</sup>
4,10 x 10 <sup>5</sup>	1,75 x 10 <sup>5</sup>	1,08 x 10 <sup>6</sup>	3,41 x 10 <sup>5</sup>
1,15 x 10 <sup>5</sup>	1,05 x 10 <sup>5</sup>	1,02 x 10 <sup>6</sup>	7,06 x 10 <sup>4</sup>
1,16 x 10 <sup>5</sup>	1,10 x 10 <sup>5</sup>	1,05 x 10 <sup>6</sup>	7,27 x 10 <sup>4</sup>
1,21 x 10 <sup>4</sup>	1,46 x 10 <sup>4</sup>	1,04 x 10 <sup>5</sup>	1,72 x 10 <sup>4</sup>
2,24 x 10 <sup>4</sup>	1,83 x 10 <sup>4</sup>	5,52 x 10 <sup>4</sup>	2,14 x 10 <sup>4</sup>
1,63 x 10 <sup>4</sup>	1,25 x 10 <sup>4</sup>	6,43 x 10 <sup>4</sup>	4,52 x 10 <sup>3</sup>
1,49 x 10 <sup>4</sup>	1,13 x 10 <sup>4</sup>	5,12 x 10 <sup>4</sup>	3,60 x 10 <sup>3</sup>
3,41 x 10 <sup>3</sup>	1,46 x 10 <sup>3</sup>	9,92 x 10 <sup>3</sup>	1,67 x 10 <sup>3</sup>
1,81 x 10 <sup>3</sup>	1,10 x 10 <sup>3</sup>	1,19 x 10 <sup>4</sup>	3,19 x 10 <sup>2</sup>
2,58 x 10 <sup>3</sup>	1,32 x 10 <sup>3</sup>	1,22 x 10 <sup>4</sup>	6,40 x 10 <sup>2</sup>

\*\* Cuantificación de ADN en Nanodrop: 3,33 ng/μL; Moléculas de ADN/mL: 2,22x10<sup>8</sup>.



**Figura 3.13:** Gráficos comparativos de Bland Almant *para E. faecalis*. Comparación entre: a. cuantificación por citometría con cultivo en placa; b. cuantificación por citometría con qPCR de células, y c. cuantificación por citometría con qPCR de gBlocks.

De acuerdo a las tablas 3.2. y 3.3. podemos decir que la correspondencia entre citometría de flujo y cuantificación por conteo en placa se mantienen dentro del mismo logaritmo de medición para valores superiores al  $10^3$  ufc/mL, sin embargo para las cuantificaciones inferiores a este logaritmo (debido al límite de detección del citómetro), el citómetro de flujo utilizado cuantifica números un logaritmo mayor a los cuantificados en placa (caso específico de la medición realizada para una dilución de  $10^2$  células de *E. coli*). Esto se observa tanto en las medidas de *E. coli* como de *E. faecalis*. También podemos decir que para *E. coli* la cuantificación por medio de PCR en tiempo real es dos logaritmos superior a las registradas por citometría y conteo en placa. En el caso de *E. faecalis*, la cuantificación por qPCR es de un logaritmo más que las de citometría y conteo en placa.





#### **4. Métodos de concentración para bacterias**

A la hora de procesar diferentes tipos de aguas, a menudo, nos encontramos que algunas son aguas que contienen una baja concentración de microorganismos lo que hace muy difícil su cuantificación. Este problema que se ve agravado cuando el método de análisis posterior es un método molecular ya que en este tipo de método el volumen analizado es muy pequeño. Frecuentemente virus y bacterias se han concentrados aplicando métodos distintos, lo que hace muy difícil su comparación. En este trabajo analizaremos la capacidad de concentración de dos métodos diseñados para concentrar todo tipo de microorganismos que después serán analizados con técnicas moleculares.

##### **4.1. Métodos de concentración de diferentes microorganismos por floculación orgánica con leche desnatada (SMF)**

La floculación orgánica con leche desnatada es un método de concentración originalmente usado para concentrar virus. En nuestros ensayos, se aplicó no sólo para la concentración de virus (aunque estos datos no se presentan en esta tesis por pertenecer a otro grupo de trabajo), sino que además se utilizó para la concentración de bacterias y protozoos.

El proceso de floculación se realizó con muestras de 10 L de agua, excepto cuando trabajamos con muestras altamente concentradas de microorganismos, en cuyo caso, se partió de 500 mL de agua.

Con el fin de conocer la eficacia de la concentración de bacterias mediante la técnica de floculación orgánica con leche desnatada estudiamos primero el porcentaje recuperación de células viables cultivables mediante técnicas de cultivo y después la recuperación de copias genómicas mediante qPCR. En esta segunda fase, como paso previo, comparamos dos kits de extracción de ADN, el QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen y el Power Soil DNA Kit de Mo Bio.

Para ello, se concentraron 3 muestras de agua potable dopadas con 2 cepas bacterianas, una Gram positivas y otra Gram negativas de referencia, mediante SMF. El valor promedio inoculado en cada muestra (un total de 3 muestras) de

*Bacillus cereus* ATCC 27398 y de *Escherichia coli* ATCC 23725 lo podemos observar en la Tabla 4.1. Se cuantificó mediante el cultivo en placa por duplicado la cantidad de ufc/mL de cada cepa inoculada a las 3 muestras.

#### 4.1.1. Estudio de la recuperación de células viables-cultivables concentradas mediante por floculación orgánica (SMF)

Se realizó el estudio de la recuperación de las células viables cultivables inoculados después del proceso de concentración utilizando el recuento en placa de TSA.

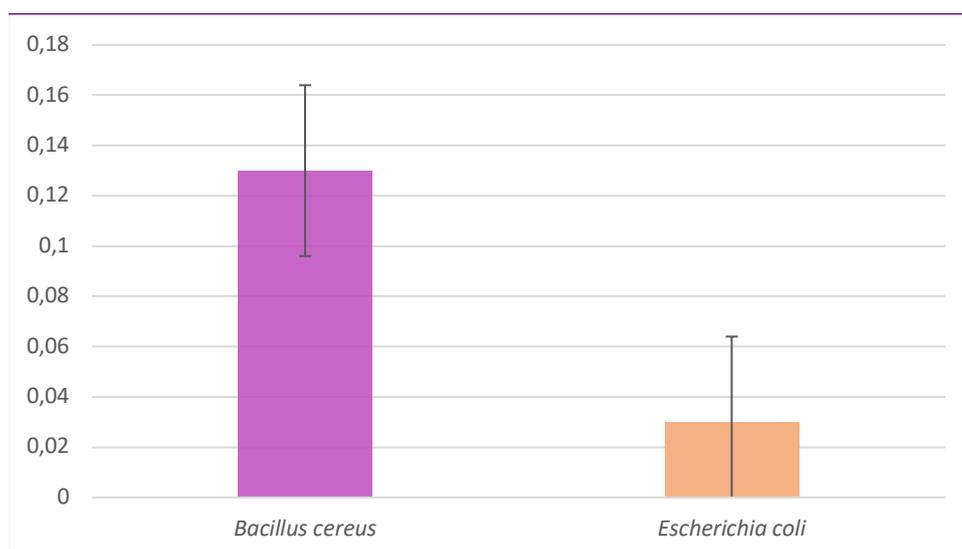
Para esto se realizó la cuantificación de las células viables cultivables inoculadas a las muestras y las recuperadas después del proceso de floculación orgánica con leche desnatada mediante el cultivo en TSA, de las 3 muestras dopadas, se tomaron 3 réplicas de cada muestra dopada, haciendo un duplicado de cada dilución sembrada. Esta medida de las células viables cultivables se realizó en otros ensayos de floculación y los valores promedios obtenidos se encuentran registrados en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1:** Cuantificación de células viables cultivables después de la concentración por floculación con leche desnatada cuantificada por cultivo.

Cepa bacteriana	Ufc inoculados en 10 L	Ufc recuperados en 10 L	% de recuperación
<i>Bacillus cereus</i>	$2,89 \times 10^7$	$3,29 \times 10^4$	0,11
	$1,7 \times 10^7$	$3,42 \times 10^4$	0,20
	$5,8 \times 10^7$	$6,4 \times 10^4$	0,11
Media Geométrica	<b><math>3,05 \times 10^7</math></b>	<b><math>4,16 \times 10^4</math></b>	<b>0,13</b>
Des. Est.	<b><math>1,72 \times 10^7</math></b>	<b><math>1,44 \times 10^4</math></b>	<b>0,04</b>
<i>Escherichia coli</i>	$2,45 \times 10^8$	$2,52 \times 10^4$	0,01
	$3,7 \times 10^7$	$3,57 \times 10^4$	0,09
	$6,30 \times 10^7$	$2,37 \times 10^4$	0,03
Media Geométrica	<b><math>8,30 \times 10^7</math></b>	<b><math>2,77 \times 10^4</math></b>	<b>0,03</b>
Des. Est.	<b><math>9,25 \times 10^7</math></b>	<b><math>5,34 \times 10^3</math></b>	<b>0,03</b>

En el caso de *B. cereus*, el valor de ufc inoculados en 10 L fue de  $3,05 \times 10^7$  y el recuperado de  $4,16 \times 10^4$  ufc en 10 L, obteniendo una recuperación de células

viables cultivables fue de 0,13 %. Para *E. coli* fueron  $8,30 \times 10^7$  ufc inoculados en 10 L y  $2,77 \times 10^4$  ufc recuperados en 10 L, para obtener un promedio de 0,03 % células viables cultivables recuperadas.



**Figura 4.1:** Porcentaje de recuperación de las células viables cultivables posterior al proceso de concentración por floculación orgánica con leche desnatada.

En la figura 4.1. podemos observar que para la *Escherichia coli* los porcentajes de recuperación de las células viables cultivables son mucho menores a los porcentajes de recuperación observados para *Bacillus cereus*.

#### **4.1.2. Estudio de la recuperación del ADN bacteriano posterior al proceso de floculación orgánica**

##### **4.1.2.1. Comparación según el método de extracción**

El estudio de recuperación también se realizó comparando los genomas inoculados y los recuperados posterior al proceso de floculación orgánica.

La cuantificación de los genomas que se inocularon en cada réplica del ensayo se realizó mediante PCR en tiempo real para bacterias totales, realizando una cuantificación de los genomas de cada inóculo y de los genomas recuperados en cada replica una vez aplicado el protocolo de concentración de microorganismos por floculación orgánica con leche desnatada. El porcentaje de genomas recuperados para cada muestra se obtuvo dividiendo la cantidad de genomas cuantificados con la qPCR para bacterias totales una vez concentrada,

entre la suma de la cuantificación de los genomas de los inóculos agregados a la misma.

La cuantificación de los inóculos se realizó comparando las copias genómicas mediante dos kits de extracción. En la tabla 4.2. se muestran la cuantificación por qPCR de bacterias totales de los inóculos para las cepas de *E. coli* y *B. cereus* que fueron agregados al inicio del protocolo de concentración realizando la extracción de ADN con dos kits, el de Qiagen y el kit de Mo Bio. Los resultados nos muestran que para la cepa de *E. coli* la extracción del inóculo con el kit de Mo Bio es más eficiente que la extracción con el kit de Qiagen, logrando  $5,46E+10$  genomas/mL para *E. coli* con Mo Bio en comparación con  $4,15E+09$  genomas/mL con Qiagen. Estos resultados nos muestran una diferencia superior de un logaritmo en el número de genomas/mL obtenido con Mo Bio respecto a Qiagen. Sin embargo, para la cepa de *B. cereus* el resultado obtenido fue diferente, para la extracción realizada con el kit de Qiagen el número de genomas/mL fue de  $7,48E+09$ , medio logaritmo mayor que la realizada con el kit de Mo Bio, que fue de  $1,87E+09$  genomas/mL.

**Tabla 4.2:** Cuantificación de los genomas de *E.coli* y *B. cereus* extraídos por el kit de Qiagen y el de MoBio mediante qPCR de bacterias totales.

Nombre	Kit Qiagen		Kit MoBio	
	Prom. (CG/10 $\mu$ L)	CG Inóculo en 1 mL	Prom. (CG/10 $\mu$ L)	CG Inóculo en 1 mL
<i>E. coli</i>	$7,27 \times 10^7$	$4,15 \times 10^9$	$1,64 \times 10^9$	$5,46 \times 10^{10}$
<i>B. cereus</i>	$1,31 \times 10^8$	$7,48 \times 10^9$	$5,62 \times 10^7$	$1,87 \times 10^9$
<i>Neg. Ext.</i>	$1,82 \times 10^3$		$8,21 \times 10^3$	

**Neg. Ext.:** negativo de extracción; **CG:** copias genómicas; **Prom.:** promedio. El cálculo para las cg/mL de los inóculos se obtuvo multiplicando el valor promedio por  $(80/10) \cdot (1000/140)$  en el caso de Qiagen, y para MoBio se multiplicó el valor promedio por  $(100/10) \cdot (1000/300)$ .

#### 4.1.2.1. Recuperación de los genomas

En cuanto a la cuantificación de los genomas recuperados después de la concentración por SMF hay una recuperación mayor de genomas con el kit de extracción de Qiagen que el obtenido mediante la extracción con el kit de Mo

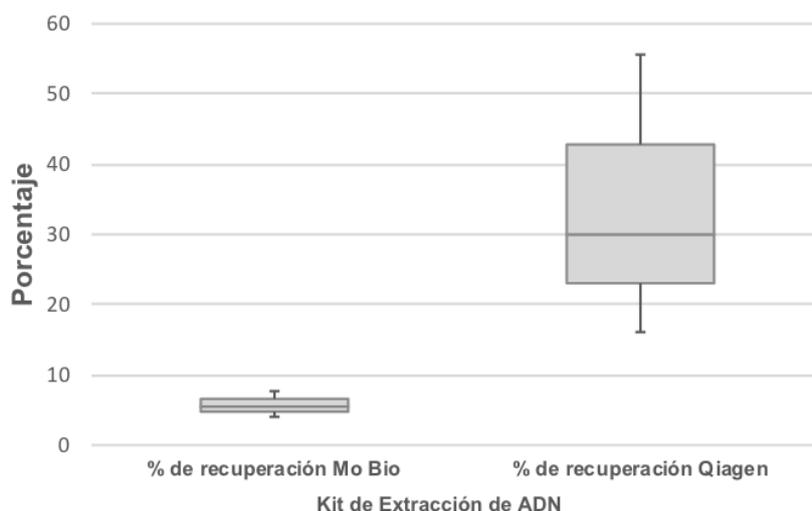
Bio. Los porcentajes de recuperación de genomas los podemos observar en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3:** Cuantificación de los porcentajes de recuperación posterior al proceso de floculación orgánica con leche desnatada utilizando para la extracción de ADN el kit de Qiagen y el de MoBio.

<i>Muestra</i>	Kit Qiagen		Kit MoBio	
	Prom. CG/10 $\mu$ L	% de Rec.	Prom. CG/10 $\mu$ L	% de Rec.
<b>1</b>	$3,07 \times 10^7$	55,70	$1,29 \times 10^7$	7,61
<b>2</b>	$2,54 \times 10^7$	29,98	$6,83 \times 10^6$	4,03
<b>3</b>	$2,26 \times 10^7$	16,10	$9,00 \times 10^6$	5,31
<b>Neg. Floc.</b>	$1,32 \times 10^4$		$8,20 \times 10^3$	

**Neg. Floc.:** negativo de floculación; **CG:** copias genómicas; **% de Rec.:** porcentaje de recuperación, **Prom:** valor promedio. El cálculo para las cg/ 10 mL de las muestras se obtuvo multiplicando el valor promedio por  $(80/10) \cdot (10000/140)$  en el caso de Qiagen, y para MoBio se multiplicó el valor promedio por  $(100/10) \cdot (10000/300)$ .

Las diferencias entre los porcentajes de genomas recuperados por ambos kits de extracción de ADN las podemos observar en la Figura 4.2. En esta figura se aprecia claramente la mejor eficiencia del kit de Qiagen para la extracción de ADN de muestras de aguas limpia.



**Figura 4.2:** Porcentaje de recuperación de los genomas posterior a la concentración por floculación orgánica con leche desnatada.

La diferencia entre los porcentajes de recuperación es superior al 28 % en el caso de la extracción realizada con el kit de Qiagen con respecto al porcentaje de recuperación del kit MoBio.

#### **4.2. Concentración de diferentes microorganismos por SMF para comparar la cuantificación genómica de *E. coli* mediante qPCR**

En este ensayo se realizó la concentración de microorganismos mediante la técnica de SMF para comparar la cuantificación del porcentaje de recuperación de los genomas de los microorganismos estudiados posterior a este proceso de concentración, utilizando para su cuantificación las qPCR de *E. coli* después de la extracción de ADN realizada con el kit de Qiagen, que fue más eficaz para la extracción del ADN después del proceso de floculación.

Para ello se concentraron 11 muestras de agua de grifo, de las cuales 10 de ellas estaban dopadas con diferentes microorganismos, entre ellos *E. coli*, *B. cereus*, ciertos virus y un protozoo. Una vez realizada la concentración por SMF, se realizó la extracción del ADN de las muestras para su posterior cuantificación mediante qPCR.

##### **4.2.1. Cuantificación del ADN mediante qPCR para *E. coli***

La cuantificación de los genomas que se inocularon en cada muestra del ensayo se realizó mediante PCR en tiempo real para *Escherichia coli*, realizando la cuantificación de los genomas de los inóculos con que se doparon las muestras y los genomas recuperados de los concentrados de cada replica una vez realizada la floculación orgánica con leche desnatada.

El porcentaje de recuperación genómica para cada muestra se obtuvo dividiendo la cantidad de genomas cuantificados mediante qPCR para *E. coli* de cada réplica de muestra concentrada entre la suma de la cantidad de genomas cuantificados para el inóculo de *E. coli* con que se doparon las mismas, tomando en consideración tanto el negativo de extracción como el negativo de floculación.

El valor para el inóculo de *E. coli* cuantificado por qPCR fue de  $2,37 \times 10^6$  ufc/mL. En la Tabla 4.4. se aprecian los valores de los genomas recuperados para cada muestra concentrada de 10 L, además del negativo de floculación (muestra 11).

La cuantificación que se obtuvo de la muestra 11 se consideró como el negativo de floculación debido a que en esta muestra los genomas que se encontraron eran los procedentes del agua de grifo que se utilizó como base para la floculación ya que en ella no se habían añadido los microorganismos estudiados. Este valor obtenido para la muestra 11 se le resta a los valores obtenidos en las muestras de la 1 a la 10, con el propósito de eliminar de la cuantificación final de cada muestra los genomas procedentes del agua de grifo. Estos valores corregidos, al hacer la resta de los genomas/10  $\mu$ L de cada muestra menos el negativo de floculación (genomas/ 10 $\mu$ L de la muestra 11), nos permitió obtener el número de genomas/ 10 mL de cada muestra.

En cuanto a los genomas recuperados cuantificados mediante qPCR para *E. coli* después de SMF los podemos observar en la Tabla 4.4.

**Tabla 4.4:** Cuantificación de la cantidad de ADN recuperada en las muestras posterior al proceso SMF realizando la cuantificación de genomas por qPCR para *E. coli*.

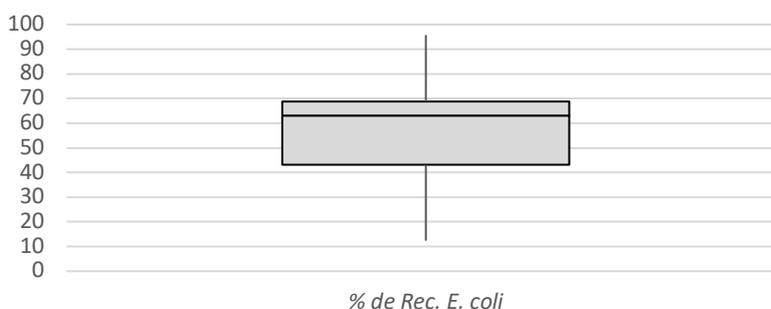
<i>Muestra</i>	Prom. (CG/10 $\mu$ L)	Prom. – Neg. Floc. (CG/ 10 $\mu$ L)	CG en 10000 $\mu$ L	% de Rec.
<b>1</b>	$6,10 \times 10^3$	$5,87 \times 10^3$	$1,96 \times 10^6$	82,65
<b>2</b>	$4,99 \times 10^3$	$4,75 \times 10^3$	$1,58 \times 10^6$	66,90
<b>3</b>	$4,91 \times 10^3$	$4,67 \times 10^3$	$1,56 \times 10^6$	65,78
<b>4</b>	$4,51 \times 10^3$	$4,28 \times 10^3$	$1,43 \times 10^6$	60,23
<b>5</b>	$7,03 \times 10^3$	$6,80 \times 10^3$	$2,27 \times 10^6$	95,73
<b>6</b>	$1,28 \times 10^3$	$1,05 \times 10^3$	$3,50 \times 10^5$	14,79
<b>7</b>	$2,93 \times 10^3$	$2,70 \times 10^3$	$9,01 \times 10^5$	38,03
<b>8</b>	$1,11 \times 10^3$	$8,78 \times 10^2$	$2,93 \times 10^5$	12,36
<b>9</b>	$4,37 \times 10^3$	$4,14 \times 10^3$	$1,38 \times 10^6$	58,27
<b>10</b>	$5,17 \times 10^3$	$4,93 \times 10^3$	$1,64 \times 10^6$	69,45
<b>11*</b>	$2,33 \times 10^2$	0	0	0

CG: copias genómicas, \*11: Neg. Floc.: negativo de floculación, % Rec.: porcentaje de recuperación, \*\*: negativo de extracción se obtuvo haciendo pasar agua molecular a través del

proceso de extracción. (Se multiplica el valor promedio menos el negativo de floculación por 10000/30)

En la Tabla 4.4. podemos observar el cálculo de los genomas/ 10mL para las muestras y el porcentaje de recuperación de dichos genomas basándonos en la cuantificación mediante la PCR en tiempo real para *E. coli*. Los valores de los porcentajes de recuperación varían entre 12,36 % y 95,73 %. Teniendo un promedio de 56,42 % de genomas recuperados mediante la floculación orgánica con leche desnatada cuantificados por qPCR de *E. coli*.

En la Figura 4.3. podemos observar que los porcentajes de recuperación obtenidos mediante la qPCR de *E. coli* son mucho mayores que los obtenidos mediante la qPCR de bacterias totales.



**Figura 4.3:** Comparación de los porcentajes de recuperación obtenidos mediante la qPCR de *E. coli*. **E. coli:** Escherichia coli.

### **4.3. Prueba comparativa entre la floculación orgánica con leche desnatada (SMF) y la filtración con una columna monolítica de adsorción (MAF), cómo métodos para la concentración de microorganismos**

En el siguiente ensayo comparamos la eficiencia de dos métodos de concentración, el SMF y el MAF, al concentrar dos concentraciones diferentes de *E. coli* y *E. faecalis*. Aunque esta prueba se realizó como una prueba comparativa de dos métodos de concentración realizados por varios laboratorios a la vez (Round Robin Test), en este trabajo sólo se mostrarán los resultados correspondientes a este grupo de investigación.

Durante esta prueba se realizó la concentración de 10 muestras de agua para cada método de concentración, haciendo un total de 20 muestras. De estas 10 muestras, 5 de ellas fueron inoculadas con concentraciones de  $10^8$  ufc de cada cepa bacteriana, 5 con concentraciones de  $10^6$  ufc y 2 blancos, sin ningún microorganismo. Además se tenían alícuotas separadas de los inóculos respectivos de cada cepa para su cuantificación. Las alícuotas fueron preparadas en el laboratorio del Dr. Michael Seidel de la Universidad Técnica de Múnich y distribuidas a diferentes laboratorios (entre ellos, el nuestro) sin que ninguno de los otros laboratorios supiese las concentraciones de los diferentes alícuotas que se utilizaron para inocular en cada muestra. Las muestras llegaron rotuladas solamente con un número. Posterior a todo el proceso de análisis de los datos, se nos revelaron las concentraciones de las diferentes muestras numeradas.

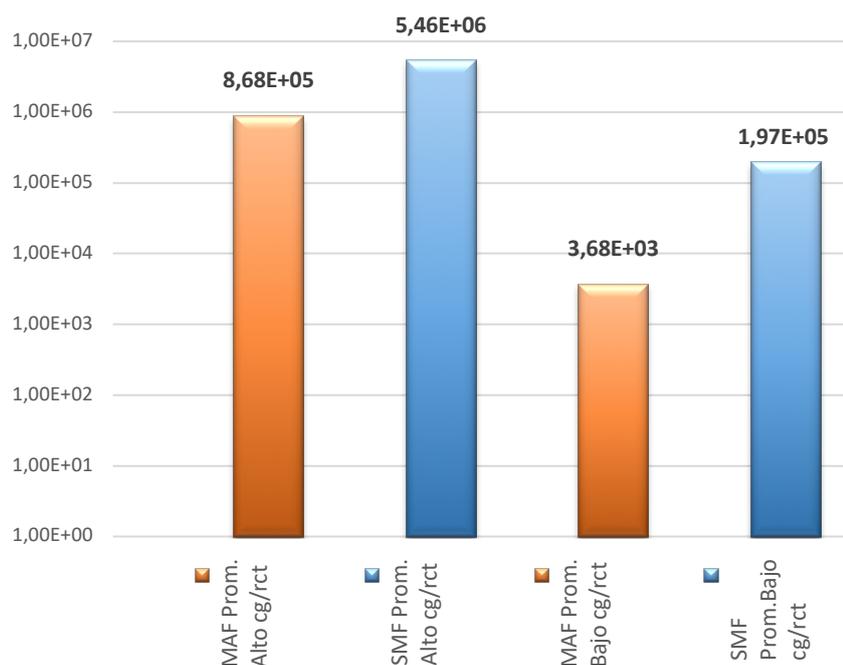
En la siguiente tabla (Tabla 4.5.) podemos encontrar los resultados obtenidos en cuanto a la recuperación de copias genómicas posterior al proceso de concentración, tanto por el método de filtración con una columna monolítica de adsorción (MAF) como por el método de floculación orgánica con leche desnatada (SMF) cuantificados mediante la qPCR de *E. coli*.

**Tabla 4.5:** Genomas recuperados por los métodos de concentración MAF y SMF, cuantificados por PCR en tiempo real específica para *E. coli*.

<i>Escherichia coli</i>			
MAF		SMF	
Muestra	Promedio cg/Rec. en 10 L	Muestra	Promedio cg/Rec. En 10 L
2	$1,09 \times 10^5$	16	$8,42 \times 10^6$
15	$1,14 \times 10^6$	4	$8,87 \times 10^6$
25	$1,61 \times 10^6$	21	$5,53 \times 10^6$
5	$1,23 \times 10^6$	20	$2,67 \times 10^6$
19	$2,47 \times 10^5$	8	$1,82 \times 10^6$
3	$2,17 \times 10^3$	1	$2,25 \times 10^5$
10	$4,97 \times 10^3$	12	$2,25 \times 10^5$
13	$4,19 \times 10^3$	22	$2,76 \times 10^5$
9	$2,36 \times 10^3$	14	$1,30 \times 10^5$
7	$4,73 \times 10^3$	24	$1,27 \times 10^5$
Blanco 1	$1,25 \times 10^3$	Blanco 2	$8,30 \times 10^2$
Inoc. Bajo	$8,07 \times 10^2$	Inoc. Bajo	$1,23 \times 10^3$
Inoc. Alto	$7,60 \times 10^5$	Inoc. Alto	$6,48 \times 10^5$

Rec.: recuperación, Inoc.: inóculo, cg: copias genómicas.

En la Figura 4.4. correspondiente a estos datos, podemos observar que la diferencia en el número de cg/mL recuperados para *E. coli*, entre ambos métodos de concentración, es de solo medio logaritmo para las concentraciones altas. Mientras que para las concentraciones bajas, existe una diferencia entre ambos métodos de concentración superior a los dos logaritmos, siendo en ambos casos mayor la recuperación de *E. coli* obtenida a través de la concentración con SMF.



**Figura 4.4:** Cantidad promedio de ufc/mL de Escherichia coli para las muestras de altas y bajas concentraciones, concentradas por ambos métodos, SMF y MAF.

En la Tabla 4.6. encontraremos las cuantificaciones realizadas con la qPCR de *Enterococcus faecalis* para las 20 muestras concentradas equitativamente por SMF y MAF.

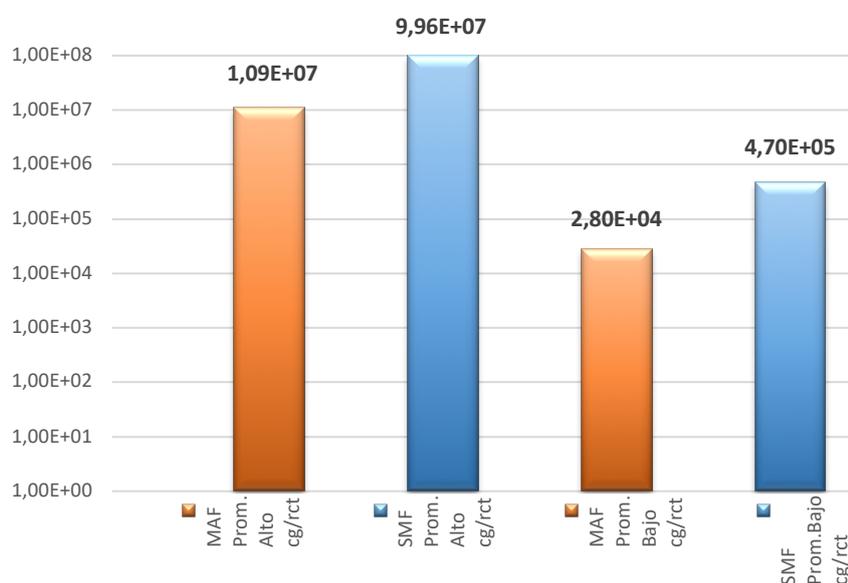
En la Figura 4.5., que ilustra estos datos a través de una gráfica de barras, veremos que la diferencia de copias genómicas recuperadas es de casi un logaritmo para las dos concentraciones, altas y bajas. La recuperación para las concentraciones altas difiere entre los métodos de concentración en menos de un logaritmo. Para las concentraciones bajas, sin embargo, hay una diferencia

de casi 2 logaritmos. En ambos métodos, la recuperación es mayor cuando la concentración fue realizada por SMF.

**Tabla 4.6:** Genomas recuperados por los métodos de concentración MAF y SMF, cuantificados por PCR en tiempo real específica para *E. faecalis*.

<i>Enterococcus faecalis</i>			
MAF		SMF	
Muestra	Promedio cg Rec. en 10 L	Muestra	Promedio cg Rec. en 10 L
2	$2,23 \times 10^6$	16	$1,62 \times 10^8$
15	$2,21 \times 10^7$	4	$2,13 \times 10^8$
25	$2,24 \times 10^7$	21	$5,01 \times 10^7$
5	$6,29 \times 10^6$	20	$4,44 \times 10^7$
19	$1,36 \times 10^6$	8	$2,90 \times 10^7$
3	$5,02 \times 10^3$	1	$2,95 \times 10^5$
10	$4,99 \times 10^4$	12	$9,06 \times 10^5$
13	$5,17 \times 10^4$	22	$1,13 \times 10^6$
9	$9,50 \times 10^3$	14	$1,28 \times 10^4$
7	$2,37 \times 10^4$	24	$1,08 \times 10^4$
Blanco 1	$3,29 \times 10^3$	Blanco 2	$9,47 \times 10^3$
Inoc. Bajo	$1,46 \times 10^4$	Inoc. Bajo	$1,71 \times 10^4$
Inoc. Alto	$1,11 \times 10^7$	Inoc. Alto	$1,63 \times 10^7$

Rec.: recuperación, Inoc.: inóculo; cg: copias genómicas.



**Figura 4.5:** Cantidad promedio de cg/mL de *Enterococcus faecalis* para las muestras de altas y bajas concentraciones, concentradas por ambos métodos, SMF y MAF.







## **5. Calidad microbiológica del agua de riego**

### **5.1. Cuantificación y detección de bacterias y amebas de vida libre en agua de riego**

En este apartado estudiaremos la calidad de distintos tipos de muestras de agua que se suelen utilizar para regadío en Cataluña. Estos tipos de fuentes los hemos agrupado en: fuentes convencionales, procedentes de acuíferos naturales, y fuentes no convencionales, procedentes de diferentes puntos de muestreo en la EDAR de Granollers.

En las fuentes de agua de riego convencionales encontramos el agua procedente del río Fluviá, el agua del pozo que se encuentra en una granja avícola, el agua del pozo que se encuentra en una granja porcina, y el agua de un pozo almacenada en una balsa que se utiliza para el riego de huertos, cercana al río Congost situado al lado de la planta de la EDAR de Granollers y en las fuentes no convencionales analizamos las aguas procedentes de diferentes puntos en el proceso de tratamiento de la EDAR de Granollers).

Para las cuantificaciones de heterótrofos totales se utilizó el cultivo mediante placas de PCA, las cuales se cuantificaron a las 24 y 48 horas. El cultivo de las muestras para cuantificar el género *Legionella* se realizó utilizando placas BCYE/GVPC (Maim, y Biomerieux). A pesar de los diferentes tratamiento utilizados para eliminar la flora acompañante que hubiera en la muestra, las placas fueron colonizadas por otro tipo de bacterias y hongos, lo que imposibilitó la cuantificación por medio del cultivo en placa.

Sólo fue posible aislar bacterias pertenecientes al género de la muestra del agua residual del afluente de la EDAR de Granollers, y de la muestra de agua del secundario de la EDAR de Granollers, del mes de enero de 2016 en el caso de la muestra de agua residual, y del mes de febrero de 2016 del agua del secundario de la EDAR de Granollers. De estos aislamiento se pudo confirmar por siembra en BCYE (MAIM, S.A.) y Agar Sangre (MAIM, S.A.) y se pudieron identificar por serología cepas pertenecientes a los serogrupos 1 y serogrupos 2-14 para la muestra de agua residual. Para la muestra de agua del secundario, las cepas aisladas pertenecen a los grupos del 2-14. Ambos aislamientos se

hicieron a partir de las muestras que había recibido el tratamiento combinado de 30 minutos a 50 °C y tratamiento ácido con un tampón pH 2 (Fotografía 1 en el Anexo I J).

En el caso de la detección de amebas en estas muestras de aguas, también presentaron problemas a la hora de su cultivo. El cultivo en NNA (Non Nutrient Agar, Scharlau) evita el crecimiento de muchos microorganismos, sin embargo la colonización por hongos era muy frecuente. Por lo cual, se hacía necesario vigilar constantemente los cultivos para inmediatamente se observaban a las amebas (en el caso que las hubiera) migrando en la placa, hacer el corte del agar en la zona donde se observaban y pasarlo a una nueva placa sembrada previamente con *E. coli* muerta para que las amebas se alimentaran y se multiplicaran. La muestras que presentaron mayor porcentaje Presencia/Ausencia de amebas fueron las muestras de agua residual, la del secundario de la EDAR de Granollers.

#### **5.1.1. Río FLuvià**

Este río nace en la sierra de Cabrera (en la comarca de la Garrotxa) y desemboca en el golfo de Rosas. Las muestras para este proyecto se tomaron en la zona del río cercana al municipio de St. Miquel de Fluvià.

Los datos obtenidos a lo largo de un año mostraron que el río Fluvià es un río poco contaminado.

En la Figura 5.1. y en la Tabla 5.1. se muestran los valores obtenidos en el análisis de esta muestra para heterótrofos totales los valores estaban entre  $10^4$  y  $10^6$  copias genómicas/ 100 mL, siendo el valor más bajo fue el del mes de abril con  $1,20 \times 10^4$  ufc/ 100 mL y el más alto,  $1,16 \times 10^6$  ufc/ 100 mL en el mes de diciembre de 2016.

En pocas muestras del río Fluvià se detectó la presencia de indicadores fecales. Sólo hubo cuantificación de *E. coli* por medio de qPCR en 3 de los 12 muestreos realizados, lo que corresponde a un 25 % de muestras positivas. Estos valores registrados se encuentran alrededor de  $10^2$  copias genómicas/100 mL de muestra, en el mes de diciembre de 2016, se cuantificaron  $2,50 \times 10^2$  copias

genómicas/ 100 mL, siendo este el valor más bajo registrado y el más alto, el del mes de marzo de 2017 con  $7,32 \times 10^2$  copias genómicas/ 100 mL. Aunque el límite de detección de esta qPCR es de  $10^1$  copias genómicas para la curva patrón construida con genomas celulares, para la construida con gBlocks es de  $10^2$ , por lo que no consideramos esta cantidad exacta.

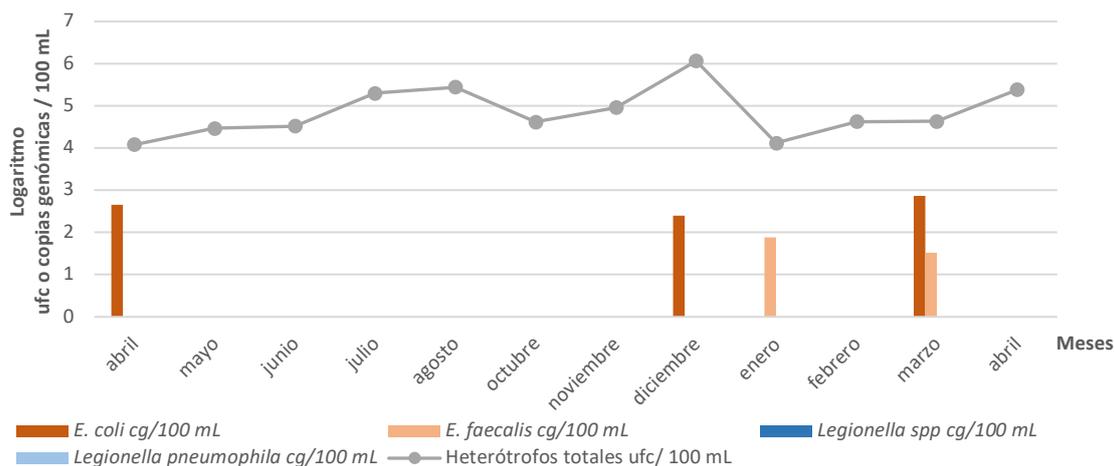
*E. faecalis*, sólo se detectó en los meses de enero y marzo de 2017, los valores fueron los siguientes:  $7,62 \times 10^1$  copias genómicas/ 100 mL y  $3,28 \times 10^3$  copias genómicas/ 100 mL respectivamente, también en este caso estaban cerca del límite de detección de la técnica que es de  $10^1$  para ambas curvas patrón. El 16,7 % de las muestras fueron positivas a este microorganismo.

No se detectó la presencia de *Legionella* durante los 12 meses de muestreo analizados. Sin embargo, para la muestra procedente del río Fluvìà pudimos detectar la presencia de protozoos en la muestra tomada para el mes de abril de 2017.

**Tabla 5.1:** Cuantificación para la muestra de agua del río Fluvìà para diferentes microorganismos.

Fecha	Het. Tot. ufc/100 mL	<i>E. coli</i> cg/100 mL	<i>E. faecalis</i> cg/100 mL	<i>Legionella spp.</i> cg/100 mL	<i>L. pneum.</i> cg/100 mL	Amebas Pres./Aus.
24.4.16	$1,20 \times 10^4$	$4,52 \times 10^2$	ND	ND	No realizada	No realizada
18.5.16	$2,95 \times 10^4$	ND	ND	ND	ND	No realizada
6.6.16	$3,34 \times 10^4$	ND	ND	ND	ND	No realizada
6.7.16	$2,00 \times 10^5$	ND	ND	ND	ND	No realizada
29.8.16	$2,80 \times 10^5$	ND	ND	ND	No realizada	No realizada
19.10.16	$4,16 \times 10^4$	ND	ND	ND	No realizada	No realizada
15.11.16	$9,18 \times 10^4$	ND	ND	ND	No realizada	Ausencia
16.12.16	$1,16 \times 10^6$	$2,50 \times 10^2$	ND	ND	No realizada	Ausencia
10.1.17	$1,33 \times 10^4$	ND	$7,62 \times 10^1$	ND	No realizada	Ausencia
7.2.17	$4,24 \times 10^4$	ND	ND	ND	No realizada	Ausencia
7.3.17	$4,28 \times 10^4$	$7,32 \times 10^2$	$3,28 \times 10^3$	ND	No realizada	Presencia
4.4.17	$2,42 \times 10^5$	ND	ND	ND	ND	Ausencia
Med.Geom.	$7,13 \times 10^4$	$2,12 \times 10^0$	$1,92 \times 10^0$	ND	ND	
Des. Est.	$3,08 \times 10^5$	$1,37 \times 10^2$	$2,18 \times 10^1$	----	----	
% Pres./Aus.	100,0	25,0	16,7	0,0	0,0	16,7

**Het. Tot.:** heterótrofos totales; ***L. pneum.:*** *Legionella pneumophila*; **cg/100 mL.:** copias genómicas por reacción en 100 mL; **ND:** no detectado; **Pres./Aus.:** presencia/ausencia; **Des. Est.:** desviación estándar; **Med. Geom.:** media geométrica. Las medias geométricas de *E. coli* y *E. faecalis* se han calculado sumando 1 en los valores no detectados.



**Figura 5.1:** Cuantificación de heterótrofos totales, *E. coli*, *E. faecalis*, *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila* desde abril de 2016 hasta abril de 2017, para el agua procedente del río Fluvià.

### 5.1.2. Agua del pozo en una granja avícola

Los datos referentes al agua de un pozo de una granja avícola en la zona de Granollers cercana al río Fluvià, los encontramos en la Tabla 5.2. y la representación de los mismos se observan en la Figura 5.2. Esta muestra a pesar de ser una agua de pozo presenta contaminación fecal en la mayoría de las muestras. La cuantificación por qPCR de *E. coli* mostró la presencia del indicador de contaminación fecal en el 77,8 % de las muestras. Los valores registrados oscilaron entre de  $10^2$  y  $10^4$  copias genómicas/ 100 mL, siendo el más bajo, el del mes de febrero de 2016 con  $1,21 \times 10^2$  copias genómicas/ 100 mL, y el más alto fue de  $1,04 \times 10^4$  copias genómicas/ 100 mL en el mes de julio de 2016.

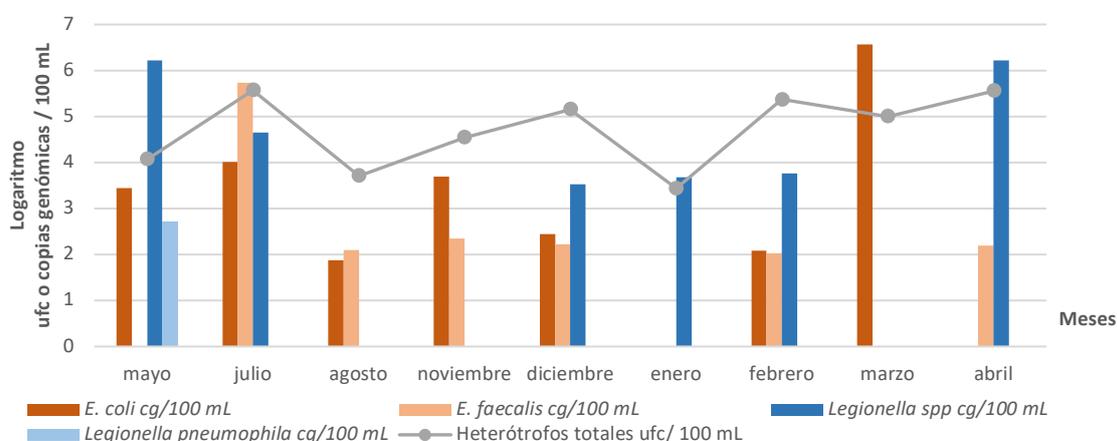
**Tabla 5.2:** Cuantificación para el agua de pozo de una granja avícola, para diferentes microorganismos.

Fecha	Het. Tot. ufc/100 mL	<i>E coli</i> cg/100 mL	<i>E faecalis</i> cg/100 mL	<i>Legionella</i> spp. cg/100 mL	<i>L. pneum.</i> cg/100 mL	Amebas Pres./Aus
18.5.16	$1,18 \times 10^4$	$2,74 \times 10^3$	ND	$1,64 \times 10^6$	$5,30 \times 10^2$	No realizada
6.7.16	$3,70 \times 10^5$	$1,04 \times 10^4$	$5,47 \times 10^5$	$4,52 \times 10^4$	ND	No realizada
29.8.16	$5,10 \times 10^3$	$7,46 \times 10^1$	$1,23 \times 10^2$	ND	No realizada	No realizada
15.11.16	$3,50 \times 10^4$	$4,94 \times 10^3$	$2,25 \times 10^2$	ND	No realizada	Ausencia
16.12.16	$1,43 \times 10^5$	$2,76 \times 10^2$	$1,65 \times 10^2$	$3,42 \times 10^3$	ND	Ausencia
10.1.17	$2,75 \times 10^3$	ND	ND	$4,84 \times 10^3$	ND	Ausencia
7.2.17	$2,36 \times 10^5$	$1,21 \times 10^2$	$1,07 \times 10^2$	$5,77 \times 10^3$	ND	Presencia
7.3.17	$1,01 \times 10^5$	$3,68 \times 10^6$	ND	ND	No realizada	Presencia
4.4.17	$3,62 \times 10^5$	ND	$1,54 \times 10^2$	$1,67 \times 10^6$	ND	Ausencia
Med. Geom.	$5,17 \times 10^4$	$4,77 \times 10^2$	$7,02 \times 10^1$	$1,32 \times 10^3$	$2,84 \times 10^0$	
Desv. Estn.	$1,40 \times 10^5$	$1,15 \times 10^6$	$1,72 \times 10^5$	$6,85 \times 10^5$	$1,97 \times 10^2$	
% Pres./Aus.	100,0	77,8	66,7	66,7	11,1	33,3

**Het. Tot.:** heterótrofos totales; ***L. pneum.*:** *Legionella pneumophila*; **cg/100 mL.:** copias genómicas por reacción en 100 mL; **ND:** no detectado; **Pres./Aus.:** presencia/ausencia; **Des. Est.:** desviación estándar; **Med. Geom.:** media geométrica. Las medias geométricas de *E. coli* y *E. faecalis* se han calculado sumando 1 en los valores no detectados.

Para esta muestra agua de pozo de una granja avícola, los valores de cuantificación por qPCR de *E. faecalis* se encuentran dentro de los  $10^2$  y  $10^5$  copias genómicas/ 100 mL para un total del 66,7 % de positividad, siendo el valor más bajo el del mes de febrero de 2017 con  $1,07 \times 10^2$  copias genómicas/ 100 mL y el más alto, el del mes de julio de 2016, con  $5,47 \times 10^5$  copias genómicas/ 100 mL.

Se detectó por qPCR la presencia de *Legionella* spp. en un 66,7 % de las muestras colectadas pero no se detectó *Legionella pneumophila*. De estos valores el más bajo fue el registrado durante el mes de diciembre de 2016 con  $3,42 \times 10^3$  copias genómicas/ 100 mL de muestra, y el valor más alto fue de  $4,52 \times 10^4$  copias genómicas/ 100 mL. En los meses de febrero y marzo de 2017 estas muestras dieron positivo a la presencia de protozoos, representando el 22,2 % de presencia de protozoos en la muestra. El cultivo de ambos grupos de microorganismos fue difícil, y por ello los aislamientos y las cuantificaciones a través del cultivo no se pudieron realizar.



**Figura 5.2:** Cuantificación de heterótrofos totales, *E. coli*, *E. faecalis*, *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila* desde abril de 2016 hasta abril de 2017, para el agua de pozo en una granja avícola.

### 5.1.3. Agua de un pozo en una granja porcina

Para la cuantificación por qPCR de los diferentes microorganismos estudiados en la muestra de agua de pozo de una granja de cerdos, las cuantificaciones que se registraron las encontramos en la Tabla 5.3. y su representación en la Figura 5.3. Los heterótrofos totales para esta muestra se mantuvieron entre  $10^3$  y  $10^5$

ufc/100 mL, reportándose el valor más bajo durante el mes de noviembre de 2016 con  $2,70 \times 10^3$  ufc/ 100 mL, y el valor más alto se registró el mes de abril de 2017 con  $2,63 \times 10^5$  ufc/ 100 mL.

En la cuantificación de *E. coli* por qPCR, los valores se encontraron entre  $10^2$  y  $10^3$  copias genómicas/ 100 mL, con un 77,8 % de presencia para *E. coli* y un 44,4 %, para *E. faecalis*.

Para *E. faecalis* solo se registraron cuantificaciones en el mes de abril y diciembre de 2016 y en enero y abril de 2017. Se registraron  $1,76 \times 10^5$  copias genómicas/ 100 mL como valor más alto en abril de 2016, y  $4,41 \times 10^1$  copias genómicas/ 100 mL, como valor mas bajo en el mes de enero de 2017.

En cuanto al género *Legionella*, se registraron valores para los meses de abril, junio, diciembre de 2016 y marzo y abril de 2017, con valores entre  $10^2$  y  $10^5$  copias genómicas, para *Legionella* spp. El valor más bajo para este grupo de cuantificaciones fue de  $2,79 \times 10^2$  copias genómicas/ 100 mL y de  $1,67 \times 10^5$  copias genómicas/ 100 mL, el más alto.

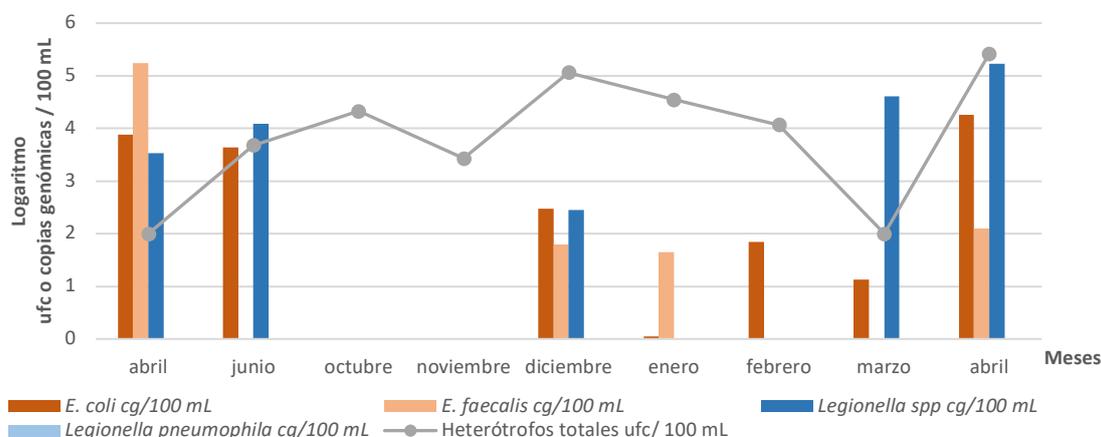
No se registró la presencia de *Legionella pneumophila* por qPCR. En este punto de muestreo se detectó la presencia de protozoos en la muestra tomada para el mes de octubre de 2016, un 11,1%. Los cultivos de protozoos y del género *Legionella* mostraron crecimiento de la microbiota acompañante en las placas, lo que dificultó sus cuantificaciones y aislamiento.

**Tabla 5.3:** Cuantificación de diferentes microorganismos en la muestra de agua de pozo en una granja de porcina.

Fecha	Het. Tot. ufc/100 mL	<i>E coli</i> cg/100 mL	<i>E faecalis</i> cg/100 mL	<i>Legionella spp.</i> cg/ 100 mL	<i>L. pneum.</i> cg/100 mL	Amebas Pres./Aus.
24.4.16	ND	$7,68 \times 10^3$	$1,76 \times 10^5$	$3,42 \times 10^3$	ND	No realizada
6.6.16	$4,80 \times 10^3$	$4,40 \times 10^3$	ND	$1,22 \times 10^4$	ND	No realizada
19.10.16	$2,13 \times 10^4$	ND	ND	ND	No realizada	Presencia
15.11.16	$2,70 \times 10^3$	ND	ND	ND	No realizada	Ausencia
16.12.16	$1,16 \times 10^5$	$2,99 \times 10^2$	$6,24 \times 10^1$	$2,79 \times 10^2$	ND	Ausencia
10.1.17	$3,50 \times 10^4$	$1,12 \times 10^0$	$4,49 \times 10^1$	ND	No realizada	Ausencia
7.2.17	$1,17 \times 10^4$	$6,95 \times 10^1$	ND	ND	No realizada	Ausencia
7.3.17	ND	$1,33 \times 10^1$	ND	$4,11 \times 10^4$	No realizada	Ausencia
4.4.17	$2,63 \times 10^5$	$1,82 \times 10^4$	$1,27 \times 10^2$	$1,67 \times 10^5$	ND	No realizada
Med. Geom.	$6,56 \times 10^3$	$8,31 \times 10^1$	$1,58 \times 10^1$	$1,63 \times 10^2$	ND	----
Desv. Estn.	$8,56 \times 10^4$	$5,82 \times 10^3$	$5,54 \times 10^4$	$5,18 \times 10^4$	----	----
% Pres./Aus.	100,0	77,8	44,4	55,6	0,0	16,7

**Het. Tot.:** heterótrofos totales; ***L. pneum.*:** *Legionella pneumophila*; **cg/100 mL.:** copias genómicas por reacción en 100 mL; **ND:** no detectado; **Pres./Aus.:** presencia/ausencia; **Des. Est.:** desviación estándar; **Med. Geom.:** media geométrica. Las medias geométricas de *E. coli* y

*E. faecalis* se han calculado sumando 1 en los valores no detectados (ND). En aquellos muestreos con cuantificación menor a 30 ufc/mL para heterótrofos totales, se tomó como base el límite de cuantificación dividido entre 2 ( $5 \times 10^1$  ufc/100 mL).



**Figura 5.3:** Cuantificación de heterótrofos totales, *E. coli*, *E. faecalis*, *Legionella spp.* y *Legionella pneumophila* desde abril de 2016 hasta abril de 2017, para la muestra de agua de un pozo en una granja porcina.

#### 5.1.4. Agua de pozo almacenada en una balsa para el riego de huertos

Uno de los pozos analizados, muy cercano a la EDAR de Granollers, vertía el agua en una pequeña balsa. Como los regantes de huertos de la zona utilizan el agua de la balsa para regar, el muestreo se realizó en esta balsa.

Los valores para la muestra del agua de la balsa, los encontramos registrados en la Tabla 5.4. y su representación en la Figura 5.4. cuantificados por cultivo en placa y por qPCR. Para las cuantificaciones de los heterótrofos totales, los registros se mantuvieron entre  $10^4$  y  $10^6$  ufc/ 100 mL de agua muestreada. El valor para los heterótrofos totales con menor reporte fue en el mes de  $4,21 \times 10^4$  ufc/ 100 mL y el más alto, de  $1,60 \times 10^6$  ufc/ 100 mL.

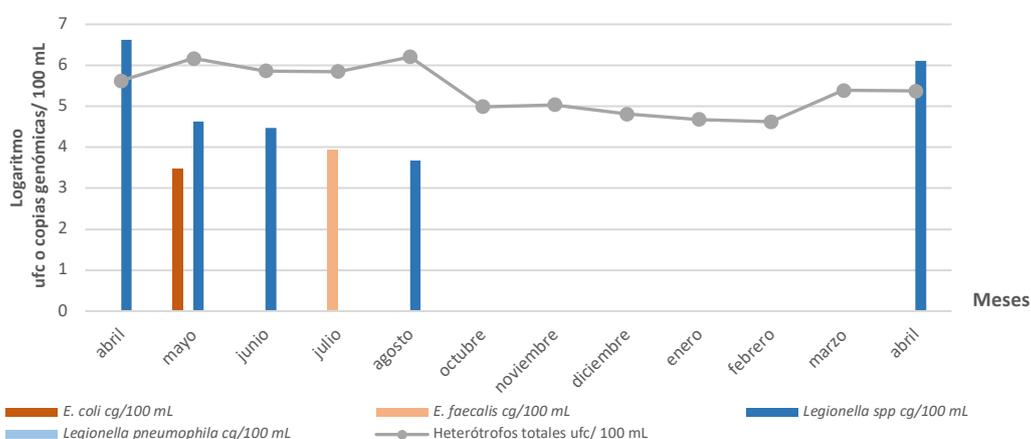
Solo se encontraron indicadores de contaminación fecal en dos muestras. Se registró cuantificación de *E. coli* por qPCR, sólo se registró cuantificación de *E. coli* el mes de mayo de 2016 con  $2,91 \times 10^3$  copias genómicas/100 mL. *E. faecalis* sólo registró cuantificación para el mes de julio de 2016 con  $8,37 \times 10^3$  copias genómicas/ 100 mL de muestra.

**Tabla 5.4:** Cuantificación para la muestra de agua de pozo almacenada en una balsa (regadíos de huertos) para diferentes microorganismos.

Fecha	Het. Tot. ufc/100 mL	<i>E coli</i> cg/100 mL	<i>E faecalis</i> cg/100 mL	<i>Legionella spp.</i> cg/100 mL	<i>L. pneum.</i> cg/100 mL	Amebas Pres./Aus.
24.4.16	4,18x10 <sup>5</sup>	ND	ND	4,25x10 <sup>6</sup>	ND	No realizada
18.5.16	1,47x10 <sup>6</sup>	2,91x10 <sup>3</sup>	ND	4,25x10 <sup>4</sup>	ND	No realizada
6.6.16	7,35x10 <sup>5</sup>	ND	ND	2,96x10 <sup>4</sup>	ND	No realizada
6.7.16	7,00x10 <sup>5</sup>	ND	8,37x10 <sup>3</sup>	ND	ND	No realizada
29.8.16	1,60x10 <sup>6</sup>	ND	ND	4,69x10 <sup>3</sup>	No realizada	No realizada
19.10.16	9,75x10 <sup>4</sup>	ND	ND	ND	No realizada	Ausencia
15.11.16	1,09x10 <sup>5</sup>	ND	ND	ND	No realizada	Ausencia
16.12.16	6,43x10 <sup>4</sup>	ND	ND	ND	No realizada	Ausencia
10.1.17	4,80x10 <sup>4</sup>	ND	ND	ND	No realizada	Ausencia
7.2.17	4,21x10 <sup>4</sup>	ND	ND	ND	No realizada	Ausencia
7.3.17	2,42x10 <sup>5</sup>	ND	ND	ND	No realizada	Ausencia
4.4.17	2,37x10 <sup>5</sup>	ND	ND	1,30x10 <sup>6</sup>	ND	Ausencia
Med. Geom.	2,42x10 <sup>5</sup>	1,94x10 <sup>0</sup>	2,12x10 <sup>0</sup>	1,34x10 <sup>2</sup>	ND	----
Desv. Estn.	5,25x10 <sup>5</sup>	8,03x10 <sup>2</sup>	2,31x10 <sup>3</sup>	1,19x10 <sup>6</sup>	----	----
% Pres./Aus.	100,0	8,0	8,0	41,7	0,0	0,0

**Het. Tot.:** heterótrofos totales; ***L. pneum.:*** *Legionella pneumophila*; **cg/100 mL:** copias genómicas por reacción en 100 mL; **ND:** no detectado; **Pres./Aus.:** presencia/ausencia; **Des. Est.:** desviación estándar; **Med. Geom.:** media geométrica. Las medias geométricas de *E. coli* y *E. faecalis* se han calculado sumando 1 en los valores no detectados.

Sin embargo, se detectó *Legionella spp.* en 4 meses, los meses de abril, mayo, junio de 2016 y el mes de abril de 2017, de estos valores el valor más bajo para *Legionella spp.* fue de 4,69x10<sup>3</sup> copias genómicas/ 100 mL y el más alto fue de 1,30x10<sup>6</sup> copias genómicas/ 100 mL. En el caso de *Legionella pneumophila* no fue detectada con qPCR en ninguna de los meses muestreados. Tampoco se detectó presencia de amebas en estas muestras. En este caso tampoco se pudo determinar por cultivo ni *Legionella*, ni protozoos por los cultivos. La identificación a través del cultivo no se pudo realizar porque los microorganismos presentes en la muestra de agua crecían mucho más rápido lo que impedía visualizar colonias presuntivas de *Legionella*.



**Figura 5.4:** Cuantificación de heterótrofos totales, *E. coli*, *E. faecalis*, *Legionella spp.* y *Legionella pneumophila* desde abril de 2016 hasta abril de 2017, para la muestra de agua de pozo almacenada en una balsa (regadíos de huertos).

### 5.1.5. Agua residual del afluente de la EDAR de Granollers

La EDAR de Granollers está situada en el municipio de Granollers, y recibe las aguas residuales de los municipios de Canovelles, parte de Les Franqueses del Vallès y de Granollers. Tiene un línea de agua, una línea de fangos y una línea de biogás.

La muestra de agua residual procede del afluente de la EDAR de Granollers. Esta EDAR, recibe un caudal de entrada de 134.494 habitantes/equivalentes procedentes de los tres municipios mencionados anteriormente (Datos obtenidos de [ww.iagua.es/data](http://ww.iagua.es/data)).

En la Tabla 5.5. podemos observar los valores encontrados para los diferentes microorganismos estudiados y su respectiva gráfica en la Figura 5.5. Tal y como era de esperar es un agua fuertemente contaminada en donde se detectó la presencia de indicadores de contaminación fecal y *Legionella* en todas las muestras. La concentración de heterótrofos totales osciló entre  $10^7$  y  $10^9$  ufc/ 100 mL, siendo el valor más alto, el observado en el mes de abril de 2017, con  $3,25 \times 10^9$  ufc/ 100 mL y el menor, fue en el mes de febrero del mismo año, en el cual hubo una cuantificación de heterótrofos totales de  $1,25 \times 10^7$  ufc/ 100 mL. Se detectó presencia de heterótrofos en el 100,0 % de las muestras.

**Tabla 5.5:** Cuantificación para la muestra de agua residual afluente de la EDAR Granollers, para diferentes microorganismos.

Fecha	Het. Tot. ufc/100 mL	<i>E coli</i> cg/100 mL	<i>E faecalis</i> cg/100 mL	<i>Legionella</i> spp. cg/100 mL	<i>L. pneum.</i> cg/100 mL	Amebas Pres./Aus.
24.4.16	$3,60 \times 10^8$	$5,23 \times 10^6$	$5,44 \times 10^5$	$5,76 \times 10^7$	ND	No realizada
18.5.16	$1,26 \times 10^9$	$4,37 \times 10^6$	$6,23 \times 10^5$	$5,76 \times 10^5$	$4,20 \times 10^3$	No realizada
6.6.16	$4,65 \times 10^8$	$9,73 \times 10^6$	$5,88 \times 10^3$	ND	$1,60 \times 10^4$	No realizada
6.7.16	$4,67 \times 10^8$	$1,44 \times 10^7$	$1,38 \times 10^6$	$4,09 \times 10^4$	$5,88 \times 10^4$	No realizada
29.8.16	$4,24 \times 10^8$	$3,59 \times 10^5$	$1,59 \times 10^5$	$1,24 \times 10^6$	$9,64 \times 10^4$	No realizada
19.10.16	$9,10 \times 10^8$	$2,94 \times 10^7$	$9,69 \times 10^5$	$8,14 \times 10^6$	$6,10 \times 10^6$	Presencia
15.11.16	$1,49 \times 10^8$	$9,24 \times 10^6$	$4,45 \times 10^5$	$9,10 \times 10^5$	$3,97 \times 10^5$	Presencia
16.12.16	$4,46 \times 10^8$	$1,16 \times 10^7$	$9,11 \times 10^5$	$2,78 \times 10^6$	$1,14 \times 10^6$	Presencia
10.1.17	$7,10 \times 10^7$	$2,71 \times 10^7$	$3,31 \times 10^5$	$1,17 \times 10^8$	$4,23 \times 10^7$	Presencia
7.2.17	$1,25 \times 10^7$	$1,87 \times 10^7$	$2,42 \times 10^5$	$1,23 \times 10^7$	$2,81 \times 10^6$	Presencia
7.3.17	$2,04 \times 10^9$	$1,38 \times 10^7$	$1,93 \times 10^5$	$3,33 \times 10^6$	$2,48 \times 10^4$	Presencia
4.4.17	$3,25 \times 10^9$	$3,80 \times 10^6$	$5,25 \times 10^5$	$3,91 \times 10^6$	$1,33 \times 10^6$	Presencia
Med. Geom.	<b><math>4,80 \times 10^8</math></b>	<b><math>8,23 \times 10^6</math></b>	<b><math>3,25 \times 10^5</math></b>	<b><math>9,65 \times 10^5</math></b>	<b><math>1,13 \times 10^5</math></b>	
Desv. Estn.	<b><math>8,87 \times 10^8</math></b>	<b><math>8,69 \times 10^6</math></b>	<b><math>3,80 \times 10^5</math></b>	<b><math>3,37 \times 10^7</math></b>	<b><math>1,15 \times 10^7</math></b>	
% Pres./Aus.	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>91,7</b>	<b>91,7</b>	<b>100,0</b>

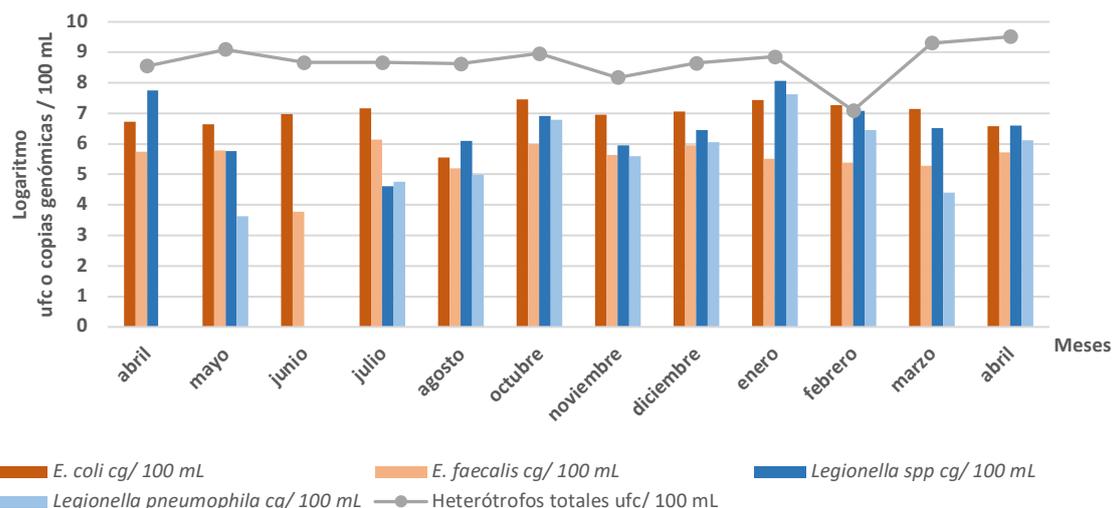
**Het. Tot.:** heterótrofos totales; **L. pneum.:** *Legionella pneumophila*; **cg/100 mL.:** copias genómicas por reacción en 100 mL; **ND:** no detectado; **Pres./Aus.:** presencia/ausencia; **Des. Est.:** desviación estándar; **Med. Geom.:** media geométrica. Las medias geométricas de *E. coli* y *E. faecalis* se han calculado sumando 1 en los valores no detectados.

Todas las muestras analizadas presentaron una elevada carga fecal, tal y como muestran las concentraciones de los indicadores fecales. Dentro de los valores registrados para *E. coli*, el valor más alto se registró con  $2,94 \times 10^7$  copias genómicas/ 100 mL en el mes de octubre de 2016, y el más bajo en el mes de agosto de 2016 con  $3,59 \times 10^5$  copias genómicas/ 100 mL. Para *E. faecalis*, el valor más alto cuantificado fue de  $1,38 \times 10^6$  copias genómicas/ 100 mL en el mes de julio, siendo el más bajo, en el mes de junio con un valor de  $5,88 \times 10^3$  copias genómicas/ 100 mL. El 100,0 % de las muestras fueron positivas a la presencia de ambos indicadores. La representación gráfica de estos valores los podemos observar en la Figura 5.5.

En prácticamente todas las muestras se determinó la presencia de *Legionella* spp. las concentraciones máximas de copias genómicas/ 100 mL fue en el mes de enero de 2017, siendo el valor de *Legionella* spp. de  $1,17 \times 10^8$  copias genómicas/ 100 mL y de  $4,23 \times 10^7$  copias genómicas/ 100. mL para *Legionella pneumophila*. El valor de menor magnitud para *Legionella* spp. fue de  $4,09 \times 10^4$  copias genómicas/ 100 mL en el mes de julio de 2016, y en el caso de *Legionella pneumophila*, el valor mínimo se dio en el mes de mayo de 2016, con una cuantificación de  $4,20 \times 10^3$  copias genómicas/ 100 mL.

Sin embargo, el cultivo, aislamiento e identificación fue muy difícil debido a que en las placas crecían mucho más rápido los otros microorganismos presentes en la muestra, evitando que se pudieran apreciar colonias presuntivas de *Legionella*. Sólo logramos aislar e identificar colonias pertenecientes a este grupo durante el mes de enero de 2016. Se aislaron e identificaron dos cepas de *L. pneumophila* sg. 1 una y de los sg. 2-14, la otra.

En la muestra de agua residual se comprobó la presencia de amebas desde octubre de 2016 a abril de 2017, con un 100 % de presencia de amebas en los meses que se utilizó el cultivo en NNA para detectar la presencia o no de amebas. En los meses anteriores no se determinó por cultivo en NNA presencia de amebas de vida libre en la muestra.



**Figura 5.5:** Cuantificación de heterótrofos totales, *E. coli*, *E. faecalis*, *Legionella spp.* y *Legionella pneumophila* desde abril de 2016 hasta abril de 2017, para la muestra de agua residual afluyente de la EDAR de Granollers.

### 5.1.6. Agua del secundario de la EDAR de Granollers

El tratamiento secundario de la EDAR de Granollers es un tratamiento con fangos activados y biogás.

Las cuantificaciones obtenidas para los diferentes microorganismos en esta muestra de agua del secundario de la EDAR de Granollers se encuentran registrados en la Tabla 5.6. y se observan graficados en la Figura 5.6.

La cuantificación de heterótrofos totales positiva para el 100,0 % de las muestras, estuvo entre  $10^6$  y  $10^8$  ufc/ 100 mL de muestra, siendo el valor más bajo el registrado el mes de noviembre de 2016, con  $4,65 \times 10^6$  ufc/ 100 mL y el más alto, el del mes de abril 2017 con  $1,80 \times 10^8$  ufc/ 100 mL de agua muestreada.

**Tabla 5.6:** Cuantificación para la muestra de agua del secundario de la EDAR Granollers, para diferentes microorganismos.

Fecha	Het. Tot. ufc/100 mL	<i>E coli</i> cg/100 mL	<i>E faecalis</i> cg/100 mL	<i>Legionella spp.</i> cg/100 mL	<i>L. pneum.</i> cg/100 mL	Amebas Pres./Aus.
24.4.16	$1,18 \times 10^7$	$4,50 \times 10^3$	$4,71 \times 10^3$	$1,32 \times 10^7$	ND	No realizada
18.5.16	$5,23 \times 10^7$	$4,02 \times 10^5$	$1,55 \times 10^6$	$1,72 \times 10^8$	$4,30 \times 10^4$	No realizada
6.6.16	$9,30 \times 10^6$	$2,87 \times 10^5$	$4,21 \times 10^5$	$6,59 \times 10^6$	$2,59 \times 10^4$	No realizada
6.7.16	$6,47 \times 10^6$	$2,04 \times 10^5$	$1,76 \times 10^5$	$5,68 \times 10^6$	$1,10 \times 10^4$	No realizada
29.8.16	$1,12 \times 10^7$	$2,24 \times 10^3$	$1,68 \times 10^3$	$9,02 \times 10^5$	$3,52 \times 10^4$	No realizada
19.10.16	$1,07 \times 10^7$	$2,77 \times 10^6$	$1,81 \times 10^5$	$5,90 \times 10^6$	$1,63 \times 10^5$	Ausencia
15.11.16	$4,65 \times 10^6$	$3,50 \times 10^6$	$1,02 \times 10^5$	ND	ND	Ausencia
16.12.16	$7,30 \times 10^7$	$6,81 \times 10^2$	$4,19 \times 10^2$	$2,89 \times 10^5$	$1,56 \times 10^4$	Presencia
10.1.17	$2,17 \times 10^7$	$3,97 \times 10^3$	$1,74 \times 10^3$	$3,95 \times 10^7$	$3,94 \times 10^5$	Presencia
7.2.17	$1,23 \times 10^7$	$2,73 \times 10^3$	ND	$8,11 \times 10^6$	ND	Presencia
7.3.17	$1,38 \times 10^8$	$1,31 \times 10^5$	$2,57 \times 10^3$	$4,97 \times 10^7$	ND	Presencia
4.4.17	$1,80 \times 10^8$	$2,81 \times 10^4$	$2,01 \times 10^3$	$7,91 \times 10^7$	$2,27 \times 10^6$	Presencia
Med. Geom.	$2,15 \times 10^7$	$4,46 \times 10^4$	$7,94 \times 10^3$	$2,72 \times 10^6$	$1,78 \times 10^3$	----
Desv. Estn.	$5,56 \times 10^7$	$1,14 \times 10^6$	$4,23 \times 10^5$	$4,84 \times 10^7$	$6,20 \times 10^5$	----
% Pres./Aus.	100,0	100,0	91,7	91,7	66,7	71,4

Het. Tot.: heterótrofos totales; *L. pneum.*: *Legionella pneumophila*; cg/100 mL.: copias genómicas por reacción en 100 mL; ND: no detectado; Pres./Aus.: presencia/ausencia; Des. Est.:

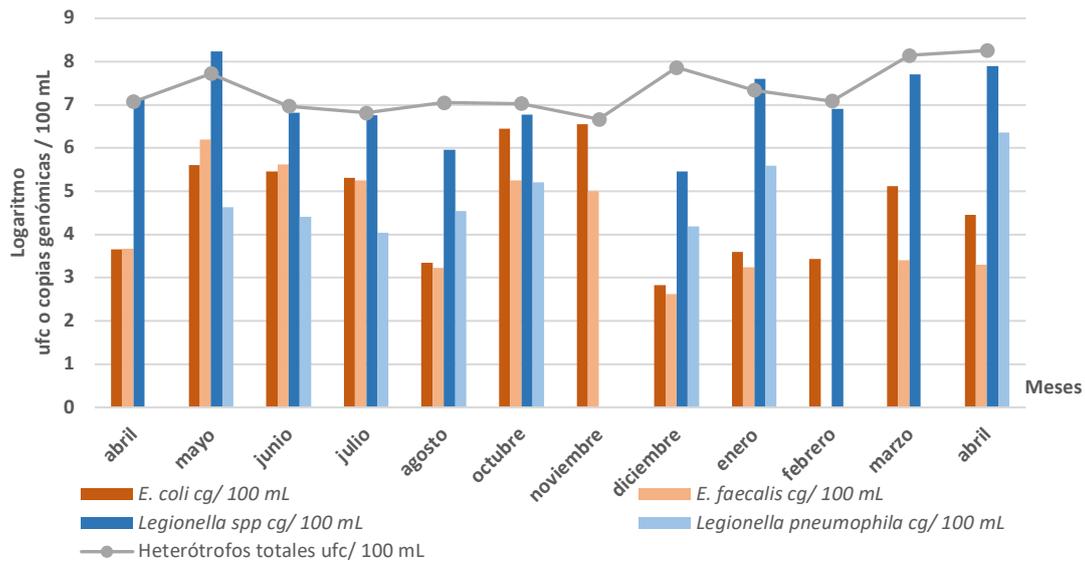
desviación estándar; **Med. Geom.:** media geométrica. Las medias geométricas de *E. coli* y *E. faecalis* se han calculado sumando 1 en los valores no detectados.

En referencia a los valores de qPCR para *E. coli*, los valores se encontraron entre  $10^2$  y  $10^6$  copias genómicas/ 100 mL de muestra. El valor más alto registrado fue de  $3,50 \times 10^6$  copias genómicas/ 100 mL en el mes de noviembre de 2016, y de  $6,81 \times 10^2$  copias genómicas/ 100 mL como valor más bajo en el mes de diciembre de 2016.

En el caso de los valores obtenidos por qPCR, el valor más bajo registrado para *E. faecalis* fue de  $4,19 \times 10^2$  copias genómicas/ 100 mL de muestra para el mes de diciembre de 2016, y el más alto, de  $1,55 \times 10^6$  copias genómicas/ 100 mL en el mes de mayo de 2016, oscilando los valores en el orden del  $10^2$  y  $10^6$  copias genómicas/ 100 mL.

Para el grupo de valores del género *Legionella*, la cuantificación por medio de la qPCR de especies *Legionella* spp., estuvo entre los rangos de  $10^5$  y  $10^8$  copias genómicas/ 100 mL de muestra, siendo el valor más bajo, el registrado el mes diciembre de 2016 con  $2,89 \times 10^5$  copias genómicas/ 100 mL y el más alto, el mes de mayo de 2016 con  $1,72 \times 10^8$  copias genómicas/ 100 mL. En cuanto a la cuantificación para la especie *Legionella pneumophila* los valores estuvieron entre  $10^4$  y  $10^6$  copias genómicas/ 100 mL. Para esta especie se obtuvo como valor más bajo, el registrado el mes de julio de 2016 con  $1,10 \times 10^4$  copias genómicas/ 100 mL y el valor más alto, el del mes de abril de 2017 con  $2,27 \times 10^6$  copias genómicas/ 100 mL.

En esta estación de muestreo, los porcentajes detectados fueron del 100 % para heterótrofos totales y *E. coli*; del 91,7 % para *E. faecalis* y *Legionella* spp.; de 66,7 % para *L. pneumophila* y del 71,4 % para los protozoos. Se logró el aislamiento e identificación de una cepa de *Legionella* el mes de febrero. La cepa aislada se identificó como perteneciente a los serogrupos del 2-14. Se detectó presencia de amebas en estas muestras desde el mes de diciembre de 2016 hasta abril de 2017.



**Figura 5.6:** Cuantificación de heterótrofos totales, *E. coli*, *E. faecalis*, *Legionella spp.* y *Legionella pneumophila* desde abril de 2016 hasta abril de 2017, para la muestra de agua del secundario de la EDAR de Granollers.

### 5.1.7. Agua del tratamiento terciario-humedal de la EDAR de Granollers

El agua procedente del tratamiento secundario de la EDAR de Granollers es vertida a unos humedales donde pasa por un tratamiento terciario. La utilización de humedales es uno de los muchos tipos de sistemas naturales para el tratamiento y control de la contaminación en aguas residuales (Llagas and Guadalupe 2006). Los valores en referencia a la muestra del terciario-humedal de la EDAR de Granollers, los encontramos en la Tabla 5.7. y su representación en la Figura 5.7.

Para esta muestra podemos decir, que sus valores de ufc/ 100 mL para los heterótrofos totales se mantuvieron dentro de los  $10^5$  ufc, exceptuando la cuantificación del mes de diciembre de 2016, en la cual se obtuvieron  $1,99 \times 10^7$  ufc/ 100 mL, siendo este el valor más alto. El valor más bajo se registró el mes de noviembre de 2016 con  $1,06 \times 10^5$  ufc/ 100 mL de muestra.

La cuantificación para *E. coli* por qPCR tenemos que decir, que sólo hubo cuantificación el mes de diciembre de 2016, con una cuantificación de  $2,36 \times 10^2$  copias genómicas/ 100 mL.

En cuanto a la cuantificación por qPCR de *E. faecalis*, sólo hubo detecciones en dos meses, el mes de noviembre de 2016 con  $3,18 \times 10^4$  copias genómicas/ 100 mL y en el mes de enero de 2017, con una cuantificación de  $1,23 \times 10^2$  copias genómicas/ 100 mL.

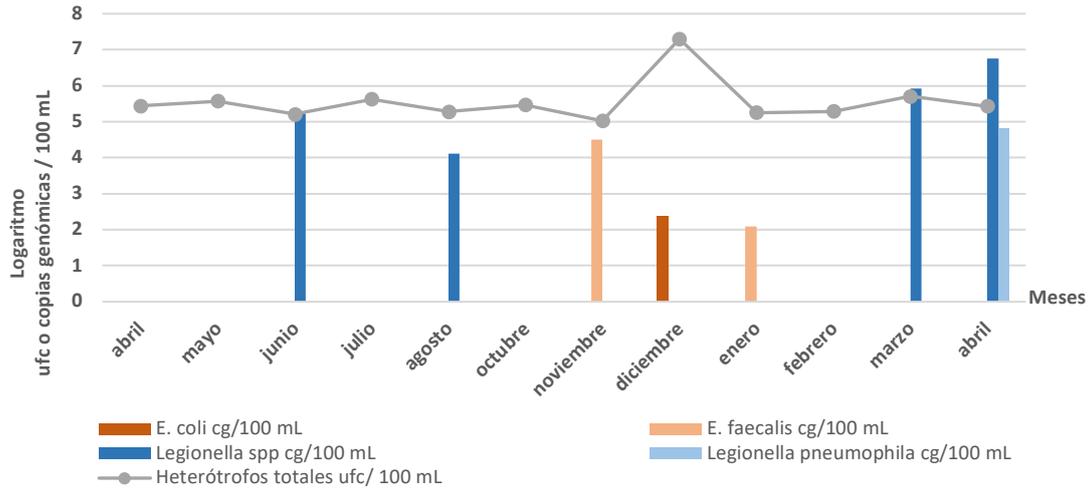
Las cuantificaciones con qPCR de *Legionella* spp. para esta muestra, estuvieron entre un  $10^4$  y  $10^6$  copias genómicas/ 100 mL, siendo el valor más bajo el del mes agosto de 2016 con  $1,31 \times 10^4$  copias genómicas/ 100 mL y el más alto el del mes de abril de 2017 con  $5,81 \times 10^6$  copias genómicas/ 100 mL.

En cuanto a la cuantificación por qPCR de *Legionella pneumophila* sólo se detectó para el mes de abril de 2017 una cantidad de  $6,63 \times 10^4$  copias genómicas/ 100 mL. El cultivo, aislamiento e identificación del género *Legionella* para este mes no se logró. No se detectó presencia de amebas en estas muestras.

**Tabla 5.7:** Cuantificación para la muestra de agua del terciario-humedales de la EDAR Granollers, para diferentes microorganismos.

Fecha	Het. Tot. ufc/100 mL	<i>E coli</i> cg/100 mL	<i>E faecalis</i> cg/100 mL	<i>Legionella</i> spp. cg/100 mL.	<i>L. pneum.</i> cg/100 mL	Amebas Pres./Aus.
24.4.16	$2,74 \times 10^5$	ND	ND	ND	No realizada	No realizada
18.5.16	$3,73 \times 10^5$	ND	ND	ND	ND	No realizada
6.6.16	$1,63 \times 10^5$	ND	ND	$1,68 \times 10^5$	ND	No realizada
6.7.16	$4,20 \times 10^5$	ND	ND	ND	ND	No realizada
29.8.16	$1,90 \times 10^5$	ND	ND	$1,31 \times 10^4$	ND	No realizada
19.10.16	$2,93 \times 10^5$	ND	ND	ND	No realizada	Ausencia
15.11.16	$1,06 \times 10^5$	ND	$3,18 \times 10^4$	ND	No realizada	Ausencia
16.12.16	$1,99 \times 10^7$	$2,36 \times 10^2$	ND	ND	No realizada	Ausencia
10.1.17	$1,80 \times 10^5$	ND	$1,23 \times 10^2$	ND	No realizada	Ausencia
7.2.17	$1,93 \times 10^5$	ND	ND	ND	No realizada	Ausencia
7.3.17	$5,06 \times 10^5$	ND	ND	$8,49 \times 10^5$	ND	Ausencia
4.4.17	$2,70 \times 10^5$	ND	ND	$5,81 \times 10^6$	$6,63 \times 10^4$	Ausencia
Med. Geom.	$3,63 \times 10^5$	$1,58 \times 10^0$	$3,54 \times 10^0$	$6,86 \times 10^1$	$9,21 \times 10^0$	----
Desv. Estn.	$5,64 \times 10^6$	$6,49 \times 10^1$	$8,77 \times 10^3$	$1,60 \times 10^6$	$2,65 \times 10^4$	----
% Pres./Aus.	100,0	16,7	16,7	33,3	8,3	0,0

**Het. Tot.:** heterótrofos totales; **L. pneum.:** *Legionella pneumophila*; **cg/100 mL.:** genoma por reacción en 100 mL; **ND:** no detectado; **Pres./Aus.:** presencia/ausencia; **Des. Est.:** desviación estándar; **Med. Geom.:** media geométrica. Las medias geométricas de *E. coli* y *E. faecalis* se han calculado sumando 1 en los valores no detectados.



**Figura 5.7:** Cuantificación de heterótrofos totales, *E. coli*, *E. faecalis*, *Legionella spp.* y *Legionella pneumophila* desde abril de 2016 hasta abril de 2017, para la muestra de terciario-humedales, EDAR Granollers.

### 5.1.8. Agua de salida del terciario de la EDAR de Granollers Filtrada-clorada

Una parte del agua de la EDAR de Granollers que pasa por el tratamiento terciario por humedales pasa a ser clorada y filtrada para generar agua regenerada que es utilizada para el riego.

En esta muestra de agua de la EDAR de Granollers, que ha sido clorada y filtrada, se registraron valores de ufc/ 100 mL entre un  $10^3$  y  $10^7$ , siendo el valor más bajo el detectado para el mes de junio de 2016 con  $6,45 \times 10^3$  ufc/ 100 mL, y el más alto de  $3,00 \times 10^7$  ufc/ 100 mL de muestra. Estos valores los podemos encontrar en la Tabla 5.8. y su representación en la Figura 5.8.

En esta muestra filtrada y clorada, la cuantificación de *E. coli* registró el valor más bajo en el mes de marzo de 2017 con  $1,19 \times 10^2$  copias genómicas/ 100 mL, y el más alto, en el mes de junio de 2016, con  $3,42 \times 10^3$  copias genómicas/ reacción en 100 mL.

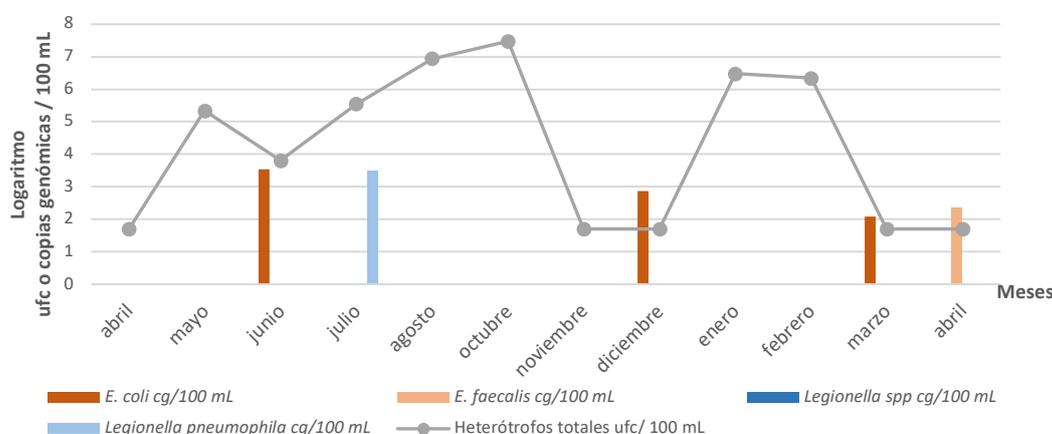
En el caso de la cuantificación por qPCR de *E. faecalis*, sólo hubo un valor de detección para cuantificación de  $2,18 \times 10^2$  copias genómicas/reacción en 100 mL para el mes de abril de 2017.

*Legionella* no registró valores de cuantificación por qPCR. No hubo ni aislamiento ni identificación a través del cultivo. No se detectó la presencia de amebas en estas muestras de agua.

**Tabla 5.8:** Cuantificación para la muestra de agua del terciario posterior al humedal (cloración y filtración) de la EDAR Granollers, para diferentes microorganismos.

Fecha	Het. Tot. ufc/100 mL	<i>E coli</i> cg/100 mL	<i>E faecalis</i> cg/100 mL	<i>Legionella spp.</i> cg/100 mL	<i>L. pneum.</i> cg/100 mL	Ameba Pres./Aus.
24.4.16	ND	ND	ND	ND	No realizada	No realizada
18.5.16	2,20x10 <sup>5</sup>	ND	ND	ND	ND	No realizada
6.6.16	6,45x10 <sup>3</sup>	3,42x10 <sup>3</sup>	ND	ND	ND	No realizada
6.7.16	3,50x10 <sup>5</sup>	ND	ND	ND	ND	No realizada
29.8.16	8,65x10 <sup>6</sup>	ND	ND	ND	No realizada	No realizada
19.10.16	3,00x10 <sup>7</sup>	ND	ND	ND	No realizada	No realizada
15.11.16	ND	ND	ND	ND	No realizada	No realizada
16.12.16	ND	7,25x10 <sup>2</sup>	ND	ND	No realizada	No realizada
10.1.17	3,00x10 <sup>6</sup>	ND	ND	ND	No realizada	No realizada
7.2.17	2,21x10 <sup>6</sup>	ND	ND	ND	No realizada	No realizada
7.3.17	ND	1,19x10 <sup>2</sup>	ND	ND	No realizada	No realizada
4.4.17	ND	ND	2,18x10 <sup>2</sup>	ND	No realizada	No realizada
Med. Geom.	6,49x10 <sup>3</sup>	5,08x10 <sup>0</sup>	1,57x10 <sup>0</sup>	ND	ND	----
Desv. Estn.	8,58x10 <sup>6</sup>	9,45x10 <sup>2</sup>	6,01x10 <sup>1</sup>	----	----	----
% Pres./Aus.	91,7	25,0	16,7	0,0	0,0	0,0

**Het. Tot.:** heterótrofos totales; ***L. pneum.*:** *Legionella pneumophila*; **cg/100 mL:** copias genómicas por reacción en 100 mL; **ND:** no detectado; **Pres./Aus.:** presencia/ausencia; **Des. Est.:** desviación estándar; **Med. Geom.:** media geométrica. Las medias geométricas de *E. coli* y *E. faecalis* se han calculado sumando 1 en los valores no detectados.



**Figura 5.8:** Cuantificación de heterótrofos totales, *E. coli*, *E. faecalis*, *Legionella spp.* y *Legionella pneumophila* desde abril de 2016 hasta abril de 2017, para la muestra de salida del humedal, filtrada y clorada.

### 5.1.9. Agua de lagunaje posterior al tratamiento de la EDAR de Granollers

En la Tabla 5.9. encontramos los valores referentes a la muestra de agua de un embalse posterior al tratamiento de la EDAR de Granollers que se utiliza para regadío de huertos. La representación de estos datos se encuentra en la Figura

5.9. Este punto de muestreo solo fue muestreado durante los 6 primeros muestreos del proyecto. En ella los valores para heterótrofos totales estuvieron entre  $10^4$  y  $10^5$  ufc/ 100 mL. El valor más bajo fue de  $4,70 \times 10^4$  ufc/ 100 mL, y el más alto de  $1,80 \times 10^6$ . El 100 % de las muestras tomadas para esta estación de muestreo fueron positivas a heterótrofos totales.

En el caso de los indicadores de contaminación fecal, podemos decir que sólo hubo cuantificación para *E. coli* durante la mitad de las muestras tomadas, un 50 % de presencia con valores entre  $10^2$  y  $10^3$  ufc/ 100 mL de muestra.

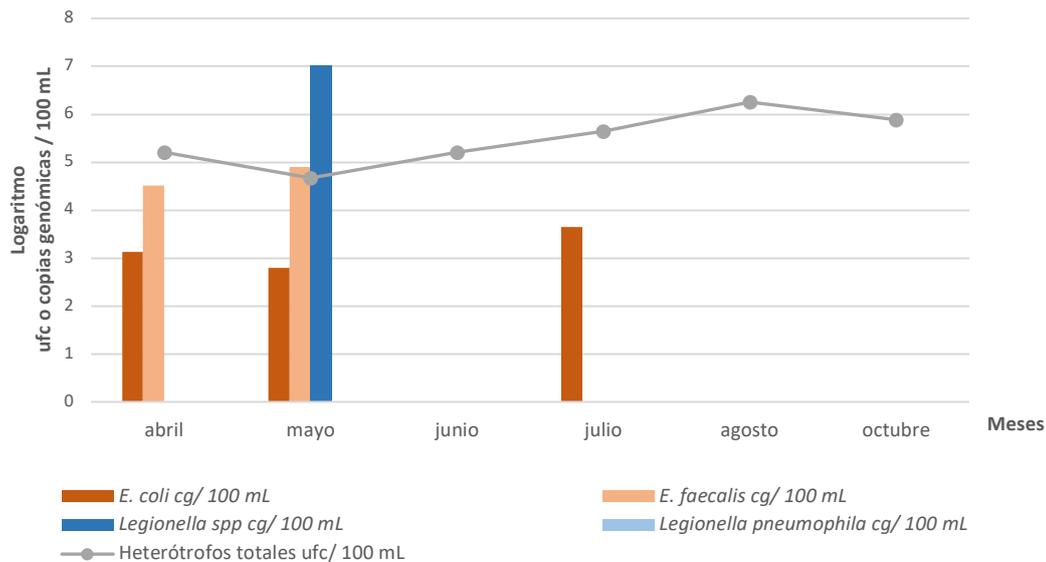
*E. faecalis* registró cuantificaciones con qPCR para el 33,3 % de las muestras. Estos valores se encontraban en los 4 logaritmos de copias genómicas/ 100 mL.

Para el género *Legionella* sólo hubo registro de cuantificación para el mes de mayo y sólo para la especie *Legionella* spp. No fue posible el aislamiento, identificación del género por medio del cultivo en placa. En esta muestra no se detectó la presencia de amebas de vida libre.

**Tabla 5.9:** Cuantificación para la muestra de agua del lagunaje posterior al tratamiento de la EDAR Granollers, para diferentes microorganismos.

Fecha	Het. Tot. ufc/100 mL	<i>E coli</i> cg/100 mL	<i>E faecalis</i> cg/100 mL	<i>Legionella</i> spp. cg/100 mL	<i>L. pneum.</i> cg/100 mL	Ameba Pres./Aus.
24.4.16	$1,60 \times 10^5$	$1,33 \times 10^3$	$3,30 \times 10^4$	ND	No realizada	No realizada
18.5.16	$4,70 \times 10^4$	$6,16 \times 10^2$	$7,87 \times 10^4$	$1,04 \times 10^7$	ND	No realizada
6.6.16	$1,61 \times 10^5$	ND	ND	ND	No realizada	No realizada
6.7.16	$4,40 \times 10^5$	$4,49 \times 10^3$	ND	ND	No realizada	No realizada
29.8.16	$1,80 \times 10^6$	ND	ND	ND	No realizada	No realizada
19.10.16	$7,65 \times 10^5$	ND	ND	ND	No realizada	Negativo
Med. Geom.	$3,00 \times 10^5$	$3,93 \times 10^1$	$3,71 \times 10^1$	$1,48 \times 10^1$	ND	ND
Desv. Estn.	$6,02 \times 10^5$	$1,60 \times 10^3$	$2,95 \times 10^4$	$3,88 \times 10^6$	----	----
% Pres./Aus.	100,0	50,0	33,3	16,7	0,0	0,0

**Het. Tot.:** heterótrofos totales; **L. pneum.:** *Legionella pneumophila*; **cg/100 mL.:** copias genómicas por reacción en 100 mL; **ND:** no detectado; **Pres./Aus.:** presencia/ausencia; **Des. Est.:** desviación estándar; **Med. Geom.:** media geométrica. Las medias geométricas de *E. coli* y *E. faecalis* se han calculado sumando 1 en los valores no detectados.



**Figura 5.9:** Cuantificación de heterótrofos totales, *E. coli*, *E. faecalis*, *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila* desde abril de 2016 hasta abril de 2017, para la muestra de lagunaje posterior al tratamiento de la EDAR de Granollers.

### 5.1.10. Comparativa de la calidad del agua de riego de los distintos puntos de muestreo

#### 5.1.10.1. Características fisicoquímicas de las diferentes puntos de muestreo

Se realizó el muestreo durante todo un año (abril de 2016 a abril 2017). Y se tomaron en el punto de muestreo parámetros fisicoquímicos como la turbidez, la conductividad y el pH del agua, para hacer la caracterización de cada muestra. El promedio anual de estos parámetros para cada muestra lo encontramos en la Tabla 5.10.

**Tabla 5.10:** Promedio de los parámetros fisicoquímicos medidos a las diferentes puntos analizadas.

Tipo de muestra	Agua del río Fluvià	Pozo en granja avícola	Pozo en granja porcina	Pozo almacenaje en balsa	Agua Residual EDAR Granollers	Secundario EDAR Granollers	Terciario-Humedal EDAR Granollers	Terciario cloración-filtración	Lagunaje Riego de huerto
<b>pH</b>	7,88	7,29	7,34	7,71	8,29	7,75	7,45	7,50	8,85
<b>Conductividad uS/cm2</b>	603,20	643,33	633,00	679,60	818,75	762,75	813,40	903,00	667,50
<b>Turbidez NTU</b>	6,05	3,42	3,72	9,72	212,00	59,67	16,60	9,12	70,18

Para realizar el estudio de estas muestras se utilizaron alícuotas directas para analizar algunos parámetros medidos como los heterótrofos totales y en otros se necesitó de la concentración de las muestras, por filtración (para las amebas de vida libre y para los cultivos de *Legionella*) o por floculación orgánica como fue el caso de los indicadores de contaminación fecal y también de *Legionella* spp.

Una vez se obtenía la muestra, se realizaba el cultivo en placa para la determinación y cuantificación de heterótrofos totales (ufc/mL) en PCA. En el caso de los indicadores de contaminación fecal, de *Legionella* spp. y de *Legionella pneumophila* se realizaron concentraciones para detectarlos y cuantificarlos. Con referencia a *Legionella*, se filtraba una alícuota de 1,5 L de las muestras de baja concentración de microorganismos o una muestra de 25 mL si la muestra era una muestra con una alta concentración de microorganismos. Los microorganismos obtenidos por esta filtración, se resuspendieron y se sembraron en BCYE/GVPC. Las colonias con morfología característica del género se le hacía la resiembra y la confirmación sembrando en agar sangre. Con estas colonias confirmadas, se procedió a identificar el serogrupo mediante la utilización del kit de aglutinación serológica, *Legionella* látex, de Oxoid. Para determinar la presencia o no de protozoos se realizó la filtración de 10 mL de la muestra de agua y se colocó el filtro en una placa con NNA, se incubó y luego se procedió a la detección por observación microscópica de quistes o trofozoitos.

En paralelo, se realizó la cuantificación de *E. coli*, *E. faecalis*, *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila* mediante qPCR partiendo de muestras concentradas por SMF, siguiendo el protocolo establecido en la sección 2.4.1. Una vez realizada la concentración, se realizó la extracción del ADN de los concentrados de las muestras mediante el kit de Qiagen (sección 2.2.3.), después de lo cual se procedió a cuantificar a través de las diferentes qPCRs, establecidas para el proyecto, específicas para los microorganismos estudiados (sección 2.2.3.1.).

#### **5.1.10.2. Características microbiológicas de los diferentes tipos de agua de riego**

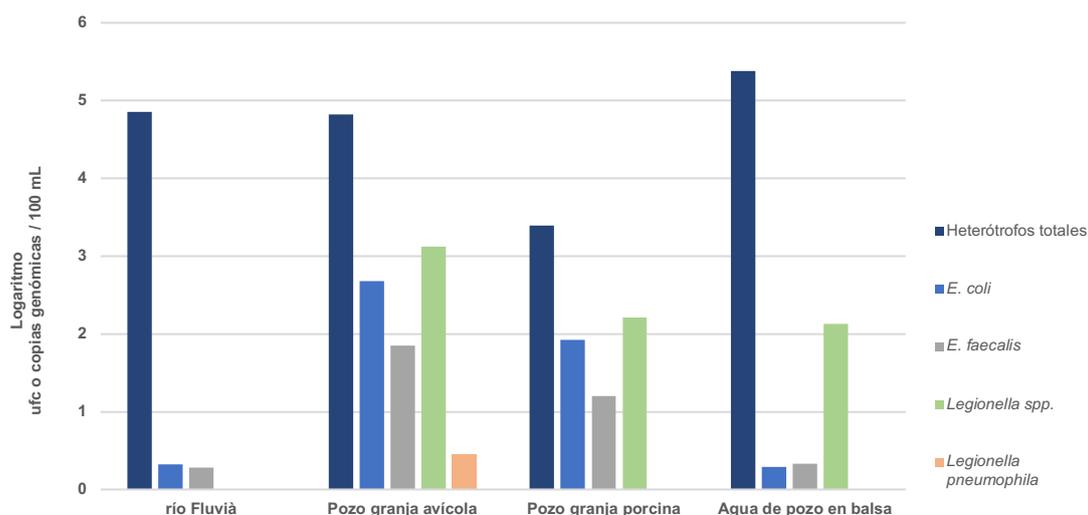
A continuación presentamos la tabla de valores (Tabla 5.11.) de las medias geométricas y su representación gráfica (Figuras 5.10. y 5.11.) obtenidas en los dos grupos de muestras de agua, las cuales fueron colectadas durante todo un año, para analizar la presencia de los diferentes microorganismos.

**Tabla 5.11:** Medias geométricas para los microorganismos estudiados.

Microorganismos	Het. Tot.	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneum.</i>
Muestra	ufc/100 mL	cg/100 mL	cg/100 mL	cg/100 mL	cg/100 mL
río Fluvià	7,13x10 <sup>4</sup> ± 3,08x10 <sup>5</sup>	2,12x10 <sup>0</sup> ± 1,37x10 <sup>2</sup>	1,92x10 <sup>0</sup> ± 2,18x10 <sup>1</sup>	1,00x10 <sup>0</sup> ± 0,0	1,00x10 <sup>0</sup> ± 0,0
Pozo granja avícola	6,68x10 <sup>4</sup> ± 1,49x10 <sup>5</sup>	4,77x10 <sup>2</sup> ± 1,15x10 <sup>6</sup>	7,02x10 <sup>1</sup> ± 1,72x10 <sup>5</sup>	1,32x10 <sup>3</sup> ± 6,85x10 <sup>5</sup>	2,84x10 <sup>0</sup> ± 1,97x10 <sup>2</sup>
Pozo granja porcina	6,56x10 <sup>3</sup> ± 8,56x10 <sup>4</sup>	8,31x10 <sup>1</sup> ± 5,82x10 <sup>3</sup>	1,58x10 <sup>1</sup> ± 5,54x10 <sup>4</sup>	1,63x10 <sup>2</sup> ± 5,18x10 <sup>4</sup>	1,00x10 <sup>0</sup> ± 0,0
Agua de pozo en balsa	2,42x10 <sup>5</sup> ± 5,25x10 <sup>5</sup>	1,94x10 <sup>0</sup> ± 8,03x10 <sup>2</sup>	2,12x10 <sup>0</sup> ± 2,31x10 <sup>3</sup>	1,34x10 <sup>2</sup> ± 1,19x10 <sup>6</sup>	1,00x10 <sup>0</sup> ± 0,0
Residual	4,80x10 <sup>8</sup> ± 8,87x10 <sup>8</sup>	8,23x10 <sup>6</sup> ± 8,69x10 <sup>6</sup>	3,25x10 <sup>5</sup> ± 3,80x10 <sup>5</sup>	9,65x10 <sup>5</sup> ± 3,37x10 <sup>7</sup>	1,13x10 <sup>5</sup> ± 1,15x10 <sup>7</sup>
Secundario	2,15x10 <sup>7</sup> ± 5,56x10 <sup>7</sup>	4,46x10 <sup>4</sup> ± 1,14x10 <sup>6</sup>	7,94x10 <sup>3</sup> ± 4,23x10 <sup>5</sup>	2,72x10 <sup>6</sup> ± 4,84x10 <sup>7</sup>	1,78x10 <sup>3</sup> ± 6,20x10 <sup>5</sup>
Terciario-humedal	3,63x10 <sup>5</sup> ± 5,64x10 <sup>6</sup>	1,58x10 <sup>0</sup> ± 6,49x10 <sup>1</sup>	3,54x10 <sup>0</sup> ± 8,77x10 <sup>3</sup>	6,86x10 <sup>1</sup> ± 1,60x10 <sup>6</sup>	9,21x10 <sup>0</sup> ± 2,65x10 <sup>4</sup>
Terciario Filtración-Cloración	6,49x10 <sup>3</sup> ± 8,58x10 <sup>6</sup>	5,08x10 <sup>0</sup> ± 9,45x10 <sup>2</sup>	1,57x10 <sup>0</sup> ± 6,01x10 <sup>1</sup>	2,27x10 <sup>0</sup> ± 5,20x10 <sup>3</sup>	1,00x10 <sup>0</sup> ± 0,0
Lagunaje	3,00x10 <sup>5</sup> ± 6,02x10 <sup>5</sup>	3,93x10 <sup>1</sup> ± 1,60x10 <sup>3</sup>	3,71x10 <sup>1</sup> ± 2,95x10 <sup>4</sup>	1,48x10 <sup>1</sup> ± 3,88x10 <sup>6</sup>	1,00x10 <sup>0</sup> ± 0,0

**Het. Tot.:** heterótrofos totales; **cg:** copias genómicas; **L. pneum.:** *Legionella pneumophila*. Las medias geométricas se calcularon sumando 1 en los valores que no se detectaron no se detectaron con las qPCRs de cada microorganismo.

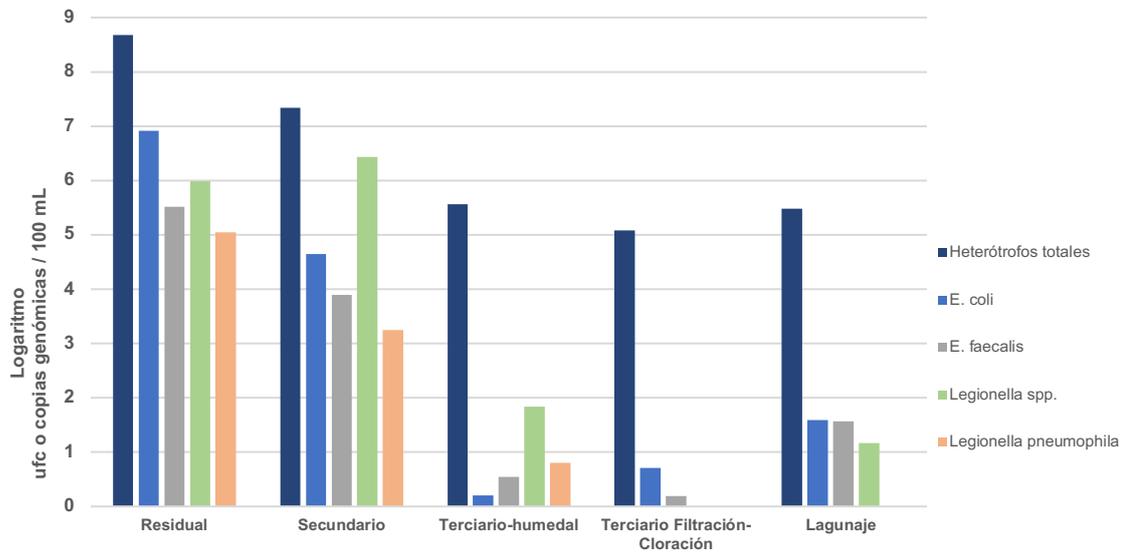
En cuanto a las aguas de acuíferos naturales (aguas de riego convencionales), tres de pozos y una de río podemos decir que el número de heterótrofos totales para el agua del río Fluvià, el agua de pozo de la granja avícola y la del agua de pozo depositada en una balsa se mantienen dentro de los 4,8 – 5,4 logaritmos, siendo el agua de pozo de la granja porcina la que mantiene el nivel de heterótrofos más bajo, con 3,4 logaritmos. Para el agua de pozo almacenada en una balsa y el agua del río Fluvià el conteo de los indicadores *E. coli* y *E. faecalis* es muy bajo, por debajo del medio logaritmo, sin embargo para el agua de pozo de la granja avícola los valores para los dos indicadores están en 2,7 y 1,8 respectivamente, y 1,9 y 1,2 para la granja porcina. En el caso del género *Legionella* sólo se registraron valores en la muestra de agua del pozo de la granja avícola, (representación en la Figura 5.10.).



**Figura 5.10:** Medias geométricas de la cuantificación de diferentes microorganismos en los puntos de muestreo de agua de acuíferos naturales.

En las aguas de riego no convencionales, aguas procedentes del afluyente de la EDAR de Granollers, del secundario de la planta de tratamiento de Granollers, del terciario-humedal de la EDAR de Granollers, del terciario filtrado-clorado efluente de la EDAR de Granollers y del terciario de la laguna de almacenamiento de la EDAR de Granollers. La diferencia entre los dos últimos puntos, aguas de diferentes puntos del terciario es la siguiente: en la primera el agua de salida de la EDAR pasa a un humedal para completar el proceso de depuración, y en el segundo el agua además de haber pasado por el humedal ha recibido tratamiento adicional de cloración y filtración. Sin embargo no toda el agua que sale de la planta recibe este tratamiento. En la Figura 5.11. (referentes a las aguas de los diferentes puntos de muestreos de la EDAR de Granollers) podemos observar que la cantidad inicial del heterótrofos totales, mas de 8 logaritmos, baja 3 logaritmos después del tratamiento en la EDAR de Granollers. Igual comportamiento de descenso en número, podemos observar para los indicadores *E. coli* y *E. faecalis*, para los cuales se nota un descenso de 5 logaritmos y medios durante el tratamiento inicial, el secundario y el terciario-humedal, manteniéndose por debajo del logaritmo en estas muestras y teniendo un ligero recrecimiento en la muestra de lagunaje de reserva para regadío de huertos de logaritmo y medio. En el caso de *Legionella*, vemos que en el agua

residual tienen números levemente mas bajos que en el secundario, desciende su conteo 4 logaritmos después del tratamiento terciario, y un logaritmo mas después de la filtración y cloración, para mostrar un incremento de medio logaritmo en la muestra procedente del lagunaje.



**Figura 5.11:** Medias geométricas de la cuantificación de diferentes microorganismos en los puntos de muestreo de la EDAR de Granollers.

## 6. Discusión



## 6. Discusión de resultados

El poder cuantificar los microorganismos a través de métodos de cultivos fue un paso muy importante en la Microbiología. El bajo coste, la facilidad de los métodos de cultivo (Johnson and Atheesha 2013), (Ramamurthy et al. 2014) y poder tener cultivo bacterianos puros, los convierte en uno de los métodos de análisis microbiológicos más utilizados. Sin embargo, no podemos obviar, que el cultivo de microorganismos es un método que involucra tiempo, en el caso de *Legionella* oscila entre 2 a 10 días, y en muchos casos medios de cultivos específicos y de enriquecimiento (Walker et al. 2017). Además y muy importante es el hecho que menos del 1% de los microorganismos presentes en muestras ambientales son cultivables (Riesenfeld, Schloss, and Handelsman 2004).

Hoy en día, frente a los retos que conlleva obtener mayor rapidez a la hora de emitir resultados y la necesidad de cuantificar aquellos microorganismos que no son cultivables (Wunderlich et al. 2016), nos ha llevado a la creciente necesidad de aplicar otro tipo de métodos de cuantificación, como lo son la citometría de flujo y la cuantificación por PCR en tiempo real o qPCR (Amini and Kraatz 2015).

La cuantificación de los microorganismos por metodologías no dependientes del cultivo, como el es caso del la qPCR, se ha extendido en los últimos años con gran éxito, principalmente por que es una técnica rápida a la hora de obtener resultados (Costa 2013). Sin embargo a la hora de evaluar estos resultados, como fiables o no, tenemos que tomar en cuenta diferentes aspectos. Algunos de los factores que pueden afectar la validez de los datos de cuantificación por qPCR son la calidad del ácido nucleico utilizado como plantilla, la eficiencia del proceso de extracción del ácido nucleico, la especificidad para un grupo

específico de los cebadores y sondas, la amplificación de ADN no viable, la variación del número de copias del gen y el número limitado de secuencias en la base de datos utilizada (Kim, Lim, and Lee 2013).

En primer lugar, la cuantificación a través de la qPCR conlleva la obtención del material genético presente en la muestra en un volumen conocido y a partir de este ácido nucleico llevar a cabo la cuantificación. Para verificar la eficiencia de la extracción que hemos realizado, lo que hacemos es cuantificar la cantidad de ADN a través de un espectrofotómetro (NanoDrop, ThermoFisher Scientific) en ng/  $\mu$ L y la pureza de este ácido nucleico, para lo cual se espera que el ratio 260/280 nm de valores entre 1,7 – 1,9. La estimación precisa de la concentración total de ADN es un componente crítico para la aplicación de técnicas moleculares como la qPCR. La estimación precisa de la concentración de masa de ADN puede lograrse cuando este basada en la concentración del número de copias siempre que el ADN este completamente caracterizado y en forma bicatenaria o que la amplificación este diseñada a partir de una de las dos cadenas complementarias (Bhat et al. 2010). Sin embargo tenemos que tomar en cuenta que las cuantificaciones por espectrofotometría pueden estar interferida por la presencia, en la muestra, de otros componentes como los nucleótidos, el ARN, ADN monocatenario, etc.

Una vez obtenida la muestra y habiendo construido la curva patrón a partir de ADN celular o partir de ADN sintetizado en un laboratorio (gBlocks), se procede a realizar la qPCR y evaluar diferentes aspectos que tienen importancia a la hora de aceptar los resultados o no, en otras palabras, evaluar la eficiencia de la qPCR. La eficiencia depende de: el ensayo, el rendimiento de la mezcla maestra

“master mix” y de la cantidad de muestra. Los valores de eficiencia aceptables están dentro del rango de 90 – 110 %.

Para el análisis cuantitativo de los resultados debemos tener claro que, los NTC (Non template Control) debe resultar con valores de CT (que es la intercepción entre la curva de amplificación y la línea de “Threshold”) indeterminados o con valores inferiores al límite de cuantificación de cada qPCR. Para evaluar el desempeño de la reacción de la qPCR, establecer los límites de cuantificación y verificar el estado del ADN utilizado como base para la curva patrón, se tiene que observar la representación logarítmica de las concentración del estándar frente al CT, en otras palabras, la Curva estándar. De este tipo de gráfico podemos obtener valores como el coeficiente de determinación  $R^2$  (que debe ser lo mas cercano a 1, ( $>0.99$ ) nos indica que tan bueno es un valor para predecir otro), el % de eficiencia (que puede ir entre 90-110%, valores superiores a estos nos indican inhibición y los valores por debajo de este rango nos pueden indicar concentraciones de reactivos insuficientes, cuando las temperaturas de “melting” de los cebadores tienen diferencias mayores a 5 °C entre sí, o temperaturas en el termociclador por debajo de lo optimo), la pendiente (la cual debe ser de  $-3,3 \pm 10\%$ , o sea que el rango esta entre - 3,58 a - 3,10). En el caso de las qPCRs que se utilizaron en los diferentes ensayos de este estudio, podemos decir que sus valores para  $R^2$ , % de eficiencia y la pendiente están dentro de los rangos aceptables (esto lo podemos observar en la Tabla 3.1), por lo cual consideramos los valores de cuantificación obtenidos por estas qPCRs como valores válidos.

Las qPCR de *E. coli* y *E. faecalis* utilizadas en este trabajo, son dos qPCR que no se habían implementado con anterioridad. Estas qPCR se basan en las

qPCRs publicadas en los artículos de Khan et al. (2007) y Shannon et al. (2007) con modificaciones realizadas por el grupo de investigación dirigido por el Dr. M. Seidel de la Universidad Técnica de Múnich, pero que no se habían realizado en el laboratorio. Cuando realizamos las curvas estándar de las dos qPCRs determinamos el límite de detección de estas qPCRs esta entre  $10^1$  y  $10^8$  copias genómicas por reacción. La curva estándar diseñada se basa en diluciones de ADN procedentes de cultivos celulares en fase exponencial. En este trabajo paralelamente diseñamos unos fragmentos de doble cadena gBlocks para realizar un estándar alternativo, esta decisión la tomamos como una manera de buscar una forma de poder estandarizar la cuantificación a través de la técnica molecular de qPCR, ya que como Nielsen et al. exponen, hacen falta estándares que nos permitan comparar los resultados obtenidos de diferentes laboratorio o entre diferentes métodos de cuantificación (Nielsen et al. 2008). Los materiales de referencias de ADN para la concentración masiva de ADN deben contar con una incertidumbre de medición estimada y rastreable para para cualquier sistema de medidas, lo cual es difícil con la forma como se realizan en la actualidad. La estandarización adecuada de una qPCR es necesaria ya que sin esta, los resultados de la qPCR pueden no tener relación entre la cantidad de ácidos nucleicos que había al inicio de la reacción y la concentración final del producto amplificado (Aguilera et al. 2014).

La validación de las qPCR de *E. coli* y *E. faecalis* se realizó con una comparativa entre la cuantificación de un cultivo celular a concentraciones conocidas “versus” las cuantificaciones para esas mismas concentraciones a través de sus respectivas qPCRs (medido utilizando un estándar a partir de células y otro, elaborado a partir de gBlocks) y las cuantificaciones hechas mediante el

citómetro de flujo. Para el caso de *E. coli*, al observar los valores obtenidos podemos decir que existe una elevada correlación entre los valores de cuantificación obtenidos por citometría de flujo y cultivo en placa, siendo está de 0,96. Que cuando comparamos los valores de cuantificación obtenidos entre la citometría de flujo y la cuantificación por qPCR con curva patrón elaborada de células, el recuento es mayor en 1 logaritmo para la cuantificación por qPCR con estándar elaborado a partir de células, y de 2 logaritmos cuando la cuantificación a comparar con citometría de flujo era la cuantificación por qPCR del gBlock. Otros autores encuentra cuantificaciones superiores para la qPCR comparada con métodos más convencionales como el cultivo en placa (Jímenez 2013). El coeficiente de correlación entre las mediciones por citometría y las mediciones por qPCR con curva patrón en base a células es de 0,98, y el comparativo con la qPCR con curva patrón de gBlocks fue de 0,99.

En el caso de las comparaciones cuantitativas entre las mediciones hechas por citometría de flujo, cultivo en placa, y qPCRs para *E. faecalis* podemos decir que los valores encontrados para qPCR cuyo estándar fue elaborado a partir de células es superior a las cuantificaciones realizadas por citometría y por cultivo en placa en 0,5 logaritmos. Sin embargo en esta comparativa los valores encontrados para los diferentes tipos de cuantificaciones fueron parecidos, manteniéndose dentro del mismo logaritmo. Al analizar los coeficientes de correlación de la comparativa para las cuantificaciones para *E. faecalis* tenemos que entre citometría y cultivo es de 0,89, entre citometría y qPCR con estándar de células es de 0,90, y la más baja correlación se mostró entre la comparación entre citometría y qPCR con estándar de gBlocks.

Estas diferencias de cuantificación molecular, para las qPCR de *E. coli* y *E. faecalis*, basadas en ADN concentrado y cuantificado por espectrofotometría puede estar interferida por la presencia de nucleótidos, ARN, ADN monocatenario e impurezas como proteínas y fenoles. Este hecho es una posible explicación a las diferencias existentes entre la qPCR con estándar a base de ADN celular con respecto a la qPCR con estándar a base de un segmento gBlocks de ADN (M. J. Holden et al. 2009). En el caso de la cuantificación de *E. coli*, su qPCR usa como diana el fragmento ITS del 16S rRNA, también puede estar afectado por la variabilidad que presenta el 16S rRNA en cuanto al número de copias que hay de este, incluso en cuanto a la variación de secuencias dentro de taxones estrechamente relacionados o dentro de un genoma, solo una minoría de genomas bacterianos alberga copias idénticas del gen 16S rDNA, y la diversidad de secuencias aumenta al aumentar el número de copias (Větrovský and Baldrian 2013). (E. P. Holden et al. 1984). Con referencia a los hallazgos encontrados para *E. faecalis* podemos decir que los problemas asociados a las diferencias en las secuencias de nucleótidos dentro de la misma especie puede ser un factor que dificulte las detecciones y cuantificaciones de este microorganismo indicador de contaminación fecal. Al realizar un BLAST de nucleótidos con la secuencia de cebadores y sondas utilizados para este microorganismo nos encontramos que la terminación de la misma está en el límite señalado en le GenBank para el gene groES, lo que podría ser una fuente de variación en cuanto a la cuantificación. Santo Domingo, J., Sieftring, S. y Haugland, R. reportaron problemas similares debido a la pobre homología en las secuencias de cebadores y sondas utilizados para cuantificar y detectar *E. faecalis* en agua (SantoDomingo, Sieftring, and Haugland 2003).

El trabajar con diferentes tipos de muestras de agua, en algunas ocasiones nos puede llevar a encontrarnos con muestras de agua con bajas concentraciones de determinados microorganismos, lo que hace muy difícil su cuantificación. Este tipo de matrices de agua hace necesario la aplicación de uno o varios métodos de concentración que nos permitan controlar los posibles contaminantes de origen microbiano en ellas, ya sea a través de métodos de cultivo o a través de métodos moleculares una vez concentrados los microorganismos.

Nuestros resultados nos muestran que la floculación orgánica con leche desnatada como un método de concentración aplicable a la concentración de bacterias, resultados similares han sido encontrados por Zhang, Y. et al. (2012) quienes indican que la floculación unida a la filtración y la centrifugación es una forma efectiva de concentrar microorganismos que se encuentran en baja concentración en las aguas (Zhang et al. 2012).

En este trabajo se abordaron diferentes métodos de cuantificación y de concentración, tratando de buscar aquellos que nos permitieran obtener mejores valores de cuantificación y de concentración en diferentes tipos de agua. Caracterizamos 9 tipos de muestras de agua, y validamos el uso de dos qPCR mediante la comparación con otras metodologías más convencionales.

La cuantificación de microorganismos indicadores de contaminación fecal en fuentes de agua nos indican de que en estas aguas podríamos encontrar patógenos de origen fecal (Arcos Pulido et al. 2005). Sin embargo, si las fuentes de agua tienen baja densidad de microorganismos hace necesaria la concentración de estos antes de ser cuantificados. Una vez hayan sido concentrados los microorganismos presentes en una fuente de agua, se puede

evaluar su número a través de técnicas moleculares. Para evaluar molecularmente una muestra de agua, debemos ser capaces de encontrar un método de extracción que nos permitan obtener extracciones de los ADN de los microorganismos presentes en una muestra de manera eficiente. Por ello evaluamos dos métodos de extracción de ADN, el kit de extracción de MoBio y el kit de extracción de Qiagen.

Los resultados nos muestran que el kit de MoBio es mas eficiente al extraer el ADN de cultivos puros, pero su eficiencia baja cuando se trata de extraer el ADN de muestras que han sido concentradas por SMF. Esta es la razón por la cual optamos por utilizar como método para las extracciones del resto del trabajo de investigación el kit de extracción de Qiagen.

La floculación orgánica con leche desnatada es un método de concentración que ha sido aplicada por autores como Bofill-Mas et al. (2011) y Calgua et al. (2008), para la concentración de microorganismos, en la mayoría de los casos, virus (Bofill-mas et al. 2013)(Calgua et al. 2008). Sin embargo, con este método de concentración no se había valorado la eficacia de este a la hora de ser utilizado como un método para la recuperación de células viables cultivables. La floculación orgánica con leche desnatada es un método de concentración en el cual se somete a los microorganismos a un ambiente altamente acidificado por un largo período de tiempo. Aunque la mayor parte de las bacterias son neutrófilos (pH entre 5,5 y 8), y la mayoría puede crecer en un margen más o menos amplio de pH (alrededor de un pH óptimo), los cambios bruscos de pH pueden ser lesivos para las bacterias, ya que estos cambios afectan la membrana, el transporte de solutos e inhibiendo enzimas, detienen el

crecimiento bacteriano, e incluso puede causar la muerte bacteriana (Yang, Swem, and Li 2003).

La influencia de este factor, el pH, en la cuantificación de células viables cultivables posterior al proceso de concentración lo podemos apreciar en el estudio de la recuperación de las células viables-cultivables posterior al proceso de floculación, ya que en el mismo, partiendo de una población bacteriana que oscilaba entre un  $10^7$ -  $10^8$  ufc/mL, al finalizar la concentración la cantidad de bacterias viables-cultivables se reducía a un  $10^4$ . Nosotros encontramos que el porcentaje de viables-cultivables recuperados con el método de concentración orgánica con leche desnatada es del 0,13% en el caso de *Bacillus cereus* y de 0,02% en el caso de *E. coli*. Este hecho, apoya lo encontrado por Su et al. quienes en 2013 y Ramamurthy et al. en 2014 que aseguraban que bacterias como *Escherichia coli* puede entrar en un estado viable pero no cultivable (VBNC) debido a las condiciones ambientales como una medida de supervivencia. (Ramamurthy et al. 2014) (Su et al. 2013) (Li et al. 2014).

En cuanto a los valores registrados en la concentración de microorganismos utilizando la filtración con una columna monolítica de adsorción podemos decir que los valores de recuperación que nosotros registramos son menores a los expresados por autores como PesKoller, C., Niessner, R. y Seidel, M., quienes señalan recuperación es superiores al 97 % para las bacterias inoculadas en sus ensayos. (Peskoller, Niessner, and Seidel 2009).

A nivel mundial, la mayor parte del agua utilizable por los seres vivos es utilizada en diferentes actividades, una de ellas es la agricultura en la cual se utiliza mas del 40% del agua dulce con la que disponemos en sus regadíos. Sin embargo,

debido a la mayor demanda y consecuentemente a la creciente escasez de agua a nivel mundial, nos hemos visto en la necesidad de buscar alternativas que nos permitan obtener nuevas fuentes de agua. Hoy en día, más del 10% de los cultivos del mundo utilizan aguas residuales para el riego de sus productos, y estas no necesariamente han sido tratadas (Silva, Torres, and Madera 2008). Sin embargo se promueven cada vez más el uso de aguas regeneradas para este propósito. La mayor parte del agua regenerada (>70%) que se produce se utiliza en el riego, ya sea en agricultura o en la jardinería (Becerra-Castro et al. 2015)(Iglesias et al. 2010) y aunque son muchos los beneficios de su uso, no deja de representar riesgos tanto para la salud como para los ecosistemas (Becerra-Castro et al. 2015).

En este trabajo hemos analizado la contaminación mediante técnicas moleculares de aguas de riego concentradas con floculación orgánica con leche desnatada y se ha determinado la contaminación de aguas de riego convencionales, como el agua de río y de freáticos, y de aguas de riego no convencionales como lo son las aguas residuales y regeneradas después de haber sido tratadas en la EDAR y la ERA.

Se ha promocionado el uso de las aguas regeneradas como una fuente de agua sostenible, ya que es sanitariamente segura para los humanos y el medio ambiente. Sin embargo esta sostenibilidad hay que monitorearla a través del control de calidad de estas aguas.

El control de la contaminación microbiana de las diferentes fuentes de agua a nivel mundial, es un tema que ha tenido y sigue teniendo relevante importancia, sobre todo porque al realizarlo, la aparición de los indicadores de contaminación

fecal en las mismas, nos indica que en estas aguas encontraremos también microorganismos patógenos de origen fecal, lo que envuelve riesgos para la seguridad de las personas por la posibilidad de adquisición de enfermedades a través del uso o el consumo de esta agua (Johnson and Atheesha 2013).

En nuestro estudio, no sólo hemos evaluado la calidad microbiológica de las aguas residuales tratadas para alcanzar la regeneración, sino también la calidad de acuíferos naturales, que pueden servir como fuente de agua de riego o para el consumo de animales. Al asegurarnos de que la calidad de las aguas regeneradas, producto de las plantas de tratamiento de aguas residuales, reúnen los requisitos para ser un agua segura para el medio ambiente y para la población, nos estamos asegurando de bajar los riesgo de enfermedades causadas por el uso y consumo de productos que han sido expuestos a aguas sanitariamente peligrosas y además, nos aseguramos de mantener los afluentes naturales con baja contaminación, lo que ayudará al proceso natural de depuración de las aguas que ocurre en estas fuentes sea efectivo, y por ende nos aseguramos de que estos mismos recursos sean reutilizables (Hanjra et al. 2012). Es por ello, que realizar estudios de este tipo son de importancia, no solo para la salud ambiental y humana, sino como actores importantes a la hora de bajar las pérdidas económicas que producen anualmente la aparición de brotes de enfermedades ligadas a la salubridad de las aguas de riego (UNESCO-WWDR 2016).

La presencia de indicadores de contaminación fecal como *E. coli* es un indicativo de contaminación fecal relativamente reciente en una muestra de agua, como podemos ver en el agua de río los niveles de este indicador es del 25 % en la

muestra con cantidades inferiores a los 3 logaritmos, lo que es un indicativo de la baja contaminación fecal de las aguas de este río. Al igual que *E. faecalis* los niveles registrados son bajos, de un 16,7 % lo que hace esta fuente de agua adecuada para la irrigación. El agua de pozo almacenada en una balsa muestra baja cuantificación de indicadores de contaminación fecal como la *E. coli* y *E. faecalis* con un valor del 8 %, lo que se ajusta a lo esperado para una fuente de agua subterránea. Sin embargo, en las otras dos muestras de agua de pozo, la del pozo de una granja avícola y la del pozo de una granja porcina, mostraron niveles para los indicadores entre 1 y 3 logaritmos, con porcentajes superiores al 50 %. Posiblemente esta contaminación procede de la escorrentía de los animales de la granja. Además en esta muestra se registró la presencia de la especie *Legionella* spp. este microorganismo es propio de reservorios de agua natural como este (Fields 1996). De estas, sólo fue positiva a *Legionella pneumophila* la muestra del agua de pozo en una granja avícola. En algunos casos los valores encontrados del género *Legionella* están fuera de los permitidos para el agua de riego. En las aguas de pozo encontramos valores por encima de los 2 logaritmos, lo que puede estar asociado a la presencia de amebas de vida libre (Thomas et al. 2010) (Molmeret et al. 2005) y factores que promueven la proliferación del género, como lo son la disponibilidad de hierro debido a las tuberías, y la presencia de biofilms en las mismas (Declerck et al. 2007) (Serrano-Suárez et al. 2013) (Cervero Aragón 2013). Para estas muestras se detectaron amebas entre el 15 y el 34 %, excepto en el agua de pozo almacenada en una balsa en donde no se detectaron amebas.

Refiriéndonos a las aguas de riego convencionales procedentes de acuíferos naturales, podemos decir que sus parámetros fisicoquímicos como la turbidez

de estas aguas esta dentro de los límites admitidos según la normativa RD 1620/2007 para el riego urbanos, calidad 1.2 (servicios), riego agrícola, uso industrial en aguas de proceso y limpieza (excepto en industria alimentaria y torres de refrigeración) y demás usos. Por los valores de conductividad, podemos decir que son aguas poco salobres, ya que están en el rango de 250-750  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . El monitoreo de la turbidez y la conductividad en los diferentes efluentes de agua que estén ligados con contaminación, nos pueden brindar una idea del grado de contaminantes químicos que estas aguas poseen ya que la conductividad está correlacionada con el nitrógeno total presente en la muestra, y la turbidez con los solidos disueltos (Bersinger et al. 2015). La turbidez, asociada a la presencia de materia orgánica en el agua utilizada para el riego, puede afectar la capacidad de retención de agua del suelo y la estabilidad de los agregados que hay en los mismos y que determinan la biodiversidad de microorganismos que encontramos en el suelo de cultivo (Becerra-Castro et al. 2015) (Gutiérrez-Cacciabue, Cid, and Rajal 2016) (Rojas 2002). En el caso del grupo de aguas de acuíferos naturales, la turbidez está dentro de los límites admitidos en el RD 1620/2007 para ser fuente de los diferentes tipos de usos, exceptuando el uso urbano (calidad residencial), el uso industrial (torres de refrigeración), el uso ambiental (inyección directas a acuíferos). La turbidez que señalamos debido a la presencia de algas microscópicas en la muestras depositadas en reservorios abiertas (balsas, lagunas, humedales) fue señalada también por Jjemba, P. et al. (2010), quienes advierten que en estos sistemas abiertos la calidad del agua se redujo al aumentar la turbidez, ya que esta se acumula al final del sistema de distribución (Jjemba et al. 2010).

La presencia de altos números de microorganismos, indicadores fecales en las aguas que son utilizadas para el riego es un aspecto a considerar y tomar en cuenta a la hora de utilizarlos en riego de productos que van a ser consumidos sin ser procesados, ya que para aumentar el valor económico de estos productos, es una practica ampliamente difundida el regar estos productos dentro de los tres días anteriores a su cosecha lo que disminuye la eliminación que se pueda dar de los microorganismos por la exposición de estos a la radiación UV producto del Sol. La presencia de altos valores de turbidez también colabora con la resistencia de los microorganismos a los mecanismos de desinfección (Barrera-Escorcía et al. 2013)(Bartram et al. 2003).

En cuanto al pH registrado para estas muestras podemos decir que está entre 7,2 y 7,9 aunque estos pH son óptimos para la presencia de microorganismos, están dentro de los límites exigidos en el agua que se utiliza para el riego (Silva, Torres, and Madera 2008) (Lorenzo et al. 2009). Además los límites esperados de pH para aguas superficiales van de 6,0 – 8,5. Las aguas utilizadas para el riego con pH neutros mantienen la diversidad microbiana de los suelos regados con estas aguas.

Aunque en las legislaciones que regulan el uso de aguas regeneradas para el riego, el pH del agua no es un factor determinante ni restrictivo, consideramos que por las investigaciones que se han realizado en torno a este parámetro debería tomarse en cuenta a la hora de elaborar normativas para el uso de las aguas regeneradas y los sitios en los que serán vertidas estas aguas (Fierer and Jackson 2006) además las investigaciones sugieren que los cambios ocasionados por el pH de las aguas vertidas a los suelos, es observable después

de años de su uso (Becerra-Castro et al. 2015). Los valores encontrados para pH y conductividad de estas aguas se ajustan a los valores esperados a fuentes superficiales de agua (Casierra-Martínez et al. 2017).

Las aguas de riego no convencionales analizadas en este trabajo pertenecen a diferentes puntos de muestreo pertenecientes a la EDAR de Granollers, la turbidez tiende a disminuir durante los pasos de tratamiento primario, secundario y terciario, pero al llegar a la laguna de embalse posterior a la filtración y la cloración, se vuelve a subir a los niveles fuera de los estipulados por la normativa para aguas de este tipo que van a ser utilizadas en el riego de huertos, esto posiblemente se deba a la presencia de algas microscópicas en suspensión en la muestra. Este es un factor a tomar en cuenta a la hora de evaluar la calidad de estas aguas para el riego, ya que la turbidez va ligada a la cantidad de materia orgánica en el agua, que en la mayoría de los casos estudiados resulto beneficiosa, pero que en otros podría no serlo, ya que puede influir en la retención de agua del suelo y en la biodiversidad microbiana propia del suelo, propiciando la proliferación de otros microorganismos ajenos a la ecología del suelo a largo plazo (Becerra-Castro et al. 2015)(Gutiérrez-Cacciabue, Cid, and Rajal 2016) (Rojas 2002).

En cuanto a nuestros resultados, la turbidez que señalamos tanto en algunas de las muestras de agua convencionales, como la muestra de agua del pozo que se almacena en una balsa, como la presentada por las aguas de riego no convencionales reducen la calidad del agua, ya que estas partículas suelen acumularse en los sistemas de riego y obstruirlos. La turbidez producida por las algas microscópicas también fue señalada por Jjemba, P. et al. (2010), quienes

advierten que en estos sistemas abiertos la calidad del agua se redujo al aumentar la turbidez, ya que esta se acumula al final del sistema de distribución (Jjemba et al. 2010).

En cuanto al pH se mantiene dentro de los rangos de neutralidad que según estudios son los que promueven mayor biodiversidad del suelo en el que se vierten las aguas (Silva, Torres, and Madera 2008) (Lorenzo et al. 2009).

Para el conteo de heterótrofos totales, se observó una alta reducción en su cuantificación, bajando de estar en concentraciones de 8 logaritmos o más, a estar en concentraciones levemente superiores a los 5 logaritmos. Estos resultados son similares a los encontrados por M. Alam (2014) y Bhattacharya, S. K. (2004) quienes señalan que después del tratamiento de las aguas residuales a utilizar en el riego de plantas el conteo de heterótrofos totales se reduce mayormente en aguas altamente contaminadas, que en aquellas que tienen baja contaminación (Alam 2014)(Bhattacharya 2004).

La enumeración de microorganismos indicadores de contaminación fecal en los diferentes puntos de muestreo dentro del proceso de tratamiento de la EDAR de Granollers, podemos decir que la cuantificación de estos indicadores disminuyó de 6,9 logaritmos para *E. coli* y 5,5 para *E. faecalis* a 1,5 logaritmos para ambos indicadores, lo que sitúa estas aguas como utilizables para usos agrícolas, calidad 2.2 (riego de productos agrícolas cuyo consumo no es en fresco, o para riego de pasto para animales, acuicultura) y 2.3 (riego de cultivos leñosos, de flores ornamentales sin contacto directo con el producto, cultivos industriales no alimentarios) y para usos industriales, calidad 3.1 (a, b y c), para usos recreativos, calidad 4.2 (aguas de estanques y ornamentales), usos ambientales,

calidad 5.1 y 5.3 (recarga de acuíferos por percolación localizada a través del terreno y riego de bosques, servicios no accesibles al público y silvicultura, respectivamente). En el caso de los heterótrofos totales se observa una disminución de 3 logaritmos durante el proceso de depuración del agua residual. La observación de un leve recrecimiento en la laguna posterior al tratamiento es coincide con lo encontrado por Fernandez-Cassi et al. (2016) quienes reportaron cuantificaciones de heterótrofos totales similares en la entrada y salida del sistema de tratamiento de aguas residuales por lagunaje.

En cuanto a patógenos como *Legionella*, también observamos una reducción en su número. Para especies *Legionella* spp. observamos una reducción de 4,5 logaritmos, en paralelo, observamos que la cuantificación de *Legionella pneumophila* disminuye 4,2 logaritmos también. Una disminución mayor a la reportada por Fernandez-Cassi et al. (2016). Sin embargo, encontramos los mismos problemas a la hora de la cuantificación de este género a través de métodos de cultivo, ya que en las placas de BCYE/GVPC había crecimiento de una gran cantidad de microorganismos haciendo difícil contar las colonias presuntivas de *Legionella*. Este problema lo encontramos tanto en las placas sembradas directas, como en las que recibieron tratamiento ácido, tratamiento de calor y tratamiento calor-ácido. Por estas razones sólo tenemos aislamientos positivos de *Legionella pneumophila* sg. 1 para la muestra de agua residual y *Legionella pneumophila* sg. 2-14 para la muestra de agua del secundario. La identificación de estos aislamientos se realizó mediante el uso del kit de aglutinación serológica posterior a la confirmación por crecimiento de las colonias aisladas en BCYE mas no en Agar sangre. Los aislamientos positivos para *Legionella* son aislamientos de las muestras de enero y febrero de 2016.

Estos resultados pueden deberse a que el crecimiento de *Legionella* puede ser inhibido por la presencia de otros organismos en el agar selectivo. En nuestros resultados también observamos recrecimiento de este género en las muestras tomadas de la laguna posterior al tratamiento terciario de filtración y cloración, lo que es consecuente con lo encontrado por otros autores, que atribuyen este tipo de situaciones a que *Legionella* es capaz de sobrevivir al tratamiento de cloración, y las condiciones de presencia de amebas de vida libre (Dietersdorfer et al. 2016) (Thomas et al. 2004) y algunos factores, como la disponibilidad de determinados iones, ausencia o presencia de otros microorganismos (Declerck et al. 2007) (Serrano-Suárez et al. 2013) (Cervero Aragón 2013) (Carlos et al. 2013).

*Legionella* es uno de los patógenos nombrados dentro de la norma para el uso de aguas de riego (RD 1620/2007 en España). Los valores obtenidos de este microorganismo en las aguas tratadas están dentro de los límites permitidos por la normativa, sin embargo, al poder cuantificar *Legionella* spp. en diferentes fuentes de agua hay que decir que los riesgos aumentan en el caso de que la utilización de estas aguas para el riego sea a través del método de riego por aspersión (Cervero Aragón 2013)(Borella et al. 2005)(Fernandez-Cassi et al. 2016).

Wéry et al. (2008) señalan que los patógenos sobreviven mejor que los indicadores de contaminación fecal como *E. coli* a los procesos de tratamiento de aguas residuales (Wéry et al. 2008) lo que corrobora nuestros datos al observar un rápido descenso en la concentración de indicadores de contaminación fecal durante los puntos de tratamiento de agua residual de la

EDAR de Granollers, y la persistencia de *Legionella*, en el terciario-humedal, posterior al proceso de tratamiento con valores ligeramente superiores a los registrados para los indicadores. Jjemba, P. et al. (2010) también señala que esta disminución es debido a la pérdida de desinfectante residual y a los altos niveles de carbono orgánico asimilable (Jjemba et al. 2010). Otros autores como Caicedo, C. et al. señalan que la persistencia y supervivencia de *Legionella* spp. está asociada a la presencia de protozoo en estos sistemas, lo que corrobora los resultados encontrados por nosotros en este estudio (Caicedo et al. 2016) (García et al. 2013) (E. P. Holden et al. 1984)(Mengue et al. 2016).

En nuestro estudio, no sólo hemos evaluado la calidad microbiológica de las aguas residuales tratadas para alcanzar la regeneración, sino también la calidad de acuíferos naturales, que pueden servir como fuente de agua de riego o para el consumo de animales. Al asegurarnos de que la calidad de las aguas regeneradas, producto de las plantas de tratamiento de aguas residuales, reúnen los requisitos para ser un agua segura para el medio ambiente y para la población, nos estamos asegurando de bajar los riesgos de enfermedades causadas por el uso y consumo de productos que han sido expuestos a aguas sanitariamente peligrosas y además, nos aseguramos de mantener los afluentes naturales con baja contaminación, lo que ayudará al proceso natural de depuración de las aguas que ocurre en estas fuentes sea efectivo, y por ende nos aseguramos de que estos mismos recursos sean reutilizables (Hanjra et al. 2012). Es por ello, que realizar estudios de este tipo son de importancia, no solo para la salud ambiental y humana, sino como actores importantes a la hora de bajar las pérdidas económicas que producen anualmente la aparición de brotes

de enfermedades ligadas a la salubridad de las aguas de riego (UNESCO-WWDR 2016).

Los hallazgos encontrados en nuestro estudio nos indican que existe la necesidad de desarrollar mejores prácticas de manejo para el agua regenerada, ya que en las etapas finales de los procesos de existe la probabilidad de recrecimiento bacteriano.

Las aguas residuales y de salida del secundario, tal y como era de esperar llevan una elevada carga de bacterias patógenas por lo que no deberían ser utilizadas como agua de riego.

# 7. Conclusiones



## 7. Conclusiones

Los objetivos desarrollados en la presente tesis doctoral han dado lugar a las siguientes conclusiones:

- Se han puesto a punto 4 qPCRs para cuantificar *E. coli*, *E. faecalis*, *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila* con el fin de implementar estas qPCR se han diseñado dos tipos de estándar: uno a partir de células cultivadas en fase exponencial y en el caso de los indicadores de contaminación fecal y para *Legionella pneumophila* también se han diseñado estándares usando la técnica de gBlocks. En todas las curvas de las qPCRs los valores de pendiente estuvieron entre -3,2 y -3,5; el coeficiente de determinación mayor al 0,95; y el % de eficiencia, para todas fue superior al 95 %, manteniéndose entre 90-110 %.
- La cuantificación de los indicadores fecales mediante qPCR se validó mediante el cultivo de las bacterias y por citometría de flujo con el citómetro CytoFlex S. Los resultados obtenidos indican una elevada correlación entre todos los distintos sistemas de cuantificación. En el caso de los *E. faecalis* el valor determinado es muy parecido entre los distintos tipos de análisis. Sin embargo, la qPCR de *E. coli* desarrollada con el estándar de gBlock cuantificaba como mínimo dos ordenes de magnitud la concentración de la bacteria determinada por citometría.
- La qPCR tanto de *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila* se puso a punto nuevamente para ajustarlas a los estándares adecuados debido a los cambios en los reactivos y los parámetros que ha habido en los últimos años. Los parámetros de las qPCR realizadas en su totalidad en el laboratorio deben repasarse cuando las condiciones de la técnica van variando.
- La concentración por floculación orgánica con leche desnatada fue poco eficiente para recuperar bacterias viables y cultivables. En el caso de *B. cereus* se recuperó un 0,13 % y en el *E. coli* un 0,02 %. Este bajo porcentaje de recuperación posiblemente era debido a que las células permanecen a pH 3 por un tiempo superior a las 12 horas. Sin embargo, la recuperación fue mayor cuando se compararon por qPCR las copias

genómicas. La recuperación de bacterias totales utilizando el kit de extracción de Qiagen fue superior en más de un 28 % a los resultados obtenidos con el kit de extracción de MoBio.

- La concentración de muestras de agua dopadas con microorganismos mediante floculación orgánica con leche desnatada (SMF) y mediante la filtración una columna monolítica de adsorción (MAF) mostro, en las condiciones establecidas, que con SMF los valores de genomas recuperados fueron entre 0,8 logaritmos y 1,9 logaritmos mayores que los recuperados por el método de (MAF).
- El análisis cuantitativo de los indicadores fecales y *Legionella* spp. mediante qPCR de las aguas de riego tras la concentración con SMF demostró la presencia de estas bacterias en muchas de las muestras. El río Fluvià mostro una baja contaminación fecal y la no presencia de *Legionella*, lo que lo convierte en una excelente fuente de agua para riego. Sin embargo, las otras fuentes de agua de riego convencionales procedentes de tres pozos distintos presentaron niveles de contaminación fecal variable y también la presencia de *Legionella* lo que indica que estas aguas pueden ser un riesgo si se usan como agua de riego.
- El análisis de las aguas de riego no convencionales presentaron una elevada contaminación fecal y confirmaron el riesgo asociado al uso directo del agua residual y el agua del secundario. Sin embargo, el tratamiento de aguas residuales realizado por la EDAR de Granollers mostró ser efectivo al eliminar en gran medida la contaminación fecal, bajando entre 5 y 6 logaritmos la concentración de los indicadores de contaminación fecal, entre el afluente de la planta y el efluente del terciario de la planta. No obstante, se observó *Legionella* en la laguna de reserva que se utiliza para el riego después del tratamiento terciario, indicando un probable recrecimiento posiblemente asociado a la presencia de protozoos, lo que aumenta el riesgo asociado al uso de riego por aspersión de estas fuentes de agua.

## 8. Bibliografía



## 8. Bibliografía

- Abzazou, Tarik. 2016. "Técnicas Moleculares Para La Caracterización Microbiológica de Los Procesos de Eliminación de Nutrientes En Las EDARs Molecular Techniques for Microbiological Characterization of Nutrient Removal Processes at WWTPs Técnicas Moleculares Para La Caracteriza."
- Abzazou, Tarik, Humbert Salvadó, Yexenia Cárdenas-Youngs, Alberto Becerril-Rodríguez, Eva M<sup>a</sup> Ciriero-Cebirán, Anna Huguet, and Rosa M<sup>a</sup> Araujo. 2018. "Characterization of Nutrient-Removing Microbial Communities in Two Full-Scale WWTP Systems Using a New qPCR Approach." *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.241>.
- Acosta, Alberto, and Esperanza Martínez. 2010. *AGUA Un Derecho Humano Fundamental*.
- Agència Catalana de l'Aigua. 2016. "Inventari de Recursos Hídrics Totals (Annex III). Pla de Gestió Del Districte de Conca Fluvial de Catalunya (2016-2021).," 62. [http://aca-web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?\\_nfpb=true&\\_pageLabel=P1210754461208200772701](http://aca-web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?_nfpb=true&_pageLabel=P1210754461208200772701).
- Aguilera, Penélope, Martha Ruiz Tachiquín, Martha Graciela, Rocha Munive, and Benjamín Pineda Olvera. 2014. "PCR En Tiempo Real." *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos Y Prácticos*, 175–202.
- Alam, Mehboob. 2014. *Microbial Status of Irrigation Water for Vegetables as Affected by Cultural Practices*.
- Amini, Kaveh, and Heinz-Bernhard Kraatz. 2015. "Recent Advances and Developments in Monitoring Biological Agents in Water Samples." *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 14 (1): 23–48. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9351-5>.
- Arcos Pulido, Del Pilar Mireya, Sara Lilia Ávila De Navia, Mónica Sandra Estupiñán Torres, and Aura Cristina Gómez Prieto. 2005. "Indicadores Microbiológicos de Contaminación de Las Fuentes de Agua." *Nova* 3 (4): 69–79. <https://doi.org/10.22490/24629448.338>.
- Arrojo, Pedro. 2009. "El Reto Ético de La Crisis Global Del Agua," 33–54.
- Banco Mundial. 2011. "Diagnóstico de La Gestión de Los Recursos Hídricos. Chile." *Departamento Del Medio Ambiente Y Desarrollo Sostenible*, 92. [http://www.dga.cl/eventos/Diagnostico\\_gestion\\_de\\_recursos\\_hidricos\\_en\\_Chile\\_Banco\\_Mundial.pdf](http://www.dga.cl/eventos/Diagnostico_gestion_de_recursos_hidricos_en_Chile_Banco_Mundial.pdf).
- Bargellini, Annalisa, Isabella Marchesi, Elena Righi, Angela Ferrari, Stefano Cencetti, Paola Borella, and Sergio Rovesti. 2011. "Parameters Predictive of Legionella Contamination in Hot Water Systems: Association with Trace

- Elements and Heterotrophic Plate Counts.” *Water Research* 45 (6). Elsevier Ltd: 2315–21. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.01.009>.
- Barrera-Escorcia, Guadalupe, Carlos Leopoldo Fernández-Rendón, Irma Wong-Chang, and Patricia Ramírez Romero. 2013. “La Sensibilidad Del Grupo Coliforme Como Indicador de La Presencia de Enterobacterias Patógenas En Cuatro Cuerpos Acuáticos de México.” *Hidrobiologica* 23 (1): 87–96.
- Bartram, J., J. Cotruvo, M. Exner, C. Fricker, A. Glasmacher, and (WHO). 2003. *WHO | Heterotrophic Plate Counts and Drinking-Water Safety: The Significance of HPCs for Water Quality and the Human Health. Drinking Water Quality*. <https://doi.org/10.2166/9781780405940>.
- Becerra-Castro, Cristina, Ana Rita Lopes, Ivone Vaz-Moreira, Elisabete F. Silva, Célia M. Manaia, and Olga C. Nunes. 2015. “Wastewater Reuse in Irrigation: A Microbiological Perspective on Implications in Soil Fertility and Human and Environmental Health.” *Environment International* 75. Elsevier Ltd: 117–35. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.001>.
- Bersinger, Thomas, Isabelle Le Hécho, Gilles Bareille, Thierry Pigot, and Alexandre Lecomte. 2015. “Continuous Monitoring of Turbidity and Conductivity in Wastewater Networks.” *Revue Des Sciences de L'eau* 28 (1): 9. <https://doi.org/10.7202/1030002ar>.
- Bhat, Somanath, Natalie Curach, Thomas Mostyn, Gursharan Singh Bains, Kate R Griffiths, and Kerry R Emslie. 2010. “Comparison of Methods for Accurate Quantification of DNA Mass Concentration with Traceability to the International System of Units” 82 (17): 7185–92.
- Bhattacharya, S.K. 2004. “WHO | Heterotrophic Plate Counts and Drinking-Water Safety: The Significance of HPCs for Water Quality and the Human Health.” *Indian Journal of Medical Research*, no. Jul: 1–8. <https://doi.org/10.2166/9781780405940>.
- Boletín Oficial del Estado. 2007. “Real Decreto 1620/2007.” *De 7 Diciembre Por El Que Se Establece El Régimen Jurídico De La Reutilización De Las Aguas Depuradas* 294 (2007): 50639. <https://www.boe.es/boe/dias/2007/12/08/pdfs/A50639-50661.pdf>.
- Borella, Paola, Maria Teresa Montagna, Serena Stampi, Giovanna Stancanelli, Vincenzo Romano-Spica, Maria Triassi, Isabella Marchesi, et al. 2005. “Legionella Contamination in Hot Water of Italian Hotels.” *Applied and Environmental Microbiology* 71 (10): 5805–13. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.5805-5813.2005>.
- Caicedo, C., S. Beutel, T. Scheper, K. H. Rosenwinkel, and R. Nogueira. 2016. “Occurrence of Legionella in Wastewater Treatment Plants Linked to Wastewater Characteristics.” *Environmental Science and Pollution Research* 23 (16). Environmental Science and Pollution Research: 16873–81. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7090-6>.

- Calgua de León, Byron Tomas. 2013. "Nuevas Metodologías Para El Estudio de Virus Humanos Contaminantes Del Medio Ambiente," 16–163. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edstdx&AN=tdx.10803.128914&lang=es&site=eds-live>.
- Carlos, José, Solana Morcillo, Elisa Millana, Daniel Rodríguez Martín, Ana Martín, González María, and Teresa García. 2013. "Implicaciones Sanitarias de Los Protozoos Como Reservorio de" 5 (3): 1–5.
- Casierra-Martínez, Henry, Jafeth Casalins-Blanco, Ximena Vargas-Ramírez, and Aracelly Caselles-Osorio. 2017. "Desinfección de Agua Residual Doméstica Mediante Un Sistema de Tratamiento Acoplado Con Fines de Reúso." *Tecnología Y Ciencias Del Agua Vol.7, #4*.
- Cervero Aragón, Sílvia. 2013. "Eficàcia dels Desinfectants de l'aigua Sobre Legionella Spp. I Les Seves Amebes Hostes = Efficiency of Water Disinfectants against Legionella Spp. and Their Amoeba Hosts." <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/49109>.
- Corral-Lugo, Andrés, Yolanda Elizabeth Morales-García, Laura Abisaí Pazos-Rojas, Araceli Ramírez-Valverde, Rebeca Débora Martínez-Contreras, and Jesús Muñoz-Rojas. 2012. "Cuantificación de Bacterias Cultivables Mediante El Método de &quot; Goteo En Placa Por Sellado (O Estampado) Masivo." *Colombia Biotecnológica* 14 (2): 147–56. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v14n2/v14n2a16.pdf>.
- Costa, Josep. 2013. "Reacción En Cadena de La Polimerasa (PCR) a Tiempo Real." *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22 (5). Elsevier: 299–305. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73092-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73092-X).
- Declerck, Priscilla, Jonas Behets, Vincent van Hoef, and Frans Ollevier. 2007. "Detection of Legionella Spp. and Some of Their Amoeba Hosts in Floating Biofilms from Anthropogenic and Natural Aquatic Environments." *Water Research* 41 (14): 3159–67. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.011>.
- Diederer, B. M W, C. M A de Jong, Ingrid Aarts, Marcel F. Peeters, and Anneke van der Zee. 2007. "Molecular Evidence for the Ubiquitous Presence of Legionella Species in Dutch Tap Water Installations." *Journal of Water and Health* 5 (3): 375–83. <https://doi.org/10.2166/wh.2007.033>.
- Dietersdorfer, Elisabeth, Sílvia Cervero-Aragó, Regina Sommer, Alexander K. Kirschner, and Julia Walochnik. 2016. "Optimized Methods for Legionella Pneumophila Release from Its Acanthamoeba Hosts." *BMC Microbiology* 16 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0691-x>.
- Eys, G J. Van, C Gravekamp, M J Gerritsen, W Quint, M.T Cornelissen, S T Schegget, and W J Terpstra. 1994. "Detection of Leptospire in Urine by." *Reactions* 32 (8): 1894–98.
- Fernandez-Cassi, X., C. Silvera, S. Cervero-Aragò, M. Rusi??ol, F. Latif-Eugeni,

- C. Bruguera-Casamada, S. Civit, et al. 2016. "Evaluation of the Microbiological Quality of Reclaimed Water Produced from a Lagooning System." *Environmental Science and Pollution Research* 23 (16). Environmental Science and Pollution Research: 16816–33. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6812-0>.
- Fernández-Jáuregui, Carlos A. 1999. "El Agua Como Fuente de Conflictos: Repaso de Los Focos de Conflictos En El Mundo." *Revista CIDOB d'Afers Internacionals* 45–46 (45): 179–94. <https://doi.org/10.2307/40586156>.
- Fields, Barry S. 1996. "The Molecular Ecology of Legionellae." *Trends in Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(96\)10041-X](https://doi.org/10.1016/0966-842X(96)10041-X).
- Fields, Barry S., Robert F. Benson, and Richard E. Besser. 2002. "Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation." *Journal of Clinical Microbiology* 16 (4): 697–99. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.506>.
- Fierer, Noah, and Robert B. Jackson. 2006. "The Diversity and Biogeography of Soil Bacterial Communities." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (3): 626–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>.
- Figueras, Ma José, and Juan J. Borrego. 2010. "New Perspectives in Monitoring Drinking Water Microbial Quality." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7 (12): 4179–4202. <https://doi.org/10.3390/ijerph7124179>.
- Garcia, Alicia, Pilar Goñi, Joanna Cieloszyk, Maria Teresa Fernandez, Laura Calvo-Beguería, Encarnacion Rubio, Maria Francisca Fillat, Maria Luisa Peleato, and Antonio Clavel. 2013. "Identification of Free-Living Amoebae and Amoeba-Associated Bacteria from Reservoirs and Water Treatment Plants by Molecular Techniques." *Environmental Science and Technology* 47 (7): 3132–40. <https://doi.org/10.1021/es400160k>.
- Gensberger, Eva Theres, Eva-Maria Gössl, Livio Antonielli, Angela Sessitsch, and Tanja Kostić. 2015. "Effect of Different Heterotrophic Plate Count Methods on the Estimation of the Composition of the Culturable Microbial Community." *PeerJ* 3: e862. <https://doi.org/10.7717/peerj.862>.
- Giulietti, Annapaula, Lut Overbergh, Dirk Valckx, Brigitte Decallonne, Roger Bouillon, and Chantal Mathieu. 2001. "An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression." *Methods* 25 (4): 386–401. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1261>.
- Guerrieri, Elisa, Moreno Bondi, Claudia Ciancio, Paola Borella, and Patrizia Messi. 2005. "Micro- and Macromethod Assays for the Ecological Study of Legionella Pneumophila." *FEMS Microbiology Letters* 252 (1): 113–19. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.040>.
- Gutiérrez-Cacciabue, Dolores, Alicia G. Cid, and Verónica B. Rajal. 2016. "How

- Long Can Culturable Bacteria and Total DNA Persist in Environmental Waters? The Role of Sunlight and Solid Particles." *Science of the Total Environment* 539. Elsevier B.V.: 494–502. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.138>.
- Hall, Walter A. 2012. "Free-Living Amoebas: Is It Safe to Go in the Water?" *World Neurosurgery* 78 (6). Elsevier Inc.: 610–11. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2011.12.063>.
- Hanjra, Munir A., John Blackwell, Gemma Carr, Fenghua Zhang, and Tamara M. Jackson. 2012. "Wastewater Irrigation and Environmental Health: Implications for Water Governance and Public Policy." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 215 (3). Elsevier GmbH.: 255–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.10.003>.
- Harms, Gerda, Alice C. Layton, Hebe M. Dionisi, Igrid R. Gregory, Victoria M. Garrett, Shawn A. Hawkins, Kevin G. Robinson, and Gary S. Sayler. 2003. "Real-Time PCR Quantification of Nitrifying Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant." *Environmental Science and Technology* 37 (2): 343–51. <https://doi.org/10.1021/es0257164>.
- Herpers, Bjorn L, Bartelt M De Jongh, Kim Van Der Zwaluw, and Erik J Van Hannen. 2003. "Real-Time PCR Assay Targets the 23S-5S Spacer for Direct Detection and Differentiation of Legionella Spp . and Legionella Pneumophila Real-Time PCR Assay Targets the 23S-5S Spacer for Direct Detection and Differentiation of Legionella Spp . and Legionella" 41 (10): 4815–17. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4815>.
- Hidalgo, José Celis, Julio Junod Montano, and Marco Sandoval. 2005. "Recientes Aplicaciones de La Depuración de Aguas Residuales Con Plantas Acuáticas." *Theoria* 14 (1): 17–25. <http://www.ubiobio.cl/theoria/v/v14/a2.pdf>.
- Hjelmsø, Mathis Hjort, Maria Hellmér, Xavier Fernandez-Cassi, Natália Timoneda, Oksana Lukjancenka, Michael Seidel, Dennis Elsässer, et al. 2017. "Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing." *PLoS ONE* 12 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170199>.
- Holden, E. P., H. H. Winkler, D. O. Wood, and E. D. Leinbach. 1984. "Intracellular Growth of Legionella Pneumophila within Acanthamoeba Castellanii Neff." *Infection and Immunity* 45 (1): 18–24.
- Holden, Marcia J., Ross J. Haynes, Savelas A. Rabb, Neena Satija, Kristina Yang, and Joseph R. Blasic. 2009. "Factors Affecting Quantification of Total DNA by UV Spectroscopy and PicoGreen Fluorescence." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (16): 7221–26. <https://doi.org/10.1021/jf901165h>.
- Iglesias, Raquel, Enrique Ortega, Genaro Batanero, and Luis Quintas. 2010.

“Water Reuse in Spain: Data Overview and Costs Estimation of Suitable Treatment Trains.” *Desalination* 263 (1–3): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.06.038>.

Jimenez, Margarita Cardenas. 2013. “Flow Cytometry as the New ‘gold Standard’ for Detection of Free Tumour Cells in Abdominal Lavage Fluid in Gastric Cancer Patients: A Comparative Study of Molecular and Conventional Method.”

Jjemba, Patrick K., Lauren A. Weinrich, Wei Cheng, Eugenio Giraldo, and Mark W. LeChevallier. 2010. “Regrowth of Potential Opportunistic Pathogens and Algae in Reclaimed-Water Distribution Systems.” *Applied and Environmental Microbiology* 76 (13): 4169–78. <https://doi.org/10.1128/AEM.03147-09>.

Johnson, Lin, and Ganesh Atheesha. 2013. “Water Quality Indicators: Bacteria, Coliphage, Enteric Viruses.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 23 (6): 484–506.

Johnson, Martin, Pius Brzoska, Olga Petrauskene, and Chris Melancon. 2010. “Genetic Engineering News: Uso de La PCR En Tiempo Real Para La Detección de Patógenos.” *Genengnews*.

Jungbauer, Alois, and Rainer Hahn. 2008. “Polymethacrylate Monoliths for Preparative and Industrial Separation of Biomolecular Assemblies.” *Journal of Chromatography A* 1184 (1–2): 62–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.087>.

Khan, Izhar U.H., Vic Gannon, Rob Kent, Wendell Koning, David R. Lapen, Jim Miller, Norman Neumann, et al. 2007a. “Development of a Rapid Quantitative PCR Assay for Direct Detection and Quantification of Culturable and Non-Culturable *Escherichia Coli* from Agriculture Watersheds.” *Journal of Microbiological Methods* 69 (3): 480–88. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.016>.

———. 2007b. “Development of a Rapid Quantitative PCR Assay for Direct Detection and Quantification of Culturable and Non-Culturable *Escherichia Coli* from Agriculture Watersheds.” *Journal of Microbiological Methods* 69 (3): 480–88. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.016>.

Kim, J., J. Lim, and C. Lee. 2013. “Quantitative Real-Time PCR Approaches for Microbial Community Studies in Wastewater Treatment Systems: Applications and Considerations.” *Biotechnology Advances* 31 (8): 1358–73. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.010>.

Kunze, Andreas, Lu Pei, Dennis Elsässer, Reinhard Niessner, and Michael Seidel. 2015. “High Performance Concentration Method for Viruses in Drinking Water.” *Journal of Virological Methods* 222. Elsevier B.V.: 132–37. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.06.007>.

Lasalde, Clarivel, Roberto Rodríguez, Gary A Toranzos, and Roberto Rodri.

2005. "Statistical Analyses : Possible Reasons for Unreliability of Source Tracking Efforts Statistical Analyses : Possible Reasons for Unreliability of Source Tracking Efforts" 71 (8): 4690–95. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4690>.
- Layton, B. A., S. P. Walters, L. H. Lam, and A. B. Boehm. 2010. "Enterococcus Species Distribution among Human and Animal Hosts Using Multiplex PCR." *Journal of Applied Microbiology* 109 (2): 539–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x>.
- Lee, J. V., S. Lai, M. Exner, J. Lenz, V. Gaia, S. Casati, P. Hartemann, et al. 2011. "An International Trial of Quantitative PCR for Monitoring Legionella in Artificial Water Systems." *Journal of Applied Microbiology* 110 (4): 1032–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04957.x>.
- Li, Laam, Nilmini Mendis, Hana Trigui, James D. Oliver, and Sebastien P. Faucher. 2014. "The Importance of the Viable but Non-Culturable State in Human Bacterial Pathogens." *Frontiers in Microbiology* 5 (JUN): 1–1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>.
- Llagas, Wilmer, and Enrique Guadalupe. 2006. "Diseño de Humedales Ar Diseño de Humedales Ar Diseño de Humedales Artificiales Par Iciales Par Iciales Para El Tr a El Tr a El Tratamiento de Aguas R de Aguas R de Aguas Residuales En La Esiduales En La Esiduales En La UNMSM." In , 15:Revista del Insituto de Investigaciones. <http://revistas.concytec.gob.pe/pdf/iigeo/v9n17/a11v9n17.pdf>.
- Lorenzo, Eliet Veliz, José Guadalupe Llanes Ocaña, Lidia Asela Fernández, and Mayra Bataller Venta. 2009. "Reúso de Aguas Residuales Domésticas Para Riego Agrícola. Valoración Crítica." *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 40 (1): 35–44.
- Mapanda, F., E. N. Mangwayana, J. Nyamangara, and K. E. Giller. 2005. "The Effect of Long-Term Irrigation Using Wastewater on Heavy Metal Contents of Soils under Vegetables in Harare, Zimbabwe." *Agriculture, Ecosystems and Environment* 107 (2–3): 151–65. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.11.005>.
- Masini, Jorge C., and Frantisek Svec. 2017. "Porous Monoliths for on-Line Sample Preparation: A Review." *Analytica Chimica Acta* 964: 24–44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.002>.
- Mella, C., G. Medina, S. Flores-Martin, Z. Toledo, R. J. Simaluiza, G. Pérez-Pérez, and H. Fernández. 2016. "Interaction between Zoonotic Bacteria and Free Living Amoebas. A New Angle of an Epidemiological Polyhedron of Public Health Importance?" *Archivos de Medicina Veterinaria* 48 (1): 1–10. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2016000100001>.
- Mengue, Luce, Matthieu Régnacq, Willy Aucher, Emilie Portier, Yann Héchard, and Ascel Samba-Louaka. 2016. "Legionella Pneumophila Prevents

- Proliferation of Its Natural Host *Acanthamoeba Castellanii*.” *Scientific Reports* 6 (1): 36448. <https://doi.org/10.1038/srep36448>.
- MICI Panamá. 2000. *Reglamento Técnico DGNTI-COPANIT 24-99 2000*. Vol. 49. Panamá.
- Molmeret, Maëlle, Matthias Horn, Michael Wagner, and Marina Santic. 2005. “Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens MINIREVIEW Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens.” *Applied and Environmental Microbiology* 71 (1): 20–28. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.20>.
- Moreno, JM. 2006. “Evaluación Preliminar de Los Impactos En España Por Efecto Del Cambio Climático.” *Boletín CF+S* 38/39: 37–56. <https://doi.org/March 2006>.
- Nevel, S. Van, S. Koetzsch, C. R. Proctor, M. D. Besmer, E. I. Prest, J. S. Vrouwenvelder, A. Knezev, N. Boon, and F. Hammes. 2017. “Flow Cytometric Bacterial Cell Counts Challenge Conventional Heterotrophic Plate Counts for Routine Microbiological Drinking Water Monitoring.” *Water Research* 113. Elsevier Ltd: 191–206. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.065>.
- Nielsen, Karsten, Helle Smidt Mogensen, Johannes Hedman, Harald Niederstätter, Walther Parson, and Niels Morling. 2008. “Comparison of Five DNA Quantification Methods.” *Forensic Science International: Genetics* 2 (3): 226–30. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.02.008>.
- Peskoller, Caroline, Reinhard Niessner, and Michael Seidel. 2009. “Development of an Epoxy-Based Monolith Used for the Affinity Capturing of *Escherichia Coli* Bacteria.” *Journal of Chromatography A* 1216 (18): 3794–3801. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.041>.
- PNUMA-ONU. 2002. “Perspectivas Del Medio Ambiente Mundial 2002 Perspectivas Del Medio Ambiente Mundial 2002 GEO-3.”
- Ramamurthy, Thandavarayan, Amit Ghosh, Gururaja P. Pazhani, and Sumio Shinoda. 2014. “Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria.” *Frontiers in Public Health* 2 (July): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00103>.
- Raso, Jordi. 2013. “Updated Report on Wastewater Reuse in the European Union,” no. April: 51.
- Riesenfeld, Christian S., Patrick D. Schloss, and Jo Handelsman. 2004. “Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities.” *Annual Review of Genetics* 38 (1): 525–52. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.091216>.
- Rojas, Ing Ricardo. 2002. “Conferencia Sistemas de Tratamiento de Aguas

Residuales.”

- Ruiz, Alvaro Arango. 2004. “La Biofiltración , Una Alternativa Para La Potabilización Del Agua.” *Lasallista De Investigacion* 1 (2): 6.
- Sala-Comorera, Laura. 2016. “Diversitat de Comunitats Heteròtrofes Associades a Les Aigües de Consum El Director.”
- Samboni Ruiz, Eugenia Natalia, Yesid Carvajal Escobar, and Juan Carlos Escobar. 2007. “Revisión de Parámetros Físicoquímicos Como Indicadores de Calidad Y Contaminación Del Agua Indicadores de Calidad Y Contaminación Del Agua” 27 (3): 172–81.
- SantoDomingo, J W, S C Siefring, and R A Haugland. 2003. “Real-Time PCR Method to Detect *Enterococcus Faecalis* in Water.” *Biotechnol.Lett.* 25 (3): 261–65.
- Serrano-Suárez, Alejandra, Jordi Dellundé, Humbert Salvadó, Sílvia Cervero-Aragó, Javier Méndez, Oriol Canals, Silvia Blanco, Antoni Arcas, and Rosa Araujo. 2013. “Microbial and Physicochemical Parameters Associated with *Legionella* Contamination in Hot Water Recirculation Systems.” *Environmental Science and Pollution Research* 20 (8): 5534–44. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1557-5>.
- Shannon, K. E., D. Y. Lee, J. T. Trevors, and L. A. Beaudette. 2007. “Application of Real-Time Quantitative PCR for the Detection of Selected Bacterial Pathogens during Municipal Wastewater Treatment.” *Science of the Total Environment* 382 (1): 121–29. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.039>.
- Silva, Jorge, Patricia Torres, and Carlos Madera. 2008. “Reuso de Aguas Residuales Domésticas En Agricultura .” *Agronomia Colombiana* 26 (1): 347–59. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/13521/14204>.
- Su, Xiaomei, Xi Chen, Jinxing Hu, Chaofeng Shen, and Linxian Ding. 2013. “Exploring the Potential Environmental Functions of Viable but Non-Culturable Bacteria.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29 (12): 2213–18. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1390-5>.
- Suárez, Alejandra Serrano. 2009. “Relación de *Legionella* Spp. Con Parámetros Microbiológicos Y Físicoquímicos En Aguas.”
- Thomas, Vincent, T. Bouchez, V. Nicolas, S. Robert, J. F. Loret, and Y. Lévi. 2004. “Amoebae in Domestic Water Systems: Resistance to Disinfection Treatments and Implication in *Legionella* Persistence.” *Journal of Applied Microbiology* 97 (5): 950–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02391.x>.

- Thomas, Vincent, Gerald McDonnell, Stephen P. Denyer, and Jean Yves Maillard. 2010. "Free-Living Amoebae and Their Intracellular Pathogenic Microorganisms: Risks for Water Quality." *FEMS Microbiology Reviews* 34 (3): 231–59. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00190.x>.
- Trapote-Jaume, Arturo. 2016. "Technologies of Wastewater Treatment and Reuse: New Approaches." *Agua Y Territorio*, no. 8: 123–35. <https://doi.org/10.17561/at.v0i8>.
- UNESCO-WWDR. 2013. "WWDR: Aguas Residuales, El Recurso Desaprovechado."
- . 2016. "WWDR: Agua Y Empleo."
- . 2017. "WWDR: Cifras Y Datos: Las Aguas Residuales, El Recurso Desaprovechado."
- . 2018. "WWDR: Soluciones Basadas En La Naturaleza Para La Gestión Del Agua." <http://unesdoc.unesco.org/images/0026/002614/261494s.pdf>.
- Větrovský, Tomáš, and Petr Baldrian. 2013. "The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses." *PLoS ONE* 8 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>.
- Walker, David I., Jonathan McQuillan, Michael Taiwo, Rachel Parks, Craig A. Stenton, Hywel Morgan, Matthew C. Mowlem, and David N. Lees. 2017. "A Highly Specific Escherichia Coli qPCR and Its Comparison with Existing Methods for Environmental Waters." *Water Research* 126. Elsevier Ltd: 101–10. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.032>.
- Wéry, Nathalie, Claire Lhoutellier, Florence Ducray, Jean Philippe Delgenès, and Jean Jacques Godon. 2008. "Behaviour of Pathogenic and Indicator Bacteria during Urban Wastewater Treatment and Sludge Composting, as Revealed by Quantitative PCR." *Water Research* 42 (1–2): 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.048>.
- Wunderlich, Anika, Carmen Torggler, Dennis Elsässer, Christian Lück, Reinhard Niessner, and Michael Seidel. 2016. "Rapid Quantification Method for Legionella Pneumophila in Surface Water." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (9): 2203–13. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9362-x>.
- Xie, Shaofeng, Robert W. Allington, Frantisek Svec, and Jean M.J. Fréchet. 1999. "Rapid Reversed-Phase Separation of Proteins and Peptides Using Optimized 'Moulded' Monolithic Poly(styrene-Co-Divinylbenzene) Columns." *Journal of Chromatography A* 865 (1–2): 169–74. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00981-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00981-4).
- Yang, H., B. L. Swem, and Y. Li. 2003. "The Effect of pH on Inactivation of Pathogenic Bacteria on Fresh-Cut Lettuce by Dipping Treatment with Electrolyzed Water." *Journal of Food Science* 68 (3): 1013–17.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb08280.x>.

Zhang, Yanyan, Lela K. Riley, Mengshi Lin, and Zhiqiang Hu. 2012. "Determination of Low-Density Escherichia Coli and Helicobacter Pylori Suspensions in Water." *Water Research* 46 (7). Elsevier Ltd: 2140–48. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.01.030>.

Zou, Hanfa, Xiaodong Huang, Mingliang Ye, and Quanzhou Luo. 2002. "Monolithic Stationary Phases for Liquid Chromatography and Capillary Electrochromatography." *Journal of Chromatography A* 954 (1–2): 5–32. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00072-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00072-9).



# 9. Artículos



## 9. Artículo publicados

Journal of Microbiological Methods 134 (2017) 46–53



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jmicmeth](http://www.elsevier.com/locate/jmicmeth)



### Characterization of the efficiency and uncertainty of skimmed milk flocculation for the simultaneous concentration and quantification of water-borne viruses, bacteria and protozoa



Eloy Gonzales-Gustavson<sup>a</sup>, Yexenia Cárdenas-Youngs<sup>a</sup>, Miquel Calvo<sup>a</sup>, Marcelle Figueira Marques da Silva<sup>a</sup>, Ayalkibet Hundesa<sup>a</sup>, Inmaculada Amorós<sup>b</sup>, Yolanda Moreno<sup>b</sup>, Laura Moreno-Mesonero<sup>b</sup>, Rosa Rosell<sup>c</sup>, Lillianne Ganges<sup>c</sup>, Rosa Araujo<sup>a</sup>, Rosina Girones<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente, Ciudad Politécnica de la Innovación, Ed. 8G, Acceso D, planta 2, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

<sup>c</sup> IRTA, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA, IRTA-UAB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 11 October 2016

Received in revised form 5 January 2017

Accepted 8 January 2017

Available online 16 January 2017

##### Keywords:

Skimmed milk flocculation

Water contamination

Microorganisms

q(RT)PCR

Recovery

Real concentration

#### ABSTRACT

In this study, the use of skimmed milk flocculation (SMF) to simultaneously concentrate viruses, bacteria and protozoa was evaluated. We selected strains of faecal indicator bacteria and pathogens, such as *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. The viruses selected were adenovirus (HAdV 35), rotavirus (RoV SA-11), the bacteriophage MS2 and bovine viral diarrhoea virus (BVDV). The protozoa tested were *Acanthamoeba*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. The mean recoveries with q(RT)PCR were 66% (HAdV 35), 24% (MS2), 28% (RoV SA-11), 15% (BVDV), 60% (*E. coli*), 30% (*H. pylori*) and 21% (*Acanthamoeba castellanii*). When testing the infectivity, the mean recoveries were 59% (HAdV 35), 12% (MS2), 26% (RoV SA-11) and 0.7% (BVDV). The protozoa *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* were studied by immunofluorescence with recoveries of 18% and 13%, respectively. Although q(RT)PCR consistently showed higher quantification values (as expected), q(RT)PCR and the infectivity assays showed similar recoveries for HAdV 35 and RoV SA-11. Additionally, we investigated modelling the variability and uncertainty of the recovery with this method to extrapolate the quantification obtained by q(RT)PCR and estimate the real concentration. The 95% prediction intervals of the real concentration of the microorganisms inoculated were calculated using a general non-parametric bootstrap procedure adapted in our context to estimate the technical error of the measurements. SMF shows recoveries with a low variability that permits the use of a mathematical approximation to predict the concentration of the pathogen and indicator with acceptable low intervals. The values of uncertainty may be used for a quantitative microbial risk analysis or diagnostic purposes.

© 2017 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

#### 1. Introduction

Diseases related to water contamination constitute a major human health issue. Inadequate drinking water and poor sanitation are estimated to cause 842,000 diarrhoeal disease-related deaths per year (World Health Organization, 2014). They are related to a broad range of health problems and cause impacts on productivity due to water-borne diseases (Amini and Kraatz, 2014). Moreover, the creation of protocols to measure water quality, considering the diversity of pathogens

that may be present, is one of the major problems that must be solved for improving the control of water quality and Quantitative Microbial Risk Assessment (QMRA) studies.

The following four main critical steps in the process of evaluating the microbiological quality of water need to be considered: (1) which pathogens may be present; (2) which microorganisms are used as indicators of contamination; (3) which method is used to concentrate the particular indicator or indicators; and (4) which technique is used to detect them.

Indicator organisms are used for a range of purposes as follows: indicators of faecal pollution and to evaluate the effectiveness of processes such as filtration or disinfection. The most popular indicator organisms are thermotolerant coliforms, *E. coli* and intestinal enterococci. However, the suitability of *E. coli* as an indicator has been questioned, because its survival in water and sensitivity to treatment and disinfection processes differ substantially from those of excreted viruses and protozoa.

**Abbreviations:** BVDV, Bovine viral diarrhoea virus; HAdV, Human adenovirus; IFA, Immunofluorescence assays; JCPyV, JC polyomavirus; NoV, Norovirus; PI, Prediction intervals; QMRA, Quantitative microbial risk assessment; q(RT)PCR, Quantitative (reverse transcriptase) PCR; RoV, Rotavirus; SMF, Skimmed milk flocculation; TCID50, 50% Tissue culture infective dose.

\* Corresponding author.

E-mail address: [rgirones@ub.edu](mailto:rgirones@ub.edu) (R. Girones).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmicmeth.2017.01.006>

0167-7012/© 2017 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

*E. coli* is far more sensitive, and the consequence is a low correlation with the presence of other pathogens (Amini and Kraatz, 2014; Bofill-Mas et al., 2013; Gorchev and Ozolins, 2011).

Coliphages share many properties with human viruses and are used as models to assess the behaviour of excreted viruses in the water environment. In this regard, they are superior to faecal bacteria. However, there is no direct correlation between the numbers of coliphages and the numbers of excreted viruses (Gorchev and Ozolins, 2011). The use of excreted viruses as microbial indicators is based on the shortcomings of the existing choices. Human adenovirus (HAdV) has been proposed as a viral indicator of contamination (Gorchev and Ozolins, 2011; Pina et al., 1998) and has been used in various studies as a viral indicator of human faecal contamination and a microbial source tracking tool (Bofill-Mas et al., 2011, 2013; Rusiñol et al., 2014).

Most HAdVs are associated with respiratory disease, but types 40 and 41 are responsible for gastroenteritis outbreaks in children (Wold and Horwitz, 2013). Rotavirus (RoV) is also associated with gastroenteritis; RoV-A is the most common cause of severe vomiting and diarrhoea among children up to 30 months old (Estes and Greenberg, 2013). The coliphage MS2 is commonly used as a surrogate and process control in microbiological food and water analyses (van Duin and Olsthoorn, 2012). BVDV is an important cause of morbidity, mortality, and economic loss in dairy and beef cattle worldwide (MacLachlan and Dubovi, 2011).

*E. coli* is commonly found in the lower intestine of warm-blooded organisms. Most strains are harmless, but others can cause serious food poisoning and are responsible for product recalls due to food contamination (Madigan et al., 2014). *H. pylori* is an acid-tolerant bacterium usually found in the stomach and is related to gastric cancer (Johnson et al., 1997). *H. pylori* has been detected in wastewater (Moreno and Ferrús, 2012), surface water and other environmental samples all over the world (Eusebi et al., 2014) and has even demonstrated the capacity to survive in chlorinated water when the enumeration of coliforms indicates that the water is potable (Santiago et al., 2015). *G. lamblia* and *C. parvum* are responsible for outbreaks of gastroenteritis related to the consumption of contaminated water (Gascón, 2006). *Acanthamoeba* spp., free-living protozoa, are considered to be opportunistic pathogens (Marciano-Cabral and Cabral, 2003) and are known to have a role in the persistence of some bacterial pathogens, such as *Legionella*, in water environments (Lambrecht et al., 2015).

The direct examination of water is difficult due to low and fluctuating concentrations of microorganisms and because concentration procedures are usually organism and/or matrix-specific and most techniques have high or unknown variability parameters. One-step skimmed milk flocculation (SMF) has been proposed as an efficient low-cost method to concentrate viruses in all types of water samples. This method has been used in environmental water matrices such as river water (Calgua et al., 2013a), seawater (Calgua et al., 2008), ground water (Bofill-Mas et al., 2011) and wastewater (Calgua et al., 2013b). However, the efficacy of the recovery in controlled conditions has not been properly described until now.

Quantitative Microbial Risk Analysis (QMRA) is a scientific tool used to assess the microbial safety of water and is needed for developing a strategy of risk management models. QMRA models each variable using a probability distribution. The advantage is that the result is represented by a probability distribution function instead of a single value. The objective of QMRA is the ability to calculate the combined impact of the uncertainty in the model's parameters to determine an uncertainty distribution of the possible model outcomes (Vose, 2008).

The aim of the present study was to determine the efficacy of the SMF recovery to simultaneously concentrate viruses, bacteria and protozoa and then compare q(RT)PCR and infectivity assays to detect and quantify the number of viruses recovered. Finally, an extrapolation method was evaluated with the q(RT)PCR quantification using the prediction interval (PI) based on the known recoveries to correctly achieve

the actual concentration of the spiked microorganisms and define the uncertainty values of the method.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganism stocks and cell lines

The following viruses were analysed and spiked into the water samples: HAdV-35 (ATCC, LGC Standards AB, Borås, Sweden) cultured in cell line A549 (ATCC CCL-185), MS2 (ATCC 23631) cultured in *Salmonella typhimurium* strain WG49 (NCTC 12484), RoV SA-11 (ATCC VR-1565) cultured in MA104 (ATCC CRL-2378) and Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strain NADL kindly donated by the EU and OIE Reference Laboratory for Classical Swine Fever, Institute of Virology, University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany, and cultured in NDBK (ATCC CCL-22). The analysed bacteria were *E. coli* (ATCC 23725) and *H. pylori* (NCTC11637). The protozoa tested in the study were *A. castellanii* (CCAP 1534/2), *G. lamblia* H3 isolate (Waterborne Inc., New Orleans, LA) and a *C. parvum* Iowa isolate (Waterborne Inc., New Orleans, LA).

### 2.2. Water samples

This experiment was conducted with tap water from the metropolitan area of Barcelona; the volume of water evaluated in each bucket was 10 L. The number of buckets inoculated with each of the microorganisms and their respective inoculated concentration are specified in Table 1. The tap water was previously treated with 100 mL of sodium thiosulfate (10% (w/v)) to eliminate chlorine residues. Four additional buckets with the same volume of water were analysed as negative control samples.

### 2.3. Skimmed milk flocculation concentration

The skimmed milk flocculation concentration protocol has been described in previous studies (Bofill-Mas et al., 2011; Calgua et al., 2008). In summary, a pre-flocculated skimmed milk solution (1% (w/v)) was prepared by dissolving 10 g of skimmed milk powder (Difco-France) in 1 L of artificial seawater and carefully adjusting the pH to 3.5 with 1 N HCl. One hundred millilitres of this solution was added to each of the previously acidified (pH 3.5) 10 L water samples (the final concentration of skimmed milk was 0.01% (w/v)). The conductivity was also measured and adjusted with artificial sea salt (Sigma, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) to achieve a minimum conductivity of 1.5 mS/cm<sup>2</sup>. The samples were stirred for 8 h at room temperature, and the flocs were allowed to settle by gravity for another 8 h. The supernatants were removed, and the sediment was collected and transferred to a 500 mL centrifuge container and centrifuged at 8000 × g for 30 min at 4 °C. The obtained pellet was resuspended in 8 mL of

**Table 1**

The number of microorganisms inoculated in each of the ten litre water buckets used for the skimmed milk flocculation concentration process.

Microorganisms (number of samples)	Molecular quantification	Quantification by infectious assays
HAdV (10)	2.88E + 07 GC	4.60E + 06 IFA
MS2 (13)	2.92E + 09 GC	2.07E + 09 PFU
	2.92E + 07 GC	5.03E + 06
RoV (19)	6.31E + 08 GC	
	2.09E + 07 GC	4.08E + 05 TCID50
BVDV (3)	2.10E + 08 GC	6.31E + 05 TCID50
<i>E. coli</i> (10)	2.37E + 06 GC	
<i>H. pylori</i> (9)	1.97E + 08 GC	
<i>A. castellanii</i> (9)	7.27E + 04 GC	
<i>C. parvum</i> (8)	1.46E + 04 IFA	
<i>G. lamblia</i> (8)	1.56E + 04 IFA	

GC: genomic copies; IFA: immunofluorescence assay; PFU: plaque-forming units; TCID50: 50% tissue culture infective dose.

0.2 M phosphate buffer at pH 7.5 (1:2, v/v of 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Once the pellet was completely dissolved, the phosphate buffer was added to a final volume of 10 mL. The concentrates were kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  after the SMF method was performed. The quantification was then performed within five days.

#### 2.4. Nucleic acid extraction

Viral nucleic acids (NA) were extracted using the QIAmp Viral RNA kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Bacterial and protozoan DNA was extracted using the UNEX method (Hill et al., 2015). The volumes of the concentrates used for the extraction were 140 and 300  $\mu\text{L}$ , and the elutions were 80 and 100  $\mu\text{L}$ , for viruses/bacteria and protozoa, respectively. Immediately after extraction, q(RT)PCR analyses were performed.

#### 2.5. q(RT)PCR quantification

Specific real-time q(RT)PCR assays were used to quantify the microorganisms following the specifications previously described for HAdV (Hernroth et al., 2002), RoV (Zeng et al., 2008), MS2 (Calgua et al., 2014), BVDV (Losurdo et al., 2015), *E. coli* (Khan et al., 2007), *H. pylori* (Santiago et al., 2015) and *A. castellanii* (Qvarnstrom et al., 2006). Undiluted and 10-fold dilutions of the nucleic acid extracts were analysed in duplicate, including the concentrates from negative control buckets. All of the q(RT)PCR assays included four non-template controls to demonstrate that the mix did not produce fluorescence. The standards for viruses were prepared using synthetic gBlocks® Gene Fragments (IDT) and quantified with a Qubit® fluorometer (Thermo Fisher Scientific). For bacteria and *A. castellanii* standards, the DNA was extracted from cultures of known concentration and quantified using a Nanodrop 1000. For all of the standards, ten-fold dilutions were prepared from  $10^0$  to  $10^7$  copies per reaction.

#### 2.6. Infectivity and immunofluorescence assays

Specific infectivity assays were performed using previously described methods for viruses as follows: IFA for HAdV-35 (Calgua et al., 2011), TCID50 for RoV (Otto et al., 2015) and BVDV (OIE, 2015) and plaque assays for MS2 (Anonymous, 1995).

For the quantification of *G. lamblia* and *C. parvum*, we used an immunofluorescence method previously described for the staining of cysts and oocysts with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and observed the staining using differential interference contrast microscopy (USEPA, 2005).

#### 2.7. Recovery, concentration and PI estimates

In our assays, in every replicate, the true concentration,  $Y_K$ , was known, allowing us to compute the recovery mean  $\bar{r}_K$ . In a future non-controlled experiment, the only information available will be the q(RT)PCR-measured concentration,  $m_U$ , while the concentration  $Y_U$  and the recovery  $r_U$  will be unknown. In this section, we introduce a new PI, which estimates this unknown concentration  $Y_U$  of new observations, guaranteeing an  $1 - \alpha\%$  confidence level.

Our approach starts by considering the distribution of our controlled recoveries as a valid model for the future measures. In a new experiment (with one replicate), the three quantities are related by the equation  $m_U = Y_U r_U$ . A point estimate of  $Y_U$  can be obtained by simply substituting  $r_U$  with  $\bar{r}_K$ :

$$\hat{Y}_U = \frac{m_U}{\bar{r}_K} \quad (1)$$

The relative error of this estimation is:

$$e_R = \frac{\hat{Y}_U}{Y_U} = \frac{r_U}{\bar{r}_K} \quad (2)$$

We consider it essential to improve Eqs. (1) and (2) by also measuring their confidence: the accuracy of  $\bar{r}_K$  depends on the sample size and variability of our current experiments.

The PIs described in the statistical literature are built specifically to predict new observations when the parameters of the distribution are estimated with a sample. The purpose and formulas of the PIs are different from the more commonly used confidence intervals. In the Gaussian case, the PI has a closed simple expression. However, the normality assumption for the recoveries is not supported in practice, and other probabilistic models are often used; for instance, Petterson et al. (2015) assumed the beta distribution to study the variability in the recovery of a virus in water.

The absence of closed expressions for the PI plus the difficulty in ensuring a correct goodness of fit of any probabilistic model has finally impelled us to find a free-distribution method. Among the different approaches previously described (see Bai et al., 1990; Mojirsheibani, 1998, for a comparison of several methods), we chose the non-parametric bootstrap-t technique. In brief, this standard computational method defines a bootstrap statistic  $T$ , which combines the distributions of the past and the future samples. Given a confidence level of  $1 - \alpha\%$ , the resampling procedure lets us obtain any  $\alpha$  quantile  $i^{(\alpha)}$  of  $T$ , and, in our context, to obtain the following limits of the PI for  $r_U$  (further details in Mojirsheibani, 1998):

$$\text{prob}(r_U \leq r_{U, \min}) = \frac{\alpha}{2} \quad \text{prob}(r_U \leq r_{U, \max}) = 1 - \frac{\alpha}{2} \quad (3)$$

The above bootstrap-t PI of  $r_U$  lets us derive from Eqs. (1) and (2) two new expressions: the PI of the unknown concentration and its relative error

$$\text{prob}\left(\frac{m_U}{r_{U, \max}} \leq Y_U \leq \frac{m_U}{r_{U, \min}}\right) = 1 - \alpha \quad (4)$$

$$\text{prob}\left(\frac{r_{U, \min}}{\bar{r}_K} \leq e_R \leq \frac{r_{U, \max}}{\bar{r}_K}\right) = 1 - \alpha \quad (5)$$

#### 2.8. Statistical evaluation

All of the data were statistically analysed with the 3.1.1 version of the R software (R Core Team, 2016). First, descriptive statistics of all of the recoveries and quantifications were performed. We plotted the actual data together with the normal density, the beta density (estimated using the maximum likelihood criteria) and a non-parametric kernel estimation of the density in order to assess their goodness of fit. The PI (3), (4) and (5) for every organism were computed implementing the equations for  $T^*$  and  $i^{(\alpha)}$  combined with the methods of the *boot* package in R. An R script with our implementation of these PIs can be found in the supplementary material of this paper. Additionally, Wilcoxon signed-rank tests were used to evaluate the difference between the methods of quantification (q(RT)PCR and the infectivity assay) with the recoveries and quantification of RoV. Spearman's rank correlation coefficient was used to evaluate the q(RT)PCR recovery between all of the microorganisms evaluated.

### 3. Results

#### 3.1. Recovery efficacy

Each water bucket was inoculated with the concentration of microorganisms indicated in Table 1. Bacteria and protozoa were quantified using one method (q(RT)PCR or the infectivity/immunofluorescence assays), whereas viruses were quantified with both methods. The recovery percentage for each microorganism represents the efficacy of recovery using the combination of SMF plus the efficacy of the method of quantification, either q(RT)PCR or the infectivity assay (Table 2). All of the negative control buckets were negative.

#### 3.2. Correlation between the recoveries for the different microorganisms

The recovery results of each of the samples were correlated to determine if there are relationships between the microorganisms for the q(RT)PCR results. Table 3 shows the results of the Spearman's correlation analysis of the values obtained, specifying the number of samples and the *p*-values. It also includes a graphical representation of the data in Cartesian planes inside a correlation matrix between each of the pairs compared. A positive correlation was found between the tested bacteria *H. pylori* and *E. coli* (Table 3). A positive but non-statistically significant correlation also occurred between all the viruses evaluated. *Acanthamoeba* recovery was not correlated with any microorganism evaluated by q(RT)PCR.

#### 3.3. Comparison of the quantification between q(RT)PCR and the infectivity assays

Viruses were enumerated with both q(RT)PCR and infectivity assays; the results for the recoveries are shown in Table 2 and the quantifications in Table 4. The descriptive results of both tables must be carefully interpreted because the small sample size of the infectivity assays does not allow an inferential assessment. For RoV, where 10 replicates are available, the Wilcoxon signed-rank test was computed.

The recoveries with q(RT)PCR and the infectivity assays for RoV show non-significant differences (*p*-value = 0.37). The descriptive results of HAdV in Table 2 may suggest a similar conclusion. In contrast, also in RoV, we detected significant differences (*p*-value = 0.002) between the quantities obtained by q(RT)PCR and by infectivity. Table 4 may suggest similar results for the rest of the organisms, but further experiments are required to confirm these preliminary results.

A ratio between the logarithm of the quantification between q(RT)PCR and infectivity was calculated to indicate how many times the quantifications varied relative to one another. The ratios for HAdV, RoV and MS2 were 1.13, 1.35 and 1.07, respectively.

**Table 2**  
Skimmed milk flocculation recoveries for each of the microorganisms evaluated.

Microorganisms	Method	Percent recovery					
		Mean %	CI 95% of mean	<i>n</i>	<i>sd</i>	min	max
HAdV	qPCR	66	53.5–78.5	10	17.4	32.2	86.7
	IFA	58.7	4.5–100	3	1.8	8.1	49.8
MS2	q(RT)PCR	23.9	19.6–28.1	13	7	13.8	36.8
	PFU	11.9	9–14.7	4	1.8	9.5	13.9
	q(RT)PCR	28.2	25.6–30.7	19	5.3	16	37.1
RoV	TCID50	26.1	17.1–35.1	10	12.6	43.5	83.7
	q(RT)PCR	14.7	10.8–18.7	3	1.6	12.9	15.8
BVDV	TCID50	0.7	0.4–1.1	3	0.13	0.67	0.89
	qPCR	59.6	40.3–79	10	27.1	15.6	98.7
<i>E. coli</i>	qPCR	30.2	24.4–36.1	9	7.6	20.8	41.5
<i>A. castellanii</i>	qPCR	20.5	14.9–26.1	9	7.2	13	32.1
<i>C. lambliia</i>	IFA	17.8	15–20.7	8	3.4	12.8	21.5
<i>C. parvum</i>	IFA	12.8	12.5–15.2	8	2.9	9.6	17.4

q(RT)PCR: quantitative (reverse transcriptase) PCR; IFA: immunofluorescence assay; PFU: plaque-forming units; TCID50: 50% tissue culture infective dose.

#### 3.4. The impact of recovery on the predicted concentration

The use of q(RT)PCR quantification in QMRA has been previously demonstrated (Rames et al., 2016). To better evaluate the real concentration of microorganisms when the quantification is obtained after SMF, we suggest extrapolation of the q(RT)PCR value incorporating the uncertainty and variability of the method. HAdV, RoV, MS2, *E. coli*, *H. pylori* and *A. castellanii* were used for this purpose. The upper and lower limits, including the real concentration in water samples with a 95% PI, were estimated using the non-parametric bootstrap approach described above. Despite the moderate sample size of our assays (between 9 and 19 replicates), the PIs show a reasonable width of approximately 4–5 units, supporting the applicability of this information for future observations.

As an example of how to use this information in practice, we take here the measurement previously published by Calgua et al. (2008) as a *future* measurement; their reported  $m_{ij}$  was  $2.73E + 4$  genomic copies in 10 L of HAdV. Substituting in Eqs. (4) and (5) the values in Table 5 (bootstrap-t PI method, row HAdV) we obtain:

$$\text{prob}(2.73E + 4 \times 1.027 \leq Y_{ij} \leq 2.73E + 4 \times 5.200) =$$

$$\text{prob}(2.80E + 4 \leq Y_{ij} \leq 1.42E + 5) = 0.95$$

$$\text{prob}(29.14\% \leq e_R \leq 147.57\%) = 0.95$$

In fact, Calgua et al. (2008) state that the real concentration inoculated in the sample was  $4.04E + 04$  with 68% recovery. Both quantities lie in their respective PIs computed above.

In Table 5, we have additionally computed the PI when a normal distribution of the recoveries is assumed. In some organisms, this PI may show comparable results to the bootstrap-t PI; for instance, in RoV (Table 5) they are almost identical. Fig. 1A can explain this concordance: normal, beta and kernel densities similarly fit the actual data. This is not the general case and, as a consequence, the normal and bootstrap PIs may show different coverages. For instance, in HAdV, the different results in Table 5 can be explained by the different fittings of the densities in Fig. 1B. The main reason to introduce the bootstrap-t predictions was the lack of fit of the normal distribution needed to correctly build prediction intervals.

### 4. Discussion

This is the first study to characterize the simultaneous concentration of viruses (including an enveloped virus), bacteria and protozoa with SMF. Moreover, this is the first study to correlate recoveries and evaluate the uncertainty of the results when using SMF for simultaneous concentration. Additionally, the evaluation of infectious viral particles has been included, since there was no previous information of recoveries with SMF using infectivity assays. The highest recoveries obtained in this experiment were with HAdV and *E. coli*. This method has been previously evaluated by spiking HAdV in seawater, river water and wastewater with recoveries by qPCR of 52%, between 41% and 50%, and between 30% and 95%, respectively (Calgua et al., 2008, 2013a,b). Moreover, SMF has been used to concentrate norovirus (NoV) with recoveries between 34 and 74% (Calgua et al., 2013a). The present study describes the recoveries of HAdV with confidence intervals that include these previous results, with higher sample size and suggesting that SMF with qPCR quantification may be used indistinctly in different water matrices without affecting the efficacy of the method.

SMF has been used in environmental samples to detect DNA viruses used as microbial source tracking tools, such as JC polyomavirus (JCPyV), porcine adenovirus and bovine polyomavirus, in superficial and ground water samples (Bofill-Mas et al., 2011); it has also been used in studies analysing a wide diversity of viruses, such as HAdV, NoV, JCPyV, RoV, Klassevirus, Asfarvirus-like virus and Merkel cell

**Table 3**

Correlation of the recoveries obtained by q(RT)PCR between microorganisms with the skimmed milk flocculation method.

RoV	<i>r</i>	0.51	0.53	0.59	0.51	0.08
	<i>n</i>	13	10	9	10	9
	<i>p</i>	0.073	0.118	0.096	0.134	0.848
MS2	<i>r</i>	0.38	0.46	0.16	0.16	
	<i>n</i>	10	9	10	9	
	<i>p</i>	0.274	0.213	0.904	0.676	
HAdV	<i>r</i>	−0.08	−0.25	−0.25		
	<i>n</i>	9	10	9		
	<i>p</i>	0.83	0.386	0.52		
<i>H. Pylori</i>	<i>r</i>	0.7	0.06			
	<i>n</i>	9	8			
	<i>p</i>	0.037*	0.896			
<i>E. coli</i>	<i>r</i>	0.27				
	<i>n</i>	9				
	<i>p</i>	0.48				
<i>A. castellanii</i>						

*r* = Spearman's rank correlation coefficient, *n* = paired sample size, *p* = *p*-value, \**p*-value < 0.05.

polymavirus in river water (Calgua et al., 2013a; Rusiñol et al., 2014, 2015) and HAdV, RoV, PP7 phage and NoV in seawater (Calgua et al., 2008; Rusiñol et al., 2014; Victoria et al., 2014). The SMF protocol with modifications has also been used to quantify HAdV, JCPyV and NoV in sewage water (Calgua et al., 2013b). Additionally, SMF has been modified to detect HAdV and NoV in strawberries with good results (Melgaço et al., 2016).

Enveloped viruses such as BVDV may be more stable than expected in water. Considering the lack of information available on the concentration protocols of enveloped viruses in water, it was decided to include in this study a representative enveloped virus, BVDV, an important pathogen for cattle. The recoveries of this virus using SMF were analysed in triplicate, and the applicability of available

methodologies, specifically qPCR and infectivity assays, was also evaluated. The analysis of BVDV, transmitted through inhalation and ingestion as main horizontal routes in cattle (MacLachlan and Dubovi, 2011), in water will produce useful information on the spread of BVDV through contaminated sources of water and animal drinking troughs.

The availability of cost-effective techniques for the simultaneous concentration of viruses, bacteria and parasites from water will be very useful when the monitoring of microbial water quality for diverse microbe types is desired (Hill et al., 2005). In addition, it will also be valuable for the application of next-generation sequencing methods and the characterization of the microbial population of water. Until now, there have been no other methods of concentration that allow for the evaluation of a representative volume (10 L), diverse water matrices with high and low turbidity, a high recovery percentage and the simultaneous evaluation of viruses, bacteria and protozoa.

Due to the importance of finding a suitable indicator of contamination, the correlation between the recoveries of the different pathogens and suggested indicators is relevant information that must be evaluated. In theory, flocs adsorb particles in an acid medium, which increases their weight and facilitates the precipitation of the particles over time (Calgua et al., 2008). These results suggest that the efficacy of the flocs to aggregate the particles in a water suspension may show small changes depending on the type of microorganism. The results also suggest that a single faecal indicator is not feasible; however, the correlations

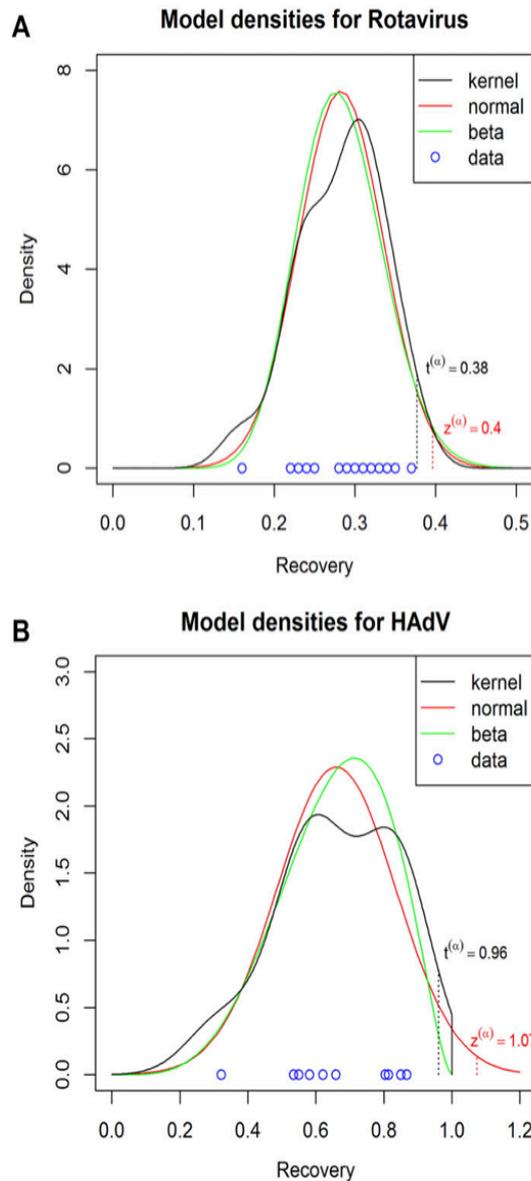
**Table 4**

A comparison between q(RT)PCR and infectivity results in the viral concentrates after skimmed milk flocculation.

Virus	N	Quantification		
		q(RT)PCR	Infectivity	Log <sub>10</sub> ratio q(RT)PCR/infectivity
RoV	10	6.25E + 06	1.06E + 05	1.35
MS2	4	7.38E + 08	1.83E + 08	1.07
HAdV	3	1.87E + 07	2.70E + 06	1.13
BVDV	3	3.09E + 07	4.67E + 03	2.04

**Table 5**  
Values used to compute a prediction interval for  $Y_u$  with a 95% confidence level (column 2.5% shows  $(\frac{-1}{r_{u,ms}}, 97.5\% (\frac{-1}{r_{u,ms}}))$ ).

Virus	n	Bootstrap-t		Normal (unknowns $\mu$ and $\sigma$ )	
		2.5%	97.5%	2.5%	97.5%
RoV	19	2.662	6.431	2.525	5.907
MS2	13	2.544	8.119	2.516	12.499
HAdV	10	1.027	5.200	0.932	4.059
<i>H. pylori</i>	9	2.023	5.734	2.054	8.467
<i>E. coli</i>	10	0.887	3.734	0.886	3.609
<i>A. castellanii</i>	9	2.711	10.990	2.627	34.465



**Fig. 1.** A: Rotavirus recoveries (dots over the axis) are similarly fitted by the density estimations: normal, beta and kernel. The similar PIs in Table 5 can be explained by the symmetry of the distributions and the similar tails of the 3 models. Notice the value of the quantiles  $t^{(\alpha)}$  and  $z^{(\alpha)}$  associated to the upper bounds of the bootstrap-t and normal prediction intervals with  $1 - \alpha = 95\%$  confidence. B: In contrast, in HAdV, the 3 models show a different fit on the upper right tail of the distribution. The discordance between the intervals for HAdV in Table 5 can be explained by taking into account that  $t^{(\alpha)}$  and  $z^{(\alpha)}$  are computed precisely on the tails of each distribution.

between bacteria and between viruses support the theory that *E. coli* and HAdV are suitable indicators for bacterial and viral contamination, respectively.

A ratio between the logarithm of the quantification between q(RT)PCR and infectivity suggests that the difference in quantification for these viruses was related to the proportion of non-infectious particles that may be produced in the cell lines where they have been cultured and the different sensitivities of the assays. The number of HAdVs detected in water using qPCR are typically 1 to 2 logs higher than estimates using culture-based methods (Rames et al., 2016). Moreover, HAdV and RoV are recognized to be resistant to pH, and their infectivity is not affected by the acidification of the sample in the SMF protocol (Attoui et al., 2012; Harrach et al., 2012). Although MS2 shows the smallest difference in quantification, the percentage of recoveries differ between q(RT)PCR and plaque-forming units. However, for an enveloped virus such as BVDV, either the recovery or the quantification was higher in q(RT)PCR (ratio of 2.03), which could be due to the acid pH (3.5) treatment (for approximately 16 h) that is used in the SMF protocol. In general, the sensitivity of infectivity assays has been traditionally considered to be lower in comparison with PCR techniques (Amini and Kraatz, 2014).

It is important to note that the model captures the random character of the unknown recoveries, but does not capture the random character of the concentrations in the sampled region. Therefore, the fitted error in the expression above refers to the technical error in the measurements but not the actual distribution of the organisms' concentrations in the water.

We strongly recommend using the extrapolation method with samples previously spiked with a surrogate virus or process control, such as the MS2 used in this study. We recommend verification of the recovery obtained with this surrogate, which might be between 10% and 38% (within 2 standard deviations of the mean of recovery) and is an interval that allows us to describe the variability and uncertainty of the SMF method in our laboratory. Another way to determine the recovery percentage in each laboratory is to estimate the mean and standard deviation of the surrogate under the particular laboratory conditions. Although variability is an intrinsic characteristic of each variable, the uncertainty introduces subjective "variability" into the variable (Vose, 2008). In addition, it may be increased or decreased by the expertise of the operator developing the SMF, the equipment, and the reagents. These may cause differences in the recoveries between operators or laboratories and should be taken into account.

The SMF recoveries are susceptible to improvement, and it is important to minimize the attachment of flocs to the lateral wall of the bucket after the sedimentation step and the loss of small pieces of flocs in the decanting process after the centrifugation step at 8000 rpm for 30 min. Although the use of non-adherent buckets may increase the recovery efficacy, this will make the SMF method more expensive. The fungible materials per sample were estimated to be low cost and can be disinfected or reused for other purposes or recycled.

The parameters that provide variability and uncertainty in HAdV and *E. coli* will be very useful in future studies. Under controlled conditions, the variability between the samples for the percentage of recovery in HAdV (CI 95%: 53.5–78.5%) includes the results of previous studies

with SMF (Calgua et al., 2008; Rusiñol et al., 2014, 2015). Therefore, we suggest modelling the recovery with the purpose of having a better approach for the real risk of the presence of the microorganism in water.

While the risk to a population is dictated by the frequency of contamination and the distribution of the dose, the probability of infection of an individual is ultimately based on the number of pathogens ingested (Ross, 2008). Errors in the precision of the quantification can underestimate the real concentration. Therefore, an extrapolation method that permits estimation of the real concentration of microorganisms in water samples is important in obtaining a better approach for future QMRA.

The distribution of the recovery under the controlled condition does not suggest that the distribution of the microorganisms in the environment occurs in the same way. It is important to consider that sampling methods of water in the environment have always been a limitation and require more work to determine the right way to describe the distribution of microorganisms in the environment (Petterson et al., 2015). Microbial water quality often varies rapidly and over a wide range. Short-term peaks in pathogen concentrations may increase disease risk considerably and may trigger outbreaks of water-borne disease, and furthermore, by the time the microbial contamination is detected, many people may have been exposed (Gorchev and Ozolins, 2011).

In summary, the low cost, repeatability, low variability, and applicability to the methods described for the simultaneous concentration of a diversity of microorganisms support SMF as a useful tool for the control of water safety. In addition, the possibility of obtaining intervals, which allows the prediction of the actual amount of microorganisms in the samples, including the uncertainty of the method, shows that SMF is an efficacious and efficient method for concentration and should be considered a robust procedure for evaluating the microbiological quality of water and the associated public health risk.

## 5. Conclusions

SMF can be used to efficiently and simultaneously concentrate viruses, bacteria and protozoa with repeatable results.

Statistically significant positive correlations were found between the recoveries of the bacteria evaluated, *E. coli* and *H. pylori*. Although the correlation between the recoveries of the viruses was not statistically significant, a positive correlation between them shows that HAdV is a suitable indicator for viral contamination.

Quantification by q(RT)PCR and infectivity methods shows ratios that suggest similar recoveries for HAdV-35 and RoV. They may be used indistinctly to evaluate these microorganisms with an SMF method of concentration.

The quantification of BVDB, which is sensitive to pH in the process of flocculation, is more efficiently conducted using q(RT)PCR than infectivity assays.

The estimation of the inoculums using q(RT)PCR quantification and the 95% bootstrap PI using the sample of the recovery estimates for each microorganism permits the acquisition of intervals that predict the real concentration of pathogens or indicators and may be used as a measure of uncertainty in QMRA studies.

## Funding information

This study was funded by the Water Challenges for a Changing World Joint Programming Initiative (W2013-095-C03-01), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO – AGL2014-55081-R) and the Grup de Recerca Consolidat: Virus, bacteris i protozoos d'interès en salut pública, aigua y aliments (Generalitat de Catalunya, Virbap – 2014-SGR-914).

## Acknowledgements

Eloy Gonzales-Gustavson would like to acknowledge the Presidente de la República scholarship from the Peruvian Government, which supported a PhD grant.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmimet.2017.01.006>.

## References

- Amini, K., Kraatz, H.-B., 2014. Recent advances and developments in monitoring biological agents in water samples. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14:23–48. <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-014-9351-5>.
- Anonymous, 1995. ISO 10705-1: Water Quality—Detection and Enumeration of Bacteriophages-Part 1: Enumeration of F-specific RNA Bacteriophages. International Organization for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- Attoui, H., Mertens, P., Becnel, J., Belaganaali, S., Betgoin, M., Bussaard, C., Chappell, J., Carlet, M., de Vas, M., Dermody, T., Dormitzer, P., Duncan, R., Fang, Q., Graham, R., Guglielmi, K., Harding, R., Hilman, B., Makkay, S., Marzachi, C., Matthijssens, J., Milne, R., Mohd Jaafar, F., Mori, H., Noordeloos, A., Omura, T., Patton, J., Rao, S., Mann, M., Stols, D., Suzuki, N., Upadhyaya, N., Wei, C., Zhou, H., 2012. Family reoviridae. In: King, A., Adams, M., Carstens, E., Lefkowitz, E. (Eds.), *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. Elsevier Academic Press, Davis, pp. 541–637.
- Bai, C., Bickel, P., Olshen, R., Marcus, M.B., 1990. Hyperaccuracy of bootstrap based prediction. In: Eberlein, E., Kuelbs, J. (Eds.), *Probability in Banach Spaces VII Proceedings of the Seventh International Conference*. Birkhauser, Boston, Cambridge, Massachusetts, pp. 31–42.
- Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Calgua, B., Rusinol, M., Maluquer de Motes, C., Girones, R., 2011. Cost-effective method for microbial source tracking using specific human and animal viruses. *J. Vis. Exp.* <http://dx.doi.org/10.3791/2820>.
- Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., Fernandez-cassi, X., Carratalà, A., Hundesa, A., Girones, R., 2013. Quantification of human and animal viruses to environmental samples. *Biomed. Res. Int.* 2013 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/675857>.
- Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Wyn-Jones, A.P., Lopez-Pila, J.M., Girones, R., 2008. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J. Virol. Methods* 153:79–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.003>.
- Calgua, B., Barardi, C.R.M., Bofill-Mas, S., Rodriguez-Manzano, J., Girones, R., 2011. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *J. Virol. Methods* 171:1–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.09.013>.
- Calgua, B., Fumian, T., Rusinol, M., Rodriguez-Manzano, J., Mbayed, V.A., Bofill-Mas, S., Miagostovich, M., Girones, R., 2013a. Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. *Water Res.* 47:2797–2810. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.043>.
- Calgua, B., Rodriguez-Manzano, J., Hundesa, A., Sunen, E., Galvo, M., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2013b. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J. Virol. Methods* 187:215–221. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.10.012>.
- Calgua, B., Carratala, A., Guerrero-Latorre, L., de Abreu Correa, A., Kohn, T., Sommer, R., Girones, R., 2014. UVC inactivation of dsDNA and ssRNA viruses in water: UV fluences and a qPCR-based approach to evaluate decay on viral infectivity. *Food Environ. Virol.* 260–268 <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-014-9157-1>.
- Estes, M., Greenberg, H., 2013. Rotaviruses. In: Knipe, D., Howley, P. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1347–1401.
- Eusebi, L.H., Zagari, R.M., Bazzoli, F., 2014. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 19:1–5. <http://dx.doi.org/10.1111/hel.12165>.
- Gascon, J., 2006. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. *Digestion* 73:102–108. <http://dx.doi.org/10.1159/000089785>.
- Gorchev, H.G., Ozolins, G., 2011. WHO guidelines for drinking-water quality. *WHO Chron.* 38:104–108. [http://dx.doi.org/10.1016/S1462-0758\(00\)00006-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1462-0758(00)00006-6).
- Harrach, B., Benkő, M., Both, G., Brown, M., Davidson, A., Echavarría, M., Hess, M., Jones, M., Kajon, A., Lehmkühl, H., Mautner, V., Mittal, S., Wadell, G., 2012. Family Adenoviridae. In: King, A., Adams, M., Carstens, E., Lefkowitz, E. (Eds.), *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 125–141.
- Herrroth, B.E., Conden-Hansson, A.-C., Rehnstam-Holm, A.-S., Girones, R., Allard, A.K., 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4523–4533. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.9.4523>.
- Hill, V.R., Polaczyk, A.L., Hahn, D., Narayanan, J., Cromeans, T.L., Roberts, J.M., Amburgey, J.E., 2005. Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6878–6884. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.11.6878-6884.2005>.
- Hill, V.R., Narayanan, J., Gallen, R.R., Ferdinand, K.L., Cromeans, T., Vinjé, J., 2015. Development of a nucleic acid extraction procedure for simultaneous recovery of DNA and

- RNA from diverse microbes in water. *Pathogens* 4:335–354. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens4020335>.
- Johnson, C.H., Rice, E.W., Reasoner, D.J., 1997. Inactivation of *Helicobacter pylori* by chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4969–4970.
- Khan, I.U.H., Gannon, V., Kent, R., Koning, W., Lapen, D.R., Miller, J., Neumann, N., Phillips, R., Robertson, W., Topp, E., van Bochove, E., Edge, T.A., 2007. Development of a rapid quantitative PCR assay for direct detection and quantification of culturable and non-culturable *Escherichia coli* from agriculture watersheds. *J. Microbiol. Methods* 69: 480–488. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.016>.
- Lambrecht, E., Baré, J., Chavatte, N., Bert, W., Sabbe, K., Houf, K., 2015. Protozoan cysts act as survival niche and protective shelter for foodborne pathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 81. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01031-15> (AEM.01031-15).
- Losurdo, M., Mari, V., Lucente, M.S., Colaanni, M.L., Padalino, I., Cavaliere, N., Buonavoglia, C., Decaro, N., 2015. Development of a TaqMan assay for sensitive detection of all pestiviruses infecting cattle, including the emerging HoBi-like strains. *J. Virol. Methods* 224:77–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.013>.
- MacLachlan, J., Dubovi, E., 2011. *Fenner's Veterinary Virology*, fourth ed. Academic Press, San Diego <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-375158-4.00030-4>.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., Stahl, D., 2014. *Brock Biology of Microorganisms*, 14th ed. Pearson, Harlow.
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G., 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:273–307. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.16.2.273-307.2003>.
- Melgaço, F.G., Victoria, M., Correa, A.A., Ganime, A.C., Malta, F.C., Brandao, M.L.L., de Mello Medeiros, V., de Oliveira Rosas, C., Bricio, S.M.L., Miagostovich, M.P., 2016. Virus recovering from strawberries: evaluation of a skimmed milk organic flocculation method for assessment of microbiological contamination. *Int. J. Food Microbiol.* 217: 14–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.005>.
- Mojirshuibani, M., 1998. Iterated bootstrap prediction intervals. *Stat. Sin.* 8, 489–504.
- Moreno, Y., Ferrús, M.A., 2012. Specific detection of cultivable *Helicobacter pylori* cells from wastewater treatment plants. *Helicobacter* 17:327–332. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-5378.2012.00961.x>.
- OIE, 2015. Bovine viral diarrhoea. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Office International des Epizooties, Paris, France, pp. 1–22.
- Otto, P.H., Reetz, J., Eichhorn, W., Herbst, W., Elschner, M.C., 2015. Isolation and propagation of the animal rotaviruses in MA-104 cells—30 years of practical experience. *J. Virol. Methods* 223:88–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.07.016>.
- Pettersson, S., Grøndahl-Rosado, R., Nilsen, V., Myrmed, M., Robertson, L.J., 2015. Variability in the recovery of a virus concentration procedure in water: implications for QMRA. *Water Res.* 87:79–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.006>.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R., 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3376–3382.
- Qvarnstrom, Y., Visvesvara, G.S., Sriram, R., Da Silva, A.J., 2006. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J. Clin. Microbiol.* 44:3589–3595. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00875-06>.
- R Core Team, 2016. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (URL <https://www.R-project.org/>).
- Rames, E., Roiko, A., Stratton, H., Macdonald, J., 2016. Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. *Water Res.* 96:308–326. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.042>.
- Ross, T., 2008. Microbial ecology in food safety risk assessment. In: Schaffner, D. (Ed.), *Microbiological Risk Assessment of Foods*. ASM Press, Washington DC, pp. 51–98.
- Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Hunders, A., Vieira, C., Kern, A., Eriksson, I., Ziros, P., Kay, D., Miagostovich, M., Vargha, M., Allard, A., Vantarakis, A., Wyn-Jones, P., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2014. Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas. *Water Res.* 59:119–129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.013>.
- Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Carratala, A., Abril, J.F., Silvera, C., Figueras, M.J., Gelati, E., Rodó, X., Kay, D., Wyn-Jones, P., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2015. Evidence of viral dissemination and seasonality in a Mediterranean river catchment: implications for water pollution management. *J. Environ. Manag.* 159:58–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.05.019>.
- Santiago, P., Moreno, Y., Ferrús, M.A., 2015. Identification of viable *Helicobacter pylori* in drinking water supplies by cultural and molecular techniques. *Helicobacter* 20: 252–259. <http://dx.doi.org/10.1111/hel.12205>.
- USEPA, 2005. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. EPA 815-R-05-002. Off. Water, Washington, DC.
- van Duin, J., Olsthoorn, R.C.L., 2012. *Family Leviviridae*. In: King, A., Adams, M., Carstens, E., Lefkowitz, E. (Eds.), *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. Elsevier Academic Press, Davis, pp. 1035–1043.
- Victoria, M., Fumian, T.M., Rocha, M.S., Dalmao, F., Leite, J.P.G., Girones, R., Miagostovich, M.P., 2014. Gastroenteric virus dissemination and influence of rainfall events in urban beaches in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 117:1210–1218. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12592>.
- Vose, D., 2008. *Risk Analysis a Quantitative Guide*, third ed. John Wiley and Sons, Wiltshire, England.
- Wold, W.S., Horwitz, M., 2013. Adenoviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1732–1767.
- World Health Organization, 2014. Preventing Diarrhoea Through Better Water, Sanitation and Hygiene. pp. 1–32. (Online).
- Zeng, S.Q., Halkosalo, A., Salminen, M., Szakal, E.D., Puustinen, L., Vesikari, T., 2008. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J. Virol. Methods* 153:238–240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.004>.



## Characterization of nutrient-removing microbial communities in two full-scale WWTP systems using a new qPCR approach



Tarik Abzazou<sup>a,\*</sup>, Humbert Salvadó<sup>b</sup>, Yexenia Cárdenas-Youngs<sup>a</sup>, Alberto Becerril-Rodríguez<sup>a</sup>, Eva M<sup>a</sup>. Ciriéro Cebirán<sup>c</sup>, Anna Huguet<sup>c</sup>, Rosa M<sup>a</sup>. Araujo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

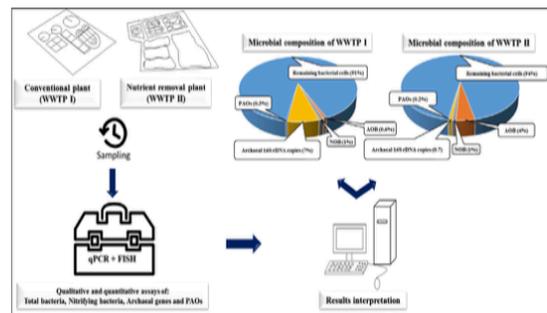
<sup>b</sup> Department of Animal Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Empresa Mixta d'Aigües de la Costa Brava S.A., Roses WWTP, Camí Arenes s/n 17480 Roses, Girona, Spain

### HIGHLIGHTS

- Microbial composition of two WWTPs was characterized using qPCR and FISH techniques.
- gBlocks were used as a rapid and easy technique for elaboration of DNA standards.
- The log-linear range of DNA standards was improved at least one order of magnitude.
- Microbial composition of WWTPs was in accordance with the operational performance.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 November 2016

Received in revised form 22 August 2017

Accepted 23 August 2017

Available online 17 October 2017

#### Keywords:

gBlocks

FISH

AOB

NOB

Archaeal gene

PAOs

### ABSTRACT

Biological wastewater treatment processes involve very complex microbial communities. Culture-independent molecular methods are feasible tools used to analyze and control the structure of different microbial communities, such as bacterial communities that remove nutrients. Here, we used the gBlocks gene fragments method, a new real-time PCR approach for the development of DNA standards, to quantify total bacterial cells, AOB, NOB, and Archaeal genes at two different WWTPs. PAOs were also quantified using the FISH technique. Our findings highlight a significant improvement in real-time PCR detection for the microorganisms studied. The qPCR and FISH technique applied allowed characterization of the microbial composition of two WWTPs operated as a conventional WWTP and a biological nutrient-removal WWTP. The results revealed a significant difference in the microbial profiles of the WWTPs, with a higher abundance of nitrifying bacterial communities and PAOs in the nutrient removal plant, which were in accordance with operational performance.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [tabzazou@ub.edu](mailto:tabzazou@ub.edu) (T. Abzazou), [hsalvado@ub.edu](mailto:hsalvado@ub.edu) (H. Salvadó), [emciriéro@aiguescb.com](mailto:emciriéro@aiguescb.com) (E.M.C. Cebirán), [amhuguet@aiguescb.com](mailto:amhuguet@aiguescb.com) (A. Huguet), [raraujo@ub.edu](mailto:raraujo@ub.edu) (R.M.<sup>a</sup> Araujo).

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.241>  
0048-9697/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Biological processes are widely used at the main bioengineering facilities for the treatment of domestic wastewater. All such processes necessarily depend on a very complex microbial composition, especially its bacterial composition. Nevertheless, the exploration of this microbial composition in the full-scale WWTPs is still in discovery phase.

Therefore, understanding the ecology that governs the biological processes is of great importance. By determining the underlying principles dictating structure and function in these complex microbial communities, process failures may be avoided and treatment systems optimized. Biological nutrient removal systems have been widely used in most WWTPs to prevent ecological problems such as eutrophication of water sources (Semerci and Hasilci, 2016). Biological nutrient removal processes are usually based on anaerobic, anoxic and aerobic phases linked in series (Cosenza et al., 2013; Lu et al., 2015).

Nitrogen is one of the most important contaminants of water bodies and is mainly present in wastewaters in its reduced form as ammoniacal nitrogen. In the biological nitrogen removal (BNR) process, the nitrogen is removed in two steps through nitrification and denitrification processes. In the nitrification step, the ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) is first oxidized metabolically to nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) under aerobic conditions: the step known as nitrification. This process is carried out mainly by ammonia-oxidizing bacteria (AOB), as the principal oxidizing organisms. However, other organisms can be involved in this process, such as ammonia-oxidizing archaea (AOA) (Gao et al., 2013). In the second step of nitrification, the step called nitritation, the nitrite is oxidized rapidly to nitrate by nitrite-oxidizing bacteria (NOB) in the presence of molecular oxygen.

Phosphorus, as well as being an important macronutrient, is considered an important pollutant that contributes directly to the eutrophication of aquatic systems as a key limiting nutrient. The biological process used for phosphorus removal processes is known as enhanced biological phosphorus removal (EBPR). EBPR is based on the capacity of certain microorganisms, such as polyphosphate-accumulating organisms (PAOs), to take up excess orthophosphate and store it as polyphosphate. Then, the stored phosphorus is removed with the biomass from the WWTP (Bao et al., 2007). The features of EBPR, high P-removal efficiency, lower operational costs, lower sludge production and the potential recovery of phosphorus, have contributed to its widespread use (Nielsen et al., 2012).

Since all the aforementioned biological nutrient removal processes are necessarily dependent on microorganisms, understanding the community dynamics of the different microorganisms involved in these processes is becoming essential for performance optimization of wastewater treatment. To gain this understanding, we require accurate, rapid and easy to

perform microbial quantification techniques. This has led to the recent use of advanced biotechnology, especially molecular techniques, in different environmental fields (Gilbride et al., 2006). Generally, the molecular techniques used to explore wastewater microbial communities can be roughly grouped into four categories: clone libraries, molecular fingerprinting, hybridization and quantitative real-time PCR (qPCR) (Kim et al., 2013). In this work, we focused our study on the use of qPCR and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques, which are adequate for the characterization, quantification and monitoring of the microbial communities at WWTPs. The potential of qPCR as a routine microbial monitoring tool is recognized due to its rapidity, specificity and accuracy. These features mean that qPCR is suitable to apply in different wastewater treatment processes, including processes with fixed and suspended microbial communities under both aerobic and anaerobic conditions (Hall et al., 2002; Kindaichi et al., 2006; Lee et al., 2011; Limpiyakorn et al., 2005). Usually, qPCR involves the use of DNA plasmids or pure cell cultures for the preparation of standard curves of a known quantity of the target DNA; however, these methods can be expensive and time consuming. One alternative method that can resolve these inconveniences is the chemical synthesis of a known concentration of double-stranded DNA fragments with DNA targets as qPCR standards known as Double-stranded gBlocks Gene Fragments.

The objectives of this work were: (i) to design DNA standards for qPCR using **Double-stranded gBlocks Gene Fragments**; (ii) to set up a qPCR technique for the quantification of total bacterial cells, AOB, NOB, and Archaeal 16S rDNA gene in two different WWTPs; (iii) to set up and apply FISH technique for the quantification of PAOs; and (iv) to compare the microbial communities at a conventional WWTP and a biological nutrient removal WWTP, and their operational performance.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sampling

Activated sludge samples (1 L) were collected fortnightly for three months from two WWTPs in the province of Girona (Spain). The samples were collected and processed within 24 h of collection. The

**Table 1**  
Average values and standard deviations of the measured operational parameters for each WWTP.

Parameter	WWTP's	
	WWTP I	WWTP II
Volume capacity ( $\text{m}^3$ )	7500	7700
Flow rate ( $\text{m}^3 \text{day}^{-1}$ )	7691 $\pm$ 2363	5023 $\pm$ 1061
HRT (days)	0.86 $\pm$ 0.08	1.50 $\pm$ 0.23
F/M ( $\text{kg DBO}_5 \text{kg MLSS}^{-1} \text{day}^{-1}$ )	0.17 $\pm$ 0.13	0.06 $\pm$ 0.05
Sludge age (days)	5.5 $\pm$ 2.3	14.68 $\pm$ 6.9
$\text{O}_2$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0.62 $\pm$ 0.29	2.16 $\pm$ 0.14
TSS ( $\text{mg L}^{-1}$ )	1698 $\pm$ 360	4816 $\pm$ 801
VSS ( $\text{mg L}^{-1}$ )	1347 $\pm$ 420	3460 $\pm$ 643
$\text{BOD}_5$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Influent	140.33 $\pm$ 32.88
	Effluent	4.33 $\pm$ 2.16
	Removal rate (%)	96.9
COD ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Influent	419.16 $\pm$ 152.57
	Effluent	103.16 $\pm$ 19.80
	Removal rate (%)	75.38
$\text{NH}_4^+$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Influent	41.17 $\pm$ 3.37
	Effluent	29.50 $\pm$ 6.35
	Removal rate (%)	28.34
TN ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Influent	53.16 $\pm$ 5.98
	Effluent	38.15 $\pm$ 10.42
	Removal rate (%)	28.23
TKN ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Influent	53.16 $\pm$ 5.98
	Effluent	38.00 $\pm$ 10.50
	Removal rate (%)	28.51
P ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Influent	5.41 $\pm$ 1.55
	Effluent	1.80 $\pm$ 1.87
	Removal rate (%)	44.5

TN: total nitrogen. TKN: Total Kjeldahl nitrogen.

**Table 2**  
Double-stranded gBlocks gene fragments.

Specificity	Sequence 5'–3'	Length (bp)	Location on 16S rDNA	GBNA <sup>b</sup> of 16S rDNA
Total bacterial cells and <i>Nitrospira</i> spp. <sup>a</sup>	See annex	507 <sup>c</sup>	1–437	AF420301
AOB	See annex	348	2933–3280	AL954747
<i>Nitrobacter</i> spp.	See annex	359	151–500	DQ388518
Archaeal 16S rDNA	See annex	493	263–755	AB019724

<sup>a</sup> Same standard was used for the quantification of both total bacteria and *Nitrospira* spp.

<sup>b</sup> GenBank accession number.

<sup>c</sup> Two 35 bp clamps were added to the ends of the standard (see Material and Methods).

WWTPs studied were the municipal plants of Roses and Castelló d'Empúries: WWTP I and WWTP II, respectively. Both plants use activated sludge combined with a Carrousel system with different organic loads. WWTP I is designed for conventional biological treatment; while WWTP II is designed for biological nitrogen removal with enhanced biological phosphorus removal. Table 1 shows the principal physicochemical features of the plants studied.

### 2.2. Preparation of qPCR standards

Standard curves for the quantification of all the microorganisms studied in this work were prepared in triplicate using Double-stranded gBlocks Gene Fragments as control templates. The gene fragments consisted of linear double-stranded DNA sequences designed from the conserved 16S rDNA gene of the microorganisms studied. Table 2 summarizes the specific features of each sequence of oligonucleotides. In the case of total bacterial cells and *Nitrospira* spp., two 35 bp clamps were added to the ends of the 16S rDNA to stabilize the DNA standard: CGTG ACATCCAGTCAGATCGTACGTCAGACTTCGA was added at the 5' terminal; while TAGCCGAATCGTCCATTGAAAATCGATCTACGTAG was added at the 3' terminal. All the gBlocks were synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies). The complete sequences of all the standards are listed as an Annex. The desired concentrations of standards were prepared following the manufacturing's instructions. The quality and amounts of the DNA of all the standards provided by the manufacturing company were checked using a Qubit Fluorometer (Invitrogen). The number of copies was calculated using the following equation (Whelan et al., 2003):

$$\text{DNA (copy)} = \frac{6.02 \times 10^{23} (\text{copies mol}^{-1}) \times \text{DNA amount (g)}}{\text{DNA length (bp)} \times 660 (\text{g mol}^{-1}\text{pb}^{-1})}$$

**Table 3**  
Oligonucleotide primers and Taqman probes used in this work

Target organism	Primer/probe	Sequence (5' to 3')	Ta (°C)	Reference
Bacterial 16S rDNA	1055f	ATGGCTGTCGTCAGCT	50	(Ferris, Muyzer, and Ward, 1996) (Lane, 1991) (Harms et al., 2003)
	1392r	ACGGCGGTGTGTAC		
	16STaq1115	6-FAM-CAACGAGCCGAACCC-TAMRA		
Ammonia-oxidizing bacterial 16S rDNA	CTO 189fA/B	GGAGRAAAGCAGGGATCG	60	(Hermansson and Lindgren, 2001) (Hermansson and Lindgren, 2001) (Hermansson and Lindgren, 2001) (Hermansson and Lindgren, 2001)
	CTO 189fC	GGAGGAAAGTAGGGGATCG		
	RT1r	CTTCCTCAGACCARTACTG		
	TMP1	6-FAM-CAACTAGCTAATCAGRCATCRGCCGTC-TAMRA		
<i>Nitrospira</i> spp. 16S rDNA	NSR1113f	CCTGCTTTCAGTGTACCCG	60	(Dionisi et al., 2002) (Dionisi et al., 2002) (Harms et al., 2003)
	NSR1264r	GTTTGACAGCGCTTGTACCG		
	NSR1143Taq	6-FAM-AGCACTCTGAAAGGACTGCCAGC-TAMRA		
<i>Nitrobacter</i> spp. 16S rDNA	Nitro-1198f	ACCCCTAGCAAATCTCAAAAACCG	58	(Graham et al., 2007) (Graham et al., 2007) (Graham et al., 2007) (Graham et al., 2007)
	Nitro-1423r	CTTCAACCCAGTCGCTGACC		
	Nitro-1374Taq	6-FAM-AAACCCGCAAGGAGGCAGCCGACC-TAMRA		
	Arch349F	GYGCASAGKCGMGAAW		
Total Archaea	Arch806R	GGACTACVSGGGTATCTAAT	56	(Takai and Horikoshi, 2000) (Takai and Horikoshi, 2000)
	Arch516F	6-FAM-TGYCAGCCGCCGGTAAHACCVGC-TAMRA		

Ta: Temperature of annealing.

### 2.3. Real-time PCR analysis

Samples of 1 and 0.3 mL were used for DNA extraction from WWTP I and WWTP II, respectively. The samples were centrifuged at 16,000g for 5 min and total genomic DNA was extracted from the resultant pellet using the Power Soil DNA Isolation Kit (MOBIO) following the manufacturing's instructions. The quality and yield of the DNA recovered was measured using a Qubit Fluorometer (Invitrogen). The DNA was extracted in duplicate and stored at –80 °C. Real-time PCR assays for the quantification of 16S rDNA of total bacteria, AOB, *Nitrospira* spp., *Nitrobacter* spp., and Archaea were performed using a StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher, SCIENTIFIC). All Real-time PCR assays were performed in duplicate in 48-well plates, including no template controls. The primer sets and probes applied in this work were synthesized by Biomers and are displayed in Table 3.

### 2.4. Real-time PCR for quantification of bacterial 16S rDNA

Bacterial 16S rDNA copies were quantified using the primer set 1055f/1392r, and TaqMan probe 16STaq1115 (Table 2). The real-time PCR mixture with a total volume of 25 µL was prepared using FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche). The same master mix was used for all the q-PCR: 15 pmol of each primer, 6.25 pmol of TaqMan probe 16STaq1115 and 10 µL of template DNA diluted 1:10 in sterile water. The PCR thermal profile was 3 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, and 45 cycles at 95 °C for 30 s, 50 °C for 1 min, and 72 °C for 20 s. Standard curves for the quantification of total bacterial 16S rDNA were prepared using a serial dilution of known concentration of the double-stranded gBlocks fragment as the control standard (Table 3). The standard was adjusted to 372 to 3.72 × 10<sup>8</sup> copies per reaction.

### 2.5. Real-time PCR for quantification of AOB 16S rDNA

The AOB 16S rDNA was amplified using set of two forwards, CTO 189fA/B and CTO 189fC, the reverse RT1r and probe TMP1 (Table 2). The real-time PCR mixture of 25  $\mu$ L was prepared using the master mix with 7.5 pmol of a 1:2 ratio of the forwards CTO 189fA/B and CTO 189fC, 7.5 pmol of reverse RT1r, 3.125 pmol of probe TMP1 and 10  $\mu$ L of template DNA diluted 1:10 in sterile water. The real-time PCR program was 2 min at 50  $^{\circ}$ C, 10 min at 95  $^{\circ}$ C, 40 cycles at 95  $^{\circ}$ C for 30 s and combined annealing and extension at 60  $^{\circ}$ C for 1 min. Standard curves for the quantification of AOB 16S rDNA were prepared using a serial dilution of the DNA standard (Table 3). The dilutions were adjusted to between 26.2 and  $2.62 \times 10^8$  copies per reaction.

### 2.6. Real-time PCR for quantification of Nitrospira 16S rDNA

The real-time PCR for the quantification of *Nitrospira* spp. 16S rDNA was carried out using the set of primers NSR1113f and NSR1264r, and probe NSR1143Taq (Table 2). The real-time PCR mixture of 25  $\mu$ L was prepared using the master mix with 15 pmol of primers, NSR1113f and NSR1264r, 6.25 pmol of probe NSR1143Taq and 10  $\mu$ L of template DNA diluted 1:10 in sterile water. The real-time PCR program consisted of 2 min at 50  $^{\circ}$ C, 10 min at 95  $^{\circ}$ C, 55 cycles at 95  $^{\circ}$ C for 30 s and annealing and extension at 63  $^{\circ}$ C for 1 min. Standard curves for the quantification of *Nitrospira* spp. 16S rDNA were prepared using the same serial dilution concentrations of standard of bacterial 16S rDNA.

### 2.7. Real-time PCR for quantification of Nitrobacter 16S rDNA

The number of copies of *Nitrobacter* spp. 16S rDNA was determined using the primer set Nitro-1198f/Nitro-1423r, and probe Nitro-1374Taq (Table 2). The real-time PCR reaction was performed in a total volume of 25  $\mu$ L of mixture containing: the master mix, 15 pmol of the primers Nitro-1198f and Nitro-1423r, 6.25 pmol of dual-labeled probe Nitro-1374Taq and 10  $\mu$ L of template DNA. The thermal profile for real-time PCR was 2 min at 50  $^{\circ}$ C, initial denaturation at 95  $^{\circ}$ C for 2 min, followed by 40 cycles of 95  $^{\circ}$ C for 20 s and annealing at 68  $^{\circ}$ C for 40 s. Standard curves were prepared using an eight logarithmic dilution of the DNA standard from 25.4 to  $2.54 \times 10^8$  copies per reaction.

### 2.8. Real-time PCR for quantification of Archaeal 16S rDNA gene

The real-time PCR for the quantification of the Archaeal 16S rDNA gene was performed using universal PCR primers set Arch349F/Arch806R, and universal fluorogenic probe Arch516F (Table 3). The real-time PCR mixture of 25  $\mu$ L was prepared using the master mix, 20 pmol of the primers, Arch349F and Arch806R, 6.25 pmol of probe Arch516F and 10  $\mu$ L of direct template DNA. The real-time PCR program, adapted from Takai and Horikoshi (2000), consisted of 2 min at 50  $^{\circ}$ C, 10 min at 96  $^{\circ}$ C, 30 cycles at 96  $^{\circ}$ C for 25 s and annealing and extension at 56  $^{\circ}$ C for 6 min. Standard curves were prepared based on a serial dilution of the DNA standard. The dilutions were performed over four orders of magnitude: from  $2.41 \times 10^4$  to  $2.41 \times 10^8$  copies per reaction.

### 2.9. Quantification of PAOs by FISH

The activated sludge samples were disaggregated by a double mechanism, combining syringe treatment and a sonication method (Abzazou

et al., 2015). The disaggregated samples were fixed in 4% paraformaldehyde (R Amann and L. Krumholz, 1990), and processed using the FISH technique as described by Abzazou et al. (2015). Briefly, the samples were fixed on a Teflon printed microscope slide and covered with the FISH mixture solution. The hybridization reactions were performed in an equilibrated humidity chamber at 46  $^{\circ}$ C for 90 min. The oligonucleotide probes applied in this work were PAO462, PAO651 and PAO846 (Table 4); all labeled at the 5' position with fluorochrome Cy3 (Biomers). The FISH quantification was performed by direct counting of 10 random fields in each well using an epifluorescence microscope (Nikon Optiphot, Japan) equipped with a Nikon DM 580 filter, and the following equation was used:

$$C = X \cdot A_c / A_{Mf} \cdot D.F.$$

C: PAO cells  $L^{-1}$ .

X: Average number of PAOs cells in each observed microscopic field.

A<sub>c</sub>: Total area of each field of the Teflon slide.

A<sub>Mf</sub>: Area of the microscopic field.

D.F.: Dilution factor.

### 2.10. Statistical analysis

The microbial abundance at the different plants studied was compared using Statgraphic Centurion XVI (v.16.1.18) software. In accordance with the results of the Shapiro-Wilk test of normality, the numerical abundance of total bacterial cells, AOB, *Nitrospira* spp. and Archaeal 16S rDNA gene copies were compared between the plants using the Kruskal-Wallis test; while the abundance of *Nitrobacter* spp. and PAOs were compared using ANOVA. A Spearman rank correlation was used to test the statistical relationships between the numerical abundance of microbial communities and operational data of the plants studied. Values below the limit of detection (LOD) were substituted by a value of half the LOD. All statistical tests of the hypotheses were performed with the  $p \leq 0.05$  as the significance level.

## 3. Results

### 3.1. Set-up and optimization of real-time PCR standard curves

Standard curves for the quantification of the microorganisms studied using real-time PCR were prepared using double-stranded gBlocks gene fragments as template controls. The results of the principal parameters of the standards curves are shown in Table 5. The findings show all the standards were successfully achieved with optimal values of efficiency and regression coefficients ( $R^2$ ). The results also show the different linear ranges of detection of the standard curves according to the corresponding targets, as performed using a series of dilutions of standard gBlocks fragments. The standard curve for *Nitrospira* spp. 16S rDNA showed a minimum LOD of 3.72 copies per reaction; while the curve of Archaeal 16S rDNA presented a higher minimum LOD of  $2.41 \times 10^3$  copies per reaction.

### 3.2. Application of real-time PCR assays to sludge samples

The extraction of genomic DNA from activated sludge samples was achieved using the commercial Power Soil DNA Isolation Kit. The average values of extracted DNA with the corresponding ranges were

**Table 4**  
Oligonucleotide probes and hybridization conditions applied in this study (Crocetti et al., 2000).

Probe	Sequence (5' to 3')	Specificity	Formamide (%)
PAO462	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	Most Accumilbacter	35%
PAO651	CCCTCGCCAACCTCCAG	Most Accumilbacter	35%
PAO846	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	Most Accumilbacter	35%

**Table 5**  
Detection limit and specific parameters of standard curve of studied Real-Time PCR.

Specificity	Slope value	R <sup>2</sup>	Efficiency %	Linear detection (copies reaction <sup>-1</sup> )
Bacteria 16S rDNA	-3.20	0.99	105	$3.72 \times 10^2$ – $3.72 \times 10^8$
AOB 16Sr DNA	-3.15	0.99	107	$2.62 \times 10^1$ – $2.62 \times 10^8$
<i>Nitrospira</i> spp. 16S rDNA	-3.16	0.99	106	$3.72 \times 10^0$ – $3.72 \times 10^8$
<i>Nitrobacter</i> spp. 16S rDNA	-3.23	0.99	103	$2.54 \times 10^1$ – $2.54 \times 10^8$
Archaeal 16S rDNA	-3.17	0.97	106	$2.41 \times 10^3$ – $2.41 \times 10^9$

17.35 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  (min 11.3–max 20.90) and 36.04 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  (min 16.98–max 56.04) in samples from WWTPs I and II, respectively. According to these results, the recovery of genomic DNA from the activated sludge samples was significantly different for the two WWTPs. For the samples from WWTP II, the DNA amount was approximately double that for the samples from WWTP I.

Real-time PCR was applied using DNA extractions diluted 1:10 (V/V) in order to minimize possible inhibition. In the case of the Archaeal 16S rDNA gene, the samples were analyzed directly due to the high LOD found for the Archaeal standard. The results of all qPCRs are summarized in Table 6. As can be seen from the table, all the microorganisms studied were successfully detected and quantified at both WWTPs. In addition to the average values of the microorganisms in six samples from each WWTP, the table shows the percentage of each microorganism within the total bacterial biomass. The gene copy number/cell is assumed to be 3.6 for bacterial 16S rDNA, and 1 for *Nitrospira* spp., *Nitrobacter* spp. and AOB 16S rDNA. In the case of Archaeal 16S rDNA, the results are presented as copies of the Archaeal 16S rDNA gene per liter without conversion to number of cells as information on the number of gene copies per cell was not available in the literature. No signal was detected from the “no template” blank control in any of the analysis.

In the conventional plant, WWTP I, the average total number of bacterial cells was  $1.92 \times 10^{11}$  cells  $\text{L}^{-1}$  with a standard deviation of just  $0.3 \times 10^{11}$  cells  $\text{L}^{-1}$ , showing high stability over the study period of three months. In terms of numerical abundance, the NOB belonging to genera of *Nitrobacter* spp. were the most abundant subpopulation with  $2.29 \times 10^9$  cells  $\text{L}^{-1}$  (>1% of total bacteria) followed by AOB, with an average of  $1.26 \times 10^9$  cells  $\text{L}^{-1}$  (0.65% of total bacteria). The results showed that NOB of *Nitrospira* spp. were less abundant and less stable than *Nitrobacter* spp.; the number of *Nitrospira* spp. per liter of activated sludge samples was close to the LOD according to the standard curve. Finally, the qPCR of Archaea showed high number of copies of the Archaeal 16S rDNA gene with an average value of  $1.40 \times 10^{10}$  copies  $\text{L}^{-1}$ .

In the WWTP designed for biological nitrogen removal with enhanced biological phosphorus removal, WWTP II, the average total concentration of bacterial cells was  $8.36 \times 10^{11}$  cells  $\text{L}^{-1}$ . With respect to nitrifying bacteria, AOB were more abundant than NOB, with an average of  $3.64 \times 10^{10}$  cells  $\text{L}^{-1}$ ; >3% of total bacteria. Meanwhile, in the NOB, *Nitrobacter* spp. was the dominate group, with an average of  $4.96 \times 10^9$  cells  $\text{L}^{-1}$ , 0.66% of total bacteria, compared with  $2.81 \times 10^9$  cells of *Nitrospira* spp. per liter of activated sludge samples: 0.31% of total bacteria. In the case of Archaea, the number of copies of the Archaeal 16S

**Table 6**  
Average values abundance with standard deviation of microorganisms studied in the three plants.

Target cells	Cells $\text{L}^{-1}$		% Biomass	
	WWTP I	WWTP II	WWTP I	WWTP II
Bacterial 16S rDNA	$19.2 \pm 0.3 \times 10^{11}$	$8.36 \pm 4.06 \times 10^{11}$	100	100
AOB 16S rDNA	$1.26 \pm 1.6 \times 10^9$	$3.64 \pm 4.03 \times 10^{10}$	$0.65 \pm 0.8$	$3.40 \pm 2.85$
<i>Nitrospira</i> 16S rDNA	$8.61 \pm 7.7 \times 10^4$	$2.81 \pm 2.01 \times 10^9$	$>0.00 \pm 0.0$	$0.31 \pm 0.10$
<i>Nitrobacter</i> 16S rDNA	$2.29 \pm 1.2 \times 10^9$	$4.96 \pm 1.58 \times 10^9$	$1.25 \pm 0.8$	$0.66 \pm 0.20$
Archaeal 16S rDNA <sup>a</sup>	$1.40 \pm 1.1 \times 10^{10}$	$5.80 \pm 2.60 \times 10^9$	-	-

<sup>a</sup> In the case of Archaeal 16S rDNA the values are presented in copies of gene per L instead cells  $\text{L}^{-1}$ .

**Table 7**  
Average values of PAOs using FISH technique.

	WWTP I	WWTP II
PAOs (cells $\text{L}^{-1}$ )	$6.46 \pm 5.29 \times 10^8$	$1.70 \pm 0.46 \times 10^9$

rDNA gene was slightly lower in this plant, with an average value of  $5.80 \times 10^9$  copies of 16S rDNA per liter of activated sludge samples.

### 3.3. Detection and quantification of PAOs using the FISH assay

The FISH technique for PAOs in this work using the fluorescent probes PAO462, PAO651 and PAO846 was necessarily used due to the unavailability of specific fluorogenic probes for the quantification of PAOs by qPCR. According to periodic analysis of activated sludge samples throughout the study period, PAOs were successfully detected and quantified in both WWTPs; the results are presented in Table 7. Quantification of PAOs shows that they were present in high numerical abundance ( $1.70 \times 10^9$  cells  $\text{L}^{-1}$ ) in WWTP II, designed for biological nitrogen removal and enhanced biological phosphorus removal processes. Meanwhile, in WWTPs I, the abundance of PAOs was lower with averages of  $6.46 \pm 5.29 \times 10^8$  cells  $\text{L}^{-1}$ .

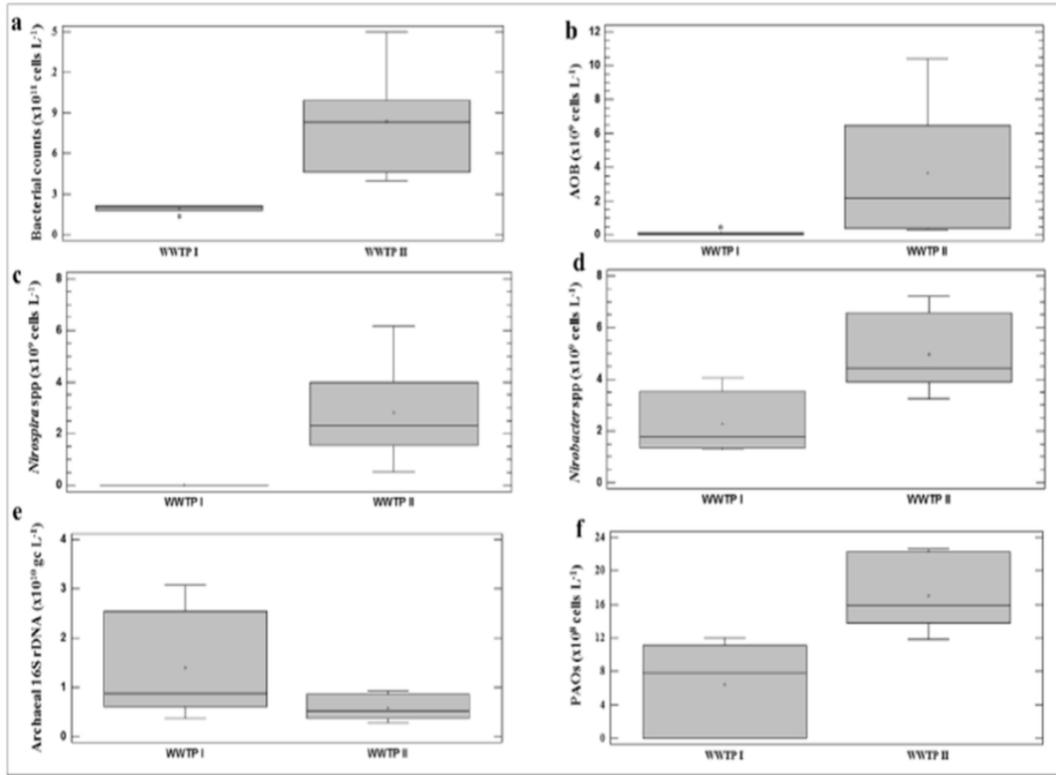
### 3.4. Nutrient-removing microbial communities in WWTPs

The microbial communities at the different WWTPs using different processes were compared. Fig. 1 is a graphical comparison of microbial abundance at WWTP I and WWTP II. The statistical analysis of the data showed a significant difference between the total bacterial cells counted at the plants studied ( $p \geq 0.05$ ,  $n = 12$ ). The same results were found for all the nitrifying bacteria and PAOs ( $p \geq 0.05$ ,  $n = 12$ ). In the case of the Archaeal 16S rDNA gene, there was no significant difference between genomic copies quantified at the two WWTPs. The graphical comparison between the plants studied shows clear stability of the microbial communities at the conventional plant, WWTP I, especially for total bacterial cells and nitrifying bacteria.

In spite of the limited number of samples analyzed per plant, possible significant correlations between microbial composition data and operational performance of the plants were studied. The results are shown in Table 8; only significant correlations are presented. The table shows the correlation coefficient between the numerical abundance of the microorganisms quantified and the operational data, including nutrient removal loads. As can be seen from the table, the microorganisms studied correlated strongly with the operational data of volatile suspended solids (VSS) and dissolved oxygen (DO) ( $p \leq 0.05$ ,  $n = 12$ ). On other hand, regarding the operational performance, the results show a clear correlation between the abundance of nutrient-removing microbial communities and nutrient removal load ( $p \leq 0.05$ ,  $n = 12$ ).

## 4. Discussion

A new real-time PCR approach using double-stranded gBlocks gene fragments as the standard was performed together with the FISH



**Fig. 1.** Comparison of microbial abundance between WWTP I and II using box and whiskers plots; (a) total bacterial cells quantified, (b) AOB, (c) *Nitrospira* spp., (d) *Nitrobacter* spp. (e) Archaeal 16S rDNA quantified by qPCR and (f) PAOs quantified by FISH technique. gc: genomic copy. Means are presented by open circles and medians are horizontal solid lines within each box.

technique to characterize and track microbial composition of two WWTPs working with different processes.

Standard curves were successfully produced based on the synthesized double DNA technique for total bacterial cells, AOB, NOB including *Nitrospira* spp. and *Nitrobacter* spp., and the Archaeal 16S rDNA gene. In addition to the advantages of being fast, easy and reliable, the technique using gBlocks DNA fragments allows the for more than one DNA target in the same gBlocks Gene Fragment, which represents a significant cost saving when designing DNA standards.

For total bacteria, the log-linear detection range was six orders of magnitude from  $3.72 \times 10^2$  to  $3.72 \times 10^8$  copies of 16S rDNA per reaction. Comparison of our results with the previously published work (Harms et al., 2003), revealed an improvement in the LOD for total bacterial cells in WWTPs. A broad LOD is most important when working with highly diluted activated sludge samples, when such dilution

supposes a decrease in the number of bacteria cells in samples; and also for samples collected from other sampling points, such as WWTP effluent samples, which usually present a reduced number of bacterial cells.

For AOB 16S rDNA, the standard curve showed a log-linear range of seven orders of magnitude from  $2.62 \times 10^1$  to  $2.62 \times 10^8$  copies per PCR. In addition to presenting a broad detection range, the standard devised using the gBlocks technique made it possible to detect and quantify fewer copies per PCR than reported in previous studies (Harms et al., 2003). For *Nitrospira* spp., the LOD ranged from 3.72 to  $3.72 \times 10^8$  copies per reaction. Compared with all the other DNA standards designed in this work, the *Nitrospira* spp. standard had the broadest range: eight orders of magnitude with the lowest minimum LOD. Due to a limited number of publications concerning the use of real-time PCR with fluorogenic probes to study nitrifying bacteria in WWTPs, all our data

**Table 8**

Spearman's rank correlation coefficient between microorganism abundance and operational data, p value is presented in brackets.

Microorganisms	Operational data					
	VSS (mg L <sup>-1</sup> )	DO (mg L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> removal load (mg L <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> effluent (mg L <sup>-1</sup> )	TN removal load (mg L <sup>-1</sup> )	PO <sub>4</sub> -P removal load (mg L <sup>-1</sup> )
Bacterial cells	0.76 (0.01)	0.80 (0.00)	–	–	–	–
AOB	–	0.76 (0.01)	0.68 (0.02)	–	0.58 (0.04)	–
<i>Nitrospira</i> spp.	–	0.76 (0.01)	0.71 (0.01)	–	0.79 (0.00)	–
<i>Nitrobacter</i> spp.	–	0.74 (0.01)	–	–	0.68 (0.02)	–
NOB <sup>a</sup>	–	0.79 (0.00)	0.71 (0.01)	–	0.78 (0.00)	–
Nitrifying bacteria <sup>b</sup>	–	0.80 (0.00)	0.80 (0.00)	0.64 (0.03)	0.94 (0.00)	–
PAOs	–	0.70 (0.00)	–	–	–	0.82 (0.00)

<sup>a</sup> Sum of AOB, *Nitrospira* spp. and *Nitrobacter* spp.

<sup>b</sup> Sum of AOB and NOB.

were compared with the work published by Harms et al., 2003. For *Nitrobacter* spp., the standard curve showed a linear detection range of seven orders of magnitude:  $2.54 \times 10^1$  to  $2.54 \times 10^8$  copies per reaction.

The findings of the present work represent detailed information regarding the LOD of *Nitrobacter* spp. in WWTPs using a qPCR technique with a specific DNA probe, in comparison with most published work, which has used the SYBR Green molecule as a fluorescent marker for a long time, instead of fluorogenic specific probes (Zeng et al., 2014).

For total Archaeal communities, and in spite of the ecological importance that they can have in WWTP systems, there are very few published data regarding the methods of its quantification using qPCR techniques (Bai et al., 2012), especially qPCR based on fluorogenic probes. In this work, a DNA standard was successfully used for accurate quantification of the total Archaeal 16S rDNA gene. The results showed a linear detection range of six orders of magnitude:  $2.41 \times 10^3$  to  $2.4 \times 10^9$  copies of Archaeal 16S rDNA per reaction.

The data obtained for all the microorganisms studied in the present work offer a new alternative to the traditional use of plasmids as a DNA standard for real-time PCR. One of the most important advantages of the gBlocks technique, besides being a fast, and simple compared with the traditional use of plasmids as standards, is that it also allows the design of a single gBlocks fragment that can carry more than one DNA target as a standard, which supposes an importance saving in both time and manufacturing costs.

Generally, total bacterial cells account for between 90% and 95% of the total biomass in activated sludge (Wagner et al., 1993). Based on this data and on the significant linear correlation found between the DNA concentration recovered from the activated sludge samples and the total number of bacterial cells,  $R = 0.72$  ( $p \leq 0.05$ ,  $n = 12$ ), the total bacteria abundance can be estimated directly through the concentration of the DNA extracted. Nevertheless, this estimation is only valid considering the type of samples studied in this work and the working conditions of this study, as well as the ranges of both DNA concentrations and bacterial abundance found. On other hand, as was expected, a significant linear correlation  $R = 0.71$  ( $p \leq 0.05$ ,  $n = 12$ ) was found between total bacterial cells and amount of DNA extracted. The findings highlight the useful of VSS as key parameter for the estimation of total bacterial cells in WWTP, as reported by other work (Abzazou et al., 2015).

We successfully characterized and quantified different microorganisms using real-time PCR with gBlocks DNA fragments as standards in two full-scale WWTPs operating with different processes. The results show a different microbial composition profile for the two WWTPs studied. WWTP II showed a higher total bacterial abundance ( $8.36 \pm 4.06 \times 10^{11}$  cells  $L^{-1}$ ) than WWTP I, where the average of  $1.92 \pm 0.3 \times 10^{11}$  cells  $L^{-1}$  corresponded to half the abundance reported in other work (Dionisi et al., 2002; Harms et al., 2003). The high total bacterial abundance recorded at WWTP II was necessarily due to the high values of operational parameters, especially to those recognized as key parameters for bacterial growth, such as sludge age, DO, VSS, influent BOD<sub>5</sub> and COD. The high values of all these parameters were more favorable for bacteria growth in WWTP II than in WWTP I.

The quantitative comparison of AOB between the two WWTPs studied revealed significant differences in abundance between the plants. As expected, the abundance of AOB at WWTP II, designed for nitrogen and phosphorus removal process, was one order of magnitude higher than that at WWTP I. This difference in AOB abundance was directly reflected in the observed ammonia removal rate; the ammonia removal rate registered at WWTP I did not reach 30% while at WWTP II this rate was >90%. This observation can also be attributed to the intervention of other factors such as sludge age, which was relatively low in the case of WWTP I, and DO. This last factor was strongly correlated with the abundance of AOB, showing the important role of DO as a key parameter in the achievement of a high and stable AOB population in biological reactors (Wells et al., 2009).

Regarding NOB, *Nitrobacter* spp. were the most predominant at the plants studied, especially WWTP I. Since *Nitrobacter* spp. are *r*-strategists, high maximum specific growth and the high abundance of *Nitrobacter* spp. detected at WWTP II can be directly related to the elevated sludge age (14.68 days) measured in this plant. The same explanation holds for *Nitrospira* spp., which presented a lower abundance at WWTP I than at WWTP II, bearing in mind that *Nitrospira* spp. are *k*-strategists, which mean they have a low maximum specific growth rate (Nogueira and Melo, 2006).

In contrast, the statistical analysis showed that the activity of NOB registered at both WWTPs was more probably due to *Nitrospira* spp. than to *Nitrobacter* spp., similar results were reported by several published studies (Daims et al., 2001; Huang et al., 2010; Schramm et al., 1999). This observation was based on the significant correlation between *Nitrospira* spp. and the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> removal load, which is supposed to be equivalent to NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produced in the plants: the substrate necessary for *Nitrospira* spp. growth. Taking into account the undetected concentration of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> influent registered at both the WWTPs studied, the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> registered in effluents of the plants was evidence of NOB activity. No direct correlation was found between NOB and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> due to total denitrification, which suggests supposes an underestimation of the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produced at the plants. Generally, the characterization of total nitrifying bacteria was marked by a clear role of sludge age and DO in nitrification processes, especially in the maintenance of a stable community of nitrifying bacteria.

With respect to Archaeal cells, the present work was limited to their detection as one of the microorganisms that can play a key role in nutrient removal processes, e.g. ammonia oxidation. The 16S rDNA gene from Archaea was successfully amplified from all the activated sludge samples from the WWTPs studied, showing high numbers of copies per liter. Due to limited information regarding the number of copies of the 16S rDNA gene per Archaeal cell, the results were presented without final transformation to number of Archaeal cells per liter. However, if we assume that Archaeal cells carry just one copy of 16S rDNA, the findings of the present study show the high abundance that Archaeal cells can have in WWTPs; it can be even higher than that of nitrifying bacteria. Consequently, the detection of high numbers of copies of the Archaeal 16S rDNA gene also indicate the possible presence of specific Archaeal members, especially those involved in nutrient removal processes as well as AOA, which can contribute simultaneously with AOB to nitrification (Bai et al., 2012).

Due to the unavailability of a specific fluorogenic probe for quantification of PAOs using real-time PCR, these were successfully detected and quantified using the FISH technique. The specificity of the probes applied, PAO462, PAO651 and PAO846, was previously tested and confirmed using the GenBank database. As expected, the findings of the quantitative FISH showed a significance abundance of PAOs at WWTP II, which was designed for enhanced biological phosphorus removal. The large PAOs abundance recorded at WWTP II was clearly reflected in a high PO<sub>4</sub>-P removal rate: around 72% compared with 44.5% at WWTP I. According to the PO<sub>4</sub>-P uptake estimation calculated in this work, taking into account both the WWTPs studied ( $1.66 \times 10^{-10}$  mg of PO<sub>4</sub>-P cell<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), the quantified PAOs showed high metabolic activity compared with other published works (Bao et al., 2007).

In summary, qPCR with the gBlocks gene fragments technique was successfully used as a new alternative to the traditional DNA plasmid technique. All the qPCR implemented in this study was significantly improved in terms of the LOD of the microorganisms studied. The microbial composition of two WWTPs operating differently was successfully characterized using qPCR and FISH techniques. The microbial profiles of the plants studied were different, especially in terms of microorganisms responsible of biological nutrient removal process, which were more abundant in the WWTP II designed for nitrogen and phosphorus removal. Most of the microorganisms quantified were directly linked with the observed operational performance of the WWTPs studied.

## Acknowledgments

The authors thank the Aigües de la Costa Brava (EMACBSA) Company for their contribution by providing samples and physicochemical data.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.241>.

## References

- Abzazou, T., Araujo, R.M., Auset, M., Salvadó, H., 2015. Tracking and quantification of nitrifying bacteria in biofilm and mixed liquor of a partial nitrification MBBR pilot plant using fluorescence in situ hybridization. *Sci. Total Environ.* 541:1115–1123. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.007>.
- Abzazou, T., Salvadó, H., Bruguera-Casamada, C., Simón, P., Lardín, C., Araujo, R.M., 2015. Assessment of total bacterial cells in extended aeration activated sludge plants using flow cytometry as a microbial monitoring tool. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4372-3>.
- Amann, R., L. Krumholz, D.A.S., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*
- Bai, Y., Sun, Q., Wen, D., Tang, X., 2012. Abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in industrial and domestic wastewater treatment systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80:323–330. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01296.x>.
- Bao, L., Li, D., Li, X., Huang, R., Zhang, J., Yang, L.V., Xia, G., 2007. Phosphorus accumulation by bacteria isolated from a continuous-flow two-sludge system. *J. Environ. Sci. (China)* 19, 391–395.
- Cosenza, A., Bella, G. Di, Mannina, G., Torregrossa, M., Viviani, G., 2013. Biological Nutrient Removal and Fouling Phenomena in a University of Cape Town Membrane Bioreactor Treating High Nitrogen Loads. Vol. 139:pp. 773–780. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000667](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000667).
- Crocetti, G.R., Hugenholtz, P., Bond, P.L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D., Blackall, L.L., 2000. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1175–1182. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1175-1182.2000>.
- Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.H., Wagner, M., 2001. In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5273–5284. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5273-5284.2001>.
- Dionisi, H.M., Layton, A.C., Harms, G., Gregory, I.R., Robinson, K.G., Saylor, G.S., 2002. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:245–253. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.245-253.2002>.
- Ferris, M.J., Muyzer, G., Ward, D.M., 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 340–346.
- Gao, J.-F., Luo, X., Wu, G.-X., Li, T., Peng, Y.-Z., 2013. Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants. *Bioresour. Technol.* 138: 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.176>.
- Gilbride, K.A., Lee, D.-Y., Beaudette, L.A., 2006. Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *J. Microbiol. Methods* 66:1–20. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.016>.
- Graham, D.W., Knapp, C.W., Van Vleck, E.S., Bloor, K., Lane, T.B., Graham, C.E., 2007. Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. *ISME J.* 1: 385–393. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.45>.
- Hermansson, A., Lindgren, P.E., 2001. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:972–976. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.972-976.2001>.
- Hall, S.J., Hugenholtz, P., Siyambalapatiya, N., Keller, J., Blackall, L.L., 2002. The Development and Use of Real-Time PCR for the Quantification of Nitrifiers in Activated Sludge. *Water Science and Technology*, pp. 267–272.
- Harms, G., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Gregory, I.R., Garrett, V.M., Hawkins, S.A., Robinson, K.G., Saylor, G.S., 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 37:343–351. <https://doi.org/10.1021/es0257164>.
- Huang, Z., Gedalanga, P.B., Asvathanagul, P., Olson, B.H., 2010. Influence of physicochemical and operational parameters on Nitrobacter and Nitrospira communities in an aerobic activated sludge bioreactor. *Water Res.* 44:4351–4358. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.037>.
- Kim, J., Lim, J., Lee, C., 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnol. Adv.* 31:1358–1373. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.010>.
- Kindaichi, T., Kawano, Y., Ito, T., Satoh, H., Okabe, S., 2006. Population dynamics and in situ kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR. *Biotechnol. Bioeng.* 94:1111–1121. <https://doi.org/10.1002/bit.20926>.
- Lane, D.J., 1991. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *J. Basic Microbiol.* John Wiley & Sons Inc, Chichester, pp. 115–148.
- Lee, I.-S., Parameswaran, P., Rittmann, B.E., 2011. Effects of solids retention time on methanogenesis in anaerobic digestion of thickened mixed sludge. *Bioresour. Technol.* 102:10266–10272. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.079>.
- Limpiyakorn, T., Shinohara, Y., Kurisu, F., Yagi, O., 2005. Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54:205–217. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.03.017>.
- Lu, Q., Wu, H., Li, H., Yang, D., 2015. Enhanced Biological Nutrient Removal in Modified Carbon Source Division Anaerobic Anoxic Oxidation Process With Return Activated Sludge Pre-concentration. Vol. 23:pp. 1027–1034. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2014.11.013>.
- Nielsen, P.H., Saunders, A.M., Hansen, A.A., Larsen, P., Nielsen, J.L., 2012. Microbial communities involved in enhanced biological phosphorus removal from wastewater—a model system in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23:452–459. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.027>.
- Nogueira, R., Melo, L.F., 2006. Competition between *Nitrospira* spp. and *Nitrobacter* spp. in nitrite-oxidizing bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 95:169–175. <https://doi.org/10.1002/bit.21004>.
- Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J.C., Ottengraf, S., Amann, R., 1999. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospora* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3690–3696.
- Semerci, N., Hasilci, N.B., 2016. Fate of carbon, nitrogen and phosphorus removal in a post-anoxic system treating low strength wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 108:166–174. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.008>.
- Takai, K., Horikoshi, K., 2000. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5066–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.5066-5072.2000>.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K.H., 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1520–1525.
- Wells, G.F., Park, H.-D., Yeung, C.-H., Eggleston, B., Francis, C.A., Criddle, C.S., 2009. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea. *Environ. Microbiol.* 11:2310–2328. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01958.x>.
- Whelan, J.A., Russell, N.B., Whelan, M.A., 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol. Methods* 278, 261–269.
- Zeng, W., Bai, X., Zhang, L., Wang, A., Peng, Y., 2014. Population dynamics of nitrifying bacteria for nitrification achieved in Johannesburg (JHB) process treating municipal wastewater. *Bioresour. Technol.* 162:30–37. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.102>.

# 10. Anexos



## 10. Anexos

### ANEXO I.A: CRITERIOS DE CALIDAD PARA LA REUTILIZACIÓN DE LAS AGUAS SEGÚN SUS USOS.

#### Calidad requerida

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMÁTODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
<b>1.USOS URBANOS</b>					
CALIDAD 1.1: RESIDENCIAL <sup>2</sup> a) Riego de jardines privados. <sup>3</sup> b) Descarga de aparatos sanitarios. <sup>3</sup>	1 huevo/10 L	0 UFC/100 mL	10 mg/L	2 UNT	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertidos: se deberá limitar la entrada de contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Legionella</i> spp. 100 UFC/ L (si existe riesgo de aerosolización)
CALIDAD 1.2: SERVICIOS a) Riego de zonas verdes urbanas (parques, campos deportivos y similares). <sup>9</sup> b) Baldeo de calles. <sup>9</sup> c) Sistemas contra incendios. <sup>9</sup> d) Lavado industrial de vehículos. <sup>9</sup>	1 huevo /10 L	200 UFC/ 100 mL	20 mg/L	10 UNT	

<sup>1</sup> Considerar en todos los grupos de calidad al menos los géneros: Ancylostoma, Trichuris y Ascaris.

<sup>2</sup> Deben someterse a controles que aseguren el correcto mantenimiento de las instalaciones.

<sup>3</sup> Su autorización estará condicionada a la obligatoriedad de la presencia doble circuito señalizado en todos sus tramos hasta el punto de uso

<sup>4</sup> Unidades Formadoras de Colonias.

<sup>5</sup> Unidades Nefelométricas de Turbiedad.

<sup>6</sup> ver el Anexo II del RD 849/1986, de 11 de abril.

<sup>7</sup> ver el Anexo IV del RD 907/2007, de 6 de julio.

<sup>8</sup> Norma de calidad ambiental ver el artículo 245.5.a del RD 849/1986, de 11 de abril, modificado por el RD 606/2003 de 23 de mayo.

<sup>9</sup> cuando exista un uso con posibilidad de aerosolización del agua, es imprescindible seguir las condiciones de uso que señale, para cada caso, la autoridad sanitaria, sin las cuales, esos usos no serán autorizados.

## Continuación del Anexo I A.

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMÁTODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
<b>2.USOS AGRÍCOLAS <sup>1</sup></b>					
<b>CALIDAD 2.1:</b> a) Riego de cultivos con sistema de aplicación del agua que permita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles para alimentación humana en fresco	1 huevo/10 L	100 UFC/100 mL Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases <sup>3</sup> con los siguientes valores: n= 10 m= 100 UFC/100 mL M= 1.000 UFC/100 mL c=3	20 mg/L	10 UNT	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido de aguas residuales: se deberá limitar la entrada de contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Legionella</i> spp. 1.000 UFC/ L (si existe riesgo de aerosolización) Es obligatorio llevar a cabo la detección de patógenos Presencia/ Ausencia ( Salmonella, etc.) cuando se repita habitualmente que c=3 para M=1.000

182

<sup>1</sup> Características del agua regenerada que requieren información adicional: Conductividad 3,0 dS/m; Relación de Adsorción de Sodio (RAS): 6 meq/L; Boro: 0,5 mg/L; Arsénico: 0,1 mg/L; Berilio: 0,1 mg/L; Cadmio: 0,01 mg/L; Cobalto: 0,05 mg/L; Cromo: 0,1 mg/L; Cobre: 0,2 mg/L; Manganeseo: 0,2 mg/L; Molibdeno: 0,01 mg/L; Níquel: 0,2 mg/L; Selenio : 0,02 mg/L; Vanadio: 0,1 mg/L.. Para el cálculo de RAS se utilizará la fórmula:

$$RAS(\text{meq} / \text{L}) = \frac{[\text{Na}]}{\sqrt{\frac{[\text{Ca}] + [\text{Mg}]}{2}}}$$

<sup>2</sup> Cuando exista un uso con posibilidad de aerosolización del agua, es imprescindible seguir las condiciones de uso que señale, para cada caso, la autoridad sanitaria, sin las cuales, esos usos no serán

<sup>3</sup> Siendo n: número de unidades de la muestra; m: valor límite admisible para el recuento de bacterias; M: valor máximo permitido para el recuento de bacterias; c: número máximo de unidades de muestra cuyo número de bacterias se sitúa entre m y M.

## Continuación del Anexo I.A.

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMÁTODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
<b>2.USOS AGRÍCOLAS <sup>1</sup></b>					
<p><b>CALIDAD 2.2:</b></p> <p>a) Riego de productos para consumo humano con sistema de aplicación de agua que no evita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles, pero el consumo no es en fresco sino con un tratamiento industrial posterior.</p> <p>b) Riego de pastos para consumo de animales productores de leche o carne.</p> <p>c) Acuicultura.</p>	1 huevo/10 L	1.000 UFC/100 mL Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases <sup>1</sup> con los siguientes valores: n= 10 m= 1.000 UFC/100 mL M= 10.000 UFC/100 mL c=3	35 mg/L	No se fija límite	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido de aguas residuales: se deberá limitar la entrada de contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Taenia saginata</i> y <i>Taenia solium</i> : 1 huevo/L (si se riegan pastos para consumo de animales productores de leche) Es obligatorio llevar a cabo la detección de patógenos Presencia/ Ausencia ( Salmonella, etc.) cuando se repita habitualmente que c=3 para M=10.000
<p><b>CALIDAD 2.3</b></p> <p>a) Riego localizado de cultivos leñosos que impida el contacto del agua regenerada con los frutos consumidos en la alimentación humana.</p> <p>b) Riego de cultivos de flores ornamentales, viveros, invernaderos sin contacto directo del agua regenerada con las producciones.</p> <p>c) Riego de cultivos industriales no alimentarios, viveros, forrajes ensilados, cereales y semillas oleaginosas.</p>	1 huevo/10 L	10.000 UFC/100 mL	35 mg/L	No se fija límite	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización del vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Legionella</i> spp. 100 UFC/L

<sup>1</sup> Siendo n: número de unidades de la muestra; m: valor límite admisible para el recuento de bacterias; M: valor máximo permitido para el recuento de bacterias; c: número máximo de unidades de muestra cuyo número de baterías se sitúa entre m y M.

**Continuación del Anexo I.A.**

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMÁTODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
<b>3.USOS INDUSTRIALES</b>					
<p>CALIDAD 3.1<sup>1</sup>:</p> <p>a) Aguas de proceso y limpieza excepto en la industria alimentaria.</p> <p>b) Otros usos industriales.</p>	No se fija límite	10.000 UFC/100 mL	35 mg/L	15 UNT	<p>OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido de aguas residuales: se deberá limitar la entrada de contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs.</p> <p><i>Legionella</i> spp. 100 UFC/L</p>
<p>c) Aguas de proceso y limpieza para uso en la industria alimentaria</p>	1 huevo/10 L	<p>1.000 UFC/100 mL</p> <p>Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases<sup>2</sup> con los siguientes valores:</p> <p>n= 10;</p> <p>m= 1.000 UFC/100 mL;</p> <p>M= 10.000 UFC/100 mL;</p> <p>c=3</p>	35 mg/L	No se fija límite	<p>OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización del vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs.</p> <p><i>Legionella</i> spp. 100 UFC/L</p> <p>Es obligatorio llevar a cabo la detección de patógenos Presencia/ Ausencia (<i>Salmonella</i>, etc.) cuando se repita habitualmente que c=3 para M=10.000</p>
<p>CALIDAD 3.2</p> <p>a) Torres de refrigeración y condensador es evaporativos.</p>	1 huevo/10 L	Ausencia UFC/ 100 mL	5 mg/L	1 UNT	<p><i>Legionella</i> spp. 100 UFC/L</p> <p>Para su autorización se requerirá:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- La aprobación, por la autoridad sanitaria, del Programa específico de control de las instalaciones contemplado en el Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis.</li> <li>- Uso exclusivamente industrial y en localizaciones que no estén ubicadas en zonas urbanas ni cerca de lugares con actividad pública o comercial.</li> </ul>

<sup>1</sup> Cuando exista un uso con posibilidad de aerosolización del agua, es imprescindible seguir las condiciones de uso que señale, para cada caso, la autoridad sanitaria, sin las cuales, esos usos no serán autorizados.

<sup>2</sup> Siendo n: número de unidades de la muestra; m: valor límite admisible para el recuento de bacterias; M: valor máximo permitido para el recuento de bacterias ; c: número máximo de unidades de muestra cuyo número de bacterias se sitúa entre m y M.

**Continuación del Anexo I.A.**

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMÁTODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
<b>4.USOS RECREATIVOS</b>					
CALIDAD 4.1 <sup>1</sup> : a) Riego de campos de golf.	1 huevo/10 L	200 UFC/100 mL	20 mg/L	10 UNT	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido de aguas residuales: se deberá limitar la entrada de contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. Si el riego se aplica directamente a la zona del suelo (goteo, microaspersión) se fijan los criterios del grupo de Calidad 2.3 <i>Legionella</i> spp. 100 UFC/L (Si existe riesgo de aerosolización)
CALIDAD 4.2 a) Estanques, masas de agua y caudales ornamentales, en los que está impedido el acceso del público al agua.	No se fija límite	10.000 UFC/100 mL	35 mg/L	No se fija límite	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización del vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. P <sub>T</sub> : 2 mg P/L (en agua estancada)

185

<sup>1</sup> Cuando exista un uso con posibilidad de aerosolización del agua, es imprescindible seguir las condiciones de uso que señale, para cada caso, la autoridad sanitaria, sin las cuales, esos usos no serán autorizados.

**Continuación del Anexo I.A.**

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMÁTODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
<b>5.USOS AMBIENTALES</b>					
CALIDAD 5.1: a) Recarga de acuíferos por percolación localizada a través del terreno.	No se fija límite	1.000 UFC/100 mL	35 mg/L	No se fija límite	N <sub>T</sub> <sup>1</sup> : 10 mg N/L NO <sub>3</sub> : 25 mg NO <sub>3</sub> /L  Art. 257 a 259 del RD 849/1986
CALIDAD 5.2 a) Recarga de acuíferos por inyección directa.	1 huevo/10 L	0 UFC/100 mL	10 mg/L	2 UNT	
CALIDAD 5.3 a) Riego de bosques, zonas verdes y de otro tipo no accesibles al público. b) Silvicultura.	No se fija límite	No se fija límite	35 mg/L	No se fija límite	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización del vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs.
CALIDAD 5.4 a) Otros usos ambientales (mantenimiento de humedales, caudales mínimos y similares).	La calidad mínima requerida se estudiará caso por caso				

186

<sup>1</sup> Nitrógeno total, suma nitrógeno inorgánico y orgánico presente en la muestra.

## ANEXO I B: FRECUENCIA MÍNIMA DE MUESTREO Y ANÁLISIS DE CADA PARÁMETRO

El control deberá realizarse a la salida de la planta de regeneración, y en todos los puntos de entrega del usuario.

La frecuencia de análisis se modificará en los siguientes supuestos:

- i. Tras 1 año de control se podrá presentar una solicitud motivada para reducir la frecuencia de análisis hasta un 50%, para aquellos parámetros que no sea probable su presencia en las aguas.
- ii. Si el número de muestras con concentración inferior al VMA del Anexo I.A es inferior al 90% de las muestras durante controles de un trimestre (o fracción, en caso de periodos de explotación inferiores), se duplicará la frecuencia de muestreo para el periodo siguiente.
- iii. Si el resultado de un control supera al menos en uno de los parámetros los rangos de desviación máxima establecidos en el Anexo I.C, la frecuencia de control del parámetro que supere los rangos de desviación se duplicará durante el resto de este periodo y el siguiente.

La frecuencias mínimas de análisis se especifican en la tabla siguiente:

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

## ANEXO I.C: EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS AGUAS REGENERADAS

La calidad de las aguas regeneradas se valorará mediante el análisis de muestras tomadas sistemáticamente en todos los puntos de entrega de las mismas y con las frecuencias mínimas previstas en el Anexo I.B.

### CRITERIOS DE CONFORMIDAD

La calidad de las aguas regeneradas se considerará adecuada a las exigencias de este real decreto si en los controles analíticos de un trimestre, o fracción cuando el periodo de explotación sea inferior, cumpla simultáneamente.

- i. El 90% de las muestras tendrá resultados inferiores a los VMA en todos los parámetros específicos del Anexo I.A.,
- ii. Las muestras que superen el VMA del Anexo I.A no sobrepasen los límites de desviación máxima establecidos a continuación
- iii. Para las sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las Normas de Calidad Ambiental en el punto de entrega de las aguas regeneradas según la legislación propia de aplicación.

PARÁMETRO	LÍMITE DE DESVIACIÓN MÁXIMA
Nemátodos intestinales	100 % del VMA
<i>Escherichia coli</i>	1 unidad logarítmica
<i>Legionella</i> spp.	1 unidad logarítmica
<i>Taenia saginata</i>	100 % del VMA
<i>Taenia solium</i>	100 % del VMA
Sólidos en suspensión	50 % del VMA
Turbidez	100 % del VMA
Nitratos	50 % del VMA
Nitrógeno Total	50 % del VMA
Fósforo Total	50 % del VMA
*Se entiende por desviación máxima la diferencia entre el valor medio y el VMA	

### MEDIDAS DE GESTIÓN FRENTE A INCUMPLIMIENTOS

- 1º. Se procederá a la suspensión del suministro de agua regenerada en los casos en los que no se cumplan con los criterios de conformidad i e ii anteriores.
- 2º. Si en un control se superan en un parámetro los límites de desviación máxima de la tabla anterior, se procederá a realizar un segundo control a las 24 horas. En caso de persistir esta situación se procederá a la suspensión del suministro.
- 3º. El suministro se reanudará cuando se hayan tomado las medidas oportunas en lo relativo al tratamiento para que la incidencia no vuelva a ocurrir, y se haya constatado que el agua regenerada cumpla los VMA del Anexo I.A durante cuatro controles efectuados en días sucesivos.
- 4º. En los casos de incumplimiento descritos en los apartados 1º, 2º y 3º será aplicación la modificación de frecuencia de control prevista en el Anexo I.B.

### ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

### Continuación Anexo I C

Los métodos o técnicas analíticas de referencia que se proponen en este Anexo se tomarán como referencia o guía. Se podrán emplear métodos alternativos siempre que estén validados y den resultados comparables a los obtenidos por el de referencia. Para el caso del análisis de contaminantes deberán cumplir los valores de incertidumbre y límite de cuantificación especificados en la tabla correspondiente.

Los análisis deberán ser realizados en laboratorios de ensayo que dispongan de un sistema de control de calidad según la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025.

**Tabla 1.10.: MICROBIOLÓGICOS**

PARÁMETRO	MÉTODOS O TÉCNICAS ANALÍTICAS DE REFERENCIA
Nemátodos intestinales	Método Bailinger modificado por Bouhoum & Schwartzbrod. "Analysis of wastewater for use in agriculture" Ayres & Mara O.M.S. (1996)
<i>Escherichia coli</i>	Recuento de Bacterias <i>Escherichia coli</i> $\beta$ - Glucuronidasa positiva
<i>Legionella</i> spp.	Norma ISO 11731 parte 1: 1998 Calidad del Agua. Detección y enumeración de <i>Legionella</i> .-
<i>Taenia saginata</i>	-----
<i>Taenia solium</i>	-----

**Tabla 1.11.: CONTAMINATES**

PARÁMETRO	TÉCNICA DE REFERENCIA	U <sup>1</sup>	LC <sup>2</sup>
Sólidos en suspensión	Gravimetría con filtro de fibra de vidrio	30 %	5 mg/L
Turbidez	Nefelometría	30 %	0,5 UNT
Nitratos	Espectroscopia de absorción molecular Cromatografía iónica	30 %	10 mg NO <sub>3</sub> /L
Nitrógeno Total	Suma de Nitrógeno Kjeldahl, nitratos y nitritos Autoanalizador	30 %	3 mg N/L
Fósforo Total	Espectroscopia de absorción molecular Espectrofotometría de plasma	30 %	0,5 mg P/L
Sustancias Peligrosas	Cromatografía Espectroscopia	Metales: 30 % Orgánicos: 50 %	30 % de NCA

<sup>1</sup> Incertidumbre máxima expandida con un factor de cobertura de 2.

<sup>2</sup> Límite de cuantificación, es decir, concentración mínima de interés que puede determinarse con el nivel de incertidumbre requerido en la tabla.

## **ANEXO I D. CRITERIOS DE CALIDAD REQUERIDOS SEGÚN LA NORMATIVA PANAMEÑA SOBRE EL USO DE AGUAS DEPURADAS.**

Este Reglamento se debe aplicar a aguas residuales tratadas que vayan a utilizarse en:

- a) Agua para el consumo de animales
- b) Riego
- c) Recreación y estética
- d) Vida acuática y acuicultura
- e) Uso urbano
- f) Recarga de acuíferos
- h) Restauración de hábitat
- i) Uso industrial y minero

No se consideran usos en consumo humano directo y recreación con contacto directo por motivos psicológicos, que limitan esos tipos de usos para las aguas recicladas.

### **3. REQUISITOS:**

Usos de las aguas residuales tratadas.

#### **3.1 REQUISITOS DEL AGUA PARA CONSUMO DE ANIMALES.**

En todos aquellos casos en que los animales estén en contacto con el ser humano o estén destinados al consumo humano se deben cumplir con los requisitos indicados en la Norma DGNTI- COPANIT 395.

#### **3.2 REQUISITOS PARA EL AGUA DE RIEGO.**

Para la utilización de las aguas servidas tratadas en riego se deben cumplir los requisitos que se indican a continuación.

### 3.3 REQUISITOS QUIMICOS.

Las aguas de riego, independientemente de su origen, deben cumplir al menos con los siguientes requisitos de tipo químico, los que siempre deben ser revisados:

TABLA 3-1: Concentraciones máximas de elementos químicos en agua para riego

Elemento	Expresión	Unidad	Limite máximo
Aluminio	Al	mg/L	5.000
Arsénico	As	mg/L	0.100
Bario	Ba	mg/L	4.000
Berilio	Be	mg/L	0.100
Boro	B	mg/L	0.750
Cadmio	Cd	mg/L	0.010
Cianuro	CN	mg/L	0.200
Cloruro	Cl	mg/L	200.00
Cobalto	Co	mg/L	0.050
Cobre	Cu	mg/L	0.020
Conductividad. Eléctrica	CE	ds/m	3.000
Cromo	Cr	mg/L	0.100
Fluoruro	F	mg/L	1.000
Hierro	Fe	mg/L	5.000
Litio	Li	mg/L	2.500
Litio (cítricos)	Li	mg/L	0.075
Manganeso	Mn	mg/L	0.200
Mercurio	Hg	mg/L	0.001
Molibdeno	Mo	mg/L	0.010
Níquel	Ni	mg/L	0.200
Plata	Ag	mg/L	0.200
Plomo	Pb	mg/L	5.000
Selenio	Se	mg/L	0.020
Sodio porcentual	% Na	%	35.000
Sulfato	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg/L	350.000
Vanadio	V	mg/L	0.100
Zinc	Zn	mg/L	2.000

## Relación de Adsorción de sodio

Los valores recomendados varían según la concentración de sales expresada en términos de conductividad eléctrica; se recomienda que no se sobrepase el límite de bajo o sin riesgo de sodificación, el que depende del contenido de sales del agua. Al final del texto, se incluye el diagrama de Clasificación de Aguas del United States Department of Agriculture, publicado en el texto Diagnóstico y Rehabilitación de Suelos Salinos y Sódicos.

### 3.4 REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS

Los requisitos microbiológicos y los procesos de tratamiento recomendados para las aguas recicladas son los siguientes:

Tabla 3-2: Procesos recomendados para tratamiento de aguas Recicladas y parámetros para calidad de aguas recuperadas usadas para Riego (a).

Tipo de riego	Proceso de Tratamiento	Parámetros Recomendados para la Calidad de Agua
Riego superficial (b) o de	Tratamiento secundario (d)	pH = 6.0 - 9.0
aspersión para cultivos de comestibles (c), no procesados comercialmente, cuando los productos no tienen contacto directo con las aguas recuperadas.	Filtración (e) Desinfección	DBO = 20 mg/L (g) Turbiedad = 3.0 NTU (h) Coliformes Fecales = <200/100 mL (i) Cloro residual = >1 mg/L (j) SST = 5.0 mg/L (m)
Riego superficial (b) de cultivos de comestibles, no procesado, cuando la parte comestible crece sin contacto con la tierra o con las aguas recuperadas.	Tratamiento secundario Desinfección es recomendada pero no requerida, como el caso de viñas, huertos, cultivos de semillas (no consumidos por seres humanos), árboles sin partes comestibles, forraje y cultivos de fibra (f).	pH = 6.0 - 9.0 DBO = 40 mg/L(max) (g) SST = 40 mg/L (max) Coliformes fecales = <500/100 mL (i) Cloro residual: entre 1 y 2 mg/L (j) Turbiedad = <3.0 NTU (h)
Riego superficial (b) o aspersión en cultivos de comestibles, procesados comercialmente (k), riego de huertos, irrigación superficial o de aspersión en cultivos no comestibles.	Tratamiento secundario (d). Desinfección (f)	pH = 6.0 - 9.0 DBO = 40 mg/L (max) (g) SST = 40 mg/L (max) Coliformes fecales = <500/100 mL (i) Cloro residual: entre 1 y 2 mg/L (j)

Riego superficial de forrajeras, y cultivos comestibles (l).	Tratamiento primario no avanzado con la adición de químicas.	y pH = 6.0 - 9.0
	Desinfección.	DBO = 60 mg/L (g)
		SST = 50 mg/L
		Coliformes fecales = <1000/100 mL (l)
		Cloro residual: entre 1 y 2 mg/L (j)

Notas:

- a) Los límites de calidad que son recomendados se aplican a aguas recuperadas en el lugar de descarga de la instalación de tratamiento.
- b) Incluye riego por surcos, goteo e inundación.
- c) Incluye cultivos de plantas tales como papas, zanahorias, rábanos, ajo, cebolla y remolacha.
- d) Los procesos de tratamiento secundarios, incluyen lodos activados, reactores consecutivos, filtros de flujo lento, unidades rotatorias de contacto biológico y varios sistemas de estabilización en lagunas.
- e) Filtración, definido como el proceso de procesar aguas por suelos naturales o filtros naturales como arena y antracita.
- f) Desinfección, definido como la destrucción, desactivación, remoción de organismos patógenos mediante procesos químicos, biológicos o físicos. La desinfección puede ser realizada con cloro, ozono, radiación UV, procesos con membranas u otros procesos conocidos.
- g) Determinado por una prueba de DBO durante 5 días.
- h) Deben cumplir con el límite de turbiedad antes de la desinfección. La turbiedad no debe exceder 5 NTU (Unidades Nefelométricas de Turbiedad) en cualquier momento.
- i) El valor medio determinado de los resultados bacteriológicos de los últimos 7 días para los que se han realizado análisis.

j) Cloro residual después de un período mínimo de 30 minutos de contacto del cloro con las aguas tratadas. Se considera un límite máximo de 2 mg/l, para evitar la formación de compuestos órgano clorados, tales como los trihalometanos.

k) Cultivos de comestibles, procesados comercialmente, son aquellos que antes de ser comercializados han recibido un tratamiento químico o físico suficiente para matar organismos patógenos.

l. Cultivos no comestibles, que incluyen praderas para animales que dan leche, forraje y cultivos de semillas. m. Sólidos Suspendidos Totales

### **3.5 REQUISITOS PARA EL AGUA DESTINADA A RECREACIÓN Y ESTÉTICA.**

Estética. Las aguas servidas tratadas destinadas a estética u ornamentación deben estar exentas de las siguientes sustancias.

- Materias que sedimenten formando depósitos indeseables.
- Desechos flotantes, aceites, espumas y sólidos de cualquier tipo.
- Sustancias que produzcan olor, color, sabor o turbiedad
- Materia en concentraciones o combinaciones que sean tóxicas o que produzcan reacciones fisiológicas indeseables en seres humanos, peces animales o plantas.
- Sustancias y condiciones o combinación de estas, en concentraciones que produzcan vida acuática indeseable y eutrofización. Recreación sin contacto directo.

El agua destinada a la recreación sin contacto directo debe ser sometida al menos a un tratamiento secundario, con filtración y desinfección. Debe cumplir con los siguientes requisitos.

**TABLA 3-3: Requisitos para agua destinada a recreación sin contacto directo**

Característica	Requisitos
pH	6,0 - 9,0
Temperatura	± 3°C de la temperatura normal
Sólidos flotantes visibles y espumas no naturales	Ausentes
Claridad	Visualización de disco Secchi a 1,5 m.
Aceites flotantes y grasas	Máximo 5 mg/l
Aceites y grasas emulsionadas	Máximo 10 mg/l
Color, escala platino cobalto	Máximo 50 unidades.
Turbiedad	30 unidades máximo
Coliformes fecales	Ausentes
DBO	< 5,0 mg/l
Cloro residual	< 5,0 mg/l
Substancias que produzcan olores desagradables	Ausentes

### 3.6 REQUISITOS DE CALIDAD DEL AGUA PARA VIDA ACUATICA Y ACUICULTURA.

Las aguas recicladas, destinadas a ser usadas para vida acuática deben cumplir con los requisitos de tratamientos y calidad que se indican en la Tabla 3-4:

**TABLA 3 -4: REUTILIZACIÓN PARA ACUICULTURA**

Procesos de tratamiento y parámetros de calidad, recomendados para aguas recuperadas y reutilizadas en la industria de Acuicultura.

Tipo de Reutilización	Proceso Recomendado para Tratamiento	Parámetros Recomendados para calidad de aguas
Para la cultivo de comida y peces ornamentales, camarones y mariscos	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Tratamiento secundario (a)</li> <li>· Filtración (b)</li> <li>· Desinfección (c)</li> </ul>	· pH = 6.0-9.0
		· DBO = 20 mg/L (d)
		· Turbiedad = 3.0 NTU (e)
		· Coliformes fecales =< 200/100 mL (f)
		· Cloro residual = 0.5 –1.0 mg/L (max) (g)
		· DO = > 5 mg/L

Para el cultivo de plantas acuáticas, como lechuga marina, jacinto, etc.

· . Tratamiento secundario (a)  
· . Desinfección (c)

· . pH = 6.0 - 9.0  
· . DBO = 30 mg/L (d)  
· . SST = 30 mg/L  
· . Coliformes fecales < 500/100 MI (e)  
· . Cloro residual = 0.5–1.0 mg/L (max) (g)

Notas:

- a) Los procesos de tratamiento secundarios, incluyen lodos activados, reactores consecutivos, filtros de flujo lento, unidades rotatorias de contacto biológico y varios sistemas de estabilización en lagunas.
- b) Filtración, definido como el proceso de procesar aguas por suelos naturales o filtros naturales como arena y antracita.
- c) Desinfección, definido como la destrucción, desactivación, remoción de organismos patógenos mediante procesos químicos, biológicos o físicos. La desinfección puede ser realizada con cloro, ozono, radiación UV, procesos con membranas u otros procesos conocidos.
- d) Determinado por una prueba de DBO durante 5 días.
- e) Deben cumplir con el límite de turbiedad antes de la desinfección. La turbiedad no debe exceder 5 NTU en ningún momento.
- f) El valor medio determinado de los resultados bacteriológicos de los últimos 7 días para los que se han realizado análisis.
- g) Cloro residual después de un período mínimo de 30 minutos de contacto del cloro con las aguas tratadas.

Si se presentaran sustancias biotóxicas estas deben ser determinadas por el bioensayo correspondiente. El valor obtenido se expresa en LTm96, debiendo utilizarse los factores de seguridad que se indican a continuación:

**TABLA 3-5: Factores de seguridad para diferentes tóxicos**

Tóxico	Factor de seguridad
Pesticidas	1/100 de la LTm96
Metales pesados	1/100 de la LTm96
Cianuros	1/10 de la LTm96
Tóxico no acumulativo	1/10 de la LTm96
Tóxico acumulativo y persistente	1/100 de la LTm96
Detergentes	1/10 de la LTm96

Para organismos filtradores debe cumplirse con la parte bacteriológica que establecen las disposiciones sobre alimentos en lo referente a la crianza y recolección de estos.

Este tipo del uso del agua reciclada deberá respetar los límites máximos para la presencia de metales pesados, con el propósito de preservar la fauna íctica y la vida acuática, de acuerdo a lo indicado en la Tabla 3-6:

**Tabla 3.6. Límites máximos para metales pesados en aguas destinadas a acuicultura y vida acuática**

Parámetro	Expresión	Unidad	Límite máximo
Aluminio	Al	mg/L	0,100
Arsénico	As	mg/L	0,050
Cadmio	Cd	mg/L	0,800
Cromo	Cr	mg/L	0,020
Cobre	Cu	mg/L	0,002
Cianuro	CN	mg/L	0,005
Hierro	Fe	mg/L	0,300
Plomo	Pb	mg/L	0,002
Mercurio	Hg	mg/L	0,001
Níquel	Ni	mg/L	0,065
Nitrógeno amoniacal	NH <sub>4</sub>	mg/L	1,370
Nitrito	NO <sub>2</sub>	mg/L	0,060
Selenio	Se	mg/L	0,001
Plata	Ag	mg/L	0,001
Zinc	Zn	mg/L	0,030

### 3.7 REQUISITOS DE CALIDAD DEL AGUA PARA USO URBANO

Las aguas recicladas, destinadas al uso urbano deben cumplir con los requisitos de tratamientos y calidad que se indican en la Tabla 3-7:

#### TABLA 3-7: REUTILIZACION URBANA

Procesos recomendados para el tratamiento de aguas recuperadas y parámetros para la calidad de aguas recuperadas y reutilizadas para usos urbanos.

Tipo de Reutilización	Proceso de Tratamiento	Parámetros para la Calidad de Aguas
Incluyen riego de cementerios, áreas verdes en caminos públicos, viveros, fabricación de concreto, limpieza de vías públicas y banquetas y áreas de trabajo al aire libre, tales como lavado de autos y otros.	Tratamiento secundario	pH = 6.0 – 9.0
	Desinfección	DBO = <40 mg/L
		SST = <40 mg/L
		Coliformes fecales < 200/100 m/L
		Cloro residual < 2 mg/L

Notas:

- Los procesos de tratamiento secundarios, incluyen lodos activados, reactores consecutivos, filtros de flujo lento, unidades rotatorias de contacto biológico y varios sistemas de estabilización en lagunas.
- Cloro residual después de un período mínimo de 30 minutos de contacto del cloro con las aguas tratadas.
- Desinfección, definido como la destrucción, desactivación, remoción de organismos patógenos mediante procesos químicos, biológicos o físicos. La desinfección puede ser realizada con cloro, ozono, radiación UV, procesos con membranas o otros procesos conocidos.

### **3.8 REQUISITOS DE CALIDAD DEL AGUA PARA SER USADAS EN RECUPERACION DE HABITAT**

Las aguas recicladas, destinadas a ser usadas en recuperación de hábitat deben cumplir con los requisitos de tratamientos y calidad que se establecen para riego o para acuicultura en la presente Norma. La autoridad competente deberá decidir cual requisitos deben cumplirse, en función de las características de la vida silvestre del hábitat que se desee recuperar.

### **3.9 REQUISITOS DE CALIDAD DEL AGUA PARA SER USADAS EN RECARGA DE ACUIFEROS**

Las aguas recicladas, destinadas a ser usadas en recarga de acuíferos deben cumplir con los requisitos de tratamientos y calidad que se establecen en la Tabla 3-8:

### TABLA 3-8: RECARGA DE ACUIFEROS SUBTERRANEOS

Procesos de tratamiento y parámetros para la calidad de aguas recuperadas y usadas para recargar acuíferos.

Tipo de Reutilización	Proceso de Tratamiento	Parámetros para la Calidad de aguas
Inyección directa que recarga agua subterránea que es usada o podrá ser usada para uso doméstico (agua potable).	· Tratamiento secundario	· pH = 6.0-9.0
	· Coagulación/floculación	· DBO = < 5 mg/l
	· Filtración	· Turbiedad = < 2 NTU
	· Extracción de compuestos orgánicos	· Coliformes fecales =< 2.2/100 ml
	· Desinfección	· Cloro residual = < 1 mg/l
Recarga mediante aplicación a la superficie de la tierra (sistema de percolación o infiltración en forma natural)	· Tratamiento secundario	· pH = 6.0 - 9.0
	· Desinfección	· DBO < 30 mg/L
		· SST <30 mg/L
		· Coliformes fecales =<500/100 mL
		· Cloro residual = < 1 mg/L

Además de lo anterior deben cumplirse los límites máximos para metales pesados, recomendados en esta Norma para aguas de riego.

### 3.10 REQUISITOS DE CALIDAD DEL AGUA PARA USO INDUSTRIAL Y COMERCIAL

En el caso de reuso industrial y comercial de las aguas recicladas, se pueden dar una gran variedad de requerimientos, que van desde usos mineros hasta usos industriales tales como refrigeración, los que tienen particulares estándares de calidad físico – química para las aguas. Por lo anterior sólo se ha normado la calidad bacteriológica, de acuerdo a lo indicado en la Tabla 3-9 adjunta:

### TABLA 3-9: REUTILIZACIÓN EN USOS INDUSTRIALES Y COMERCIALES

Procesos de tratamiento y parámetros para la calidad de aguas recuperadas y reutilizadas para usos industriales y comerciales en la República de Panamá.

Tipo de Reutilización	Proceso de Tratamiento	Parámetros para la calidad de agua
Procesos industriales, refrigeración, calderas, etc.	- ) Tratamiento secundario (a)	- ) pH = 6.0 - 9.0
	- ) Filtración (b)	- ) DBO = 20 mg/L max (d)
	- ) Desinfección (c)	- ) Turbiedad = < 3.0 NTU (e)
Usos comerciales, control de incendios, compactación de suelos, concretos, procesos mineros, etc.		- ) Coliformes fecales =< 200/100 mL (f)
		- ) Cloro residual =< 1.0 mg/L (g)
	- ) Tratamiento secundario (a)	- ) pH = 6.0 - 9.0
		- ) DBO = 40 mg/L max (d)
	- ) Desinfección (c)	- ) SST = < 40 mg/L max
		- ) Coliformes fecales =< 500/100 ml (f)
		Cloro Residual = < 1 mg/L (g)
	- ) Turbiedad <15 NTU (e)	

### Notas:

a) Los procesos de tratamiento secundarios incluyen, lodos activados, reactores consecutivos (sequencing batch reactors), filtros de flujo lento, unidades rotatorias de contacto biológico y varios sistemas de estabilización en lagunas.

b) Filtración, definido como el proceso de procesar aguas por suelos naturales o filtros de arena o antracita.

c) Desinfección, definido como la destrucción, desactivación, remoción de organismos patógenos por maneras químicas, biológicas o físicas. La desinfección puede ser realizada mediante cloración, ozonización, desinfectantes químicos, radiación UV, procesos con membranas o otros procesos conocidos.

d) Determinado por una prueba de DBO de 5 días.

e) Deben cumplir con el límite de turbiedad antes de la desinfección. La turbiedad debe ser basada en un periodo de 24 horas. La turbiedad no debe de exceder 5 NTU en ningún momento.

f) El valor medio determinado de los resultados bacteriológicos de los últimos 7 días para los que se han realizado análisis

g) Cloro residual total medido después de un período mínimo de 30 minutos de contacto.

#### **4. TOMA DE MUESTRAS**

Generalidades.

Las plantas de tratamiento deberán llevar su propio control de los parámetros señalados en la presente norma, de acuerdo con el tipo de uso que se quiera dar a las aguas tratadas, sin perjuicio de los controles que realice la autoridad competente.

La toma de muestras debe ser efectuada por personal idóneo de un laboratorio acreditado. Debe ser realizada en cada uno de los puntos de evacuación o descarga de las plantas de tratamiento de aguas residuales, siendo responsabilidad de los operadores de la planta.

Los controles de la autoridad competente serán efectuados sin previo aviso, efectuando los muestreos y determinando las características de los efluentes de la planta de tratamiento.

Obtención de la Muestra. Muestra puntual.

Cada muestra puntual deberá estar constituida por la mezcla homogénea de dos sub-muestras de igual volumen, extraídas de la superficie y del interior de fluido, debiéndose observar las condiciones de colecta, tipo de envase, preservación y tiempo máximo entre la toma de muestra de acuerdo a lo señalado en la Tabla 4-1 y realizando el análisis correspondiente al método oficial.

Muestra compuesta.

La muestra compuesta esta constituida por una mezcla homogénea de 3 muestras puntuales obtenidas cada 3 horas. Además se deben cumplir las condiciones de extracción de muestras que se señalan en la presente norma.

Las muestras serán puntuales para los parámetros: Color, Temperatura, pH, Sólidos sedimentables, Sulfuros, Cianuros, y Nitrógeno en sus diferentes formas. Las determinaciones de los Sólidos sedimentables, la Temperatura y Oxígeno disuelto deberán ser realizadas en terreno. El pH deberá determinarse en un tiempo inferior a dos horas después de haberse extraído la muestra.

Las muestras serán compuestas para los parámetros: Sólidos suspendidos, DBO, Arsénico, Cadmio, Cobre, Cromo, Mercurio, Níquel, Plomo, Sulfato, Fósforo y Zinc.

Lugar de muestreo

El lugar de muestreo será una cámara o dispositivo especialmente habilitado para tal efecto, en donde concurren previamente mezclados, todos los líquidos provenientes del proceso de tratamiento de las aguas.

La cámara o dispositivo de control deberá ser habilitado por la planta de tratamiento de tal forma que permita realizar sin dificultades el aforo o medición de los caudales descargados con un sistema universalmente aceptado para estos efectos.

La autoridad competente se reserva la facultad de tomar muestras de control en lugares diferentes si así lo estima conveniente.

#### 4.1 CONDICIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Las muestras deben cumplir las condiciones que se señalan en la Tabla siguiente, en cuanto a tipo de envase, lugar de análisis, envase, preservación, y tiempo.

TABLA 4 -1. Lugar de análisis, tipo de envase, preservación y tiempo límite para realizar el análisis en muestras de aguas recicladas

Parámetro	Lugar de análisis	Envase	Preservación	Tiempo
PH	Terreno	P o V	----	--
Temperatura	Terreno	P o V	----	--
Sólidos suspendidos	Laboratorio	P o V	----	24 horas
Sólidos sedimentables	Pref. Terreno	P o V	----	24 horas
DBO <sub>5</sub>	Laboratorio	P o V	Llenar envase, enfriar 2-5 °C. Oscuridad.	24 horas
Arsénico	Laboratorio	P o V	Acidificar a pH < 2 con HCl	1 mes
Cadmio	Laboratorio	P o VB	Acidificar a pH < 2 con HCl	1 mes
Cianuro	Laboratorio	P o V	Agregar NaOH a pH >12. Enfriar a 2-5 °C. Oscuridad	24 horas
Cobre	Laboratorio	P o VB	Acidificar pH <2 con HNO <sub>3</sub>	1 mes
Cromo total	Laboratorio	P o VB	Acidificar pH <2 con HNO <sub>3</sub>	1 mes
Cromo hexavalente	Laboratorio	P o VB	Enfriar a 2-5 °C	24 horas
Fósforo	Laboratorio	V o VB	Acidificar pH <2 con HSO <sub>4</sub>	1 mes
Mercurio	Laboratorio	VB	Acidificar pH <2 con HSO <sub>4</sub> para mercurio enfriar a 2-5 °C	1 mes
Níquel	Laboratorio	P o VB	Acidificar pH <2 con HNO <sub>3</sub>	1 mes
Nitrógeno amoniacal	Laboratorio	P o V	Acidificar pH <2 con HSO <sub>4</sub> enfriar a 2-5 °C Oscuridad	24 horas
Plomo	Laboratorio	P o V.B.	Acidificar pH <2 con HNO <sub>3</sub>	1 mes
Sulfatos	Laboratorio	P o V	Enfriar a 2-5 °C	1 semana
Zinc	Laboratorio	P o VB	Acidificar pH <2 con HNO <sub>3</sub>	1 mes
DQO	Laboratorio	V	Acidificar pH <2 con HSO <sub>4</sub>	1 mes

P : Envase plástico V : Envase vidrio VB : Envase vidrio borosilicato .

Volúmenes de Muestra.

En el Tabla No 4-2 se indican los volúmenes mínimos de muestra a utilizar de acuerdo a los parámetros a determinar

TABLA 4-2. Volúmenes de muestra según parámetro a analizar

Volumen mínimo de muestra	Parámetros
2 litros: Muestra natural	Sólidos sedimentables, DBO <sub>5</sub> , sólidos suspendidos, sulfatos poder espumógeno y cromo hexavalente.
1 litro: Muestra con ácido nítrico pH 2	Cadmio, cobre, cromo total, níquel plomo y zinc
1 litro: Muestra, ácido clorhídrico pH 2	Aceites, grasas e hidrocarburos
1 litro: Muestra ácido sulfúrico pH 2	Arsénico, fósforo, nitrógeno amoniacal y DQO
300 ml: Muestra con ácido nítrico pH 2	Mercurio
1 litro: Muestra con hidróxido de sodio pH 12	Cianuro
500 ml: Muestra hidróxido de sodio pH 9 y acetato de zinc	Sulfuro

#### 4.2 FRECUENCIA DE LOS MUESTREOS PARA CADA TIPO DE PARAMETRO SE INDICA A CONTINUACION

La frecuencia mínima de muestreos para cada tipo de parámetro que se debe controlar en las plantas de tratamiento de aguas servidas se indica en la tabla 4-3:

TABLA 4-3. Frecuencia mínima de control de muestreo para los distintos parámetros

Parámetro	Frecuencia
Reacción (pH)	Diario
Cloro residual	Diario
Coliformes fecales	Semanal
Conductividad eléctrica	Diario
Sólidos sedimentables	Semanal
Sólidos suspendidos totales	Semanal
Demanda bioquímica de oxígeno	Semanal
Nitrógeno y Fósforo	Mensual
Metales pesados	2 veces al año

## 6. ENSAYOS

### Métodos de análisis oficiales

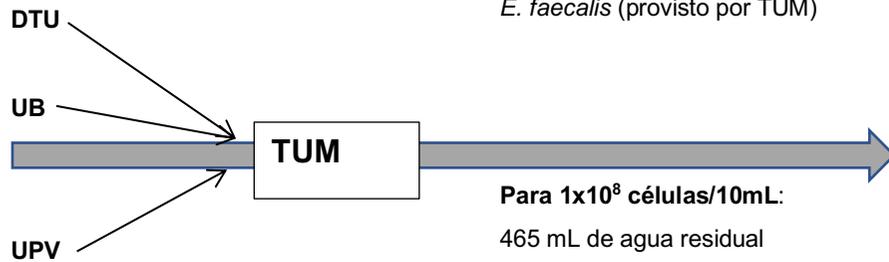
Serán oficiales los métodos de análisis establecidos en la última edición del "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", publicada por la A.P.H.A., A.W.W.A., y W.P.C.F.. En casos excepcionales debido a condiciones especiales la autoridad competente podrá aceptar modificaciones a los métodos oficiales.

El método de análisis utilizado para cada parámetro deberá ser el que corresponda para las características específicas de la muestra, debiéndose observar en cada caso, las interferencias y límites de detección de dicho método.

## ANEXO I E. VISIÓN GENERAL DE LA PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PARA LA FILTRACIÓN CON MAF.

### Visión general del experimento para la concentración con MAF

Proporcionaron las muestras de patógenos a TUM (quien se encargó de preparar las alícuotas para todo el Test)



#### Condiciones de las muestras

Reserva de 10 mL con  $10^9$  células/mL

Adición de 500 mL de agua residual por concentración con todos los patógenos

*E. coli* (provisto por TUM)

*E. faecalis* (provisto por TUM)

#### Para $1 \times 10^8$ células/10mL:

465 mL de agua residual  
 + 5 mL *E. coli* ( $10^9$  cel./mL)  
 + 5 mL *E. faecalis* ( $10^9$  cel./mL)  
 + 25 mL de otros microorganismos del estudio.

#### Para $1 \times 10^6$ células/10mL:

465 mL de agua residual  
 + 5 mL *E. coli* ( $10^7$  cel./mL)  
 + 5 mL *E. faecalis* ( $10^7$  cel./mL)  
 + 25 mL otros microorganismos en estudio

Alícuotas: 10 mL de cada concentración enviadas a cada par institucional (fueron enviadas a 4 °C, y se mantuvieron a 4 °C por un máx. de 1 semana)



#### Cada par institucional obtuvo:

##### Para MAF:

6 alícuotas  $1 \times 10^8$  (1 extra para la evaluación de los patógenos inoculados)

6 alícuotas  $1 \times 10^6$  (1 extra para la evaluación de los patógenos inoculados)

3 alícuotas  $1 \times 10^0$

##### Para SMF:

6 alícuotas  $1 \times 10^8$  (1 extra para la evaluación de los patógenos inoculados)

6 alícuotas  $1 \times 10^6$  (1 extra para la evaluación de los patógenos inoculados)

3 alícuotas  $1 \times 10^0$

#### Adición a 10 L de agua Evian



Número de muestras de 10 L de Evian a las que se les agregó las alícuotas de microorganismos:

13 muestras para concentración por MAF

( $5 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^0$ )

13 muestras para concentración por SMF

( $5 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^0$ )

$2 \times 10^8$  y  $2 \times 10^6$  para la evaluación de los inóculos.

## ANEXO I F: SISTEMA MAF



## SISTEMA SMF



## ANEXO I G:

**Análisis de la regresión lineal para las comparativas entre citometría de flujo y cultivo en placa; citometría de flujo y qPCR con curva patrón a partir de células; y citometría de flujo y qPCR con curva patrón a partir de gBlocks.**

**Tabla 3.3.** Análisis de regresión lineal entre citometría y cultivo en placa.

Regresión lineal citometría - cultivo en placa								
Resumen								
<i>Estadísticas de la regresión</i>								
Coefficiente de correlación múltiple	0,973549291							
Coefficiente de determinación $R^2$	0,947798222							
$R^2$ ajustado	0,943782701							
Error típico	0,2609247							
Observaciones	15							
ANÁLISIS DE VARIANZA								
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F			
Regresión	1	16,06957287	16,06957287	236,0336635	1,02716E-09			
Residuos	13	0,885062089	0,068081699					
Total	14	16,95463495						
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	1,532863115	0,240707391	6,368159733	2,46394E-05	1,012846412	2,0528798	1,0128464	2,05287982
Cultivo en placa (ufc/mL)	0,738727464	0,048083633	15,36338711	1,02716E-09	0,634849091	0,8426058	0,6348491	0,84260584

**Tabla 3.4.** Análisis de regresión lineal entre citometría y qPCR células.

Regresión lineal citometría - qPCR células								
Resumen								
<i>Estadísticas de la regresión</i>								
Coefficiente de correlación múltiple	0,989846452							
Coefficiente de determinación $R^2$	0,979795998							
$R^2$ ajustado	0,978241844							
Error típico	0,16232718							
Observaciones	15							
ANÁLISIS DE VARIANZA								
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F			
Regresión	1	16,61208348	16,61208348	630,4369	2,11741E-12			
Residuos	13	0,342551474	0,026350113					
Total	14	16,95463495						
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	0,6151511	0,182816737	3,364851106	0,005074	0,220199551	1,01010265	0,2201996	1,01010265
qPCR células	0,771330482	0,030719892	25,1085023	2,12E-12	0,70496419	0,83769677	0,7049642	0,83769677

**Tabla 3.5.** Análisis de regresión lineal entre citometría-cultivo en placa; citometría-qPCR células y citometría- qPCR gBlocks.

Regresión lineal citometría - qPCR gBlocs								
Resumen								
<i>Estadísticas de la regresión</i>								
Coefficiente de correlación múltiple	0,989033157							
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,978186585							
R <sup>2</sup> ajustado	0,97650863							
Error típico	0,168668651							
Observaciones	15							
ANÁLISIS DE VARIANZA								
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F			
Regresión	1	16,58479647	16,58479647	582,9636	3,48718E-12			
Residuos	13	0,369838481	0,028449114					
Total	14	16,95463495						
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-0,339319595	0,228766084	-1,483260058	0,16184	-0,833538673	0,15489948	-0,8335387	0,15489948
qPCR gBlocs (CG/mL)	0,785400045	0,032528963	24,14463813	3,49E-12	0,715125493	0,8556746	0,7151255	0,8556746

**Análisis de correlación para la prueba comparativa entre técnicas de cuantificación**

## **Anexos I H: Preparación de algunas soluciones utilizadas durante los ensayos**

### **Ácido hidrociorhídrico (HCl) 1 N:**

- 34,4 mL de ácido hidrociorhídrico concentrado
- 400 mL de agua de ionizada

Se agregan 400 mL de agua de ionizada en una botella de vidrio de 500 mL previamente esterilizado por autoclave. Utilizando una pipeta desechable estéril se le agregan 34,4 mL de ácido clorhídrico concentrado. Etiquetar con el nombre del compuesto, la fecha de elaboración y su concentración.

### **Ácido hidrociorhídrico (HCl) 0,1 N:**

- 10 mL de ácido hidrociorhídrico 1 N
- 90 mL de agua de ionizada

Colocar 90 mL de agua de ionizada en una botella de vidrio previamente esterilizada por autoclave. Agregar 10 mL de ácido hidrociorhídrico 1 N con una pipeta de 10 mL desechable. Etiquetar con el nombre del compuesto, su concentración y la fecha de elaboración.

### **Hidróxido de sodio 1 M/4 %:**

- 4 g de hidróxido de sodio
- 100 mL de agua de ionizada

Disolver el hidróxido de sodio en el agua de ionizada en un vaso de cristal Beaker. Una vez disuelto, verterlo en una botella de vidrio estéril de 250 mL. Etiquetar con el nombre, concentración y fecha de elaboración.

### **Buffer Fosfato:**

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M

En una proporción 1:2 v/v de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M estéril y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M mezclar los compuestos y colocarlos en una botella de vidrio estéril de 500 mL. Medir el pH y ajustarlo a 7,5. Etiquetar con el nombre, la concentración y la fecha de elaboración.

**Agua de mar Artificial:**

- 33,33 g de Sal de mar (Sigma Ref. S 9883)
- 1 L de agua de grifo de clorada.

Añadir la sal de mar artificial al agua, dejar durante toda la noche a temperatura ambiente para que se disuelva la sal. Si es necesario agitar agregando una barra magnética y colocando el recipiente con la mezcla en un agitador magnético.

**Leche desnatada pre floculada (PSM):**

- 100 mL de agua de mar artificial
- 1 g de leche desnatada (Difco Ref. 232100)

Disolver la leche desnatada en el agua de mar artificial utilizando una barra magnética y ajustar el pH a 3,5. Los flóculos deben formarse y ser claramente visibles.

**Ringer  $\frac{1}{4}$  :**

- 2.5 g medio Ringer, en polvo
- 1 L agua destilada

Esterilizar en autoclave a 121° C 15 min y guardar a temperatura ambiente.

**Caldo TSB (trypticasein soy broth):**

- 17 g caseína peptona
- 3 g peptona de soja
- 5 g cloruro sódico
- 2,5 g fosfato di potásico

- 2,5 g dextrosa
- 1 L de agua destilada

Esterilizar en autoclave a 121° C 15 min y guardar a 4° C.

**TSA (Trypticasein soy agar):**

- 40 g de TSA
- 1 L agua destilada

Esterilizar en autoclave a 121° C 15 min, dispensar en placas de Petri y guardar a 4° C.

**LB agar:**

- 10 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 15 g Agar Bacteriológico Europeo
- 1 L agua destilada

Esterilizar a 121° C por 15 minutos, dispensar en placas de Petri y guardar las placas a 4° C. Nota: Si el medio va suplementado con algún antibiótico, después de esterilizar en el autoclave se deja enfriar hasta unos 50° C y se añade el antibiótico a la concentración adecuada antes de plaquear.

**ANEXO I J: Fotografías de algunos detalles del trabajo.**

**Fotografía 1. Placas de BCYE/GVPC sembradas para diferentes muestras, con diferentes tratamientos. De izquierda a derecha muestra agua residual, secundario, terciario-humedal, agua de terciario de lagunaje, muestra de pozo de granja porcina,**



**Fotografía 2: Grupo de muestras una vez llegaban al laboratorio**



**Fotografía 2. Puntos de muestreo:**

Río Fluvía



Pozo en una granja porcina.



Pozo en una granja avícola



Agua de pozo en balsa de reserva



Agua del afluente de la EDAR  
Granollers



Agua del secundario EDAR  
Granollers



Terciario-Humedal EDAR Granollers



Terciario Cloración-Filtración



Terciario lagunaje posterior al  
tratamiento terciario



# ANEXO I K: Secuencias de los segmentos gBlock

## *E. coli*



INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

---

SPECIFICATION SHEETWWW.IDTDNA.COM

---

11-Oct-2016Order No. **2613955**

Ref. No. **72212831**

---

**Name -** Ecoli-gblock gBlocks® Gene Fragments 190 base pairs

5' - ATC ACG CAA CGC GTG ATA AGC AAT TTT CGT GTC CCC TTC GTC TAG GGG CCC AGG ACA CCG CCC TTT  
CAC GGC GGT AAC AGG GGT TCG AAT CCC CTA GGG GAC GCC ACT TGC TGG TTT GTG AGT GAA AGT CGC CTG  
CCT TAA TAT CTC AAA ACT CAT CTT CGG GTG ATG TTT GAG ATA TTT GCT CTT TAA A - 3'

Note 1: The sequence information of the sense strand displayed above is intentionally truncated to the first 400 bases. The complete sequence can be verified in FASTA format in your order history.

Note 2: gBlocks® Gene Fragments are delivered as double-stranded DNA. Conformance to quality standards is established in multiple ways, including size verification by capillary electrophoresis, sequence identification by mass spectrometry and consensus sequence verification.

---

<b>Properties</b> <hr/> <p>Length: 190 Amount Delivered: 250ng GC Content: 50.53% Molecular Weight: 117277.8 fmols/ng: 8.53 µg/OD<sub>260</sub>: 50</p>	<b>Shipped To</b> <hr/> <p>UNIVERSITAT DE BARCELONA AV DIAGONAL 645 EDIFICI PREVOSTI PLANTA 0 LABORATORI 10 BARCELONA, BARCELONA 08028</p> <p>Customer No. 4244310</p>
---	--

---

<b>Modifications &amp; Services</b> <hr/>	<b>Instructions</b> <hr/> <p>Dried contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the gBlocks Gene Fragment.</p> <p><b>Resuspending your gBlocks Gene Fragment</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Centrifuge the tube for 3-5 sec at a minimum of 3000 x g to ensure the material is in the bottom of the tube.</li><li>2. Add TE to reach a final concentration of 10ng/µL.</li><li>3. Vortex briefly.</li><li>4. Incubate at 50°C for 20 minutes.</li><li>5. Briefly vortex and centrifuge.</li></ol> <p><b>Amplifying your gBlocks Gene Fragment</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>* For gBlocks Gene Fragments ≤1kb, amplification can be performed using a high fidelity polymerase. To avoid sequence mutations due to amplification errors, limit cycles to 12 or fewer.</li><li>* For gBlocks Gene Fragments &gt;1kb, we do not recommend amplification.</li></ul>
---	--

Labels - Peel Here



72212831 IDT  
Alone Aragile 11-Oct-2016  
209813738  
gBlocks® Gene Fragments  
Ecoli-gblock  
250ng / 2100rpm / 40



72212831 IDT  
Alone Aragile 11-Oct-2016  
209813738  
gBlocks® Gene Fragments  
Ecoli-gblock  
250ng / 2100rpm / 40

---

**Disclaimer**For additional information please see [www.idtdna.com/gblockssupport](http://www.idtdna.com/gblockssupport) or contact [genes@idtdna.com](mailto:genes@idtdna.com).

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

# E. faecalis



SPECIFICATION SHEET

WWW.IDTDNA.COM

13-Oct-2016

Order No. **2613955**

Ref. No. **72212834**

Name - Legio pneu\_gBlock

gBlocks® Gene Fragments 146 base pairs

5' - AAA CAA AAA CAA GCC AGG CGT TGT TGT ATT GCC AAG TGG TTT GCA ATA CAA AGT AAT CAA TTC TGG  
AAA TGG TGT TAA ACC CGG AAA ATC GGA TAC AGT CAC TGT CGA ATA TAC TGG TCG TCT GAT TGA TGG TAC  
CGT TTT TGA CA - 3'

Note 1: The sequence information of the sense strand displayed above is intentionally truncated to the first 400 bases. The complete sequence can be verified in FASTA format in your order history.

Note 2: gBlocks® Gene Fragments are delivered as double-stranded DNA. Conformance to quality standards is established in multiple ways, including size verification by capillary electrophoresis, sequence identification by mass spectrometry and consensus sequence verification.

## Properties

Length: 146  
Amount Delivered: 250ng  
GC Content: 39.73%  
Molecular Weight: 90074.4  
fmol/ng: 11.10  
µg/OD<sub>600</sub>: 50

## Shipped To

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
AV DIAGONAL 645 EDIFICI PREVOSTI  
PLANTA 0 LABORATORI 10  
BARCELONA, BARCELONA 08028

Customer No. 4244310

## Modifications & Services

## Instructions

Dried contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the gBlocks Gene Fragment.

### Resuspending your gBlocks Gene Fragment

1. Centrifuge the tube for 3-5 sec at a minimum of 3000 x g to ensure the material is in the bottom of the tube.
2. Add TE to reach a final concentration of 10ng/µL.
3. Vortex briefly.
4. Incubate at 50°C for 20 minutes.
5. Briefly vortex and centrifuge.

### Amplifying your gBlocks Gene Fragment

- For gBlocks Gene Fragments ≤1kb, amplification can be performed using a high fidelity polymerase. To avoid sequence mutations due to amplification errors, limit cycles to 12 or fewer.
- For gBlocks Gene Fragments >1kb, we do not recommend amplification.

Labels - Peel Here



## Disclaimer

See on reverse page notes (i) (ii) & (iii) for usage, label license, and product warranties

For additional information please see

[www.idtdna.com/gblockssupport](http://www.idtdna.com/gblockssupport) or contact [genes@idtdna.com](mailto:genes@idtdna.com).

# Legionella pneumophila



SPECIFICATION SHEET

WWW.IDTDNA.COM

13-Oct-2016

Order No. **2613955**

Ref. No. **72212834**

Name - Legio pneu\_gBlock

gBlocks® Gene Fragments 146 base pairs

5' - AAA CAA AAA CAA GCC AGG CGT TGT TGT ATT GCC AAG TGG TTT GCA ATA CAA AGT AAT CAA TTC TGG  
AAA TGG TGT TAA ACC CGG AAA ATC GGA TAC AGT CAC TGT CGA ATA TAC TGG TCG TCT GAT TGA TGG TAC  
CGT TTT TGA CA - 3'

Note 1: The sequence information of the sense strand displayed above is intentionally truncated to the first 400 bases. The complete sequence can be verified in FASTA format in your order history.

Note 2: gBlocks® Gene Fragments are delivered as double-stranded DNA. Conformance to quality standards is established in multiple ways, including size verification by capillary electrophoresis, sequence identification by mass spectrometry and consensus sequence verification.

## Properties

Length: 146  
Amount Delivered: 250ng  
GC Content: 39.73%  
Molecular Weight: 90074.4  
fmols/ng: 11.10  
µg/OD<sub>260</sub>: 50

## Shipped To

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
AV DIAGONAL 645 EDIFICI PREVOSTI  
PLANTA 0 LABORATORI 10  
BARCELONA, BARCELONA 08028

Customer No. 4244310

## Modifications & Services

## Instructions

Dried contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the gBlocks Gene Fragment.

### Resuspending your gBlocks Gene Fragment

1. Centrifuge the tube for 3-5 sec at a minimum of 3000 x g to ensure the material is in the bottom of the tube.
2. Add TE to reach a final concentration of 10ng/µL.
3. Vortex briefly.
4. Incubate at 50°C for 20 minutes.
5. Briefly vortex and centrifuge.

### Amplifying your gBlocks Gene Fragment

- For gBlocks Gene Fragments ≤1kb, amplification can be performed using a high fidelity polymerase. To avoid sequence mutations due to amplification errors, limit cycles to 12 or fewer.
- For gBlocks Gene Fragments >1kb, we do not recommend amplification.

Labels - Peel Here



## Disclaimer

See on reverse page notes (i) (ii) & (iii) for usage, label license, and product warranties

For additional information please see [www.idtdna.com/gblockssupport](http://www.idtdna.com/gblockssupport) or contact [genes@idtdna.com](mailto:genes@idtdna.com).