

Estudio de la evolución de la calidad microbiológica de los suelos abonados con fangos de EDAR

A. López-Martín¹, J. Gómez², J. Sarasa¹, R., Mosteo¹, N. Miguel¹, J. Labadía¹, A.M. Lasheras³, M.P. Ormad¹

¹ Grupo Agua y Salud Ambiental · Instituto Universitario de Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA) · Dpto. Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente · Universidad de Zaragoza. C/María de Luna 3, 50018, Zaragoza

² Navarra Infraestructuras Locales S.A (NILSA). Avda. Barañain 22, 31008 Pamplona-Navarra

³ Depuración de Aguas del Mediterráneo (DAM): Operación y Mantenimiento. Avda. Benjamin Franklin, 21 Parque Tecnológico 46980 Paterna-Valencia

RESUMEN

El fango generado en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) es una fuente importante de nutrientes y materia orgánica por lo que se utiliza habitualmente en agricultura.

En la actualidad, la aplicación de fangos en agricultura se regula a través del Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario, en el que se establecen límites o criterios de calidad para algunos metales, pero no de gérmenes patógenos.

Son escasos los estudios realizados a escala real sobre el comportamiento y evolución de microorganismos en suelos agrícolas abonados con fangos de depuradora.

En este trabajo de investigación se estudia la evolución temporal de la contaminación microbiológica de terrenos agrícolas de distinta naturaleza (arcilloso y arenoso) en los que se cultivan girasol y maíz, abonados con fangos de depuradora urbana, con el fin de establecer los riesgos que para la salud humana y el medio ambiente ello conlleva.

Tras realizar una caracterización físico-química y microbiológica sistemática de muestras de suelo, fango, suelo abonado y agua de riego, se puede concluir, 1) el fango tratado procedente de un proceso de depuración de aguas residuales urbanas mejora las características agronómicas de los suelos, aumentando la concentración de materia orgánica y nutrientes, 2) al aumentar el tiempo de almacenamiento del fango tratado disminuye su contaminación microbiológica, 3) la aplicación del fango al suelo no supone un empeoramiento de la calidad microbiológica del terreno, teniendo en cuenta los indicadores bacterianos objeto de este trabajo y 4) la contaminación microbiológica presente en el agua de riego podría repercutir de manera considerable sobre la existente en el suelo, incluso en mayor medida que la procedente de los fangos con los que se ha abonado.

INTRODUCCIÓN

El fango generado en las EDARs se utiliza habitualmente en agricultura, ya que presenta una importante fuente de nutrientes y materia orgánica para el suelo. En la actualidad, la aplicación de fangos en agricultura se regula a través del Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario, en el que se establecen límites o criterios de calidad para algunos metales, pero no de gérmenes patógenos.

Conscientes de que esta aplicación al suelo puede suponer un riesgo sanitario y ambiental, se publica la Orden AAA/1072/2013, de 7 de junio, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario, cuyo objetivo es establecer la información que una EDAR debe proporcionar en relación con el tratamiento aplicado a sus fangos y además debe informar sobre la concentración de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y otros contaminantes químicos inorgánicos y orgánicos presentes en el mismo (Carballa et al., 2009; Joo et al., 2015; Levantesi et al., 2015; Ottoson et al., 2008; Scaglia et al., 2014; Sidhu y Toze, 2009).

Dada la naturaleza de los fangos de EDARs, éstos suelen someterse a procesos de estabilización para reducir su capacidad de fermentación, el olor y los microorganismos potencialmente patógenos. En la actualidad existen diferentes tecnologías para conseguir estos objetivos.

En concreto, destaca la aplicación de los tratamientos biológicos, muy utilizados sobre todo en EDARs situadas en medianos y grandes núcleos de población. Los criterios, tanto de higienización como de estabilidad de fangos de EDARs quedan reflejados en distintos documentos de trabajo para la aplicación de los fangos al suelo (Environmental Protection Agency (EPA), 2003; Unión Europea 2000, 2003, 2010).

El control en la aplicación del fango en agricultura, unido a una mayor exigencia en los tratamientos de los mismos, tiene como objetivo evitar la propagación de los microorganismos patógenos, tanto por escorrentías como por atracción de vectores, definido este término como *la capacidad de atraer roedores, moscas, mosquitos y otros organismos capaces de transportar agentes infecciosos*. Por ello, resulta sumamente importante realizar estudios de supervivencia de estos microorganismos en el suelo, una vez que el fango se incorpora al mismo.

Son escasos los estudios realizados a escala real sobre el comportamiento y evolución de microorganismos en suelos agrícolas abonados con fangos de depuradora. Además, entre los distintos estudios existe una diversidad destacable en relación a los resultados y conclusiones obtenidos; la tabla 1 resume algunas de ellas. Estas diferencias se deben principalmente a la notable variación en las condiciones experimentales, las propiedades agronómicas, la heterogeneidad de las muestras, la climatología, el periodo de análisis o el tipo de fango (Gondim-Porto et al., 2016; Lang et al., 2007; Schwarz et al., 2014).

Tabla 1: Observaciones de otros autores en relación a la caracterización microbiológica de la aplicación de fango al suelo

TIPO DE MUESTRA	PRINCIPALES OBSERVACIONES	REFERENCIA
Suelos	La reducción de la concentración microbiológica en suelos abonados con biosólidos es más rápida que en suelos no abonados. Influyen factores ambientales y específicos del suelo como la temperatura, radiación UV, humedad del suelo, pH o actividad de microorganismos autóctonos	(Schwarz et al., 2014)
	La evolución microbiológica depende de condiciones físicas y químicas del suelo además de la disponibilidad de nutrientes más que de condiciones atmosféricas	(Estrada et al., 2004)
	Existe una relación significativa entre la humedad del suelo, la temperatura y la reducción microbiológica. La biota del suelo está involucrada en los procesos de reducción de patógenos	(Gondim-Porto et al., 2016; Horswell et al., 2007; Lang y Smith, 2007; Schwarz et al., 2014; Vieira y Pazianotto, 2016)
	La posible existencia de compartimentos anaerobios favorece el crecimiento de <i>C.perfringens</i>	(de las Heras et al., 2005; Xu et al., 2016)
	Se observa un aumento de esporas de <i>C.perfringens</i> respecto a las muestras iniciales de suelo hasta 24 meses después de adicionar el fango	(Gondim-Porto et al., 2016)
	Existe una relación entre la reducción de la actividad microbiológica y la concentración de metales como Cd, Cr, Cu o Zn	(de las Heras et al., 2005; Qureshi et al., 2003)
Fangos	El fango contiene entre 100 y 1000 veces más de microorganismos que el suelo	(Estrada et al., 2004; Gondim-Porto et al., 2016)
	La persistencia de los microorganismos en los suelos abonados está relacionada con la combinación del tratamiento aplicado al fango y el tiempo de almacenaje así como de la dosis aplicada. La población de enterococos se reduce en diferentes ratios en función del tratamiento aplicado al fango	(Gondim-Porto et al., 2016; Gonzalez-Ubierna et al., 2013)
Plantas	Bacterias como <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pueden actuar como bioadsorbentes y reducir la acumulación de Cd en el grano	(Suksabye et al., 2016)

El objetivo del trabajo que aquí se presenta, realizado en colaboración entre la Universidad de Zaragoza y NILSA (Navarra de Infraestructuras Locales S.A.), es conocer la evolución temporal de la contaminación microbiológica de terrenos agrícolas de distinta naturaleza (arcilloso y arenoso), abonados con fangos de depuradora urbana, que han sido sometidos a tratamiento de digestión aerobia, con el fin de establecer riesgos para la salud humana y el medio ambiente.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Selección de cultivos

Para que la aplicación de los fangos procedentes de la depuración de aguas residuales sea sostenible, es fundamental considerar las necesidades de los cultivos así como las posibles necesidades de almacenamiento y operatividad en la introducción al suelo (Sobrados et al., 2010).

En este trabajo de investigación se seleccionan dos terrenos con texturas diferentes sobre los que se siembran cultivos diferentes; maíz y girasol, los cuales tienen diferentes necesidades nutricionales e hídricas.

Las figuras 1 y 2 muestran fotografías de ambas plantaciones.



Figura 1: Cultivo de maíz



Figura 2: Cultivo de girasol

El maíz, es uno de los cereales de mayor importancia a nivel mundial (Bernal y Gondar, 2007). Se adapta ampliamente a diversas condiciones, pero a su vez es muy exigente en cuanto a la fertilización física del suelo. Entre las características físicas más importantes se encuentran (Bonilla, 2009):

- Capacidad de retención de agua. Es fundamental para asegurar un suministro continuo entre riegos.
- Sensibilidad a la salinidad del suelo. Este cultivo soporta una salinidad del suelo de hasta 1.7 dS/m a 20 °C.
- Aireación. El maíz es muy sensible a la asfixia radicular, limitación de la capacidad de respirar de las plantas a través de las raíces, por lo que no tolera suelos apelmazados.
- Temperatura. El maíz se muestra especialmente sensible durante la germinación, nascencia e inicio de la vegetación. Requiere un mínimo de 12°C de temperatura del suelo para la germinación.
- Requerimientos de agua. Presenta un coeficiente hídrico muy bajo, aproximadamente 300 kg de agua por un kg de sustancia seca producida, pero debe satisfacer perfectamente las exigencias hídricas. El consumo hídrico se estima en unos 5000-6000 m³/ha para el desarrollo de todo el ciclo de cultivo.

En la tabla 2 se presentan las cantidades de los principales nutrientes consumidos por el maíz, que varían ligeramente según la referencia consultada (López Bellido et al., 2009).

La extracción más fuerte de nutrientes se produce a partir de las 4-5 semanas, pudiendo asimilar el nitrógeno tanto en forma nítrica como amoniacal. Una parte importante de los nutrientes extraídos son destinados a partes de la planta que no siempre se retiran del campo, por lo que existen importantes diferencias entre la extracción total de nutrientes y la exportación en los granos (López-Bellido et al., 2009).

Tabla 2: Extracción y exportación real de nutrientes principales del maíz

NUTRIENTES	EXPORTACIÓN EN GRANOS (Kg/Tn grano)	EXTRACCIÓN TOTAL (Kg/Tn grano)
Nitrógeno	15.5-19.1	24.7-30.0
Fósforo (P ₂ O ₅)	7.0-12.3	10.2-12.3
Potasio (K ₂ O)	4.5-5.4	20.7-25.2

En este estudio este cultivo se siembra en un suelo arcilloso a principios del mes de mayo y se recoge en el mes de febrero.

El girasol tiene gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones climáticas y edáficas. Su crecimiento se regula por la disponibilidad de agua y nutrientes, además de otros factores como temperatura y radiación a lo largo del ciclo. Entre las propiedades y características de este cultivo se encuentran:

- Temperatura. Las temperaturas altas favorecen el cuajado y maduración de los frutos.
- Requerimientos de agua y humedad. Es un cultivo que puede desarrollarse con buenos rendimientos en condiciones de secano, siempre que las precipitaciones anuales superen los 400 mm y no se concentren en invierno, ya que aprovecha el agua de forma eficiente en condiciones de escasez. El cultivo antecesor, las labranzas y los barbechos condicionan el almacenaje de agua en el suelo y resultan de gran importancia.
- Responde bien al riego, siendo las necesidades totales en general entre 3000-4000 m³/ha.

En la tabla 3 se presentan los principales nutrientes consumidos por el girasol por tonelada de grano producido (López-Bellido et al., 2009).

Tabla 3: Requerimientos de nutrientes del girasol

NUTRIENTES	(Kg/Tn pipa comercial)
Nitrógeno	30-40
Fósforo (P ₂ O ₅)	15-20
Potasio (K ₂ O)	30-40

En este estudio este cultivo se siembra en un suelo arenoso a principios del mes de mayo y se recoge en octubre.

2. Selección de suelos

Para poder llevar a cabo una agricultura productiva y sostenible, se necesitan terrenos fértiles, entendiéndose por fertilidad del suelo a su capacidad para suministrar todos y cada uno de los nutrientes que necesitan las plantas en cada momento, en la cantidad necesaria y de forma asimilable, para llevar a cabo los procesos fisiológicos y metabólicos que les permiten desarrollarse (García et al., 2009). Los nutrientes son diversos y se clasifican como macronutrientes (carbono, hidrógeno, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio y calcio), que suponen el 99% de la masa y micronutrientes (hierro, manganeso, zinc, cobre, boro, níquel y cloro), que son necesarios en muy pequeñas cantidades y son catalizadores de numerosas reacciones del metabolismo vegetal, aunque se consideran tóxicos a partir de determinadas concentraciones.

La zona objeto de estudio se encuentra en la Comunidad Foral de Navarra. El clima de la zona es de transición entre mediterráneo y atlántico. Se caracteriza por ser templado-frío, lleno de contrastes y que varía de un año a otro. La temperatura media anual es de 12.4 °C. Los cambios de invierno a primavera y de verano a otoño son bruscos. La media de temperaturas máximas es de 27.1 °C en agosto, el mes más cálido; la media de las mínimas es de 1.1 °C en enero, el mes más frío. El total de precipitaciones a lo largo del año es de un promedio de 772.5 l/m². Anualmente llueve unos 132 días, que se concentran sobre todo en invierno (Larraya, 2011).

Los dos suelos objeto de estudio son terrenos de 4 hectáreas cada uno, distanciados entre sí 887 metros, los cuales se muestran en la figura 3.



Figura 3: Imágenes del suelo arcilloso y el suelo arenoso (Google maps)

La diferencia entre ambos suelos es la textura, siendo en uno arcillosa (contenido en arcilla superior al 30%) y en otro arenosa (contenido en arcilla inferior al 10%). La textura es una propiedad que influye sobre el laboreo, la compactación, disponibilidad de agua útil sobre las plantas, disponibilidad de nutrientes o penetración de raíces. Algunas de las características propias de cada textura se muestran en la tabla 4.

Ambos suelos presentan una ligera pendiente, más pronunciada en el suelo arcilloso. Cada campo se cultiva con un tipo de cultivo diferente, aunque previamente los dos han estado cultivados con maíz. Durante la campaña objeto de estudio se cultiva girasol en el suelo de textura arenosa y se cultiva maíz en el suelo de textura arcillosa.

Tabla 4: Características de los suelos de textura arcillosa y de textura arenosa

	CARACTERÍSTICAS
Suelo arenoso	Baja compactación Alta infiltración Facilidad para laboreo Alta capacidad retención agua disponible Alta inercia térmica
Suelo arcilloso	Alta compactación Baja infiltración Dificultad para laboreo Dificulta penetración de raíces Alta capacidad de intercambio térmico

La forma de riego de ambos campos es por aspersión. Cada aspersor está separado unos 18 m del siguiente y cubren toda la superficie cultivable. El agua de riego se encuentra a 1.45 m del suelo arenoso y a menos de 500 m del suelo arcilloso.

3. Características del fango y aplicación al terreno

Los fangos aplicados en los suelos provienen de una depuradora de aguas residuales urbana, situada en la Comunidad Foral de Navarra, que trata unos 1350 m³/semana de fango mediante digestión aerobia. La principal diferencia entre los fangos aplicados en los dos suelos es el tiempo que permanecen almacenados antes de su aplicación. El fango aplicado en la superficie arcillosa permanece dos meses hasta su esparcimiento en el suelo y el fango aplicado en la superficie arenosa se aplica en 24 horas, tras su transporte desde la planta de tratamiento.

Los fangos se aplicaron al suelo en el mes de mayo de 2016. La recogida de cultivos anterior a la aplicación del fango se realizó en el mes de febrero de ese mismo año. Previamente a la aplicación del fango el suelo se rompe y airea con un rotocultor. Se aplican 25 toneladas de fango en cada campo (6.25 Tn/ha).

La aplicación de los fangos se realiza mediante una distribución en superficie con una abonadora agrícola. Una vez cubierta la superficie de cultivo, se labra, con el fin de enterrar y remover los primeros centímetros de la superficie de cultivo con los fangos. Dos días después del acondicionamiento y preparación del suelo, se procede a la siembra de los cultivos correspondientes en cada campo por medio de una sembradora agrícola.

4. Toma de muestras, acondicionamiento y parámetros de control

Las muestras objeto de estudio son: muestras de suelos sin abonar, muestras de fangos de EDAR antes de añadir al suelo y muestras de suelo abonado con fangos. Además se toman muestras de agua de riego para su caracterización.

La toma de muestras se realiza en días en los que las condiciones climatológicas son favorables entre mayo de 2016 y febrero de 2017. Previamente a la aplicación del fango al suelo se toman muestras tanto del suelo como del fango antes de mezclarlos.

A continuación, una vez abonados los suelos y sembrados los cultivos, se realizan dos muestreos sucesivos después de la siembra de los cultivos y durante el crecimiento de los mismos, tomando muestras del suelo abonado y del agua de riego. Finalmente, se toman muestras del suelo abonado tras la recogida del cultivo (24 semanas en el suelo arenoso y 42 semanas en el suelo arcilloso). Las figuras 4 muestra imágenes de uno de los suelos antes de la aplicación del fango y de uno de los muestreos realizados.

La figura 5 muestra la línea temporal de las muestras tomadas y la nomenclatura utilizada en este trabajo para la denominación de las mismas.



Figura 4: Imágenes de los suelos y la toma de muestras. a) Suelo arenoso antes de abonar; b) Toma de muestra de suelo arcilloso

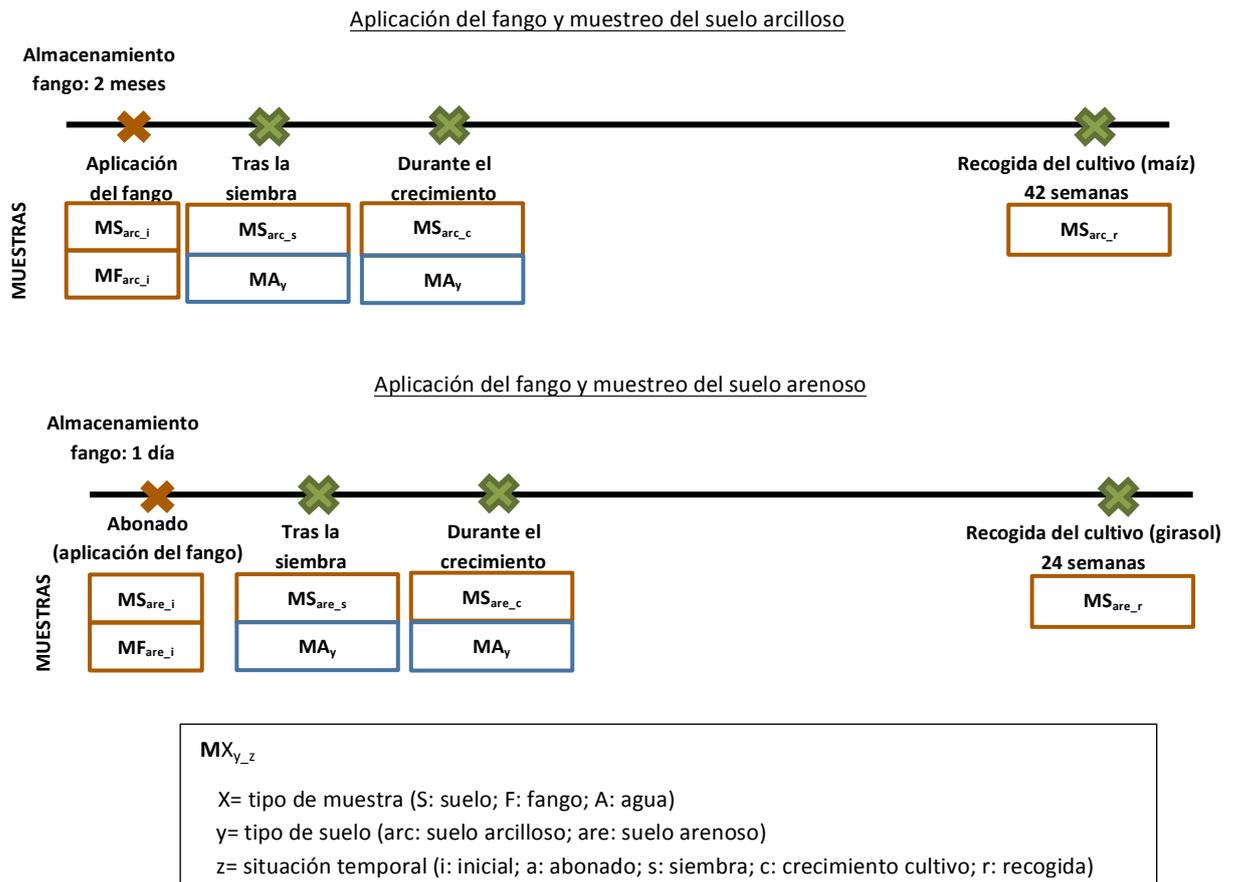


Figura 5: Línea temporal de la toma de muestras

Las muestras, tanto de suelo sin abonar como de suelo abonado, se toman mediante un método estandarizado (Carter, 1993). Las parcelas se dividen en cuadrículas, considerando que los sistemas de riego por aspersión delimitan un cuadrado de aproximadamente 18 m x 18 m.

En cada cuadrícula se recoge con una azada una porción de suelo a unos 15 cm de profundidad. Cada porción es acumulada en un cubo hasta completar el muestreo total del suelo objeto de estudio.

El contenido de los cubos se deposita sobre una superficie aislada y de toda la mezcla se selecciona una porción significativa de las muestras por el método de cuarteos.

Este método consiste en homogeneizar el material, aplanarlo hasta obtener un espesor y diámetro uniformes, dividir la pila en cuatro partes iguales y seleccionar partes diagonalmente opuestas.

La mezcla vuelve a homogeneizarse, aplanarse, cuartearse y seleccionar sucesivamente hasta obtener el tamaño de muestra requerido, en este caso 500 g.

Por otro lado, se toma una muestra inicial de fango antes de añadirse al suelo así como muestras de agua de riego.

Se utilizan recipientes estériles de 150 y 500 ml para el análisis de bacterias y recipientes no estériles para el análisis de parámetros físico-químicos.

Las muestras se transportan refrigeradas hasta su análisis. Las bacterias se analizan en un tiempo inferior a 24 horas (ISO y AENOR, 2011, 2013a).

En las muestras se analizan los parámetros físico-químicos y microbiológicos detallados en las tablas 5 y 6, respectivamente.

Tabla 5: Parámetros físico-químicos de control, instrumentación y metodología de referencia

PARÁMETRO	UNIDADES	INSTRUMENTACIÓN	ERROR	MÉTODO (REFERENCIA)
pH (Tª)	-	Medidor portátil multiparamétrico ORION Star A3295	≤0.02	4500H ⁻ -B (Eaton et al., 2005)
Conductividad	μS/cm	Conductímetro Hanna HI 9033 Multirange Medidor portátil multiparamétrico ORION Star A3295	≤0.5μS/cm	27888:1994 (Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), 1994)
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg/l	Fotómetro multiparamétrico Hanna	±1	410.4 (Environmental Protection Agency, 1993)
Carbono Orgánico Disuelto (COD)	mg/l	Analizador de COT Shimadzu	5-10%	5310B (Eaton et al., 2005)
Sólidos Totales (ST) y Sólidos en Suspensión (SS)	g/g mg/l	Balanza de laboratorio Estufa	7%	2540 B;D (Eaton et al., 2005)
Nitrógeno orgánico	%	Digestor	-	4500-N _{org} (Eaton et al., 2005)
Fósforo asimilable	mg/kg	-	-	Método Olsen 4500-P (Eaton et al., 2005)
Potasio asimilable	mg/kg	Espectrómetro de absorción atómica (llama)	-	3111 (Eaton et al., 2005)
Calcio (Ca) / Hierro (Fe) Magnesio (Mg) / Cadmio (Cd) / Cobre (Cu) / Níquel(Ni)/ Plomo (Pb) / Zinc (Zn) / Mercurio (Hg) / Cromo (Cr)	mg/g	Espectrómetro de emisión atómica (ICP-OES)	-	3120B (Eaton et al., 2005)

Tabla 6: Normas de análisis y medios de cultivo empleados para la caracterización microbiológica

PARÁMETRO	MÉTODO ESTÁNDAR	REFERENCIA	MEDIO DE CULTIVO
Coliformes totales	UNE EN ISO 9308-1	(ISO y AENOR, 2014)	Chromogenic Coliform Agar (CCA)
	Standard Methods 9215B	(Eaton et al., 2005)	
	9215C 9215D		
<i>Escherichia coli</i>	UNE EN ISO 9308-1	(ISO y AENOR, 2014)	Chromogenic Coliform Agar (CCA)
	Standard Methods 9215B	(Eaton et al., 2005)	Agar Glucuronico triptona y bilis (TBX)
	9215C		
	9215D 9222D		
<i>Staphylococcus aureus</i>	UNE EN ISO 6888:2000	(ISO y AENOR, 2000)	Agar Mannitol
	Standard Methods 9215C	(Eaton et al., 2005)	Agar nutritivo +NaCl (20%)
<i>Enterococcus sp.</i>	UNE EN ISO 7899-2	(ISO y AENOR, 2001)	Agar Slanetz&Bartley
	Standard Methods 9215B	(Eaton et al., 2005)	
	9215C		
	9215D		
<i>Pseudomonas sp.</i>	UNE EN ISO 16266	(ISO y AENOR, 2008)	Agar Cetrimida
	Standard Methods 9215C	(Eaton et al., 2005)	
<i>Salmonella sp.</i>	UNE EN ISO 6579	(ISO y AENOR, 2003)	Agar XLD Agar cromogénico Salmonella Latex test
Recuento de mesófilas totales	Standard Methods 9215B	(Eaton et al., 2005)	Agar nutritivo

RESULTADOS

1. Análisis del agua de riego

Las tablas 7 y 8 muestran los resultados promedio de la caracterización físico-química y microbiológica, respectivamente, del agua utilizada en el riego de ambos terrenos. Tal y como muestra la tabla 7, el agua contiene una concentración destacable de sólidos suspendidos y DQO.

Tabla 7: Resultados de caracterización físico-química del agua de riego

	MA _y
pH	7.2
Temperatura (°C)	11.8
Conductividad (µS/cm)	160
DQO (mgO ₂ /l)	110
COD (mg/l)	8
SS (mg/L)	110

En la tabla 8 se observa que en el agua de riego las bacterias más abundantes son coliformes totales y *Pseudomonas* sp., por lo que su utilización supone un aporte continuo de microorganismos al suelo en una concentración del orden de 10^3 UFC/100ml.

Tabla 8: Caracterización microbiológica (UFC/100ml) del agua de riego

	MA _y
Coliformes totales	$(1.3 \pm 0.5) \times 10^3$
<i>Escherichia coli</i>	$<5.0 \times 10^1$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$(1.5 \pm 0.8) \times 10^2$
<i>Enterococcus</i> sp.	$<1.0 \times 10^1$
<i>Pseudomonas</i> sp.	$(1.8 \pm 0.8) \times 10^3$
Recuento de mesófilas totales	$(2.1 \pm 0.3) \times 10^3$

2. Aplicación del fango en suelo arcilloso

Los resultados de la caracterización físico-química de suelos y fango previa al abonado, se muestran en la tabla 9 (MS_{arc_i} y MF_{arc_i} de la figura 5).

Tabla 9: Caracterización físico-química del suelo arcilloso antes de ser abonado (MS_{arc_i}) y del fango (MF_{arc_i}) con el que se va a abonar

	Unidades	MS_{arc_i}	MF_{arc_i}
pH	-	7.1	6.7
Temperatura	°C	18.0	16.0
Conductividad	μS/cm	4200	1100
DQO	mgO ₂ /l	800	5400
COD	mg/l	12	530
ST	g/g	0.85	25.3
N orgánico	%	0.86	25.92
Fósforo	mg/kg	9.8	13.3
Potasio asimilable	mg/kg	200	349
Ca	mg/g	152.63	35.56
Fe	mg/g	22.15	6.95
Mg	mg/g	7.39	1.90
Cd	mg/g	<MCD	<MCD
Cu	mg/g	<MCD	0.14
Ni	mg/g	0.03	0.04
Pb	mg/g	<MCD	<MCD
Zn	mg/g	0.05	0.62
Hg	mg/g	<MCD	<MCD
Cr	mg/g	<MCD	<MCD

MCD: Límite de detección del equipo

Tal y como se muestra en la tabla 9, el suelo arcilloso presenta una alta concentración de minerales como Ca, Fe y Mg. Por otro lado, en el fango es elevada la concentración de proteína bruta, fósforo, potasio así como la cantidad de materia orgánica. La concentración de aquellos metales limitados en la legislación vigente (RD 1310/1990), en concreto Cd, Cu, Pb, Zn, Hg y Cr está por debajo de los límites establecidos, tanto en el suelo como en el fango.

La evolución temporal de los valores de parámetros físico-químicos en el suelo arcilloso se muestra en la tabla 10.

Tabla 10: Evolución temporal de los valores de parámetros físico-químicos en el suelo arcilloso

	Unidades	MS _{arc_s}	MS _{arc_c}
pH	-	7.0	6.8
Temperatura	°C	13.0	18.0
Conductividad	μS/cm	9000	9800
DQO	mgO ₂ /l	850	14000
COD	mg/l	11	26
ST	g/g	0.87	0.84
N orgánico	%	0.87	0.8
Fósforo	mg/kg	8.5	22.1
Potasio asimilable	mg/kg	214	210
Ca	mg/g	-	134.89
Fe	mg/g	-	21.46
Mg	mg/g	-	7.43
Cd	mg/g	-	<MCD
Cu	mg/g	-	<MCD
Ni	mg/g	-	0.03
Pb	mg/g	-	<MCD
Zn	mg/g	-	0.05
Hg	mg/g	-	<MCD
Cr	mg/g	-	<MCD

Si se comparan los resultados de las tablas 9 y 10, no se observan diferencias físico-químicas apreciables en el suelo, tras la aplicación del fango y la siembra del cultivo (MS_{arc_s}). Sin embargo, sí se observa que en la muestra tomada durante el crecimiento del cultivo se produce un incremento destacable de la materia orgánica (medida como DQO) y del fósforo, así como una disminución de la concentración de calcio (MS_{arc_c}). La concentración de metales se encuentra en todos los casos por debajo de los límites exigidos en el RD 1310/1990.

Los resultados del análisis del suelo final, tras la recogida del cultivo (maíz) a las 42 semanas, se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: Caracterización físico-química del suelo arcilloso tras la recogida del cultivo (42 semanas)

	Unidades	MS _{arc_r}
pH	-	7.2
Temperatura	°C	10.4
Conductividad	μS/cm	11000
DQO	mgO ₂ /l	12000
COD	mg/l	20
ST	g/g	0.84

Tal y como muestra la tabla 11, se observa una disminución de la materia orgánica y un aumento del pH, en comparación con la muestra de suelo tomada durante el crecimiento del cultivo (MS_{arc_c}).

Por otro lado, la figura 6 muestra los resultados promedio de la caracterización microbiológica del suelo y el fango por separado, antes de mezclarse, así como la evolución temporal de la contaminación microbiológica en el suelo abonado.

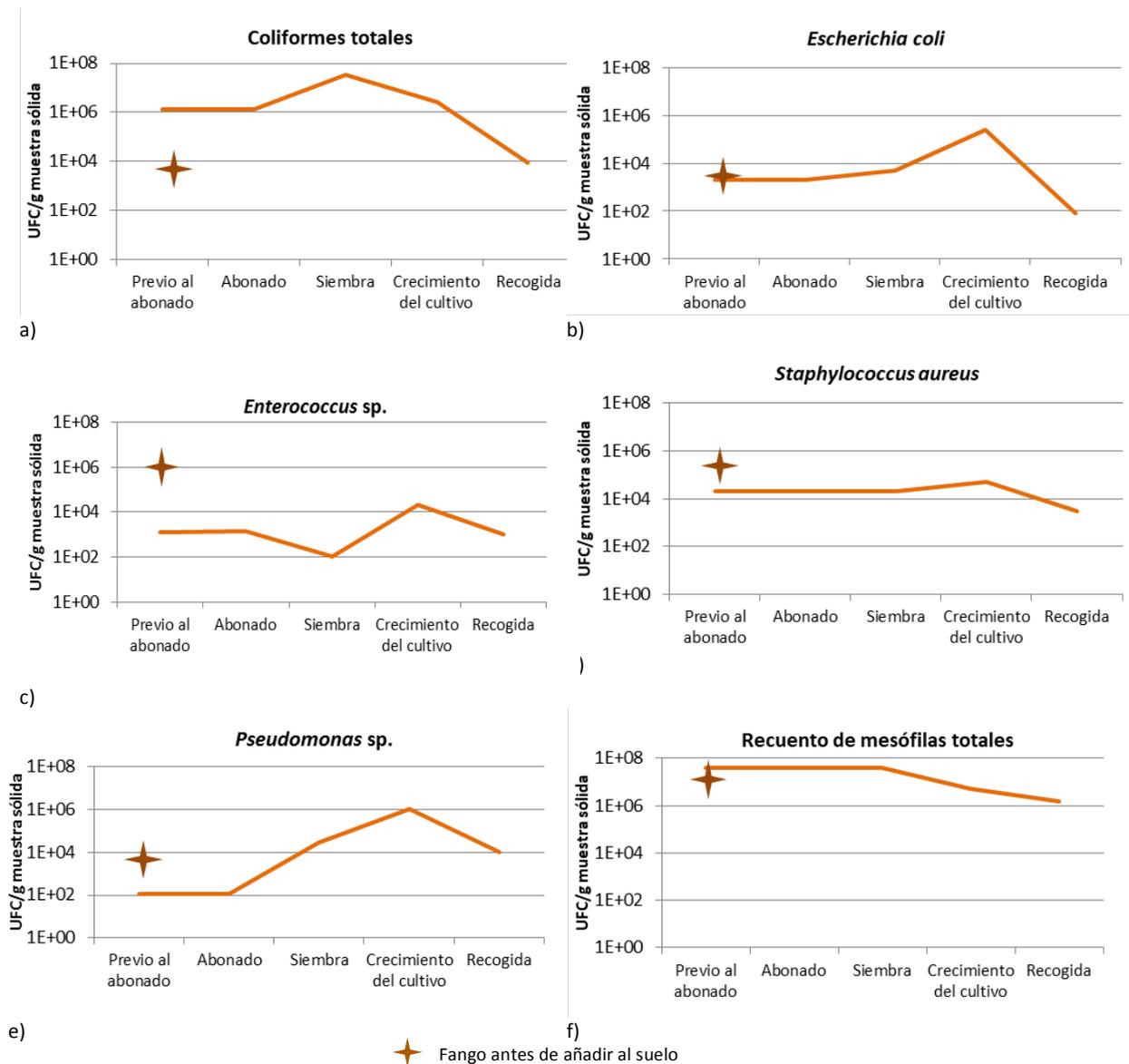


Figura 6: Evolución de la concentración microbiológica en el suelo arcilloso abonado y concentración inicial del fango aplicado. a) Coliformes totales; b) *Escherichia coli*; c) *Enterococcus sp.*; d) *Staphylococcus aureus*; e) *Pseudomonas sp.*; f) Recuento de mesófilas totales

Tal y como muestran los resultados de caracterización microbiológica (figura 6), los resultados obtenidos en el análisis del suelo previo al abonado, el recuento de mesófilas totales es de 10^7 UFC/g de muestra seca en el suelo (figura 6f) y la concentración promedio de cada bacteria analizada es superior a 10^2 UFC/g de muestra seca, siendo la mayor concentración la de coliformes totales (figura 6a).

Por otro lado, en los fangos, el recuento de mesófilas totales es de 10^7 UFC/g de muestra seca y el valor promedio de la concentración de cada bacteria analizada es superior a 10^3 UFC/g de muestra seca, siendo *Enterococcus sp.* la que mayor concentración presenta (MF_{arc_i}). No se detecta *Salmonella spp.* en las muestras recogidas de suelo y fango.

En la muestra de suelo tomada tras la siembra del cultivo, la concentración de *E.coli*, *S.aureus* y recuento de mesófilas totales es del mismo orden de magnitud que la concentración determinada en el suelo antes de abonar, resultados que coinciden en algunos casos con los observados por otros investigadores (Pourcher et al., 2007). Por otro lado, la concentración de coliformes totales y *Pseudomonas* sp. es 1 y 2 órdenes de magnitud mayor, respectivamente, respecto a la muestra inicial de suelo antes de abonarlo.

En la muestra tomada durante el crecimiento del cultivo, la concentración de *E.coli*, *Enterococcus* sp. y *Pseudomonas* sp. aumenta respecto a la caracterización inicial del suelo, la de coliformes totales y *Staphylococcus aureus* es más o menos la misma y la de mesófilas totales va descendiendo.

Por otro lado, la concentración bacteriana (recuento de mesófilas totales) en la muestra tomada tras la recogida del cultivo, disminuye respecto a la concentración inicial. Así mismo, salvo la concentración de *Pseudomonas* sp., el resto de los microorganismos analizados se cuantifican en menor concentración que en la muestra de suelo antes del abonado.

Tal y como se muestra en la tabla 8, relativa a la caracterización microbiológica del agua de riego, y teniendo en cuenta el consumo hídrico para el desarrollo del maíz (5000-6000 m³/ha), la contaminación presente en este agua podría repercutir de manera considerable sobre la existente en el suelo, incluso en mayor medida que la procedente de los fangos con los que se ha abonado.

3. Aplicación del fango en suelo arenoso

Los resultados de la caracterización físico-química de suelos y fangos previa al abonado se muestran en la tabla 12 (MS_{are_i} y MF_{are_i}) de la figura 5.

Tal y como se muestra en la tabla 12, el suelo arenoso presenta una elevada concentración de minerales como Ca, Fe y Mg.

Por otro lado, en el fango es elevada la concentración de proteína bruta, fósforo, potasio así como la cantidad de materia orgánica.

La concentración de aquellos metales limitados en la legislación vigente (RD1310/1990), en concreto Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg y Cr están por debajo de los límites establecidos, tanto en el suelo como en el fango.

La evolución temporal de los valores de parámetros físico-químicos en el suelo arenoso abonado se muestra en la tabla 13.

Tabla 12: Caracterización físico-química del suelo arenoso antes de ser abonado (MS_{are_i}) y del fango (MF_{are_i}) con el que se va a abonar

	Unidades	MS_{are_i}	MF_{are_i}
pH	-	7.1	6.6
Temperatura	°C	18.0	16.0
Conductividad	$\mu S/cm$	10700	10000
DQO	mgO_2/l	380	3700
COD	mg/l	15	300
ST	g/g	0.87	0.85
N orgánico	%	0.68	21.34
Fósforo	mg/kg	10.5	16.0
Potasio asimilable	mg/kg	118	292
Ca	mg/g	161.30	49.39
Fe	mg/g	17.58	8.04
Mg	mg/g	4.34	3.78
Cd	mg/g	<MCD	<MCD
Cu	mg/g	<MCD	0.15
Ni	mg/g	0.03	0.04
Pb	mg/g	<MCD	<MCD
Zn	mg/g	0.05	0.69
Hg	mg/g	<MCD	<MCD
Cr	mg/g	<MCD	<MCD

Tabla 13: Evolución temporal de los valores de parámetros físico-químicos en el suelo arenoso

	Unidades	MS_{are_s}	MS_{are_c}
pH	-	7.3	7.2
Temperatura	°C	13.2	18.4
Conductividad	$\mu S/cm$	11300	10900
DQO	mgO_2/l	154	1500
COD	mg/l	8	22
ST	g/g	0.89	0.84
N orgánico	%	0.68	0.60
Fósforo	mg/kg	6.5	20.5
Potasio asimilable	mg/kg	130	136
Ca	mg/g	-	124.43
Fe	mg/g	-	16.99
Mg	mg/g	-	4.57
Cd	mg/g	-	<MCD
Cu	mg/g	-	<MCD
Ni	mg/g	-	0.03
Pb	mg/g	-	<MCD
Zn	mg/g	-	0.05
Hg	mg/g	-	<MCD
Cr	mg/g	-	<MCD

Si se comparan los resultados de las tablas 12 y 13, no se observan diferencias físico-químicas apreciables en el suelo tras la aplicación del fango, salvo una ligera disminución en la materia orgánica presente, aumento del potasio y reducción del fósforo (MS_{are_s}).

Sin embargo, sí se observa que en la muestra de suelo abonado tomada durante el crecimiento del cultivo se produce un incremento destacable de la materia orgánica (medida como DQO) y del fósforo, así como una reducción de la concentración del calcio (MS_{are_c}). La concentración de metales se encuentra en todos los casos por debajo de los límites exigidos en el RD 1310/1990.

Los resultados del análisis del suelo final, tras la recogida del cultivo (girasol) a las 24 semanas, se muestran en la tabla 14.

Tabla 14: Caracterización físico-química del suelo arenoso tras la recogida del cultivo (24 semanas)

	Unidades	MS_{are_r}
pH	-	7.1
Temperatura	°C	16.2
Conductividad	$\mu S/cm$	11500
DQO	mgO_2/l	1700
COD	mg/l	24
ST	g/g	0.92
N orgánico	%	0.58
Fósforo	mg/kg	14.7
Potasio asimilable	mg/kg	140.60

Tal y como muestra la tabla 14, no se observan variaciones en la composición físico-química en comparación con la muestra de suelo tomada durante el crecimiento del cultivo.

La figura 7 muestra los resultados promedio de la caracterización microbiológica del suelo y el fango por separado, antes de mezclarse, así como la evolución temporal de la contaminación microbiológica en el suelo abonado, para cada microorganismo objeto de estudio.

Tal y como muestran los resultados de caracterización microbiológica de la figura 7, el recuento de mesófilas totales es de 10^7 UFC/g de muestra seca en el suelo y la concentración promedio de cada bacteria es superior a 10^2 UFC/g de muestra seca, siendo la mayor concentración la de coliformes totales (MS_{are_i}). Por otro lado, en el fango el recuento de mesófilas totales es de 10^7 UFC/g de muestra seca, el valor promedio de concentración de cada bacteria es superior a 10^5 UFC/g de muestra seca y la mayor concentración se corresponde con *Enterococcus* sp. (MS_{are_i}). No se detecta *Salmonella* spp. en las muestras recogidas de suelo y fango.

En la muestra de suelo abonado tomada tras la siembra del cultivo, salvo en el caso de *Pseudomonas* sp., la concentración del resto de indicadores bacterianos se mantiene o se reduce respecto a la concentración inicial de la muestra de suelo. Por otro lado, en la muestra de suelo abonado tomada durante el crecimiento del cultivo, la concentración de los microorganismos analizados sigue siendo del mismo orden de magnitud o inferior a la concentración determinada en la muestra inicial del suelo, salvo para *Pseudomonas* sp.

Finalmente, tras la recogida del cultivo, la concentración global bacteriana (medida como recuento de mesófilas totales) es inferior respecto a la determinada en la muestra inicial del suelo antes de su abonado. Así mismo, el resto de indicadores microbiológicos presentan una concentración del mismo orden de magnitud o inferior respecto a la concentración inicial del suelo (MS_{are_i}).

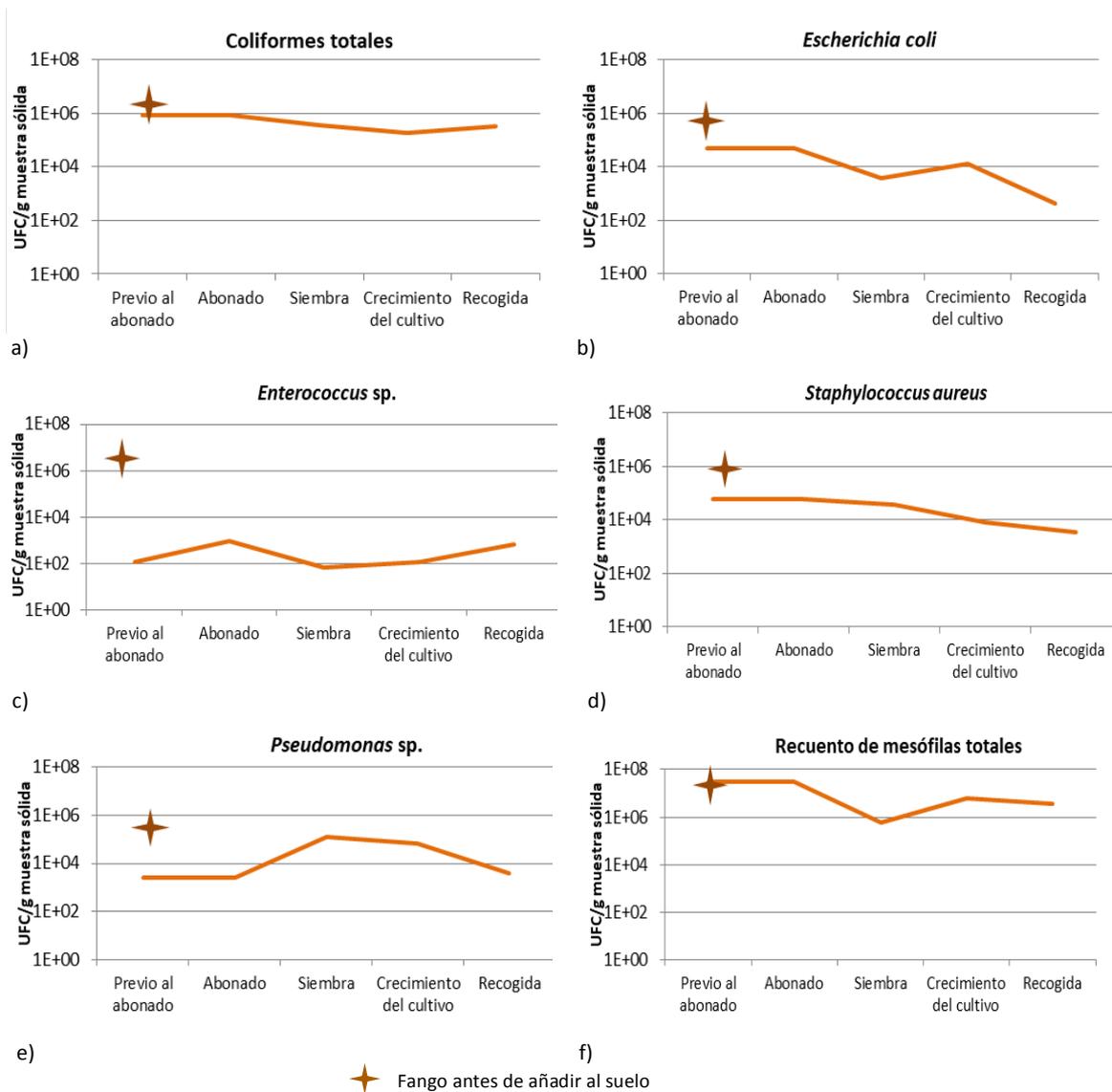


Figura 7: Evolución de la concentración microbológica en el suelo arenoso abonado y concentración inicial del fango aplicado. a) Coliformes totales; b) *Escherichia coli*; c) *Enterococcus sp.*; d) *Staphylococcus aureus*; e) *Pseudomonas sp.*; f) Recuento de mesófilas totales

Teniendo en cuenta los requerimientos de agua para el girasol (3000-4000 m³/ha), la contaminación presente en el agua de riego, podría repercutir sobre la concentración existente en el suelo.

Sin embargo, la demanda de agua por parte del girasol es inferior a la exigida por el maíz, de modo que la aportación de microorganismos al suelo a través del agua de riego es menor, lo que podría estar relacionado con la menor concentración determinada en las muestras de suelo arenoso recogidas después de la siembra del cultivo y durante el crecimiento.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- 1.- Las propiedades beneficiosas de los fangos quedan patentes por la elevada concentración de materia orgánica y minerales presentes, sobre todo por el porcentaje de proteína bruta, relacionado con el aporte de nitrógeno, resultados que coinciden con los obtenidos por otros autores (de las Heras et al., 2005). Tras su aplicación en el suelo y hasta la recogida del cultivo, el suelo abonado presenta una mayor concentración de DQO y de fósforo asimilable. El aumento de potasio en los suelos tras el abonado, puede relacionarse con la liberación por parte del fango de los minerales y nutrientes que no han sido asimilados todavía por las plantas.
- 2.- En cuanto a los resultados de la determinación de metales, no se observa un incremento destacable de la concentración de metales tras la adición del fango, en ninguno de los dos suelos.
- 3.- El tiempo de almacenamiento del fango antes de su aplicación al suelo influye en la concentración microbiológica presente. El fango que permanece menos tiempo almacenado contiene una mayor concentración de coliformes totales, *E.coli* y *Pseudomonas* sp., siendo hasta 3 órdenes de magnitud mayor que en el fango que permanece más tiempo almacenado hasta su aplicación. Sin embargo, la concentración de *S. aureus* y *Enterococcus* sp. es del mismo orden en los dos fangos analizados.
- 4.- En general, la concentración bacteriana determinada (recuento de mesófilas totales) es de un orden de magnitud menor en los suelos tras la recogida del cultivo que la determinada en el suelo inicialmente antes de añadir el fango. Por otro lado, la concentración a lo largo de las semanas de muestreo difiere en función del microorganismo considerado, así como del suelo analizado. Mientras algunos autores determinan que el tipo de suelo no tiene un efecto significativo en la reducción microbiológica (Lang y Smith, 2007; Schwarz et al., 2014), otros demuestran que la supervivencia de los microorganismos es menor en suelos arenosos (Pourcher et al., 2007), por considerar que en general el suelo arenoso es más agresivo en la descomposición de organismos entéricos al ser más susceptibles al estrés por humedad (Lang y Smith, 2007), aunque en este estudio no se ha podido relacionar la evolución de la concentración microbiológica con la tipología del suelo.
- 5.- No se detecta *Salmonella* spp. en ninguna de las muestra analizadas.
- 6.- El agua de riego analizada tiene una concentración microbiológica de hasta 10^3 UFC/100ml, lo que supone un aporte continuo de microorganismos al suelo, incluso mayor que el procedente de los fangos.

CONCLUSIONES

Como consecuencia de los resultados obtenidos durante el trabajo de investigación realizado, se puede concluir que:

- Las condiciones de almacenamiento del fango tratado influyen en la contaminación microbiológica presente. Aunque la concentración de las bacterias Gram positivas no se ve afectada, la concentración de las Gram negativas, disminuye al aumentar el tiempo de almacenamiento.

- El fango tratado procedente de un proceso de depuración de aguas residuales urbanas mejora las características agronómicas de los suelos, tanto de naturaleza arcillosa como arenosa, aumentando la concentración de materia orgánica y nutrientes.
- La aplicación del fango al suelo no supone un empeoramiento de la calidad microbiológica del terreno, teniendo en cuenta los indicadores bacterianos objeto de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación recibida a través del Grupo de Investigación de Referencia Agua y Salud Ambiental (DGA-FSE T51_17R), el Proyecto CTM3013-41397-R “Evaluación de procesos en el tratamiento de aguas y fangos en EDARs, para la reducción de microorganismos con riesgo sanitario y ambiental” financiado por MINECO-FEDER y el contrato de investigación “Estudio de investigación para la mejora de la calidad sanitaria de efluentes procedentes de EDARs y de vertederos de residuos urbanos situados en la Comunidad Foral de Navarra” financiado por NILSA.

BIBLIOGRAFÍA

- Bernal, M.P., Gondar, D.M., 2008. Producción y gestión de los residuos orgánicos: situación actual a nivel mundial, comunitario y estatal. Moreno, J., Mora, R. (Eds.), Compostaje. Ediciones Mundi-Prensa. ISBN 978-84-8476-346-8.
- Bonilla, N., 2009. Manual de recomendaciones técnicas: cultivo de maíz (*Zea mays*). Ramírez, L., Morúa, J. (Eds.). Inst. Nac. Innovación y Transf. en Tecnol. Agropecu. ISBN 978-9968-586-00-9.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., 2009. Influence of different pretreatments on anaerobically digested sludge characteristics: Suitability for final disposal. *Water, Air, Soil Pollut.* 199, 311–321. doi:10.1007/s11270-008-9880-z.
- Carter, M.R., 1993. Soil sampling and methods of analysis. Lewis Publishers. Ediciones Taylor&Francis Group. ISBN 978-0-8493-3586-0.
- de las Heras, J., Mañas, P., Labrador, J., 2005. Effects of several applications of digested sewage sludge on soil and plants. *J. Environ. Sci. Heal.* A40, 437–451.
- Documento de trabajo: Draft Discussion document for the ad hoc meeting on biowastes and sludges, 2003. E 80, enero de 2004.
- Documento de trabajo: Working Document: Sludge and Biowaste, 2010. ENV.C.2, septiembre de 2010.
- Eaton, A., Clesceri, L., Rice, E., Greenberg, A., 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. APA-AWWA-WEF. ISBN 0-87553-047-8.
- Environmental Protection Agency, 1993. Método EPA 410.4, Revisión 2.0: Determinación de Demanda Química de Oxígeno por colorimetría.

- Environmental Protection Agency, 2003. Environmental Regulations and Technology Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge Control of Pathogens and Vector Attraction. *Environ. Prot.* 47, 498–504. doi:10.1016/S0015-1882(99)80035-4.
- Estrada, I.B., Aller, A., Aller, F., Gómez, X., Morán, A., 2004. The survival of *Escherichia coli*, faecal coliforms and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants. *Bioresour. Technol.* 93, 191–198. doi:10.1016/j.biortech.2003.10.022.
- García, P., Lucena, J., Ruano, S., Nogales, M., 2009. Guía práctica de fertilización racional de los cultivos en España. Edita Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. ISBN 978-84-491-0997-3
- Gondim-Porto, C., Platero, L., Nadal, I., Navarro-García, F., 2016. Fate of classical faecal bacterial markers and ampicillin-resistant bacteria in agricultural soils under Mediterranean climate after urban sludge amendment. *Sci. Total Environ.* 565, 200–210. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.04.160.
- Gonzalez-Ubierna, S., Jorge-Mardomingo, I., Cruz, M., Valverde, I., Casermeiro, M., 2013. Sewage sludge application in Mediterranean agricultural soils: Effects of dose on the soil carbon cycle. *Int. J. Environ. Res.* 7, 945–956.
- Horswell, J., Ambrose, V., Clucas, L., Leckie, A., Clinton, P., Speir, T.W., 2007. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. after application of sewage sludge to a *Pinus radiata* forest. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1321–1331. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03373.x.
- Joo, S.H., Monaco, F., Dello, Antmann, E., Chorath, P., 2015. Sustainable approaches for minimizing biosolids production and maximizing reuse options in sludge management: A review. *J. Environ. Manage.* 158, 133–145. doi:10.1016/j.jenvman.2015.05.014.
- Lang, N.L., Bellett-Travers, M.D., Smith, S.R., 2007. Field investigations on the survival of *Escherichia coli* and presence of other enteric micro-organisms in biosolids-amended agricultural soil. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1868–1882. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03489.x.
- Lang, N.L., Smith, S.R., 2007. Influence of soil type, moisture content and biosolids application on the fate of *Escherichia coli* in agricultural soil under controlled laboratory conditions. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2122–2131. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03490.x.
- Larraya, J.M., 2011. Los climas de Navarra: diversidad y localización. *Rev. Clasehistoria* 1–13. ISSN 1989-4988.
- Levantesi, C., Beimfohr, C., Blanch, A.R., Carducci, A., Gianico, A., Lucena, F., Tomei, M.C., Mininni, G., 2015. Hygienization performances of innovative sludge treatment solutions to assure safe land spreading. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 7237–7247. doi:10.1007/s11356-014-3572-6.
- López Bellido, L., Betrán Aso, J., Ramos Monreal, Á., López Córcoles, H., López Fuster, P., Bermejo Corrales, J.L., Urbano Terrón, P., Piñeiro Andión, J., Castro Insua, J., Blázquez Rodríguez, R., Ramos Mompó, C., Pomares García, F., Quiñones Oliver, A., Martínez Alcántara, B., Primo-Millo, E., Legaz Paredes, F., Espada Carbó, J.L., García-Escudero Domínguez, E., García García, C., Pérez Rodríguez, J., 2009. Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España. Parte II: Abonado de los principales cultivos en España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. ISBN 978-

84-491-0997-3.

- Milieu Ltd, WRc, RPA, 2003. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. Final Report. Part I: Overview Report 1–20.
- Orden AAA/1072/2013, de 7 de junio, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario. Boletín Oficial del Estado 142, de 14 de junio de 2013.
- Ottoson, J.R., Schnürer, A., Vinnerås, B., 2008. In situ ammonia production as a sanitation agent during anaerobic digestion at mesophilic temperature. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 325–330. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02317.x.
- Pourcher, A.M., Françoise, P.B., Virginie, F., Agnieszka, G., Vasilica, S., Gérard, M., 2007. Survival of faecal indicators and enteroviruses in soil after land-spreading of municipal sewage sludge. *Appl. Soil Ecol.* 35, 473–479. doi:10.1016/j.apsoil.2006.10.005.
- Qureshi, S., Richards, B.K., Hay, A.G., Tsai, C.C., McBride, M.B., Baveye, P., Steenhuis, T.S., 2003. Effect of microbial activity on trace element release from sewage sludge. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3361–6. doi:10.1021/es020970h.
- Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. Boletín Oficial del Estado 262, de 1 de noviembre de 1990.
- Scaglia, B., D’Imporzano, G., Garuti, G., Negri, M., Adani, F., 2014. Sanitation ability of anaerobic digestion performed at different temperature on sewage sludge. *Sci. Total Environ.* 466–467, 888–897. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.07.114.
- Schwarz, K.R., Sidhu, J.P.S., Pritchard, D.L., Li, Y., Toze, S., 2014. Decay of enteric microorganisms in biosolids-amended soil under wheat (*Triticum aestivum*) cultivation. *Water Res.* 59, 185–197. doi:10.1016/j.watres.2014.03.037.
- Sidhu, J.P.S., Toze, S.G., 2009. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environ. Int.* 35, 187–201. doi:10.1016/j.envint.2008.07.006.
- Sobrados, L., Gómez, J., Lasheras, A., García-Ganuza, J., 2010. Criterios para aplicación de fangos de depuradora en suelos: estabilidad e higienización. Ed. Centro de Publicaciones CEDEX. ISBN 978-84-7790-517-2.
- Suksabye, P., Pimthong, A., Dhurakit, P., Mekvichitsaeng, P., Thiravetyan, P., 2016. Effect of biochars and microorganisms on cadmium accumulation in rice grains grown in Cd-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 962–973. doi:10.1007/s11356-015-4590-8.
- UNE-EN 26461: 1995. Calidad del agua. Detección y recuento de los esporos de microorganismos anaerobios sulfito-reductores (clostridia).
- UNE EN 27888:1994. Calidad del agua. Determinación de la conductividad eléctrica. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR).
- UNE EN ISO 9308-1:2014. Calidad del agua. Recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido de microbiota.
- UNE EN ISO 5667-13:2011. Calidad del agua. Muestreo Parte 13: Guía para el muestreo de

lodos.

UN-EN ISO 5667-3:2013. Water quality. Sampling. Part 3: Preservation and handling of water samples.

UNE EN ISO 7899-2:2001. Water quality. Detection and enumeration of intestinal enterococci.

UNE EN ISO 16266:2008. Water quality. Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*.

UNE-EN ISO 6888-1:2000. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species).

UNE EN ISO 6579: 2003: Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp

Vieira, R.F., Pazianotto, R.A.A., 2016. Microbial activities in soil cultivated with corn and amended with sewage sludge. Springerplus 5, 1844. doi:10.1186/s40064-016-3502-9.

Xu, C., Wang, D., Huber, A., Weese, S.J., Warriner, K., 2016. Persistence of *Clostridium difficile* in wastewater treatment-derived biosolids during land application or windrow composting. J. Appl. Microbiol. 120, 312–320. doi:10.1111/jam.13018.