

Reutilización de efluentes y fangos de EDAR y presencia de parásitos y protozoos potencialmente patógenos

M. Benito^{1,2}, D. LaPlante², E. Rubio², M.T. Fernández³, N. Miguel¹, A. Clavel², M.P. Ormad¹, P. Goñi²

¹ Grupo Calidad y Tratamiento de Aguas: Instituto Universitario de Ciencias Ambientales de Aragón. Dpto. Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente. Universidad de Zaragoza. C/María de Luna 3, 50018 - Zaragoza.

² Grupo Parasitología, Autocuidados y Salud Ambiental (GPAySA). Dpto. Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Zaragoza. C/ Calle Domingo Miral S/N. 50009. – Zaragoza. Zaragoza.

³ Grupo Parasitología, Autocuidados y Salud Ambiental (GPAySA). Dpto. Fisiología y enfermería. Universidad de Zaragoza. C/ Calle Domingo Miral S/N. 50009. – Zaragoza. Zaragoza.

575821@unizar.es (María Benito)

Resumen

Los efluentes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) y los fangos generados, se han convertido en un valioso recurso en actividades agrícolas dado su elevado contenido en nutrientes, pero la posible presencia de microorganismos potencialmente patógenos, puede suponer un riesgo ambiental-sanitario. Según normativa, eliminar estos contaminantes en efluentes o fangos es obligatorio si van a ser reutilizados, regulando entonces la presencia de bacterias pero no de parásitos y protozoos. Este trabajo analiza la presencia de microorganismos patógenos en diversas EDARs de la cuenca del Ebro, para estudiar la relación entre el proceso de depuración y su eliminación. Los microorganismos analizados son: *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., huevos de nematodos, amebas de vida libre (AVL) y bacterias resistentes a la depredación de AVL (ARB). Se observan al microscopio 5 concentraciones/muestra para el análisis morfológico. El aislamiento de AVL se realiza por inoculación de 3 placas/muestra, observándolas durante al menos 15 días. La identificación de género y genotipo se realiza mediante extracción de ADN y PCR. Se han aislado 41 AVL en 17 de las 20 muestras analizadas, 30 de estas corresponden a aguas (14 en efluentes) y 11 a fangos; obteniéndose resultado positivo por PCR para 29 AVL e identificando los géneros *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp. en proporción de 0,293 y 0,146 respectivamente. Se encuentra *Giardia* spp. en afluentes de EDAR en un proporción de 0,400 y de 0,200 en efluentes, no detectándose en ninguna muestra de fango. *Cryptosporidium* spp. se identifica en efluentes en proporción 0,400 y en todas las muestras de fangos, previas y posteriores al tratamiento. Los resultados revelan una persistencia de parásitos y protozoos potencialmente patógenos, sugiriendo la necesidad de intensificar el tratamiento para la reutilización de fangos y efluentes.

Palabras Clave: Aguas residuales, fangos, parásitos, protozoos.

Introducción

Como consecuencia de los procesos que se desarrollan en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), se producen grandes cantidades de fangos y efluentes residuales, que pueden ser reutilizados en el desarrollo de actividades agrícolas. Los fangos se emplean para enmienda de suelos y como fertilizantes (Amorós et al., 2016), dado su alto contenido en nutrientes y materia orgánica, mientras que los efluentes se reutilizan para riego de diversos cultivos (Panakos et al., 2015). Sin embargo, tanto aguas residuales como fangos pueden contener gran cantidad de patógenos que sobreviven a los tratamientos habituales, convirtiéndose en un riesgo para el medio ambiente y la Salud Pública (Fonseca et al., 2016).

Bacterias, parásitos y protozoos, pueden estar presentes en efluentes y fangos de EDAR. Con el fin de reducir el riesgo ambiental y sanitario que ello genera, la normativa vigente (RD 1620/2007 en términos de agua y RD 1310/90 y AA/1072/2013 referidos a fangos) obliga a eliminar estos contaminantes durante el proceso de depuración, si efluentes o fangos van a ser

reutilizados. Sin embargo, sólo se regula el control bacterias y nematodos intestinales, sin que se establezcan umbrales obligatorios para parásitos y protozoos, a pesar de su demostrada patogenicidad (Kistemann et al., 2011). Todo ello, suscita interés por la eliminación y comportamiento de estos microorganismos potencialmente patógenos durante los distintos procesos de depuración (Marín et al., 2015; Mosteo et al., 2013).

El objetivo de este trabajo es identificar los parásitos y protozoos potencialmente patógenos en efluentes y fangos procedentes de EDARs con distinto tratamiento para analizar cómo influyen éstos en su eliminación.

Materiales Y Métodos

Las EDARs participantes se localizan a lo largo de la cuenca del Ebro y su colaboración es voluntaria. El 60% de las plantas desarrollan tratamiento primario y secundario añadiendo tratamiento terciario en el 40% restante. Respecto al tratamiento de fangos, el 40% realizan digestión aerobia y deshidratación, otro 40% espesamiento de fangos y el 20% restante no lleva a cabo ningún tratamiento en la propia EDAR. El proceso de muestreo de cada planta se elaboró en función de su diseño, tomando muestras de 5-20L de agua en entrada, salida y etapas intermedias de interés. En el caso de fangos, se tomó muestra en la entrada y salida del digester en todas las depuradoras que realizan el tratamiento, pudiendo muestrear solo el 50% de aquéllas que realizan espesamiento. Las muestras de fango deshidratado fueron de 500g y las de no deshidratado de 5L.

Las muestras de agua se filtraron a través de una membrana de 0,7µm de diámetro de poro y las de fango no deshidratado se centrifugaron para separar el agua de la mezcla, que fue también filtrada. Ambos fueron analizados por separado. Cinco concentraciones de cada muestra fueron observadas al microscopio a 10X, 40X y 100X, para la identificación morfológica de parásitos y protozoos, llevando a cabo tinción de Ziehl-Neelsen modificada para detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y otros coccidios. Para detección y caracterización genética de *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., huevos de nematodos, amebas de vida libre (AVL) y bacterias resistentes a la depredación de las AVL (ARB), se extrajo el ADN, utilizando el kit comercial Ron's Tissue DNA Mini Kit y se realizó PCR anidada para identificación de *Giardia duodenalis* [gen *tpi* (Sulaiman et al., 2003) y gen de la *Beta giardina* (Lalle et al., 2004)], de *Cryptosporidium* spp. [gen de subunidad 18S del rRNA (*SSU rARN*) (Xiao et al., 1999) y glicoproteína GP60 de 60kDa (*gp60*) (Sulaiman et al., 2005)]. Para el aislamiento de AVL se inocularon tres placas de MNN con *E. coli* por muestra, que se incubaron a 30°C durante 15 días (García et al., 2001). Se extrajo ADN y se hicieron 4 PCR para la identificación de género y especie (Schroeder et al., 2001; Tsvetkova et al., 2004; Pelandakis et al., 2002). Se realizó una pentaplex-nested PCR modificada que permite identificar simultáneamente las siguientes bacterias albergadas en el interior de las AVL: *Legionella Pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp. y Cianobacterias tóxicas (Calvo et al., 2013). En todos los casos el producto de ADN obtenido se separó en gel de agarosa, se purificó utilizando el Kit comercial GFXTM PCR ADN and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) y se sometió a secuenciación en ambas direcciones. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa BioEdit® y la herramienta informática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool del National Center for Biotechnology Information, NCBI) para el alineamiento de las secuencias obtenidas con las recogidas en la base de datos GenBank.

Resultados y Discusión

Se han encontrado huevos de nematodo en el 80% de aguas de entrada y efluentes y en el 20% de las muestras de etapas intermedias del tratamiento. En las muestras de fangos, se observan en entrada y salida del tratamiento aerobio en todas las EDARs en las que se lleva a cabo, sin embargo, no se encuentran en ninguna muestra de fango espesado. En dos de los resultados positivos (afluente y etapa intermedia), se identificaron también larvas de nematodo, sugiriendo su viabilidad (Fig. 1.B). Los nematodos de vida libre participan en los procesos de depuración de aguas, siendo sólo problemática la presencia de aquéllos potencialmente

patógenos para el hombre y animales, como *Strongyloides* y Uncinarias. En este caso no ha sido posible la identificación de los nematodos.

En el 40% de las EDARs se detecta *Cryptosporidium* spp., en el 20% en entrada y salida y en el otro 20% sólo en la salida. El tratamiento secundario, con un reactor de fangos activos que favorece la flotación del parásito por aireación puede ser la causa de que el proceso concentre *Cryptosporidium* spp. y se pueda detectar a la salida. El agua separada de fangos por centrifugación, dio positivo por PCR para *Cryptosporidium* spp. en la entrada y salida de todas las plantas que realizan digestión de fangos, no encontrándose en ninguna muestra de agua proveniente de fango espesado. Se tiene resultado positivo en todas las muestras de fango deshidratado, a excepción de una que procede de entrada al tratamiento aerobio. Sin embargo, únicamente se ha detectado *Cryptosporidium* spp. por tinción de Zielh-Neelsen en el 18% de las muestras positivas por PCR (Fig. 1.D). Esto se puede deber bien al bajo número de parásitos o bien porque la PCR detecta ADN de ooquistes no viables (Spanakos, et al., 2015).

La PCR para *G. duodenalis* fue positiva en el 60% de afluentes y 20% de efluentes, lo que indica un tratamiento efectivo en el 40% de las plantas. Destacar, que en una de las depuradoras en las que se elimina *Giardia* del agua en la salida, no se consigue eliminar *Cryptosporidium* spp., lo que evidencia la necesidad de considerar y analizar la presencia de todos estos protozoos potencialmente patógenos en efluentes y fangos en el caso de que vayan a ser reutilizados. Mediante visualización al microscopio, se observan quistes de *Giardia* en el 30% de las muestras positivas por PCR (Fig. 1.C).

Se han aislado 41 AVL, en los puntos de muestreo que se indican en la Tabla 1. Se observa que algunas AVL tienen su hábitat en la planta depuradora, pudiendo aparecer a la salida, como es el caso de una *Naegleria* spp., identificada por primera vez en el año 2012 en la misma depuradora. Veintidós AVL no han podido ser identificadas, 12 no han amplificado por PCR, y 10 no se han podido secuenciar. Se han identificado 21 AVL provenientes de 19 muestras. De ellas, 6 fueron *Naegleria* spp., 2 *Vermamoeba* spp. y 13 *Acanthamoeba* spp. (Fig. 1.A). Estas dos últimas han sido descritas como AVL patógenas productoras de queratitis y también encefalitis en el caso de *Acanthamoeba* spp.

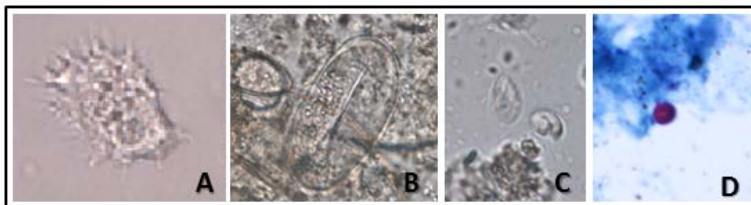


Figura 1.-A: Trofozoíto *Acanthamoeba* spp. 100X. B: Huevo de nematodo y larva 40X. C: Quiste *Giardia* spp. 100X. D: Ooquiste *Cryptosporidium* spp. 100X.

Respecto al análisis ARB, se encuentra al menos una de las cuatro bacterias estudiadas en 27 de las AVL aisladas, no detectando cianobacterias en ninguna de ellas. De estas 27 AVL, 1 alberga simultáneamente *Legionella*, *Pseudomonas* y *Mycobacterium*, 11 retienen dos bacterias (generalmente *Legionella* y *Mycobacterium*) y 15 una única bacteria. Se detecta *Mycobacterium* en el interior de 22 AVL, *Legionella* en 12 y *Pseudomonas* en 6 (Tabla1). Destacar que la infección por *Pseudomonas* spp. (Sharma et al., 2013); se ha encontrado frecuentemente asociada a queratitis amebiana. Ninguna de las 6 AVL que albergan en su interior *Pseudomonas* spp., se han identificado como *Acanthamoeba* spp. Sin embargo, una de ellas se ha identificado como *Vermamoeba* spp., indicando que amebas que se consideran no patógenas ayudan a bacterias patógenas a superar el proceso de depuración, de forma que aunque estas amebas no constituyan un riesgo para la salud, sí lo hacen las bacterias que albergan en su interior.

Tabla 1.- Cuadro resumen de AVL aisladas e identificadas y ARB presentes en ellas. Proporción respecto AVL aisladas en total entre paréntesis.

	AGUAS			FANGOS		
	Entrada	Salida	Etapas intermedias	Entrada aerobio	Salida aerobio	Espesado
AVL aisladas	10	14	8	5	3	1
AVL identificadas (secuenciación)	4 (0,40)	6 (0,43)	6 (0,75)	4 (0,80)	1 (0,33)	0
<i>Acanthamoeba</i> spp.	3 (0,30)	3 (0,21)	2 (0,25)	4 (0,80)	1 (0,33)	0
Positivos ARB en AVL aisladas	5 (0,5)	11 (0,79)	7 (0,88)	3 (0,60)	1 (0,33)	0
<i>Mycobacterium</i> spp.	3 (0,3)	10 (0,71)	6 (0,75)	3 (0,60)	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp.	3 (0,3)	1 (0,07)	1 (0,13)	1 (0,20)	0	0
<i>Legionella pneumophila</i>	2 (0,2)	5 (0,36)	3 (0,38)	1 (0,20)	1 (0,33)	0
Cianobacterias tóxicas	0	0	0	0	0	0

Conclusiones

Los resultados sugieren que la intensificación del tratamiento, si efluentes y fangos van a ser reutilizados es necesaria, ya que se observa persistencia de parásitos y protozoos. Resaltar también, la detección de bacterias patógenas en el interior de las AVL, a las que estas protegen del tratamiento empleado y de las condiciones adversas externas.

Agradecimientos

El trabajo ha sido financiado por la DGA-FSE a los grupos de Investigación Calidad y Tratamiento de aguas (T33) y Parasitología, Autocuidados y Salud Ambiental (B124) y el Proyecto CTM3013-41397-R de MINECO-FEDER. Los autores agradecen la colaboración de NILSA.

Referencias

- Amorós I, Moreno Y, Reyes M, Moreno-Mesonero L, Alonso JL. (2016) Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw and treated sewage sludges. *Environ Technol* 15, 1-7.
- Calvo L., Gregorio I., García A., Fernández M.T., Goñi P., Clavel A., Peleato M.L., Fillat M.F. A new pentaplex-nested PCR to detect five pathogenic bacteria in free living amoebae (2013) *Water Res*, 47(2), 493-502.
- Fonseca JA, Heredia RD, Ortiz C, Mazo M, Clavijo-Ramírez CA, Lopez MC (2016) Identification of *Entamoeba moshkovskii* in Treated Waste Water Used for Agriculture. *Ecohealth*. 13(1),156-60.
- Kistemann T, Rind E, Koch C, Claßen T, Lengen C, Exner M, Rechenburg A. (2012) Effect of sewage treatment plants and diffuse pollution on the occurrence of protozoal parasites in the course of a small river. *Int J Hyg Environ Health*, 215(6), 577-583.
- Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. (2005) Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol*, 35(2), 207-13.
- Marín I, Goñi P, Lasheras AM, Ormad MP. (2015) Efficiency of a Spanish wastewater treatment plant for removal potentially pathogens: Characterization of bacteria and protozoa along water and sludge treatment lines. *Ecol Eng*, 74, 28-32.
- Mosteo R, Ormad MP, Goñi, P, Rodríguez-Chueca J, García A, Clavel A. (2013), Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): water reuse possibilities. *Water Sci Technol*, 68(3), 575-83.
- Orden AAA/1072/2013, de 7 de junio, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario.
- Pélandakis M, Pernin P. Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment (2002) *Appl Environ Microbiol*, 68(4), 2061-5.
- RD 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.
- RD 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario.
- Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, and Byers TJ. (2001) Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clinical Microbiol*, 39: 1903-1911.
- Sharma R, Jhanji V, Satpathy G, Sharna N, Khokhar S, Agarwar T (2013) Coinfection with *Acanthamoeba* and *Pseudomonas* in contact lens-associated keratitis. *Optom Vis Sci*, 90(2), 53-55.
- Spanakos G, Biba A, Mavridou A, Karanis P. (2015) Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in recycled waters used for irrigation and first description of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in Greece. *Parasitol Res*. 114:1803-1810.
- Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L. (2003) Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *G. duodenalis*. *Emerg Infect Dis*, 9(11), 1444-52.
- Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, Iqbal J, Khalid N, Xiao L. (2005) Unique endemicity of *Cryptosporidiosis* in children in Kuwait. *Journ of Clin Microbiol*, 43 (6), 2805-2809.
- Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walochnik J, Aspöck H, Lucas MS, Müller N. (2004) The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res*, 92(5), 405-13.
- Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R, Lal AA. (1999) Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites base on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol*, 65(4), 1578-83.