

Eliminación de Virus en diferentes procesos de depuración y desinfección (hipoclorito, ultravioleta y MBR) en la EDAR de Abanilla y EDAR de Calasparra en Murcia

- **Pedro J. Simón Andreu**, Director técnico de la Entidad Regional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales de Murcia (ESAMUR)
- **Carlos Lardín Mifsut**, Técnico de Explotación de la Entidad Regional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales de Murcia (ESAMUR)
- **Antonio Camacho González**, Catedrático de Ecología, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universitat de València
- **Antonio Picazo Mozo**, Investigador, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universitat de València
- **Antonio V. Sánchez Betrán**, Director Técnico, RED CONTROL S.L.
- **Jose Alfredo López**, Jefe de planta EDAR Abanilla, RED CONTROL S.L.

Resumen

La reducción de patógenos en los sistemas de depuración de aguas residuales ha sido un tema relevante de investigación científico-técnica en este ámbito a lo largo de las últimas décadas. En concreto la reducción de la carga viral de los influentes de depuración es un objetivo cada vez más relevante, ya que una parte de los virus que llegan a las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) son potencialmente patógenos. Son múltiples los sistemas que se utilizan para la eliminación de virus. En este trabajo se describen los rendimientos de reducción de partículas víricas totales y bacteriófagos líticos obtenidos, por un lado, por la combinación de los procesos de depuración seguidos de tratamientos de desinfección por cloración y radiación ultravioleta en la EDAR de Abanilla, así como por el sistema MBR (Reactor Biológico de Membrana) de la EDAR de Calasparra, ambas plantas situadas en la provincia de Murcia. El sistema de depuración y desinfección por cloración y luz ultravioleta presentó altos rendimientos de eliminación de fagos líticos, mientras que su reducción de las cargas víricas totales fue un poco más limitada, dado que probablemente se produce una sustitución por fagos de la propia EDAR, en principio no patógenos para los humanos, que se favorecen principalmente en el reactor biológico. El sistema de filtración MBR presentó un rendimiento de eliminación alto tanto para bacteriófagos líticos como, especialmente, para virus totales, mostrándose como un sistema recomendable para la eliminación efectiva de virus.

Abstract

The removal of pathogens in wastewater treatment systems has been a relevant topic of scientific and technical research over the past decades. Specifically, the reduction of the viral content of the wastewater influents is an increasingly relevant objective, since some of the viruses reaching the wastewater treatment plants (WWTP) are potentially pathogenic. There are multiple systems used for the removal of viruses. In this work we describe the reduction performance on viral particles and lytic bacteriophages by the combination of wastewater treatments supplemented by disinfection through chlorination and ultraviolet radiation in the WWTP of Abanilla, as well as in the MBR (Membrane Biological Reactor) system in the WWTP of Calasparra, both WWTPs located at the province of Murcia (Spain). The combined treatments of purification followed by chlorination and UV radiation exhibited a high performance in the elimination of lytic bacteriophages, while the elimination of total viral particles was somewhat more limited. Most likely, there was a substitution by viruses linked to the community of microorganisms in the WWTP, non-pathogenic for humans. The MBR filtration system showed a high removal performance for both lytic phages and, especially, for total viruses, being a recommended system for the effective elimination of viruses.

1.- Introducción

Los virus, al igual que las bacterias, son ubicuos en todo tipo de aguas residuales, así como en los sistemas de tratamiento y depuración de aguas. De entre todos los virus, los patógenos virales de las aguas residuales son potencialmente peligrosos tanto para la salud humana como para otros elementos ambientales y de importancia económica. Así, el control de los virus ha sido una gran preocupación en el tratamiento de aguas residuales y en la recuperación y reutilización del agua. Además de la desinfección directa de las aguas depuradas, tradicionalmente se sigue buscando métodos de eliminación de virus combinados con procesos de tratamiento de aguas residuales (Hu et al., 2003).

Los virus en general, y aquellos que son patógenos humanos en particular, pueden entrar en las aguas residuales a través de la descarga de los desechos de las personas o animales infectados. La contaminación de las aguas residuales con virus patogénicos puede promover brotes infecciosos.

Los virus, sea cual fuere la fuente de su infección, pueden causar enfermedades graves, como la miocarditis (virus de Coxsackie), la parálisis (virus de la poliomielitis), la meningitis (ecovirus) o la hepatitis infecciosa (virus de la hepatitis A y E) (Sakoda et al., 1997; Petterson y Ashbolt, 2001; Rzezutka y Cook, 2004) y, más recientemente, son causantes de enfermedades como la COVID-19, causada por el coronavirus SARS-CoV-2.

En general, la efectividad de los métodos tradicionales de desinfección para la eliminación de patógenos (tanto virus como bacterias) ha sido ampliamente documentada (Sobsey, 1989). Tanto los procesos de cloración como los tratamientos con luz ultravioleta u ozono han demostrado ser eficientes en la inactivación de estos tipos de patógenos (Oppenheimer et al., 1997). La desinfección es un proceso en el que un porcentaje significativo de organismos patógenos se destruyen o se inactivan (Lazarova et al., 1999; Tchobanoglous et al., 2003; Rattanukul et al., 2014; Kuo, 2017). Hay una serie de productos químicos y procesos que se utilizan habitualmente en estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) para la desinfección de estas aguas, pero ninguno es de aplicación universal.

Los procesos de tratamiento biológico de las propias depuradoras también reducen la abundancia de virus con potencial patogénico, pero, en general, no siempre lo suficiente como para conseguir una desinfección total. La cloración ha sido históricamente la tecnología de desinfección más utilizada, mientras que la ozonización y la radiación ultravioleta (UV) son tecnologías que en las últimas décadas han ido tomando bastante protagonismo, demostrando ser incluso más efectivas que la cloración (Mezzanotte et al., 2007). El uso secuencial de la cloración y la radiación ultravioleta ha sido empleado comúnmente para conseguir mayores rendimientos en el proceso de desinfección (Wang et al., 2011). Además de éstos, el sistema de ultrafiltración avanzado mediante tecnología de biorreactores de membrana (MBR) se ha ido implementando paulatinamente en diferentes plantas de depuración. Estos sistemas juegan un importante papel en el propio proceso de depuración, pero, también lo pueden tener en la desinfección. Cada uno de estos métodos tiene diferentes potencialidades para la desinfección de las aguas residuales (Droste y Gehr, 2018).

Los sistemas de depuración basados en biorreactores de membrana (MBR) se basan en un tratamiento biológico mediante lodos activos seguido de una separación mecánica de estos y el agua, siendo esta agua filtrada a través de membranas específicas (Santos et al., 2011). Como resultado, la calidad del agua del producto es, en términos generales, significativamente más alta que la generada por el tratamiento convencional, pudiéndose obviar, o cuanto menos reducir, la necesidad de un proceso de desinfección adicional (Villain et al., 2014). El sistema MBR ha mostrado buenos rendimientos respecto a las tecnologías más convencionales en la eliminación de materia orgánica, así como en la retención de sólidos, consiguiendo también efluentes con una calidad muy superior en lo que a parámetros físico-químicos se refiere (Judd, 2008,

2010; Maza-Márquez et al., 2016), dado que en los sistemas MBR las membranas sirven de barrera que puede retirar la mayor parte de la biomasa del biorreactor. Una de las principales ventajas de un sistema MBR es la eliminación de una amplia gama de microorganismos, incluidas bacterias patógenas y virus que pudieran sobrevivir al proceso de depuración. De hecho, algunos estudios han demostrado que el sistema MBR puede ser muy eficiente en la eliminación de virus. Por ejemplo, diferentes investigaciones han demostrado que se podía lograr mucho mejores rendimientos de eliminación de bacteriófagos (virus que atacan específicamente a bacterias, siendo usado como indicadores) mediante un reactor MBR que los obtenidos mediante procesos convencionales de lodo activado y desinfección (Ueda y Horan, 2000; Shang et al., 2005; Huang y Lee, 2015)

En los sistemas de depuración de aguas existen tanto virus provenientes de las propias aguas residuales que llegan a la EDAR, parte de los cuales pueden ser potencialmente patógenos para los humanos, y otros, como los virus relacionados con los microorganismos presentes en la EDAR que se desarrollan en el propio tratamiento, principalmente en los fangos activos. Es por esto que resulta relevante estudiar la eliminación tanto del total de virus, que da una idea de la eficacia conjunta del sistema en la eliminación de éstos, como de indicadores víricos, como lo son los bacteriófagos de *E.coli.*, ya que estos últimos dan una idea de cómo se podría comportar el sistema de depuración en la eliminación de los virus infectivos. En este trabajo, se estudia y se compara la eficacia de los diferentes procesos en la desinfección (cloración y luz ultravioleta) que operan en la EDAR de Abanilla siguiendo a un tratamiento de depuración convencional, comparándolo con el sistema MBR de la EDAR de Calasparra, ambas situadas en la Región de Murcia, en el ámbito de la Entidad de Saneamiento de dicha región (ESAMUR), tanto en lo referente a la eliminación de partículas víricas totales (PVT) como de bacteriófagos específicos de *E.coli.*

2.- Material y métodos

2.1.- Área de estudio

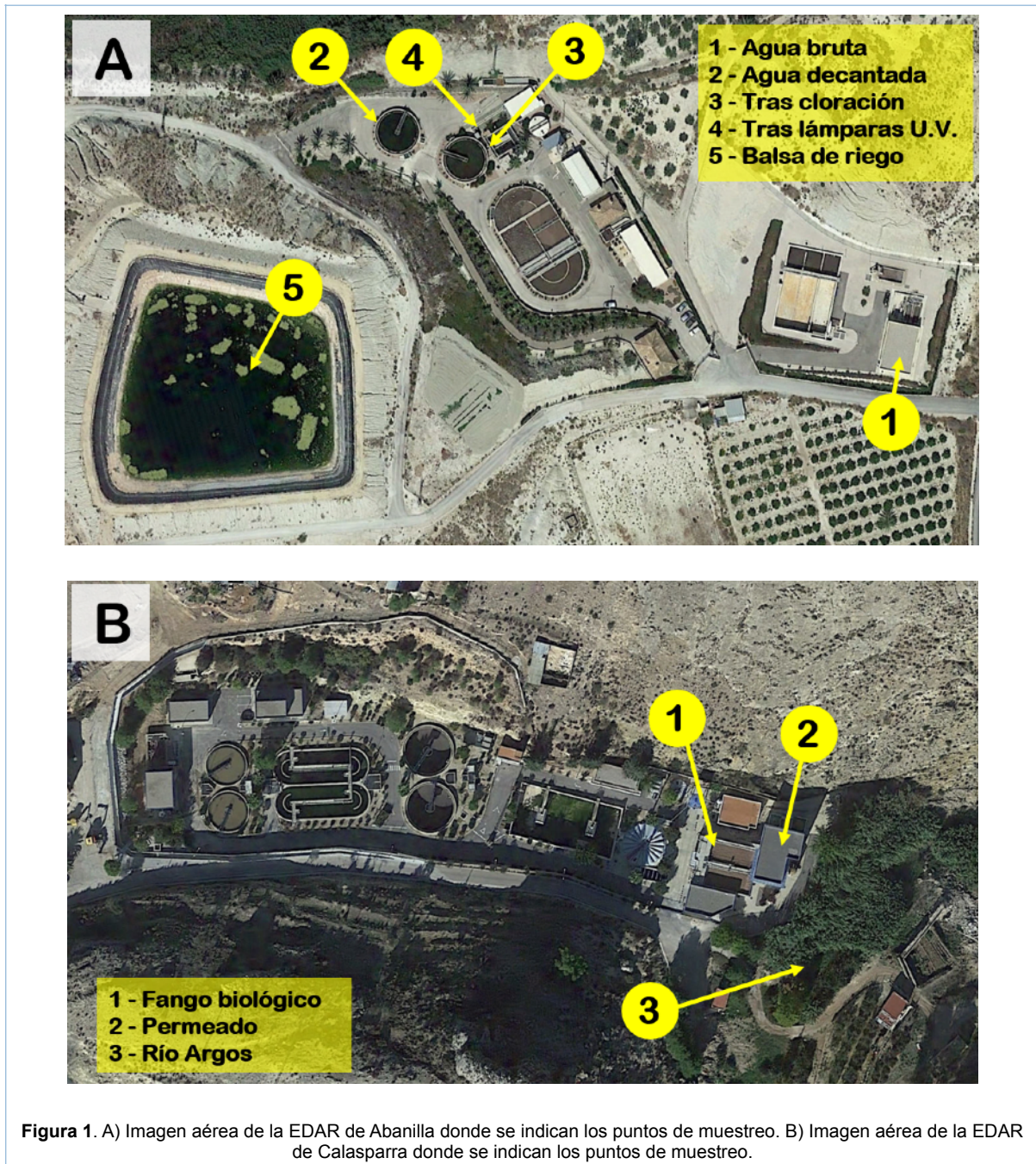
Las muestras objeto del estudio se han recogido en las EDARs de Abanilla y Calasparra, ambas situadas en la Región de Murcia.

La EDAR de Abanilla está situada en la provincia de Murcia, en el municipio de Abanilla, que le da nombre. Esta EDAR presenta un caudal de entrada de 571.080 m³/año y está diseñada para una población de 6.651 habitantes. La carga de diseño es de 17.540 h.e. Se encuentra situada aproximadamente a un kilómetro de la población y dispone de un pretratamiento con desbaste mediante cuchara bivalva y reja automática, tamizado y desarenado-desengrasado. El tratamiento biológico se realiza en un reactor tipo carrusel aireado con dos oxirrotadores controlados de forma automática mediante potencial redox. Dispone a su vez de dos decantadores circulares troncocónicos, dotados de carro-puente móvil. El tratamiento terciario se realiza mediante dos filtros de arena abiertos. El tratamiento de los lodos consiste en espesamiento y deshidratación mecánica mediante dos decantadores centrífugos. El efluente tratado es vertido a una balsa de acumulación para su posterior reutilización para riego agrícola. (Figura 1A) LA EDAR cuenta con dos sistemas de desinfección que actúan de manera secuencial, el primero con hipoclorito sódico y el segundo con radiación ultravioleta (Simón Andreu et al., 2015). Con posterioridad a la realización de este estudio la planta se dotó de un sistema de desinfección del efluente mediante ozono, el cual está actualmente en servicio. La EDAR vierte a una balsa de riego agrícola. En la EDAR de Abanilla se recogieron 5 muestras (figura 1): (1) Agua bruta, tras desbaste, (2) agua decantada tras el tratamiento biológico, (3) tras el tratamiento de cloración, (4) tras el tratamiento con ultravioleta, en la salida de la depuradora y (5) en la balsa de riego.

En los que se refiere a los datos operacionales de la desinfección en la EDAR de Abanilla durante la toma de muestras del estudio, las dosis aplicadas eran las siguientes:

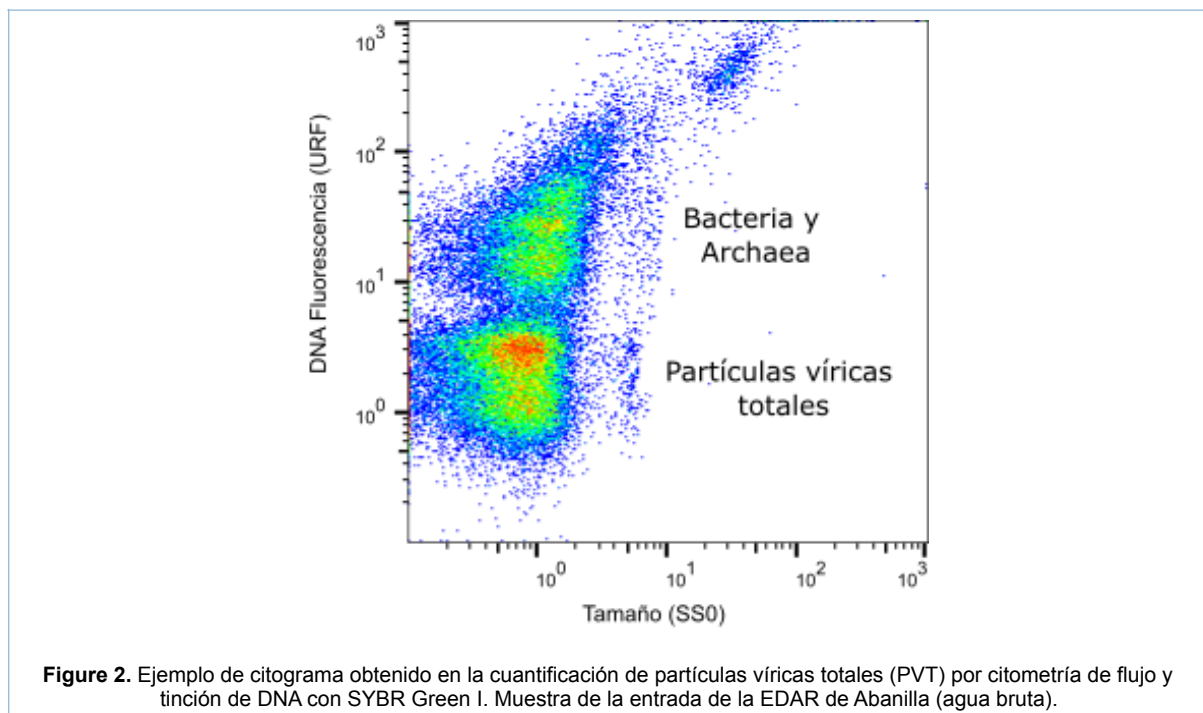
- Dosis UV:74 mJ/cm²
- Dosis de hipoclorito:4,5 gramos cloro activo/ m³

La EDAR de Calasparra está situada en dicho municipio, también en la provincia de Murcia. Presenta un caudal de entrada de 604.239 m³/año y está diseñada para una población de 9.548 habitantes. La carga de diseño es de 27.993 h.e. La EDAR de Calasparra presenta líneas de tratamiento biológico paralelas, que comparten las etapas de pretratamiento, desarenado, desengrasado y decantación primaria. Una de estas líneas dispone de un sistema de ultrafiltración avanzado mediante tecnología de biorreactores de membrana (MBR), en concreto membranas de ultrafiltración ZeeWeed 500D de Zenon, en 4 “Casettes” de 48 módulos (Simón Andreu et al., 2011). Las muestras se obtuvieron inmediatamente antes y después del paso de las aguas tratadas en los fangos activados a través de los biorreactores de membrana. Esta EDAR vierte directamente al río Argos, que también se muestreó justo antes de su confluencia con el efluente de la EDAR (Figura 1B).



2.2.- Toma de muestras, procesamiento y cuantificación de la abundancia total de virus

Para la cuantificación de partículas víricas totales (PVT), se recogieron por triplicado 10 ml de muestra en cada punto de muestreo (Figura 1), que se fijaron con glutaraldehído a una concentración final del 0,5%, y se transportaron al laboratorio a 4 ° C en oscuridad. Tras la fijación, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. En el momento de realizar el análisis de PVT se descongelaron las muestras y se diluyeron en tampón TE (pH 8) con un factor de dilución entre 10 y 100 dependiendo de las partículas víricas esperadas en la muestra. Tras la dilución la muestra se tiñó con SYBR Green I (2X) durante 10 minutos a 80°C en oscuridad. Una vez teñido se procedió al análisis por citometría de flujo con el ajuste adecuado del voltaje del detector “Side Scatter” (SS0-tamaño) y del detector FL1 (Fluorescencia de DNA) para poder detectar partículas de tamaño vírico (Figura 2). Los resultados mostrados corresponden a la media de las tres réplicas de cada muestra.



2.3.- Toma de muestras, procesamiento y cuantificación de fagos líticos asociados a E.coli

Para la cuantificación de virus bacteriófagos líticos asociados a *E.coli* se seleccionó una cepa de clonación especialmente sensible a la infección por estos fagos (cepa JM109, ATCC 53323) y así (Łoś, et al., 2008) poder estimar el efecto de los diferentes tratamientos sobre una población más diversa de fagos de las que habitualmente se contempla en los ensayos estandarizados de bacteriófagos por los métodos estandarizados (ISO10705-2, 2000; USEPA1602, 2001).

Para ello, se recogieron (por triplicado) 50 ml de muestra de cada punto de muestreo que se mantuvieron refrigeradas hasta la realización del análisis, el cual se inició antes de 24 horas desde la recogida de la muestra. El análisis de los fagos líticos asociados a *E.coli* (bacteriófagos) se realizó mediante un ensayo de recuento en placa de calvas de lisis especialmente diseñado para aumentar la sensibilidad (Suttle, 1993; Łoś et al., 2008). Para llevar a cabo el ensayo se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) para el crecimiento de *E. coli* (cepa JM109, Promega).

El mismo medio, pero complementado con agar bacteriológico al 1,5%, se usó como agar de fondo para verter en las placas Petri del ensayo. El agar superior consistió en 1% de triptona, 0,5% de NaCl y 0,7% de agar bacteriológico.

Se realizaron diluciones seriadas (5 órdenes de magnitud) de las muestras sin fijar y filtradas con filtros de policarbonato (0,2 µm de tamaño de poro) para cada una de las tres muestras replicadas de cada punto de muestreo.

Cada dilución de cada una de las tres réplicas fue inoculada en 0,1 ml del cultivo de *E. coli* (cepa JM109, Promega) en fase exponencial en el agar superior, y un 1ml de este fue sembrado sobre el agar de fondo en las placas Petri preparadas anteriormente.

Tras el período de incubación de 24 horas se contaron las calvas de lisis en las diluciones adecuadas para cada muestra y réplica, y se estimó la carga de bacteriófagos en cada muestra en función del factor de dilución. Los resultados mostrados corresponden a la media de las tres réplicas de cada muestra.

3.- Resultados y discusión

3.1.- Partículas víricas totales y fagos líticos de *E.coli* en la EDAR de Abanilla

La abundancia de virus totales y de virus asociados a la lisis de bacterias indicadoras de contaminación fecal, como *E.coli*, son parámetros relevantes en el tratamiento de las aguas residuales.

Existen una gran variedad de virus con capacidad patogénica, por lo que la reducción de la carga viral en las aguas residuales es esencial para un correcto proceso de depuración.

Cabe recordar que, por ejemplo, el virus SARS-CoV-2, responsable de la enfermedad COVID-19, pertenece al grupo de los virus líticos.

Como se ha señalado, el recuento de partículas víricas totales (PVT) se ha realizado por citometría de flujo y el recuento de fagos líticos se ha realizado en placa sobre una cepa de *E.coli* muy sensible a la infección

Si bien los métodos en placa pueden presentar sesgos en la estimación de la abundancia de este tipo de virus, siguen siendo la mejor alternativa para el estudio de la virulencia en ausencia de ensayos de reactividad celular, somática o inmunológica a un patógeno viral específico.

La abundancia de partículas víricas totales (PVT) en los puntos muestreados de la EDAR de Abanilla (Figura 3) osciló en un rango absoluto entre 2,8-6,7 x10⁸ PVT ml⁻¹, con las abundancias máximas encontradas en la entrada de la EDAR (en promedio 5,5 x 10⁸ PVT ml⁻¹) e incluso un pequeño aumento a la salida del decantador (5,7 x 10⁸ PVT ml⁻¹), explicable por la sustitución de parte de los virus que entraban con las aguas residuales por otros posiblemente desarrollados en el tratamiento de fangos biológicos asociado a las ingentes cantidades de biomasa bacteriana que en estos se desarrolla.

No obstante, las abundancias más bajas se encontraron en la salida de la EDAR (3,3 x 10⁸ PVT ml⁻¹ en promedio), por lo que, en su conjunto, la reducción de PVT en el proceso de depuración fue de un 29,2%, habiendo una sustitución de virus propios de las aguas residuales, con alta incidencia de posibles patógenos, por otros propios del proceso de depuración a lo largo del proceso que carecen mayoritariamente de esa patogenicidad para organismos eucariotas.

Fijándose únicamente en los procesos de desinfección, la reducción fue de un 37,4%.

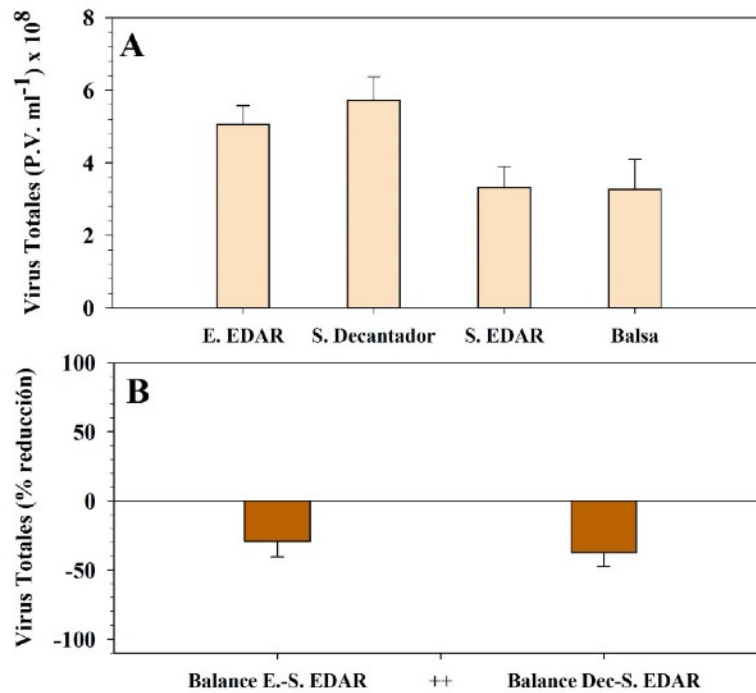


Figura 3. A) Abundancia de partículas víricas totales (PVT) estimadas por citometría de flujo los diferentes puntos estudiados de la EDAR. B) Porcentaje de reducción de partículas víricas totales (PVT) en toda la EDAR (izquierda), y reducción en el tramo de desinfección, desde la salida del decantador (Dec) hasta la salida de la EDAR de Abanilla (derecha). E. (Entrada), S. (Salida).

Los ensayos basados en cultivo en placa son el método habitual utilizado para determinar la concentración de virus líticos (bacteriófagos de *E. coli*) en términos de fracción infecciosa.

Los ensayos de placa determinan el número de unidades formadoras de placa (PFU) en una muestra con una abundancia desconocida de virus, dando una estimación de la cantidad de virus líticos. Para aumentar la sensibilidad respecto a la posible persistencia de virus líticos en las muestras analizadas en este estudio se ha usado una cepa especialmente sensible a la infección por bacteriófagos (JM109, ATCC 53323), ya que ésta se utiliza para clonación de genes utilizando bacteriófagos como vectores.

Existen diferentes cepas de *E. coli* sensibles a diferentes tipos de fagos (Mutalik, 2020), de manera el uso de una cepa muy sensible a su infección permite estimar el efecto de los diferentes tratamientos de desinfección sobre una población más amplia de fagos de lo que es habitual en ensayos normalizados. Esto implica que los resultados obtenidos no se ajustan a los de los métodos habituales para establecer el límite legal de fagos somáticos o F+ en el tratamiento de aguas residuales que utilizan cepas específicas para sus ensayos (ISO10705-2, 2000; USEPA1602, 2001), sino que en este estudio contempla un rango más amplio de fagos, lo que permite aumentar la resolución del efecto de los diferentes tratamientos en la eliminación de una gama más amplia de virus líticos.

Una EDAR que funcione normalmente, como las estudiadas en este trabajo, presenta rangos de abundancia de salida de fagos somáticos y F+ muy bajos o indetectables por los procedimientos normalizados. Por ello, aumentar la sensibilidad del ensayo, como se ha realizado en este caso, puede permitir observar diferencias que de otra manera no se detectarían, como por ejemplo el descenso adicional de la abundancia de fagos líticos observado en la balsa de riego (figura 4A) de la EDAR de Abanilla, o comparar su abundancia en las aguas de salida de la EDAR de Calasparra con la que presenta el río Argos antes de confluir con éstas (figura 6A).

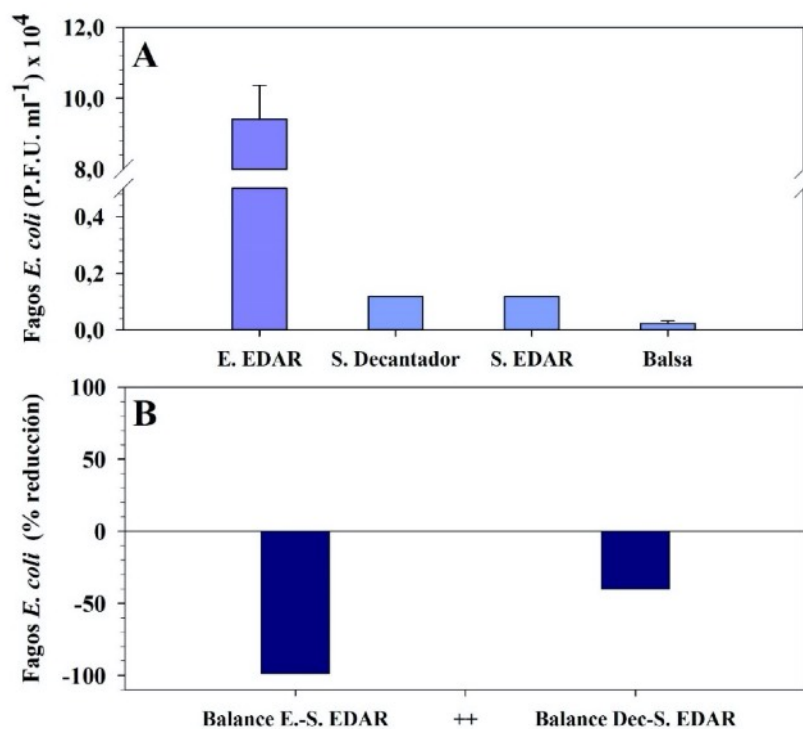


Figura 4. A) Abundancia de fagos líticos de *E. coli* en los diferentes puntos de muestreo de la EDAR B) Porcentaje de reducción de fagos líticos de *E. coli* en toda la EDAR (izquierda) y reducción en el tramo de desinfección, desde la salida del decantador (Dec) a la salida de la EDAR de Abanilla (derecha). E. (Entrada), S. (Salida).

En la EDAR de Abanilla las abundancias más altas de virus líticos (Figura 4), que denotan infectividad, y por tanto serían indicativas de posible patogenicidad en el viroma total (Schwartzbrod y Mathieu, 1986; Carducci et al., 2009; Días et al., 2018), se encontraron en la entrada de la EDAR, con $9,4 \times 10^4$ PFU ml⁻¹.

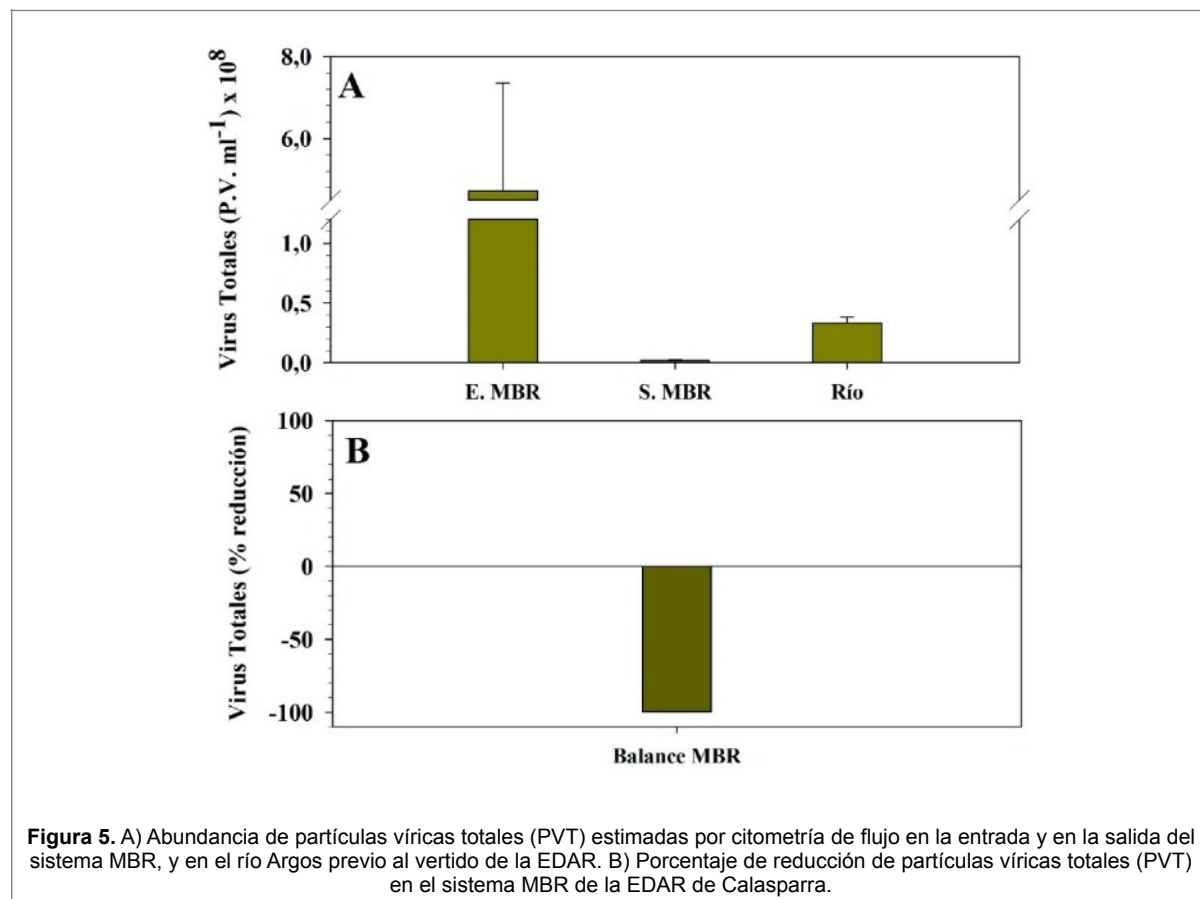
Respecto a la entrada de la EDAR, la salida del decantador presentó un descenso de casi dos órdenes de magnitud de fagos líticos hasta valores de $1,96 \times 10^3$ PFU ml⁻¹, es decir, que, incluso usando una técnica de máxima resolución que incrementa mucho la sensibilidad del análisis, poco más de un 2 % de la capacidad lítica de los virus que entran en la EDAR se mantendría en la población vírica que sale del decantador tras el tratamiento de fangos activados.

Por lo que se refiere a los puntos de muestreo tras los tratamientos de hipoclorito y ultravioleta, se observó de nuevo un descenso hasta los $1,18 \times 10^3$ PFU ml⁻¹ de promedio entre las diferentes réplicas ensayadas. En su conjunto, los resultados indicaron un descenso muy importante, de un 98,7%, en la abundancia de fagos líticos totales en el conjunto del proceso de depuración, gran parte del cual se producía ya en el tratamiento biológico, si bien su abundancia se reducía aún más, en torno a un 40 %, tras aplicar los tratamientos adicionales de desinfección respecto al ya pequeño porcentaje (2 % respecto a la entrada en la EDAR) remanente en el efluente del decantado.

3.2.- Partículas víricas totales y fagos líticos de *E. coli* en la EDAR de Calasparra

Al igual que en la depuradora de Abanilla, la abundancia de PVT en las muestras de la depuradora de Calasparra se estimó por citometría de flujo, mientras que el recuento de fagos líticos se realizó sobre placas de la cepa de mayor sensibilidad de *E. coli* JM109.

La abundancia de partículas víricas totales (PVT) y de virus asociados a la lisis de bacterias se estudiaron tanto a la entrada como a la salida del sistema MBR, para poder conocer las eficiencias en la reducción en cada caso, así como en el río Argos (en un punto previo al vertido de la EDAR), a efectos de comparar la potencial influencia que puede suponer el aporte del efluente de la EDAR de Calasparra sobre estos parámetros.



De entre los puntos estudiados, la entrada al MBR presentaba las abundancias más altas de virus (Figuras 5 y 6), tanto de partículas víricas totales ($4,7 \times 10^8$ PVT ml⁻¹) como de virus líticos ($4,7 \times 10^4$ PFU ml⁻¹).

La filtración MBR tuvo un efecto muy importante en la reducción, en las aguas de salida, tanto de las partículas víricas totales ($2,0 \times 10^6$ PVT ml⁻¹) como de los virus líticos ($7,8 \times 10^3$ PFU ml⁻¹).

En el río Argos, antes de unirse al efluente de la EDAR de Calasparra, la cantidad de partículas víricas totales ($3,3 \times 10^7$ PVT ml⁻¹) era mayor que en la salida MBR (figura 5), si bien la abundancia de virus líticos (Figura 6) era mucho menor ($1,7 \times 10^1$ PFU ml⁻¹).

En cualquier caso, el sistema MBR de la EDAR de Calasparra se comportó como un proceso muy eficiente en la reducción de virus, reduciendo el 99,6 % de las PVT, así como el 81,3 % de los virus líticos totales estimados en una cepa muy sensible a la infección (JM109) por fagos de *E. coli* (figuras 5B y 6B).

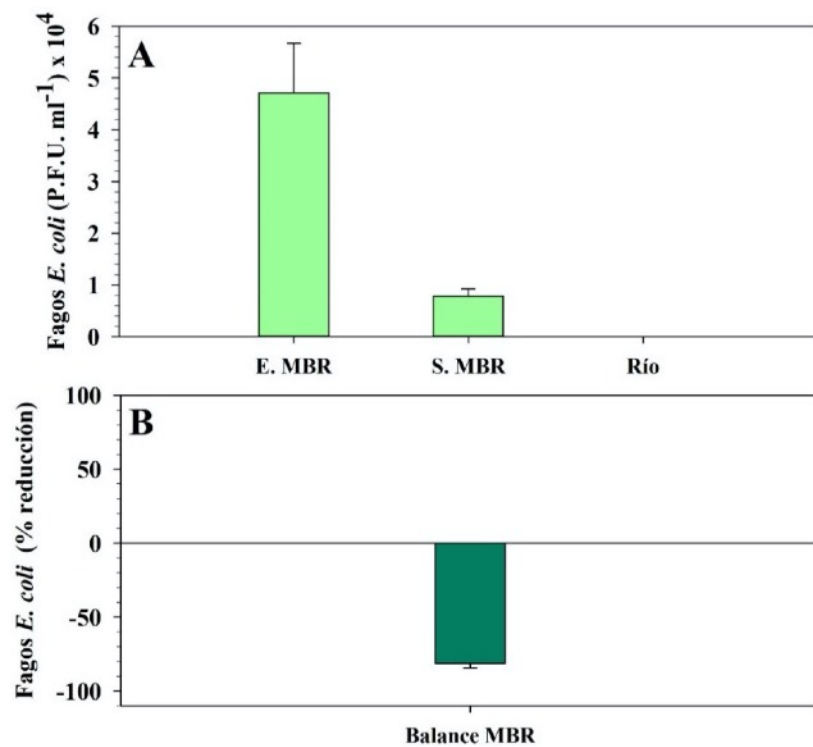


Figura 6. A) Abundancia de fagos líticos de *E.coli*. B) Porcentaje de reducción de fagos líticos de *E.coli* en el sistema MBR de la EDAR de Calasparra.

La mayoría de los virus que afectan a los humanos son más pequeños que las dimensiones de los poros de las membranas típicamente utilizadas en los MBR.

Algunos de ellos, como norovirus, sapovirus, rotavirus, enterovirus y virus de la hepatitis A y E, tienen un diámetro de aproximadamente 30 nm, mientras que el diámetro de los más grandes, como los adenovirus, oscila entre 60 y 90 nm (Van Regenmortel et al., 2000). Sin embargo, una proporción importante de estos virus, que son más pequeños que el tamaño de los poros de la membrana, son también retenidos en el MBR, ya sea debido a la biopelícula que se forma en las propias membranas o a la adsorción de los virus en la biomasa bacteriana de los fangos activados (Wong et al., 2009).

Esta retención es importante dada la relevancia epidemiológica de los patógenos virales, puesto que algunos de ellos son los principales responsables de los brotes de enfermedades asociadas a la contaminación del agua (Szewzyk et al., 2000).

Los virus que infectan a las bacterias (bacteriófagos), han sido propuestos como indicadores de la eliminación de virus en los procesos de tratamiento de aguas (Havelaar, 1991, Lucena y Jofre, 2010).

Los bacteriófagos se han postulado repetidamente como buenos indicadores de contaminación fecal, siendo adecuados para evaluar el rendimiento de eliminación de virus en el tratamiento de aguas residuales, tanto por filtración a través de membranas, como por otros procesos como la cloración, la radiación ultravioleta o la ozonización.

Los bacteriófagos presentan algunas características que los hacen idóneos para este papel indicador siendo específicos de bacterias fecales como coliformes, *Bacteroides* y *Enterococcus*, además de ser muy abundantes en las aguas residuales.

Por otro lado, son grupos de virus muy diversos, cuyas bacterias hospedadoras son de fácil cultivo y fácilmente disponibles para los ensayos en laboratorio (Wong et al., 2009, Zhang y Farahbakhsh, 2007; McMinn et al., 2017).

De todos los grupos de bacteriófagos, como se indica en la revisión de McMinn et al. (2017), el más abundante es el de los colífagos, que se han ensayado en este estudio usando una técnica de especial sensibilidad que permite, junto con la utilización de la citometría de flujo para la determinación de la abundancia de partículas víricas totales, realizar estimaciones mucho más sensibles que las de los métodos normalizados sobre el efecto de los tratamientos de depuración y desinfección de aguas en la eliminación de virus.

4.- Conclusiones

En la EDAR de Abanilla, las reducciones más importantes de partículas víricas totales (PVT) se produjeron en los tratamientos de desinfección, mientras que el descenso de los bacteriófagos líticos se dio principalmente en los tratamientos previos a la decantación con un alto rendimiento de eliminación, que se vio completado por los tratamientos de desinfección.

En el tratamiento biológico se produjo probablemente el reemplazamiento parcial de los virus presentes en la entrada de la EDAR por virus propios del sistema de lodos activos (que en general no serían patógenos para los humanos), por lo que incluso se observó un ligero incremento en el promedio de PVT en el decantador respecto a la entrada.

Por su parte, el proceso de filtración MBR en la EDAR de Calasparra ofrece unas excelentes eficiencias en la eliminación de virus, de manera que en la salida del MBR solo queda el 0,3% de las partículas víricas totales respecto a su entrada, y tan solo un 18% de los fagos líticos que se pueden detectar por un método de máxima sensibilidad.

Comparando ambos sistemas de tratamiento en su conjunto, la eficiencia en la reducción de partículas víricas totales es mayor en el sistema MBR utilizado en la EDAR de Calasparra que en la EDAR de Abanilla, esta última con un sistema de depuración convencional y desinfección por hipoclorito y UV.

5.- Referencias

- Carducci, A., Battistini, R., Rovini, E., & Verani, M. (2009). Viral removal by wastewater treatment: monitoring of indicators and pathogens. *Food and Environmental Virology*, 1(2), 85-91.
- Dias, E., Ebdon, J., & Taylor, H. (2018). The application of bacteriophages as novel indicators of viral pathogens in wastewater treatment systems. *Water Research*, 129, 172-179.
- Droste, R. L., & Gehr, R. L. (2018). *Theory and practice of water and wastewater treatment*. John Wiley & Sons.
- Havelaar, A. H. (1991). Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Research*, 25(5), 529-541.
- Hu, J.Y., Ong, S.L., Song, L.F., Feng, Y.Y., Liu, W.T., Tan, T.W., Lee, L.Y. and Ng, W.J. (2003). Removal of MS2 bacteriophage using membrane technologies. *Water Science and Technology*, 47(12), 163 –168.
- Huang, L., & Lee, D. J. (2015). Membrane bioreactor: a mini review on recent R&D works. *Bioresource Technology*, 194, 383-388.
- ISO 10705–2, (2000). *Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages–part 2: enumeration of somatic coliphages*. International Organisation for Standardisation.
- Judd, S. (2008). The status of membrane bioreactor technology. *Trends in Biotechnology*, 26(2), 109-116.
- Judd, S. (2010). *The MBR book: principles and applications of membrane bioreactors for water and wastewater treatment*. Elsevier.
- Kuo, J. (2017). Disinfection processes. *Water Environment Research*, 89(10), 1206-1244.
- Lazarova, V., Savoye, P., Janex, M. L., Blatchley Iii, E. R., & Pommepuy, M. (1999). Advanced wastewater disinfection technologies: state of the art and perspectives. *Water Science and Technology*, 40(4-5), 203-213.
- Łoś, J. M., Golec, P., Węgrzyn, G., Węgrzyn, A., & Łoś, M. (2008). Simple method for plating *Escherichia coli* bacteriophages forming very small plaques or no plaques under standard conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 5113-5120.
- Lucena, F., & Jofre, J. (2010). Potential use of bacteriophages as indicators of water quality and wastewater treatment processes. In *Bacteriophages in the control of food-and waterborne pathogens* (pp. 103-118). American Society for Microbiology.
- Maza-Márquez, P., Vilchez-Vargas, R., Kerckhof, F. M., Aranda, E., González-López, J., & Rodelas, B. (2016). Community structure, population dynamics and diversity of fungi in a full-scale membrane bioreactor (MBR) for urban wastewater treatment. *Water Research*, 105, 507-519.
- McMinn, B. R., Ashbolt, N. J., & Korajkic, A. (2017). Bacteriophages as indicators of faecal pollution and enteric virus removal. *Letters in Applied Microbiology*, 65(1), 11-26.
- Mezzanotte, V., Antonelli, M., Citterio, S., & Nurizzo, C. (2007). Wastewater disinfection alternatives: chlorine, ozone, peracetic acid, and UV light. *Water Environment Research*, 79(12), 2373-2379.
- Mutalik, V. K., Adler, B. A., Rishi, H. S., Piya, D., Zhong, C., Koskella, B., Calendar, R., Novichkov, P., Price, M. N., Deutschbauer, A. M. & Arkin, A. P. (2020) High-throughput mapping of the phage resistance landscape in *E. coli*. *PLoS Biol* 18(10): e3000877
- Oppenheimer, J. A., Jacangelo, J. G., Laïné, J. M., & Hoagland, J. E. (1997). Testing the equivalency of ultraviolet light and chlorine for disinfection of wastewater to reclamation standards. *Water Environment Research*, 69(1), 14-24.
- Petterson, S.R. and Ashbolt, N.J. (2001). Viral risks associated with wastewater reuse: modeling virus persistence on wastewater irrigated salad crops. *Water Science and Technology*, 43(12), 23–26
- Rattanukul, S., Oguma, K., Sakai, H., & Takizawa, S. (2014). Inactivation of viruses by combination processes of UV and chlorine. *Journal of Water and Environment Technology*, 12(6), 511-523.

- Rzezutka, A. and Cook, N. (2004). Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 441–453.
- Sakoda, A., Sakai, Y., Hayakawa, K., et al. (1997). Adsorption of viruses in water environment onto solid surfaces. *Water Science and Technology*, 35(7), 107–114.
- Santos, A., Ma, W., & Judd, S. J. (2011). Membrane bioreactors: two decades of research and implementation. *Desalination*, 273(1), 148-154.
- Schwartzbrod, L., & Mathieu, C. (1986). Virus recovery from wastewater treatment plant sludges. *Water Research*, 20(8), 1011-1013.
- Shang, C., Wong, H. M., & Chen, G. (2005). Bacteriophage MS-2 removal by submerged membrane bioreactor. *Water Research*, 39(17), 4211-4219.
- Simón Andreu, P. J., Lardín Mifsud, C., Martínez Muro, M. A., Sánchez Betrán, A. V., Vicente González, J. A. & Martínez Bravo, F. (2011). Control microbiológico y estructural en membranas de ultrafiltración en un sistema MBR mediante microscopía electrónica. *Tecnología del Agua*, 31(329), 50-56.
- Simón Andreu, P. J., Lardín Mifsud, C., González Herrero, R., Sánchez Betrán, A. V., & Vicente González, J. A. (2015). Estudio de la presencia de contaminantes emergentes en las distintas etapas de las depuradoras. *RETEMA*, 186, 84-91.
- Sobsey, M. D. (1989) Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. *Water Science and Technology*, 21, (3), 179.
- Suttle, C. A. (1993). Enumeration and isolation of viruses. In: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla, pp. 121-134.
- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., & Schleifer, K. H. (2000). Microbiological safety of drinking water. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 81-127.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L., & Stensel, H. D. (2003). *Wastewater engineering: treatment and reuse*, 4th edn. Metcalf & Eddy Inc.
- Ueda, T., & Horan, N. J. (2000). Fate of indigenous bacteriophage in a membrane bioreactor. *Water Research*, 34(7), 2151-2159.
- USEPA. (2001). Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure. EPA 821-R-01-029.
- Van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DH, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (2000). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press.
- Villain, M., Bourven, I., Guibaud, G., & Marrot, B. (2014). Impact of synthetic or real urban wastewater on membrane bioreactor (MBR) performances and membrane fouling under stable conditions. *Bioresource Technology*, 155, 235-244.
- Wang, X., Hu, X., Hu, C., & Wei, D. (2011). Sequential use of ultraviolet light and chlorine for reclaimed water disinfection. *Journal of Environmental Sciences*, 23(10), 1605-1610.
- Wong, K., Xagorarakis, I., Wallace, J., Bickert, W., Srinivasan, S., & Rose, J. B. (2009). Removal of viruses and indicators by anaerobic membrane bioreactor treating animal waste. *Journal of Environmental Quality*, 38(4), 1694-1699.
- Zhang, K., & Farahbakhsh, K. (2007). Removal of native coliphages and coliform bacteria from municipal wastewater by various wastewater treatment processes: implications to water reuse. *Water Research*, 41(12), 2816-2824.