



# Aigua regenerada: noves estratègies en la gestió de riscos microbiològics

Miriam Agulló i Barceló

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

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

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







## **Aigua regenerada: noves estratègies en la gestió de riscos microbiològics**

*Míriam Agulló i Barceló*





Departament de Microbiologia  
Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona

## **Aigua regenerada: noves estratègies en la gestió de riscos microbiològics**

Memòria presentada per Míriam Agulló i Barceló per optar al grau de doctora per  
la Universitat de Barcelona

Programa de doctorat EEES: Microbiologia ambiental i Biotecnologia

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Francisco Lucena Gutiérrez al departament  
de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

El director

La doctoranda

Francisco Lucena Gutiérrez

Míriam Agulló i Barceló

Barcelona, Febrer 2013



*A tots els que heu estat  
amb mi, d'una manera  
o d'una altra, durant  
tot aquest temps*





***« It was the best of times, it was the worst of times,  
it was the age of wisdom, it was the age of foolishness,  
it was the epoch of belief, it was the epoch of incredulity,  
it was the season of Light, it was the season of Darkness,  
it was the spring of hope, it was the winter of despair,  
we had everything before us, we had nothing before us [...] »***

Charles Dickens,  
*A Tale of two cities* (1859)



**« La ciència no té límits.  
La ciència no té moral.  
No és ni bona ni dolenta,  
segueix el seu curs,  
imparable. »**

Moisès Broggi i Vallès  
(18 de maig de 1908 - 31 de desembre 2012)



## AGRAÏMENTS

**Abans de començar amb els agraïments més personalitzats només us volia dir a tots (als que us esmento i als que segurament em deixaré), que MOLTES GRÀCIES per haver format part d'això. Per mi, els últims anys no només han estat genials des del punt de vista de la meva formació, sinó que també han estat una gran etapa pel que fa al meu creixement personal, a la meva visió de la vida, de les coses, de les persones i de la ciència, així que gràcies.**

**Francisco**, ya sé que esto suena a tópico, pero no por eso voy a dejar de decirlo: muchas gracias por darme la oportunidad de estar ahí. Empecé a colaborar contigo hace... buff... más de 7 años!!! ¿¿Te lo puedes creer?? Entre colaboraciones, master, doctorado nos hemos plantado en 2013! Gracias por las risas, por las anécdotas, por las historias, por tus frases míticas, por las comidas y por las meriendas de yogur de oveja con mermelada de naranja amarga y gracias por tener siempre una visión de conjunto cuando yo no he sabido verla.

A la resta de “jefes” (Maite, Joan i Anicet) només dir-vos que és entre el Francisco i tots vosaltres que crec que heu fet de mi una bona científica, i tenint en compte que la ciència és tant la meva feina com una de les meves passions, només puc fer que donar-vos infinites gràcies. **Maite**, des del minut zero que has estat allà per ajudar, tant al laboratori com a fora, per donar suport i per donar ànims. No oblidaré mai alguns moments no tan bons de fa molts anys en què tu sempre aconseguies veure la part bona de les coses i aconseguies motivar-me, crec que ets un gran exemple a seguir. **Joan**, moltes gràcies pel teu “bon dia princeses”, que sàpigues que això no té preu! Gràcies per la confiança dipositada, per parlar sempre clar, per enganxar-nos *in fraganti* i tot i així, riure, i per tants i tants petits i grans consells que m’han ajudat tant! **Anicet**, moltes gràcies per la teva perspectiva de les coses, pels riures, per les bromes, per intentar explicar-nos que formem part d’un tot i integrar-nos-hi, i per ajudar-me a creure que aquest “tot” és gran. També moltes gràcies a la **Rosa**, a la **Rosina** i al **Xavi Méndez** per haver-me ajudat sempre que ho he necessitat! I al **Francesc**, amb el que encara tinc pendent unes birres!

A la gent de **secretaria**; un agraïment molt especial a la **Rosario** per les estones passades, i pels litres i litres d’agars de pràctiques i la teva bona voluntat sempre!!! A la **Macu**, a la **Susana**, al **Manolo** i a la **Bea**; tenint en compte que sóc superdespistada, i no ens enganyem, que la burocràcia m’agrada zero; segur que us he fet anar malament en algun moment... disculpeu-me, i moltes gràcies per la vostra paciència. Ah! I moltes gràcies pel bunyol anual de carnestoltes i iniciatives semblants!! M’encanta!

**Andrey**, qué te voy a decir... tú fuiste mi inicio en este laboratorio, dedicaste tu tiempo a enseñarme tanto técnicas como razonamientos y luego tuviste paciencia cuando me equivoqué, titulando decenas de placas sin bacteria, o poniéndolo todo en jarras de anaerobiosis cuando no eran anaerobios... jejeje y seguro que muchas más veces... Por todo esto y por las charlas, las risas, los cafecitos y todo lo demás, gracias. **Michel!!!** Moltes

gràcies per ser el meu “pare” jeje en el tema Crypto, per ajudar-me amb les tècniques, els consells i per les explicacions, per estar sempre disposat a planejar projectes i a fer coses. Moltes gràcies per les discussions, els jocs i les bones estones que vam passar al lab. **Ana**, moltes gràcies per ser com ets. Ets una de les persones que més em va ajudar quan començava, sempre has estat disposada a fer coses, a buscar solucions, a arremangar-te i “pringar” fins i tot quan no era cosa teva. Sempre buscant la motivació, animant-me i donant-me suport. Donant-me confiança. M’has ensenyat infinites coses i no podré estar-te mai prou agraïda. **Carolina**, tan lindaaaaa!!! Muchas gracias por los “Buenos días, ¿cómo amaneciste?” por los ratos pasados entre risas, lodos, anécdotas, y APIs de *Salmonella* en fin de semana, por la compañía en largas horas de trabajo, y por ser la maravillosa persona que eres.

També vull agrair al **Sergi** i a la **Ruth** els seus shows, que sé que mai tornaré a veure enlloc perquè eren únics, com el de fer el conillet al lab!! I els esmorzars i dinars amb historietes marranes... jejeje. A l'**Aiora**, moltes gràcies per cuidar-te de les cel·luletes, per ensenyar-me a cuidar-les, per estar sempre disposada a explicar-me com hauria de fer totes aquelles coses - tipus comandes i papers - que odio fer... No em vull imaginar un doctorat sense l'Aiora... jeje. També gràcies a la **Lejla**, a la **Fanny**, a l'**Andreu** i la resta de gent que heu anat passant.

A tots els “Muniesas” petits, però que ja no sou petits, perquè en realitat sou grans!! **Anna**, **Marta Colomer**, **Marta Gómez**, **Àlex**. Sou un grup genial, de persones genials, que feu un equip digne d'admirar (com ho diu la senyora de l'APM). Àlex, no deixis mai lo dels “cumplidos” que m’encanta! ;)

Passant pel lab 8, he de fer una menció especial a les **Sílvies**, que juntament amb mi formen les Capgrosses, \*\*\*petites!! El comando Mataró triomfa, diguin el que diguin... Crec que hauríem de començar a moure els fils per traslladar el departament cap a Mataró. Ara que tenim un Tecnocampus al costat del mar, no estaria malament, eh?! Segur que el Florenci també s’hi apuntaria! Cervero, gràcies per les històries compartides, els “momentazos” als congressos, la xocolata a les dents...! Bofill, també gràcies per grans moments, però sobretot ser com ser com ets, m’encanta la teva visió de la vida i de les coses! Seguint amb el lab 8, **Marta Rusiñol** i **Persi-Parru**, gràcies perquè, m’heu fet riure infinit des que us conec i sou dues persones estupendes!! A la resta, **Anna**, **Laura**, **Byron**, **Tarik**, **Carmina**, **Chus**, **Carlos**, **Ayalke**, **Sandra**... a tots, gràcies per les estones compartides (xerrades, birres, feina, sopars, snooker...).

Al lab 7, gràcies a la **Sílvia V.**, la **Rocío**, la **Natàlia**, les **Maites**, al **Markus**, la **Raquel**, **Flor**, a la **Ivania**, i als que em deixo que hi sou i que heu anat passant...

A la gent de **Fase I** (per molt que diguin que no hi ha dues fases, sí que hi són... però això no és dolent ni res... és com és, i ja està!), aquí hi entreu totes aquelles persones amb les que ens acostumem a veure a l’hora de dinar i del cafè, o a les reunions de responsables, o també les salutacions al passadís... Amb moltes de vosaltres també hem rigut molt: **Marga**, **Quim**, **Arnau B.**, **Nerea**, **Sílvia C.**, **Laia**, **Llorenç**, **Amanda**, **Sònies** (les dues), **Carla**, **Susana**, **Cristina**, **Fran**... i molts d’altres que segur que em deixo!

Finalment arribo al Lab 9 més recent, el que ha sigut, per bé o per mal, la meva segona casa (a vegades fins i tot la primera...). Moltes gràcies a la **Cristina** i a l'**Eli**, vosaltres hi éreu al principi, vau marxar, ara heu tornat! Moltes gràcies per ajudar-me sempre, i que sapiguen que us admiro un munt a les dues!! Sou uns cracs! A les futures generacions d'aquest lab, de moment la **Laura** i la **Julia**, us desitjo molta sort en tot el que feu, amb moooooolta paciència (que ja sabeu que és la mare de la ciència), voluntat i empenta, mica mica tot va sortint, i si no, doncs demaneu ajuda! A la **Míriam**, per estar sempre disposada a donar un cop de mà! I als altres que heu passat i aneu passant per aquí, **Ángela, Sergi, Camilo, Sílvia M., Jordi, Mar, Mateu...**

I a vosaltres tres: **Maru, Rachi i Babau...** no tinc prou paraules per agrair-vos tots els anys que hem passat junts (mostrejos, esmorzars, dinars, berenars i sopars, feina a saco, carnestoltes, cants i balls al lab, frustracions i alegries compartides, **LA LLIBRETA...**), i les coses que segur que heu hagut d'aguantar de mi... jeje Però que sapiguen que la persona que ara sóc té una petita part de **Maru**, una petita part de **Raquel** i una petita part d'**Arnau**, i crec sincerament que això em converteix en una persona millor! Si hi penseu bé, som una estranya combinació que seria molt difícil que es donés de forma natural, però que ha acabat formant un gran equip! Funcionalment, una espècie de tapet microbià!! jejeje Algú ho hauria d'estudiar, ara està de moda l'estudi de les poblacions com un tot, podríem enviar-ho al *Journal of Chus...* jejeje I si algú en vol alguna prova, sempre tindrem la llibreta, les fotos i la feina feta!!!

**Andreas**, I would like to thank you for giving me the opportunity to work with you. It has been a great pleasure, and I've learned a lot! I hope we meet again someday! And if not, we'll always have Cranfield! Jejeje And to the rest of you, that were by my side, and that made my stay in Cranfield such a great experience: **Sara, Yolanda & Bruce, Marta, Sergio, Francisco, Sandra & Cristóbal, Jorge, Nelia, Mr. Mo, Graham, Matthew, Roger, Gavin, Nikos...** Thanks to you all!

A toda la gente de la **PSA**, especialmente a **Pilar** e **Inma**, ha sido un placer trabajar con vosotras. ¡Creo que hemos hecho un gran trabajo! ¡Quizá nuestros caminos se vuelvan a cruzar algún día! Y al resto, **Isa, Irene, Agustín, Eli, Sara, Lucía, Sixto...** y a los que seguro que me dejo, ¡Gracias por ser tan majos!

A les "Nenes Bio", **Marta, Mariona i Isolda**. Les nostres vides han agafat camins molt diferents, però sempre ens unirà la Biologia!! M'encanta que després de tant de temps seguim sent amigues! Sou, genials!

A les Nenes de Mataró: Ens hem fet taaaaan grans, estic orgullosa de nosaltres! Moltes gràcies per ser com sou! Tenim mil històries genials; bueno, jo més que vosaltres... jeje (amb el *quant me-deixes*, el *merci.....bocú*, el *pan "zinza"*, o les radiografies... jejeje). Però també n'hi ha de boníssimes de l'**Ana** (massatge frontal), de la **Maria** (*Levante*), de la **Queralt** (cabell a la finestra del cotxe); **Alba** i **Núria**, el nivell està molt alt... no sé si mai hi arribareu. A vosaltres, i al resta de la "**30 ZONE**", se us estima!! El nostre 1983-2013, *The Trip* serà genial!!



Ja per acabar, a la meva **família**. Especialment als meus pares i germans (“The Buuuullooons”, amb la musiqueta de “The Siiimpsoooooons”). **Mama i papa**, sé que sempre us ha costat entendre el que estava fent, i que no ho heu vist mai gaire clar, però tot i així m’heu donat tot el suport que heu pogut, incondicional, sense fer preguntes. Sou part d’aquesta tesi, espero que el dia de la presentació ho entengueu tot una mica més! **Nuri i Jordi**, sou els millors germans que una podria desitjar, jo tampoc seria com sóc sense vosaltres! Nuri, m’encanta que hagi après a dir *Cryptosporidium*!! Al **Marçal**, perquè ets com un germà més, i a tota la família Vinardell per ser tant macos! A la **Lara** i al **Lluís**, perquè també sou de la família i tenim moments insubstituïbles, dels que espero que només en quedi el record i cap registre audiovisual... jeje Al **Guillem** i a la **Mariona** Vinardell i Agulló, per ser dues personetes fantàstiques, genials i meravelloses que només feu que sorprendre’m; i òbviament per ser els nebots més macos que una tieta pot demanar, us estimo moooooolt! Que sapiguen que podeu comptar amb mi sempre!

A la tieta **Maribel**, perquè no ens truquem gaire, però sabem que l’una pensem en l’altra. A la **família Pop** en general, i al **tiet Pop** en particular pels “Com van els exàmens? Necessites vaselina??” de quan estudiava, i els “Com van els ratolins?” de més endavant! A la **iaia “Sunsión”**, que ja no hi és, però que estic segura que hagués estat a primera fila el dia de la presentació de la meva tesi, t’hi trobaré a faltar iaia! A la **tieta Margarita**, per ser tant *hermosa*! I a la resta de família que heu estat allà!

A tots, gràcies.

**Llistat d'abreviatures**

°C Graus Celsius

µL Microlitre

**AR** Aigua residual crua (sense tractar, d'entrada a la depuradora)

**ATZ** Atrazina

**BES** *Boletín epidemiológico semanal*

**CB390PH** Fags que infecten la soca CB390 (soca modificada d'*Escherichia coli*)

**CFU** De l'anglès *colony forming unit*, unitats formadores de colònies

**CIEMAT** *Centro de investigaciones energéticas, medioambientales y tecnológicas*

**cm** Centímetre

**DNA** De l'anglès *deoxyribonucleic acid*, àcid desoxiribonucleic

**E** Efluent d'entrada a la depuradora, és a dir, aigua residual crua.

**E. coli** *Escherichia coli*

**EDAR** Estació depuradora d'aigua residual

**EEUU** Estats Units

**ERA** Estació regeneradora d'aigua

**ES** Efluent secundari

**ET** Efluent terciari

**ETAP** Estació de tractament d'aigua potable

**FDA** De l'anglès *food and drug administration*, agència d'administració d'aliments i fàrmacs

**Fe** Ió ferro

**FRNAPH** Fags RNA F específics que infecten la soca WG49 de *Salmonella*

**h** Hora

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peròxid d'hidrogen

**IDESCAT** Institut d'estadística de Catalunya

**ISO** De l'anglès *International standardization Organization*, organització internacional per l'estandardització.

**IOO** De l'anglès *infectious oocysts*, oocists infecciosos de *Cryptosporidium*

**Km** Quilòmetre

**KJ** Quilojoule

**L** Litre

**m** Metre

**MBR** De l'anglès *membrane bioreactor*, bioreactor de membranes

**mg** Mil·ligrams

**min** Minut

**mJ** Mil·lijoule

**mL** Mil·lilitre

**mRNA** RNA missatger (vegeu RNA)

**MST** De l'anglès *microbial source tracking*, traçabilitat de la font de contaminació

**OCDE** Organització per la cooperació i el desenvolupament econòmic

**OMS** Organització mundial de la salut

**ONU** Organització de les nacions unides

**MDG** De l'anglès *millenium development goals*, objectius del mil·lenni per al desenvolupament.

**NTU** De l'anglès *nefelometric turbidity unit*, unitat nefelomètrica de terbolesa

**PCR** De l'anglès *polymerase chain reaction*, reacció en cadena de la polimerasa

**PDF** De l'anglès *probability distribution function*, funció de distribució de probabilitats

**PFU** De l'anglès *plaque forming units*, unitats formadores de placa

**pH** Potencial d'hidrogen

**PI** Probabilitat d'infecció

**PMA** De l'anglès *propidium monoazide*

**POA** Processos d'oxidació avançada

**PPCP** De l'anglès *pharmaceutical and personal care products*, productes farmacèutics i d'higiene personal

**PSA** *Plataforma solar de Almería*

**qPCR** De l'anglès *quantitative PCR*, PCR quantitativa

**QMRA** De l'anglès, *quantitative microbial risk assessment*, valoracions quantitatives de risc microbiològic

**Q<sub>UV</sub>** Energia acumulada per unitat de volum

**r** coeficient de correlació

**RD** Real decret

**RFLP** De l'anglès *restriction fragment length polymorphism*, polimorfisme de longitud de fragments de restricció.

**RNA** De l'anglès *ribonucleic acid*, àcid ribonucleic

**ROS** De l'anglès *reactive oxygen species*, espècies reactives de l'oxigen

**s.** Segle

- RT-qPCR** De l'anglès *reverse transcriptase-qPCR*, qPCR amb transcriptasa inversa
- SCADA** De l'anglès *supervisory control and data acquisition*, control supervisor i adquisició de dades
- SIDA** Síndrome d'immunodeficiència adquirida
- SODIS** De l'anglès *solar disinfection*, desinfecció solar
- SOMCPH** Fags somàtics (*somatic coliphages*) que infecten la soca WG5 d'*E. coli*
- SSRC (o SRC)** De l'anglès *spores of sulphite-reducing clostridia*, espores de clostridis reductors del sulfit
- t** temps
- TiO<sub>2</sub>** Diòxid de titani
- TOO** De l'anglès *total oocysts*, oocists totals de *Cryptosporidium*
- TSS** De l'anglès *total suspended solids*, sòlids totals en suspensió.
- UE** Unió europea
- uLog** unitats logarítmiques
- UV** Ultraviolat -ada
- VIH** Virus d'immunodeficiència humana
- W** Watts
- WWAP** De l'anglès *world water assessment programme*



---

**CONTINGUT DE LA TESI**

<b>Agraïments</b>	<b>i-iv</b>
<b>Llistat d'abreviatures</b>	<b>v-viii</b>
<b>Continguts</b>	<b>ix-x</b>
<b>1. Introducció general i objectius</b>	<b>1-32</b>
<b>1.1. ANTECEDENTS I CONTEXTUALITZACIÓ</b>	<b>3</b>
1.1.1. L'aigua és vida	3
1.1.2. El paper de l'aigua al llarg dels temps: Aigua i desenvolupament	5
1.1.3. Tractament de l'aigua i reutilització	7
1.1.4. Aigua regenerada i salut	9
<b>1.2. CAPÍTOL I: Riscos microbiològics lligats a la reutilització:     el cas de <i>Cryptosporidium</i></b>	<b>11</b>
1.2.1. Risc microbiològic de la reutilització: patògens i indicadors de qualitat	11
1.2.2. <i>Cryptosporidium</i> com a patògen de referència	15
1.2.3. <i>Quantitative Microbial Risk Assessment</i> (QMRA)	18
<b>1.3. CAPÍTOL II: Noves tecnologies per al tractament de     l'aigua regenerada</b>	<b>25</b>
1.3.1. Processos d'oxidació avançada (POA)	28
• H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	30
• Fotocatàlisi heterogènia amb TiO <sub>2</sub> /UV	30
• Fotocatàlisi homogènia amb foto-Fenton Fe/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	31
<b>2. Objectius</b>	<b>33-36</b>
<b>3. Publicacions</b>	<b>37 - 122</b>

---

## CAPÍTOL I: Riscos microbiològics lligats a la reutilització d'aigua regenerada: el cas de *Cryptosporidium*

<b>3.1. ARTICLE 1:</b> <i>Assessing the effects of tertiary treated wastewater reuse on a Mediterranean River (Llobregat, NE Spain), part III: Pathogens and indicators.</i>	
• Resum article 1	39
• Informe del factor d'impacte i de participació de l'article 1	41
<b>3.2. ARTICLE 2:</b> <i>Alternative indicators for monitoring Cryptosporidium oocysts in reclaimed water</i>	
• Resum article 2	51
• Informe del factor d'impacte i de participació de l'article 2	54
<b>3.3. ARTICLE 3:</b> <i>Direct and indirect QMRA of infectious Cryptosporidium oocysts in reclaimed water.</i>	
• Resum article 3	63
• Informe del factor d'impacte i de participació de l'article 3	66

## CAPÍTOL II: Noves tecnologies per al tractament de l'aigua regenerada

<b>3.4. ARTICLE 4:</b> <i>Evaluation of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the disinfection and treatment of municipal secondary effluents for water reuse.</i>	
• Resum article 4	77
• Informe del factor d'impacte i de participació de l'estudi 4	79
<b>3.5. ARTICLE 5:</b> <i>Solar advanced oxidation processes as disinfection tertiary treatments for real wastewater: implications for water reclamation.</i>	
• Resum article 5	91
• Informe del factor d'impacte i de participació de l'estudi 5	93
• Carta d'acceptació de l'editor	95

---

## 4. Discussió global i conclusions finals 123-130

4.1. Discussió global i conclusions finals del capítol I	125
4.2. Discussió global i conclusions finals del capítol II	128

---

## 5. Bibliografia 131-140

---

# **1. Introducció**



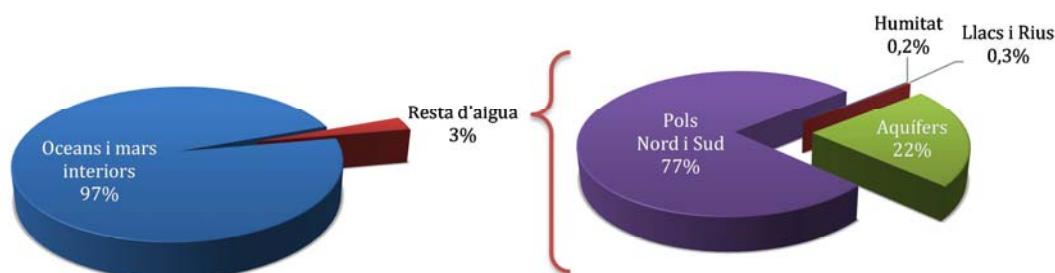


## 1.1. ANTECEDENTS I CONTEXTUALITZACIÓ

### 1.1.1. L'Aigua és vida

S'estima que a la Terra hi ha aigua des de fa uns 5000 milions d'anys i que l'aigua que tenim avui és la mateixa que la que hi havia fa 3000 milions d'anys, és a dir, que s'ha anat movent contínuament pels seus diversos reservoris: processos d'evapotranspiració, sublimació, condensació, fusió, precipitació i escolament (Rohli i Vega, 2011). Per tant, podem considerar que tota l'aigua que tenim avui en dia és, de fet, aigua reciclada.

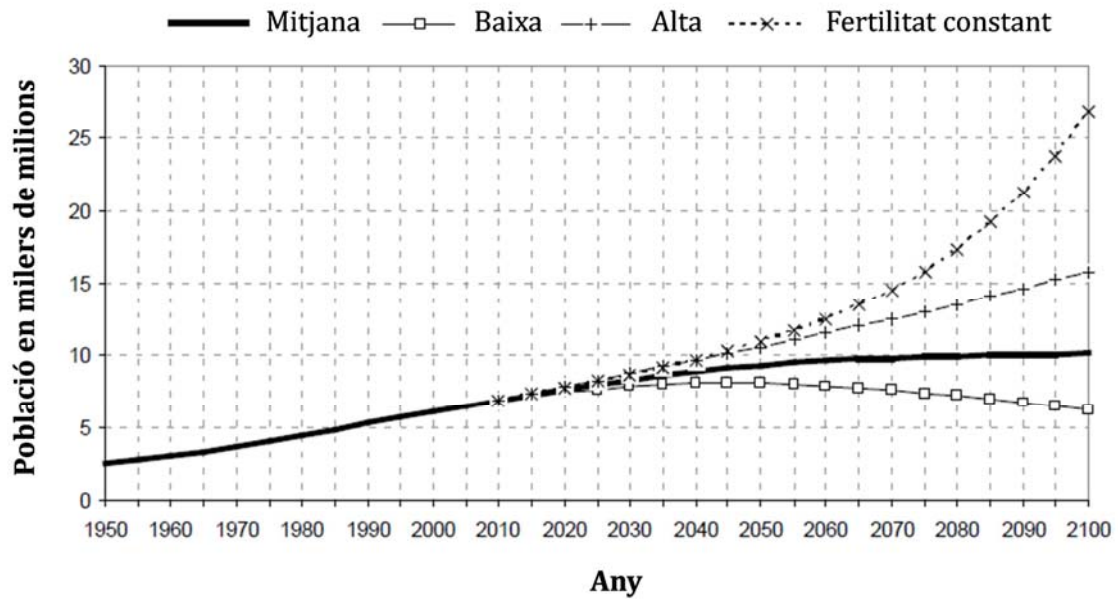
Un 71% de la superfície de la terra és aigua, i d'aquesta, un 97,2% està en forma d'aigua salada en oceans i mars interiors. La resta, aproximadament un 2,8%, és aigua dolça. Tot i així, només una petita porció d'aquest 2,8% està disponible, ja que a grans trets, està distribuïda de la següent manera: 0,008% en llacs; 0,62% en aqüífers; 2,15% als pols nord i sud; un 0,0001% en rius; un 0,001% pertany a l'atmosfera; un 0,005% és la humitat del sòl i el 0,008% mars interiors (vegeu figura 1).



**Figura 1:** Gràfic esquemàtic de la distribució, en percentatge, de l'aigua a la Terra.

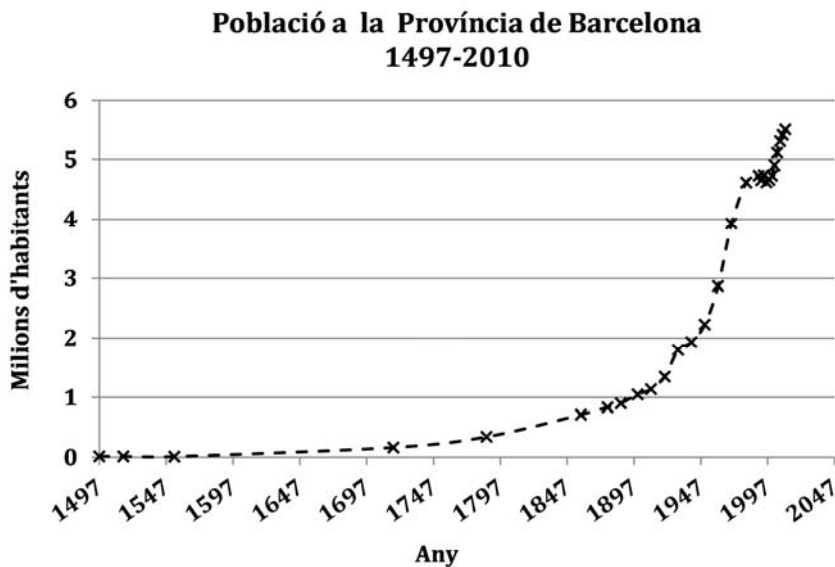
Tenint en compte el temps que l'aigua està en cadascun dels seus reservoris i la velocitat amb la que la població humana l'està consumint, el resultat és un dèficit hídric global que fa que l'aigua hagi passat a ser un recurs escàs i finit. Altres factors com **l'increment de la població (A)** i el **canvi climàtic (B)** contribueixen significativament a la sobreexplotació de l'aigua fent que la situació empitjori. D'aquesta manera, cada vegada hi ha menys aigua disponible i més demanda, cosa que és insostenible a llarg termini.

**(A)** Pel que fa a **l'increment de la població**, s'estima que al 2050 (d'aquí a 37 anys), al món hi haurà entre 9.300 i 10.600 milions de persones en funció de com varïï la fertilitat (vegeu figura 2; UNWPP, 2010). A més a més, es preveu que el creixement serà desigual, és a dir, molt més alt en països en vies de desenvolupament que no pas en països desenvolupats. En aquest sentit, cal remarcar que és en països en vies de desenvolupament on les necessitats d'aigua són més elevades, on les condicions higièniques i sanitàries són més pobres i on el tractament d'aigua contaminada, si és que existeix, es un procés que tot just està a les beceroles. A més a més, l'OCDE estima que, si no s'apliquen mesures correctives i d'adaptació, al 2050, un 40% de la població viurà en zones amb un estrès hídric significatiu.



**Figura 2:** Població mundial del 1950 al 2100 segons diferents projeccions i variants. Adaptació del gràfic de l'informe 2010 de l'ONU sobre creixem de la població

Sense anar més lluny, a la Província de Barcelona, la població ha augmentat de manera exponencial des que se'n tenen registres. Aquest augment ha estat especialment important des de l'inici del s. XX (vegeu figura 3).



**Figura 3:** Població històrica del territori al que avui en dia correspondria a la província de Barcelona. Gràfic elaborat utilitzant dades de l'IDESCAT. 1947-1953: fogatges (a la Catalunya vella, s. XIII). 1717-1981: població de fet i 1990-2010: població de dret; ambdues a la província de Barcelona.

**(B)** En relació al **canvi climàtic**, els models actuals (IPCC, 2007) indiquen que durant el s. XXI, hi ha probabilitats altes (>90%) que s'incrementin tant els episodis de

pluja intensa com les àrees afectades per la sequera (>66% probabilitat). Així doncs, la disponibilitat d'aigua a nivell global serà molt menor. L'IPCC (2007) considera que aquest estrès hídric podria, de retruc, tenir influència en la salut de les persones ja que d'una banda, disminuiria la disponibilitat d'aigua, i de l'altra, empitjoraria la qualitat de les aigües tant superficials com subterrànies incrementant el risc de patir malalties infeccioses transmises per l'aigua. Aquests mateixos estudis consideren que la Mediterrània serà una de les regions que es veurà més afectada per aquests canvis.

En el mateix sentit, altres previsions indiquen que hi haurà reduccions generalitzades dels cabals, d'entre un 10 a un 50%, en funció de l'escenari socioeconòmic (tendencial o sostenible) i del tipus d'escenari de canvi climàtic (lleu o greu); que canviarà l'estacionalitat dels cabals; que hi haurà efectes sobre la descàrrega dels aquífers i que augmentarà del nombre de dies que els rius estan per sota del seu cabal de manteniment (ACCUA, 2011).

### **1.1.2. El paper de l'aigua al llarg dels temps: aigua i desenvolupament**

Al llarg de la història, les civilitzacions més antigues s'han establert al voltant de l'aigua, essent aquesta un condicionant molt important pel que fa al desenvolupament, a l'estat sanitari de la població, al comerç, a la indústria, i en definitiva a la generació de riquesa i a l'estat del benestar. Fins i tot ha estat motiu de disputes en algunes ocasions: en els registres històrics hi tenim, per exemple, els usatges de Barcelona, que al voltant del s. XII ja especificaven que l'aigua era de propietat pública però que era el rei qui s'encarregava de repartir-ne l'usdefruit a qui pagués els impostos corresponents. Actualment al món, l'aigua segueix sent motiu de conflicte: tot i que segons l'ONU el conflicte per l'aigua només s'ha donat excepcionalment, en els últims 50 anys hi ha hagut diversos episodis de violència relacionats amb l'aigua (UNDP, 2006). A Espanya mateix, el pla hidrològic nacional, aprovat per llei el 5 juliol de 2001, va ser i encara és motiu de conflictes polítics, socials i econòmics lligats a la gestió de l'aigua. A més a més, hi ha altres tipus de conflictes, com per exemple, els que es generen quan el govern imposa restriccions en èpoques de sequera, ja que provoquen un gran impacte en l'economia i malestar social en general.

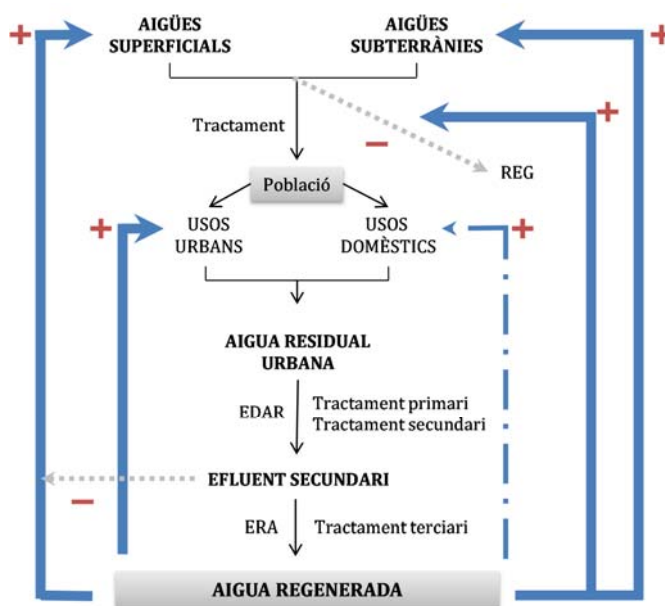
A nivell de desenvolupament global, l'aigua juga un paper clau en tots els territoris del planeta. Així, si s'analitzen detalladament els 8 objectius del mil·lenni per al desenvolupament (UNDP, 2000), es veu clarament com l'aigua té un paper fonamental en l'assoliment de la majoria d'ells (vegeu figura 4).



**Figura 4.** Els vuit objectius del mil·lenni per al desenvolupament (MDG) establerts en el programa de desenvolupament de l'ONU (UNPD), que s'haurien d'assolir a finals del 2015. L'asterisc blau marca tots aquells objectius en els que l'aigua hi està directament involucrada.

Tot i que com hem vist, l'aigua és un afer global, a Catalunya, durant l'última dècada, també ha crescut el nombre d'iniciatives i de campanyes de sensibilització tant contra el malbaratament de l'aigua com per al seu ús racional i per al seu estalvi; començant pel projecte *Catalunya Estalvia Aigua* (CEA, 2002-2004 i 2004-2006) i continuant amb altres campanyes com: *Gota a gota s'esgota*; *Estima l'aigua. Cada gota compta*; *Tanca l'aixeta*; *L'aigua no té preu, estalviem-la*, etc. amb l'objectiu de conscienciar la societat que l'aigua és un bé escàs. Campanyes similars s'han dut a terme en la majoria de països industrialitzats durant els últims anys.

Per a poder assolir una gestió de l'aigua adequada, és necessari utilitzar diferents estratègies que integrin una sèrie d'accions enfocades d'una banda, a la reducció del consum i de l'altra, a la cerca de noves fonts d'aigua. En aquesta línia, la regeneració d'aigües residuals depurades s'ha convertit en una estratègia clau pel que fa a l'obtenció de nous recursos hídrics ja que té implicacions molt positives en el totalitat del cicle urbà de l'aigua (vegeu figura 5).



**Figura 5.** Cicle urbà de l'aigua. Adaptació del gràfic de Sala i Millet (1997). El signe "+" indica augment i el signe "-" disminució de les vies corresponents.

Finalment, és molt important que sigui quina sigui l'estratègia escollida, estigui adaptada a l'entorn i al moment en què es vol aplicar, ja que factors econòmics, tècnics, climàtics, o socials poden determinar quina o quines opcions són les més adequades pel que fa a la gestió de l'aigua.

### 1.1.3. Tractament de l'aigua i reutilització

A l'antiga mesopotàmia, aproximadament 3000 anys AC, ja hi havia tot un sistema de clavegueram, tot i que possiblement rudimentari, per allunyar els residus fecals de les cases, i generalment aquesta aigua era abocada als rius. Els primers indicis de reutilització d'aigua residual els trobem a l'antiga Grècia al voltant dels anys 300 AC – 500 DC, on s'han localitzat restes de sistemes de drenatge que recollien tant les aigües de pluja com les aigües residuals dels habitatges i les transportaven lluny de la població. Des d'allà, diferents conductes dirigien l'aigua cap als camps, on era utilitzada com a font d'aigua per als cultius i per a la fertilització d'horts i conreus (Cooper, 2001).

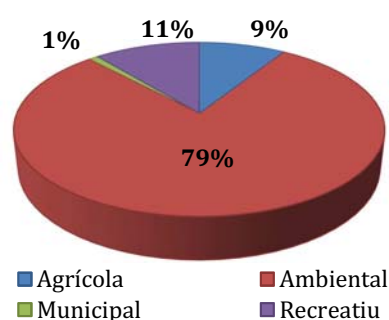
En els seus inicis, però, la reutilització va ser més aviat una activitat fortuïta, conseqüència de la depuració d'aigua, i no pas una activitat dirigida a la idea de regeneració que tenim avui en dia. Un altre exemple n'és la ciutat de Londres, a finals del s. XIX, on es va prohibir llençar aigües brutes al carrer ja que aquestes s'havien de recol·lectar en pous negres, el contingut dels quals era transportat al camp per la seva aplicació al sòl. Un altre exemple situat en la mateixa època (1890), però geogràficament més llunyà, és el de Ciutat de Mèxic, on es van construir una sèrie de canals que drenaven l'aigua residual sense tractar i l'utilitzaven per irrigar zones agrícoles properes.

No va ser fins al 1913 que s'establirien els primers processos de fangs activats amb la finalitat de depurar l'aigua residual. Les primeres proves es van desenvolupar a nivell de laboratori al *Lawrence Experiment Station*, a Massachusetts (EEUU) i durant el 1913 i el 1914 es van posar en pràctica a Manchester (Anglaterra), a escala pilot. Finalment, la primera ciutat Britànica que va aplicar aquest procés complet va ser Sheffield, el 1920. El procés d'implantació al Regne Unit va ser força més lent que no pas als EEUU, ja que els britànics havien invertit molts diners durant els anys anteriors en sistemes de filtració de l'aigua residual tot utilitzant terrenys propers a les ciutats. Aquesta estratègia, però, va acabar no sent tant efectiva com s'esperava, ja que les matèries més grolleres acabaven obstruint les terres que no deixaven passar l'aigua.

Mica en mica, el que havia començat com un incident, és a dir, la reutilització d'aigua contaminada, es va anar convertint en una necessitat, principalment en zones on l'escassetat d'aigua era i ha seguit sent un problema. Des d'aleshores, el tractament d'aigua enfocat a la reutilització s'ha anat estenent arreu del món. A Los Angeles, Califòrnia, els *LA County Sanitation Districts* han proveït aigua tractada per al reg de parcs i camps de golf des del 1929; i el 1962 ja s'hi havia construït la primera planta regeneradora a gran escala (Okun, 2000).

Pel que fa a Catalunya, l'origen de la regeneració d'aigua el tenim cap a l'any 1985, any en què el Consorci de la Costa Brava (CCB) va posar en marxa un projecte de regeneració i reutilització a l'EDAR de Castell-Platja d'Aro per al reg de camps de golf. A la Província de Girona, degut a l'augment de població i de la demanda d'aigua durant les temporades d'estiu, la manca d'aigua era un problema evident. Per tant, el CCB va considerar que era el lloc ideal per desenvolupar un projecte de reutilització. Des d'aleshores, han anat augmentant les estacions regeneradores d'aigua, el volum d'aigua que es regenera i la qualitat de l'aigua que es produeix. A més a més, s'han diversificat els usos per als quals s'ha fet servir: actualment s'utilitza per al reg de jardins públics i privats, de zones agrícoles, per la recàrrega d'aqüífers, per protecció ambiental, per a usos urbans no potables, etc.

A la resta de Catalunya, s'han anat implantant estratègies similars, i amb els anys, la regeneració i la reutilització s'han convertit en una pràctica absolutament necessària i molt estesa per tot el territori. S'estima que l'any 2008 a Catalunya es reutilitzava un 7,6% de l'aigua i que durant l'estiu podia arribar al 12%. D'aquesta, la majoria (79%) s'utilitza per a usos ambientals (vegeu figura 6).



**Figura 6.** Percentatges de reutilització per usos a Catalunya l'any 2008.

Enllaçant amb les possibles conseqüències del canvi climàtic a la Mediterrània esmentades anteriorment, és obvi que la reutilització d'aigua regenerada per a usos ambientals com la recàrrega d'aqüífers, el manteniment d'aiguamolls o el manteniment dels cabals ecològics dels rius, pot suposar una manera molt eficient de gestionar les sequeres. D'altra banda, si tenim en compte que els rius són la nostra font més important d'aigua potable, l'increment del cabal d'un riu implica la reutilització indirecta per potabilització. El terme "indirecta", fa referència a que aquesta activitat no consisteix a agafar aigua regenerada i tractar-la directament per obtenir aigua de beguda, sinó que l'aigua és abocada a un medi receptor, com un riu, que en algun moment serà utilitzat com a font d'aigua potable. Aquest tipus de reutilització passa *de facto* ja que hi ha moltes poblacions que aboquen els efluent de les seves depuradores al riu. Quan això passa, es tracta de reutilització per a usos potables no planejada, terme que en anglès s'anomena *unplanned IPR (indirect potable reuse)*. Tot i així, si aquest tipus de reutilització es vol fer de manera planejada, s'ha de fer una avaluació completa per determinar si l'aigua és segura i si no implica riscos per a la salut pública.

A nivell d'estat, des de l'any 2007, es disposa d'una normativa específica, el RD 1620/2007 del 7 de desembre, per al qual s'estableix el règim jurídic de la reutilització de les aigües depurades. A més a més, les tecnologies actuals de regeneració i de tractament d'aigua fan que cada vegada aquesta es gestioni de manera més eficient i més econòmica.

L'objectiu de regeneració a curt i mitjà termini és el d'arribar a regenerar un 30% de l'aigua residual que produïm.

Actualment, Israel regenera el 75% de l'aigua residual que produeix, i es converteix així en el líder mundial en temes de regeneració. Tot i que molt allunyada d'aquest percentatge, en segon lloc hi tenim Espanya, que en regenera un 12%, seguida d' Austràlia (9%), d'Itàlia (8%), de Grècia (5%) i finalment de centre-Europa i EEUU amb un 1%.

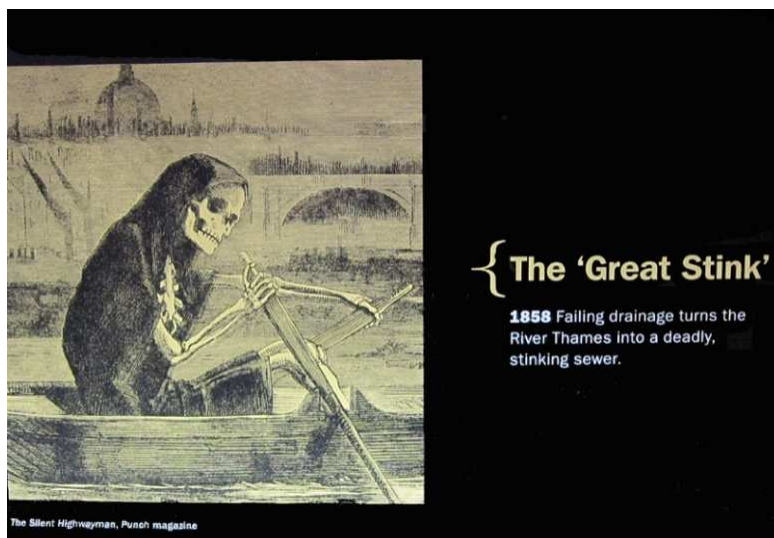
A nivell internacional es creu que si s'estengués la reutilització per a usos agrícoles i industrials així com per augmentar el cabal de les aigües superficials, es podria incrementar de manera significativa la disponibilitat d'aigua total (NRCR, 2012). Així doncs, és normal que en els últims anys els esforços s'hagin dirigit a una millora global dels processos de regeneració com a nova font d'aigua. Nogensmenys, la regeneració d'aigua té certs inconvenients, la majoria dels quals fan referència al risc per a la salut pública ja que l'aigua residual original és d'origen fecal i conté microorganismes patògens.

#### 1.1.4. Aigua regenerada i salut

El 1840, la taxa de mortalitat a la ciutat de Londres era tan alta i la situació sanitària tan precària, que l'esperança de vida mitjana era de 37 anys. El 1855, una carta de Michael Faraday (físic i químic anglès) al diari *The Times*, descrivia així l'estat de contaminació del riu *Thames*:

*"The whole of the river was an opaque pale brown fluid. [...] surely the river which flows for so many miles through London ought not to be allowed to become a fermenting sewer."*

i cap al 1858 el *Thames* s'havia convertit en una claveguera (vegeu figura 7).



**Figura 7.** Imatge presa al *Museum of London*. Foto original "Silent Highway Man" de John Leech, publicada a la revista *Punch* (35), el 10 de juliol de 1858, que feia referència a l'estat de contaminació del riu *Thames*, especialment durant l'onada de calor que es va patir aquell estiu.



El lamentable estat de contaminació del *Thames* va fer que des del 1830 al 1860, a Londres, desenes de milers de persones morissin de còlera. Tot i que s'intuïa que era la pol·lució extrema del riu la que feia emmalaltir i morir les persones, no va ser fins uns anys més tard (1862-1865) que Louis Pasteur va demostrar d'una banda, que la generació espontània no existia i de l'altra, que es podia relacionar els microorganismes ("gèrmens") amb la producció de malalties. Aquesta relació però, va ser estudiada i establerta cap al 1890, després que Robert Koch, amb l'ajut de Friedrich Loeffler formulés els avui tant coneguts "Postulats de Koch".

Tornant al s. XXI, avui es calcula que cada any hi ha 1,8 milions de morts infantils relacionades amb l'aigua i la falta de sanejament (UNDP, 2006) i que als països en vies de desenvolupament, el 70% de les aigües residuals (industrials i urbanes) s'aboquen a l'ambient sense tractar, contaminant molts subministraments d'aigua utilitzable (UN-Water, 2009). A nivell global, l'OMS estima que si es pogués disposar d'aigua segura, es podrien prevenir 1,4 milions de morts infantils cada any causades per diarrea.

A part de la presència de microorganismes d'origen fecal, a les aigües contaminades també hi ha riscos que provenen d'altres substàncies, com microcontaminants químics, l'origen dels quals pot ser tant d'aigües urbanes com de vessaments industrials o agrícoles i que poden ser perjudicials per a la salut de les persones. Aquest tipus de substàncies solen ser molt més difícils de detectar i d'eliminar que no pas els microorganismes, i els seus efectes sobre la salut no acostumen a ser immediats sinó que són a llarg termini, la qual cosa complica les mesures que s'han de prendre per a evitar danys a les persones. Alguns exemples d'aquestes substàncies són: productes farmacèutics, disruptors endocrins, pesticides, drogues, tints, desinfectants, tensioactius, additius de gasolines, i qualssevol dels seus productes de transformació. A l'apartat 1.3. d'aquesta introducció es parlarà de manera més extensa sobre aquest tipus de contaminants i sobre les tecnologies més adequades per al seu tractament.

En definitiva i a mode de resum, aquí hi ha algunes idees clau que defineixen el context en el que s'emmarca aquesta tesi doctoral:

- i.** L'aigua és necessària per a la vida en general i per al desenvolupament de persones i societats en particular.
- ii.** Globalment, podem considerar que l'aigua és un bé escàs.
- iii.** Les previsions, tant pel que fa a l'increment de la població com pel que fa al canvi climàtic, indiquen que la situació empitjorarà si no es comencen a aplicar mesures que ho evitin. En aquest sentit, una bona gestió de l'aigua als països desenvolupats és fonamental.
- iv.** La regeneració d'aigua residual urbana i la seva reutilització en usos que no requereixen de qualitat d'aigua potable, per exemple, per al reg de zones agrícoles, es perfila com una de les solucions a l'estrès hídric.
- v.** La regeneració, ha de ser un procés controlat, que ha de seguir la normativa vigent i que ha de poder garantir que l'aigua regenerada és segura (tant químicament com microbiològica) en termes de salut pública.

## 1.2. CAPÍTOL I: Riscos microbiològics lligats a la reutilització: el cas de *Cryptosporidium*

---

En aquest capítol farem un repàs dels riscos microbiològics que poden anar associats a la reutilització d'aigua residual regenerada centrant-nos en *Cryptosporidium* com a patògen de referència. A més a més, farem una breu revisió dels indicadors més estudiats pel que fa a la qualitat microbiològica de l'aigua regenerada i ens centrarem en aquells que s'han utilitzat en els articles publicats que formen part d'aquesta tesi.

### 1.2.1. Risc microbiològic de la reutilització: patògens i indicadors de qualitat

**Patògens.** Com ja s'ha comentat anteriorment, la contaminació de l'aigua pot tenir implicacions molt negatives, no només des del punt vista sanitari per a les persones sinó també pels impactes ambientals i econòmics. Pel que fa al risc sanitari, aquest es deu a presència de microorganismes patògens d'origen entèric a aigües superficials, recreatives, potables, regenerades, etc. Els principals agents causants de malalties infeccioses es poden classificar en 3 grans grups: bacteris, virus i paràsits (protozous o helmints).

**i. Bacteris.** Els bacteris són microorganismes procariotes ubics a la natura. Alguns són patògens intestinals, i si és així, estaran presents a les femtes dels individus afectats. Òbviament doncs, la presència de bacteris patògens d'origen fecal és molt comú en aigües residuals. Alguns dels més destacats són: *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* enteropatògena, *Campylobacter*, *Vibrio cholera*, *Yersinia* etc. Els tres primers han estat causants de brots de transmissió hídrica associats a aigua potable en nombroses ocasions. En una aigua residual, tant la concentració com el tipus de bacteris patògens que hi haurà, vindran determinats, en gran part, per l'estat sanitari de la població.

**ii. Virus.** Els virus són paràsits intracel·lulars obligats que només es poden multiplicar dins la cèl·lula hoste. Els virus entèrics es multipliquen al tracte intestinal i són alliberats a l'ambient a través de les femtes. La persistència d'aquests virus en aigua residual pot variar molt en funció del tipus de virus. Dels virus entèrics, els Enterovirus, els Rotavirus, i els Adenovirus entèrics s'han aïllat d'aigües residuals, i Norovirus i Rotavirus s'han descrit com a causants de grans brots associats a aigua. Tot i així, s'han detectat molts altres virus en aigües residuals i les infeccions que poden produir solen causar una àmplia diversitat de símptomes que poden anar des de gastroenteritis fins a malalties del sistema nerviós central passant per malalties cardiovasculars o respiratòries.

**ii. Protozous paràsits o helmints.** Els paràsits no poden multiplicar a l'ambient i necessiten un hoste per reproduir-se. Es tracta de microorganismes eucariotes molt senzills, majoritàriament unicel·lulars. Com en la resta de casos, els que produeixen malalties gastrointestinals són excretats per les femtes. En aquest punt del seu cicle vital solen estar formant espores, cists, oocists, o ous: totes elles són formes de resistència que romandran a l'ambient fins a poder infectar un nou hoste, permetent així que es tanqui el seu cicle vital. Dins d'aquest grup hi ha gèneres com *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora* i *Toxoplasma*. En els últims anys, els dos primers

de la llista han guanyat protagonisme, ja que han causat nombrosos brots d'origen hídric o alimentari. A l'apartat 1.2.2. d'aquesta introducció parlarem amb més detall sobre *Cryptosporidium* com a patògen a l'aigua. Les amebes, també formen part dels protozous patògens i dins d'aquest grup en podem destacar alguns gèneres com *Entamoeba*, *Acanthamoeba* o *Naegleria*, que poden causar malalties molt importants, però que afortunadament són poc freqüents en la nostra àrea.

L'objectiu del tractament de les aigües residuals, és el de reduir significativament les concentracions de patògens per no contaminar l'ambient receptor. Si el que es pretén és obtenir aigua regenerada, les concentracions de patògens s'han de reduir prou com per assolir la qualitat requerida per a l'ús que se li vulgui donar. Els criteris de qualitat vénen donats per la normativa vigent aplicable en cada país, en aquest cas, pel RD 1620/2007. En qualsevol cas, hi ha dues estratègies, l'una, és la separació física dels bacteris, virus o protozous i l'altra, la seva inactivació amb desinfectants o altres processos químics. La combinació d'ambdues, també és molt comú. Sigui quina sigui l'opció escollida, el resultat serà la disminució de la concentració de microorganismes infecciosos a l'efluent final.

Amb sistemes convencionals de sedimentació, decantació i filtració s'aconsegueix una bona reducció dels nivells de bacteris, protozous i d'helmints. Aquesta reducció sol ser més evident en protozous i helmints ja que per qüestions de mida (són molt més grans) són més fàcils de separar. Les concentracions de virus també disminueixen amb processos de sedimentació o filtració, però degut a que la seva mida és molt petita, l'eficiència d'aquests sol ser força baixa. Part de la reducció dels nivells de virus es deu a l'agregació d'aquests a les partícules i sòlids en suspensió de l'aigua. Així, quan se separen aquests sòlids també se separen els virus. D'altra banda, pel que fa a la desinfecció, els resultats poden variar molt en funció del tipus de desinfecció i del microorganisme que es tracti. L'ús de la cloració és un dels més utilitzats per a la desinfecció d'aigua. Per exemple, la majoria de virus tenen tendència a ser força sensibles al clor, en canvi, protozous com *Cryptosporidium* s'hi mostren molt resistents (Betancourt i Rose, 2004). Altres tractaments però, tenen l'efecte contrari: molts virus es mostren més resistents a l'aplicació de llum UV que no pas *Cryptosporidium*, que n'és molt sensible.

Tot i així, avui en dia la detecció de patògens a l'aigua encara suposa un problema, sobretot si és aigua tractada, ja que en aquest cas les concentracions són baixes, i per tant, els mètodes de detecció són llargs, tediosos, amb molts passos intermedis que en fan disminuir l'eficiència i econòmicament poc atractius. Tot aquest seguit d'inconvenients fan que la detecció de patògens no es pugui fer de manera rutinària a les EDAR o ETAP.

**Microorganismes indicadors.** L'ús de microorganismes indicadors de la qualitat microbiològica de l'aigua s'ha fet servir amb gran èxit des de fa més de 100 anys. El 1885 Theodor Escherich, pediatra alemany, va descriure un bacteri que es trobava en les femtes de nadons sans. Escherich el va anomenar a *Bacillus coli commune*, que més endavant es va acabar anomenant *Escherichia coli* en honor al metge. El 1891 Percy i Grace Frankland, després d'haver-se passat uns anys analitzat les aigües a Londres de manera rutinària, van

arribar a la conclusió que hi havia alguns microorganismes que eren característics de les aigües residuals, és a dir, aigües contaminades amb matèria fecal. Així, aquests microorganismes es podien utilitzar com a evidència d'aigües potencialment perilloses ja que s'havia observat que les aigües contaminades amb matèria fecal portaven malalties. Amb la caracterització d'aquests microorganismes es va anar definint el concepte de coliform i més endavant es definirien les característiques metabòliques tant dels coliforms totals com del subgrup dels coliforms fecals. Cal remarcar que avui en dia la detecció de coliforms fecals és un dels paràmetres més utilitzats en normatives de qualitat microbiològica de l'aigua arreu del món. Aquests, estan presents de manera natural en femtes d'animals de sang calenta a concentracions molt més elevades que no pas els patògens, són fàcilment detectables i mostren una correlació positiva amb la contaminació fecal. A més a més, solen mostrar un comportament similar als bacteris patògens davant d'un tractament determinat. Avui en dia, ja que el concepte de microorganisme d'indicador de la qualitat és molt ampli, se suggereix que se'n podria classificar els següents tipus (WHO, 2001):

- i.** **Microorganismes indicadors de contaminació fecal.** Indiquen que l'aigua ha estat contaminada amb matèria fecal i per tant, que hi podria haver patògens.
- ii.** **Microorganismes indicadors de procés.** És aquell grup de microorganismes que permet valorar l'eficàcia d'un procés, per exemple la cloració, per saber si aquest és prou efectiu.
- iii.** **Microorganismes model.** Poden tenir funció índex o indicadora. La funció índex fa referència a la presència del patogen, és a dir, la presència del microorganisme indicador implicaria la presència del microorganisme patogen. La funció indicadora fa referència al comportament davant d'un tractament, és a dir, que l'indicador es comporta de la mateixa manera que el patogen al que representa.

Al llarg del temps s'han descrit alguns dels criteris que definirien un bon indicador. Aquests criteris, tot i que representen les funcions que hauria de complir un microorganisme model amb funció índex i indicadora alhora, han estat acceptats per la comunitat científica i s'utilitzen sovint:

- i.** L'indicador ha d'estar a l'aigua quan el patogen al que representa també hi és, i no hi ha de ser, quan l'aigua no està contaminada.
- ii.** L'indicador no ha de multiplicar a l'ambient.
- iii.** L'indicador ha d'estar en concentracions més altes que el patogen.
- iv.** L'indicador ha de respondre de manera similar al patogen davant de les condicions ambientals que es puguin donar de manera natural a l'aigua.
- v.** L'indicador ha de ser fàcil d'aïllar identificar i comptar.
- vi.** L'anàlisi de l'indicador no ha de ser car, permetent així la presa de múltiples mostres.
- vii.** L'indicador no hauria de ser un patogen per així minimitzar el risc per a l'analitzador.

En termes generals, alguns dels indicadors clàssics més utilitzats són els coliforms fecals, *E. coli*, enterococs, espècies del gènere *Bifidobacterium* spp., *Rhodococcus coprophilus*, etc. Alguns d'aquests, a més a més, tenen la peculiaritat que es poden utilitzar per a *microbial source tracking* (MST), terme que fa referència a la traçabilitat de l'origen de la contaminació. Tot i la gran importància d'aquests indicadors bacterians al llarg de la història així com actualment, amb el temps han anat sorgint alguns dubtes sobre la seva eficiència per a la protecció davant de malalties causades per virus o protozoous. Arran d'aquests dubtes, s'ha anat aprofundint en la recerca d'indicadors alternatius com per exemple els bacteriòfags com a indicadors vírics (IAWPRC study group, 1991; Lucena i Jofre, 2010) o les espores de clostridis reductors del sulfit (SRC) (Payment i Franco, 1993; Wu et al., 2011). Aquests últims vans ser descrits com a possibles indicadors molt al principi del s. XX, i pel que fa als bacteriòfags, no va ser fins al 1930 que es van començar a fer servir com a indicadors. Tant bacteriòfags com SRC han estat inclosos en normatives de qualitat (USEPA, 2006; State of Queensland EPA, 2005). Tot seguit n'explicarem algunes de les característiques més importants.

**BACTERIÒFAGS.** Els bacteriòfags són virus de bacteris que s'han utilitzat com a microorganismes model de virus entèrics humans en aigües. Quan fem referència al seu ús com a indicadors de qualitat de l'aigua, en podem destacar 3 grups: colifags somàtics (SOMCPH), colifags RNA F-específics (FRNAPH) i fags que infecten *Bacteroides fragilis*. Els dos primers estan presents en femtes d'animals homeotermes (humans i no humans) i la seva suma dóna una idea del recompte de colifags totals. De fet, també s'han descrit soques bacterianes com ara la CB390 (Guzmán et al., 2008) o la *E. coli* C-3000 (ATCC 15597), que poden detectar de manera simultània SOMCPH i FRNAPH.

- i. **SOMCPH.** Aquest tipus de fags infecten cèl·lules d'*E. coli* mitjançant el reconeixement de receptors de membrana. La metodologia per a la seva detecció està ben estandarditzada i establerta (ISO 10705-2:2000) i si és necessari, permet obtenir resultats en unes 4h.
- ii. **FRNAPH.** Infecten bacteris a través del pili sexual, que està codificat en el plasmidi F. Com que el plasmidi F és fàcilment transferible, aquest tipus de fag pot infectar un gran nombre de bacteris gram-negatius. De la mateixa manera que amb els SOMCPH, la metodologia de detecció està estandarditzada i establerta (ISO 10705-1:1995).
- iii. **Fags que infecten *Bacteroides fragilis*.** ISO 10705-4:2001. En aquest cas també infecten la cèl·lula a través de la paret cel·lular. Un dels requeriments per a la detecció d'aquests fags és que s'ha de fer en condicions d'anaerobiosi. A més a més, alguns d'aquests fags són específics d'humans i d'altres específics d'animals, de manera que s'utilitzen per a MST ja que permeten discriminar l'origen de la contaminació fecal.

Fags que pertanyen a tots tres grups s'han utilitzat recurrentment per avaluar la resistència a condicions ambientals i a processos de desinfecció. De fet, disposar de diferents tipus de bacteriòfags és avantatjós ja que cada tipus de fag pot comportar-se de manera diferent davant l'aplicació d'un mateix tractament.

**ESPORES DE CLOSTRIDIS REDUCTORS DEL SULFIT.** Són microorganismes gram-positius, formadors d'espores, anaerobis estrictes i amb la capacitat de reduir el sulfat a sulfhídric ( $H_2S$ ). Dins d'aquest grup, la detecció de *Clostridium perfringens* s'ha considerat la més adequada, ja que no tots els SRC que hi ha a l'aigua són indicadors de contaminació fecal (Bonde, 1963). Un gran nombre d'estudis han utilitzat bacteris formadors d'espores, com els SRC, com a indicadors de *Cryptosporidium* per tal de valorar l'eficiència de tractaments de depuració, regeneració i potabilització (Harwood et al., 2005; Mandilara et al., 2006; Costán-Longares et al., 2008). De fet, en el RD 140/2003 del 7 de febrer, pel que s'estableixen els criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua de consum humà, s'esmenta que si en algun cas, l'anàlisi de *Clostridium perfringens* és positiu i la torbesa és  $> 5$  NTU, és recomanable fer l'anàlisi de *Cryptosporidium*.

### 1.2.2. *Cryptosporidium* com a patògen de referència

*Cryptosporidium* és un protozou del fílum *Apicomplexa*, paràsit intracel·lular, que causa un tipus de gastroenteritis anomenada criptosporidiosi. Va ser descrit per primera vegada l'any 1907 per Ernest Edward Tyzzer, tot i que no va ser fins molts anys més tard, el 1976, que es va considerar com a patògen humà (Nime et al., 1976; Meisel et al., 1976).

La característica més important de *Cryptosporidium* és que una de les formes en què es presenta durant el seu cicle vital és la d'ooquist (vegeu figura 8). Els oocists, són extraordinàriament resistents tant a les condicions ambientals com a la majoria de tractaments de depuració que s'apliquen avui en dia. Els oocists tenen forma esfèrica, fan de 4 a 6  $\mu m$  de diàmetre i contenen 4 esporozoïts. Tot el cicle vital té lloc dins l'hoste, i els oocists s'alliberen a l'ambient a través de les femtes mentre dura la infecció. La dosi infecciosa és molt baixa, cosa que facilita la infecció i la seva transmissió.

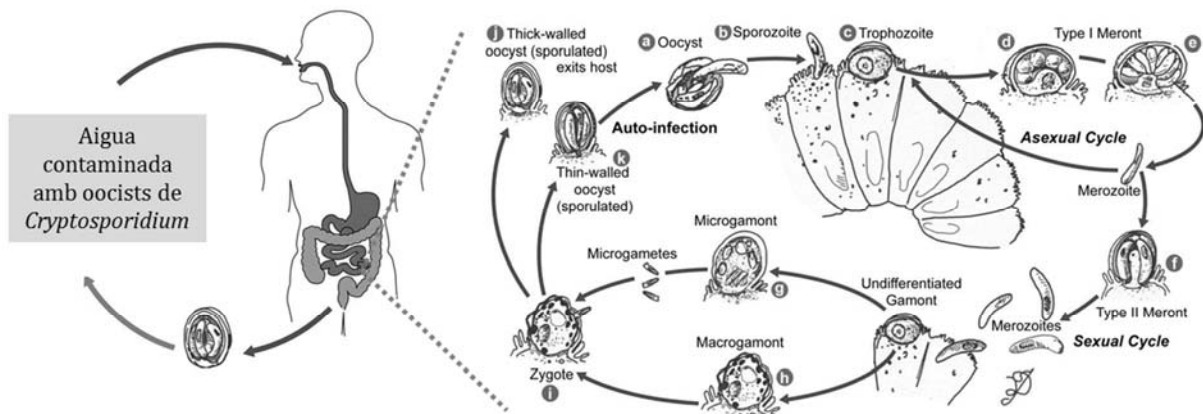


Figura 8. Esquema de la ruta d'infecció i cicle vital de *Cryptosporidium*.

Hi ha més de 20 espècies descrites que varien en funció de l'hoste al que infecten. Les espècies específiques d'humans són *C. hominis* i *C. parvum*. Tot i així, s'han descrit molts casos en què altres espècies han infectat humans. Aquest, és un fet comú quan es tracta de persones immunodeprimides com canalla, persones grans, persones amb SIDA o persones que reben quimioteràpia. Hi ha altres espècies que poden infectar mamífers com, *C. muris* (sol infectar rosegadors), *C. felis* (infecta felins), *C. canis* (infecta canins), *C. andersoni* (infecta ramat boví), etc. També s'han descrit espècies que infecten rèptils com *C. serpentis*, amfibis (*C. fragile*), o aus, com *C. galli*, *C. meleagridis* i *C. baileyi*.

**Criptosporidiosi.** La criptosporidiosi se sol manifestar de 2 a 10 dies després de la infecció. En persones immunocompetents és autolimitant i té una durada que pot anar de pocs dies a dues setmanes a tot estirar. La simptomatologia, en general, és una diarrea aquosa, sense sang i amb dolor abdominal durant la qual s'excreten a l'ambient de  $10^5$  a  $10^8$  oocists de *Cryptosporidium* per gram de femtes. La deshidratació severa és un dels símptomes més greus de la infecció. Pel que fa a les persones immunodeprimides, la criptosporidiosi es pot convertir en una malaltia crònica i recurrent, es pot estendre a altres teixits més enllà de l'intestí prim (p. ex. vesícula biliar), i pot presentar una simptomatologia molt més severa fins a arribar a causar la mort. Actualment no hi ha cap tractament efectiu contra la malaltia, degut en part, a la falta de comprensió dels mecanismes immunopatogènics de la infecció en humans (Kothavade et al., 2011). Tot i així, en alguns casos es pot administrar algun agent antiparasitari com la nitazoxanida, que als EEUU ha estat aprovat per la FDA com a tractament per la criptosporidiosi, o altres medicaments que puguin estimular el sistema immunitari. El diagnòstic clínic se sol fer amb una anàlisi de les femtes de la persona infectada. També se sap que hi ha portadors asimptomàtics que tot i trobar-se bé, excreten oocists a l'ambient a través de les seves femtes (DWI, 2006).

La malaltia es transmet a través dels oocists de *Cryptosporidium* per contacte entre persones, entre animals i persones i a través del consum d'aliments i aigua contaminats. Tot i que la transmissió persona-persona és la més important, sobretot si es tracta de criatures, la transmissió hídrica és la més comuna i probablement la més coneguda, ja que ens els últims 20 anys s'han donat desenes de casos de brots de criptosporidiosi associats a aigua arreu del món. El més important és el que es va donar a Milwaukee, EEUU, el 1993 (Mc Kenzie et al., 1994) i ha significat un punt d'inflexió pel que fa totes les normatives d'aigua dels EEUU i al coneixement de *Cryptosporidium* i la criptosporidiosi en aquest país i de retruc, a tot arreu. Es considera el brot més gran de transmissió hídrica d'una malaltia infecciosa en la història dels EEUU: hi va haver més de 400.000 afectats i se li atribueixen més de 100 morts; a més a més, al cap dels anys es va veure que la taxa de mortalitat de persones amb SIDA era significativament més alta en aquelles que havien estat afectades pel brot. El brot es va originar perquè d'una banda, hi va haver una contaminació de les aigües superficials (font d'aigua potable) i de l'altra, perquè una de les plantes potabilitzadores, que abastia unes 800.000 persones, va fallar. Arran de l'esmentat brot, les normatives de qualitat de les aigües així com els controls de qualitat al llarg de sistemes de potabilització han anat augmentant.

**Epidemiologia.** L'avanç en tècniques moleculars (PCR, RFLP, seqüenciació, etc.) ha suposat una millora significativa pel que fa als estudis epidemiològics i a la comprensió de la transmissió dels oocists de *Cryptosporidium*. Així, avui en dia se sap que de les famílies de *C. hominis* (Ia, Ib, Id, Ie If i Ig), la més comuna és la Ib (Pangasa et al., 2010) i que el tipus IbA10G2R2 és el causant de la majoria de criptosporidiosis transmeses a través de l'aigua en països industrialitzats (Iqbal et al, 2012).

*Cryptosporidium* s'ha trobat a molts països de tots els continents excepte a l'Antàrtida (Fayer i Xiao, 1997), i la criptosporidiosi s'ha descrit a països desenvolupats i en vies de desenvolupament, tant en zones rurals com urbanes i en climes temperats i tropicals. A més a més, s'han detectat oocists en aigües superficials, aigües subterrànies, sòls, aliments i begudes.

*Cryptosporidium* és el tercer patogen dels quatre més identificats habitualment al món, i s'ha observat que les taxes d'infecció són més altes en països en vies de desenvolupament. S'han fet centenars d'estudis epidemiològics i pel que fa a la seva prevalença en humans, els resultats poden variar del 0 al 100% (Hunter, 2002). Aquesta variabilitat no és tan estranya com podria semblar si es tenen en compte tots els factors que hi intervenen, entre els quals podem destacar:

- i. **El país.** Principalment pel que fa a l'estat sanitari de la població, que sol anar lligat al nivell de desenvolupament d'aquest.
- ii. **Zona rural o urbana.** La majoria d'estudis demostren que com més proper s'està a àrees rurals, més fàcil és que es doni el contacte amb *Cryptosporidium* (degut a activitats ramaderes, etc.) (Ramírez et al, 2004).
- iii. **Metodologia de detecció.** Els resultats obtinguts poden variar molt en funció de si es tracta d'una anàlisi de seroprevalença o si es tracta de l'anàlisi en femtes. Dins d'aquests dos grans grups, també s'utilitzen tècniques molt variades, que en cas de detecció en femtes, per exemple, poden anar de la detecció per mètodes moleculars a la detecció microscòpica.
- iv. **Variació estacional.** En moltes ocasions s'han descrit patrons estacionals pel que fa a la presència de *Cryptosporidium* que han anat associats al número de casos de criptosporidiosi. Alhora, l'estacionalitat pot anar lligada a un clima determinat o a una zona geogràfica concreta.
- v. **Franja d'edat.** Generalment, els infants són més susceptibles a patir la malaltia i les prevalences solen ser més altes en nens d'1 a 4 anys que no pas en adults.
- vi. **Salut.** L'estat immunitari de les persones és un dels punts clau pel que fa a la prevalença de *Cryptosporidium*. En alguns grups d'estudi concrets s'han descrit prevalences del 100% en pacients amb VIH/SIDA.

A grans trets però, s'estima que la prevalença a Europa i Nord-Amèrica és d'un 1 a un 4%; i a l'Àfrica, l'Àsia, Austràlia i centre i Sud-Amèrica d'un 3 a un 20%. D'altra banda, la franja d'edat dels nens menors de 5 anys té una prevalença força més alta en països industrialitzats. Mentre que en països en vies de desenvolupament la franja d'edat



s'estreny a nens de 0 a 1 any i és estranya en adults. Finalment, el percentatge de portadors asimptomàtics, per presència d'oocists en femtes, es calcula que és < 1% en països industrialitzats i d'un 10 a un 30% en països no industrialitzats. Aquests percentatges incrementen considerablement quan es tracta de seroprevalença. A Espanya s'han fet alguns estudis en què s'ha determinat que la prevalença de *Cryptosporidium* pot anar del 0,4 al 12,8% (Compañ-Barco et al., 1991) o de l'1 al 3,1% (Cardona et al., 2011).

En definitiva, *Cryptosporidium* és un dels microorganismes que més costa d'eliminar durant el tractament de l'aigua; ha estat capaç de superar les múltiples barreres que formen part del tractament de l'aigua en nombroses ocasions; és un dels que ha provocat més brots d'origen hídric; és altament resistent al les condicions ambientals i a molts processos de desinfecció i finalment l'efecte de la infecció sobre la salut de les persones pot ser moderat o fins i tot sever en alguns casos. De tot això se'n desprèn que la seva absència en un efluent final és indicadora de que els tractaments han funcionat correctament i que s'ha assolit una determinada qualitat (WHO, 2009), i és precisament per això que es considera un patògen de referència.

### 1.2.3. *Quantitative microbial risk assessment (QMRA)*

La presència d'oocists de *Cryptosporidium*, així com de molts altres patògens en aigües regenerades i recreatives ha estat ben descrita (Gennacaro et al., 2003; Polgreen et al., 2012). Així doncs, és clar que l'ús de l'aigua regenerada podria ser un perill per a la salut de les persones per la presència de patògens d'origen entèric. Les valoracions quantitatives de risc microbiològic (QMRA) són una eina que s'ha utilitzat de manera creixent en els últims anys per a fer aproximacions d'aquest risc en escenaris de reutilització concrets (Ryu et al., 2007; Page et al., 2010; Rodríguez-Manzano et al., 2012).

A grans trets, el QMRA és el procés que es fa servir per fer una estimació del risc d'infecció d'un microorganisme determinat mitjançant dades sobre la seva distribució a l'aigua, models dosi-resposta, coneixent vies d'exposició, etc. Així, alhora de fer QMRA s'ha de tenir en compte la probabilitat d'exposició al patògen i l'efecte sobre la salut que tindria si es donés l'exposició.

Les primeres aproximacions al QMRA es van desenvolupar per avaluar la seguretat de l'aigua potable i avui en dia són un punt clau en la gestió de l'aigua. En aquest sentit es considera que el QMRA ajuda a la gestió del risc ja que:

- i. En base a la informació científica disponible, proporciona una idea del nivell de seguretat de l'aigua.
- ii. Ajuda a la comprensió tant de les vies com de les barreres que estan involucrades en la transmissió de patògens alhora que fa paleses les debilitats del sistema.

Les etapes per al desenvolupament d'un estudi de QMRA són: **(1) Identificació del perill i formulació del problema; (2) valoració de l'exposició; (3) avaluació de l'efecte mitjançant la relació dosi-resposta i (4) caracterització del risc.** Tot seguit

s'expliquen amb més detall cadascuna d'aquestes etapes en el context de la possible presència de *Cryptosporidium* en aigua regenerada.

### (1) Identificació del perill i formulació del problema

En el context en el que estem emmarcats, la identificació del perill seria la presència d'oocists de *Cryptosporidium* a l'aigua regenerada i la definició del problema fa referència a la concreció de en quina situació es pot donar aquest perill, per exemple, en una planta de tractament determinada on es té informació sobre les concentracions de *Cryptosporidium*, de l'eficiència dels tractaments aplicats, i de possibles avaries en el tractament que podrien significar un perill.

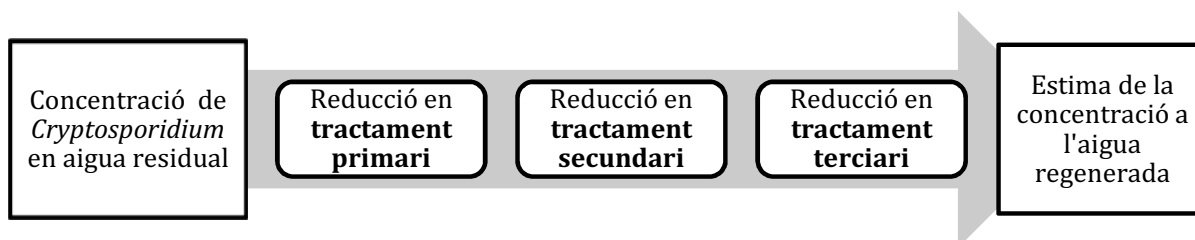
### (2) Valoració de l'exposició

Aquesta etapa serveix per a definir les possibles vies d'exposició i per a caracteritzar-les. En el nostre cas, la via d'exposició seria el contacte (ingestió) d'aigua regenerada i per tant, l'exposició dels humans a *Cryptosporidium* està condicionada principalment per dos factors: (i) la concentració d'oocists (infecciosos) de *Cryptosporidium* i (ii) el volum d'aigua al que estaríem exposats en cas que es donés un esdeveniment perillós (vegeu equació 1), com podria ser la ingestió accidental o la ingestió d'aliments que han estat regats amb aigua regenerada, etc.

$$P = C \times V \quad (1)$$

On  $P$  és la probabilitat de l'exposició,  $C$  és la concentració d'oocists infecciosos i  $V$  és el volum (WHO, 2009). L'exposició vindria a ser la dosi, és a dir, la quantitat d'oocists, que podria ingerir una persona en el nostre escenari.

Aquesta és la versió més senzilla de l'estimació de l'exposició, però a l'hora de fer el càlcul, també s'ha de tenir en compte la freqüència en què es pot donar l'esdeveniment perillós, que pot ser puntual, o múltiple al llarg d'un any.



**Figura 9:** Esquema d'una possible determinació de la concentració d'oocists de manera indirecta, en aquest cas utilitzant les reduccions de cadascun dels tractaments aplicats

D'altra banda, la determinació de la concentració d'oocists es pot fer de manera directa, és a dir, utilitzant valors reals de la concentració d'oocists en l'aigua

regenerada o de manera indirecta: (i) utilitzant valors de *Cryptosporidium* en aigua residual crua i mitjançant les dades d'eficiència dels diferents tractaments, fer una estimació de la concentració a l'aigua regenerada (vegeu figura 9), o també (ii) utilitzant dades d'indicadors en comptes de dades de *Cryptosporidium*.

Sigui com sigui, les concentracions de *Cryptosporidium* vindran determinades en gran part per la metodologia de detecció que s'utilitzi. El mètode 1623 (USEPA, 2005) o la ISO 15553:2006 són dels més utilitzats per a la determinació d'aquest patògen en mostres ambientals. Tot i així, com ja s'ha comentat abans, les concentracions de *Cryptosporidium* en aigua no són elevades, de manera que els protocols acaben essent molt llargs i amb etapes intermèdies. Això fa que els mètodes de detecció tinguin percentatges de recuperació força baixos, és a dir, que al final del procés de detecció estarem infravalorant la concentració real d'oocists a l'aigua. És obvi doncs, que per a l'estimació de la concentració final en un assaig de QMRA s'ha de tenir en compte el factor "percentatge de recuperació del mètode".

Un altre factor que no es pot eludir en aquest càlcul, és la "viabilitat o infectivitat dels oocists", ja que la sola presència de *Cryptosporidium* no implica un perill si aquests oocists no són infecciosos. Durant molts anys, aquests dos termes es van fer servir indistintament per indicar si els oocists eren capaços de produir una infecció. Avui en dia però, la viabilitat s'entén com la integritat de la membrana externa dels oocists, que generalment s'estableix mitjançant la tinció amb colorants vitals i l'observació al microscopi de la seva morfologia. Així, un oocist serà viable si la seva membrana externa està intacta i si conté els 4 esporozoïts en el seu interior. No obstant això, podria passar que un oocist fos viable, però que per algun motiu no fos capaç de produir una infecció. És per això que existeixen mètodes de determinació de la infectivitat, que es basen fonamentalment en la capacitat d'infecció en cultiu cel·lular (Slifko et al., 1997) o en models animals. És molt important explicar bé aquests dos conceptes ja que alguns tractaments com la llum UV, molt utilitzat com a tractament terciari i també durant la potabilització, poden afectar a la capacitat d'infecció dels oocists, però mantenir-ne intacta la viabilitat. D'altra banda, les tècniques moleculars avancen a un gran ritme i ja existeixen algunes aproximacions que permeten tenir dades sobre la viabilitat dels oocists com per exemple l'RTqPCR d'mRNA o la PMA-qPCR (Brescia et al., 2009; Liang i Keeley, 2012).

Per últim, també és important tenir en compte el factor "especificitat genètica" dels oocists detectats, ja que no totes les espècies de *Cryptosporidium* són capaces d'infectar persones sanes. Així, si una aigua conté *C. hominis*, *C. parvum* o fins i tot *C. meleagridis* (WHO 2009; Chappell et al., 2011) la situació és més perillosa que no pas si conté espècies que no infecten persones. A més a més, el genotipatge de les espècies circulants proporciona informació molt interessant des del punt de vista epidemiològic.

Hi ha altres factors, com la probabilitat de malaltia donada la infecció que també s'han de valorar quan es fa QMRA. Si es disposa de dades referenciades que s'adapten

al nostre estudi, aquests valors també es poden tenir en compte. Tot i així, una estratègia molt utilitzada és la de definir un escenari conservador, de manera que es considera que tots els individus que desenvoluparan la infecció també desenvoluparan la malaltia.

### (3) Avaluació de l'efecte: Relació dosi-resposta

En aquest punt del QMRA el que es pretén és arribar a saber quins efectes tindrà sobre la salut d'una població determinada, el contacte (a través d'una via concreta) amb una dosi definida del patogen. En definitiva, es tracta de construir models matemàtics que representin el comportament de la població pel que fa a emmalaltir a causa de la infecció. Els models dosi-resposta solen provenir de l'anàlisi de dades d'una població infectada durant un brot real de la malaltia o d'assajos clínics amb voluntaris als quals s'ha subministrat una concentració coneguda del patogen.

Per tant, s'ha de tenir en compte per exemple, la variabilitat tant pel que fa a l'hoste com pel que fa al patogen. Així, les persones es poden mostrar més o menys susceptibles a patir la malaltia per predisposició genètica, per resistència adquirida (per exposicions prèvies), o per circumstàncies específiques en l'estil de vida etc.

L'efecte final sobre la salut serà sempre la combinació de tots aquests factors.

Fins al moment, s'han descrit dos tipus de models dosi-resposta per a *Cryptosporidium*: el model Exponencial (equació 2) i el model  $\beta$ -Poisson (equació 3):

$$PI = e^{(-r \times D)} \quad (2)$$

On  $PI$  és la probabilitat d'infecció,  $D$  és la dosi de patogen i  $r$  és una constant que representa la probabilitat que un sol oocist de *Cryptosporidium* sobrevisqui a les barreres de defensa de l'hoste (sistema immunitari, pH estomacal, moviments peristàltics, etc.). Aquesta constant és específica del patogen i pot presentar certa variabilitat en funció de com s'hagi calculat. Diferents autors han donat diferents valors d' $r$  en els seus estudis.

Molts autors, però, consideren aquest model massa simple, ja que la interacció hoste-patogen és massa complexa per si sola com perquè sigui definida tan sols amb un paràmetre ( $r$ ). El model  $\beta$ -Poisson té en compte la variabilitat que hi pot haver en la infectivitat d'un oocist i també la variabilitat de l'hoste pel que fa a la susceptibilitat davant de la infecció.

$$PI \approx 1 - \left(1 + \frac{D}{\beta}\right)^{-\alpha} \quad (3)$$

En aquest cas, se li dóna a l'anteriorment esmentat paràmetre  $r$  una distribució  $\beta$  per tenir en compte l'heterogeneïtat en les interaccions hoste patogen. La versió

simple d'aquest model és l'equació 3. Els paràmetres  $\alpha$  i  $\beta$  són constants que vénen determinades per qui fa el model.

Tot i que teòricament aquest model és més precís, només es aconsellable quan  $\alpha \ll \beta$  i  $\beta \gg 1$  (WHO 2009). D'altra banda, s'ha descrit que en alguns casos l'ús d'aquest model pot portar a una gran sobreestimació del risc a dosis baixes del patogen (Teunis i Havelaar, 2000).

#### (4) Caracterització del risc

La caracterització del risc vindria a ser la integració conceptual de la probabilitat de l'exposició i l'efecte sobre la salut de la població, expressada en una probabilitat d'infecció o de malaltia en funció de com es dugui a terme l'anàlisi. Aquest concepte també inclou la discussió sobre si el risc que s'ha calculat (PI), és o no és acceptable per a la població.

La caracterització del risc pot ser puntual o mitjançant distribucions probabilístiques. Si és puntual, estem fent una estimació de la probabilitat d'infecció amb un valor concret d'un paràmetre determinat. Per exemple, per definir la concentració d'oocists, agafem el valor corresponent a la mitjana d'oocists en aquella aigua (1 oocist/L); o per definir el volum ingerit, agafem el volum mitjà pres en cas d'ingestió accidental d'aigua regenerada (0,1L). En canvi, si volem fer una aproximació probabilística, el que fem és definir una funció de distribució de probabilitat (PDF) pel paràmetre que vulguem tenir en compte. L'ús d'una PDF en comptes d'un valor puntual (com la mitjana) per definir un paràmetre (volum o concentració d'oocists), és una aproximació molt més acurada i molt més real del risc.

Per fer aquest tipus d'anàlisis existeixen programaris especialitzats amb interfícies intuïtives i millorades que faciliten el procés de càlcul de les probabilitats d'infecció. Aquest tipus de programari sol utilitzar simulacions de Monte Carlo per calcular la probabilitat d'infecció resultant de la nostra anàlisi. Les simulacions de Monte Carlo són una tècnica matemàtica que es basa en què pren valors a l'atzar dels paràmetres que se li defineixen per al càlcul del risc. A més a més, aquests programes permeten fer iteracions; fer-ne unes 10000 per simulació, és una de les opcions més utilitzades.

Per exemple, pel que fa al volum ingerit, podem definir (amb dades obtingudes experimentalment o usant referències) una PDF triangular amb un número més probable de 125 mL; un mínim de 5 mL i un màxim de 200 mL (vegeu figura 10).

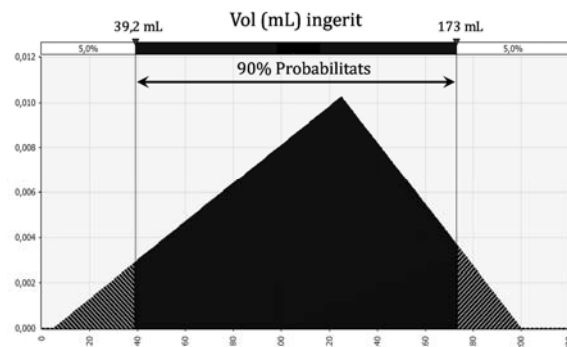
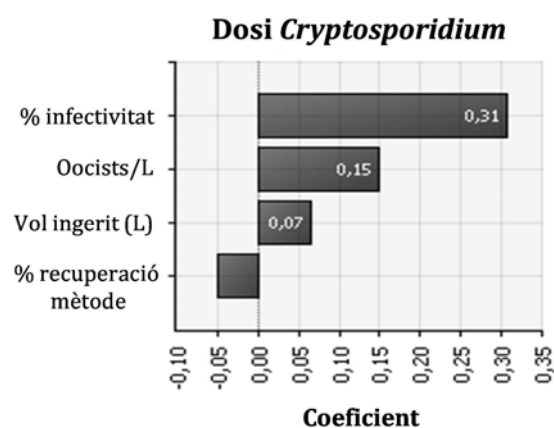


Figura 10: PDF triangular del volum.

Si seguim amb l'exemple del volum, durant una simulació de Monte Carlo, el programa prendria valors d'entre 0 i 200 (establerts com a mínim i màxim de la PDF). I seguint la PDF que hem definit per al volum, el 90% de les vegades prendria valors molt propers als 125 mL, aproximadament entre 40 i 170 mL (vegeu figura 10).

Finalment, el programa dóna com a resposta una caracterització de la PI que inclou, entre d'altres, una PDF de la PI (resultat), el valor mitjà, percentils, i gràfics de sensibilitat. Aquests últims ajuden a interpretar els resultats obtinguts ja que faciliten la comprensió de quins són els paràmetres més importants per al càlcul de la PI (vegeu figura 11).

**Figura 11.** Exemple d'un gràfic de sensibilitat per al càlcul de la dosi d'ocists de *Cryptosporidium*. En aquest cas, el % d'infectivitat seria el paràmetre amb més pes en el càlcul de la PI de *Cryptosporidium*.



**Acceptabilitat del risc.** Al final del procés, tindrem un valor entre 0 i 1 que ens indicarà, en el nostre escenari d'exemple, la probabilitat de patir una infecció de *Cryptosporidium* deguda a la ingestió d'aigua regenerada. Un cop obtingut aquest valor, és el moment de valorar si aquesta PI és o no és acceptable, sense oblidar en cap moment que el risc zero no existeix.

Qui decideix si una PI és acceptable o tolerable? Com es decideix? Aquestes preguntes no tenen una resposta fàcil ja que hi ha molts factors a tenir en compte quan s'està valorant l'acceptabilitat d'un risc. Segons l'OMS (2001) aquest concepte és diferent en funció del punt de vista amb què s'analitzi (social, econòmic, científic). Així doncs, un risc es pot considerar acceptable si alguna d'aquestes condicions es compleix:

- i. Està per sota d'una PI definida arbitràriament.
- ii. Està per sota d'un nivell que, de fet, ja s'està tolerant.
- iii. El cost de reduir aquest risc està per sobre del cost que estalvia.
- iv. Els professionals del sector diuen que ho és.
- v. La societat percep que sí que ho és (o més aviat, no diu que no ho és).
- vi. Els polítics diuen que és acceptable.

A més a més, aquests factors interaccionen entre ells, de manera que la decisió final haurà d'intentar complir com més d'aquestes condicions millor.

Pel que fa a l'aigua potable, la USEPA i l'OMS, consideren que el llindar de l'acceptabilitat és d'1 infecció per cada 10.000 habitants ( $1 \times 10^{-4}$ ) per any (Macler i Regli, 1993). D'altra banda, les conseqüències d'una infecció poden ser molt diferents i el greuge que aquesta provoqui (*burden of disease*), es pot intentar mesurar tenint en compte conceptes com les seqüeles a llarg termini, severitat de la infecció, taxa de mortalitat, etc. En aquest sentit, es considera que la mesura de DALYs (*disabled adjusted live years*) és una mesura més precisa del risc (AAM, 2006), ja que té en compte els factors esmentats anteriorment. Pel que fa a la ingestió d'aigua potable, es considera que el risc és acceptable si és inferior a  $1 \times 10^{-6}$  DALYs.

Com que aquests llindars no s'han definit en un escenari de reutilització d'aigua regenerada, la majoria d'assajos de QMRA adopten els mateixos llindars que per aigua potable, és a dir, una PI anual  $< 1 \times 10^{-4}$ , i DALYs  $< 1 \times 10^{-6}$ . Tot i així, molts autors consideren que tractant-se d'aigua regenerada són massa restrictius (Haas et al., 1996).

Finalment, perquè el procés del QMRA tingui sentit i sigui efectiu, és molt important treballar en la comunicació del risc així com en la seva percepció per part de la societat.

Així doncs, en el primer capítol d'aquesta tesi es pretén aprofundir sobre la seguretat d'algunes de les estratègies de reutilització que s'estan aplicant avui en dia a Catalunya i de manera més específica fer valoracions de risc associades a *Cryptosporidium* en aquestes aigües regenerades.

### 1.3. CAPÍTOL II. Noves tecnologies per al tractament de l'aigua regenerada

Al llarg dels estudis que formen aquesta tesi s'han analitzat mostres provinents de diferents plantes depuradores i regeneradores d'aigua. Totes elles disposaven de tractament primari i de tractament secundari convencional amb fangs activats. Pel que fa als tractaments terciaris, a continuació es mostra una taula amb la descripció dels que s'aplicaven a les plantes d'estudi (vegeu taula 1).

ERA	Població servida		Descripció del tractament terciari
	PE	Hab.	
1	175.000	36.548	FS + UV (18 a 25 mJ/cm <sup>2</sup> ) + Cloració (≈5 ppm)
2	43.100	5.976	C-F + Dec. Lamel·lar + FS + Cloració + UV (màx. 48 mJ/cm <sup>2</sup> )
3	2.275.000	1.092.573	C-F + Dec + FS + UV + Cloració (> 0,6 ppm de Cl res.)
4	70.000	21.871	2 línies: A) FS + Cloració; B) MF + OI
5	210.583	42.076	Pre-Cloració + C-F + Dec. Lamel·lar + FS - cloració (1 ppm de Cl res.)

**Taula 1.** Descripció dels tractaments terciaris utilitzats a les 5 ERAs (estacions regeneradores d'aigua). PE: població equivalent; Hab.: número d'habitants; FS: filtre de sorra; C-F: coagulació-floculació; Dec.: decantació; MF: microfiltració; OI: osmosi inversa; Cl res.: clor residual.

Pel que fa a la desinfecció en tractaments terciaris, l'ús de la cloració així com de la llum UV són pràctiques molt esteses. De fet, l'efecte sinèrgic entre aquests dos tractaments per a la inactivació de microorganismes, ha esta descrit en nombroses ocasions (Montemayor et al. 2008; Wang et al., 2011 i 2012). Tot i així, hi ha certs aspectes de la desinfecció convencional amb clor que s'han de tenir en compte, com ara els productes derivats de la desinfecció (trihalometans, cloramines o nitrosamines). La cerca de noves tecnologies així com l'optimització de les que ja existeixen, és una de les estratègies que es poden adoptar en el marc de la millora de la qualitat de l'aigua.

A la figura 12 s'hi poden observar algunes de les tecnologies que s'estan utilitzant i intentant optimitzar per al tractament de l'aigua. Aquestes es podrien englobar, a grans trets, en tecnologies de membranes i en tecnologies d'oxidació avançada.

NOVES TECNOLOGIES PER AL TRACTAMENT D'AIGUA	
TECNOLOGIES DE MEMBRANES	TECNOLOGIES D'OXIDACIÓ AVANÇADA
•Microfiltració (MF)	•Incineració (oxidació tèrmica)
•Ultrafiltració (UF)	•Oxidació Humida (catalítica i no catalítica)
•Nanofiltració (NF)	•Ozonització (O <sub>3</sub> ) i O <sub>3</sub> /UV
•Osmosi Inversa (RO)	•Peròxid d'hidrogen i H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV
•Bioreactors de membranes (MBR)	•Diòxid de Titani (TiO <sub>2</sub> )/UV
•Electrodiàlisi (ED)	•Fenton i Foto-Fenton
•Electrodiàlisi inversa (EDR)	•Ultrasons

**Figura 12.** Llistat d'algunes tecnologies en les que es treballa actualment, separades en dos grans grups: tecnologies de membranes i tecnologies d'oxidació avançada.



Avui en dia s'estan invertint molts esforços en la millora d'aquest tipus de procediments per tal de millorar-ne les limitacions, ja que tenen un gran potencial per al tractament d'aigua. Tot i això, en aquest capítol no pretenem fer una revisió exhaustiva de tots ells, sinó que només volem fem un repàs de les tecnologies amb més perspectives de futur per acabar centrant-nos en els processos d'oxidació avançada (POA) que s'han avaluat en els articles 4 i 5 d'aquesta tesi.

Les tecnologies de membranes es basen en la separació-filtració de substàncies (microorganismes o partícules) mitjançant membranes selectives amb permeabilitats variables. Aquesta separació es pot aconseguir, per exemple, amb la diferència de pressió osmòtica (OI), o la de potencial elèctric (electrodiàlisi). També existeixen processos d'MBR, que combinen l'acció de les membranes (generalment MF o UF) amb un bioreactor. Aquest tipus de processos s'han utilitzat amb èxit per al tractament d'aigua residual (Martí et al., 2011). Pel que fa a la MF i a l'UF, han demostrat la seva habilitat per reduir les concentracions d'(oo)cists de protozoous (*Cryptosporidium* o *Giardia*) per sota dels nivells de detecció, i la terbolesa fins a assolir els requeriments exigits en les normatives de tractament per aigua potable (USEPA, 2001). L'inconvenient principal de les membranes és el d'una possible esquerda en la seva integritat, ja que això podria comprometre la capacitat de separació de microorganismes o partícules. Tot i així, hi ha d'altres factors que n'estimulen l'ús com la facilitat d'operació, requeriments mínims de personal o que mantenen l'eficiència tot i les fluctuacions en la qualitat inicial de l'aigua.

Pel que fa a les tecnologies d'oxidació avançada, s'originen com a tractaments associats a la reducció de compostos químics a l'aigua, principalment els que avui en dia s'anomenen contaminants emergents. Aquests, són compostos químics que fins ara no s'havien reconegut i que per tant, no estan regulats. Tot i així, existeix certa preocupació, pels efectes que puguin tenir sobre la salut ja que han estat detectats en efluent de depuradores, en aigües marines i continentals, en aigües subterrànies i fins i tot en aigües de beguda (Benotti et al., 2009; Rosal et al., 2010). Entre aquests contaminants hi ha tant productes de nova generació com substàncies que sempre hi han estat però que fins ara no es detectaven perquè les metodologies de detecció no eren prou sensibles. Alguns exemples en són els productes farmacèutics i d'higiene personal (PPCP), hormones, desinfectants, tensioactius, additius de gasolines i els seus subproductes (Kümmerer, 2001; Farré et al., 2008; Pal et al., 2010).

Generalment, aquests productes acaben anant a parar a l'aigua a través dels efluent de les EDARs, que amb els sistemes fisicoquímics i biològics convencionals, no són especialment eficients en la seva eliminació. Com que els efluent de depuradora acaben essent abocats a l'ambient (llacs, rius, mar, etc.), fàcilment poden contaminar les aigües superficials. Tot i que les concentracions a les que es detecten a la sortida de les depuradores estan en el rang dels µg/L, quan aquests microcontaminants es detecten a l'ambient (aigües superficials), el rang sol ser de ng/L (Gros et al., 2010; Vulliet i Cren-Olivé, 2011). A la taula 2 es poden observar alguns exemples d'aquestes substàncies en aigües superficials i subterrànies: en el cas de les hormones, són principalment estrògens i

esteroides; i en cas dels productes farmacèutics, hi ha diferents antibiòtics, antiinflamatoris, medicaments psiquiàtrics etc.

COMPOST	Aigües superficials		Aigües subterrànies	
	Freq. (%)	Mitjana (ng/L)	Freq. (%)	Mitjana (ng/L)
<b>Hormones</b>				
17 $\beta$ -Estradiol	1	0,2	10	0,4
Testosterona	96	2,2	100	1,4
Androstendiona	97	0,8	99	0,8
Levonorgestrel	47	3,6	49	4,0
Progesterona	89	1,6	93	1,6
<b>Productes farmacèutics</b>				
Propranolol	7	1,2	1	1,8
Lorazepam	6	2,1	4	1,2
Carbamazepina	61	13,9	70	10,4
Trimetoprim	13	0,9	1	1,4
Paracetamol	28	14,7	17	10,3
Ibuprofèn	9	5,5	0	0
Àcid salicílic	54	6,7	53	6,5
Naproxèn	9	3,5	3	1,2
Diclofenac	37	5,4	20	9,7

**Taula 2.** Freqüència de detecció i concentració a l'aigua (ng/L) d'alguns d'aquests compostos a França. Taula adaptada de Vulliet i Cren-Olivé. (2011).

Anant més a prop de casa nostra, al riu Llobregat també s'hi ha estudiat la presència de molts principis actius de productes farmacèutics. Estudis recents demostren que n'hi ha una gran varietat i que les seves concentracions poden variar molt en funció de l'estació i de circumstàncies climàtiques o meteorològiques concretes com ara sequeres, o avingudes sobtades del riu (Osorio et al., 2012). A la taula 3 es pot apreciar com molts d'aquests compostos descrits al Llobregat també havien estat descrits a França.

COMPOST	Concentració al riu Llobregat (ng/L)			
	2009-2010		2005-2006	
	Mín.	Màx.	Mín.	Màx.
Ketoprofèn	0,7	224,9	160	2710
Ibuprofèn	2,7	868	160	9890
Diclofenac	0,4	785,9	80	18740
Paracetamol	4,4	1059,8	60	2420
Benzafibrat	0,2	217,1	30	15060
Carbamazepina	1,2	266,7	80	3090
Atenolol	0	251,2	50	670
Sotalol	0,1	3552,6	110	1820
Sulfametoxazol	0,2	1500	30	11920
Trimetoprim	0	35,6	20	470

**Taula 3.** Concentracions mínimes (Mín.) i màximes (Màx.) en ng/L, d'una selecció de productes farmacèutics representatius a les aigües del riu Llobregat en dos períodes diferents. Taula adaptada d'Osorio et al., (2012).

Tot i que existeixen diferents tècniques per determinar el possible impacte -tant per a la salut com per a l'ambient- d'aquests contaminants, la seva eliminació s'ha convertit en l'objectiu de molts projectes de millora de la qualitat de les aigües ja que de moment, no se sap si una exposició continuada podria provocar alteracions endocrines o tenir efectes genotòxics a llarg termini.

A dia d'avui s'han fet centenars d'estudis que avaluen l'efectivitat dels processos d'oxidació avançada per a l'eliminació d'aquest tipus de microcontaminants. Dels resultats obtinguts se'n desprèn que els POA tenen un gran potencial per mineralitzar completament molts d'aquests compostos. No obstant això, es té molt poca informació sobre l'efecte d'aquests processos en la inactivació de microorganismes, la qual cosa s'ha de tenir en compte quan s'està fent una gestió integral de l'aigua. De fet, l'efecte dels POA en les concentracions d'indicadors i patògens en aigües reals és un camp que tot just es comença a explorar ja que de moment la majoria d'estudis s'han fet amb aigües artificials o netes, dopades amb soques de laboratori de determinats microorganismes i per tant, la seva inactivació i el seu comportament davant d'un tractament concret pot ser molt diferent al d'un microorganisme present de manera natural en un efluent real. De moment, es desconeixen els mecanismes d'acció concrets que acaben inactivant els microorganismes, però se sap que les espècies reactives de l'oxigen (ROS) formades poden malmetre les membranes dels microorganismes o el seu material genètic i oxidar-ne proteïnes. A continuació, s'explicaran alguns dels aspectes més característics dels processos fotocatalítics que s'han estudiat en els articles 4 i 5.

### **1.3.1. Processos d'oxidació avançada (POA)**

Els POA es podrien definir com aquelles tecnologies que promouen la formació massiva de radicals hidroxil (OH), que gràcies a la seva alta reactivitat i baixa especificitat, són els que finalment oxidaran els contaminants. Els processos fotocatalítics són POAs en els quals hi està involucrada l'absorció de llum (fotons), per part del substrat.

L'ús de POA com a tractaments de regeneració podria oferir alguns avantatges respecte altres tecnologies existents, que el converteixen en una opció molt atractiva:

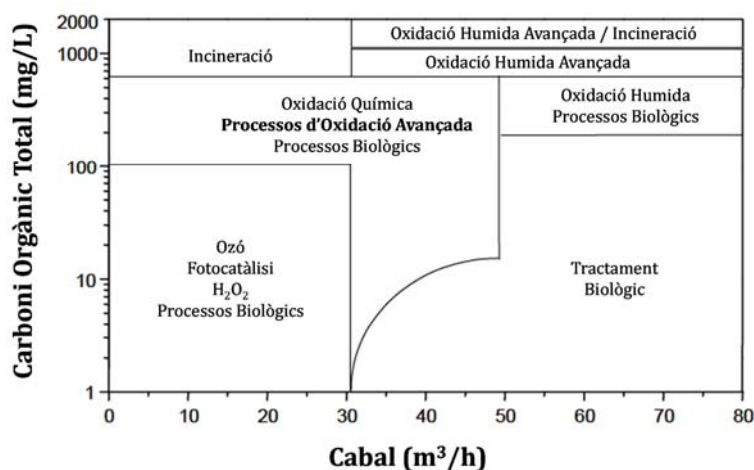
- i.** Poden arribar a la completa mineralització dels contaminants.
- ii.** La seva alta reactivitat amb la majoria de compostos orgànics i la seva baixa especificitat els fan idonis per a l'eliminació total d'alguns microcontaminants així com dels subproductes d'altres contaminants que s'hagin pogut generar durant tractaments previs.
- iii.** Els reactius utilitzats com a oxidants s'acaben descomponent en productes que són innocus.
- iv.** Són molt efectius per a contaminants refractaris que solen resistir els mètodes convencionals.

Degut a l'elevada taxa d'oxidació dels radicals hidroxil, el comportament dels microcontaminants pot canviar després del tractament, de manera que contaminants d'origen orgànic es poden transformar en productes més petits i biodegradables. L'aplicació de POAs com a tractament directe d'aigua residual crua no és, ara per ara, una opció viable ja que l'elevat cost econòmic d'aquests processos, en comparació amb els processos fisicoquímics i biològics convencionals, ho impedeix. No obstant això, utilitzar-los de manera combinada i integrada amb d'altres tractaments és una de les opcions que ha estat més estudiada en els últims anys. Així doncs, que aquests tractaments formin part d'un procés més ampli d'obtenció d'aigua regenerada o potable, sí que podria ser una opció viable i beneficiosa, si es fes de la manera adequada.

Tot i així, per poder decidir si els POA són els més adequats per a la regeneració, hi ha una sèrie de factors que s'han de valorar molt bé prèviament a la seva aplicació:

- ~ **Concentració màxima de contaminant.** En processos de fotocàlisi, no es recomana que sigui massa alta (vegeu figura 13).
- ~ **La naturalesa dels contaminants.** Poden ser orgànics o inorgànics i tenen característiques diferents pel que fa a la seva estructura química, solubilitat, biodegradabilitat, volatilitat, toxicitat, polaritat, potencial d'oxidació, càrrega elèctrica i als seus subproductes.
- ~ **Normativa.** Suposant que existeixi, s'han de tenir en compte els límits permesos en cada cas.
- ~ **El cost econòmic.** Costos d'operació, temps d'operació, consum energètic, etc.

**Figura 13.** Diagrama dels tractaments recomanats segons el nivell de contaminació de l'efluent (COT) i segons el cabal a tractar.



En processos fotoquímics, els fotons implicats han d'aportar l'energia necessària per excitar els electrons i formar radicals lliures. Els mètodes que utilitzen llum com a font d'energia solen utilitzar llum UV ja que els seus fotons tenen més energia. L'ús de làmpades d'UV és una pràctica molt comuna com a tractament de desinfecció per a l'obtenció d'aigua potable i d'aigua regenerada. Per tant, l'ús de radiació solar en substitució de les làmpades, suposaria un gran avantatge econòmic a més a més d'un d'ambiental, ja que es tractaria d'una tecnologia molt més sostenible.

No tots el processos de fotooxidació són capaços d'aprofitar la radiació solar de manera eficient, ja que n'hi ha que requereixen longituds d'ona a les que no s'hi arriba utilitzant la radiació solar. Tot i així, n'hi ha molts que han demostrat una gran eficiència en els estudis fets fins ara, com per exemple, la fotocatàlisi amb peròxid d'hidrogen i llum UV ( $H_2O_2/UV$ ); el diòxid de titani i llum UV ( $TiO_2/UV$ ) i les reaccions de foto-Fenton (Stasinakis, 2008). Tot seguit parlarem amb una mica més de detall d'aquests POA.

### $H_2O_2/UV$

La fotòlisi de l' $H_2O_2$  amb radiació UV es produeix quan la llum trenca l'enllaç O-O de l'aigua produint dos OH (equació 4). Aquesta reacció pot tenir lloc sempre i quan la longitud ( $\lambda$ ) d'ona aplicada estigui entre 200 nm i 400 nm.

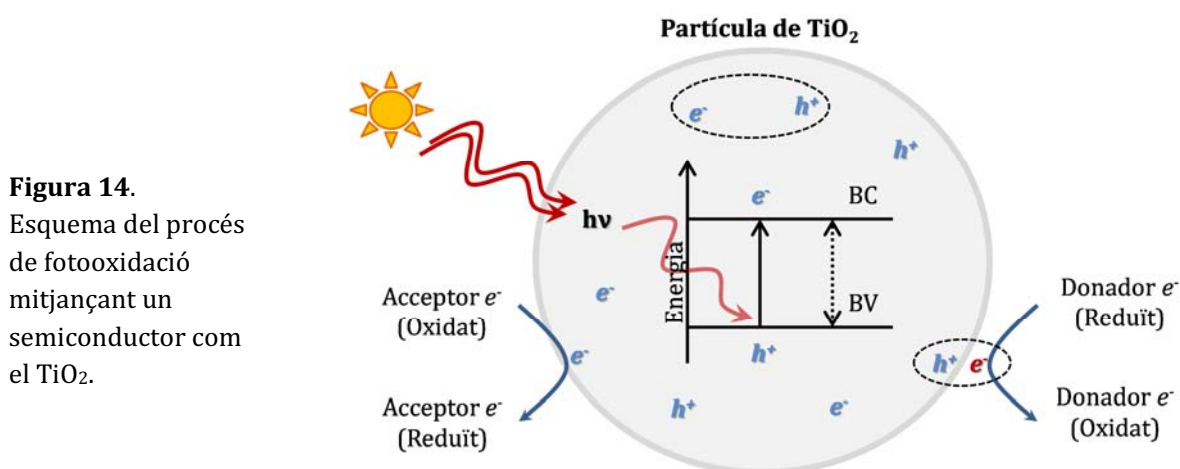


El procés  $H_2O_2/UV$  produeix un efecte sinèrgic molt més gran que no pas l'efecte additiu de l' $H_2O_2$  i de l'UV. Aquest, és capaç de destruir molts dels contaminants orgànics més difícils de degradar com ara l'atrazina o el tricloroetilè. Cal recordar però, que hi ha algunes limitacions com la terbolesa, que pot actuar absorbint la radiació UV i fent menys eficient el procés global.

Teòricament, radiacions amb  $\lambda < 300$  nm, no són eficients, però la llum UV d'origen solar conté una fracció d'UV-B (280-320 nm) i la major part d'UV-A (320-400 nm). A més a més, hi ha molts estudis que demostren l'efecte sinèrgic entre  $H_2O_2/UV$  en l'eliminació de microorganismes a l'aigua tot i que no se'n coneixen els mecanismes exactes.

### Fotocatàlisi heterogènia amb $TiO_2/UV$

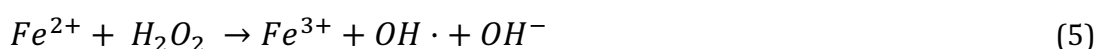
S'entén per fotocatàlisi heterogènia, aquell procés fotocatalític que utilitza un sòlid semiconductor (per exemple el  $TiO_2$ ), que forma una suspensió estable i que com a resultat a l'absorció de la radiació, estimula la formació de radicals hidroxil.



Durant aquest procés, els fotons han de tenir prou energia com per fer saltar un electró de la banda de valència (BV) a la banda de conducció (BC) i produir així un *forat* en la banda de valència. Tant els electrons com els forats produïts en aquesta reacció poden provocar reduccions o oxidacions respectivament (vegeu figura 14). Tot i que hi ha molts catalitzadors, el TiO<sub>2</sub> ha demostrat tenir una gran estabilitat, eficiència i baix cost, característiques que l'han fet preferible a d'altres catalitzadors en moltes ocasions.

### Fotocatàlisi homogènia amb Foto-Fenton (Fe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV)

Quan es tracta de fotocatalàlisi homogènia, el catalitzador està en dissolució. La reacció de Fenton, és a dir, una barreja de ferro i peròxid d'hidrogen, va ser desenvolupada el 1894 per Henry John Horstman Fenton, però no va ser fins anys més tard, el 1930, que Haber i Weiss la van descriure (vegeu equació 5).

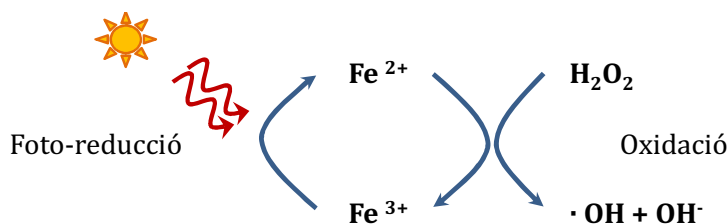


En la reacció de Fenton, el ferro actua com a catalitzador i se sol afegir a l'aigua en forma de FeSO<sub>4</sub> (sulfats de ferro), que seran la font d'ions Fe(II). En aquesta reacció, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxida l'ió Fe(II) i forma l'ió Fe(III) i radicals hidroxil. En el cas del foto-Fenton, l'ió Fe(III) serà reduït una altra vegada a ió Fe(II) gràcies a la radiació UV (solar o amb làmpades), i com que està dissolt a l'aigua, donarà com a resultat la formació d'un radical hidroxil i un protó (vegeu equació 6).



Si es tenen en compte les dues reaccions es pot apreciar que l'únic component que es consumeix és l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Així, si l'anem afegint a l'aigua a mesura que es va consumint, aconseguirem una reacció en cadena de contínua alliberació de radicals OH, que podran actuar oxidant tot el que hi hagi a l'aigua.

**Figura 15.** Esquema del procés d'oxidació mitjançant el foto-Fenton solar.



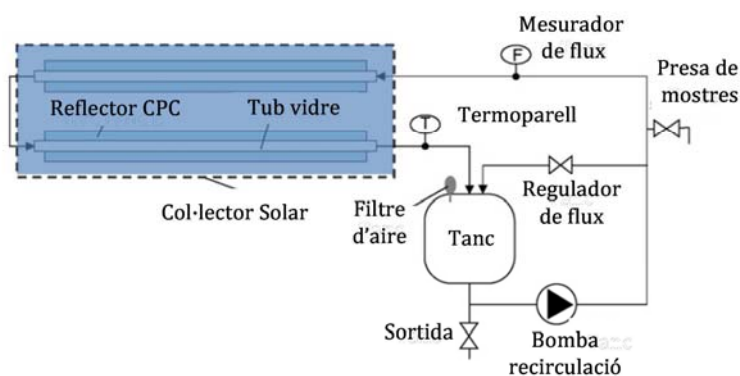
Com ja s'ha comentat, la font de llum UV pot ser radiació solar, de manera que si s'aplica en la reacció de Fenton, tindrem el que s'anomena foto-Fenton solar (vegeu figura 15). Aquest POA s'ha utilitzat molt sovint en els darrers anys i ha demostrat ser molt eficient en l'eliminació de substàncies tòxiques i també a l'hora d'augmentar la biodegradabilitat d'alguns components (Chamarro et al., 2001). A més a més, s'ha fet servir amb èxit per a la mineralització d'algunes substàncies com ara el fenol (Esplugas et al., 2002).

Tot i així, una de les limitacions que té aquest procés és el pH. Perquè aquestes reaccions siguin possibles, el ferro ha d'estar en dissolució, cosa que només passa a pHs molt baixos, al voltant de 3. Quan el pH està entre 3 i 5, el Fe està en forma col·loïdal i a un pH > 5, el Fe precipita en forma d'òxids de Fe (Al-Momani, 2003).

Cada vegada més, però, s'estan estudiant els efectes del foto-fenton a pHs propers als naturals, i en algunes ocasions hi ha resultats molt esperançadors pel que fa a aquest procés (Sciacca et al., 2010; García-Fernández et al., 2012; Ortega-Gómez et al., 2012). Aquest tipus d'estudis són particularment interessants perquè l'aplicació real del foto-fenton està limitada en gran part per l'efecte del pH, ja que de moment, per cabals grans no és viable l'acidificació prèvia ni la neutralització posterior d'efluents de depuradora.

**Ús de l'energia solar com a tractament d'aigua.** L'ús de la radiació solar per a la desinfecció (SODIS) de l'aigua és un procés que des de fa anys s'està utilitzant a molts països en vies de desenvolupament per a l'obtenció d'aigua de beguda. De fet, és un procediment recomanat per l'OMS ja que és senzill i eficient. Bàsicament es tracta d'omplir ampolles d'aigua (1,5 a 2L) de plàstic (PTE) transparent i exposar-les al sol entre 6 i 48h en funció de si es està núvol o no (EAWAG/SANDEC, 2002). L'efecte de la radiació solar així com de la temperatura acaben reduint significativament el nombre de microorganismes causants de malalties gastrointestinals. De fet, s'ha descrit que els episodis de diarrea en nens disminueixen en un 24% en famílies que utilitzen SODIS, i també que aquests nens tenen una probabilitat 8 vegades inferior d'agafar còlera (Conroy et al., 1999 i 2001; Hobbins et al., 2000) que en famílies que no l'apliquen.

D'altra banda, als països industrialitzats s'intenta anar més enllà per tal d'optimitzar l'ús de la radiació solar. Així, en els darrers anys s'han optimitzat materials i dissenys de foto-reactors (de moment a escala pilot) per poder tractar aigua de manera més eficient. En l'estudi 5 d'aquesta tesi s'utilitzen foto-reactors CPC (vegeu figura 16, Sichel et al., 2007), que permeten recuperar la llum directa i difusa, que incideix en el col·lector.



**Figura 16.** Diagrama de flux d'un foto-reactor CPC. Adaptació de Sichel et al. (2007).

En el segon capítol d'aquesta tesi s'avalua l'efecte de la radiació solar així com dels processos fotocatalítics explicats ( $H_2O_2/UV$ ;  $TiO_2/UV$  i  $Fe/H_2O_2/UV$ ), en la inactivació de microorganismes indicadors amb l'objectiu d'obtenir aigua regenerada de qualitat.

## **2. Objectius**





---

## 2.1. CAPÍTOL I: Riscos microbiològics lligats a la reutilització d'aigua regenerada: el cas de *Cryptosporidium*

---

🕒 L'objectiu d'aquest primer capítol era el d'aprofundir en aspectes relacionats amb la seguretat de l'aigua regenerada, tot avaluant algunes de les estratègies de reutilització que s'estan aplicant avui en dia a Catalunya i explorant els seus beneficis i inconvenients. De manera més específica es pretenia:

- Avaluar l'impacte al riu Llobregat d'un experiment d'IPR planejat (*Planned Indirect Potable Reuse*) per a futures situacions d'emergència de falta d'aigua. És a dir, avaluar els canvis en la qualitat microbiològica del riu després d'abocar-hi, de manera controlada, aigua regenerada per augmentar-ne el cabal.
- Estudiar l'eficiència de les SRC com a indicadors dels oocists de *Cryptosporidium*, tant totals com infectius, tenint en compte els diferents tractaments terciaris utilitzats a les plantes depuradores estudiades.
- Analitzar les concentracions, la viabilitat, la infectivitat i els genotips dels oocists de *Cryptosporidium* a les aigües residuals de les plantes estudiades així com l'efecte dels diferents tractaments (de depuració i de regeneració) en els microorganismes indicadors i en *Cryptosporidium*.
- Avaluar, amb QMRA, el risc microbiològic lligat a *Cryptosporidium* en un escenari de reutilització real, utilitzant: (i) concentracions de *Cryptosporidium* totals i infectius, i (b) dades de la relació entre SRC i *Cryptosporidium* en els diferents efluents.

---

## 2.2. CAPÍTOL II: Noves tecnologies per al tractament de l'aigua regenerada

---

🕒 L'objectiu del segon capítol de la tesi era el d'explorar noves tecnologies pel que fa a l'obtenció d'aigua regenerada, és a dir, testar alguns processos fotocatalítics com a possibles tractaments terciaris per a l'obtenció d'aigua regenerada. De manera més específica es pretenia:

- Avaluar l'efecte de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, amb baixes concentracions de peròxid d'hidrogen i utilitzant làmpades d'UV, en la inactivació d'alguns microorganismes indicadors com: *E. coli*, SOMCPH, SRC i fags que infecten la soca CB390, en un efluent secundari real.
- Avaluar l'efecte de diferents POA que utilitzen radiació solar – UV solar; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV; TiO<sub>2</sub>/UV; i Fe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV– com a possibles tractaments terciaris, tot determinant les cinètiques d'inactivació de diferents microorganismes indicadors: *E. coli*, SOMCPH, SRC i FRNAPH, partint d'un efluent secundari real.



# **3. Publicacions**



### 3.1. ARTICLE 1

**Autors:** M<sup>a</sup> Eugenia Rubiano, **Míriam Agulló-Barceló**, Raquel Casas-Mangas, Joan Jofre i Francisco Lucena

**Títol:** *Assessing the effects of tertiary treated wastewater reuse on a Mediterranean River (Llobregat, NE Spain), part III: Pathogens and indicators.*

**Revista:** Environmental Science and Pollution Research. Vol 34; 373-388 (2011)

## RESUM

### Introducció

En els darrers anys ha acrescut considerablement l'interès en l'obtenció de recursos hídrics alternatius degut a diferents episodis de manca d'aigua. A més a més, els avenços tecnològics per al tractament d'aigües residuals i per a l'obtenció d'aigua regenerada, han fet possible que es plantegi l'opció d'incrementar, de manera puntual, els recursos hídrics existents amb aigua regenerada per a la producció d'aigua potable. Aquesta activitat podria suposar un risc per a la salut degut a l'origen de l'aigua, i és per això que el *National Research Council of the USA National Academies* (1998) i l'*Australian National Water Commission* (2007), van concloure que l'aigua residual regenerada només es pot utilitzar per augmentar les reserves hídriques destinades a la potabilització si es fes com a últim recurs i sempre després d'una avaluació exhaustiva dels riscos microbiològics que d'aquesta activitat se'n podrien derivar. Aquesta avaluació hauria d'incloure l'anàlisi d'indicadors de contaminació fecal així com de patògens (virus i protozous).

Els oocists de *Cryptosporidium* (tant totals com infecciosos) així com els enterovirus citopatogènics (definites com aquells virus que infecten les cèl·lules BGM), es van seleccionar com a patògens en aquest estudi ja que ambdós han estat inclosos en nombroses ocasions, en diferents normatives que regulen la qualitat de l'aigua. A més a més, s'han utilitzat indicadors de contaminació fecal tradicionals com la *E. coli* i alternatius com els fags somàtics (SOMCPH) i les espores de clostridis reductors del sulfit (SRC).

Durant la crisi hídrica del 2007-2008, les autoritats de gestió de l'aigua pertinents es van plantejar la possibilitat d'augmentar el cabal del riu Llobregat amb aigua regenerada de l'ERA del Prat de Llobregat, uns quilòmetres més amunt del punt de captació de l'ETAP de Sant Joan Despí. En aquest estudi es presenten els resultats obtinguts de l'avaluació dels possibles riscos tant ambientals com de salut pública com a conseqüència d'aquesta reutilització tan particular.

### Resultats i discussió

#### Indicadors i patògens a l'aigua regenerada (abans i després del transport)

Aplicant llum UV i cloració durant el procés de regeneració, les concentracions d' *E. coli* i de SOMCPH van estar sempre per sota el límit de detecció (2 CFU i 10 PFU per 100 mL

respectivament). D'altra banda, quan l'aigua estava tractada només amb UV, les concentracions mitjanes d'*E. coli* i SOMCPH van ser significativament més altes que usant ambdós tractaments. Pel que fa a les SRC, es van detectar en ambdós tractaments i no hi va haver diferències entre ells. Tots els valors obtinguts estan dins del rang habitual de la planta, i per tant es va considerar que aquesta funcionava amb normalitat durant l'estudi.

Pel que fa als patògens, no es van poder detectar ni oocists infecciosos de *Cryptosporidium* ni enterovirus citopatogènics en cap dels dos tractaments emprats (en volums analitzats de 50 i 100 L respectivament). Tot i així, sí que es van detectar oocists totals de *Cryptosporidium*, però sempre en concentracions inferiors a 1 oocist per 10 L. Aquest fet però, no és estrany, ja que és sabut que els processos de desinfecció no eliminen la presència del paràsit però sí que en redueixen o n'eliminen la infectivitat.

Les concentracions d'*E. coli* i de SOMCPH no van variar després que l'aigua regenerada fos transportada riu amunt a través d'una canonada de 15,6 Km, més amunt del punt de captació de la planta potabilitzadora de Sant Joan Despí. Pel que fa a les SRC, es van detectar concentracions significativament més baixes després del transport quan l'aigua s'havia tractat amb UV i cloració. Efecte degut, probablement, al clor residual present a l'aigua regenerada, que hauria seguit actuant durant un temps. Així doncs, es va descartar que hi hagués recreixement en la foscor (durant el transport), procés descrit en alguns bacteris i protozous després del tractament amb UV.

#### Indicadors i patògens a l'aigua de riu

A l'aigua del riu Llobregat, les concentracions dels indicadors de contaminació fecal van ser significativament més altes que a l'aigua regenerada. De fet, la concentració més baixa de qualssevol dels indicadors al riu va ser més alta que a l'aigua regenerada. Així doncs, després de l'abocament d'aigua regenerada al riu, la qualitat microbiològica d'aquest millorava. Les concentracions de patògens després de l'abocament van ser menors, però no significativament diferents, a les del riu abans de la barreja amb aigua regenerada. Tot i així, al riu, les concentracions eren significativament més altes que a l'aigua regenerada. És possible que el fet que no es trobin diferències es degui més aviat a la incertesa inherent als mètodes de detecció quan les concentracions són baixes, que no pas al fet que en realitat no ho fossin.

#### **Conclusions**

---

El vessament d'aigua regenerada provinent de l'ERA del Prat de Llobregat al riu Llobregat, en millora la qualitat microbiològica. Tenint en compte que l'aigua del riu Llobregat a l'alçada de Sant Joan Despí s'utilitza com a font d'aigua potable, podríem dir que si en una situació d'emergència de manca d'aigua, es decidís augmentar el cabal del riu amb aigua regenerada, això no implicaria un risc per a la salut de les persones des de la perspectiva de les malalties infeccioses que es transmeten a través de l'aigua.

**INFORME SOBRE EL FACTOR D'IMPACTE - ARTICLE 1**

L'article *Assessing the effects of tertiary treated wastewater reuse on a Mediterranean River (Llobregat, NE Spain), part III: Pathogens and indicators* va ser publicat el 2011 a la revista *Environmental Science and Pollution Research*, que està dins del Q1 en la temàtica d'*Environmental Sciences*. L'any 2011, la revista va presentar un índex d'impacte de 2,651.

**INFORME DE PARTICIPACIÓ - ARTICLE 1**

La doctoranda Míriam Agulló-Barceló ha dut a terme totes les anàlisis de *Cryptosporidium* tant en aigua regenerada com a l'aigua de riu. Ha participat en les anàlisis d'SRC i és responsable de la recollida de mostres i del seu transport. Ha participat activament en el processament de les dades corresponents a *Cryptosporidium* i als indicadors així com en la discussió dels resultats. Finalment ha col·laborat en l'elaboració de taules i gràfics així com en la redacció de l'article i ha contribuït a la difusió dels resultats que se'n deriven.

Dr. Francisco Lucena Gutiérrez





# Assessing the effects of tertiary treated wastewater reuse on a Mediterranean river (Llobregat, NE Spain), part III: pathogens and indicators

María-Eugenia Rubiano · Míriam Agulló-Barceló ·  
Raquel Casas-Mangas · Juan Jofre · Francisco Lucena

Received: 3 March 2011 / Accepted: 21 June 2011 / Published online: 1 July 2011  
© Springer-Verlag 2011

## Abstract

**Purpose** Need, coupled with advances in water treatment technology, is motivating a growing interest in augmenting drinking water supplies with reclaimed water. Using reclaimed water to increase the flow of the Llobregat River upstream the water catchment site of the complex multi-step drinking water treatment plant of Sant Joan Despí has been considered. The impact of reclaimed water discharges on the load of *E. coli*, spores of sulphite-reducing clostridia, somatic coliphages, cytopathogenic enteroviruses, and total and infectious *Cryptosporidium* oocysts in the Llobregat River water was assessed to gain information for funded decisions in potential future emergencies.

**Methods** Enterovirus and *Cryptosporidium* oocysts were concentrated from great water volumes prior to enumeration, whereas indicators were enumerated directly from the samples. Both indicators and pathogens were enumerated by cultural techniques that determine infectious microbes.

**Results and discussion** Densities of both indicators and pathogens in reclaimed water, despite that it was disinfected by UV irradiation alone or by UV irradiation plus chlorination, were significantly lower than their densities in the river water, both upstream and downstream the reclaimed water release site in the river.

**Conclusion** Results gathered indicate that discharging reclaimed water into the river does not increment the load of indicators and pathogens of the river water. Then, in

emergency situations due to severe water shortages after prolonged droughts, at least from the infectious diseases point of view, the risks of augmenting drinking water supplies with reclaimed water can be satisfactorily and safely managed.

**Keywords** Indicators · Pathogens · Reclaimed water · Drinking water sources

## 1 Introduction

Need, coupled with advances in water treatment technology, is motivating a growing interest in augmenting drinking water supplies with reclaimed water. Regarding health risks linked to indirect reuse of reclaimed water as potable water, the National Research Council of the USA National Academies (US National Research Council 1998) and the Australian National Water Commission (Australian Government 2007) concluded that reclaimed wastewater can be used to supplement drinking water sources but only as a last resort and after a thorough health and safety evaluation, which, regarding microbial contamination, means testing for viruses and protozoa in addition to testing for the traditional bacterial indicators. But, none of these reports are precise on which viruses or protozoa have to be studied.

Cytopathogenic enteroviruses, defined as those viruses infecting buffalo green monkey (BGM) cells, and *Cryptosporidium* seem good candidates for this purpose for several reasons. Both have been included as parameters to be determined in different water quality regulations (USEPA 2003, 2004; European Economic Commission 1976; DWI 1999). Moreover, for the purpose of assessing the quality of reclaimed water, it is essential to test for still infectious viruses and protozoa, and both cytopathogenic

Responsible editor: Philippe Garrigues

M.-E. Rubiano · M. Agulló-Barceló · R. Casas-Mangas · J. Jofre ·  
F. Lucena (✉)  
Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia,  
Universitat de Barcelona,  
Avinguda Diagonal 643,  
08028 Barcelona, Spain  
e-mail: flucena@ub.edu

enteroviruses and *Cryptosporidium* can be detected in water through feasible methods based on cell culture (USEPA 1995; Slifko et al. 1997). Additionally, alternative methods for testing virus and protozoa are testing indicators other than the traditional bacterial ones. Bacteriophages of enteric bacteria, mostly coliphages, had been advocated as indicators of human viruses (IAWPRC Study Group 1991; Lucena and Jofre 2010) and as such, are included in some water quality regulations (USEPA 2006; Anonymous 2001; State of Queensland EPA 2005). Spores of sulphite-reducing clostridia have also been advocated as indicators of *Cryptosporidium* (Payment and Franco 1993).

During a drinking water sources crisis, due to a severe drought that occurred in 2008, the water authority managing water resources in the area of Barcelona considered augmenting drinking water supplies with reclaimed water. To know the possible environmental, health, and water quality effects of such water reuse, an experiment consisting in introducing reclaimed water in the river upstream of the potabilization plant was performed in October 2009. The climatic and geographic scenarios of such experiment are described in detail in Munné et al. (2011). The present work provides an overview of occurrence and levels of microbial indicators and pathogens in reclaimed water, in receiving river water, and in river water upstream and downstream from the point where reclaimed water is delivered into the Llobregat River which is used as drinking water source. Indicators studied were *E. coli*, spores of sulphite-reducing clostridia and somatic coliphages, and the pathogens were cytopathogenic enteroviruses and total and infectious *Cryptosporidium* oocysts.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Study site and description of the experiment

The study site and the conditions under which the experiment of releasing reclaimed water into the Llobregat River is described in detail in Munné et al. (2011). For the microbiology study, two types of reclaimed water were studied: one set of samples was reclaimed water disinfected by UV irradiation and chlorination and the other set only by UV irradiation.

### 2.2 Samples and sampling

Four types of samples were taken for the microbiological analysis: (1) reclaimed water delivered by the treatment plant (RW1 samples); (2) reclaimed water discharged in the river after transport upstream through a 15.6-km long pipe (RW2 samples); (3) river water 0.2 km upstream of reclaimed water release (R0 samples); (4) river water at the catchment site of the Sant Joan Despí Drinking Water Treatment Plant

(SJDDWTP), about 6 km downstream from where reclaimed water was discharged into the river (R2 samples). RW1 and RW2 samples were of two types—ones disinfected by UV irradiation plus chlorination and the others disinfected only by UV irradiation. Sampling of RW1 and RW2 samples was coordinated as follows: When an RW1 sample was collected, the corresponding RW2 sample was collected after the time estimated for the transport through the pipe. This coordination allowed determining the effect of transport in the concentrations numbers of indicators. The 18 RW1 and RW2 samples were collected in three sets of six samples, each set corresponding to a day in which one of the proportions of mixture of reclaimed water/river water (1:1; 1:2 and 1:3) was applied; see Munné et al. (2011).

RW1 samples, R0 and R2, were tested for indicators and pathogens, whereas RW2 samples were tested only for indicators.

The sampling campaign was carried out in during November 2009. Samples were collected in sterile containers, transported to the laboratory at 4°C, and the indicators tested in within 12 h. Testing for enteroviruses and *Cryptosporidium* required previous concentration. Samples of 50 and 100 l were concentrated in the sampling points, whereas 1 l samples were transported to the laboratory and concentrated upon arrival.

### 2.3 Concentration of enteroviruses

Viruses in reclaimed water delivered by the treatment plant (RW1 samples) were concentrated by adsorption to and elution from positive charged cartridge filters MK-100 (AMF Corp., CUNO, Meriden, CT, USA). For it, 100 l were filtered through MK cartridges. Viruses were eluted with 0.25 M glycine buffer solution at pH 10.5 during 25 min. A secondary concentration step was done by organic flocculation, adding 3% of beef extract (BBL-Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) and adjusting the pH to 3.5 as described by Katzenelson et al. (1976).

Viruses in 1 l of river water (R0 and R2 samples) were concentrated by organic flocculation, adding 3% of beef extract (BBL-Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) and adjusting the pH to 3.5 as described by Katzenelson et al. (1976).

Prior to infection of the BGM cells, the concentrates were decontaminated and detoxified by filtration through 0.22 mm pore size low protein binding polyether sulphone membrane filters (Millipore, Bedford, MA).

### 2.4 Concentration of *Cryptosporidium* oocysts

*Cryptosporidium* oocysts in 100 l of reclaimed water samples (RW1 samples) were concentrated using Envirochek-sampling capsules (Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI) according to Method 1623 (USEPA 1999).

*Cryptosporidium* oocysts in 1 l of river water samples (R0 and R2 samples) were concentrated by filtration as described by Shepherd and Wyn-Jones (1995), with some modifications detailed in Montemayor et al. (2005).

Concentrated *Cryptosporidium* oocysts were purified by immunomagnetic separation with a Dynabeads Anti-*Cryptosporidium* kit (Dynal, A.S., Oslo, Norway; Bukhari et al. 1998). After the dissociation step, the sample was homogenized and divided in two equal subsamples, one for the total oocysts detection and the other for the infectivity assay.

## 2.5 Quantification of bacterial and viral indicators

*Escherichia coli* and total coliforms were enumerated by membrane filtration. *E. coli* was plated on Chromocult® Coliform Agar (Merck KGaA, Germany) supplemented with antibiotics (*E. coli*/coliform selective supplement; Merck KGaA, Germany; ref 1.00898.0001), and total coliforms were plated on mFC Agar (Difco™, Detroit, MI). Spores of sulphite-reducing clostridia were determined according to Bufton (1959). Somatic coliphages were quantified by enumerating plaque forming units (PFUs) on host strain WG5 of *E. coli* according to the ISO standard method (ISO 2000).

## 2.6 Quantification of cytopathogenic enteroviruses

Buffalo green monkey kidney cell line (ECAAC 90092601) was used for the enumeration of cytopathogenic enteroviruses. The method used for determination of PFUs was the double-layer plaque assay for Mocé-Llivina et al. (2004).

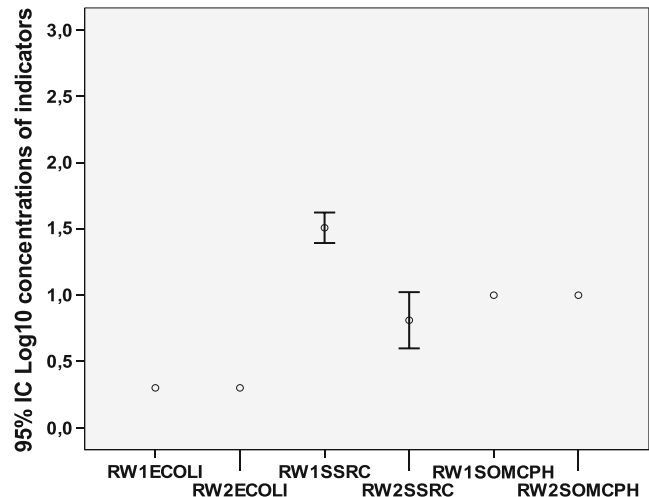
## 2.7 Quantification of *Cryptosporidium*

Detection of oocysts was performed by laser scanning cytometry and previous staining, with specific fluorescent antibodies (EStain-c400, TSC Biosciences) as described in Montemayor et al. (2005).

Infectious *Cryptosporidium* oocysts were enumerated according to the method described by Slifko et al. (1997). Briefly, HCT-8 competent cells were infected with the oocyst suspensions and, after 48 h incubation at 37°C, the infected cells were stained with specific fluorescent antibodies (EStain-c400, TSC Biosciences). Results are then given in fluorescent foci (FF).

## 2.8 Data treatment and statistical analysis

Data below the detection limit were given the value of the detection limit value for each one of the parameters analyzed. Student's *t* test was performed in order to determine the significance of the differences between the series of results



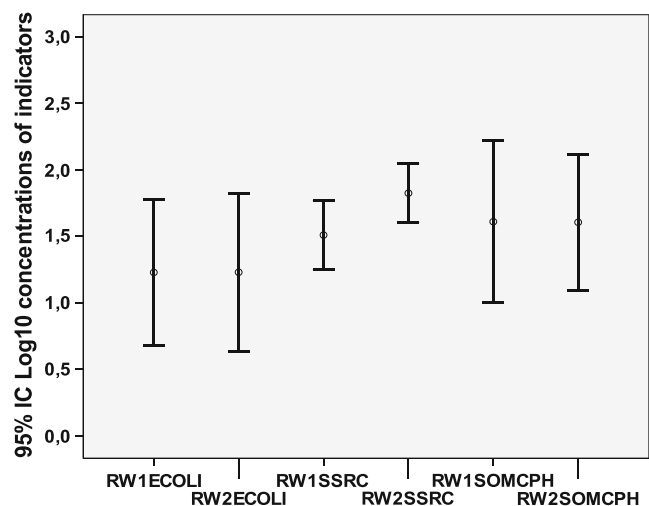
**Fig. 1** Log<sub>10</sub> values of the concentrations of indicators (mean values and 95% confidence levels) in reclaimed water (RW1 samples) and transported reclaimed water (RW2) when reclamation treatment included UV irradiation plus chlorination. Values are CFU (*E. coli* and SSRC) and PFU (somatic coliphages) per 100 ml. *ECOLI* is *E. coli*; *SSRC* are spores of sulphite-reducing clostridia; *SOMCPH* is somatic coliphages

with the Statistical Package for Social Science (Anonymous 1999). Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## 3 Results and discussion

### 3.1 Indicators and pathogens in reclaimed water

Figures 1 and 2 display the values in log<sub>10</sub> units per 100 ml of the densities of *E. coli*, spores of sulphite-reducing



**Fig. 2** Log<sub>10</sub> values of the concentrations of indicators (mean values and 95% confidence levels) in reclaimed water (RW1 samples) and transported reclaimed water (RW2) when reclamation treatment included only UV irradiation, but not chlorination. Values are CFU (*E. coli* and SSRC) and PFU (somatic coliphages) per 100 ml. *ECOLI* is *E. coli*; *SSRC* are spores of sulphite-reducing clostridia; *SOMCPH* are somatic coliphages

**Table 1** Pathogens in reclaimed water (RW1 samples)

Pathogen	Treatment received	Number of samples	Min. value	Max. value	Arith. mean
Enteroviruses	UV+Cl	3	<0.01	<0.01	<0.01
Enteroviruses	UV	3	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Cryptosporidium</i> oocysts	UV+Cl	3	<0.02	<0.02	<0.02
<i>Cryptosporidium</i> oocysts	UV	3	<0.02	0.04	<0.03
Enteroviruses are expressed as Infectious <i>Cryptosporidium</i>	UV+Cl	3	<0.02	<0.02	<0.02
PFU per liter and infectious <i>Cryptosporidium</i> as FF per liter	UV	3	<0.02	<0.02	<0.02

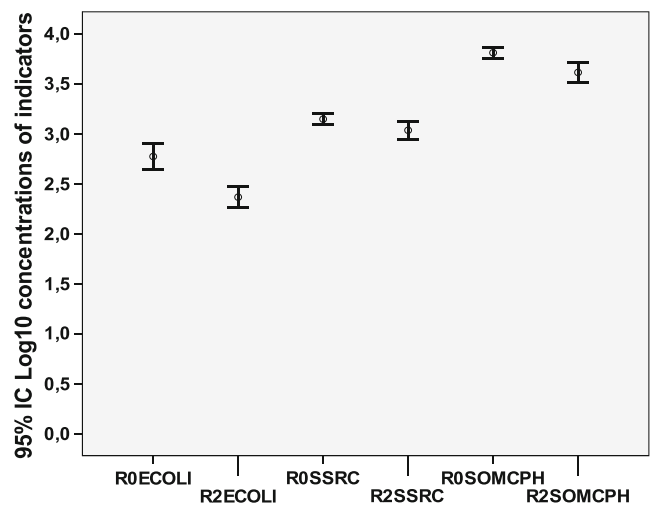
clostridia (SSRC), and somatic coliphages in reclaimed water (RW1 samples). Densities of *E. coli* and somatic coliphages were always below the detection limit (2 CFU and 10 PFU per 100 ml, respectively) when the water was UV irradiated and chlorinated. In contrast, quantifiable densities of SSRC were detected, with maximum values of 55 UFC per 100 ml. In contrast, the three indicators in water that was only UV irradiated could be quantified, with values averaging 6.5 CFU per 100 ml for *E. coli* and 20 PFU per 100 ml for somatic coliphages. Numbers of *E. coli* and somatic coliphages in reclaimed water that was only UV irradiated were significantly higher (Student’s *t* test,  $P < 0.05$ ) than those in UV irradiated and chlorinated water. In contrast, values of SSRC did not differ significantly (Student’s *t* test,  $P > 0.05$ ). The water reclamation facility operates usually to produce reclaimed water for irrigation. Under routine operation, disinfection is carried out as for the RW1 samples. In a routine survey performed every 15 days during 2009 and 2010, the range of values (average, maximum, and minimum values) of *E. coli*, SSRC, and somatic coliphages was similar to the range of values reported here. Hence, we can additionally conclude that the operation of the water reclamation plant is quite reliable.

The values of pathogen densities in RW1 samples are shown in Table 1. Independently of the treatment received, this is UV irradiation plus chlorination versus UV irradiation alone, neither cytopathogenic enteroviruses nor infectious *Cryptosporidium* were detected over the detection limits, which were 0.01 PFU per liter and 0.02 FF per liter, respectively. This is not surprising, taking into consideration the numbers of enteroviruses and *Cryptosporidium* found in raw sewage in the area (Montemayor et al. 2005; Costan-Longares et al. 2008) and that the reclamation process includes a secondary treatment, followed by sand filtration prior to disinfection. Non-infectious *Cryptosporidium* oocysts were still detected in the reclaimed water samples (RW1), yet at very low levels. However, all positive values were lower than one oocyst per 10 l that is the value required for drinking water by the only drinking water quality regulation that includes *Cryptosporidium* (DWI 1999). In any case, it is well known that most

disinfection procedures, which do not include filtration as in the case of chlorination and UV irradiation, do not substantially reduce oocysts when these are detected as physical particles after staining either with fluorescent specific antibodies or with vital dyes (Black et al. 1996; Montemayor et al. 2008).

3.2 Indicators in reclaimed water after transport

Figures 1 and 2 also display the values in log<sub>10</sub> units of the densities of *E. coli*, spores of sulphite-reducing clostridia (SSRC) and somatic coliphages in reclaimed water after circulating into the pipe from the reclamation facility to the point of delivery into the Llobregat River (RW2 samples). There were no significant (Student’s *t* test,  $P > 0.05$ ) differences between the values of RW1 and RW2 samples when the transported water was only UV irradiated. However, when the water was UV irradiated and chlorinated, the densities of SSRC were significantly lower (Student’s *t* test,  $P < 0.05$ ) in RW2 samples. This reduction in numbers is



**Fig. 3** Log<sub>10</sub> values of the concentrations of indicators (mean values and 95% confidence levels) in the Llobregat River upstream (R0 samples) and downstream (R2 samples) the point of discharge of reclaimed water. Values are CFU (*E. coli* and SSRC) and PFU (somatic coliphages) per 100 ml. *ECOLI* is *E. coli*; *SSRC* are spores of sulphite-reducing clostridia; *SOMCPH* are somatic coliphages

**Table 2** Pathogens in river water samples, upstream (R0) and downstream (R2) the point of reclaimed water release into the river (RW2)

Enteroviruses are expressed as PFU per liter and infectious *Cryptosporidium* as FF per liter

Pathogen	Sample	Number of samples	% Positive samples	Min. value	Max value	Arith. mean
Enteroviruses	R0	6	66.6	<1	4	<2.0
Enteroviruses	R2	6	66.6	<1	5	<2.5
<i>Cryptosporidium</i> oocysts	R0	6	66.6	<0.7	2.7	<1.2
<i>Cryptosporidium</i> oocysts	R2	6	66.6	<0.7	2.0	<1.3
Infectious <i>Cryptosporidium</i>	R0	6	33.3	<0.07	1.4	<0.8
Infectious <i>Cryptosporidium</i>	R2	6	33.3	<0.07	0.7	<0.7

likely due to the effect of residual chlorine or by the presence in the water of by-products of chlorination as for example chloramines (Rebhun et al. 1997). This effect, if existing, could not be detected with either *E. coli* or somatic coliphages, since their densities were below the detection limit in both RW1 and RW2 samples.

The similarity of densities prior to and post-transport when the water was only UV irradiated seems to discard the occurrence of dark reactivation, which occurs in bacteria (Zimmer and Slawson 2002) and protozoa (Shin et al. 2001) after UV irradiation, though this phenomenon seems not to be significant when medium- or high-pressure UV lamps are used to irradiate (Hijnen et al. 2006). It can then also be expected that the densities of pathogens do not vary after transport through the 15.6-km long pipe.

### 3.3 Indicators and pathogens in river water

A comparison of geometric means of *E. coli*, SSRC, and somatic coliphages sampled in sampling points R0 and R2 are displayed in Fig. 3. The densities of the three indicators in river water in point R0, which has not yet been impacted by the delivery of reclaimed water, were significantly higher (Student's *t* test,  $P < 0.05$ ) than those in reclaimed water (Figs. 1 and 2). The lowest value of each one of the indicators detected in the river upstream release was higher than the highest value detected in reclaimed water samples (RW1 and RW2; Table 3). The densities, as well, after the mixture of river water with reclaimed water (R2) were slightly lower than those before the mixture (R0). The differences, though small, were significant (Student's *t* test,  $P < 0.05$ ). Then, it can be concluded that, if release of reclaimed water has some effect on the concentration of indicators in the river, this is a decrease. This is due to the fact of the numbers in the reclaimed water being lower than those in the river water; the addition of reclaimed water to the river causes a dilution of indicators in the mixture. In contrast, the numbers of indicators in R2 do not differ significantly (Student's *t* test,  $P > 0.05$ ) among them in terms

of the proportion of the mixture of river and reclaimed water in the river in the day of sampling. Consequently, the delivery of reclaimed water does not worsen the microbiological quality of the Llobregat River water.

Pathogens were consistently found in the river water as well. Their densities in points R0 and R2 are shown in Table 2. The numbers of enteroviruses, oocysts of *Cryptosporidium*, and infectious *Cryptosporidium* in river water in R0 and R2 samples are significantly higher (Student's *t* test,  $P < 0.01$ ) than their numbers in reclaimed water (RW2). In contrast, numbers are similar upstream and downstream reception of reclaimed water (Student's *t* test,  $P > 0.05$ ). If there was any difference, as noticed for the indicators, this may be masked by the uncertainty of the numbers of pathogens detected because of the inherent uncertainty of all kind of measurements with low numbers of counts (Kraft et al. 1991; Clough et al. 2005) and the uncertainty introduced by the two-step detection procedure. As in the case of indicators, a decrease is to be expected due to the fact that the numbers in reclaimed water are lower than those in river water; therefore, the addition of reclaimed water causes the dilution of pathogens.

Table 3 summarizes the average, maximum, and minimum numbers of indicators in reclaimed water released in the river and river water samples prior to disposal of reclaimed water and clearly shows that the disposal of reclaimed water in the river does not impair the microbi-

**Table 3** Summary of average, maximum, and minimum values (in  $\log_{10}$  units per 100 ml) of indicators in reclaimed water released in the river (RW1+RW2) and river water samples upstream (R0) and downstream (R2) the point of release of reclaimed water

	R0 average (min–max)	RW1+RW2 average (min–max)	R2 average (min–max)
Number of samples	18	36	18
<i>E. coli</i>	2.7 (2.3–3.2)	0.8 (0.3–2.1)	2.4 (2.0–2.6)
SSRC	3.1 (3.0–3.3)	1.3 (0.6–2.3)	3.0 (2.9–3.3)
SOMCPH	3.8 (3.6–4.0)	1.3 (1.0–2.5)	3.6 (3.2–3.9)

ological quality of the river water used as source water by the multi-step SJDDWTP. Since this facility can satisfactorily reduce the load of the pathogens and indicators studied herein and those present in the Llobregat River water in order to obtain drinking microbiologically safe water (Ribas et al. 1996, 2000; Jofre et al. 1995), we can conclude that augmenting Llobregat River flow with reclaimed water does not suppose health risks with regards to water-borne infectious diseases.

#### 4 Conclusions

During the study period, densities of both indicators and pathogens in reclaimed water were significantly lower than their concentrations in the river water, both upstream and downstream the reclaimed water release site in the river; if there is any effect of releasing reclaimed water in the river, this is an improvement of the microbiological quality of the river water to be used as drinking water source. The addition of reclaimed water to the Llobregat River does not suppose an increase of the concentrations of indicators and pathogens with regard those already present in the river and consequently, does not add additional stress to the drinking water treatment facility. Then, in severe water shortages after prolonged droughts, at least, from the infectious diseases point of view, the health risks due to water-borne pathogens linked to augmenting drinking water supplies with reclaimed water can be satisfactorily and safely managed in the scenario studied.

**Acknowledgments** We want to thank the *Agència Catalana de l'Aigua* (ACA) for allowing us to participate in this study and for financing it, and the *Empresa Metropolitana de Sanejament Societat Anònima* (EMSSA) for allowing us to use the data of the routine survey on the water produced by the water reclamation facility.

#### References

- Anonymous (1999) Statistic program. SPSS for Windows, Version 10.0.6, 1989–1999. Statistical Package for Social Science. Chicago, IL
- Anonymous (2001) Law on environmental quality: regulation 429 on drinking water quality c. Q-2, r.18.1.1. Canada. Official Gazette of Quebec 24:3561, in French
- Australian Government (2007) Using recycled water for drinking: National Water Commission position. Australian Government Web <http://www.nwc.gov.au/resources/documents/using-recy-water-drinking-body-Waterlines-0607.pdf>
- Black EK, Finch GR, Taghi R (1996) Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. FEMS Microbiol Lett 135:187–189
- Buften AW (1959) A note of the enumeration of thermophilic sulphite-reducing bacteria. J Appl Bacteriol 22:278–280
- Bukhari Z, McCuin RM, Fricker CR, Clancy JL (1998) Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. Appl Environ Microbiol 64:4495–4499
- Clough HE, Clancy D, O'Neill PD, Robinson SE, French NP (2005) Quantifying uncertainty associated with microbial count data: a Bayesian approach. Biometrics 61:610–616
- Costan-Longares A, Moce-Llivina L, Avellon A, Jofre J, Lucena L (2008) Occurrence and distribution of culturable enteroviruses in wastewater and surface waters of north-eastern Spain. J Appl Microbiol 105:1945–1955
- Drinking water inspectorate (DWI) (1999) Water supply (water quality) (Amendments) Regulations 1999. SI no. 1524. Part 2. Laboratory and analytical procedures. Revision 2 October 1999. Revision 3 November 2000. DWI. London
- European Economic Commission (1976) The Council of European Economic Communities Directive of 8 December, 1975 concerning the quality of bathing waters. Official Journal of the European Communities directive no. 76/160/EEC. Council of European Economic Communities, Brussels, Belgium
- Hijnen WAM, Beerendonk EF, Medema GJ (2006) Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan oocysts in water: a review. Water Res 40:3–22
- IAWPRC study group on health related water microbiology (1991) Bacteriophages as model viruses in water quality control. Water Res 25:529–545
- ISO (2000) ISO 10705–2. Detection and Enumeration of Bacteriophages. Part 2. Enumeration of Somatic Coliphages. International Standardisation Organization, Geneva
- Jofre J, Ollé E, Ribas F, Vidal A, Jofre J (1995) Potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. Appl Environ Microbiol 61:3227–3231
- Katzenelson E, Fattal B, Hostovesky T (1976) Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. App Environ Microbiol 32:638–639
- Kraft RP, Burrows DN, Nousek JA (1991) Determination of confidence limits for experiments with low numbers of counts. Astrophys J 374:344–355
- Lucena F, Jofre J (2010) Potential use of bacteriophages as indicators of water quality and wastewater treatment processes. In: Sabour PM, Griffiths MW (eds) Bacteriophages in the control of food- and waterborne pathogens. ASM Press, Washington, pp 103–118
- Mocé-Llivina L, Lucena F, Jofre J (2004) A double layer plaque assay for the quantification of enteroviruses. Appl Environ Microbiol 70:2801–2805
- Montemayor M, Valero F, Jofre J, Lucena F (2005) Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. J Appl Microbiol 99:1455–1462
- Montemayor M, Costán A, Lucena F, Jofre J, Muñoz J, Dalmau E, Mujeriego R, Sala L (2008) Combined performance of UV light and chlorine during reclaimed water disinfection. Wat Sci Technol 57:935–940
- Munné A, Tirapu L, Solà C, Matia L, Manzano A, Ginebreda A, Lucena F, Prat N (2011) Assessing the effects of tertiary treated wastewater reuse on a Mediterranean river (Llobregat, NE Spain). Part I: searching for solutions to manage drought periods. Submitted to be published in the SCARCE special issue
- Payment P, Franco E (1993) *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. Appl Environ Microbiol 59:2418–2424
- Rebhun M, Heller-Grossman L, Manka J (1997) Formation of disinfection byproducts during chlorination of secondary effluent. Water Environ Res 69:1154–1162
- Ribas F, Huguet JM, Perramón J, Lucena F, Frias J, Jofre J (1996) Control of enterovirus in a water treatment plant to supply a

- metropolitan area for two consecutive periods characterized by different treatments. In: Microbiology of Water Supply. (ed) AEAS, Madrid, Spain, pp 163–181 (in Spanish)
- Ribas F, Bernal A, Perramon J (2000) Elimination of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, turbidity and particles in a drinking water treatment plant with clarification and double filtration. *Wat Sci Technol* 41:203–211
- Shepherd KM, Wyn-Jones AP (1995) Evaluation of different filtration techniques for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *Water Sci Technol* 31:425–429
- Shin GA, Linden KL, Arrowood MJ, Sobsey MD (2001) Low-pressure UV inactivation and DNA repair potential of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 67:3029–3032
- Slifko TR, Friedman D, Rose J, Jakubowski W (1997) An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Appl Environ Microbiol* 63:3669–3675
- State of Queensland EPA (2005) Queensland water recycling guidelines. The State of Queensland environmental protection agency. Brisbane, Australia. <http://www.epa.qld.gov.au/publications>
- U.S. Environmental Protection Agency (1995) Virus monitoring protocol for the information collection requirement rule: ICR-EPA Manual EPA/814-B-95-002. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Government Printing Office, Washington DC, USA
- U.S. Environmental Protection Agency (1999) Method 1623. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by filtration/IMS/FA. EPA/821/R-99-006. U.S. Environmental Protection Agency. Government Printing Office, Washington DC, USA
- U.S. Environmental Protection Agency (2003) National primary drinking water legislation: long term 2 enhanced surface water treatment rule; proposed rule. Federal register, 40 CFR Parts 141 and 142, 68 No. 154. Washington, DC, USA
- U.S. Environmental Protection Agency (2004) Guidelines for Water Reuse EPA/624/R-04/108. Washington, DC. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Government Printing Office, Washington DC, USA
- U.S. Environmental Protection Agency (2006) National primary drinking water regulations: ground water rule; final rule (40 CFR Parts 9, 141, and 142). Federal register 71: 65573–65660. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC, USA
- U.S. National Research Council (1998) Issues in Potable Reuse. The Viability of Augmenting Drinking Water Supplies with Reclaimed Water. Washington, DC, USA. National Research Council, National Academy Press
- Zimmer JL, Slawson RM (2002) Potential repair of *Escherichia coli* DNA following exposure to UV radiation from both medium- and low-pressure UV sources used in drinking water treatment. *Appl Environ Microbiol* 68:3293–3299





### 3.2. ARTICLE 2

**Autors:** Míriam Agulló-Barceló, Francesc Oliva i Francisco Lucena

**Títol:** *Alternative indicators for monitoring Cryptosporidium oocysts in reclaimed water*

**Revista:** Environmental Science and Pollution Research (2012)

## RESUM

### Introducció

Els plans de seguretat de l'aigua són un instrument clau en el control de la qualitat de l'aigua potable i per tant, un sistema equivalent per al control de l'aigua regenerada suposaria una gran millora en la seva gestió.

Degut a les dificultats en la detecció de patògens a l'aigua regenerada (baixes concentracions, metodologies complexes, etc.), s'utilitzen microorganismes model (amb funció índex o bé amb funció indicadora) per valorar tant la qualitat de l'aigua com l'efectivitat dels tractaments que s'apliquen durant la regeneració. En els últims anys alguns indicadors com ara fags somàtics i espores de clostridis reductors del sulfit (SOMCPH i SRC respectivament) s'han utilitzat de forma alternativa als habituals (*E. coli*, coliforms fecals) ja que els primers permeten fer un seguiment més acurat de l'eficiència dels tractaments. L'ús d'aquests indicadors alternatius ha anat guanyant adeptes en la comunitat científica ja que s'ha observat que poden ser molt útils.

Com ja s'ha comentat a la introducció d'aquesta tesi, *Cryptosporidium* s'ha convertit en un patògen de referència pel que fa als intents de relacionar-lo amb algun indicador de contaminació fecal en concret ja que al llarg de la història s'han descrit molts brots de criptosporidiosi lligats a aigües contaminades. Tot i així, la legislació espanyola que regula la qualitat de l'aigua regenerada, el RD 1620/2007, està basada en *E. coli* com a indicador clàssic de contaminació fecal, i no contempla aquest patògen tot i que s'ha descrit que *E. coli* podria no ser massa efectiu en relació a la protecció de malalties causades per protozous.

En aquest estudi, s'han seleccionat 3 microorganismes model com a possibles indicadors de *Cryptosporidium*: *E. coli*, ja que és el que està inclòs a la legislació, SRC i SOMCPH ja que han estat proposats amb anterioritat com a possibles indicadors alternatius de qualitat, amb l'objectiu de valorar quin d'ells és el més adequat per indicar la presència d'oocists de *Cryptosporidium* totals i infecciosos.

### Resultats i discussió

#### Concentració de microorganismes model i *Cryptosporidium*

Les concentracions dels microorganismes indicadors a l'aigua residual crua són significativament més elevades que les dels oocists de *Cryptosporidium*. Tots ells

disminueixen significativament al llarg del tractament, tot i així, les proporcions relatives en cada tipus d'aigua (entrada, efluent secundari o efluent terciari) varien, indicant que els tractaments tenen un efecte diferencial segons el tipus de microorganisme. Les SRC van ser l'indicador més resistent, essent la seva reducció des de l'aigua d'entrada a l'efluent terciari de 2,7 uLog. D'altra banda, la reducció d'*E. coli* i de SOMCPH van ser de 5,24 i 4,24 uLog respectivament.

A l'efluent terciari (ET), es van detectar un 21,4% de mostres positives per IOO (oocists infecciosos) i un 88,1% per TOO (oocists totals). Aquesta diferència suggereix que els tractaments terciaris (de desinfecció) són més eficients en la reducció de la infectivitat que no pas en la presència d'oocists.

D'altra banda, també s'ha observat una distribució estacional amb un marcat increment de les concentracions de *Cryptosporidium* durant els mesos d'estiu. Aquest resultat coincideix amb un pic estiuenc pel que fa al número de casos de criptosporidiosi registrats al butlletí epidemiològic setmanal (BES).

#### Funció indicadora dels microorganismes model

En comparar la reducció de l'efluent secundari (ES) a l'ET dels microorganismes model, s'observen diferències significatives entre *Cryptosporidium* (TOO i IOO) i els indicadors *E. coli* i SOMCPH. En canvi, les SRC es redueixen de manera semblant als IOO, però no gaire semblant als TOO. Tot i així, hi ha una correlació forta ( $r = 0,76$ ) entre SRC i TOO però una correlació dèbil ( $r = 0,034$ ) entre SRC i IOO.

#### Funció índex dels microorganismes model

El percentatge de coincidència de TOO amb SRC, SOMCPH i *E. coli*, va ser de 86,5%, 54,1% i 27% respectivament. En fer-ho amb IOO, els percentatges van ser de 16,2% per SRC i SOMCPH i de 5,4% per *E. coli*. Les anàlisis de regressió múltiple van assenyalar que la combinació dels 3 microorganismes model resultava en una correlació ( $R^2$ ) de 0,64 amb TOO. L'ús de SOMCPH i SRC presentava una correlació pràcticament idèntica ( $R^2 = 0,63$ ) indicant que la *E. coli* no és una variable predictora adequada ja que el seu ús no té cap efecte en el coeficient de correlació. Les anàlisis de regressió múltiple amb IOO van mostrar valors molt baixos de correlació ( $R^2 = 0,13$ ) amb els 3 microorganismes model combinats. Aquests resultats donen suport a la idea que l'ús d'un altre microorganisme model, a part de la *E. coli*, seria útil sobretot en l'avaluació del risc associat a *Cryptosporidium*.

Les anàlisis de regressió simple en mostres d'ET van mostrar una correlació no significativa ( $r = 0,21$ ) entre SRC i IOO i una correlació significativa i forta ( $r = 0,85$ ) entre SRC i TOO. Uns valors tan elevats (0,85) no s'havien trobat fins al moment, tot indicant que de manera general, les SRC es poden utilitzar com a indicadors de procés de *Cryptosporidium*. Pel que fa a la relació amb IOO, és possible que la incertesa associada a la metodologia de detecció així com les baixes concentracions de *Cryptosporidium* en els efluent terciaris hagin tingut una gran influència en els resultats obtinguts.

### Anàlisi discriminant

Per intentar relacionar les concentracions dels microorganismes model, tant en combinació com sols, amb la presència/absència d'IOO, es van fer anàlisis discriminants tot seguint la funció discriminant quadràtica, ja que és la que s'adequava millor a les dades. El percentatge més elevat de mostres ben classificades (94,6%) corresponia a la combinació de tots tres microorganismes, seguit de la combinació EC/SOMCPH amb 91,9% i SRC/SOMCPH amb un 83,8% de mostres classificades correctament. Les anàlisis discriminants amb TOO, en canvi, van mostrar baixos percentatges de mostres ben classificades (< 71%) i alts percentatges de falsos negatius (> 24%).

### **Conclusions**

---

De tots els indicadors estudiats, només les SRC van mostrar un gran potencial com a indicadors tant de la incidència com del comportament de TOO. Els SOMCPH van mostrar millors resultats que *E. coli* però no tan bons com les SRC. Tot i així, les anàlisis discriminants ens indiquen que l'ús de SOMCPH en combinació amb *E. coli* és útil en la determinació de la presència/absència d'IOO. Per tant, recomanem que s'utilitzi com a mínim un indicador més, a part de la *E. coli*, com a paràmetre de qualitat en aigua regenerada. L'elecció de la combinació, SRC/*E. coli* o bé SOMCPH/*E. coli*, podria variar en funció de cada cas.

### INFORME SOBRE EL FACTOR D'IMPACTE - ARTICLE 2

L'article *Alternative indicators for monitoring Cryptosporidium oocysts in reclaimed water* va ser publicat online el 18 de desembre de 2012 a la revista *Environmental Science and Pollution Research*, que està dins del Q1 en la temàtica d'*Environmental Sciences*. L'any 2011, la revista va presentar un índex d'impacte de 2,651.

### INFORME DE PARTICIPACIÓ - ARTICLE 2

La doctoranda Míriam Agulló-Barceló ha dut a terme totes les anàlisis d'oocists totals i infecciosos de *Cryptosporidium* (concentració, elució, purificació, detecció i assajos d'infectivitat) necessàries per al desenvolupament de l'article i ha participat activament en les anàlisis dels indicadors microbians. També és responsable tant de la recollida de mostres com del seu transport i de la logística de les campanyes de mostreig. D'altra banda, la doctoranda s'ha encarregat del processament i organització de totes les dades i d'una part de les anàlisis estadístiques. Finalment, ha participat activament en la discussió dels resultats i ha redactat l'article en tot el seu conjunt.

Dr. Francisco Lucena Gutiérrez

# Alternative indicators for monitoring *Cryptosporidium* oocysts in reclaimed water

M. Agulló-Barceló · F. Oliva · F. Lucena

Received: 18 September 2012 / Accepted: 2 December 2012  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

**Abstract** With the widespread use of reclaimed water all over the world, there is a clear need to optimise its management in order to guarantee water safety. Model microorganisms (with either indicator or index function) are commonly used to assess risks related to the presence of enteric pathogens in water. Samples from five water reclamation plants located in Northeastern Spain were analysed to validate the use of three model microorganisms (*Escherichia coli*, somatic coliphages and spores of sulphite-reducing clostridia) as surrogates of *Cryptosporidium* total or infectious oocysts (TOO and IOO, respectively) in reclaimed water. Probability plots, simple and multiple linear regression and discriminant analyses were performed to assess their relationships. Results show that the detection of *E. coli* alone is not useful to model either the behaviour or concentrations of *Cryptosporidium*. However, discriminant analyses showed a high rate of correctly classified samples (91.9 %) when *E. coli* and somatic coliphages data were used together to predict the presence/absence of IOO. Spores of sulphite-reducing clostridia (SRC) showed parallel reduction patterns and high correlation values ( $r=0.76$ ) with reductions in TOO. Furthermore, simple regression analyses of SRC and TOO in reclaimed water showed high correlation values ( $r=0.85$ ).

Therefore, at the treatment plants studied, SRC can be considered to have good indicator and index functions for TOO. From the point of view of health protection, the use of SRC together with *E. coli* (which is mandatory in the current Spanish regulations) would satisfy the need for improved reclaimed water management.

**Keywords** *Cryptosporidium* · Reclaimed water · Indicator · Spores of sulphite-reducing clostridia · *E. coli* · Somatic coliphages

## Introduction

Water safety plans are a key instrument for the quality control of drinking water, therefore, an equivalent system for reclaimed water, would improve the control of tertiary treatments and the quality of the final effluent. The widespread use of reclaimed water for non-potable purposes (due to permanent or periodic water scarcity) as well as the unremitting trend towards planned or unplanned potable reuse all over the world requires a much more reliable system for monitoring water quality, since the presence of enteric pathogens represents a health risk for users.

However, the detection of pathogens may face some difficulties: concentrations of most pathogens are generally low, even in non-treated wastewater; expensive and complicated methods; and low recovery rates. As a consequence, even standardised methods and molecular techniques are associated with a high level of uncertainty (Jofre and Blanch 2010). The use of model microorganisms (with index or indicator function) can overcome some of these disadvantages; and they have been used for years to assess microbiological quality of water and the functioning of water treatments (Lucena and

---

Responsible editor: Robert Duran

---

M. Agulló-Barceló · F. Lucena (✉)  
Department of Microbiology, Faculty of Biology,  
Universitat de Barcelona, 643 Avinguda Diagonal,  
08028 Barcelona, Spain  
e-mail: flucena@ub.edu

F. Oliva  
Department of Statistics, Faculty of Biology,  
Universitat de Barcelona, 643 Avinguda Diagonal,  
08028 Barcelona, Spain

Jofre 2010). In the last 20 years, alternative indicators such as bacteriophages or spores of sulphite-reducing clostridia have gained acceptance (Costán-Longares et al. 2008; Durán et al. 2003; Payment and Franco 1993). These microorganisms meet more requirements of a good indicator (Medema et al. 2003) than the traditional ones; they are much more resistant than *Escherichia coli* and in general allow a more efficient monitoring of water treatments. Although the different persistence of process indicators is used to monitor treatment efficiencies, it has been reported that the main factors affecting correlations between indicators and pathogens are the sample size and the percentage of positive samples (Wu et al. 2011), and that correlations between any pathogen and any indicator are random, site specific or time specific (Payment and Locas 2011). Although it is known that no single indicator will reflect exactly either the behaviour or the number of a given pathogen, the study of their relationship is necessary to improve reclaimed water management.

*Cryptosporidium* has been a reference pathogen in the attempts to determine the relationship between pathogens and indicators, and in fact it has been included in 17 % of the studies performed in the last 40 years (Wu et al. 2011). Hence, the rationale behind evaluating bacterial indicators for *Cryptosporidium* is that: (1) health risks related to *Cryptosporidium* in reclaimed water (Gennaccaro et al. 2003), drinking water (WHO 2009) and in recreational waters (Amburgey et al. 2012; Polgreen et al. 2012) have been well documented all over the world; (2) there are no therapeutic measures or vaccines due to inadequate understanding of its immunopathogenesis in humans (Kothavade 2011) and (3) molecular tools for assessing viability and infectivity of *Cryptosporidium* are still under developmental and validation stages (Kothavade et al. 2012).

In Spain, regulations on the microbiological quality of reclaimed water (RD 1620/2007 2007) consider the detection of a number of pathogens, but are based mainly on *E. coli* as the indicator of faecal contamination, although it has been described that it may not be useful to protect against protozoan diseases (Harwood et al. 2005; IAWPRC Study group on health related water microbiology 1991; Wu et al. 2011).

In this study we selected three model microorganisms as possible surrogates of *Cryptosporidium*: first, *E. coli*, the indicator mentioned in the Spanish regulations; second, somatic coliphages; and third, spores of sulphite-reducing clostridia. Both of the latter have been proposed as alternatives in previous studies (Costán-Longares et al. 2008; Harwood et al. 2005; Payment and Franco 1993; Payment and Locas 2011; Rubiano et al. 2011). The objective of the study was to evaluate the use of these traditional and alternative faecal indicators to assess the presence of total and infectious *Cryptosporidium* oocysts in reclaimed waters in Catalonia, Northeastern Spain, in order to supply additional

information for stakeholders aiming to improve reclaimed water safety and management.

## Materials and methods

### Water reclamation plants

Five water reclamation plants located in different areas of Catalonia were selected for this study. All apply a biological secondary treatment based on activated sludge and decantation. Tertiary treatments are mainly based on sand filtration plus disinfection. All treatment plants use chlorination and three of them also use UV irradiation.

Reclaimed water has various reuse purposes, such as the irrigation of golf courses and public and private gardens and other non-potable urban uses such as street cleaning and fire fighting. All the treatment plants meet the Spanish regulations on the specific reuse of reclaimed water (RD 1620/2007 2007).

### Sampling

Twenty-five samples of raw wastewater (RW), 32 samples of secondary effluent (SE) and 42 samples of tertiary effluent (TE) were taken to determine the occurrence and levels of model microorganisms and *Cryptosporidium* total and infectious oocysts (TOO and IOO respectively). Water samples were taken in sterile containers under aseptic conditions and a solution of 3 % thiosulphate was used to neutralise chlorinated TE samples. Large volumes of TE for the analysis of *Cryptosporidium* were concentrated in situ using filtrating capsules.

Samples were collected over 3 years (2008 to 2010) in different sampling campaigns that took place either on a monthly basis or in punctual samplings, depending on the treatment plant. All samples were collected in the morning (from 10 a.m. to 13 p.m.) and immediately stored in a cool box on ice packs until the analysis. Filtrating capsules for *Cryptosporidium* were also stored in the cool box after concentration. For all microorganisms, the analysis started upon arrival; within 6±2 h of sampling collection.

### Quantification of model microorganisms

*E. coli* (EC), somatic coliphages (SOMCPH) and spores of sulphite-reducing clostridia (SRC) were selected as model microorganisms. *E. coli* was quantified by membrane filtration using 47-mm cellulose acetate filters with a nominal pore size of 0.45 µm (Millipore, Bedford, USA), and incubated on Chromocult® Coliform Agar with *E. coli*/coliform Selective Supplement (Merck KGaA, Germany) for 20±4 h

at 44 °C. SRC were cultured on SPS agar medium (Bufton 1959) for 24 h at 44 °C. SOMCPH were enumerated by the double-agar-layer method following the ISO standard 10705–2 (Anonymous, 2000).

In tertiary effluents, the maximum volume analysed was 10 mL, therefore, the detection limit was 10 CFU or PFU/100 mL for all the model microorganisms.

Quantification of *Cryptosporidium*

*Cryptosporidium* total and infectious oocysts were enumerated as described in Montemayor et al. (2005) and modified as described in Agulló-Barceló et al. (2012). Briefly, all samples were sieved prior to concentration. RW and SE samples were concentrated using membrane filtration (Shepherd and Wyn-Jones 1995). Samples of TE were concentrated and eluted with Envirocheck® Capsules following USEPA 1623 (USEP 2005). Volumes ranged from 0.08 to 0.75 L for RW, from 0.32 to 2 L for SE and from 10 to 65 L for TE samples. Oocyst purification was performed using immunomagnetic separation (IMS) with the Dynabeads Anti-*Cryptosporidium* kit (Dynal, A.S., Oslo, Norway) using a modified version of the manufacturer’s instructions (Reynolds et al. 1999). After purification, the final volume was divided into different tubes for the detection of TOO and for the infectivity assay. Detection of TOO was performed with one of the subsamples. Oocysts were stained with EasyStain™ antibody following the manufacturer’s instructions and were then examined with Laser Scanning Cytometry (LSC). The infectivity assay was performed with another subsample using a modified version of the focus detection method described by Slifko et al. (1997). Purified oocysts were used to infect HCT8 cell monolayers; samples were labelled with the A600FLR-20X Sporo-Glo antibody and the C101 counterstain reagent (Waterborne™, Inc., New Orleans, LA) following the manufacturer’s instructions.

The detection limit ranged from 0.015 to 0.1 oocysts per litre in tertiary effluents. This limit depended on the volume analysed which, in turn, depended on the sample turbidity.

Statistical analyses

MiniTab® 16.0 statistical software and Statgraphics Plus 5.1 were used to perform the following analyses: (1) descriptive statistics; (2) simple and multiple linear regression analyses and Pearson correlations to test for dependence between model microorganisms and *Cryptosporidium*; (3) discriminant analyses to establish whether any model microorganisms or any combination of them could predict the presence/absence of IOO. Discriminant analyses were performed with the quadratic model. Cross-validation method was applied in order to evaluate the performance of the discriminant rule.

For the descriptive statistics of the concentrations, all the results were divided into three groups depending on the origin of the water: raw wastewater, secondary effluent and tertiary effluent. When values were under a specific detection limit, this limit was used for the statistical analysis. For the regression and correlation studies, as well as for the discriminant analyses, only data from tertiary effluents were used. In simple and multiple regression analyses, outliers were detected and removed from the data on the basis of large standardised values.

All the analyses were performed at a significance level of 0.05. Therefore, every statistically significant result has a *p* value < 0.05.

Results and discussion

Occurrence and levels of model microorganisms and *Cryptosporidium*

Mean concentrations, percentage of positive samples and sample size are shown in Table 1. In RW, SOMCPH and EC presented similar concentrations; SRC presented the lowest. In SE, concentrations of SOMCPH were higher than EC, although they were still similar. There was a significant reduction of all model microorganisms from the influent water to SE.

In TE, SRC concentrations were the highest, followed by SOMCPH; EC were the lowest. These results suggest that

Table 1 Mean concentrations of indicators and *Cryptosporidium*

Mean Concentrations		<i>n</i>	RW	%(+)	<i>n</i>	SE	%(+)	<i>n</i>	TE	%(+)
Indicators (Log <sub>10</sub> units of CFU or PFU/100 mL)	EC	24	6.53	100	32	4.50	100	37	1.29	27
	SOMCPH	25	6.55	100	32	4.79	100	37	2.01	64.9
	SRC	25	5.11	100	32	3.70	100	42	2.40	100
<i>Cryptosporidium</i> (Log <sub>10</sub> units of oocysts/L)	TOO	25	1.44	88	32	0.86	100	42	0.17	88.1
	IOO	16	1.09	87.5	32	0.26	66.7	42	-1.08	21.4

EC *E. coli*, SOMCPH somatic coliphages, SRC spores of sulphite-reducing clostridia, TOO *Cryptosporidium* total oocysts, IOO *Cryptosporidium* infectious oocysts, RW raw wastewater, SE secondary effluent, TE tertiary effluent; *n* number of samples, “%(+)” percentage of positive samples



EC and SOMCPH were removed more efficiently during the water treatment than SRC, which were more resistant. All the indicators decreased significantly from the influent water to the final effluent. The concentrations of the model microorganisms are similar to others previously described in this geographical area (Costán-Longares et al. 2008; Montemayor et al. 2005).

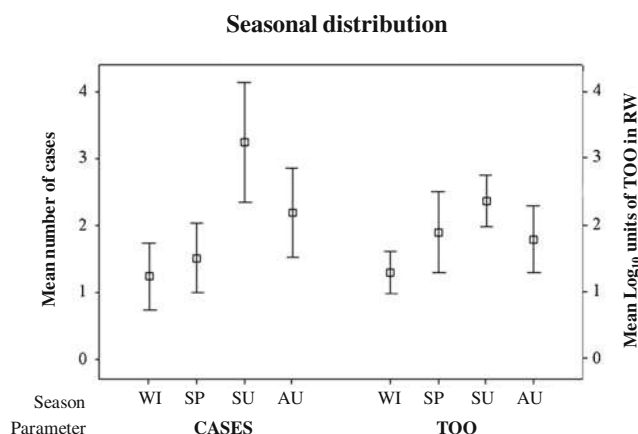
Concentrations of TOO and IOO decreased significantly during treatment. Log<sub>10</sub> reductions from influent to reclaimed water were 1.27 for TOO and 2.17 for IOO, indicating that IOO were more efficiently removed than TOO. In fact, IOO were detected in 21.4 % of reclaimed water samples, and TOO in 88.1 %. Similar percentages of positive samples as well as *Cryptosporidium* concentrations have been described elsewhere in similar water types (Costán-Longares et al. 2008; Harwood et al. 2005). The low percentage of IOO in this study is probably due to the fact that disinfection processes in the tertiary treatment have a stronger effect on infectivity than the presence of oocysts. Rates of removal differed between the indicators, between indicators and pathogens, and between TOO and IOO throughout the reclamation process, indicating that a given treatment has distinct effects on the various microbial parameters. Previous studies have reported similar results (Costán-Longares et al. 2008; Harwood et al. 2005; Mandilara et al. 2006).

#### Seasonal distribution of *Cryptosporidium*

Samples of RW, SE and TE were pooled apart depending on the sampling season and on the water type in order to observe whether a seasonal distribution existed and, if so, in which type of sample. All water types showed higher concentrations in summer than in the other seasons: mean concentrations of TOO in summer were 2.36, 1.29 and 0.31 log<sub>10</sub> units/L in RW, SE and TE, respectively. These results are in agreement with the weekly reported cases of cryptosporidiosis in Spain during the same period (see Fig. 1). The summer peak of TOO has not been reported before in Catalonia; it may be due to the fact that the treatment plants studied here are located in tourist areas, where there is a high increase in the population during the summer period. Moreover, it is in summer when recreational water activities are more common, which contributes to the water transmission of *Cryptosporidium*.

#### Indicator function of model microorganisms: reduction from SE to TE

Concentrations of model microorganisms and *Cryptosporidium* (TOO and IOO) were available in 32 SE samples and in their paired TE samples. Reductions from SE to TE were analysed to establish whether any of the indicators behaved



**Fig. 1** Seasonal distribution of the weekly reported cases in Spain (Cases) and of the concentrations of TOO (*Cryptosporidium* total oocysts) in RW. The white box shows the mean concentrations and bars are showing 95 % confidence intervals. RW raw wastewater, WI winter, SP spring, SU summer, AU autumn

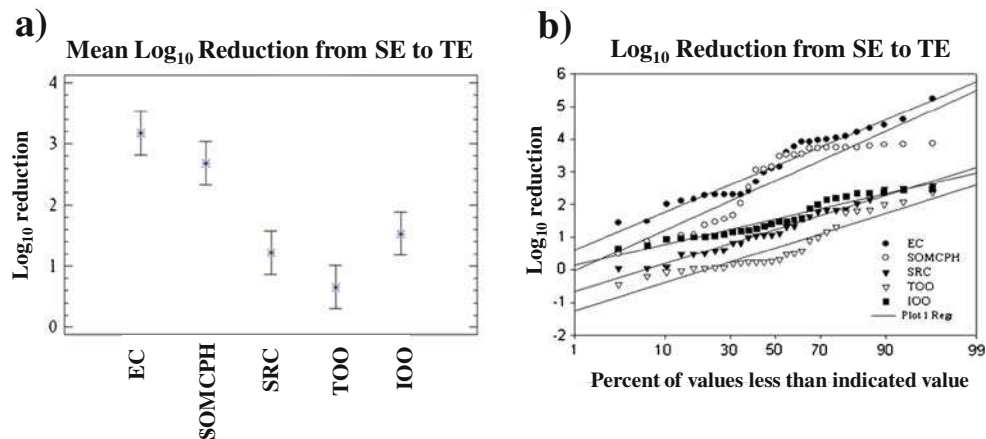
in a similar way to *Cryptosporidium*. Figure 2 shows mean reductions (a) and probability plots (b) of the reductions obtained by all microorganisms from SE to TE.

EC and SOMCPH mean reductions were the highest (3.17 and 2.68 log<sub>10</sub> units, respectively) and followed a similar pattern. Mean reduction of SRC lagged far behind that of the other model microorganisms (1.22 log<sub>10</sub> units); nonetheless, it resembled the reduction of TOO and IOO (0.66 and 1.53 log<sub>10</sub> units, respectively). SRC and TOO presented the same reduction pattern despite treatment, since the regression lines of the reduction were parallel (see Fig. 2b). In contrast, comparison of mean reductions showed significant differences between SRC and TOO. There were no significant differences between reductions of SRC and IOO; however, the IOO regression line in the probability plot was not parallel to that of SRC.

To explore the indicator function of SRC for *Cryptosporidium* in more depth, simple linear regression analyses of the reduction from SE to TE were performed. A significant and strong correlation ( $r=0.76$ ) was found between SRC and TOO reductions (1):

$$\text{TOO reduction} = -0.2949 + 0.7918 \times \text{SRC reduction} \quad (1)$$

These data may be useful in the quantitative assessment of the risk associated with *Cryptosporidium* at the treatment plants studied here. In contrast, the same analyses performed with IOO showed no significant correlation ( $r=0.034$ ). These results suggest that the mere comparison of mean reductions (in the case of SRC, TOO and IOO) may not be precise enough because the inactivation of TOO and SRC correlated well, but the comparison of mean reductions showed significant differences between them.



**Fig. 2** a Log<sub>10</sub> reduction of the microbial parameters from SE (secondary effluent) to TE (tertiary effluent). Symbol *asterisk* shows mean concentrations and bars show 95 % confidence interval. EC *E. coli*, SOMCPH somatic coliphages, SRC spores of sulphite-reducing clostridia, TOO *Cryptosporidium* total oocysts and IOO *Cryptosporidium*

Index function of model microorganisms: multiple and simple regression

The occurrence of each model microorganism was compared to that of TOO and IOO in order to assess co-occurrence events in each case. The trend of co-occurrence between indicators and TOO was SRC>SOMCPH>EC, with percentages of 86.5, 54.1 and 27 %, respectively. Therefore, occurrence of TOO was more likely to be associated with SRC than with SOMCPH or EC occurrences. In the case of IOO, the co-occurrence percentages were low: 16.2 % for SRC and SOMCPH and 5.4 % for EC, suggesting that the occurrence of IOO was not related to the occurrence of any of the model microorganisms tested here.

Multiple regression was performed to assess whether model microorganisms (predictor variables) can be used to predict *Cryptosporidium* TOO or IOO concentrations in TE samples ( $n=37$ ). The combination of the three (EC, SRC and SOMCPH) showed a high correlation value ( $R^2=0.64$ ), indicating their capability to predict concentrations of TOO when used together. The effect of SRC and SOMCPH on the prediction was significant, whereas the effect of EC was not. Multiple regression performed using only SRC and SOMCPH showed a high multiple correlation coefficient ( $R^2=0.63$ ), very similar to that obtained when using *E. coli* as well. These two findings suggest that the variable *E. coli* is not a good predictor of TOO densities. Multiple regression analyses performed with IOO and all the model microorganisms showed low correlations ( $R^2=0.13$ ). The relationship between SRC and IOO was significant, whereas the relationship of EC and SOMCPH with IOO was not.

Multiple regression analyses support the idea that the detection of a second model microorganism in addition to

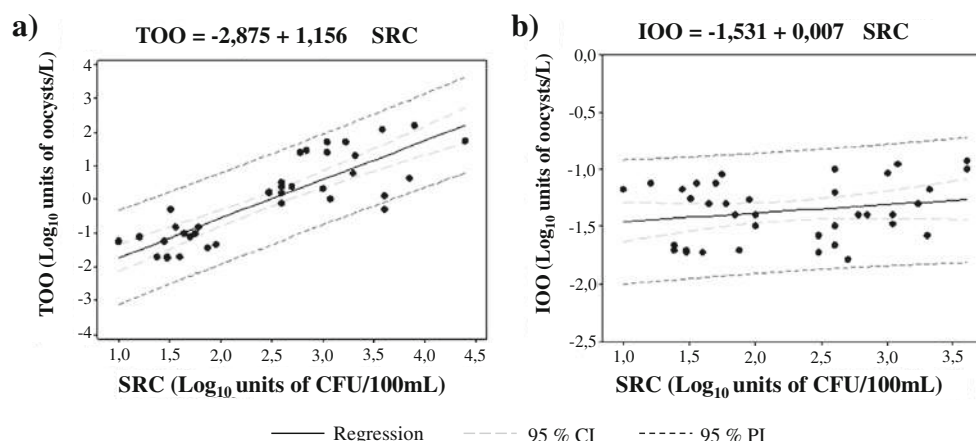
infectious oocysts. b Probability plot representing removal achieved for indicators and *Cryptosporidium* oocysts from SE to TE (black circle EC, while circle SOMCPH, black down-pointing triangle SRC, black square IOO, white down-pointing triangle TOO)

EC (which is mandatory) is useful for assessing the health risks associated with *Cryptosporidium* in reclaimed water (Costán-Longares et al. 2008).

Simple linear regression performed with EC, SOMCPH and *Cryptosporidium* (TOO or IOO) showed low, non-significant correlation values (data not shown). SRC data together with the corresponding TOO and IOO data ( $n=42$ ) were used for the simple regression analyses (see Fig. 3). There was no significant correlation between SRC and IOO ( $r=0.21$ ), whereas a significant and strong correlation ( $r=0.85$ ) was observed between SRC and TOO. This high correlation value between these two parameters has not been described before; it suggests that SRC are suitable indicators with index function of TOO in reclaimed waters. Furthermore, the low correlation values with IOO may be due to their low concentrations in reclaimed water samples, which in turn is directly related to the uncertainty of the detection methodology.

Although direct correlations between SRC and TOO showed high values in this study, there are some factors influencing the concentrations of *Cryptosporidium* in reclaimed water that should not be ruled out: (1) different concentrations in influent waters; (2) different reclamation treatments; (3) the geographical area of the treatment plants; (4) the seasonal variation in *Cryptosporidium* concentrations and (5) the uncertainty of the detection methods. In contrast, model microorganisms are subjected to fewer fluctuations. These differences between model microorganisms and *Cryptosporidium* make it more difficult to establish universal relationships between them. Nevertheless, these data suggest that in general, SRC can be used to assess TOO occurrence and levels. In fact, SRC are currently used as an indicator of *Cryptosporidium* in Spanish drinking

**Fig. 3** Simple regression analyses between SRC (spores of sulphite-reducing clostridia) and *Cryptosporidium* concentrations. **a** Between SRC and TOO (*Cryptosporidium* total oocysts);  $r=0.85$  ( $p$  value=0.000). **b** Between SRC and IOO (*Cryptosporidium* infectious oocysts);  $r=0.21$  ( $p$  value=0.2). Concentrations are expressed in  $\log_{10}$  units of UFC/100 mL for SRC and  $\log_{10}$  units of oocysts/litre for *Cryptosporidium*



water regulations (RD 140/2003 2003) and have been used previously as water treatment surrogates for parasites (Hill et al. 2002; Venczel et al. 1997). Moreover, SRC have been used to assess *Cryptosporidium* risk in a recent study showing that this could be a conservative strategy for risk assessment (Agulló-Barceló et al. 2012).

Correlation studies between model microorganisms and infectious *Cryptosporidium* are scarce, and the methodology used for their detection is associated with a high level of uncertainty. More studies with larger datasets are needed to improve our understanding of the effectiveness of these microorganisms to predict IOO concentrations.

Presence/absence of infectious oocysts (IOO): discriminant analyses

No single model microorganism or any combination of them showed the ability to assess the behaviour (indicator function) or levels (index function) of IOO. Therefore, IOO observations were converted to binary data indicating presence/absence. Discriminant analyses were performed to establish whether these model microorganisms could predict presence or absence of IOO. Different discriminant functions were tested to fit the discriminant rule: linear, logistic

and quadratic discriminant functions. The quadratic discriminant function showed the best performance.

Analyses showed that EC, on its own, is not useful for predicting the presence/absence of IOO; it obtained 75.7 % of accurately classified samples and 10.8 % of false negatives. Combinations of EC/SOMCPH, EC/SRC, EC/SRC/SOMCPH and SRC/SOMCPH were used to predict the presence/absence of IOO (see Table 2). The highest percentage (94.6 %) of well-classified samples was obtained with the combination of all model microorganisms (EC/SRC/SOMCPH), followed by EC/SOMCPH (91.9 %), SRC/SOMCPH (83.8 %) and finally EC/SRC (81.1 %). In addition, discriminant analyses also showed false positives and false negatives. Percentages of false negatives were low in the SRC/SOMCPH combination (2.7 %) and non-existent in the rest. As the detection limit depends on the volume, discriminant analysis in this study predicted presence or absence of IOO in an average volume of  $30.5 \pm 16.2$  L. The prediction of the presence/absence of TOO with all the indicators showed low percentages of well-classified samples (<71 % in any of the combinations) and high percentages of false negatives (>24 % in any of the combinations), suggesting that the presence/absence of TOO cannot be accurately predicted with these indicators.

Although a higher proportion of false positives for IOO means an overestimation of health risks, this situation is preferable to an underestimation in which reclaimed water is considered safe when it is not. Nevertheless, the optimal situation would be to reach a compromise that minimises the two types of error (Costán-Longares et al. 2008). SOMCPH and SRC (in this order) are the model microorganisms that best complement EC to establish the safety of reclaimed water linked to the absence of IOO.

**Table 2** Percentage of correctly classified samples, false positives and false negatives from the discriminant analysis (quadratic method with cross-validation) to predict presence/absence of infectious *Cryptosporidium* oocysts

Combination of model microorganisms	Well-classified	False positive	False negative
EC+SRC+SOMCPH	94.6 % (35/37)	5.4 % (2/37)	0 % (0/37)
EC+SOMCPH	91.9 % (34/37)	8.1 % (3/37)	0 % (0/37)
SOMCPH+SRC	83.8 % (31/37)	13.5 % (5/37)	2.7 % (1/37)
EC+SRC	81.1 % (30/37)	18.9 % (7/37)	0 % (0/37)

EC *E. coli*, SOMCPH somatic coliphages, SRC spores of sulphite-reducing clostridia

**Conclusions**

Only SRC showed great potential as predictors of TOO occurrence and behaviour, since significant, strong correlations

between reductions and concentrations of both microorganisms were observed. SOMCPH showed better capability than *E. coli*, but not as good as SRC, as indicators of *Cryptosporidium* concentrations. However, the usefulness of SOMPCH increases significantly when used together with any of the other indicators tested here, especially for the prediction of the presence/absence of IOO. Thus, since *E. coli* is not able to predict either the behaviour or the occurrence of *Cryptosporidium*, at least one more model microorganism should be included in the Spanish regulations. Therefore, the combination of SRC and EC appears to be an adequate alternative for improving reclaimed water management.

**Acknowledgements** This research was carried out within the framework of the SOSTAQUA project (CENIT 2007–1039) and the Generalitat de Catalunya (2009-SGR-01043). Míriam Agulló-Barceló is grateful to the Universitat de Barcelona for the doctoral grant (APIF).

**References**

Agulló-Barceló M, Casas-Mangas R, Lucena F (2012) Direct and indirect QMRA of infectious *Cryptosporidium* oocysts in reclaimed water. *J Water Health* 10(4):539–548. doi:10.2166/wh.2012.082

Amburgey JE, Walsh KJ, Fielding RR, Arrowood MJ (2012) Removal of *Cryptosporidium* and polystyrene microspheres from swimming pool water with sand, cartridge, and precoat filters. *J Water Health* 10(1):31–42. doi:10.2166/wh.2011.062

Anonymous (2000) ISO 10705–2. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2. Enumeration of somatic coliphages. International Standardisation Organisation Geneva, Switzerland

Buflon AW (1959) A note on the enumeration of thermophilic sulphite-reducing bacteria. *J Appl Bacteriol* 22:278–280

Costán-Longares A, Montemayor M, Payán A, Méndez J, Jofre J, Mujeriego R, Lucena F (2008) Microbial indicators and pathogens: removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. *Water Res* 42:4439–4448. doi:10.1016/j.watres.2008.07.037

Durán AE, Muniesa M, Mocé-Llivina L, Campos C, Jofre J, Lucena F (2003) Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination. *J Appl Microbiol* 95:29–37. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.t01-1-01948.x

Gennaccaro AL, McLaughlin MR, Quintero-Betancourt W, Huffman DE, Rose JB (2003) Infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in final reclaimed effluent. *Appl Environ Microbiol* 69:4983–4984. doi:10.1128/AEM.69.8.4983-4984.2003

Harwood VJ, Levine AD, Scott TM, Chivukula V, Lukasik J, Farrah SR, Rose JB (2005) Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl Environ Microbiol* 71:3163–3170. doi:10.1128/AEM.71.6.3163-3170.2005

Hill VR, Kantardjieff A, Sobsey MD, Westerman PW (2002) Reduction of enteric microbes in flushed swine wastewater treated by a biological aerated filter and UV irradiation. *Water Environ Res* 74:91–99

IAWPRC Study group on health related water microbiology (1991) Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res* 25:529–545. doi:10.1016/0043-1354(91)90126-B

Jofre J, Blanch AR (2010) Feasibility of methods based on nucleic acid amplification techniques to fulfil the requirements for microbio-

logical analysis of water quality. *J Appl Microbiol* 109:1853–1867. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04830.x

Kothavade RJ (2011) Challenges in understanding the immunopathogenesis of *Cryptosporidium* infections in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30(12):1461–1472. doi:10.1007/s10096-011-1246-6

Kothavade RJ (2012) Potential molecular tools for assessing the public health risk associated with waterborne *Cryptosporidium* oocysts. *J Med Microbiol* 61:1039–1051. doi: 10.1099/jmm.0.043158-0

Lucena F, Jofre J (2010) Potential use of bacteriophages as indicators of water quality and wastewater treatment processes. In: Sabour P, Griffiths M (eds) *Bacteriophages in the control of food and waterborne pathogens*. ASM Press, Washington DC, pp 103–118

Mandilara GD, Smeti EM, Mavridou AT, Lambiri MP, Vatopoulos AC, Rigas FP (2006) Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. *FEMS Microbiol Lett* 263:119–126. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00414.x

Medema GJ, Hoogenboezem W, Van DV, Ketelaars HAM, Hijnen WAM, Nobel PJ (2003) Quantitative risk assessment of *Cryptosporidium* in surface water treatment. *Water Sci Technol* 47:241–247

Montemayor M, Valero F, Jofre J, Lucena F (2005) Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. *J Appl Microbiol* 99:1455–1462. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02737.x

Payment P, Franco E (1993) *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl Environ Microbiol* 59(8):2418–2424

Payment P, Locas A (2011) Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. *Ground Water* 49:4–11. doi:10.1111/j.1745-6584.2010.00710.x

Polgreen PM, Sparks JD, Polgreen LA, Yang M, Harris ML, Pentella MA, Cavanaugh JE (2012) A statewide outbreak of *Cryptosporidium* and its association with the distribution of public swimming pools. *Epidemiol Infect* 140(8):1439–1445. doi:10.1017/S0950268811000987

RD 1620/2007. (2007) Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. BOE no. 294. <http://www.boe.es/boe/dias/2007/12/08/pdfs/A50639-50661.pdf>. Accessed 17 September 2012.

RD 140/2003. (2003) Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE no. 45. <http://www.boe.es/boe/dias/2003/02/21/pdfs/A07228-07245.pdf>. Accessed 17 September 2012.

Reynolds DT, Slade RB, Sykes NJ, Jonas A, Fricker CR (1999) Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water: techniques for generating precise recovery data. *J Appl Microbiol* 87:804–813

Rubiano ME, Agulló-Barceló M, Casas-Mangas R, Jofre J, Lucena F (2011) Assessing the effects of tertiary treated wastewater reuse on a mediterranean river (Llobregat, NE Spain), part III: pathogens and indicators. *Environ Sci Pollut Res Int*. doi:10.1007/s11356-012-0886-0

Slifko TR, Friedman D, Rose JB, Jakubowski W (1997) An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Appl Environ Microbiol* 63:3669–3675

USEPA (2005) Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA.

Venczel LV, Arrowood M, Hurd M, Sobsey MD (1997) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. *Appl Environ Microbiol* 65:1598

WHO (2009) Risk assessment of *Cryptosporidium* in drinking water. World Health Organization, Geneva, Switzerland

Wu J, Long SC, Das D, Dorner SM (2011) Are microbial indicators and pathogens correlated? a statistical analysis of 40 years of research. *J Water Health* 9:265–278. doi:10.2166/wh.2011.117



### 3.3. ARTICLE 3

**Autors:** Míriam Agulló-Barceló, Raquel Casas-Mangas i Francisco Lucena

**Títol:** *Direct and indirect QMRA of infectious Cryptosporidium oocysts in reclaimed water.*

**Revista:** Journal of Water and Health, Volum 10 (4), pàgines 539-548 (2012)

#### RESUM

#### Introducció

La regeneració d'aigua és un procés nou i sostenible d'obtenció de recursos hídrics alternatius per a usos no potables. Catalunya ha sofert històricament, però cada vegada més, diversos episodis de manca d'aigua, i alguns d'ells han suposat la imposició de restriccions severes en l'ús de l'aigua. El RD 1620/2007 estableix els criteris de qualitat microbiològica de l'aigua regenerada en funció de l'ús que se'n vol fer. Aquests criteris es basen principalment en *E. coli*, però hi ha un ampli rang de patògens (com altres bacteris, virus i paràsits) que poden estar a l'aigua regenerada. En aquest sentit, per modelar tant la presència com el comportament d'aquests patògens, s'utilitzen indicadors alternatius com les SRC o els SOMCPH.

Com ja s'ha explicat a la introducció general, *Cryptosporidium* és l'agent causal de la criptosporidiosi. Al llarg dels últims anys s'han produït diversos brots de criptosporidiosi, entre els quals hi ha un dels brots de transmissió hídrica més gran, descrits fins al moment en països desenvolupats (Milwaukee, EEUU, 1993). Una de les característiques més importants d'aquest paràsit és que és molt resistent a les condicions ambientals i a tractaments de desinfecció àmpliament utilitzats com la cloració. Això ha portat a estendre l'ús de tractaments multibarrera, entesos aquests com la combinació de diversos processos fisicoquímics, per aconseguir una qualitat final adequada. Els processos de desinfecció que utilitzen llum UV han resultat ser molt efectius en la inactivació de *Cryptosporidium*.

Les valoracions de risc microbiològic permeten la quantificació dels riscos potencials associats a l'ús de l'aigua regenerada. Els estudis de QMRA en aigua regenerada han incrementat substancialment en els últims anys, tot demostrant que són una eina molt útil en l'estimació de riscos associats a la presència de patògens. Per tant, són un gran avantatge a l'hora d'establir si determinats tractaments són fiables i segurs des del punt de vista sanitari. Per dur a terme aquestes anàlisis es poden utilitzar directament les concentracions de patògens o també se'n pot fer una aproximació indirecta amb les concentracions d'indicadors específics. Així, aquest estudi es va plantejar amb l'objectiu de fer valoracions de risc microbiològic tant directes com indirectes, lligades a la presència de *Cryptosporidium*, en aigua regenerada.

## Resultats i discussió

Les concentracions d'ooïsts de *Cryptosporidium* així com de les SRC es van analitzar en 5 EDARs al llarg del tractament: entrada de la depuradora, efluent secundari i efluent terciari. Les concentracions d'ooïsts totals de *Cryptosporidium* (TOO) així com les d'SRC van disminuir significativament al llarg del tractament amb concentracions d'1,76, 1,02 i 0,04 TOO/L en E, ES i ET respectivament. Les concentracions d'SRC van ser 5,37, 3,81 i 2,64 uLog de CFU/100mL. Els resultats dels ooïsts infecciosos (IOO) es van separar en funció del tipus de tractament terciari aplicat: (1) tractaments que utilitzaven UV i (2) tractaments sense UV. Les concentracions d'IOO (en uLog) van ser <-4,32 IOO/L quan s'utilitzava UV i -0,45 IOO/L quan no s'utilitzava UV, i el percentatge d'infectivitat va ser del 0,0134% i de l'11,3971% respectivament. No hi va haver diferències estadísticament significatives entre les concentracions d'IOO i les d'SRC en els efluent terciaris, ni en els tractats amb UV ni en els no tractats amb UV.

El genotipat dels ooïsts trobats va permetre identificar les espècies a les quals pertanyien: un 87% de les mostres positives, van mostrar perfils de PCR-RFLP pertanyents a *C. hominis* i la seva seqüenciació va mostrar que tots formaven part de la família IbA10G2R2. Només dues mostres van donar perfils d'origen animal: *C. andersoni* i *C. muris*, espècies que infecten bestiar boví i rosegadors respectivament. Per tant, podem suposar que hi ha un alliberament continu d'ooïsts d'origen humà a l'ambient, cosa que coincideix amb la freqüència de persones que són portadores del paràsit a Espanya, que s'ha descrit que està entre el 0,4 i el 12,8%. D'altra banda, el registre del número de persones que desenvolupen la malaltia cada any, és molt petit, indicant un possible increment de la immunitat al paràsit degut a l'exposició constant a concentracions subclíniques d'ooïsts.

Per a les avaluacions de risc (QMRA), es va considerar que el pitjor escenari seria la ingestió accidental d'aigua regenerada. A més a més, es van considerar dos models dosi-resposta, el model exponencial i el model  $\beta$ -Poisson. La probabilitat d'infecció (PI) per *Cryptosporidium* amb el model exponencial, va ser  $3,69 \times 10^{-6}$  en ET tractats amb UV, mentre que va ser 3 uLog més elevada,  $1,89 \times 10^{-3}$ , en ET tractats sense UV. Amb el model  $\beta$ -Poisson, la PI mitjana va ser de  $1,56 \times 10^{-4}$  en mostres tractades amb UV, i 2 uLog més gran,  $4,37 \times 10^{-2}$ , en ET tractats sense UV.

Per al càlcul de PIs utilitzant els valors d'SRC, es van fer servir dues tècniques: (A) les concentracions d'SRC a l'ET i la ràtio entre SRC i IOO, i (B) les concentracions d'IOO a l'ES, la ràtio entre SRC i IOO en aquest efluent i la reducció de secundari a terciari d'SRC. L'ús d'SRC per a fer QMRA va mostrar PI més altes que quan s'utilitzaven els valors d'IOO directament. Aquesta observació suggereix que l'ús dels indicadors podria ser una eina conservadora per a la valoració dels riscos microbiològics lligats a *Cryptosporidium*.

## Conclusions

---

Les EDARs estudiades assoleixen una disminució estadísticament significativa de les concentracions de *Cryptosporidium* així com de les d'SRC. La reducció més gran s'obté quan s'utilitza UV en el tractament terciari. Això coincideix amb les dades de la PI de *Cryptosporidium*, que són 3 uLog més elevades quan no s'utilitza UV al tractament terciari, independentment del tipus de model dosi-resposta que s'utilitza. Per tant, els sistemes multibarrera de tractament d'aigües, poden garantir una millor qualitat de l'efluent final. A més a més, l'ús d'SRC per a fer valoracions de risc, podria ser una eina conservadora per a la determinació de riscos lligats a *Cryptosporidium*.



### INFORME SOBRE EL FACTOR D'IMPACTE - ARTICLE 3

L'article *Direct and indirect QMRA of infectious Cryptosporidium oocysts in reclaimed water* va ser publicat el desembre de 2012 a la revista *Journal of Water and Health*, dins del Q3 en la temàtica d'*Environmental Sciences*. L'Any 2011, la revista va presentar un índex d'impacte d'1,367.

### INFORME DE PARTICIPACIÓ - ARTICLE 3

La doctoranda Míriam Agulló-Barceló ha dut a terme totes les anàlisis de *Cryptosporidium* (tant totals com infecciosos) així com les anàlisis moleculars necessàries per a l'estudi epidemiològic de les espècies circulants de *Cryptosporidium* (extraccions de DNA, *nested-PCR-RFLP*, seqüenciacions) en les àrees estudiades. Ha participat en les anàlisis d'SRC i és responsable de la recollida de mostres i del seu transport. La doctoranda ha processat les dades i ha realitzat les anàlisis estadístiques, incloent-hi totes les valoracions de risc microbiològic (anàlisis QMRA). A més a més, ha participat activament en la determinació d'escenaris de risc i en la discussió dels resultats obtinguts. Finalment ha redactat tot l'article i ha participat activament en la seva difusió en diferents ocasions.

Dr. Francisco Lucena Gutiérrez

## Direct and indirect QMRA of infectious *Cryptosporidium* oocysts in reclaimed water

M. Agulló-Barceló, R. Casas-Mangas and F. Lucena

### ABSTRACT

Water scarcity leads to an increased use of reclaimed water, which in turn calls for an improvement in water reclamation procedures to ensure adequate quality of the final effluent. The presence of infectious *Cryptosporidium* oocysts (IOO) in reclaimed water is a health hazard for users of this resource. Here, we gathered information on *Cryptosporidium* (concentrations, infectivity and genotype) in order to perform quantitative microbial risk assessment (QMRA). Moreover, data concerning the spores of sulphite-reducing clostridia (SRC) were used to undertake QMRA at a screening level. Our results show that the probability of infection (PI) by *Cryptosporidium* depends on the tertiary treatment type. The mean PI using the exponential dose-response model was  $3.69 \times 10^{-6}$  in tertiary effluents (TE) treated with UV light, whereas it was 3 log<sub>10</sub> units higher,  $1.89 \times 10^{-3}$ , in TE not treated with this disinfection method. With the  $\beta$ -Poisson model, the mean PI was  $1.56 \times 10^{-4}$  in UV-treated TE and 2 log<sub>10</sub> units higher,  $4.37 \times 10^{-2}$ , in TE not treated with UV. The use of SRC to perform QMRA of *Cryptosporidium* showed higher PI than when using directly IOO data. This observation suggests the former technique is a conservative method of QMRA.

**Key words** | *Cryptosporidium*, infectivity, QMRA, reclaimed water, sulphite-reducing clostridia spores, UV irradiation

M. Agulló-Barceló  
R. Casas-Mangas  
F. Lucena (corresponding author)  
Department of Microbiology,  
Faculty of Biology,  
Universitat de Barcelona,  
643 Avinguda Diagonal,  
08028 Barcelona,  
Spain  
E-mail: [flucena@ub.edu](mailto:flucena@ub.edu)

M. Agulló-Barceló  
F. Lucena  
Institut de Recerca de l'Aigua,  
Universitat de Barcelona,  
684 Avinguda Diagonal,  
08034 Barcelona,  
Spain

### INTRODUCTION

Water reclamation is a new and sustainable process that provides non-potable water for a variety of uses. Fluctuations in drought periods in the Mediterranean area are common, and Catalonia (northeast Spain) has suffered several periods of water shortage over recent years. The most recent shortage took place between 2007 and 2008 and resulted in the government imposing severe water restrictions. Climate change is expected to increase the frequency and intensity of extreme events, such as drought and floods, as well as to reduce water availability (IPCC 2007; Falloon & Betts 2010). Accordingly, improvements in water management and in water reclamation and reuse will be essential in the near future.

Microbiological criteria for reclaimed water quality in Spanish legislation (RD 1620/2007) are based mainly on the detection of *E. coli* and nematode eggs. In addition, depending on the use made of the water, analyses of

*Legionella* spp., *Salmonella*, *Taenia saginata* and *T. solium* are required. Nevertheless, a huge range of pathogens, such as enteric viruses and other pathogenic bacteria or protozoan parasites, can be found in reclaimed water, thus posing a health risk to final users. Alternative indicators, such as bacteriophages and spores of sulphite-reducing clostridia (SRC), have been proposed as suitable candidates for modelling the presence or behaviour of certain pathogens in water (Payment & Franco 1993; Harwood *et al.* 2005; Mandilara *et al.* 2006; Costán-Longares *et al.* 2008).

*Cryptosporidium* is a ubiquitous protozoan parasite that causes a type of gastroenteritis known as cryptosporidiosis and has produced several waterborne outbreaks of this illness. The most extensive waterborne outbreak caused by *Cryptosporidium* on record was in Milwaukee in 1993 (MacKenzie *et al.* 1994). Since this incident, *Cryptosporidium* has become an important target of water research

(WHO 2009). Given several of its characteristics, such as high infectivity, resistance to chemical disinfection and long survival in the environment, this parasite is now widely considered a reference pathogen. Therefore, efforts have been focused on water treatments designed to decrease *Cryptosporidium* infectivity. As a result, one of the most common strategies for obtaining reclaimed water has been the use of multi-barrier systems (combinations of several physicochemical processes) to achieve adequate quality of the final effluent. Moreover, as *Cryptosporidium* is highly resistant to chlorine, even at very high doses (Betancourt & Rose 2004), disinfection processes using ozone and UV irradiation have been widely applied in combination with other techniques. UV treatment is highly effective at inactivating protozoa (Hijnen *et al.* 2006). The combination of UV treatment with a secondary disinfectant (such as chlorine) has shown synergistic disinfection effects (Ballester & Malley 2004; Shang *et al.* 2007; Montemayor *et al.* 2008; Wang *et al.* 2011), thereby indicating its utility as a disinfection treatment in reclamation processes.

Quantitative microbial risk assessment (QMRA) allows quantification of the potential risks associated with the presence of pathogens in water. The approach was initially developed to assess drinking water safety; however, it has been widely applied to reclaimed water. Reports on the use of QMRA have increased considerably in the last five years and it has been repeatedly proven that QMRA is a useful tool for identifying potential human health risks associated with the presence of certain pathogens in reclaimed water (Rose *et al.* 1991; Asano *et al.* 1992; Hamilton *et al.* 2006). Furthermore, indirect QMRA can be performed using the relationship between a given faecal indicator and a pathogen, in contrast to direct QMRA, which uses pathogen concentrations (Craig *et al.* 2003; Van Lieverloo *et al.* 2007). Thus, indirect QMRA may be an advantage when working with water samples with low concentrations of pathogens, such as tertiary effluents (TE).

Here we performed direct QMRA related to the presence of *Cryptosporidium* in TE samples treated with UV light and samples not treated thus. For this purpose we examined the following: (i) *Cryptosporidium* oocyst occurrence; (ii) *Cryptosporidium* inactivation with the different tertiary treatments studied; and (iii) genotype identification

data. Finally, we performed indirect QMRA at a screening level using the relationship between SRC and *Cryptosporidium* in reclaimed water.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection of samples and sampling sites

Samples of raw wastewater (RW), secondary effluent (SE) and TE from seven wastewater treatment plants (WWTPs) were taken in order to: (i) monitor the concentrations of total and infectious oocysts (TOO and IOO) throughout the treatment process; (ii) assess the efficiency of tertiary treatments in inactivating infectious oocysts; (iii) study the relationship between SRC and *Cryptosporidium* oocysts; (iv) identify the genotype of the oocysts; and (v) perform QMRA analyses directly with *Cryptosporidium* data or with SRC concentrations, ratios or reductions.

The WWTPs were located in three provinces of Catalonia (Spain). The population served by these plants varied from 6000 to 1,093,000 inhabitants. All of them used biological processes plus sedimentation as secondary treatment and five of them produced reclaimed water. Tertiary treatments had multiple barrier systems for water reclamation purposes, including: coagulation-flocculation, sand filtration or microfiltration; and combined disinfection steps with UV treatment (dose ranged from 18 to 80 mJ/cm<sup>2</sup>) and/or chlorination (1–5 ppm). Reclaimed water from these plants was used for a number of purposes, such as golf course irrigation, environmental restoration (aquifer recharge, maintenance of water environment to prevent sea water intrusion), public garden irrigation and other non-potable urban uses.

### Detection of *Cryptosporidium* oocysts and SRC

#### Total *Cryptosporidium* oocyst concentration and elution

A range of sample volumes were taken depending on the turbidity of the sample. Volumes ranged from 0.05 to 1 L for RW, 0.5 to 3 L for SE and 10 to 100 L for TE. Samples were processed as described by Montemayor *et al.* (2005), with minor modifications and following USEPA guidelines

(2005). Briefly, water samples were filtered through a 160- $\mu\text{m}$  and a 38- $\mu\text{m}$  sieve to remove large particles before concentration. The elution step of RW and SE samples was performed twice to improve the recovery efficiency of the filtration.

### Oocysts purification

Oocysts were purified using immunomagnetic separation with a Dynabeads Anti-*Cryptosporidium* kit (DynaL, A.S., Oslo, Norway) and following a modified version of the manufacturer's instructions. Modifications consisted of the following: (i) a double step of bead capture, to improve recovery; (ii) two dissociation steps (Reynolds *et al.* 1999); (iii) two sample washing – centrifugation steps with PBS to ensure pH neutralisation; and (iv) homogenisation of the final volume, which was then divided equally into tubes and stored at 4 °C for further analyses (detection, infectivity assay or genotype identification).

### Detection of *Cryptosporidium* oocysts by laser scanning cytometry

*Cryptosporidium* oocysts were stained with anti-*Cryptosporidium* EasyStain™ antibody following the manufacturer's instructions and examined by laser scanning cytometry, as described in Montemayor *et al.* (2005).

### Infectivity assay

Infectivity assays were performed by inoculating an aliquot of the purified oocysts in a HCT8 cell monolayer to detect infectious oocysts, using the focus detection method as described by Slifko *et al.* (1997) but with the following modifications: (i) after bleach pre-treatment (1/10 bleach solution of 4.5% sodium hypochlorite, for 8 min at 4 °C), samples were washed three times with PBS to ensure bleach removal; (ii) well chamber slides (Lab-Tek®II Chamber Slide™ System; Nalge Nunc International, Naperville, IL) were plated with  $5 \times 10^4$  to  $5 \times 10^5$  cells per well; (iii) one sample per well was added; and (iv) after incubation, the slide was washed, fixed, rehydrated and labelled with the A600FLR-20X Sporo-Glo antibody and the C101 counter-stain reagent (Waterborne™, Inc., New Orleans, LA),

following the manufacturer's instructions. Each slide was mounted and foci were immediately counted under an epifluorescence microscope. The infection foci fluoresced an apple-green colour against a relatively red background (caused by the C101 reagent) of uninfected cells.

### Genotype identification

A subsample of purified oocysts was used for DNA extraction with the QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. Next, the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) procedure described by Xiao *et al.* (2001) was performed to identify the genotype. When the RFLP profile indicated *C. hominis* genotype, we amplified and sequenced the gp60 gene (Peng *et al.* 2001; Sulaiman *et al.* 2001; Chalmers *et al.* 2005). However, when the profile indicated a different genotype, the small-subunit rRNA gene was sequenced to confirm the RFLP result.

### SRC detection

SRC were cultured in SPS agar medium following the procedure described by Bufton (1959) and were then incubated for  $20 \pm 4$  h at 44 °C.

### Quantitative microbial risk assessment

QMRA was performed to assess the risk associated with *Cryptosporidium* as a result of accidental ingestion of reclaimed water produced in each reclamation plant. Moreover, a possible failure of UV disinfection was considered. Such a failure would lead to reclaimed water being disinfected only with chlorine rather than with the combination of chlorine and UV irradiation. In addition, a single (one ingestion of reclaimed water) and a cumulative (more than one ingestion) PI were determined. Risk of infection by *Cryptosporidium* was calculated using the exponential model described by Haas *et al.* (1996) and the  $\beta$ -Poisson dose-response model based on data published by Chappell *et al.* (2006) and optimised by Enger (2011). @RISK software version 5.5 (Palisade Corporation) was used to perform QMRA.

## Statistical analyses

Statgraphics Plus software version 5.1 (Statistical Graphics Corporation, Herndon, VA, USA) was used for statistical analyses. A  $p$ -value  $<0.05$  was considered statistically significant. Results under the detection limit were taken as the value of the detection limit except when using the effective volume strategy (Parkhurst & Stern 1998).

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Cryptosporidium* and SRC concentrations and ratios along the treatment train

*Cryptosporidium* and SRC concentrations showed a significant reduction from influent wastewater to SE and from SE to TE (see Figure 1).

### *Cryptosporidium* and SRC in RW

Forty RW samples were analysed. Oocysts were found in most of the samples (97.5% positive samples) with a minimum of 1.33 and a maximum of 7,460 oocysts/L. Previously published data on *Cryptosporidium* concentrations in northeast Spain showed higher percentages of positive samples as well as a much narrower range of oocysts/L (Montemayor et al. 2005). This variability is probably due to the diversity of the treatment plants studied (size of population served,

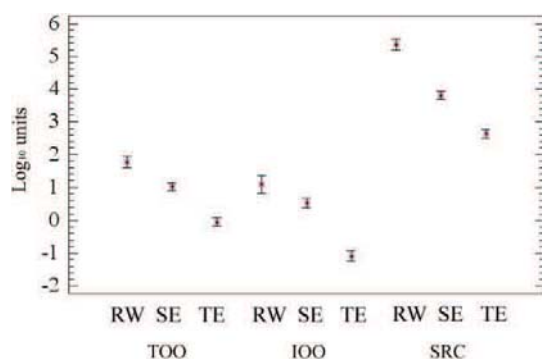
different areas or sampling seasons). The mean concentration of *Cryptosporidium* TOO per litre was 1.76  $\log_{10}$  units, while IOO per litre registered 1.09  $\log_{10}$  and SRC 5.37  $\log_{10}$  units CFU/100 mL. The mean ratios between the concentrations of SRC and TOO and between SRC and IOO were  $3.83 \pm 0.53$  (SD) and  $4.65 \pm 0.47$   $\log_{10}$  units, respectively.

### *Cryptosporidium* and SRC in SE

Seventy-four SE samples were analysed. Oocysts were found in 91.9% of the samples, with values ranging from 0.5 to 496 oocysts/L. Mean concentrations of *Cryptosporidium* in SE were 1.02  $\log_{10}$  units of TOO/L and 0.54  $\log_{10}$  units of IOO/L. SRC concentrations were 3.81  $\log_{10}$  units of CFU/100 mL. With regard to the concentrations of *Cryptosporidium* as well as the percentage of positive samples, our results are similar to those described previously (Harwood et al. 2005; Montemayor et al. 2005; Costán-Longares et al. 2008). The mean ratios between the concentrations of SRC and TOO or SRC and IOO were  $2.85 \pm 0.61$  and  $3.44 \pm 0.51$   $\log_{10}$  units respectively.

### *Cryptosporidium* and SRC in TE

Sixty-seven samples of reclaimed water were analysed. The mean concentrations of oocysts as well as the percentage of positive samples were significantly lower in TE than in SE. The percentage of positive samples for TOO was 83.6%, which is higher than other reports in TE samples (Harwood et al. 2005; Montemayor et al. 2005; Costán-Longares et al. 2008). However, the mean concentrations were  $-0.04$   $\log_{10}$  units of TOO/L,  $-1.09$   $\log_{10}$  units of IOO/L and 2.64  $\log_{10}$  units of CFU/100 mL of SRC. The mean ratios between SRC and TOO were the lowest ( $2.42 \pm 0.87$   $\log_{10}$  units), whereas they were similar but higher between SRC and IOO ( $3.66 \pm 0.75$   $\log_{10}$  units). This increment in the ratio with IOO suggests that tertiary treatments (probably disinfection processes) are more effective at decreasing oocyst infectivity than SRC viability.



**Figure 1** | Mean concentrations and 95% confidence intervals of total *Cryptosporidium* oocysts (TOO), infectious oocysts (IOO) and spores of sulphite-reducing clostridia (SRC) expressed in  $\log_{10}$  units of oocysts/L and CFU/100 mL respectively. RW: raw wastewater; SE: secondary effluent; TE: tertiary effluent.

### UV treatment: effect on the inactivation of IOO and SRC

Samples of TE were grouped depending on the tertiary treatment, namely with or without UV irradiation.

Concentrations of IOO were significantly higher when tertiary treatment did not include UV light as part of the disinfection process. The mean concentrations of IOO in tertiary treatments with and without UV irradiation were  $-1.41 \log_{10}$  units and  $-0.38 \log_{10}$  units respectively. The effective volume-averaged concentration of IOO/L was  $< -4.32 \log_{10}$  units. In contrast, an effective volume-averaged concentration of  $-0.45 \log_{10}$  units of IOO/L was found when tertiary treatment excluded the application of UV light. These values were calculated from:

$$C = \frac{\sum_{i=1}^n OO_i}{\sum_{i=1}^n V_i} \quad (1)$$

where  $C$  is the concentration of *Cryptosporidium* (oocysts/L),  $n$  is the number of samples,  $OO_i$  is the number of total or infectious oocysts detected in a given sample and  $V_i$  is the volume (L) analysed in the given sample.

No IOO were detected out of 7,481 TOO in a total sample volume ( $V$ ) of 896.8 L from UV-treated samples. On the other hand, in tertiary treatments without UV irradiation, 124 IOO were detected out of 1,088 TOO counted in a total sample volume of 345.6 L ( $V$ ). Furthermore, the percentage of positive samples was calculated in accordance to:

$$INF = \frac{\sum_{i=1}^n IOO_i}{\sum_{i=1}^n TOO_i} \times 100 \quad (2)$$

where INF is the infectivity percentage,  $n$  is the number of samples,  $IOO_i$  is the number of infectious oocysts detected in a given sample and  $TOO$  is the number of total oocysts detected in the given sample.

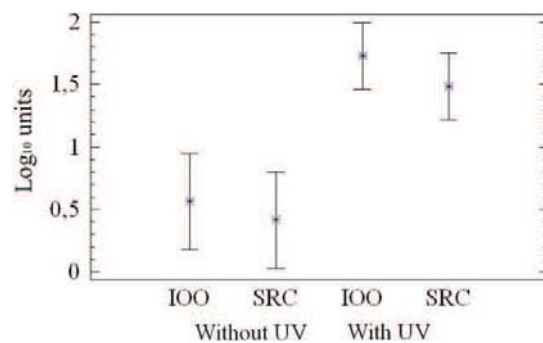
Using Equation (2), TE samples subjected to UV irradiation showed 0.013% of infectivity while those samples not treated with this disinfection method registered 11.4% infectivity. When UV treatment was applied, there was a  $5.41\text{-}\log_{10}$  reduction in the IOO from RW to TE. The concentrations of IOO as well as infectivity percentages were  $3 \log_{10}$  units higher when UV irradiation was not used in the tertiary treatment. The efficiency of UV irradiation to inactivate *Cryptosporidium* has previously been described (Hijnen et al. 2006; Montemayor et al. 2008).

Data from two representative treatment plants that apply UV irradiation and from two other representative WWTPs without this disinfection process were selected to compare the reductions of SRC and IOO in the two treatment options (see Figure 2).

Mean  $\log_{10}$  reductions of SRC were  $1.49 \pm 0.71$  (SD)  $\log_{10}$  units when UV light was included in the tertiary treatment and  $0.42 \pm 0.69 \log_{10}$  units without this disinfection regime. IOO mean  $\log_{10}$  reductions were  $1.73 \pm 0.56 \log_{10}$  units with UV irradiation and  $0.57 \pm 0.59 \log_{10}$  units without. There were no significant differences between mean  $\log_{10}$  reductions of IOO and SRC in either case (with or without UV irradiation). In contrast, significantly higher reductions in IOO and SRC were detected when UV treatment was used compared to mean reductions without this disinfection procedure. These results indicate that SRC behave in a similar manner to IOO in the tertiary treatments studied here.

### Genotype identification of the circulating *Cryptosporidium* oocysts

We analysed the genotypes of the purified oocysts in order to gather epidemiological data on *Cryptosporidium* in north-east Spain. Of the samples, 76% (31/41) were positive by the nested PCR-RFLP procedure and 87% of these showed RFLP profiles that belonged to *C. hominis* (two of them were mixed profiles of *C. hominis* and *C. muris*). Only two samples showed RFLP profiles belonging exclusively to *Cryptosporidium* of animal origin: one sample had a



**Figure 2** | Mean reduction and 95% confidence intervals of infectious oocysts (IOO) and spores of sulphite-reducing clostridia (SRC) from secondary to tertiary effluent expressed in  $\log_{10}$  units of IOO/L and  $\log_{10}$  units of CFU/100 mL respectively.

*C. muris* profile (infects rodents and some mammals) and the other had a *C. andersoni* profile (infects cattle). The *C. andersoni* profile came from a WWTP receiving wastewater from cattle abattoirs and it was confirmed that the slaughterhouse was in operation on the sampling day. The gp60 gene was amplified and sequenced when the resulting RFLP profiles belonged to *C. hominis*. Family IbA10G2R2 was found in 100% of the gp60-positive samples. However, 19% (5/27) of the samples were repeatedly negative in the PCR for the gp60 gene. Genotype identification revealed that most of the samples were of human origin, thereby indicating that oocysts are continuously shed throughout the study area (ill people plus asymptomatic carriers). This notion is in agreement with the human carriage rates of *Cryptosporidium* reported in Spain, which can range from 0.4 to 12.8% depending on the population, age range and region (Compañ-Barco et al. 1991). Another recent study in the north of Spain has described prevalence of from 1 to 3.1% in children (Cardona et al. 2011). That study also reported that *C. hominis* was the only genotype infecting these children. However, the annual mean number of reported cases of cryptosporidiosis from 2000 to 2010 was 102 (data from the BES, weekly Spanish epidemiological bulletins). This number is consistent with the low prevalence described but contrasts with the high concentrations of *Cryptosporidium* oocysts detected in RW in Spain. This observation could be attributed to failure to diagnose the illness and is supported by the fact that cryptosporidiosis is not a notifiable disease in Spain. Furthermore, population immunity may increase as a result of high rates of endemic *Cryptosporidium* infections (Bonadonna et al. 2002). As epidemiological studies on *Cryptosporidium* in Catalonia have not been published to date, our data should be taken into account for risk assessment purposes; however, more studies are required to further our understanding of waterborne transmission of *Cryptosporidium* in this area.

### QMRA analyses

The *Cryptosporidium* data gathered in this study were used to perform QMRA linked to the presence of *Cryptosporidium* in reclaimed water. The worst-case scenario was selected for the calculation, namely the accidental ingestion of reclaimed water. This scenario was chosen because one of

the treatment plants studied has a distribution network of reclaimed water, which can be used for private purposes, and therefore there is a real risk of accidental ingestion. In addition, direct ingestion of reclaimed water is one of the simplest scenarios for risk assessment since there are fewer assumptions to consider (such as decay rates or time from release to consumption), thus, final results carry fewer uncertainties. Hazard was identified as the presence of IOO, and PI was calculated using *Cryptosporidium* concentrations in TE and also SRC data in SE and TE.

### Use of direct *Cryptosporidium* concentrations

Data were grouped into samples: (i) treated with UV light and (ii) not treated with UV light, with infectivity percentages of 0.013 and 11.4% respectively. Concentrations of IOO/L were calculated as follows: the infectivity percentage was applied to TOO/L and new estimated values of IOO/L were obtained. This was selected as the best approach to work with the data because of the great number of values under the detection limit for IOO. We then assigned a probability distribution function (PDF) of IOO/L to each treatment plant. Two other parameters were taken into account to calculate the dose: the recovery efficiency (%) and the volume per ingestion of reclaimed water. For the recovery rate, a normal distribution with parameters mean = 33.6% and SD = 20.2% was selected (Montemayor 2007). For the volume per ingestion of reclaimed water, a triangular distribution with the following parameters was used: most likely = 0.125 L; minimum = 0.010 L, and maximum = 0.2 L. The equation used to calculate the dose was:

$$\text{Dose} = C \times (100 \div R) \times V \quad (3)$$

where  $C$  is the PDF of concentration of IOO (IOO/L),  $R$  is the PDF of recovery percentage and  $V$  is the PDF of volume (L) per ingestion.

Single and multiple exposures were studied. It was considered that accidental ingestion of reclaimed water in a private-use scenario would be more likely to occur in the summer than in colder seasons. Therefore, the multiple exposure scenario was calculated on the basis of 12 exposures (one intake per week during 12 summer weeks). *C. hominis* was chosen as the only genotype present in

reclaimed water on the basis of our epidemiological results. Furthermore, in the worst-case context, it was assumed that 100% of the population is susceptible to the disease (WHO 2006) and that the ratio of illness to infection is 1. Mean PIs by *Cryptosporidium* and 95% percentiles were calculated for each treatment plant (see Table 1).

The mean PI was 1 to 2 log<sub>10</sub> units higher with the  $\beta$ -Poisson dose-response model than with the exponential model regardless of the degree of exposure. When all treatment plants using UV irradiation were pooled, the mean PI was  $3.69 \times 10^{-6}$  (single exposure, exponential dose-response model) while it was approximately 3 log<sub>10</sub> units higher ( $1.89 \times 10^{-3}$ ) without the inclusion of UV light in the tertiary treatment. These results are consistent with the IOO concentrations found in TE, which were 3 log<sub>10</sub> units lower in UV-treated effluents. When the  $\beta$ -Poisson model was used, the same difference was observed: mean PI of  $4.40 \times 10^{-5}$  in treatment plants using UV irradiation and  $1.78 \times 10^{-2}$  in those not applying this disinfection procedure. Ryu et al. (2007) found similar results with regard to the risk of infection in reclaimed water treated with UV light, or not. In that study, the mean risk of infection was 3 to 4 log<sub>10</sub> units higher in treatment plants using only chlorine for disinfection.

### Use of SRC data for QMRA analyses

Due to the low densities of TOO and IOO in final effluents, QMRA performed directly with *Cryptosporidium* data in TE samples may carry uncertainties derived from the imprecision inherent to the methodology, namely the use of several steps such as oocyst concentrations, elution, purification and cell line infection. Therefore, QMRA analyses were also performed at a screening level using the following SRC data: concentrations of SRC, ratios between SRC and *Cryptosporidium*, and reductions from SE to TE. Risk assessment performed with SRC was calculated in a single exposure scenario and using the data from the treatment plant with the highest number of TE samples (plant 1, with UV treatment). Using the concentrations of SRC, we applied two approaches:

- (A) Using the concentrations of SRC in SE samples; the ratio between SRC and IOO in SE, and the reduction of IOO from SE to TE. The formula used to calculate the estimated IOO concentrations was:

$$\text{Log}_{10}e\text{IOO} = (C_{\text{SRCSE}} - R_{\text{SRC:IOO SE}}) - \text{Red}_{\text{SRC SE-TE}} \quad (4)$$

**Table 1** | Probability of infection by *Cryptosporidium* and 95 percentiles (Perc. 95%) calculated for each treatment plant with two dose-response models

Dose-response model	Exposure	Treatment plants with UV			Treatment plants without UV			
		1	2	3	4	5	1 <sup>d</sup>	
Exponential <sup>a</sup>	Single	Mean PI	$1.10 \times 10^{-5}$	$5.24 \times 10^{-8}$	$3.54 \times 10^{-8}$	$9.58 \times 10^{-4}$	$2.74 \times 10^{-3}$	$1.97 \times 10^{-3}$
		Perc. 95%	$2.35 \times 10^{-5}$	$1.20 \times 10^{-7}$	$7.13 \times 10^{-8}$	$2.38 \times 10^{-3}$	$6.93 \times 10^{-3}$	$4.30 \times 10^{-3}$
	Multiple <sup>c</sup>	Mean PI	$1.31 \times 10^{-4}$	$6.29 \times 10^{-7}$	$4.24 \times 10^{-7}$	$8.05 \times 10^{-3}$	$2.63 \times 10^{-2}$	$1.90 \times 10^{-2}$
		Perc. 95%	$2.81 \times 10^{-4}$	$1.44 \times 10^{-6}$	$8.56 \times 10^{-7}$	$2.82 \times 10^{-2}$	$8.01 \times 10^{-2}$	$5.04 \times 10^{-2}$
$\beta$ -Poisson <sup>b</sup>	Single	Mean PI	$4.64 \times 10^{-4}$	$2.42 \times 10^{-6}$	$1.63 \times 10^{-6}$	$1.69 \times 10^{-2}$	$6.40 \times 10^{-2}$	$5.03 \times 10^{-2}$
		Perc. 95%	$1.08 \times 10^{-3}$	$5.53 \times 10^{-6}$	$3.29 \times 10^{-6}$	$8.81 \times 10^{-2}$	$1.90 \times 10^{-1}$	$1.38 \times 10^{-1}$
	Multiple	Mean PI	$4.51 \times 10^{-3}$	$2.89 \times 10^{-5}$	$1.94 \times 10^{-5}$	$7.69 \times 10^{-2}$	$2.72 \times 10^{-1}$	$2.51 \times 10^{-1}$
		Perc. 95%	$1.26 \times 10^{-2}$	$6.64 \times 10^{-5}$	$3.95 \times 10^{-5}$	$3.80 \times 10^{-1}$	$5.21 \times 10^{-1}$	$4.60 \times 10^{-1}$

<sup>a</sup>Exponential dose-response model (Haas et al. 1996).

<sup>b</sup> $\beta$ -Poisson dose-response model (Chappell et al. 2006; Enger 2011).

<sup>c</sup>12 hazardous events were taken to calculate multiple exposures.

<sup>d</sup>UV irradiation was stopped manually in treatment plant 1.



where  $eIOO$  is the estimated IOO concentration,  $C_{SRC\ SE}$  is the PDF of concentration of SRC ( $\log_{10}$  units of SRC/100 mL) in SE samples,  $Ra_{SRC:IOO\ SE}$  is the PDF of the ratio between SRC and IOO in SE (in  $\log_{10}$  units), and  $Red_{SRC\ SE-TE}$  is the PDF of the reduction from SE to TE of SRC (in  $\log_{10}$  units).

There were no significant differences between true IOO concentrations in SE and estimated IOO concentrations with the SRC:IOO ratio in SE. However, we detected significant differences when true IOO concentrations in TE were compared to estimated IOO concentrations in TE (using SRC reductions from SE to TE). True IOO concentrations in this effluent were 0.6  $\log_{10}$  units lower than the estimated concentrations.

- (B) Using the concentrations of SRC in TE samples and the ratio between SRC and IOO in TE, the formula used to calculate the estimated IOO concentrations was:

$$\log_{10}eIOO = C_{SRC\ TE} - Ra_{SRC:IOO\ TE} \quad (5)$$

where  $C_{SRC\ TE}$  is the PDF of concentration of SRC (in  $\log_{10}$  units of SRC/100 mL) in TE samples and  $Ra_{SRC:IOO\ TE}$  is the PDF of the ratio between SRC and IOO in the TE (in  $\log_{10}$  units).

There were no significant differences between true IOO concentrations in TE and estimated IOO concentrations with the SRC:IOO ratio in this effluent.

Using SRC data, mean PIs were 1 to 2  $\log_{10}$  units higher than when *Cryptosporidium* was used directly depending on the model and on the method (see Table 2). The PI in treatment plant 1 calculated with approach A would meet the annual acceptable risk of infection of  $1 \times 10^{-4}$  (USEPA 1989; WHO 2006). In contrast, using approach B, the PI would not meet this value. However, in treatment plant 1, no infectious oocysts were detected when UV irradiation was used for disinfection, despite the considerably higher concentrations of TOO (1.3  $\log_{10}$  units of TOO/L). Therefore, these results suggest that the use of indicators to indirectly calculate the risk of infection by pathogens could be a conservative method for QMRA.

Nevertheless, there are a few facts that could limit the applicability of these approaches such as the variability in

**Table 2** | Comparison of mean probabilities of infection (PI) and 95 percentiles (Perc. 95%) in treatment plant 1 (with UV irradiation) using SRC (sulphite-reducing clostridia) data for the calculation

Dose-response model	Treatment plant 1 (with UV)		
	Direct <sup>c</sup>	A <sup>d</sup>	B <sup>e</sup>
Exponential <sup>a</sup>			
Mean PI	$1.10 \times 10^{-5}$	$5.50 \times 10^{-4}$	$5.83 \times 10^{-5}$
Perc. 95%	$2.35 \times 10^{-5}$	$2.53 \times 10^{-3}$	$2.24 \times 10^{-4}$
$\beta$ -Poisson <sup>b</sup>			
Mean PI	$4.64 \times 10^{-4}$	$1.65 \times 10^{-2}$	$2.53 \times 10^{-3}$
Perc. 95%	$1.08 \times 10^{-3}$	$8.70 \times 10^{-2}$	$1.01 \times 10^{-2}$

<sup>a</sup>Exponential dose-response model (Haas et al. 1996).

<sup>b</sup> $\beta$ -Poisson dose-response model (Chappell et al. 2006; Enger 2011).

<sup>c</sup>Using *Cryptosporidium* oocysts concentrations.

<sup>d</sup>Using PDFs (probability distribution functions) of SRC concentrations in secondary effluents (SE), PDF of ratios between SRC and infectious oocysts (IOO) in SE, and PDF of reductions of IOO from SE to tertiary effluent (TE).

<sup>e</sup>Using PDF of SRC concentrations in TE samples and PDF of ratios between SRC and IOO in TE.

the reductions of SRC from SE to TE; that their use does not provide any epidemiological data for *Cryptosporidium*, which is an important issue in terms of health risks and the fact that the presence of SRC does not imply the presence of *Cryptosporidium*. Thus, these results justify further research to achieve more reliable risk assessment of *Cryptosporidium* using SRC data and to determine the proper circumstances to apply it.

To sum up, when treatment plants were studied separately, great differences (3  $\log_{10}$  units) in the PI were observed, even when the plants used the same disinfection treatment. This finding is not surprising because they are located in different geographic areas, and *Cryptosporidium* concentrations in influent water as well as in reclaimed water varied significantly from one plant to another (data not shown). Moreover, a theoretical outage of the UV lamps in a treatment plant could have serious consequences regarding the risk of *Cryptosporidium* infection. In fact, risk of infection in plants that do not apply UV treatment would not meet the limit of less than one infection per 10,000 people per year ( $1 \times 10^{-4}$ ). However, this limit is only a reference value for drinking water, and some authors have considered it overly restrictive (Haas et al. 1996). Moreover, all the assumptions for the QMRA made in the present study were highly conservative.

## CONCLUSIONS

*C. hominis* family IbA10G2R2 is the most common circulating genotype in the study area. The WWTPs studied achieved a significant reduction of *Cryptosporidium* oocysts through treatment. In fact, the highest reductions of IOO were obtained when UV light was included in tertiary treatments. Accordingly, the mean PIs associated with *Cryptosporidium* were 3 log<sub>10</sub> units lower when UV light was applied for disinfection purposes, regardless of the dose-response model used. Thus, multiple barrier tertiary treatments using UV disinfection, in combination with other processes, can better guarantee reclaimed water quality. Moreover, QMRA analyses performed with SRC data (concentrations, ratios and reductions) resulted in higher mean PIs in a treatment where no infectious oocysts were ever detected. Therefore, the use of indicators in QMRA could be a conservative method for risk calculation.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was carried out within the framework of the SOSTAQUA project (CENIT 2007–1039) and the Generalitat de Catalunya (2009-SGR-01043). The authors are grateful to Consorci de la Costa Brava for providing sampling facilities and advice. Míriam Agulló-Barceló is grateful to the Universitat de Barcelona for the doctoral grant (APIF).

## REFERENCES

- Asano, T., Leong, L., Rigby, M. & Sakaji, R. 1992 Evaluation of the California wastewater reclamation criteria using enteric virus monitoring data. *Water Sci. Technol.* **26**, 1513–1524.
- Ballester, N. A. & Malley, J. P. 2004 Sequential disinfection of adenovirus type 2 with UV–chlorine–chloramine. *J. Am. Water Works Assoc.* **96**, 97–103.
- Betancourt, W. Q. & Rose, J. B. 2004 Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet. Parasitol.* **126**, 219–234.
- BES (Boletín epidemiológico semanal) <http://revistas.isciii.es/bes/index.php/bes> (Accessed 30 April 2012).
- Bonadonna, L., Briancesco, R., Ottaviani, M. & Veschetti, E. 2002 Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and correlation with microbial, chemical and physical water variables. *Environ. Monitor. Assess.* **75**, 241–252.
- Buften, A. W. 1959 A note on the enumeration of thermophilic sulphite-reducing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **22**, 278–280.
- Cardona, G. A., Carabin, H., Goñi, P., Arriola, L., Robinson, G., Fernández-Crespo, J. C., Clavel, A., Chalmers, R. M. & Carmena, D. 2011 Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, North of Spain. *Sci. Total Environ.* **412–413**, 101–108.
- Chalmers, R. M., Ferguson, C., Caccio, S., Gasser, R. B., Abs EL-Osta, Y. G., Heijnen, L., Xiao, L., Elwin, K., Hadfield, S., Sinclair, M. & Stevens, M. 2005 Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *Int. J. Parasitol.* **35**, 397–410.
- Chappell, C., Okhuysen, P., Langer-Curry, R., Widmer, G., Akiyoshi, D., Tanriverdi, S. & Tzipori, S. 2006 *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**, 851–857.
- Compañ-Barco, M. D., Llopis-González, A. & Morales, M. M. 1991 Consideraciones epidemiológicas sobre criptosporidiosis. *Revista de Sanidad e Higiene Pública* **65**, 363–370.
- Costán-Longares, A., Montemayor, M., Payán, A., Méndez, J., Jofre, J., Mujeriego, R. & Lucena, F. 2008 Microbial indicators and pathogens: removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. *Water Res.* **42**, 4439–4448.
- Craig, D. L., Fallowfield, H. J. & Cromar, N. J. 2003 Effectiveness of guideline faecal indicator organism values in estimation of exposure risk at recreational coastal sites. *Water Sci. Technol.* **47**, 191–198.
- Enger, K. S. 2011 [http://wiki.camra.msu.edu/index.php?title=Cryptosporidium\\_parvum\\_and\\_Cryptosporidium\\_hominis%3A\\_Dose\\_Response\\_Models](http://wiki.camra.msu.edu/index.php?title=Cryptosporidium_parvum_and_Cryptosporidium_hominis%3A_Dose_Response_Models) (Accessed 4 October 2012).
- Falloon, P. & Betts, R. 2010 Climate impacts on European agriculture and water management in the context of adaptation and mitigation – the importance of an integrated approach. *Sci. Total Environ.* **408**, 5667–5687.
- Haas, C. N., Crockett, C. S., Rose, J. B., Gerba, C. P. & Fazil, A. M. 1996 Assessing the risk posed by oocysts in drinking water. *J. Am. Water Works Assoc.* **88**, 131–136.
- Hamilton, A. J., Stagnitti, F., Premier, R., Boland, A. & Hale, G. 2006 Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3284–3290.
- Harwood, V. J., Levine, A. D., Scott, T. M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S. R. & Rose, J. B. 2005 Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3163–3170.
- Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E. F. & Medema, G. J. 2006 Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res.* **40**, 3–22.

- IPCC 2007 *Intergovernmental Panel on Climate Change AR4 Synthesis report*, IPCC Secretariat, Geneva, Switzerland. <http://www.ipcc.ch/> (Accessed 27 April 2011).
- MacKenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R. & Rose, J. B. 1994 A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* **331**, 161–167.
- Mandilara, G. D., Smeti, E. M., Mavridou, A. T., Lambiri, M. P., Vatopoulos, A. C. & Rigas, F. P. 2006 Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. *FEMS Microbiol. Lett.* **263**, 119–126.
- Montemayor, M. 2007 Avances metodológicos en la detección y caracterización de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas residuales regeneradas y muestras ambientales (Methodological Improvements on the Detection and Characterization of *Cryptosporidium* Oocysts in Reclaimed Water and Environmental Samples). PhD Thesis, University of Barcelona.
- Montemayor, M., Costán-Longares, A., Lucena, F., Jofre, J., Muñoz, J., Dalmau, E., Mujeriego, R. & Sala, L. 2008 The combined performance of UV light and chlorine during reclaimed water disinfection. *Water Sci. Technol.* **57**, 935–940.
- Montemayor, M., Valero, F., Jofre, J. & Lucena, F. 2005 Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 1455–1462.
- Parkhurst, D. F. & Stern, D. A. 1998 Determining average concentrations of *Cryptosporidium* and other pathogens in water. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 3424–3429.
- Payment, P. & Franco, E. 1993 *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2418–2424.
- Peng, M. M., Matos, O., Gatei, W., Das, P., Stantic-Pavlinic, M., Bern, C., Sulaiman, I. M., Glaberman, S., Lal, A. A. & Xiao, L. 2001 A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *J. Eukaryot. Microbiol.* **48** (Suppl. 1), 28S–31S.
- RD 1620/2007. Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. BOE n° 294. <http://www.boe.es/boe/dias/2007/12/08/pdfs/A50639-50661.pdf> (Accessed 4 October 2012).
- Reynolds, D. T., Slade, R. B., Sykes, N. J., Jonas, A. & Fricker, C. R. 1999 Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water: techniques for generating precise recovery data. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 804–813.
- Rose, J. B., Haas, C. N. & Regli, S. 1991 Risk assessment and control of waterborne giardiasis. *Am. J. Public Health* **81**, 709–713.
- Ryu, H., Alum, A., Mena, K. D. & Abbaszadegan, M. 2007 Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-potable reclaimed water. *Water Sci. Technol.* **55**, 283–290.
- Slifko, T. R., Friedman, D., Rose, J. B. & Jakubowski, W. 1997 An *in vitro* method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3669–3675.
- Shang, C., Cheung, L. K. & Liu, W. 2007 MS2 coliphage inactivation with UV irradiation and free chlorine/monochloramine. *Environ. Eng. Sci.* **24**, 1321–1332.
- Sulaiman, I. M., Lal, A. A. & Xiao, L. 2001 A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites. *J. Eukaryot. Microbiol.* **48**, 24s–27s.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) 1989 National primary drinking water regulations: total coliform rule, final rule. *Fed. Regist.* **54** (124), 27544–27568, June 29.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) 2005 Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA.
- Van Lieverloo, J. H., Blokker, E. J. & Medema, G. 2007 Quantitative microbial risk assessment of distributed drinking water using faecal indicator incidence and concentrations. *J. Water Health*, **5** (Suppl. 1), 131–149.
- Wang, X., Hu, X., Hu, C. & Wei, D. 2011 Sequential use of ultraviolet light and chlorine for reclaimed water disinfection. *J. Environ. Sci.* **23**, 1605–1610.
- WHO (World Health Organization) 2006 *Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO (World Health Organization) 2009 *Risk Assessment of Cryptosporidium in Drinking Water*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Xiao, L., Singh, A., Limor, J., Graczyk, T. K., Gradus, S. & Lal, A. A. 2001 Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1097–1101.

### 3.4. ARTICLE 4

**Autors:** Bruno S. Souza, Renato F. Dantas, **Míriam Agulló-Barceló**, Francisco Lucena, Carme Sans, Santiago Esplugas, Márcia Dezotti

**Títol:** *Evaluation of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the disinfection and treatment of municipal secondary effluents for water reuse*

**Revista:** Journal of Chemical Technology & Biotechnology (2012)

## RESUM

### Introducció

La regeneració d'aigua residual és una estratègia atractiva que pot contribuir de manera significativa a la preservació de l'aigua, sobretot en zones on hi ha escassetat o un consum excessiu. L'aigua regenerada haurà de tenir una qualitat determinada segons l'ús final que se n'hi vulgui donar. Arreu del món s'ha anat establint legislació al voltant d'aquesta qüestió per poder controlar i gestionar l'aigua regenerada. Tot i així, la presència de microcontaminants (medicaments, drogues, hormones, pesticides, etc) pot afectar els ecosistemes i acumular-se a l'ambient, a més amés, la presència de patògens pot afectar la salut pública. Per això els POAs, dels que s'ha parlat a l'apartat 1.3.1. de la introducció general, s'estan utilitzant cada vegada més en processos de regeneració.

En aquest estudi es van analitzar quatre microorganismes model després de l'aplicació d'un POA, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a baixes concentracions), com a tractament de desinfecció per a la producció d'aigua regenerada. Com a indicadors bacterians es van utilitzar *E. coli* i espores de clostridis reductors del sulfit (SRC), i com a indicadors vírics es van utilitzar fags somàtics (SOMCPH) i fags que infecten la soca CB390 (CB390PH). Com ja s'ha comentat, aquesta soca pot detectar simultàniament fags somàtics i fags RNA F específics. A més a més, es va utilitzar atrazina (ATZ) com a compost model per a representar la presència de microcontaminants a l'efluent secundari. Tot i que l'ús d'ATZ com a herbicida està prohibit a la UE des del 2004, es fa servir de model ja que encara se'n troba molt sovint en aigües superficials i subterrànies.

### Resultats i discussió

La caracterització de l'efluent secundari de la planta de Gavà-Viladecans va mostrar que, tot i la variació habitual en els efluentes municipals, tots els paràmetres estaven dins dels rang normal d'una EDAR. Pel que fa a la desinfecció, després de 5 minuts de tractament (ja fos UV o UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tots els paràmetres microbiològics estaven per sota el límit de detecció (10 CFU o PFU en 100 mL). Tot i que tots ells es van inactivar molt ràpidament, les cinètiques d'inactivació van mostrar que les SRC eren els més resistents, cosa que coincideix amb dades prèviament descrites a la bibliografia.

El flux necessari d'UV per a la inactivació d'*E. coli* va ser de 2412 mJ/cm<sup>2</sup>, i l'efecte en la resta de paràmetres va seguir la tendència: *E. coli* > SOMCPH ≥ CB390PH > SRC. L'efecte sinèrgic entre UV i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no va mostrar diferències significatives amb el de l'UV sol. Quan l'experiment va tenir lloc amb ATZ a l'efluent, es va poder observar que la inactivació de les SRC era encara més lenta, suggerint que aquesta actua absorbint la llum UV i per tant, disminuint-ne l'efecte a l'hora d'inactivar les SRC. Amb la resta de microorganismes no es va observar l'efecte esmentat.

Tot i la ràpida inactivació dels paràmetres microbiològics, després de cinc minuts, l'efluent secundari no havia assolit la qualitat necessària per ser reutilitzada. Per tant, el temps de tractament es va allargar. Després de 120 min, la reducció de la terbolesa va ser > 60% i dels TSS ≈ 40%. Tot seguit, es van identificar 3 nivells de qualitat de l'aigua regenerada: (1) establert als 35 min, en què s'eliminaven tant els paràmetres microbiològics com l'ATZ; (2) establert als 60 min, en què a més a més, els TSS i la terbolesa assolien nivells per sota els 10 mg/L i les 3 NTU respectivament i finalment (3) després de 100 min de reacció, es va arribar a nivells de 7,0 mg/L de TSS i a les 2,0 NTUs. En aquest últim nivell, l'aigua tindria una qualitat adequada per a tots els usos excepte en torres de refrigeració ja que en aquest cas la terbolesa no hauria de ser superior a 1,0 NTU. A més a més, la toxicitat es va eliminar després del tractament i el contingut en compostos aromàtics va disminuir significativament.

Finalment es va realitzar un estudi del cost econòmic i energètic que aquest tractament tindria si s'apliqués, que va resultar ser de 0,23 €/m<sup>3</sup> d'efluent tractat. D'aquest preu, la porció més important correspondria a la despesa en llum UV. Tot i així, aquest balanç no contemplava altres costos com per exemple l'emmagatzematge, la manipulació de les mostres, el manteniment, etc i per tant podria ser una infravaloració del preu real.

## Conclusions

---

El tractament amb UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> d'un efluent secundari urbà permetria assolir les concentracions necessàries de tots els paràmetres de qualitat descrits a la legislació de diferents països (excepte per torres de refrigeració) pel que fa a la reutilització d'aigües residuals, reduint a més a més la toxicitat, i ho faria a uns costos assumibles en els càlculs preliminars.

#### INFORME SOBRE EL FACTOR D'IMPACTE – ARTICLE 4

L'article *Evaluation of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the disinfection and treatment of municipal secondary effluents for water reuse* va ser publicat el 29 de desembre de 2012 a la revista *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, que està dins del Q1 en la temàtica d'*Environmental Sciences*. L'any 2011, la revista va presentar un índex d'impacte de 2,168.

#### INFORME DE PARTICIPACIÓ – ARTICLE 4

La doctoranda Míriam Agulló-Barceló ha dut a terme la majoria de les tasques relacionades amb la vessant microbiològica de l'article, incloent-hi la participació en la detecció dels microorganismes escollits (*E. coli*, SRC, SOMCPH i CB390PH), en la presa de decisions al llarg del projecte, la redacció dels apartats corresponents en la versió definitiva de l'article i en la discussió general dels resultats.

Dr. Francisco Lucena Gutiérrez



# Evaluation of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the disinfection and treatment of municipal secondary effluents for water reuse

Bruno S. Souza,<sup>b</sup> Renato F. Dantas,<sup>a\*</sup> Míriam Agulló-Barceló,<sup>c,d</sup> Francisco Lucena,<sup>c,d</sup> Carme Sans,<sup>a</sup> Santiago Esplugas<sup>a,b</sup> and Márcia Dezotti<sup>b</sup>

## Abstract

**BACKGROUND:** In this work, photochemical treatment (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) of a municipal secondary effluent was studied to assess its suitability for preparing water for reuse. Ten water reuse criteria obtained from the legislation of eight countries were used as indicators of water quality. Effluents from the municipal wastewater treatment plant (WWTP) of Gavà-Viladecans (Barcelona, Spain) were subjected to UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment with low H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration ([H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>0</sub> = 5 mg L<sup>-1</sup> and UV fluence = 8.04 mW cm<sup>-2</sup>) and the most common water reuse parameters, such as disinfection indicators, turbidity, total suspended solids and microcontaminant removal (atrazine), were monitored.

**RESULTS:** Treatment inactivated 100% of the disinfection indicators after 5 min. Afterwards, three levels of treatment corresponding to different reuse applications were defined according to the legislation used. In addition, according to the LuminoTox<sup>®</sup> bioassay, oxidative treatment of the secondary effluent favoured the formation of less toxic intermediates. Finally, a study was performed to determine the costs of each reuse condition.

**CONCLUSIONS:** Findings suggest that UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a suitable method to obtain water of sufficient quality for further reuse.

© 2012 Society of Chemical Industry

**Keywords:** disinfection; water reuse; advanced oxidation; wastewater treatment plant; atrazine; cost study

## INTRODUCTION

Water reuse is an attractive strategy that can significantly contribute to water conservation in areas suffering from water scarcity or overconsumption. This allows the use of reclaimed water for specific purposes, which, depending on the application, require different levels of treatment. Despite the importance of water reuse, only a few countries carry it out at present. Among them are the USA, some southern European countries and those with a humid north-western climate.<sup>1</sup> A number of these countries have also developed guidelines that give water quality criteria and advice on how effluents should be treated for purposes such as irrigation, groundwater recharge and recreational reuse. Examples of these are the 'Guidelines for water reuse',<sup>2</sup> 'Queensland Water Recycling Guidelines'<sup>3</sup> and the Spanish 'Real Decreto 1620/2007'.<sup>4</sup> Among the diverse types of effluents with the potential for reuse are those from municipal waste water treatment plants (WWTP), which are an attractive and common source of water, and can be used for a large range of applications such as in soils on cultivated and marginal areas, various facilities and within urban building complexes.<sup>5</sup> Nevertheless, the presence of micropollutants in these and other effluents is a topic of great concern.<sup>6</sup> Most of these contaminants, including pharmaceuticals and pesticides, can affect natural ecosystems<sup>7</sup> and bioaccumulate in the environment.<sup>8,9</sup> In this context, the treatment of secondary effluents (SE) could minimize the discharge of micropollutants and

enteric pathogens into the receiving waters, thereby improving the overall SE quality for possible reuse.

Water reclamation for non-potable reuse typically requires conventional water and wastewater treatment technologies that are already widely practised and readily available in many countries. However, if the quality of the reclaimed water is not appropriate for the intended use, a higher level of wastewater treatment is required. Often, the use of filtration, oxidative and enhanced disinfection processes is recommended.<sup>2</sup> Thus, due to their ability to remove diverse types of micropollutants from water<sup>10–12</sup> and to disinfect,<sup>13</sup> advanced oxidation processes (AOPs) can be used as alternative methods to recycle SE and achieve the levels of reuse parameters imposed by current legislation. Among the AOPs, ultraviolet irradiation in combination

\* Correspondence to: R.F. Dantas, Chemical Engineering Department, University of Barcelona, Martí i Franquès 1, 08028, Barcelona, Spain. E-mail: renatofalcaod@ub.edu

a Chemical Engineering Department, University of Barcelona, Barcelona, Spain

b Chemical Engineering Program, COPPE, UFRJ, CP 68502, 21941-972, Rio de Janeiro, Brazil

c Department of Microbiology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

d Institut de Recerca de l'Aigua, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain



with hydrogen peroxide (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which produces hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) by the photolysis of hydrogen peroxide, can degrade micropollutants<sup>14,15</sup> and simultaneously reduce other physicochemical parameters included in current water reuse legislations.<sup>16</sup> However, there is still little research concerning the effect of AOPs on microbiological and physicochemical parameters in municipal effluents for reuse purposes.

In this study, four different model microorganisms were tested for UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inactivation: *E. coli* and spores of sulphite-reducing clostridia (SSRC) as bacterial indicators,<sup>17</sup> and somatic coliphages (SOMCPH) and phages infecting the CB390 strain (CB390PH) as viral indicators.<sup>18</sup> The CB390 strain is a genetically modified *E. coli* WG5 strain that can be used to simultaneously detect somatic coliphages and RNA F-specific coliphages (both suggested elsewhere as viral indicators). Except for CB390PH, all these indicators are included in the different reclaimed water guidelines mentioned above, since they can represent both the occurrence and the response of different types of pathogens (i.e. bacteria, viruses and protozoa) to water disinfection. *E. coli* is considered as a traditional indicator whereas bacteriophages and SSRC are considered as alternative indicators. 1-chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine (Atrazine = ATZ) was chosen as a model compound to represent micropollutant presence in SE. ATZ is usually used for pesticide control in the farming of corn and other crops.<sup>19</sup> Although ATZ was banned from the European Union (EU) in 2004 due to its persistent groundwater contamination, its considerable use in the past has impacted on the environment and is often found in surface and ground waters,<sup>20–22</sup> as well as in SE.<sup>23–26</sup> Other countries, however, consider this pesticide to be safe, given that cumulative exposures tests show that it is spread at levels below the limits that can potentially cause health effects; therefore, its final concentration has been limited to 3.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  for drinking water in these countries.<sup>2</sup>

This work aimed to assess the use of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a tertiary treatment of SE for water reuse purposes. The main concern is what modifications are produced in SE during disinfection by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using low H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration. The monitored parameters were those mentioned by the regulations of several countries (USA, Spain, Panama, Israel, Brazil, Italy, Australia and Portugal) covering different water reuse practices. To better evaluate water quality during the treatment, apart from disinfection, microcontaminant (ATZ) concentration, physicochemical parameters and toxicity (using LuminoTox<sup>®</sup>) were monitored. Finally, a cost study for the laboratory-scale treatment was performed.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents and WWTP effluent samples

Atrazine of purity higher than 98% and catalase from bovine liver were obtained from Sigma-Aldrich (Spain). Stock solutions of ATZ were prepared with Milli-Q water. Other chemicals such as hydrogen peroxide solution (30% w/w), oxalic acid (>99%), ammonium metavanadate (>99%), and solutions of acetonitrile, methanol, dichloromethane and uranyl nitrate were supplied by Panreac Química Inc. (Spain).

SE was collected from the secondary treatment outlet of the Gavà-Viladecans WWTP in Barcelona (Spain). The WWTP serves a population of 172 208 inhabitants and uses activated sludge processes plus decantation as secondary treatment. After collection, 40 L samples were transported to the laboratory within 1 hour and were filtered through 10  $\mu\text{m}$  pores. The disinfection experiments were performed within 30 min after the samples

were filtered and the microbiological indicators were analysed immediately. Samples for physicochemical analyses were stored at 4°C.

### UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> device set-up

Photochemical experiments were performed in batch mode using 2.0 L of effluent samples spiked with 0.1  $\text{mg L}^{-1}$  of ATZ. A single dose of hydrogen peroxide at an initial concentration of 5  $\text{mg L}^{-1}$  was added before starting the radiation. This low H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration was chosen in order to reduce costs and minimize the residual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the treated effluent. The photochemical reactor used was a Pyrex perfect mixing jacketed vessel (i.d. = 9.6 cm, height = 27.7 cm), assisted by a thermostatic system that kept the temperature at 25°C. The irradiation system included three low-pressure Hg UV lamps (Philips TUV 8W, G8T5) emitting at 254 nm and located inside quartz tubes (equally separated) immersed in the photo-reactor. The actinometrical measurement used to determine the UV fluence in the photoreactor was based on the photochemical decomposition of oxalic acid in the presence of uranyl nitrate, as described previously.<sup>27–29</sup> According to the actinometrical measurement, an incident photonic flux of  $1.49 \times 10^{-5}$  Einstein  $\text{s}^{-1}$ , corresponding to a fluency rate of 8.04  $\text{W cm}^{-2}$  for the three 254-nm lamps, was obtained.

### Analytical methods

Atrazine concentration in SE and in deionized water was measured by an HPLC system supplied by Waters Corporation. The HPLC column used was a Teknokroma C-18 Tracer Extrasil ODS2 (250 mm  $\times$  4.6 mm) and the mobile phase consisted of a 60:40 solution of acetonitrile and water, respectively. The wavelength of the UV detector was set at 221.0 nm and the flow rate kept at 1  $\text{mL min}^{-1}$ . To monitor the ATZ concentration in the order of magnitude of  $\mu\text{g L}^{-1}$ , a solid phase extraction was necessary. ATZ extraction was undertaken by filtering the sample through cartridges (Oasis HLB discs, Waters<sup>®</sup>). Afterwards, ATZ was extracted from the retention cartridges using 20 mL of acetonitrile followed by 20 mL of methanol. The solvent was evaporated by a N<sub>2</sub> stream and the obtained solid was dissolved in 2.5 mL of a 60:40 solution of acetonitrile:water.

Total organic carbon (TOC) levels were measured by a Shimadzu TOC-VCSN TOC analyser. To determine the chemical oxygen demand (COD), the standard APHA 5220 D procedure was followed. UV<sub>254</sub> absorbance was used as the aromaticity indicator and was measured using a Perkin Elmer UV/VIS Lambda 20 spectrophotometer. The most common reuse parameters were: total suspended solids (TSS) and turbidity, which were analysed following APHA standard methods guidelines 2540D and 2540E, respectively. To measure turbidity, a HACH 2100P turbidimeter was used.

### Microbiological analysis

*E. coli* and SSRC were selected as bacterial indicators. *E. coli* was quantified by membrane filtration using 47-mm cellulose acetate filters with a nominal pore size of 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore EZ-Pack membrane filters, Cat. Number: EZHAWG474), and incubated on Chromocult<sup>®</sup> Coliform Agar (Merck KGaA, Germany) for 20  $\pm$  4 h at 44°C. SSRC were cultured on SPS agar medium for 24 h at 44°C, following the method of Bufton (1959).<sup>30</sup> Somatic coliphages (SOMCPH) were selected as viral indicators and were detected following the ISO standard 10705–2.<sup>31</sup> Phages infecting the CB390 strain were enumerated by the double-agar-layer method

following the protocol of Guzmán *et al.*<sup>32</sup> The detection limit in treated SE was 10 CFU or PFU per 100 mL for all the indicators.

### Toxicity testing procedures

To assess toxicity, LuminoTox<sup>®</sup> was used. The bioassays were conducted on samples taken from UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> runs using [ATZ]<sub>0</sub> = 0.1 mg L<sup>-1</sup> and [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>0</sub> = 5 mg L<sup>-1</sup>. The LuminoTox<sup>®</sup> SAPS test kit consisted of a fluorometer biosensor that used stabilized aqueous photosynthetic systems (SAPS) to recognize toxic chemicals in the water by measuring photosynthetic activity. SAPS are algae (*Chlorella vulgaris*) that fluoresce when photosynthesis is triggered by light absorption. The absorbed energy is emitted as fluorescence, which is the signal measured by the LuminoTox<sup>®</sup> device. Decreases in fluorescence measurements produced by a blank and test samples containing toxic contaminants were expressed as percentage inhibition. An incubation period of 15 min was started when 100 µL of SAPS solution were added to 2 mL of sample using an amber syringe followed by mixing by inverting five times. In this incubation period, permeable molecules acting directly on the photosynthetic electron chain were detected at low concentrations. Following this exposure period, the content of the syringe was added to a cuvette within the LuminoTox<sup>®</sup> device to determine toxicity. The endpoint determined was the fluorescence inhibition at 15 min, expressed in %. The samples were analysed after residual hydrogen peroxide quenching using catalase solution.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Wastewater characterization

The SE was characterized after filtration and its physicochemical parameters are shown in Table 1. This first step of filtration was carried out to avoid suspended and/or flocculated material that would disturb analytical measurements. This previous filtration removed about 50% TSS, 20% turbidity and 10% COD. The other parameters were not affected.

All effluent parameters were within the standard range of values for municipal WWTP. Variation in the values was considered normal. It is important to mention that the results in this paper depended on the WWTP effluent composition. It is well known that WWTP effluents can differ considerably, despite the treatments applied being similar. This is due to factors such as the treated volume, chemical substances, the presence of a variety of industrial effluents and the season of the year, which directly affect treatment efficiency.<sup>33,34</sup>

### Disinfection

To carry out disinfection experiments, SE samples were taken and transported in refrigerated boxes to the laboratory in about 30 min. Disinfection experiments were performed and the samples were analysed immediately after. SE samples were treated with UV irradiation alone or UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (using 5 mg L<sup>-1</sup> of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in the presence and absence of 0.1 mg L<sup>-1</sup> of ATZ. The runs lasted a maximum of 60 min; however, the samples were withdrawn after 0.5, 1, 2, 3, 4 and 5 min of treatment. After 5 min of treatment, no significant changes were observed in the disinfection parameters (tailing plateau).

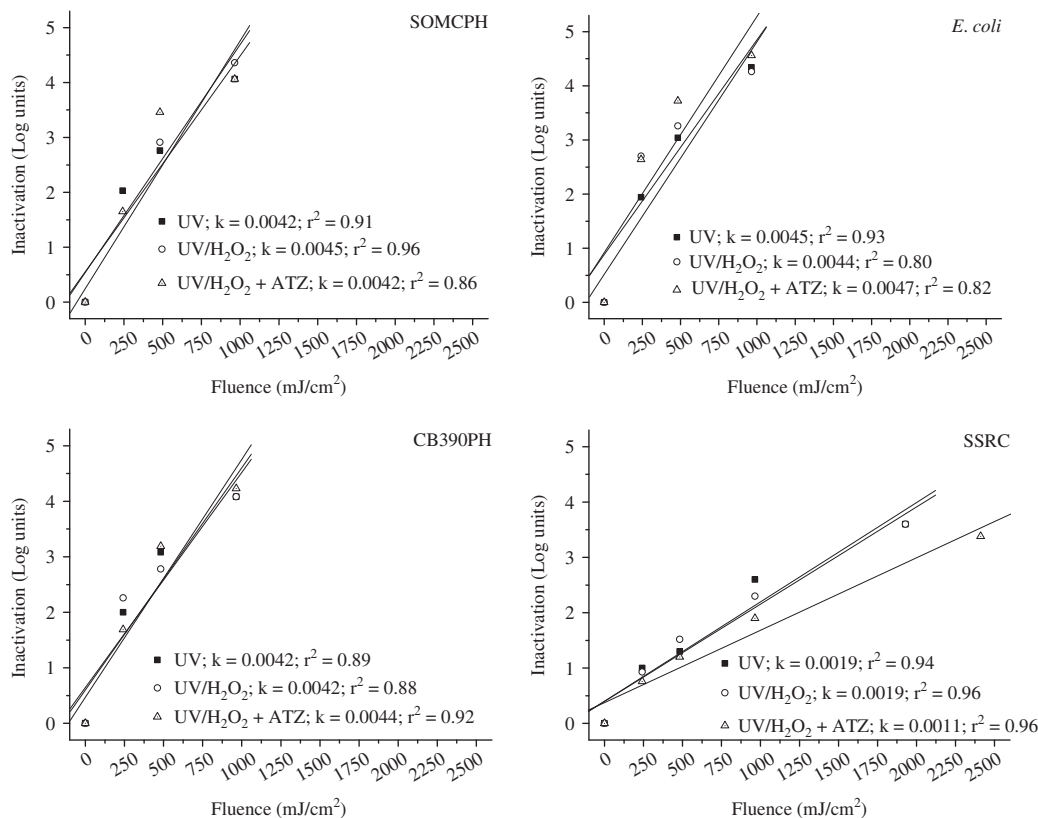
Samples of SE were filtered prior to disinfection to improve subsequent processes. However, there were no significant differences (*P*-value > 0.05) in any of the disinfection indicators before and after filtration.

**Table 1.** Characteristics of the pre-filtrated secondary effluent

Parameter	Value
pH	7.9 ± 0.1
TSS (mg L <sup>-1</sup> )	12.2 ± 1.1
Alkalinity (mg HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> L <sup>-1</sup> )	507 ± 24
Turbidity (NTU)	4.1 ± 0.7
UV <sub>254</sub> (cm <sup>-1</sup> )	0.3144 ± 0.0126
TOC (mg C L <sup>-1</sup> )	15.5 ± 1.2
COD (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	52 ± 4
BOD <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	9.1 ± 1.4

Initial concentrations (in log units) in SE effluents were as follows: (i) 6.03 ± 0.02 (SD) for *E. coli*; (ii) 5.26 ± 0.14 for SOMCPH; (iii) 5.13 ± 0.07 for CB390PH and (iv) 4.53 ± 0.1 for SSRC. In Fig. 1, microorganism inactivation by UV and ·OH oxidation is expressed as microbial concentration removal (log units) versus UV fluence. The data were also used to calculate the inactivation constant (*k*), which was used to compare the inactivation rate of all the treatment conditions used. Although there were weak differences in the inactivation kinetics, all the indicators were below the detection limit after 5 min of treatment regardless of the treatment. *E. coli* as well as SOMCPH and CB390PH were quickly inactivated, whereas SSRC showed a slightly higher resistance. Log reductions of these parameters were 5.04, 4.36, 4.08 and 3.6, respectively. The initial concentration of SSRC in the SE was the lowest. SSRC resistance has been reported elsewhere; these microorganisms have been described as suitable surrogates of protozoan pathogens such as *Cryptosporidium*.<sup>17,34</sup> Health risks related to *Cryptosporidium* in water have been well described<sup>35,36</sup> and it is considered as a reference pathogen due to its high resistance to one of the most commonly applied disinfection procedures, chlorination. Therefore, the need for an appropriate indicator is clear. SSRC have shown similar behaviour to *Cryptosporidium* before tertiary treatments such as UV and chlorination,<sup>37</sup> which is a common treatment used in Catalonia for water reclamation.

A irradiation time of 5 min, corresponding to a UV fluence of 2412 mJ cm<sup>-2</sup>, was able to inactivate all disinfection indicators. However, the UV inactivation constant for each microbial indicator was as follows: *E. coli* > SOMCPH ≥ CB390PH > SSRC, which is in agreement with results previously described in real SE samples.<sup>38</sup> CB390PH resistance to UV irradiation is slightly higher than that of SOMCPH because strain CB390 allows the simultaneous detection of SOMCPH and F-specific RNA phages, which are more resistant to UV irradiation. The synergistic effect between UV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elicited a similar reduction of the disinfection indicators to that induced by direct UV photolysis. Therefore, it can be suggested that the contribution of the UV dose was much higher than that of the OH radical toward disinfection. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed 5 min after UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment was around 1 mg L<sup>-1</sup>, thus confirming the presence of hydroxyl radicals in the medium. The effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone was not investigated since it is known that *E. coli* is not inactivated within this range of concentration and exposure time.<sup>39,40</sup> ATZ only affected the SSRC inactivation rate, which had its inactivation rate kinetic constant reduced by about 42%. This decrease may be explained by the UV absorption by ATZ molecules, which diminished the UV available for inactivating SSRC. Since the other inactivation indicators were less resistant to direct UV-C irradiation, this influence could not be observed in them.



**Figure 1.** Indicators of inactivation of the different treatments applied to the filtered SE. SOMCPH, somatic coliphages; CB390PH, phages infecting the CB390 strain; SSRC, spores of sulphite-reducing clostridia.

### Reuse proposal

To obtain the reusable quality required by legislation, the effluent must meet the desired levels for specific parameters. Figure 2 shows the analysis of the most common water reuse parameters: turbidity and TSS during UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. After disinfection (5 min of reaction) the treatment was not able to achieve the required SE quality for reuse, so the treatment time was extended to verify its effect on reuse parameters. According to Fig. 2, after 120 min of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, turbidity was reduced by more than 60% and TSS by about 40%, indicating that the OH radical decreased specific reuse parameters. After 90 min of reaction, these parameters reached a plateau and no further reduction was observed. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption after 120 min was greater than 98% (4.92 mg L<sup>-1</sup>), thus this time was considered the end of the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaction. TSS and turbidity were not affected by UV irradiation alone.

To better compare the effects of the treatment, the results were compared with the recommendations given by different water reuse legislation. Table 2 summarizes the water quality reuse criteria of some countries.

As shown in Table 2, turbidity, pH, TSS and coliforms are the most relevant and widely used water reuse parameters for recreational and environmental purposes. In some particular applications, COD and BOD<sub>5</sub> can be monitored as probing parameters. Depending on the industrial water reuse application, specific parameters such as metal concentrations, temperature and alkalinity are required to be monitored. Apart from the specific reuse legislation, water quality should follow the regular water quality legislation of each country for treating effluents, which in general prohibits the presence of some hazardous microcontaminants and, in some specific cases, emerging contaminants.

In this work, the water quality requirements for reuse were divided into different levels to better suit the differences in legislation. Thus, three different oxidation periods were considered based on the level of the treatment, which all achieved the water quality appropriate for reuse. Figure 3 displays the oxidation steps including treatment time and UV dose.

Three important steps providing the desired water qualities using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were identified. It is important to mention that according to the legislations followed in this study, the SE was not suitable for direct reuse due to its high microbiological content. The disinfection stage based on UV and OH radicals was able to inactivate microbial indicators in the SE after 5 min. When the oxidation time was extended to 35 min, in addition to SE disinfection, the micropollutant ATZ was completely removed from the effluent. The ATZ elimination step was an important achievement because ATZ represents a micropollutant that needs to be removed according to legislation. This treatment time was called the 1st condition as some appropriate water reuse parameters were achieved. The 2nd condition was achieved after 60 min of treatment, when TSS and turbidity reached values below 10.0 mg L<sup>-1</sup> and 3.0 NTU, respectively; this was sufficient to comply with new water reuse recommendations. After 100 min of reaction, the 3rd condition was reached, in which TSS and turbidity were reduced, reaching 7.0 mg L<sup>-1</sup> and 2.0 NTU, respectively. Thus, in accordance with the criteria used, this level of treatment yielded the desired quality for all applications. The exception was for reuse in cooling towers suggested by the Spanish legislation, which requires a turbidity of 1.0 NTU. Table 3 correlates the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment level with water reuse applications according to diverse regulations.

**Table 2.** Water reuse criteria and parameters from legislations of different countries

Criteria	Water reuse from country or directives	Parameter												
		Total Coliform (CFU/100 mL)	Somatic coliphage, F-RNA bacteriophage (PFU/100 mL) and Clostridium perfringens (CFU/100 mL)	Fecal Coliform (CFU/100 mL)	<i>E. coli</i> (CFU/100 mL)	TSS (mg L <sup>-1</sup> )	Turbidity (NTU)	BOD <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	COD (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	pH				
Agricultural irrigation (cultures of raw consumption, after processing industrial)	Portugal	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Spain	-	-	-	100 - 10000	-	20	-	-	-	-	-	-	-
	Italy	-	-	10 - 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	USEPA	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Golf courses and green areas irrigation	California/USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Australia (A+) <sup>a</sup>	-	< 1 (median); <10 (95%ile)	-	<1 (median); <10 (95%ile)	-	-	2 (95%ile); 5 (max)	20	-	-	-	-	6 - 8.5
	Florida/USA	2.2 - 23	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Israel	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Steam boiler	Portugal	-	-	200	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-
	Spain	-	-	-	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Italy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	USEPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cooling towers	California/USA	23 - 240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Australia (A or C)	-	-	-	(10 - 1000)*	(5-30)*	2 (95%ile); 5 (max)	20	-	-	-	-	-	6 - 8.5
	Florida/USA	-	-	(200 - 800)*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Israel	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Recharge of aquifers	California/USA	0 - 1000	-	-	-	5	10	-	-	-	-	-	-	-
	Washington/USA	23	-	25	-	5	10	-	-	-	-	-	-	-
	Phoenix/USA	3500	-	200	2000	25	3	-	-	-	-	-	-	-
	Spain <sup>b</sup>	-	-	-	10000	15	35	-	-	-	-	-	-	-
Restricted recreation	USEPA	-	-	-	-	100	50	25	75	6 - 9	-	-	-	-
	Spain <sup>c</sup>	-	-	800	0	10	2	-	-	-	-	-	-	-
	Australia (c)	-	-	-	<1000	5	2 (95%ile); 5 (max)	20	-	-	-	-	-	6 - 8.5
	USEPA	-	-	0 - 75	-	30	2	5	-	-	-	-	-	6 - 9
Not restricted recreation	Australia (A)	-	-	-	<10	30	-	5	-	-	-	-	-	6 - 8.5

**Table 2.** Continued

Parameter		Somatic coliphage, F-RNA bacteriophage (PFU./100 mL) and Clostridium perfringens (CFU./100 mL)									
Criteria	Water reuse from country or directives	Total Coliform (CFU./100 mL)	Fecal Coliform (CFU./100 mL)	<i>E. coli</i> (CFU./100 mL)	TSS (mg L <sup>-1</sup> )	Turbidity (NTU)	BOD <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	COD (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	pH		
Urban not-potable (not restrict use)	USEPA	-	0	-	20	2	10	-	6-9		
	Australia	-	-	-	-	2 (95%ile); 5 (max)	-	-	6-9.2		
	Spain	-	-	0	10	2	-	-	-		
Urban not-potable (restrict use)	USEPA	-	100	-	45	2	45	-	6-9		
	Spain	-	-	200	20	10	-	-	-		
Building construction	SINDUSCON-SP/Brazil	-	0	-	5	2	10	-	6-9		

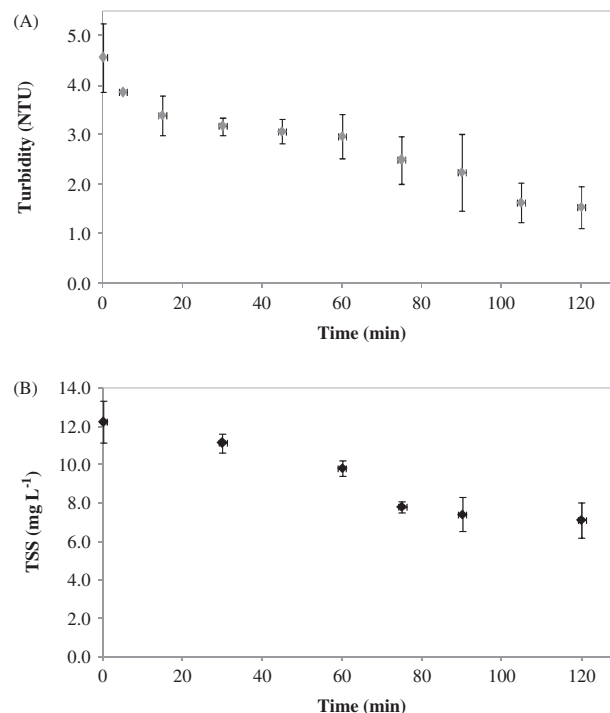
<sup>a</sup> For sustainable irrigation, salinity should be kept as low as possible, e.g. if TDS > 1000 mg/L or EC > 1600  $\mu$ S/cm, a salinity reduction program should be implemented.

<sup>\*</sup>Maximum and minimum value for several restricted reuse recommendation.

<sup>b</sup> Injection for percolating.

<sup>c</sup> direct injection.

-value not established.



**Figure 2.** Turbidity (A) and total suspended solids (B) versus time during UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of SE. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>0</sub> = 5 mg L<sup>-1</sup>, UV fluence = 8.04 mW cm<sup>-2</sup>.

### Toxicity

Although the different legislations for water reuse do not consider toxicity measurements, we performed some assays to verify the impact of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the acute ecotoxicity of treated SE. LuminoTox<sup>®</sup> could detect positive responses in SE, as well as in SE samples spiked with 0.1 mg L<sup>-1</sup> of ATZ. The inhibition measurement indicated the toxicity responses shown in Fig. 4.

The toxic potential caused by the presence of ATZ and its transformation by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was assessed. ATZ clearly affected the LuminoTox<sup>®</sup> response in SE samples. An increase in irradiation time influenced the toxicity of the spiked SE, reducing toxicity proportionally to ATZ elimination. In the absence of ATZ, the bioassay detected a positive response; however, inhibition did not decrease with time during UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. The bioassay was considered sensitive to the SE samples used and contributed to the evaluation of water quality obtained by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The LuminoTox<sup>®</sup> assay also suggested that effluent organic matter (EfOM) transformation induced by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> did not promote the formation of more toxic compounds, supporting the suitability of this technique for SE reclamation.

### Micropollutant (ATZ) removal

To perform the runs, 100  $\mu$ g L<sup>-1</sup> of ATZ was added to 2 L of SE or distilled water (DW). The samples were subjected to UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment ([H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>0</sub> = 5 mg L<sup>-1</sup>) and ATZ concentration was recorded during the reaction time. Figure 5 shows the ATZ removal and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption profiles during the reaction.

When the SE sample underwent UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure, the system lowered the ATZ concentration to undetectable levels, achieving a reduction of over 99% (ATZ quantification limit = 0.55  $\pm$  0.05  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) after 35 min of treatment. Blank experiments with DW were also performed and verified the influence of EfOM on ATZ degradation, showing ATZ removal in around 2.5 min of

Treatment time (min)	5	35	60	100	120
UV dose ( $\text{mJ cm}^{-2}$ )	2412	16884	28944	48240	57888
TSS ( $\text{mg L}^{-1}$ )	12.1	11.1	9.8	7.3	7.1
Turbidity (NTU)	3.9	3.2	3.0	1.6	1.5
Reached condition	Inactivation	ATZ elimination 1 <sup>st</sup> reuse condition	2 <sup>nd</sup> reuse condition	3 <sup>rd</sup> reuse condition	Final reaction

Figure 3. Water reuse conditions achieved during the experimental time.

Table 3. Conditions for water reuse application

Reuse proposal	Water reuse application	Legislation or directive
Condition 1	Farming, golf course and green area irrigation	All mentioned in Table 2
	Steam boiler	Italy and Spain
	Cooling towers	USEPA
	Recharging of aquifers	Spain <sup>a</sup>
	Restricted recreation	USEPA and Australia
	Non-restricted recreation	Australia
	Urban non-potable (restricted use)	Spain and Australia
	Building construction	SINDUSCON-SP/Brazil
Condition 2	Steam boiler	California/USA, California/USA, Panamá
	Recharging of aquifers	Phoenix/USA
Condition 3	Urban non-potable (non-restricted use)	USEPA
	Non-restricted recreation	USEPA
	Recharging of aquifers	Spain <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Injection for percolation.

<sup>b</sup> direct injection.

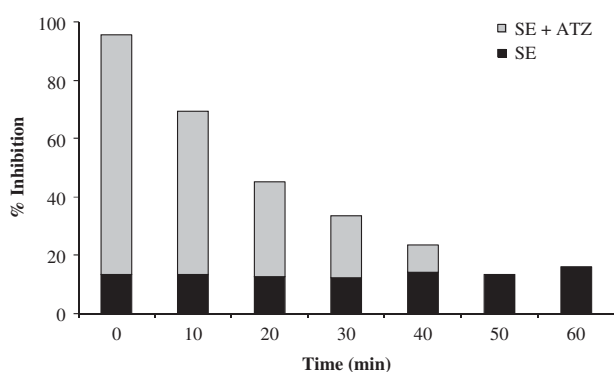


Figure 4. Toxicity LuminoTox<sup>®</sup> analysis results for UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of SE samples and SE + ATZ samples.  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $[\text{ATZ}]_0 = 0.1 \text{ mg L}^{-1}$  and UV fluence =  $8.04 \text{ mW cm}^{-2}$ .

treatment. EfOM presence increased the treatment time needed to remove ATZ. This necessitated an important rise of the required UV irradiance, which increased from 1206 to 16884  $\text{mJ cm}^{-2}$ . It is important to point out that as expected, ATZ also had an important direct photolysis rate. Figure 5 also shows that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed to achieve total ATZ removal were 2.4 and 1.9  $\text{mg L}^{-1}$  for SE and DW, respectively.

#### Mineralization and specific UV absorbance (SUVA) removal

Photochemical treatment, which is considered efficient in reducing physicochemical parameters, did not promote significant mineralization of the effluent in this case. Figure 6 presents TOC removal during the reaction. TOC did not exhibit a clear decrease when using the hydrogen peroxide concentration of 5  $\text{mg L}^{-1}$ . However, when evaluating EfOM aromaticity, a significant reduction was observed, indicating that the OH radicals affected mainly the molecular weight of organic substances in SE by breaking aromatic rings and double bonds. The UV<sub>254</sub> and TOC were used to calculate the aromaticity indicator. It was assumed that UV<sub>254</sub> was a useful indication of the levels of hydrocarbon content, double bonds and carbonyl organic substances, including humic acid. The combination of these measurements can be used to calculate the SUVA ( $\text{UV}_{254}/\text{TOC}$ ), a practical parametric predicting the aromatic carbon content of organic matter in water.<sup>41,42</sup> According to the classification quoted by Edzwald and Benschoten,<sup>41</sup> SUVA values, expressed in  $\text{L m}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  and ranging from 4 to 6.5, mainly represent organic matter composed of humic and fulvic acids, suggesting greater aromaticity and stronger hydrophobicity with larger molecular weights. SUVA values less than 3 correspond to organic compounds with less aromaticity and relative hydrophobicity and lower molecular weight. Figure 5 shows SUVA measurements and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption in SE samples

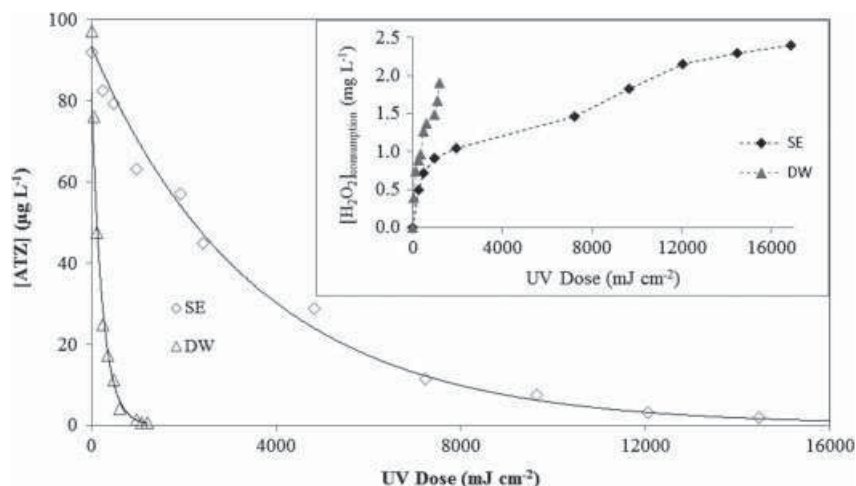


Figure 5. ATZ decay and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption during UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment in DW and SE. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>0</sub> = 5 mg L<sup>-1</sup>.

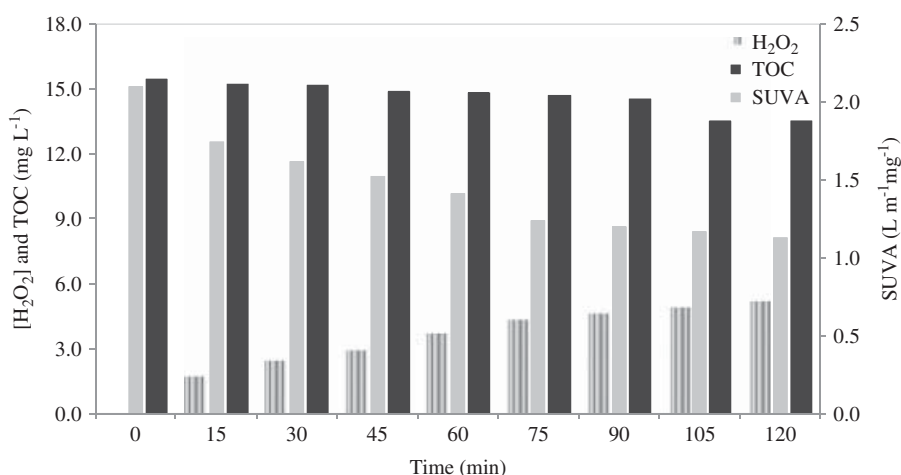


Figure 6. Effect of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on mineralization, aromaticity and hydrogen peroxide consumption in SE samples. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 5 mg L<sup>-1</sup>, UV fluence = 8.04 mW cm<sup>-2</sup>.

treated with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 120 min. Regarding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption with time, Fig. 5 demonstrates that the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process continued during the entire reaction time. As previously commented, after 120 min, all the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was consumed and the reaction finished.

### Energy consumption and costs

Energy consumption of the different steps of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation was calculated and compared. The electrical energy required was calculated using a UV fluence of 8.04 mW cm<sup>-2</sup>, an irradiation area of 169.3 cm<sup>2</sup> for a 2-L vessel and a reflection coefficient value for the reactor walls of 1.5, as described in Equation (1):

$$G_{UV} = \frac{I_0 \times A \times C_f}{V} \quad (1)$$

where  $G_{UV}$  = consumption of light bulbs UV (W L<sup>-1</sup>);  $I_0$  = UV fluence (8.04 × 10<sup>-3</sup> W cm<sup>-2</sup>);  $A$  = irradiation area (169.3 cm<sup>2</sup>);  $C_f$  = reflection coefficient of reactor wall (1.5); and  $V$  = reactor volume (2 L).

According to Equation (1), the energy needed to treat 1 m<sup>3</sup> of effluent was 1.02 kW m<sup>-3</sup>. Considering that the local energy cost

in Barcelona city (Spain) is 0.1177 € kWh<sup>-1</sup>, it was possible to quantify the energy cost associated with the different oxidation periods of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. The expected hydrogen peroxide consumption cost was also considered, taking into account a laboratorial commercial value of 5 € kg<sup>-1</sup> (hydrogen peroxide 30%). Table 4 shows the electrical energy and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption costs to treat each m<sup>3</sup> of SE.

The calculated total energy costs (UV radiation + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption costs) was considered relatively low, not exceeding 0.23 € m<sup>3</sup> of treated effluent. In particular, the UV radiation cost represented the major portion of the total cost. However, for strict energy cost quantification of the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process, other variables must be considered such as those associated with storage and sample handling, reagents, maintenance, reactor design considerations, thermostatic jacket system and labour cost. They can strongly affect operational costs. It should also be considered that if the initial hydrogen peroxide concentration is increased, the reaction time and the irradiation time (energy cost) decrease. Therefore, the costs presented in this work refer only to UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment using a low H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dosage. The cost of the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment is in agreement with some bench scale studies dealing with the cost of advanced oxidation for water and wastewater treatment.<sup>43,44</sup>

**Table 4.** Theoretical energy costs of several stages of the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment process on SE

Reaction stage	Reaction time (h)	UV consumption (kWh m <sup>-3</sup> )	UV energy cost (€/m <sup>3</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> consumption (kg m <sup>-3</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> cost (€/m <sup>3</sup> )	Total costs (€/m <sup>3</sup> )
Disinfection	0.0670	0.0680	0.0080	$6.17 \times 10^{-4}$	0.0031	0.0111
ATZ elimination / 1 <sup>st</sup> condition	0.5800	0.5950	0.0700	$2.55 \times 10^{-3}$	0.0127	0.0828
2 <sup>nd</sup> condition	1.0000	1.0200	0.1201	$3.70 \times 10^{-3}$	0.0185	0.1386
3 <sup>rd</sup> condition	1.6700	1.7000	0.2001	$4.50 \times 10^{-3}$	0.0225	0.2226
Complete reaction	2.0000	2.0400	0.2401	$4.90 \times 10^{-3}$	0.0245	0.2646

## CONCLUSION

In this study, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of municipal effluents using low H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dosages achieved *E. coli* levels allowed by Spanish legislation (RD 1620/2007) for different reuse purposes such as for farming, green areas, golf course irrigation and some urban uses. This, coupled with the fact that bacteriophages and SSRC were also removed, suggests that UV plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are very effective for SE disinfection and SE recycling even in the presence of more resistant organisms. Moreover, the treatment was able to achieve other reuse conditions by increasing treatment time.

With low hydrogen peroxide concentration and increasing treatment time UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment generated reuse parameters deemed acceptable by most national water reuse legislation, the exception being for its use in cooling towers (Spanish legislation). During SE treatment, very low mineralization was observed; however, the aromaticity of the effluent was considerably lowered. Despite the low transformation of the EFOM during SE oxidation, there was a significant reduction in sample ecotoxicity during treatment. Concerning the costs of recycling SE using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the calculated value was not considered unusual for the treatment of municipal effluents.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Spanish Ministry of Education and Science (CTQ2008-1710/PPQ; Consolider-Ingenio 2010 CSD2007-00055), the Brazilian 'Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior' CAPES and the Generalitat de Catalunya (2009-SGR-01043) for financial support of this work.

## REFERENCES

- Hochstrat R, Wintgens T and Melin T, Development of integrated water reuse strategies. *Desalination* **218**:208–217 (2008).
- USEPA, Guidelines for Water Reuse. Office of Water US Environmental Protection Agency, Washington, DC. EPA/625/R-04/108 (2004).
- USEPA, Queensland Water Recycling Guidelines. Brisbane, Queensland (2005).
- Spain, Royal Decree 1620/2007, Madrid. (Real Decreto 1620/2007, 50639–50661). Madrid, (2007).
- Kalavrouziotis IK and Apostolopoulos CA, An integrated environmental plan for the reuse of treated wastewater effluents from WWTP in urban areas. *Building Environ* **42**:1862–1868 (2007).
- Ternes TA, Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res* **32**:3245–3260 (1998).
- Cleuvers M, Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett* **142**:185–194 (2003).
- Albanis TA, Hela D, Papakostas G and Goutner V, Concentration and bioaccumulation of organochlorine pesticide residues in herons and their prey, in wetlands of Thracian Gulf, Macedonia, Greece. *Sci Total Environ* **182**:11–19 (1996).
- Isidori M, Nardelli A, Pascarella M, Rubino M and Pascarella A, Toxic and genotoxic impact of fibrates and their protoproducts on non-target organisms. *Environ Int* **33**:635–664 (2007).
- Pera-Titus M, Garcia-Molina V, Baños MA, Gimenez J and Esplugas S, Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation process: a general review. *Appl Catal B Environ* **47**:219–256 (2004).
- Pignatello JJ, Oliveros E and Mackay A, Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Critic Rev Environ Sci Technol* **36**:1–84 (2006).
- Dantas RF, Darcissac M, Lesueur C, Contreras S, Sans C, Fuerhacker M and Esplugas S, Assessment of cationic surfactants mineralization by ozonation and photo-fenton process. *Water Environ Res* **81**:201–205 (2009).
- Debowski M and Krzemieniewski M, The influence of Fenton's reagent on the raw sludge disinfection. *Environ Prot Eng* **33**:65–76 (2007).
- Guzzella L, Feretti D and Monarca S, Advanced oxidation and adsorption technologies for organic micropollutant removal from lake water used as drinking-water supply. *Water Res* **36**:4307–4318 (2002).
- Kusic H, Koprivanac N and Bozic AL, Minimization of organic pollutant content in aqueous solution by means of AOPs: UV- and ozone-based technologies. *Chem Eng J* **123**:127–137 (2006).
- Koning J, Bixio D, Karabelas A, Salgot M and Schäfer A, Characterization and assessment of water treatment technologies for reuse. *Desalination* **218**:92–104 (2008).
- Payment P and Franco E, *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl Environ Microbiol* **59**:2418–2424 (1993).
- Lucena F and Jofre J, Potential use of bacteriophages as indicators of water quality and wastewater treatment processes, in *Bacteriophages in the Control of Food and Waterborne Pathogens*, ed by Sabour PM and Griffiths MW. ASM Press, Washington, 103–118 (2010).
- Montiel A, Elimination de l'atrazine: traitements physico-chimiques et/ou traitements biologiques. *Water Supply* **7**:213–223 (1989).
- Marchini S, Passerini L, Cesario D and Tosato ML, Herbicidal triazines: acute toxicity on *Daphnia*, fish and plants and analysis of its relationships with structural factors. *Ecotoxicol Environ Safety* **16**:148–157 (1988).
- Bottoni P and Fumari E, Criteria for evaluating the impact of pesticides on groundwater quality. *Sci Total Environ* **123**:581–590 (1992).
- Gavrilescu M, Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Eng Life Sci* **5**:497–526 (2005).
- Seel P, Knepper TP, Gabriel S, Weber A and Haberer K, Entry of pesticides in surface water - an attempt at the mass balance. *Vom Wasser* **86**:247–262 (1996a).
- Seel P, Knepper TP, Gabriel S, Weber A and Haberer K, Sewage works as the main source of pesticides in surface water - balance of the entry. *Vom Wasser* **86**:247–262 (1996b).
- Nitschke L and Schossler W, Surface water pollution by herbicides from effluents of waste water treatment plants. *Chemosphere* **36**:35–41 (1998).
- Xiang-Ji K, Dong Li, Lian-Qiu C, Xue-Mei Z, Yan Z, Yang L and Jie Z, Evaluation of municipal sewage treatment systems for pollutant removal efficiency by measuring levels of micropollutants. *Chemosphere* **72**:59–66 (2008).
- Volman D and Seed J, The photochemistry of uranyl oxalate. *J Am Chem Soc* **86**:331–335 (1964).
- Heidt L, Tregay G and Middleton F, Influence of the pH upon the photolysis of the uranyl oxalate actinometer system. *J Phys Chem* **74**:1876–1882 (1979).
- Vicente M and Esplugas S, Calibrado del fotoreactor anular. *Afinidad* **387**:453–457 (1983).



- 30 Bufton AW, A note of the enumeration of thermophilic sulphite-reducing bacteria. *J Appl Bacteriol* **22**:278–280 (1959).
- 31 ISO 10705–2. Detection and Enumeration of Bacteriophages. Part 2. Enumeration of Somatic Coliphages. International Standardization Organization, Geneva.
- 32 Guzmán C, Mocé-Llivina L, Lucena F and Jofre J, Evaluation of *Escherichia coli* host strain CB390 for simultaneous detection of somatic and F-specific coliphages. *Appl Environ Microbiol* **74**:531–534 (2007).
- 33 Monte HM and Albuquerque A, Technical guide n.14 – Wastewater reuse, 1st edn. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. Lisboa, Portugal (2010).
- 34 Wu J, Long SC, Das D and Dorner SM, Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. *J Water Health* **9**:265–278 (2011).
- 35 WHO, *Risk Assessment of Cryptosporidium in Drinking-Water*. WHO, Geneva, Switzerland (2009).
- 36 Gennacarro, AL, McLaughlin MR, Quintero-Betancourt W, Huffmann DE and Rose JB, Infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in final reclaimed effluent. *Appl Environ Microbiol* **69**:4983–4984 (2003).
- 37 Agulló-Barceló M, Casas-Mangas R and Lucena F, Direct and indirect QMRA of infectious *Cryptosporidium* oocysts in reclaimed water. *J Water Health* **10**:539–548 (2012).
- 38 Montemayor M, Costan A, Lucena F, Jofre J, Muñoz J, Dalmau E, Mujeriego R and Sala L, The combined performance of UV light and chlorine during reclaimed water disinfection. *Water Sci Technol* **57**:935–940 (2008).
- 39 Sommer R, Pribil W, Pflieger S, Haider T, Werderitsch M and Gehringer P, *Microbicidal efficacy of an advanced oxidation process using ozone/hydrogen peroxide in water treatment* *Water Sci Technol* **50**:159–164 (2004).
- 40 Mamane H, Shemer H and Linden KG, Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation. *J Hazard Mater* **146**:479–486 (2007).
- 41 Edzwald JK and Van Benschoten, J, Aluminum coagulation of natural organic matter, in *Chemical Water and Wastewater Treatment*, ed by Hahn HH and Klute R. Springer-Verlag, Berlin, 450–480 (1990).
- 42 Chin YP, Aiken G and O'Loughlin E, Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ Sci Technol* **28**:1853–1858 (1994).
- 43 Azbar N, Yonar T and Kestioglu K, Comparison of various advanced oxidation processes and chemical treatment methods for COD and color removal from a polyester and acetate fiber dyeing effluent. *Chemosphere* **55**:35–43 (2004).
- 44 Safarzadeh-Amiri A, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Treatment of methyl-tert-butyl ether (Mtbe) in contaminated waters. *Water Res* **35**:3706–3714 (2001).

### 3.5. ARTICLE 5

**Autors:** Míriam Agulló-Barceló, Inmaculada Polo-López, Francisco Lucena, Joan Jofre, Pilar Fernández-Ibáñez

**Títol:** *Solar advanced oxidation processes as disinfection tertiary treatments for real wastewater: implications for water reclamation*

**Revista:** Applied Catalysis B: Environmental (2013)

## RESUM

### Introducció

Els patògens causants de malalties infeccioses que es transmeten a través de l'aigua suposen un perill per a la salut pública associat a les aigües residuals urbanes. L'èxit en la prevenció de malalties de transmissió fecal-oral en països desenvolupats, rau en gran mesura, en la depuració d'aigües residuals i en la desinfecció d'aigua per a usos potables. Tot i així, hi ha certs factors que estimulen que la recerca de nous procediments de desinfecció continuï. Uns exemples en són la disminució en la disponibilitat d'aigua, l'increment de recursos hídrics no convencionals (com l'aigua regenerada), la preocupació pels productes derivats de la desinfecció, o la destrucció de microcontaminants.

La radiació solar i la fotocatàlisi solar són dos dels nous processos que estan essent investigats com a tractaments alternatius de tractament d'aigües i que formen part dels anomenats POAs. Com ja s'ha comentat en la introducció general, aquest tipus de tractaments s'han estudiat típicament amb mostres d'aigua netes o artificials, en condicions de laboratori i amb microorganismes dopats, però gairebé no hi ha informació pel que fa al seu efecte en els microorganismes presents de manera natural a l'aigua. Els microorganismes indicadors de contaminació fecal s'utilitzen tant per a la predicció de la incidència de patògens com per a l'estudi de l'efecte de tractaments de desinfecció a l'aigua. Per tot això, en aquest estudi, un efluent secundari convencional (de l'EDAR de *El Bobar* a Almeria) va ser sotmès a diferents tractaments de foto-oxidació: llum solar concentrada (UV), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, TiO<sub>2</sub>/UV i foto-Fenton solar amb l'objectiu d'avaluar el seu efecte en les concentracions d'indicadors: *E. coli*, espores de clostridis reductors del sulfit (SRC), fags somàtics (SOMCPH) i fags RNA F específics (FRNAPH).

### Resultats i discussió

Pel que fa al SODIS (*solar disinfection*), *E. coli* va ser l'indicador més sensible i les SRC el més resistent, mentre que els dos indicadors virals van mostrar una sensibilitat semblant entre ells, i inferior a *E. coli* però superior a SRC. L'experiment també es va dur a terme a la foscor per intentar separar l'efecte degut a radiació de l'efecte per temperatura. La temperatura no va tenir cap efecte en la inactivació dels indicadors, excepte per als FRNAPH. De fet, es va constatar que gairebé tota la inactivació dels FRNAPH produïda amb el SODIS era deguda a la temperatura i no pas a la radiació UV.

El tractament de llum solar + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 i 50 ppm), va ser més efectiu en la inactivació dels microorganismes que no pas la radiació solar per si sola. L'efecte de l'addició d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, va ser més potent en SRC i indicadors virals que no en *E. coli*. En condicions de foscor l'efecte va ser pràcticament nul per a tots els microorganismes indicadors. A més a més es va observar que el tractament amb 20 ppm d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era més eficient que el tractament amb 50 ppm, fet que ha estat descrit amb anterioritat.

L'ús del TiO<sub>2</sub>/UV va tenir un efecte molt diferent segons el tipus de microorganisme. Els indicadors virals, principalment els FRNAPH, van resultar ser molt més sensibles a la seva acció que no pas els bacterians. Tant les SRC com la *E. coli*, van mostrar una inactivació semblant a l'obtinguda només amb llum solar.

El foto-Fenton es va valorar a pH 3 (pH òptim per al seu funcionament) i a pH natural. A pH natural (7,31 ± 0,30), l'efecte sobre *E. coli* va ser molt semblant a l'efecte de l'addició de 50 ppm d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tenint en compte que com més alt és el pH, menys Fe hi ha en dissolució i per tant, menys reacció del Fenton tenim, aquest resultat semblen molt raonables. En canvi, a pH 3 els valors de *E. coli* es van reduir 4 uLog en 10 minuts. Pel que fa als indicadors virals, l'efecte va ser notable tant a pH natural com a pH 3, sobretot per als FRNAPH, que es van reduir > 3uLog després de 10 minuts de tractament. L'efecte del pH 3 per si sol es va comprovar en tots els microorganismes i només en el cas d'*E. coli* va ser significatiu, mostrant una reducció de > 2 uLog en 60 min.

Pel que fa a l'aplicabilitat d'aquests tractaments de foto-oxidació en plantes regeneradores d'aigua, es van calcular els temps que serien necessaris per aconseguir unes reduccions d'*E. coli* de 3, 4 i 6 uLog. Aquestes reduccions aconseguirien nivells d'*E. coli* recomanats per l'OMS, el RD 1620/2007 i la USEPA respectivament, per al reg amb aigua regenerada. Els resultats van mostrar que aquestes reduccions s'aconseguirien en 5,4 min, 7,2 min i 11,4 min respectivament. Temps que permetria implementar, sense massa complicacions, aquests sistemes a escala real.

## Conclusions

---

En primer lloc, els resultats suggereixen que un sol indicador microbià podria no ser prou útil com per garantir un risc baix d'infecció ja que els indicadors testats han tingut comportaments molt diferents. És a dir, que l'ús de més d'un microorganisme model garantiria millor l'efectivitat d'un tractament. D'altra banda, els indicadors estudiats podrien servir per fer estimacions de com els processos d'oxidació testats podrien afectar a bacteris, virus i protozous patògens. Finalment, els POAs utilitzats podrien ser molt útils per a la producció d'aigua regenerada segura i de qualitat de manera sostenible.

**INFORME SOBRE EL FACTOR D'IMPACTE - ARTICLE 5**

L'article *Solar advanced oxidation processes as disinfection tertiary treatments for real wastewater: implications for water reclamation* va ser acceptat el 28 de gener de 2013 a la revista *Applied Catalysis B: Environmental*, que està dins del Q1 en la temàtica d'*Environmental Sciences*. L'any 2011, la revista va presentar un índex d'impacte de 5,625.

**INFORME DE PARTICIPACIÓ - ARTICLE 5**

La doctoranda Míriam Agulló-Barceló va dur a terme totes les anàlisis de SOMCPH, FRNAPH i SRC incloent la preparació dels medis, reactius i material de referència (tant bacteris com bacteriòfags) així com de la seva validació. També va gestionar part de la logística del projecte, que va tenir lloc a Almería, i va participar en l'elaboració del disseny experimental i de la presa de decisions durant la seva execució. A més a més, va participar activament en la redacció de l'article (especialment en el que era relatiu a la microbiologia), en el processament de les dades, en l'elaboració de taules i figures, en la discussió global dels resultats i finalment ha contribuït a la difusió dels resultats que se n'han derivat.

Dr. Francisco Lucena Gutiérrez



**CARTA D'ACCEPTACIÓ DE L'EDITOR**

**Ms. Ref. No.: APCATB-D-12-01532R1**

**Title: Solar Advanced Oxidation Processes as disinfection tertiary treatments for real wastewater: implications for water reclamation.**

**Applied Catalysis B: Environmental**

Dear Dr. Fernandez-Ibañez,

I am pleased to inform you that your manuscript, entitled "Solar Advanced Oxidation Processes as disinfection tertiary treatments for real wastewater: implications for water reclamation.", is now accepted for publication in Applied Catalysis B.

From now on you will be contacted by the publisher. However, if you do encounter any difficulties, please do not hesitate to contact me.

Congratulations! Thank you for submitting your work to this journal and I am looking forward to receiving further manuscripts from your group.

Yours sincerely,

Xenophon E. Verykios, Professor  
Editor  
Applied Catalysis B: Environmental



# Solar Advanced Oxidation Processes as disinfection tertiary treatments for real wastewater: implications for water reclamation.

Agulló-Barceló M.<sup>b</sup>, Polo-López M.I.<sup>a</sup>, Lucena F.<sup>b</sup>, Jofre J.<sup>b</sup>, Fernández-Ibáñez P.<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Plataforma Solar de Almería – CIEMAT, PO Box 22, 04200 Tabernas, Almería, Spain

<sup>b</sup> Department of Microbiology. Faculty of Biology. Universitat de Barcelona. 643 Avinguda Diagonal, 08028 Barcelona, Spain

Miriam Agulló-Barceló: [miriam.agullo.b@gmail.com](mailto:miriam.agullo.b@gmail.com)

M. Inmaculada Polo-López: [inmaculada.polo@psa.es](mailto:inmaculada.polo@psa.es)

Francisco Lucena: [flucena@ub.edu](mailto:flucena@ub.edu)

Joan Jofre: [jjofre@ub.edu](mailto:jjofre@ub.edu)

## \*CORRESPONDING AUTHOR:

Dr. Pilar Fernández-Ibáñez

Plataforma Solar de Almería – CIEMAT, PO Box 22, 04200 Tabernas, Almería, Spain

Phone: + 34 950 387957

Fax: + 34 950 363015

Email: [pilar.fernandez@psa.es](mailto:pilar.fernandez@psa.es)

## Abstract

The aim of this study was to assess the disinfection of a real secondary effluent from a municipal wastewater treatment plant using added H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 and 50 mg L<sup>-1</sup>), TiO<sub>2</sub> (100 mg L<sup>-1</sup>) and photo-Fenton under natural solar radiation in compound parabolic collector photo-reactors. For this purpose, the naturally occurring *E. coli*, spores of sulphite-reducing clostridia (SRC), somatic coliphages (SOMCPH) and F-specific RNA bacteriophages (FRNA) were tested before and along the different solar treatments. Results for *E. coli* showed the different treatments efficiency rank: photo-Fenton pH 3 > H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mg L<sup>-1</sup>)/solar > TiO<sub>2</sub>/solar > solar photo-inactivation. On the other hand, for viral indicators the ranking was: photo-Fenton pH 3 > TiO<sub>2</sub>/solar > H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mg L<sup>-1</sup>)/solar > solar photo-inactivation. SRC were the most resistant indicator microorganism in all the evaluated processes. For the first time these solar processes have been evaluated for naturally occurring conventional indicators such as *E. coli* and alternative indicators such as SOMCPH and FRNA as viral indicators or spores of SRC as protozoan indicators. Some of the tested solar photo-oxidation treatments have shown their capability to reduce *E. coli* concentrations to a suitable level for water reuse (according to different reclaimed water guidelines) within affordable treatment times.

**Keywords:** Solar disinfection; AOP; *E. coli*; bacteriophages; reclaimed water



## 1. INTRODUCTION

Pathogens causing waterborne infectious diseases constitute one of the health risks associated with urban wastewater, and they have been identified as the main cause of contamination in streams, rivers and estuaries in the United States [1]. Diarrhoea is the most widespread waterborne infectious disease worldwide, mostly among children, and it is one of the leading causes of mortality in developing countries, where circa 88% of cases are associated with poor water quality and sanitation [2]. Among other measures, proper treatment of wastewater and drinking water disinfection are required in order to tackle this problem [3].

Other situations related to the scarcity of fresh water also render it necessary to conduct further research on new water disinfection technologies. First, the availability of safe fresh water is diminishing at an alarming rate both in high and low income countries, and sunny areas worldwide are particularly affected [4]. This situation will inexorably lead to the use of non-conventional water resources such as reclaimed water. Second, there is an increasing presence of disinfection by-products (DBPs) in drinking water due to the widespread use of chlorination and ozonation [5, 6]. Third, many countries and communities are unable to assume the economic and energy costs of some of the current disinfection treatments. Moreover, the efficacy of some widely used disinfection treatments is limited as regards removal of resistant waterborne pathogens such as *Cryptosporidium* and *Giardia* [7].

Advanced Oxidation Processes (AOPs) have been widely demonstrated to be reliable for wastewater treatment since they have a high capacity to oxidise nearly all organic pollutants. This capacity derives from the generation of hydroxyl radicals ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), the second most oxidant species after fluorine which acts unselectively [8]. Moreover, the use of solar light means that these treatments are environmentally friendly. Among solar AOPs, heterogeneous and homogeneous photocatalysis (i.e.  $\text{TiO}_2$  and photo-Fenton) are the processes which have received most research attention in recent decades for wastewater treatment purposes. Recently, these AOPs have also begun to be studied for water disinfection purposes [9].

This study analysed the disinfection capacity of 4 water disinfection methods based on the use of natural solar radiation. These were: solar photo-inactivation (with no additives or catalysts),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (20 mg and 50 mg  $\text{L}^{-1}$ ) with solar light, solar heterogeneous photocatalysis ( $\text{TiO}_2$ ), and solar photo-Fenton. Recently, these treatments have been proven to have a good capacity to inactivate microorganisms in water. Solar photo-inactivation has been applied for inactivation of a wide range of waterborne pathogens [10]. The synergistic effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and sunlight has been demonstrated to be effective for water disinfection against bacterial cells and fungal spores [11, 12]. Since the 90's, the use of  $\text{TiO}_2$ /solar UVA for inactivation of *E. coli*, *E.*

1 *faecalis*, total coliforms and several fungal spores has been studied in depth by several  
2 groups [13-16]. Moreover, the almost neutral pH photo-Fenton method has been  
3 studied as a novel mild water disinfection treatment. This treatment was successfully  
4 tested with *E. coli*, *E. faecalis*, *Salmonella* spp. and fungal spores in different  
5 contaminated waters [17-19].

6  
7 The concentration of pathogenic microorganisms in highly polluted waters, i.e.  
8 wastewater, may be low and furthermore, difficult to quantify. Consequently,  
9 indicators are used to represent both the potential occurrence and the response of  
10 pathogens to water disinfection, and faecal bacteria (faecal coliforms, *E. coli*,  
11 enterococci) are commonly used for this purpose. However, these indicators do not  
12 provide information on the occurrence and behaviour of viruses and protozoa. Hence,  
13 alternative indicators are used to evaluate water treatments: somatic coliphages  
14 (SOMCPH), F-specific RNA phages (FRNA) and bacteriophages infecting *Bacteroides*  
15 are used as viral indicators [20], and spores of sulphite-reducing clostridia (SRC) are  
16 used as indicators of oocysts of *Cryptosporidium* [21, 22]. These indicators are present  
17 in wastewater, and their concentrations in a secondary effluent are sufficiently high to  
18 monitor 4 log reductions of *E. coli*, 3.5-4 log of SOMCPH, 2.5-3 log of FRNA and 2-  
19 2.5 log of SRC without requiring costly and complicated concentration procedures  
20 [23].

21  
22 The aim of this study was to assess the disinfection of a real secondary effluent from a  
23 Municipal Wastewater Treatment Plant (MWWTP) using added H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> and photo-  
24 Fenton under natural solar irradiation in Compound Parabolic Collector (CPC) photo-  
25 reactors. For this purpose, the naturally occurring *E. coli*, SRC, SOMCPH and FRNA  
26 were tested before and throughout the different solar treatments in order to: (i)  
27 determine the inactivation of these microbial indicators in real wastewater effluents,  
28 (ii) determine the indicator removal efficiency of the technologies studied, and (iii)  
29 evaluate the feasibility of these disinfection technologies for water reclamation.

## 30 31 **2. MATERIALS AND METHODS**

### 32 33 **2.1. Collection of MWWTP samples**

34  
35 Samples of real MWWTP effluent (MWWTP) were collected from the municipal  
36 wastewater treatment plant in the city of Almería (SE Spain) and used to carry out all  
37 the disinfection experiments. This treatment plant uses activated sludge plus  
38 decantation as secondary treatment, and produces 11,594,704 m<sup>3</sup> of secondary effluent  
39 per year. Fresh secondary effluent was collected every day in batches of 60 litres. The  
40 samples were used for solar tests within 2 hours of collection. Several parameters were  
41 evaluated for the chemical and microbiological characterisation of the effluent. Table 1  
42 shows pH, inorganic ion concentrations, turbidity, conductivity, Total Organic Carbon

(TOC) and *E. coli* concentrations, averaged for all MWWTP effluent samples used in all the experiments. Ion determination was performed by ion chromatography (IC) using a DX-600 model (Dionex Corporation, Sunnyvale, California) for anions and a DX-120 model for cations. TOC and Total Carbon (TC) were analysed using a TOC-5050 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Turbidity was measured with a turbidimeter (Model 2100N, Hach, USA). The natural presence of iron in MWWTPE was analysed using a spectrophotometric technique with phenanthroline/acetic acid (UV-VIS measurements, limit of detection 0.05 mg L<sup>-1</sup>). No iron was detected in any of the samples used.

## 2.2. Indicator detection and quantification

*E. coli* was detected using the plate counting method in Chromocult<sup>®</sup> Coliform agar (Merck, Germany) with different sample volumes: (a) 25, 50, 250, and 500 µL of sample was spread over 90 mm diameter Petri dishes, and (b) 5 mL of sample was poured and cultured twice (total of 10 mL) in 140 mm diameter Petri dishes. In both cases, plates were incubated at 44°C for 20 ± 4 h and enumerated. For detection of SRC, water samples were cultured on sulphite polymyxin sulphadiazine (SPS, Cultimed, Panreac) agar medium at 44°C under anaerobic conditions for 24 h. Plaque forming units (PFU) of SOMCPH in the WG5 *Escherichia coli* strain were counted by the double agar layer technique following ISO standard 10705-2 [24]. FRNA were determined in *Salmonella* strain WG49 according to ISO 10705-1 [25]. The limit of detection for bacteria and bacteriophages was 10 CFU and PFU/100 mL, respectively.

## 2.3. Solar CPC photo-reactors

The efficiency of solar photo-activated treatments may be enhanced by the use of solar Compound Parabolic Collector (CPC) reactors. Their high efficiency in solar radiation (both direct and diffuse) collection accelerates the inactivation rates of the different solar treatments due to optimal collection of solar UVA photons [26, 27].

All experiments were performed under natural solar radiation at Plataforma Solar de Almería, located at 37° 84' N and 2° 34' W. The solar CPC reactors used for this study have been described elsewhere [28]. They consist on a CPC photo-reactor tube module placed on a tilted platform connected to a recirculation tank and a centrifugal pump. Total volume of the photo-reactor was 10 L, illuminated volume was 4.5 L and the irradiated collector surface was 0.4 m<sup>2</sup>. Based on our previous experience, the selected water flow rate was 10 L/min. The experimental setup allowed two experiments to be carried out simultaneously in two identical solar CPC reactors.

## 2.4. Solar experiments

All experiments were conducted on sunny days in September and October 2011. The weather conditions (ambient temperature and solar irradiance) were those typical for this time of the year at this location. The average solar UVA irradiance for all tests was  $38 \text{ W m}^{-2}$  within the period 11:00 – 15:00 local time, with maximum values of  $50 \text{ W m}^{-2}$  registered between 13:00 pm and 15:00 pm. The temperature of the water samples during the solar tests (5h) ranged from  $28^{\circ}\text{C} \pm 1.6^{\circ}\text{C}$  to  $39.8^{\circ}\text{C} \pm 3.8^{\circ}\text{C}$ .

Inactivation results are presented as the average of at least two replicates for each treatment. Water and reagents were added to the reactor tank and re-circulated for 15 min to ensure adaptation and homogenisation, with the CPC mirror covered by an opaque sheet. After that, the first sample was taken and the reactor was exposed to solar radiation. Samples were collected at regular intervals to determine indicator concentrations. Frequency of sampling varied depending on the treatment. Duration of all experiments was 5 h, starting at 11:00-11:30 a.m. local time. Water temperature (Checktemp, Hanna instruments, Spain), dissolved oxygen (DO) and pH (multi720, WTW, Germany) were measured in the reactor during the experiments. For each treatment, dark control tests were carried out using the same conditions (reactor, reagents, etc.) in a covered reactor. *E. coli* re-growth was evaluated 24 and 48 h after the treatment. This was performed with samples that reached the limit of detection. The samples were stored in the dark at  $25^{\circ}\text{C}$  and enumerated again as described above. These results showed no re-growth in any of the treatments.

## 2.5. Reagents

Aeroxide P25 (Evorick Corporation, Germany)  $\text{TiO}_2$  catalyst was used as received from the manufacturer as slurry to conduct heterogeneous photocatalytic experiment. The catalyst concentration used was  $100 \text{ mg L}^{-1}$  according to previous findings for the same CPC reactor configuration [28].

Ferrous sulphate heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , PANREAC, Spain) was used as source of  $\text{Fe}^{2+}$  at concentrations of  $5 \text{ mg L}^{-1}$  and  $10 \text{ mg L}^{-1}$  for homogeneous photo-Fenton reaction.  $\text{Fe}^{2+}$  and total iron ( $\text{Fe}^{\text{tot}}$ ) concentrations were measured according to ISO 6332.  $\text{Fe}^{3+}$  concentration was determined subtracting  $\text{Fe}^{2+}$  from  $\text{Fe}^{\text{tot}}$ . The weight ratio of iron: $\text{H}_2\text{O}_2$  used was 1:2. Sulphuric acid (Merk, Germany, analytical grade) was used when acidic conditions were required for photo-Fenton experiments.

Hydrogen peroxide 30% w/v (Riedel-de Haën, Germany) solution was added directly into the samples.  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration was determined with spectrometric methods as described elsewhere [29] with a range of  $0.1\text{--}100 \text{ mg L}^{-1}$ . The experiments of  $\text{H}_2\text{O}_2$ /solar UVA were performed with  $20$  and  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . For photo-Fenton tests, a

1 freshly prepared solution of bovine liver catalase (0.1 g L<sup>-1</sup>, Sigma–Aldrich, USA) was  
 2 added to samples in a ratio 0.1/5 v/v to eliminate residual hydrogen peroxide and avoid  
 3 Fenton reactions after samples collection. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase at these concentrations  
 4 have been demonstrated to have no detrimental effect on *E. coli* viability [18].

## 6 2.6. Solar radiation

8 UVA radiation was measured with a global UVA pyranometer (300 - 400 nm, Model  
 9 CUV4, Kipp & Zonen, Netherlands) tilted 37°, the same angle as the local latitude. The  
 10 pyranometer provides data in terms of incident UVA-W m<sup>-2</sup>, which is the solar radiant  
 11 UVA energy rate incident on a surface per unit area. In this study, the inactivation rate  
 12 is plotted against both experimental time (*t*), and cumulative energy per unit of volume  
 13 (*Q<sub>UV</sub>*) received in the photo-reactor. *Q<sub>UV</sub>* (Eq. 1) is commonly used to compare results  
 14 under different conditions [9].

$$16 \quad Q_{UV,n} = Q_{UV,n-1} + \Delta t_n \overline{UV}_{G,n} A_r / V_t \quad \Delta t_n = t_n - t_{n-1} \quad (\text{Eq. 1})$$

18 where *Q<sub>UV,n</sub>*, *Q<sub>UV,n-1</sub>* is the UV energy accumulated per litre (kJ L<sup>-1</sup>) at times *n* and *n-1*,  
 19 *UV<sub>G,n</sub>* is the average incident radiation on the irradiated area, *Δt<sub>n</sub>* is the experimental  
 20 time of sample, *A<sub>r</sub>* is the illuminated area of collector (m<sup>2</sup>), and *V<sub>t</sub>* is the total volume  
 21 of water treated (L).

## 23 2.7. Kinetics evaluation

25 The inactivation results are usually evaluated using the Chick–Watson’s law (Eq. 2).

$$27 \quad \log \left( \frac{N}{N_0} \right) = -k_t \cdot t \quad (\text{Eq. 2})$$

29 Where *N/N<sub>0</sub>* is the reduction in the concentration of microorganism, *k<sub>t</sub>* is the  
 30 disinfection kinetic constant, and *t* is the experimental time. However the kinetics of  
 31 the photo-induced disinfection process depends also on the photon flux received inside  
 32 the photo-reactor. For this reason, to properly assess the inactivation rates of processes  
 33 carried out under natural solar radiation, the modified Chick–Watson’s law was  
 34 proposed (Eq. 3, [28]):

$$36 \quad \log \left( \frac{N}{N_0} \right) = -k_{Q_{UV}} \cdot Q_{UV} \quad (\text{Eq. 3})$$

1 Where  $k_{QUV}$  is the new disinfection kinetic constant and  $Q_{UV}$  accounts for the solar  
2 UVA energy per unit of volume accumulated in the system.

### 3 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 4 3.1. Inactivation of microbial indicators by solar photo-inactivation

5  
6  
7  
8  
9 The effect of solar radiation on pathogen viability is shown in Figure 1a, while Tables  
10 2 and 3 show the first order decay rate of microbial indicators ( $k_t$  and  $k_{QUV}$ ,  
11 respectively) for all the solar treatments evaluated in this study. According to the  
12 inactivation rates, the order of sensitivity to solar photo-inactivation was: *E. coli* >  
13 FRNA  $\geq$  SOMCPH > SRC.

14  
15 Dark control experiments were performed under the same conditions in a covered  
16 reactor, so that the water presented the same thermal behaviour as under solar UVA  
17 exposure, thus enabling the effect of mild solar heating on these indicators to be  
18 evaluated (Figure 1b). This effect was either low or null for all indicators except  
19 FRNA, which showed a significant reduction (1.8-log). The sequence of sensitivity to  
20 this increase in temperature (29°C to 38°C) was FRNA > *E. coli*  $\geq$  SOMCPH  $\geq$  SRC.

21  
22 Different responses to mild heating have been reported for the indicators studied here  
23 [30-33]. Temperature has a clear influence on the inactivation rate of microorganisms  
24 in solar water disinfection [34]. The synergistic effect of UVA radiation and  
25 temperature has also been evaluated in a number of Solar Water Disinfection (SODIS)  
26 articles [10], which have demonstrated that inactivation of bacteria by solar  
27 disinfection is substantially faster at temperatures above 45°C [35]. In the present  
28 study, the range of temperatures was too low (< 40°C) to observe such strong synergy.  
29 As can be seen in our results (Figure 1), the inactivation of *E. coli* and SOMCPH  
30 seemed to be mainly due to solar UVA irradiation. FRNA bacteriophage  
31 concentrations decreased 2 logs under solar exposure, although the thermal effect  
32 accounts for most of the inactivation (1.8 log). No significant reduction in SRC spores  
33 was observed in either case. The bactericidal effect of solar UVA radiation has been  
34 well described elsewhere [30, 10] for a wide range of pathogens. The effect is based on  
35 the oxidative action of several reactive oxygen species (ROS) generated in water under  
36 UVA radiation. The main variables affecting the inactivation rate are photon flux and  
37 the way that solar radiation is delivered into the system [36], and the dissolved oxygen  
38 [37], chemical composition and turbidity of the water [38]. Much research has been  
39 reported on the photo-inactivation of microorganisms, and the results have varied  
40 widely, being influenced not only by the above-mentioned parameters but also by other  
41 factors such as the origin of the microbial contamination (naturally occurring or lab  
42 seeded), water temperature, the source of light (sun, solar light simulators or UV

lamps) and the design of the photo-reactor. Most studies have been carried out using low volume static batch systems, such as 2L PET bottles, following the so-called SODIS method. However, this paper presents results for a re-circulated batch system. This permitted treatment of higher volumes but also required longer treatment times to reach the detection limit because the UVA radiation dose was delivered continuously into the system [36]. Therefore, the total volume of treated water should be taken into account when comparing the treatment times (or UVA dose in terms of  $\text{kJ m}^{-2}$ ) required by both types of systems to disinfect water.

*Escherichia coli* is the most frequently studied bacterium. Using the SODIS method, this waterborne pathogen has been found to be inactivated within 6 hours under full sunlight [10]. However, naturally occurring faecal coliforms have shown a higher resistance to sunlight [39, 40], with a substantial difference being observed between the inactivation of *E. coli* and that of bacterial endospores (belonging to *Bacillus*) in experiments performed in pure water seeded with laboratory-grown microorganisms, which is in agreement with the results obtained in this study. Furthermore, in experiments using UV irradiation, the same sequence of sensitivity, *E. coli* > human viruses > spores of *Bacillus subtilis*, has been reported [41]. Wegelin et al. [30] also observed that animal viruses and bacteriophages f2 (F-specific RNA bacteriophages) were more resistant than *E. coli* to UV irradiation. In contrast, the inactivation kinetics of *E. coli* and coliforms reported by Caslake et al. [42] were markedly faster than those described here. Nevertheless, it should be borne in mind that the coliforms studied by these authors consisted of a mix of pure laboratory-grown enteric bacteria cultures.

The variability observed in microbial inactivation in the experiments carried out in this study may have been due to numerous factors which changed daily between the different experiments, such as the level of solar irradiance, water temperature, and the load and nature of microbial and chemical contamination of the secondary effluent. However, although replicates were performed on different days and with the secondary effluent samples that varied slightly in turbidity and microbial indicator concentrations, they gave similar results, as shown in standard errors of  $k_t$  (Table 2) and  $k_{\text{Quv}}$  (Table 3). This low variability of the results was observed for all treatments.

### 3.2. Inactivation of microbial indicators by $\text{H}_2\text{O}_2$ /Solar

Figures 2a and 2b show representative observations of microbial indicator inactivation with 20 and 50  $\text{mg L}^{-1}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  respectively, under natural solar irradiation. The drop in concentration of each indicator during solar exposure with added 20  $\text{mg L}^{-1}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was: 5.3-log for *E. coli*, 3-log for FRNA, 2.3-log for SOMCPH and 1.9-log for SRC. The addition of 50  $\text{mg L}^{-1}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  resulted in similar inactivation levels, i.e., *E. coli* (5.2-log), FRNA (2.8-log), SOMCPH (2-log) and SRC (2.1-log). For comparison purposes, the inactivation rate constants should be taken into account (Tables 2 and 3)

1 in order to establish the order of resistance of each indicator to this solar treatment. As  
2 expected, both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations led to similar k-values, and the sequence of  
3 inactivation rate observed was: *E. coli* > FRNA > SOMCPH > SRC. During solar  
4 treatment, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption was 12 mg L<sup>-1</sup> and 30 mg L<sup>-1</sup>, respectively. The main  
5 factor responsible for this consumption was the chemical oxygen demand (COD) of the  
6 water samples, although temperature and pH may also have played a role. As  
7 demonstrated in previous contributions [12], there was no direct relationship between  
8 the amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed and the inactivation rate.

9  
10 To determine the influence of the low H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, we performed dark control  
11 tests in the same reactor under the same conditions except that the reactor was covered.  
12 The viability of each indicator in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mg L<sup>-1</sup>) was evaluated over  
13 5 h (Figure 2c). As reported in the literature for other microorganisms, we observed a  
14 non-significant decrease in the concentration of all of the indicators. The poor effect of  
15 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the dark on survival of seeded *E. coli* has also been described by Rincón and  
16 Pulgarín [43], of naturally occurring *E. coli* by Fisher et al. [44], and of wild fungi  
17 [11]. The harmful effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> itself depends on the microorganism and on the  
18 dosage applied; bacterial growth is inhibited in the range of 10-1000 mg L<sup>-1</sup>, while at  
19 higher concentrations the organisms are destroyed [45]. The low H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations  
20 used in this study only exerted a damaging effect on the indicators evaluated when  
21 combined with the presence of sunlight.

22  
23 The synergistic effect of low amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and solar irradiation to inactivate  
24 different microorganisms has been reported for *E. coli*, bacteriophage T7, *Bacillus*  
25 spores and *Fusarium* spp spores [12, 44, 46]. The different levels of sensitivity to this  
26 treatment shown by the indicators is in agreement with other reported results for  
27 inoculated *E. coli* [47], *Bacillus* spores [48], MS2 (F-specific RNA bacteriophage) and  
28 somatic coliphages T4 and T7 [49, 50]. There are some similarities between the values  
29 of T90 (time required to achieve a 90% reduction) for naturally occurring *E. coli*  
30 reported by Fisher et al. [44] in water from contaminated ditch water and our results. In  
31 both cases, T90 ranged between 2 and 3 hours.

32  
33 These authors attributed cell inhibition or death to the following mechanisms occurring  
34 simultaneously: (i) direct photo-inactivation (Figure 1a), (ii) internal Fenton and  
35 Haber–Weiss reactions leading to internal cell injuries (this occurs when small,  
36 uncharged H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molecules diffuse through membranes into the cell, increasing  
37 intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels. These molecules then react with free iron or loosely bound  
38 iron from cellular sources of iron (sulphur cluster, enterobactin, ferritin, and  
39 siderophores) leading to OH• generation via a Haber–Weiss reaction), and (iii)  
40 inactivation of catalase and superoxide dismutase (SOD), which occurs under UV-A  
41 radiation stress, favouring an increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inside the cells. Although the complete



1 mechanism still remains unclear, since there is no experimental evidence of what is  
2 happening inside the cells, our results may be explained by the above mechanisms.

3  
4 Moreover, no enhancement of inactivation was observed when 50 mg L<sup>-1</sup> of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was  
5 used (Figure 2b). The same effect has been observed before for *Fusarium* sp [11, 12,  
6 18]. This finding could be also explained by the internal reaction mechanisms, as they  
7 are limited by the iron available inside cells and not by the concentration of added  
8 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In this case, as with solar photo-inactivation [36], the amount of oxidative  
9 species needed to induce the destruction or inhibition of a certain microorganism are  
10 generated under given conditions (i.e., 20 mg L<sup>-1</sup> of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), but additional generation of  
11 ROS does not necessarily lead to better inactivation results.

### 13 3.3. Inactivation of microbial indicators by heterogeneous photocatalysis with 14 TiO<sub>2</sub>

15  
16 Figure 3 shows the inactivation of the 4 microbial indicators under solar heterogeneous  
17 photocatalysis using 100 mg L<sup>-1</sup> of suspended TiO<sub>2</sub>. The improvement in disinfection  
18 achieved by the addition of TiO<sub>2</sub> was very different for the microorganisms tested (see  
19 inactivation kinetics in Figure 3 and decay rates in Tables 2 and 3). The viral indicators  
20 (SOMCPH and FRNA) were the most sensitive, particularly FRNA, the inactivation  
21 rates of which were much higher than with solar light alone. *E. coli* inactivation was  
22 similar under both treatments. In contrast, SRC were hardly affected by the addition of  
23 titanium dioxide. According to inactivation rate constants (Tables 2 and 3), the  
24 sequence of microbial indicator sensitivity to the TiO<sub>2</sub>/Solar treatment was: FRNA >  
25 SOMCPH ≥ *E. coli* > SRC.

26  
27 A similar sequence of sensitivity has been reported elsewhere with seeded  
28 microorganisms. The greater sensitivity of MS2 (F-specific RNA bacteriophage)  
29 compared to *E. coli* [51] and phages φX174 and PR772 (both somatic coliphages) has  
30 also been reported [52]. In addition, the greater sensitivity of *E. coli* when compared to  
31 SRC [53] and the greater effect of TiO<sub>2</sub> photo-oxidation on bacteriophage MS2 has  
32 been reported [54]. Regarding animal viruses, it has been described that enteroviruses  
33 are more sensitive to TiO<sub>2</sub> photo-oxidation than *E. coli* [55]. On the other hand, some  
34 papers reports contradictory results with seeded *E. coli* [56-59].

35  
36 Under the experimental conditions applied in this study, it was not possible to obtain  
37 the best photocatalytic disinfection results due to the existence of certain detrimental  
38 factors, such as the presence of a high amount of carbonates/bicarbonates in the water,  
39 which decreases photocatalytic efficiency [28]. Similarly, organic matter competed for  
40 hydroxyl radicals generated under solar irradiation. Nevertheless, the reduction in  
41 dissolved organic carbon (DOC) was measured throughout the experiment and this  
42 parameter did not suffer any significant change. The high water pH (7.31 ± 0.30) did

1 not favour the interaction between photo-catalyst particles and microorganism cells  
2 [60].

### 3.4. Inactivation of microbial indicators by solar photo-Fenton

3  
4  
5  
6 The inactivation of microbial indicators with photo-Fenton was tested in the real  
7 effluent at pH 3 and at natural pH ( $7.31 \pm 0.30$ ) using  $10 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{Fe}^{2+}$  and several  
8 doses of  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $20 \text{ mg L}^{-1}$  per dose), added during the solar experiments when the  
9 hydrogen peroxide fell below  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . The addition time of  $\text{H}_2\text{O}_2$  doses varied  
10 depending on each experiment. The inactivation patterns obtained are shown in Figures  
11 4a and 4b and decay rate constants are given in Tables 2 and 3. As expected, the results  
12 differed depending on the pH and also on the microorganisms, and very short  
13 inactivation times were needed at pH 3 compared with natural pH, for all tested  
14 indicators. The sensitivity of the indicators against the photo-Fenton treatment at both  
15 pH values was: *E. coli* > FRNA > SOMCPH > SRC.

16  
17 Dark control tests to evaluate the viability of the indicators at pH 3 were also  
18 performed in a covered reactor for 5 h. The indicator most affected by pH 3 was *E.*  
19 *coli*, which showed a > 2-log reduction within 60 min. FRNA and SOMCPH showed a  
20 1-log and 0.2-log drop in concentration, respectively, in 60 min. On the other hand, pH  
21 3 did not affect SRC, as its concentrations remained constant throughout the 5 h.

22  
23 Dissolved iron in the neutral pH photo-Fenton tests was zero or below the detection  
24 limit of the quantification method; consequently  $k_t$  and  $k_{Q_{uv}}$  values of microbial  
25 indicators were similar to those obtained for the  $\text{H}_2\text{O}_2$ /Solar treatment. In contrast, the  
26 effect on all indicators except for SRC of photo-Fenton at pH 3 was dramatic: for *E.*  
27 *coli*, FRNA, and SOMCPH, the concentration reductions were 5-log (10 min), 3.8-log  
28 (10 min), and 5-log (1.5 h), respectively. The SRC concentration did not show a  
29 significant enhancement in inactivation, demonstrating the very strong resistance of  
30 this pathogen even to photo-Fenton at pH 3.

31  
32 The high efficiency of the process at pH 3 was due to the photo-Fenton reaction which  
33 occurred between the added  $\text{H}_2\text{O}_2$  and the dissolved iron in the effluent, and the stress  
34 that the very acidic conditions represented for the microorganisms may also have  
35 favoured inactivation. Although  $10 \text{ mg L}^{-1}$  of iron was added, only low amounts of  
36 dissolved iron were present due to the chemical composition of the water (Table 4).  
37 The dissolved iron at pH 3 was between 1 and  $3 \text{ mg L}^{-1}$ , generating sufficient hydroxyl  
38 radicals to produce lethal damage to microbial cells, as has been reported for fungal  
39 spores, virus and bacteria in other papers [12, 18, 61]. It was the photo-Fenton reaction  
40 which was primarily responsible for this dramatic drop in indicator concentrations,  
41 because similar experiments at neutral pH or with only added  $\text{H}_2\text{O}_2$  showed slower  
42 inactivation profiles (Tables 2 and 3). Due to the photo-Fenton reactions, the reduction

1 in DOC at pH 3 was around  $10 \text{ mg L}^{-1}$  in all experiments (from 15 to  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ), while  
2 in the near neutral pH photo-Fenton reaction, the decrease in DOC was not  
3 appreciable. Therefore, to minimise the supplementary cost of acidification and  
4 neutralisation, it would seem advisable to conduct further research into the effect of pH  
5 values between 3 and neutral.

### 7 **3.5. Photo oxidation effects on microbial inactivation**

8  
9 These treatments have typically been studied using laboratory strain microorganisms  
10 seeded in water (i.e., *E. coli* K12). However, very little information is available about  
11 disinfection of naturally occurring *E. coli* [44], and nothing has been reported about  
12 viral indicators or bacterial spores until now. Moreover, seeded microorganisms are  
13 more sensitive to disinfection than naturally occurring ones [62-66].

14  
15 A global comparison of all the inactivation rates achieved for each naturally occurring  
16 indicator (Figure 5) shows that SRC was the indicator with the lowest inactivation rates  
17 for all treatments. In contrast, *E. coli* was always the most easily inactivated indicator  
18 except in the case of the treatment with  $\text{TiO}_2/\text{solar}$ , where FRNA phages were the most  
19 susceptible microorganisms. Regarding the elimination of *E. coli*, which is currently  
20 the recommended indicator worldwide [67], in the USA [68] and in Spain [69], etc.,  
21 the different treatments ranked as follows: photo-Fenton pH 3 >  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ )/solar  
22 >  $\text{TiO}_2/\text{solar}$  > solar photo-inactivation. On the other hand, for viral indicators the  
23 ranking was: photo-Fenton pH 3 >  $\text{TiO}_2/\text{solar}$  >  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ )/solar > solar photo-  
24 inactivation. These different rankings should be taken into account when intending to  
25 combine photo-oxidisers.

26  
27 The sensitivity of the viral indicators to the disinfection procedures tested was  
28 moderate when compared with *E. coli* and SRC (Figure 5), as suggested in reported  
29 studies of seeded viruses [41]. SOMCPH, which are a mixture of different DNA  
30 viruses, showed a higher resistance than FRNA phages to the tested photo-oxidative  
31 processes (Figure 5), in agreement with other studies performed with seeded  
32 bacteriophages [52]. The few reports on seeded human viruses presented very variable  
33 results: rotaviruses and FRNA phages f2 and MS2 showed similar levels of resistance;  
34 nevertheless the encephalomyocarditis virus presented levels of resistance similar to  
35 those of SOMCPH [30]. Thus, it can be deduced that naturally occurring SOMCPH are  
36 good surrogate indicators for human viruses in photo-oxidative systems, since they  
37 cover viruses that are not covered by either *E. coli* or F-specific RNA phages.

38  
39 It is difficult to compare inactivation of SRC and *Cryptosporidium* oocysts, since data  
40 on inactivation of naturally occurring oocysts with these treatments are not available.  
41 Nevertheless, seeded *Cryptosporidium* oocysts [70-72] and *Achantamoeba* cysts [41]  
42 have been described to be quite resistant to photo-oxidation treatments. Additionally, it

1 has been reported that with tertiary treatments such as UV irradiation and chlorination,  
2 SRC inactivate similarly to *Cryptosporidium* infectious oocysts [73-75]. Therefore,  
3 among the currently used model microorganisms, SRC appears to be the best indicator  
4 of the fate of protozoan oocysts when photo-oxidation treatments are used.

### 6 **3.6. Applicability of photo-oxidation treatments in water reclamation**

8 The treatment time required to fulfil the microbiological criteria stated in water  
9 reclamation policies and guidelines has been estimated for four solar-promoted photo-  
10 oxidation treatments. Table 5 presents a summary of the required time (solar exposure)  
11 for each treatment to eliminate 3-, 4- and 6-log of naturally occurring *E. coli* under the  
12 experimental conditions used in this study. In the worst case scenario of a highly  
13 contaminated secondary effluent (i.e.,  $10^6$  CFU-*E. coli* per 100 mL), these reductions  
14 would provide reclaimed water suitable for unrestricted irrigation which fulfilled the  
15 criteria established by: (i) the WHO (2006), (ii) Spanish regulations [69] and (iii) the  
16 USEPA [68]. These three different regulations on reclaimed water quality stipulate  
17 different requirements:  $< 1000$ ,  $< 100$ , and  $< 1$  *E. coli* (CFU per 100 mL), respectively.  
18 The design of a solar treatment plant which fulfilled these criteria would need a  
19 residence time of at least 6 min for photo-Fenton at pH 3, or 2 h for  $H_2O_2$  ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ )  
20 /solar (Table 5). These treatment times are still lengthy for a continuous flow reactor.  
21 Previous experiences with solar pilot reactors are based on batch flow reactors which  
22 can treat variable volumes (tens of litres) of water, as they are modular. Only a few  
23 studies have been reported on continuous flow systems, for example, a sequential batch  
24 photo-reactor based on solar photo-inactivation for drinking water purification in  
25 isolated communities with lack of access to drinking water. In this case, the reactor was  
26 tested using *E. coli* in natural well water [29].

28 The capability of several solar technologies for real MWWTP effluents disinfection  
29 (for further reclamation) using a solar CPC photoreactor prototype has been shown  
30 here. According to our results, a continuous flow reactor for the treatment of large  
31 amounts of water (several  $\text{m}^3$  per day), the CPC field surface area required should be  
32 enormous (hundreds of  $\text{m}^2$ ), as the treatment times range from few minutes to 2 hours  
33 (4-log decrease). The design of this system should be enhanced for the real  
34 applications; this will be achieved by reducing the residence time. For example, from  
35 the solar collection point of view, the best choice of the optical path length (it depends  
36 on the water quality) would improve the income of solar photons in the photoreactor.  
37 Therefore, a proper design of a CPC plant for real MWWTP effluents based on the real  
38 load of contaminated water is needed prior to report on surface areas of solar collectors  
39 and capacity of the treated volumes per day. Additionally, more research should be  
40 conducted on these kinds of solar photo-oxidative technologies with the aim of finding  
41 out the limitations of these processes from the photo-chemical and photo-biological  
42 point of view.

#### 4. CONCLUSIONS

One novel contribution of the study reported here is that it was performed with naturally occurring microorganisms, and to the best of our knowledge this is the first time that a description has been given of the effects of photo-oxidation processes on naturally occurring viral indicators and spores of sulphite-reducing clostridia, which are considered indicators of protozoan (oo)cysts. In addition, the results confirm previously described studies suggesting that a single microbial indicator may not be enough to guarantee a low risk of infection. Nevertheless, it would also be possible to estimate the effects of these treatments on viruses and protozoa using the indicators, and to calculate the treatment necessary to bring pathogens down to acceptable levels. In addition, the photo-oxidation treatments tested were capable of achieving the disinfection level necessary to reduce microbial health risks for users and they seemed to be functional as regards the treatment time required to achieve the regulatory limits. Consequently, from a practical point of view, this is highly valuable information that will be useful when deciding which of these treatments is the most feasible to obtain safe reclaimed water.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for the financial support under the AQUASUN project (reference: CTM2011-29143-C03-03), the Generalitat de Catalunya (reference: 2009-SRG-01043) and the Xarxa de Referència en Biotecnologia (Unitat de Microbiologia Ambiental). Finally, we would like to thank the Language Services (Serveis Lingüístics de la Universitat de Barcelona) for their job.

#### References

- [1] USEPA. National Water Quality Inventory: Report to Congress, 2004 Reporting Cycle. US Environmental Protection Agency, 2009
- [2] WHO. The Global Burden of Disease. 2004 Update, 2008  
[http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/) (accessed 13.11.12)
- [3] J. Jancangelo, R. Trusell, Water Supply. 2 (2002) 147-157.
- [4] UNDP. United Nations Development Programme. Human Development report Beyond Scarcity. Power, Poverty and the Global Water Crisis. New York: Palgrave Macmillan (2006). <http://hdr.undp.org/en/reports/global/hdr2006/> (13.11.12)
- [5] E.M. Smith, M.J. Plewa, C.L. Lindell, S.D. Richardson, W.A. Mitch, Environmental Science & Technology 44 (2010) 8446-8452.
- [6] U. von Gunten, Water Research 37 (2003) 1469-1487, doi: 10.1016/S0043-1354(02)00458-X.

- 1 [7] WHO. Evaluating household water treatment options: health-based targets and  
2 microbiological performance specifications, 2011.
- 3 [8] C. Comninellis, A. Kapalka, S. Malato, S.A. Parsons, I. Poullos, D. Mantzavinos, *Journal of*  
4 *Chemical Technology & Biotechnology* 83 (2008) 769-776, doi: 10.1002/jctb.1873.
- 5 [9] S. Malato, P. Fernández-Ibáñez, M.I. Maldonado, J. Blanco, W. Gernjak, *Catalysis Today*  
6 147 (2009) 1-59, doi: 10.1016/j.cattod.2009.06.018.
- 7 [10] K.G. McGuigan, R.M. Conroy, H. Mosler, M.d. Preez, E. Ubomba-Jaswa, P. Fernandez-  
8 Ibañez, *Journal of Hazardous Materials* 235–236 (2012) 29-46, doi:  
9 10.1016/j.jhazmat.2012.07.053.
- 10 [11] C. Sichel, P. Fernández-Ibáñez, M. de Cara, J. Tello, *Water Research* 43 (2009) 1841-  
11 1850, doi: 10.1016/j.watres.2009.01.017.
- 12 [12] M. Polo-López, I. García-Fernández, I. Oller, P. Fernández-Ibáñez, *Journal of*  
13 *Photochemistry and Photobiology B: Biology* 10 (2011) 381-388.
- 14 [13] A. Rincón, C. Pulgarin, *Applied Catalysis B: Environmental* 49 (2004) 99-112, doi:  
15 10.1016/j.apcatb.2003.11.013.
- 16 [14] A. Rincón, C. Pulgarin, *Catalysis Today* 122 (2007) 128-136, doi:  
17 10.1016/j.cattod.2007.01.028.
- 18 [15] J. Lonnen, S. Kilvington, S.C. Kehoe, F. Al-Touati, K.G. McGuigan, *Water Research* 39  
19 (2005) 877-883, doi: 10.1016/j.watres.2004.11.023.
- 20 [16] C. Sichel, J. Tello, M. de Cara, P. Fernández-Ibáñez, *Catalysis Today* 129 (2007) 152-160,  
21 doi: 10.1016/j.cattod.2007.06.061.
- 22 [17] F. Sciacca, J.A. Rengifo-Herrera, J. Wéthé, C. Pulgarin, *Chemosphere* 78 (2010) 1186-  
23 1191, doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.12.001.
- 24 [18] I. García-Fernández, M.I. Polo-López, I. Oller, P. Fernández-Ibáñez, *Applied Catalysis B:*  
25 *Environmental* 121-122 (2012) 20-29.
- 26 [19] E. Ortega-Gómez, P. Fernández-Ibáñez, M. Ballesteros Martín, M. Polo-López, B.  
27 Esteban García, J. Sánchez Pérez, *Water Research* 46 (2012) 6154-6162.
- 28 [20] IAWPRC Study group on health related water microbiology, *Water Research* 25 (1991)  
29 529-545, doi: 10.1016/0043-1354(91)90126-B.
- 30 [21] P. Payment, E. Franco, *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1993) 2418-2424.
- 31 [22] J. Wu, S.C. Long, D. Das, S.M. Dorner, *Journal of Water and Health* 9 (2011) 265-278,  
32 doi: 10.2166/wh.2011.117.
- 33 [23] F. Lucena, J. Jofre, in: SABOUR, P.M. and GRIFFITHS, M.W. (Eds.), *Bacteriophages in*  
34 *the Control of Food- and Waterborne Pathogens.*, 2010, pp. 103-118.
- 35 [24] Anonymous, ISO 10705-2. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2.  
36 Enumeration of Somatic Coliphages (2000)
- 37 [25] Anonymous, ISO 10705-2. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2.  
38 Enumeration of Somatic Coliphages (1995)
- 39 [26] C. Navntoft, E. Ubomba-Jaswa, K. McGuigan, P. Fernández-Ibáñez, *Journal of*  
40 *Photochemistry and Photobiology B: Biology* 93 (2008) 155-161.
- 41 [27] O.A. McLoughlin, P.F. Ibáñez, W. Gernjak, S.M. Rodríguez, L.W. Gill, *Solar Energy* 77  
42 (2004) 625-633, doi: 10.1016/j.solener.2004.05.017.
- 43 [28] P. Fernández-Ibáñez, C. Sichel, M.I. Polo-López, M. de Cara-García, J.C. Tello, *Catalysis*  
44 *Today* 144 (2009) 62-68, doi: 10.1016/j.cattod.2009.01.039.

- 1 [29] M.I. Polo-López, P. Fernández-Ibáñez, E. Ubomba-Jaswa, C. Navntoft, I. García-  
2 Fernández, P.S.M. Dunlop, M. Schmid, J.A. Byrne, K.G. McGuigan, *Journal of*  
3 *Hazardous Materials* 196 (2011) 16-21, doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.052.
- 4 [30] M. Wegelin, S. Canonica, K. Mechsner, T. Fleischmann, F. Pesaro, A. Metzler, *Journal of*  
5 *Water Supply: Research and Technology - Aqua* 43 (1994) 154-169.
- 6 [31] T.M. Joyce, K.G. McGuigan, M. Elmore-Meegan, R.M. Conroy, *Applied and*  
7 *Environmental Microbiology* 62 (1996) 399-402.
- 8 [32] L. Mocé-Llivina, M. Muniesa, H. Pimenta-Vale, F. Lucena, J. Jofre, *Applied and*  
9 *Environmental Microbiology* 69 (2003) 1452-1456, doi: 10.1128/AEM.69.3.1452-  
10 1456.2003.
- 11 [33] M.D. Aitken, M.D. Sobsey, K.E. Blauth, M. Shehee, P.L. Crunk, G.W. Walters,  
12 *Environmental Science & Technology* 39 (2005) 5804-5809, doi: 10.1021/es048004h.
- 13 [34] M. Berney, H. Weilenmann, J. Ihssen, C. Bassin, T. Egli, *Applied and Environmental*  
14 *Microbiology* 72 (2006) 2586-2593, doi: 10.1128/AEM.72.4.2586-2593.2006.
- 15 [35] McGuigan, Joyce, Conroy, Gillespie, Elmore-Meegan, *Journal of Applied Microbiology*  
16 84 (1998) 1138-1148, doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00455.x.
- 17 [36] E. Ubomba-Jaswa, C. Navntoft, M. Polo-López, P. Fernandez-Ibáñez, K.G. McGuigan,  
18 *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 85 (2009) 1028-1037.
- 19 [37] R.H. Reed, *Letters in Applied Microbiology* 24 (1997) 276-280, doi: 10.1046/j.1472-  
20 765X.1997.00130.x.
- 21 [38] B. Sommer, A. Mariño, Y. Solarte, M. Salas, C. Dierolf, C. Valiente, D. Mora, R.  
22 Rechsteiner, P. Setter, W. Wirojanagud, H. Ajarmeh, A. Al-Hassan, M. Wegelin, *Journal*  
23 *of Water Supply: Research and Technology - Aqua* 4 (1997) 127-137.
- 24 [39] R.H. Reed, S.K. Mani, V. Meyer, *Letters in Applied Microbiology* 30 (2000) 432-436, doi:  
25 10.1046/j.1472-765x.2000.00741.x.
- 26 [40] M. Boyle, C. Sichel, P. Fernández-Ibáñez, G.B. Arias-Quiroz, M. Iriarte-Puña, A.  
27 Mercado, E. Ubomba-Jaswa, K.G. McGuigan, *Applied and Environmental Microbiology*  
28 74 (May 15, 2008) 2997-3001, doi: 10.1128/AEM.02415-07.
- 29 [41] J.C. Chang, S.F. Ossoff, D.C. Lobe, M.H. Dorfman, C.M. Dumais, R.G. Qualls, J.D.  
30 Johnson, *Applied and Environmental Microbiology* 49 (1985) 1361-1365.
- 31 [42] L.F. Caslake, D.J. Connolly, V. Menon, C.M. Duncanson, R. Rojas, J. Tavakoli, *Applied*  
32 *and Environmental Microbiology* 70 (2004) 1145-1151, doi: 10.1128/AEM.70.2.1145-  
33 1150.2004.
- 34 [43] A. Rincón, C. Pulgarin, *Applied Catalysis B: Environmental* 63 (2006) 222-231, doi:  
35 10.1016/j.apcatb.2005.10.009.
- 36 [44] M. Fisher, C. Keenan, K. Nelson, B. Voelker, *Journal of Water and Health* 6 (2008) 35-53.
- 37 [45] D.L. Pardieck, E.J. Bouwer, A.T. Stone, *Journal of contaminant hydrology* 9 (1992) 221-  
38 242, doi: 10.1016/0169-7722(92)90006-Z.
- 39 [46] P. Hartman, A. Eisenstark, *Journal of Bacteriology* 133 (1978) 769-774.
- 40 [47] C.E. Bayliss, W.M. Waites, *Journal of Applied Microbiology* 48 (1980) 417-422, doi:  
41 10.1111/j.1365-2672.1980.tb01030.x.
- 42 [48] D.W.M. Gardner, G. Shama, *Journal of Applied Microbiology* 84 (1998) 633-641, doi:  
43 10.1046/j.1365-2672.1998.00391.x.
- 44 [49] H.N. Ananthaswamy, P.S. Hartman, A. Eisenstark, *Journal of Photochemistry and*  
45 *Photobiology B: Biology* 29 (1979) 53-56, doi: 10.1111/j.1751-1097.1979.tb09259.x.
- 46 [50] H. Mamane, H. Shemer, K. Linden, *Journal of hazardous materials* 146 (2007) 479-486.

- 1 [51] M. Cho, H. Chung, W. Choi, J. Yoon, *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005)  
2 270-275, doi: 10.1128/AEM.71.1.270-275.2005.
- 3 [52] D. Misstear, L.W. Gill, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 107  
4 (2012) 1-8.
- 5 [53] P.S.M. Dunlop, T.A. McMurray, J.W.J. Hamilton, J.A. Byrne, *Journal of Photochemistry*  
6 *and Photobiology A: Chemistry* 196 (2008) 113-119, doi:  
7 10.1016/j.jphotochem.2007.11.024.
- 8 [54] J.C. Sjogren, R.A. Sierka, *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1994) 344-347.
- 9 [55] R.J. Watts, S. Kong, M.P. Orr, G.C. Miller, B.E. Henry, *Water Research* 29 (1995) 95-100,  
10 doi: 10.1016/0043-1354(94)E0122-M.
- 11 [56] C. Wei, W. Lin, Z. Zainal, N. Williams, K. Zhu, A. Kruzic, R. Smith, K. Rajeshwar,  
12 *Environmental Science & Technology* 28 (1994) 934, doi: - 10.1021/es00054a027.
- 13 [57] K. Sunada, Y. Kikuchi, K. Hashimoto, A. Fujishima, *Environmental Science &*  
14 *Technology*. 32 (1998) 726, doi: 10.1021/es970860o.
- 15 [58] I.H. Cho, I.Y. Moon, M.H. Chung, H.K. Lee, K.D. Zoh, *Water Science and Technology* 2  
16 (2002) 181-190.
- 17 [59] F.M. Salih, *Journal of Applied Microbiology*. 92 (2002) 920-926, doi: 10.1046/j.1365-  
18 2672.2002.01601.x.
- 19 [60] D. Gumy, C. Morais, P. Bowen, C. Pulgarin, S. Giraldo, R. Hajdu, J. Kiwi, *Applied*  
20 *Catalysis B: Environmental* 63 (2006) 76-84, doi: 10.1016/j.apcatb.2005.09.013.
- 21 [61] J. Nieto-Juarez, K. Pierzchla, A. Sienkiewics, T. Kohn, *Environmental Science &*  
22 *Technology* (2010) 3351, doi: 10.1021/es903739f.
- 23 [62] L.A. Carson, M.S. Favero, W.W. Bond, N.J. Petersen, *Applied Microbiology* 23 (1972)  
24 863-869.
- 25 [63] F.D. Dryden, C. Chen, M.W. Selna, *Journal (Water Pollution Control Federation)* 51  
26 (1979) 2098-2109.
- 27 [64] E.M. Aieta, J.D. Berg, P.V. Roberts, R.C. Cooper, *Journal (Water Pollution Control*  
28 *Federation)* (1980) 810-822.
- 29 [65] J.D. Berg, A. Matin, P.V. Roberts, *Applied and Environmental Microbiology* 44 (1982)  
30 814-819.
- 31 [66] J.A. Tree, M.R. Adams, D.N. Lees, *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003)  
32 2038-2043, doi: 10.1128/AEM.69.4.2038-2043.2003.
- 33 [67] WHO. Guidelines for the safe use of wastewaters, excreta and greywater. World Health  
34 Organization (2006)
- 35 [68] USEPA. Guidelines for Water Reuse EPA/624/R-04/108. Washington, DC. Office of  
36 Water, U.S. Environmental Protection Agency (2004)
- 37 [69] Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de  
38 la reutilización de las aguas depuradas, BOE nº 294, 2007  
39 <http://www.boe.es/boe/dias/2003/02/21/pdfs/A07228-07245.pdf> 13.11.12
- 40 [70] F. Méndez-Hermida, J.A. Castro-Hermida, E. Ares-Mazás, S.C. Kehoe, K.G. McGuigan,  
41 *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005) 1653-1654, doi:  
42 10.1128/AEM.71.3.1653-1654.2005.
- 43 [71] H. Ryu, D. Gerrity, J.C. Crittenden, M. Abbaszadegan, *Water Research* 42 (2008) 1523-  
44 1530, doi: 10.1016/j.watres.2007.10.037.
- 45 [72] O. Sunnotel, R. Verdoold, M. Dunlop, W. Snelling, J. Lowery, J. Dooley, J. More, J.  
46 Bryne, *Journal of Water and Health* 8 (2010) 83-91.



- 1 [73] M. Montemayor, B. Galofré, F. Ribas, F. Lucena, *Cytometry Part A* 71A (2007) 163-169,  
2 doi: 10.1002/cyto.a.20373.
- 3 [74] M. Montemayor, A. Costán, F. Lucena, J. Jofre, J. Muñoz, E. Dalmau, R. Mujeriego, L.  
4 Sala, *Water Science and Technology* 57 (2008) 935-940.
- 5 [75] M. Agulló-Barceló, R. Casas-Mangas, F. Lucena, *Journal of Water and Health* 10 (2012)  
6 539-548, doi: doi:10.2166/wh.2012.082.
- 7

**Table 1.** Chemical and biological characterisation of the municipal wastewater treatment plant secondary effluent used (El Bobar, Almería, Spain).

Secondary effluent characterisation			
<b>pH</b>	7.31 ± 0.30	<b>Turbidity (NTU)</b>	8 ± 4
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	6 ± 3	<b>Conductivity (µS/cm)</b>	1530 ± 152
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	3.4 ±	<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	12 ± 15
<b>Cl<sup>-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	289.7 ± 64	<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	114.7 ± 32
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	35 ± 21	<b>Mg<sup>2+</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	27 ± 3
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	85 ± 3	<b>K<sup>+</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	24.3 ± 3
<b>Na<sup>+</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	182 ± 11	<b>Ca<sup>2+</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	78 ± 3
<b>DOC (mg L<sup>-1</sup>)</b>	16.3 ± 3	<b>Fe<sup>2+/3+</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0 ± 0
<b><i>E. coli</i> (CFU/100 mL)</b>	1 × 10 <sup>5</sup> ± 9 × 10 <sup>4</sup>		

**Table 2.** Decay rates ± standard errors in min<sup>-1</sup> of the microbiological parameters in the different treatments. SRC: spores of sulphite reducing clostridia; SOMCPH: somatic coliphages; FRNA: F specific bacteriophages infecting *Salmonella* strain WG49.

Treatment	Decay rate - k <sub>t</sub> (min <sup>-1</sup> )			
	<i>E. coli</i>	SRC	SOMCPH	FRNA
<b>Solar photo-inactivation</b>	0.0133 ± 0.0004	0.0019 ± 0.0012	0.0074 ± 0.0006	0.0085 ± 0.0017
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Solar (20 mg L<sup>-1</sup>)</b>	0.0342 ± 0.0094	0.0065 ± 0.0000	0.0077 ± 0.0002	0.0118 ± 0.0018
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Solar (50 mg L<sup>-1</sup>)</b>	0.0201 ± 0.0032	0.0066 ± 0.0006	0.0065 ± 0.0004	0.0107 ± 0.0014
<b>TiO<sub>2</sub>/Solar (100 mg L<sup>-1</sup>)</b>	0.0135 ± 0.0013	0.0022 ± 0.0004	0.0141 ± 0.0010	0.0627 ± 0.0186
<b>Photo-Fenton pH 3</b>	0.5377 ± 0.1355	0.0051 ± 0.0005	0.0390 ± 0.0010	0.4525 ± 0.0921
<b>Photo-Fenton Natural pH</b>	0.0263 ± 0.0000	0.0039 ± 0.0000	0.0126 ± 0.0000	0.0137 ± 0.0000

**Table 3.** Decay rates in  $L\ kJ^{-1}$  of the microbiological parameters in the different treatments. SRC: spores of sulphite reducing clostridia; SOMCPH: somatic coliphages; FRNA: F specific RNA bacteriophages infecting *Salmonella* strain WG49.

Treatment	Decay rate – $k_{Quv}$ ( $L\ kJ^{-1}$ )			
	<i>E. coli</i>	SRC	SOMCPH	FRNA
Solar photo-inactivation	$0.110 \pm 0.010$	$0.012 \pm 0.004$	$0.061 \pm 0.004$	$0.075 \pm 0.007$
$H_2O_2$ /Solar (20 mg $L^{-1}$ )	$0.410 \pm 0.050$	$0.055 \pm 0.005$	$0.068 \pm 0.004$	$0.132 \pm 0.007$
$H_2O_2$ /Solar (50 mg $L^{-1}$ )	$0.290 \pm 0.020$	$0.064 \pm 0.008$	$0.068 \pm 0.003$	$0.125 \pm 0.012$
$TiO_2$ /Solar (100 mg $L^{-1}$ )	$0.150 \pm 0.010$	$0.029 \pm 0.003$	$0.149 \pm 0.006$	$0.500 \pm 0.300$
Photo-Fenton pH 3	$0.800 \pm 0.030$	$0.064 \pm 0.004$	$0.500 \pm 0.090$	$0.490 \pm 0.050$
Photo-Fenton Natural pH	$0.300 \pm 0.040$	$0.043 \pm 0.004$	$0.133 \pm 0.006$	$0.135 \pm 0.010$

**Table 4.** Iron measurement during the photo-Fenton experiment.

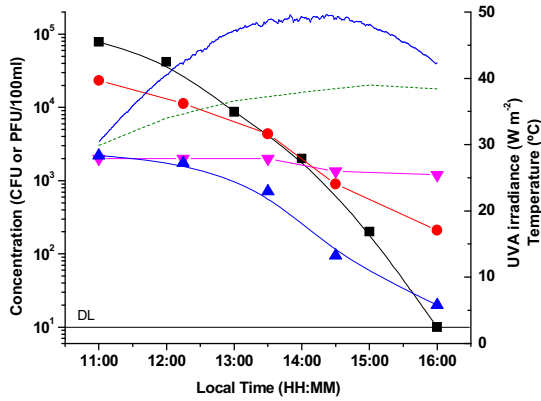
pH	Added Fe *	Dissolved Fe *	Total $H_2O_2$ *
3	10	1.1	80
3	10	3.2	120
3	10	2.9	140
8	10	0	100

\*Expressed in  $mg\ L^{-1}$

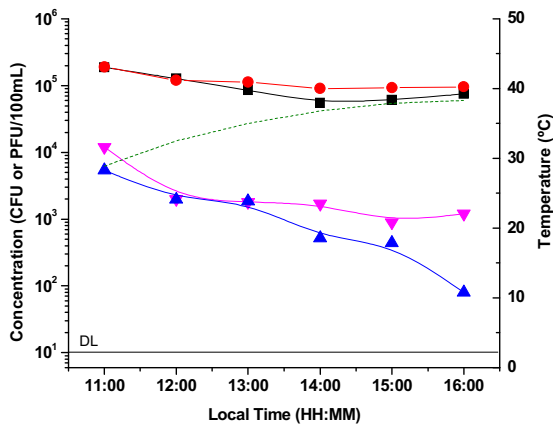
**Table 5.** Time needed (hours) to achieve 3, 4 and 6 Log reductions using photo oxidation processes assayed.

Treatment	Time needed (h)		
	3-log reduction	4-log reduction	6-log reduction
Solar photo-inactivation	3.76	5.01	7.52
$H_2O_2$ /Solar (20 mg $L^{-1}$ )	1.46	1.95	2.93
$TiO_2$ /Solar (100 mg $L^{-1}$ )	3.70	4.94	7.41
Photo-Fenton pH 3	0.09	0.12	0.19

**Figure 1.** Inactivation of all the microbial indicators tested in a representative single experiment of solar disinfection (a) and corresponding experiment performed in the dark (b). *E. coli* (—■—); SRC: Sulphite-reducing clostridia (—▼—); SOMCPH: somatic coliphages (—●—); FRNA: F-specific RNA bacteriophages (—▲—); DL: detection limit; CFU: colony forming units; PFU: plaque forming units. UVA irradiance (—); temperature (—).

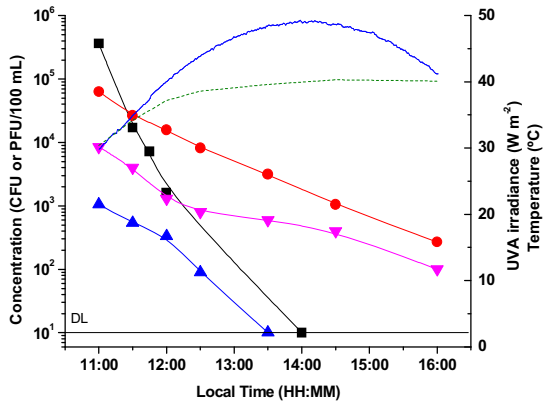


(a)

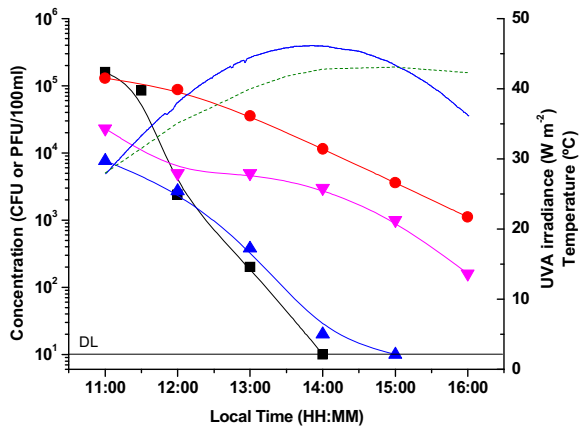


(b)

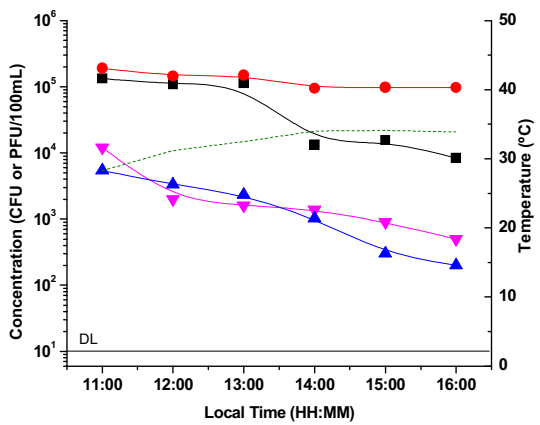
**Figure 2.** Inactivation of all the microbial indicators tested in a representative single experiment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mg L<sup>-1</sup> and 50 mg L<sup>-1</sup>)/solar UVA (a) and (b) respectively; experiment performed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mg L<sup>-1</sup>) in the dark (c). *E. coli* (—■—); SRC: Sulphite-reducing clostridia (—▼—); SOMCPH: somatic coliphages (—●—); FRNA: F-specific RNA bacteriophages (—▲—); DL: detection limit; CFU: colony forming units; PFU: plaque forming units. UVA irradiance (—); temperature (—).



(a)

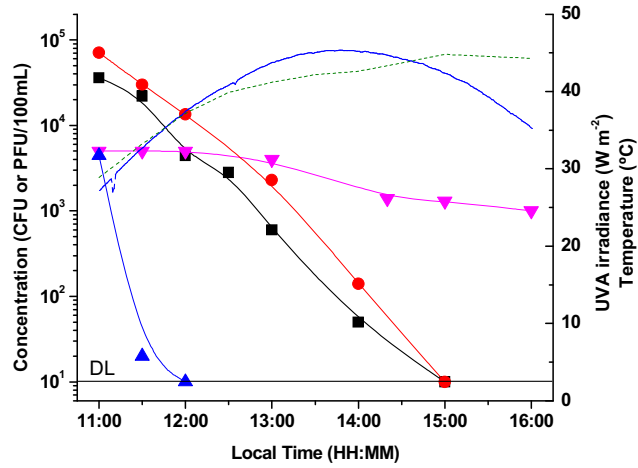


(b)

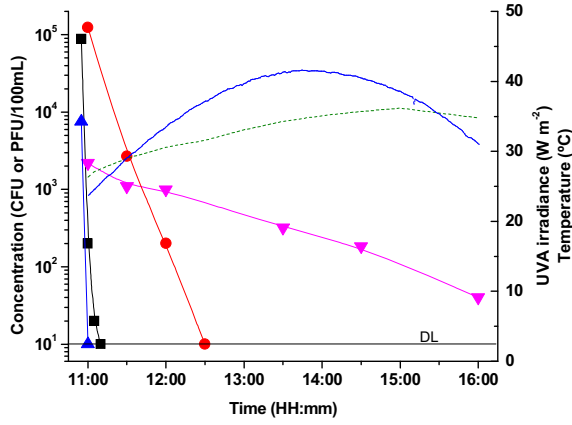


(c)

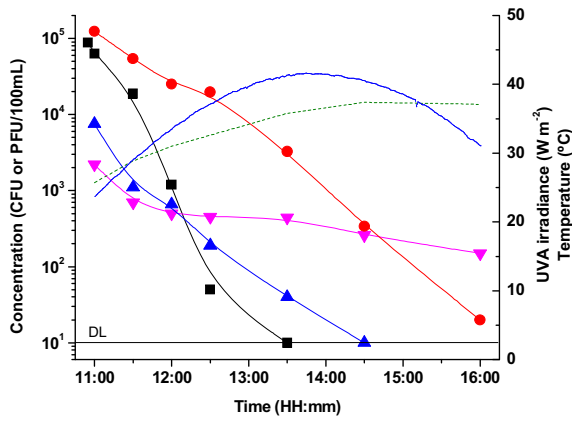
**Figure 3.** Inactivation of all the microbial indicators tested in a representative single experiment of  $\text{TiO}_2$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ )/solar UVA. *E. coli* (—■—); SRC: Sulphite-reducing clostridia (—▼—); SOMCPH: somatic coliphages (—●—); FRNA: F-specific RNA bacteriophages (—▲—). UVA irradiance (—); temperature (—).



**Figure 4.** Inactivation of all the microbial indicators tested in a representative single experiment of Photo – Fenton pH3 (a) and natural pH (b): 10 mg<sup>-1</sup> of Fe<sup>+2</sup> and 20 mg L<sup>-1</sup> of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at pH3. *E. coli* (—■—); SRC: Sulphite reducing clostridia (—▼—); SOMCPH: somatic coliphages (—●—); FRNA: F-specific RNA bacteriophages (—▲—). UVA irradiance (—); temperature (—).

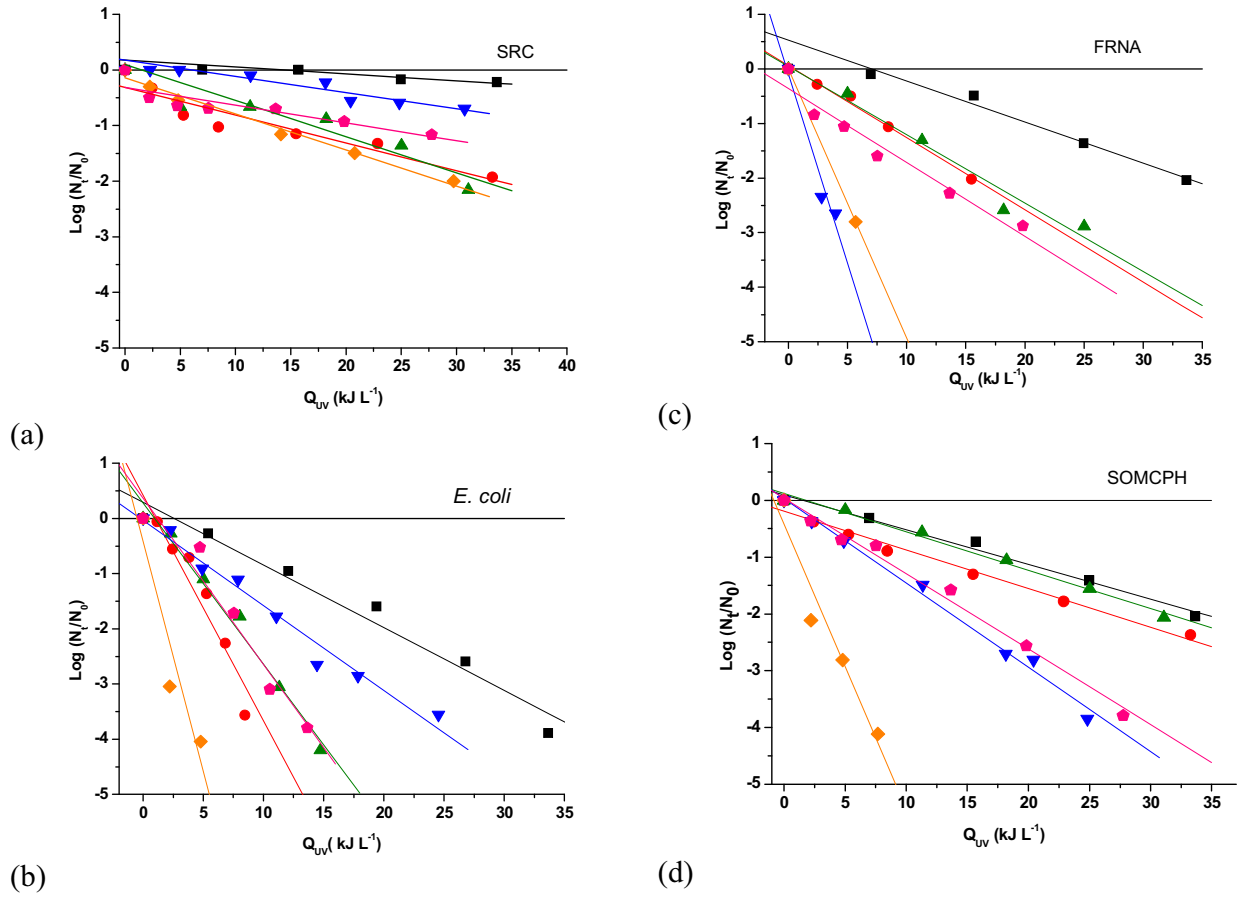


(a)



(b)

**Figure 5.** Log inactivation of SRC (a), *E. coli* (b), FRNA (c), and SOMCPH (d) in each photo oxidation treatment: solar disinfection (—■—), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-20 mg L<sup>-1</sup> (—●—), photo-Fenton pH3 (—◆—), TiO<sub>2</sub> (—▼—), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-50 mg L<sup>-1</sup> (—▲—), photo-Fenton natural pH (—◆—). SRC: sulphite-reducing clostridia; SOMCPH: somatic coliphages; FRNA: F-specific RNA phages. Q<sub>UV</sub>: accumulated energy.







## **4. Discussió global i conclusions finals**



#### 4.1. CAPÍTOL I: Riscos microbiològics lligats a la reutilització: el cas de *Cryptosporidium*

Per al desenvolupament del capítol 1 s'han estudiat un total de 7 EDARs de Catalunya. Cinc d'aquestes plantes disposaven també de tractament terciari, de manera que s'ha pogut dur a terme un estudi intensiu sobre les concentracions d'oocists de *Cryptosporidium* així com dels microorganismes indicadors seleccionats. Això ha permès avaluar l'eficiència dels diferents tractaments regeneració que aquestes plantes utilitzen.

Per començar, es va estudiar l'impacte de la reutilització (indirecta i controlada) per potabilització. Concretament, es va avaluar l'impacte que tindria, sobre la qualitat microbiològica del riu Llobregat, l'abocament d'aigua regenerada (procedent de l'ERA del Prat de Llobregat) uns Km més amunt del punt de captació de la potabilitzadora. Aquesta activitat s'emmarca dins les mesures d'actuació que es podrien prendre a Catalunya suposant que hi tornés a haver una situació d'emergència com la que es va viure durant la sequera del 2007-2008.

D'altra banda, es van determinar les concentracions de diversos microorganismes indicadors (*E. coli*, SRC i SOMCPH) i d'oocists (totals i infecciosos) de *Cryptosporidium*, en mostres d'aigua residual d'entrada (E), d'efluent secundari (ES) i d'efluent terciari (ET) de les EDARs implicades en l'estudi. Finalment, es va fer un estudi de QMRA lligat a *Cryptosporidium* en aigua regenerada. Aquest estudi pretenia avaluar dues estratègies per dur a terme QMRA. L'una, basada en l'ús de les concentracions de *Cryptosporidium* trobades a l'aigua regenerada i l'altra, basada en l'ús de les concentracions d'SRC per analitzar el risc lligat a *Cryptosporidium*.

Els resultats d'aquest capítol estan englobats en les publicacions següents:

- **ARTICLE 1:** *Assessing the effects of tertiary treated wastewater reuse on a Mediterranean River (Llobregat, NE Spain), part III: Pathogens and indicators.*
- **ARTICLE 2:** *Alternative indicators for monitoring Cryptosporidium oocysts in reclaimed water.*
- **ARTICLE 3:** *Direct and indirect QMRA of infectious Cryptosporidium oocysts in reclaimed water.*

Pel que fa a l'estudi de l'augment del cabal del riu Llobregat amb aigua regenerada, les concentracions d'*E. coli*, SRC i SOMCPH indicaven que l'abocament d'aigua regenerada al riu en millora la qualitat microbiològica, ja que a l'aigua regenerada, les concentracions d'aquests microorganismes eren molt inferiors a les del propi riu. Aquest fet no és estrany ja que l'aigua del Llobregat a l'alçada de St. Joan Despí, és en gran part, el resultat de molts vessaments d'efluents de depuradora de poblacions situades aigües amunt. Tant si l'aigua de l'ERA havia estat tractada amb llum UV i cloració (UV + Clor), com si només havia estat tractada amb UV, la qualitat de l'aigua regenerada seguia sent superior a la del riu.

Les anàlisis fetes abans i després del transport de l'aigua regenerada, des de l'ERA del Prat fins a uns quilòmetres més amunt del punt de captació de l'ETAP, indicaven que no hi havia recreixement de cap dels microorganismes indicadors seleccionats, fet que s'ha descrit en algunes ocasions quan l'aigua és tractada amb llum UV. Pel que fa a les concentracions d'oocists de *Cryptosporidium* a l'aigua regenerada, van estar sempre per sota del límit de detecció (< 0,02 TOO o IOO/L). A l'aigua del riu Llobregat en canvi, es van trobar valors màxims de 2,7 TOO/L i 1,4 IOO/L. Després del vessament d'aigua regenerada aquestes concentracions van ser menors, però no de manera estadísticament significativa. S'ha de tenir en compte però, que la incertesa de la tècnica així com les baixes concentracions poden tenir una gran influència en aquests valors.

Cal esmentar que l'aigua regenerada del Prat del Llobregat va mostrar sempre unes concentracions de *Cryptosporidium* molt baixes, però això pot variar molt en funció de l'EDAR i de les concentracions inicials del patògen a l'aigua residual crua (E). Tenint en compte totes les EDARs estudiades, un 88% de les mostres d'E van ser positives per *Cryptosporidium* tot i que generalment aquest valor sol ser del 100%. També hi va haver molta variabilitat pel que fa al nombre, ja que va oscil·lar entre 1 TOO/L i 7000 TOO/L. La caracterització genètica dels oocists va mostrar que el genotip IbA10G2R2 de *C. hominis* és el més comú de les espècies circulants de *Cryptosporidium*. Per últim, en observar la distribució estacional d'aquests oocists es va poder apreciar que hi havia un pic en les concentracions de TOO durant l'estiu. Aquest pic coincideix amb el número de casos de criptosporidiosi declarats a Espanya segons el BES, i és degut, probablement, a que la majoria d'EDARs estudiades estaven situades en zones turístiques, que pateixen un increment de la població molt gran durant l'estiu.

Les variacions en les concentracions de patògens són normals, ja que aquests poden variar molt en funció de l'àrea, l'època de l'any, la població etc. En canvi, les concentracions d'indicadors se solen mantenir estables en aigües sense tractar, en aquest estudi han estat al voltant de 6 uLog per *E. coli* i SOMCPH i al voltant de 5 per les SRC.

A grans trets, les concentracions dels indicadors es redueixen significativament al llarg del tractament, però la proporció entre ells varia, ja que n'hi ha que s'inactiven molt ràpidament, com *E. coli*, i n'hi ha que són més resistents, com les SRC o els SOMCPH. Després de fer un estudi estadístic entre aquests indicadors i *Cryptosporidium*, es va poder comprovar que les SRC són les que millor reflecteixen el comportament dels TOO de *Cryptosporidium*, de manera que són un bon indicador de procés per a aquest patògen. De fet, es van utilitzar les dades agrupades en funció del tipus de tractament terciari (amb UV + Clor o només amb UV) i es va observar que en ambdós casos les SRC seguien inactivant-se de manera molt similar als TOO. En canvi, quan s'estava valorant quin o quins indicadors serien més adequats per determinar la presència d'IOO en aigua regenerada, es va veure que la parella *E. coli* – SOMCPH seria la més adequada, ja que classificava correctament el 92% de mostres amb un 0% de falsos positius mitjançant l'anàlisi discriminant. Aquest fet és extremadament important perquè des de fa molt temps la comunitat científica accepta que la determinació d'un sol paràmetre de qualitat microbiològica (*E. coli*) podria no ser suficient quan estem avaluant si una aigua

regenerada és segura, ja que aquest bacteri, tot i que molt útil, no reflecteix en absolut el comportament de molts virus i protozous patògens.

Tenint en compte aquestes dades, es va realitzar l'estudi de QMRA en un escenari d'ingestió accidental d'aigua regenerada. Per fer-ho es van utilitzar les concentracions de TOO, a les que se'ls hi va aplicar un percentatge d'infectivitat diferent (determinat experimentalment) en funció del tipus de tractament. Tenint en compte que les concentracions en ET variaven extraordinàriament en funció de la planta, les PI mitjanes també van variar molt. El model utilitzat per al càlcul també és un factor clau a l'hora de determinar les probabilitats d'infecció. La PI quan el tractament terciari no utilitzava llum UV va ser aproximadament 3 uLog més elevada que nos pas quan sí que l'utilitzava, independentment del model i de la concentració d'oocists. Finalment, l'estudi exploratori de QMRA amb dades d'SRC va mostrar que les PIs eren al voltant d'1 uLog més elevades que les obtingudes amb *Cryptosporidium*, i que per tant, tenen potencial per a ser utilitzades com a una versió conservadora de QMRA.

Poder disposar d'un indicador adequat de *Cryptosporidium* és fonamental ja que la detecció d'oocists és un procés molt costós econòmicament i que requereix de personal especialitzat. Tot i així, cada vegada s'estan millorant més les tècniques de detecció d'aquest patògen, sobretot pel que fa a les tècniques moleculars. Aquestes, a més a més, tenen el potencial de poder diferenciar oocists viables i no viables, com la qPCR d'mRNA, o la PMA-qPCR. Aquest tipus de tècniques encara no estan prou desenvolupades i de moment també són costoses econòmicament, però en un futur, poden esdevenir una eina molt valuosa en l'estudi de *Cryptosporidium*.

Com a conclusions finals del capítol I, podríem destacar que:

- ▬ La reutilització d'aigua per a l'augment del cabal del riu Llobregat no implicaria, des del punt de vista de les malalties infeccioses, un detriment en la qualitat microbiològica del riu, sinó més aviat el contrari.
- ▬ Els tractaments d'aigua actuals redueixen significativament les concentracions d'indicadors així com de *Cryptosporidium*.
- ▬ Els tractaments terciaris multibarrera són els més adequats per poder garantir aigua regenerada segura, sigui quin sigui l'ús que se li vulgui donar.
- ▬ L'ús de llum UV com a tractament de desinfecció és fonamental pel que fa al risc associat a *Cryptosporidium*, ja que la PI és 3 uLog més alta quan no s'utilitza UV en el tractament terciari.
- ▬ L'ús d'un altre microorganisme indicador, a part d'*E. coli*, significaria, des de la perspectiva microbiològica, una millora de la gestió de l'aigua. Els SOMCPH, tenen molt potencial per ser aquest segon indicador.

## 4.2. CAPÍTOL II: Noves tecnologies per al tractament de l'aigua regenerada:

---

Per al desenvolupament del capítol 2 s'han estudiat els següents processos fotocatalítics:  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ ,  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  i  $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  com a processos de regeneració d'aigua. D'una banda, es va estudiar la fotòlisi de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (amb baixes concentracions d' $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i llum UV provinent de làmpades. De l'altra, es van estudiar tots els tractaments esmentats utilitzant la radiació solar com a font de llum UV. Aquest últim projecte es va dur a terme a la PSA (Plataforma solar de Almería), centre que pertany al CIEMAT, ja que són una plataforma líder en l'ús de l'energia solar.

Els resultats d'aquest capítol estan englobats en les publicacions següents:

- **ARTICLE 4:** *Evaluation of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the disinfection and treatment of municipal secondary effluents for water reuse*
- **ARTICLE 5:** *Solar advanced oxidation processes as disinfection tertiary treatments for real wastewater: implications for water reclamation*

Pel que fa a la primera part (baixes concentracions d' $\text{H}_2\text{O}_2$  i làmpades UV), es va analitzar la inactivació d' *E. coli*, SRC, SOMCPH i CB390PH després de l'aplicació d'aquest tractament en un efluent secundari d'una planta amb tractament convencional. L'objectiu de l'estudi era avaluar l'eliminació d'ATZ de l'efluent ja que aquesta és una substància que s'utilitza com a model en l'eliminació de microcontaminants. L'ATZ és un herbicida, que tot i que està prohibit des de fa anys, encara està present en moltes aigües degut a l'ús exhaustiu que se'n va fer durant anys. Per a millorar l'eficiència del procés fotocatalític, l'ES es va filtrar abans del tractament, ja que la terbolesa i els sòlids en suspensió poden influir negativament tant pel segrest de radicals OH com impeding que els fotons arribin a la seva diana. A més a més, aquestes substàncies alteren fàcilment les mesures dels paràmetres químics. Aquesta filtració no va influir en els paràmetres microbiològics.

El resultat d'aquest tractament va ser la inactivació completa de tots els microorganismes en 5 min de reacció. Hi va haver lleugeres diferències en les cinètiques d'inactivació, però després de 5 min, tots els indicadors estaven per sota del límit de detecció (10 CFU o PFU/100mL). Tot i que es van utilitzar concentracions baixes d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , (5 mg/mL) la dosi de llum UV aplicada va ser molt alta (2412 mJ/cm<sup>2</sup>), de manera que pel que fa als microorganismes, pràcticament no hi va haver diferència entre l'aplicació de UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , i l'aplicació de només llum UV. D'altra banda, ja que la inactivació de les SRC va ser molt accentuada tot i que generalment són els microorganismes més resistents, seria interessant seguir estudiant aquest tipus de POA per trobar l'equilibri entre les dosis d'UV aplicades i els resultats obtinguts pel que fa a la qualitat microbiològica de l'aigua, ja que segurament amb dosis més baixes es podrien assolir resultats satisfactoris.

En canvi, quan es vol utilitzar la radiació solar com a font de llum UV per a POA, la dosi de llum UV depèn del sol. L'inconvenient és clar, la irradiació és molt diferent segons el moment del dia i segons l'època de l'any. Però d'altra banda, l'avantatge és obvi, ja que la

llum del sol és, ara per ara, gratuïta, i desenvolupar tecnologies que sàpiguen aprofitar-la és una opció molt sostenible.

Com ja hem explicat a la introducció, el SODIS és una pràctica molt estesa sobretot en països no industrialitzats, però s'està intentant optimitzar com a possible tractament a més gran escala. El ventall de possibilitats que ofereix l'energia solar és immens i la PSA disposa de les instal·lacions adequades així com de foto-reactors tipus CPC (*compound parabolic collector*) a escala pilot per poder-hi fer assajos.

Entre tots els tractaments realitzats utilitzant els foto-reactors CPC, la radiació solar per si sola (SODIS) va ser el menys efectiu, tot i així, 5 h de tractament van aconseguir reduir les concentracions d'*E. coli* per sota del límit de detecció (10 CFU/100mL).

L'eficiència dels tractaments assajats va variar molt en funció del tipus de microorganisme. Així, pels indicadors bacterians (*E. coli* i SRC) l'eficiència dels tractaments va seguir la següent tendència: SODIS < TiO<sub>2</sub>/UV < H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV << Fe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV; mentre que per als indicadors vírics (SOMCPH i FRNAPH) la tendència va ser: SODIS < H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV << TiO<sub>2</sub>/UV < Fe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV. Cal destacar, doncs, que l'ús de TiO<sub>2</sub>/UV va inactivar molt més ràpid el grup dels bacteriòfags que no pas *E. coli* i SRC, cosa que sorprèn perquè, en general, *E. coli* és molt més sensible que els bacteriòfags als tractaments de l'aigua. D'altra banda, fos quin fos el tractament, les SRC van ser l'indicador més resistent, i fos quin fos el microorganisme analitzat, el tractament més eficient va ser el foto-Fenton. Aquests resultats reafirmen la idea, ja esmentada al capítol 1, que és imprescindible l'ús d'algun altre indicador microbiològic en termes de seguretat de l'aigua regenerada, ja que el comportament d'aquests davant d'un tractament és molt variable.

Tenint el compte que els indicadors analitzats són microorganismes model d'una gran varietat de patògens (bacterians, vírics i de protozous), es podria fer un càlcul de l'efecte dels POA estudiats sobre aquests patògens, i fer una estimació de la intensitat dels tractaments necessària per reduir-los a nivells acceptables des del punt de vista del risc microbiològic per a la salut de les persones. Per tant, seria interessant, que en un futur no gaire llunyà, i partint de la informació aconseguida amb l'anàlisi dels indicadors, es comencessin a estudiar els efectes d'aquests tractaments sobre patògens presents de manera natural en efluent secundaris.

Si el foto-Fenton s'apliqués com a tractament terciari, trigaria 11,4 minuts a produir aigua amb nivells d'*E. coli* inferiors a 1 CFU/100 mL, és a dir, que des del punt de vista d'aquest paràmetre, seria apta per a qualssevol dels usos contemplats a la legislació. Aquests resultats animen a estudiar el foto-Fenton amb més profunditat ja que ara per ara, hi ha certes limitacions que s'haurien de solucionar abans de poder-lo aplicar de manera més àmplia.

El problema de l'acidificació prèvia de l'efluent per a poder tractar amb foto-Fenton, així com la neutralització posterior, abans d'abocar o reutilitzar l'efluent, són dos factors clau en el procés, que encara no estan del tot clars.



Una possible solució seria l'entrada de l'efluent a la borsa de subproductes o alguna entitat semblant. D'aquesta manera, se'n podria treure algun benefici addicional, ja fos econòmic o ambiental (reutilització). A més a més, si es pretén utilitzar aquest tractament, no de manera universal sinó de manera més localitzada, i amb cabals no massa elevats, la possibilitat d'acidificar l'efluent i de neutralitzar-lo seria factible amb l'ús de sondes de pH i bombes per dispensar àcids/bases segons la conveniència de cada efluent. El tipus de suport informàtic per poder-ho existeix des de fa temps – programaris del tipus SCADA – i és molt comú per al tractament d'aigües.

Com a conclusions finals del segon capítol, podríem destacar que:

- ▬ És necessari fer assajos en aigües reals quan s'estan avaluant aquest tipus de tractaments ja que l'ús de microorganismes dopats en aigües artificials pot no ser prou representatiu de la realitat.
- ▬ L'ús de tecnologies d'oxidació avançada té un gran potencial en el tractament d'aigua, tant si es tracta de disminuir les concentracions de microcontaminants químics com biològics.
- ▬ L'ús de radiació solar com a font d'energia en aquests processos té un gran potencial per al tractament d'aigua, tant per la seva eficiència com per la disminució de l'impacte ambiental que implicaria.
- ▬ L'ús d'un altre microorganisme indicador, a part d'*E. coli*, significaria una millora de la gestió de l'aigua des de la vessant microbiològica, i els SOMCPH, tenen molt potencial per ser aquest segon indicador.

## **5. Bibliografia**



- AAM (2006) Clean Water: What is Acceptable Microbial Risk? American Academy of Microbiology, Washington DC.
- ACCUA (2011) Adaptacions al canvi climàtic en l'ús de l'aigua.  
<http://www.creaf.uab.cat/accua/>
- Al-Momani, F. (2003) Tesi doctoral: Combination of photo-oxidation processes with biological treatment. Universitat de Barcelona. Facultat de Química. Departament d'enginyeria química i metal·lúrgica.
- Benotti, M. J., Trenholm, R.A., Vanderford, B.J., Holady, J. C., Standford B. D., Snyder, S. A. PhACs endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environ Sci Technol*, 43:597–603.
- Betancourt, W. Q., Rose, J. B. (2004) Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet Parasitol*, 126: 219–234.
- Brescia, C. C., Griffin, S. M., Ware, M. W., Varughese, E. A., Egorov, A. I., Villegas, E. N. (2009) *Cryptosporidium parvum* monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts (2009) *Appl Environ Microbiol* 75 (21): 6856-63
- Bonde, G. J. (1963) *Bacterial Indicators of Water Pollution*, Teknisk Forlag, Copenhagen.
- Cardona, G. A., Carabin, H., Goñi, P., Arriola, L., Robinson, G., Fernández-Crespo, J. C., Clavel, A., Chalmers, R. M., Carmena, D. (2011) Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, North of Spain. *Sci Total Environ*, 412–413: 101–108.
- Chamarro, E., Marco, A., Esplugas S. (2001) Use of Fenton reagent to improve organic chemical biodegradability, *Wat Res*, 35 (4): 1047-1051
- Chappell, C., Okhuysen, P., Langer-Curry, R., Widmer, G., Akiyoshi, D., Tanriverdi, S., Tzipori, S. (2011) *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *Am J Trop Med Hyg*, 75: 851–857
- Compañ-Barco, M. D., Llopis-González, A., Morales, M. M. (1991) Consideraciones epidemiológicas sobre criptosporidiosis. *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, 65: 363–370.
- Conroy, R. M., Meegan, M., Joyce, T., McGuigan, K. G., Barnes, J. (2001) Solar disinfection of water reduces diarrhoeal disease: an update. *Arch Dis Child*, 81: 337-338

- Conroy, R. M., Meegan, M., Joyce, T., McGuigan, K. G., Barnes, J. (2001) Solar disinfection of drinking water protects against cholera in children under 6 years of age. *Arch Dis Child*, 85 (4): 293-295
- Cooper, P. F. (2001) Decentralised Sanitation and Reuse. Concepts, Systems and Implementation. Capítol 2, part I: Historical aspects of wastewater treatment.  
<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/leeds/cooper.pdf>
- Costán-Longares, A., Montemayor, M., Payán, A., Méndez, J., Jofre, J., Mujeriego, R., Lucena, F. (2008) Microbial indicators and pathogens: removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. *Water Res*, 42: 4439–4448.
- DWI (2006) Drinking water inspectorate. Cryptosporidiosis: a report on the surveillance and epidemiology of *Cryptosporidium* infection in England and Wales. DWI 70/2/201.  
[http://dwi.defra.gov.uk/research/completed-research/reports/DWI70\\_2\\_201.pdf](http://dwi.defra.gov.uk/research/completed-research/reports/DWI70_2_201.pdf)
- EAWAG/SANDEC (2002) Solar water disinfection - A guide for the application of SODIS  
[http://www.sodis.ch/methode/anwendung/ausbildungsmaterial/dokumente/material/manual\\_e.pdf](http://www.sodis.ch/methode/anwendung/ausbildungsmaterial/dokumente/material/manual_e.pdf)
- Esplugas, S., Giménez, J., Contreras, S., Pascual, E., Rodríguez, M. (2002) Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation. *Water Res* 36 (4):1034-42
- Farré, M., Gros, M., Hernández, B., Petrovic, M., Hancock, P., Barceló, D. (2008) Analysis of biologically active compounds in water by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22 (1): 41–51
- Fayer, R. Xiao, L. (1997) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, New York.
- García-Fernández, I., Polo-López, M. I., Oller, I., Fernández-Ibáñez, P. (2012) Bacteria and fungi inactivation using Fe<sup>3+</sup>/sunlight, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/sunlight and near neutral photo-Fenton: A comparative study. *App Cat B: Environ*, 121-122: 20-29
- Gennaccaro, A. L., McLaughlin, M. R., Quintero-Betancourt, W., Huffman, D. E., Rose, J. B. (2003) Infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in final reclaimed effluent. *Appl Environ Microbiol* 69: 4983–4984
- Gros M., Petrovic M., Barceló D. (2009) Tracing PhACs residues of different therapeutic classes in Environmental Waters by using Liquid Chromatography/Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Automated Library Searching. *Anal Chem*, 81: 898–912

- Guzmán, C., Mocé-Llivina, L., Lucena, F., Jofre, J. (2008) Evaluation of *Escherichia coli* host strain CB390 for simultaneous detection of somatic and F-specific coliphages. *Appl Environ Microbiol*, 74 (2):531-4
- Haas, C. N., Crockett, C. S., Rose, J. B., Gerba, C. P., Fazil, A. M. (1996) Assessing the risk posed by oocysts in drinking water. *J Am Water Works Assoc*, 88: 131–136
- Harwood, V. J., Levine, A. D., Scott, T. M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S. R., Rose, J. B. (2005) Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl Environ Microbiol*, 71: 3163–3170.
- Havelaar A. H., den Hollander A. E. M., Teunis, P. F. M., Evers, E. G., van Kranen, H. J., Versteegh, J. F. M., van Koten, J. E. M., Slob, W. (2000) Balancing the risks and benefits of drinking water disinfection: disability adjusted-life years on the scale. *Environ Health Persp*, 108 (4):315-321
- Hobbins, M., Mäusezahl, D., Tanner, M. (2000) Home-based drinking water purification: The SODIS Health Study, Bangladesh. Swiss Tropical Institute, Basel, Berkeley, Rajshahi.
- Hunter, P. (2002) Epidemiology and Clinical Features of Cryptosporidium Infection in Immunocompromised Patients. *Clin Microbiol Rev* 15 (1): 145–154
- IDESCAT. Institut d'estadística de Catalunya.  
<http://www.idescat.cat/dequavi/?TC=444&V0=1&V1=1>
- IPCC (2007). Intergovernmental panel on climate change. Fourth assessment report.  
[http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4\\_syr.pdf](http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4_syr.pdf)
- Iqbal, A., Lim, Y. A., Surin, J., Sim, B. L. (2012) High diversity of Cryptosporidium subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targeting gp60 gene. *PLoS One* 7 (2):e31139
- ISO 10705-1:1995. Water quality - Detection and Enumeration of Bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. International Standardization Organization, Gènova.
- ISO 10705-2:2000. . Water quality - Detection and Enumeration of Bacteriophages. Part 2. Enumeration of Somatic Coliphages. International Standardization Organization, Gènova.
- ISO 10705-4:2001. Water quality - Detection and enumeration of bacteriophages. Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*. International Standardization Organization, Gènova.

- ISO 15553:2006. Water quality - Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. International Standardization Organization, Gènova.
- IAWPRC (1991) IAWPRC study group on health related water microbiology. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res*, 25: 529–545
- Kothavade, R., J. (2011) Challenges in understanding the immunopathogenesis of *Cryptosporidium* infections in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 30(12): 1461–1472
- Kümmerer, K. (2001) Drugs, diagnostic agents and disinfectants in waste water and water – a review. *Chemosphere*, 45: 957–969
- Liang, Z., Keeley, A. (2012) Comparison of propidium monoazide-quantitative PCR and reverse transcription quantitative PCR for viability detection of fresh *Cryptosporidium* oocysts following disinfection and after long-term storage in water samples. *Water Res*, 46 (18): 5941-53
- Lucena, F., Jofre, J. (2010) Potential use of bacteriophages as indicators of water quality and wastewater treatment processes. In: Sabour PM, Griffiths MW (eds) *Bacteriophages in the control of food and waterborne pathogens*. ASM Press, Washington, pp 103–118
- Mandilara, G. D., Smeti, E. M., Mavridou, A. T., Lambiri, M. P., Vatopoulos, A. C., Rigas, F. P. (2006) Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. *FEMS Microbiol Lett* 263: 119–126
- Macler, B. A., Regli, S. (1993) Use of microbial risk assessment in setting United States drinking water standards. *Int J Food Microbiol*, 18 (4): 245–256
- Marti, E., Monclús, H., Jofre, J., Rodriguez-Roda, I., Comas, J., Balcázar, J .L. (2011) Removal of microbial indicators from municipal wastewater by a membrane bioreactor (MBR). *Bioresour Technol*, 102 (8): 5004-9
- Mc Kenzie, W. R., Neil, J., Hoxie, M. E., Proctor, M., Gradus S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B., Davis, J. P. (1994) A Massive Outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* Infection Transmitted through the Public Water Supply *N Engl J Med* 331:161-16  
<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199407213310304#t=articleBackground>
- Meisel, J. L., Perera, D. R., Meligro, C., Rubin, C. E. (1976) Overwhelming watery diarrhea associated with a *cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70, 1156-1160.

- Montemayor, M., Costán-Longares, A., Lucena, F., Jofre, J., Muñoz, J., Dalmau, E., Mujeriego, R., Sala, L. The combined performance of UV light and chlorine during reclaimed water disinfection. *Water Sci. Technol.* 57, 935–940.
- Nime, F. A., Burek, J. D., Page, D. L., Holscher, M. A., Yardley, J. H. (1976). Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70, 592-598.
- NRCR (2012) National research council report.  
<http://dels.nas.edu/Materials/Report-In-Brief/4307-Water-Reuse>
- Okun, D. A. (2000) Water Reclamation and Unrestricted Non-potable Reuse: A New Tool in Urban Water Management. *Annu Rev Publ Health*, 21: 223-245  
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.publhealth.21.1.223>
- Ortega-Gómez, E., Fernández-Ibáñez, P., Ballesteros-Martín, M.M., Polo-López, M. I., Esteban-García, B., Sánchez-Pérez, J. A. (2012) Water disinfection using photo-Fenton: Effect of temperature on *Enterococcus faecalis* survival. *Water Res*, 46 (18): 6154-6162
- Osorio, V., Marcé, R., Pérez, S., Ginebreda, A., Cortina, J. L., Barceló, D. (2012) Occurrence and modeling of pharmaceuticals on a sewage-impacted Mediterranean river and their dynamics under different hydrological condition. *Sci Total Envi*, 440: 3-13
- Page, D., Dillon, P., Toze, S., Bixio, D., Genthe, B., Jiménez Cisneros, B. E., Wintgens, T. (2010) Valuing the subsurface pathogen treatment barrier in water recycling via aquifers for drinking supplies. *Water Res* 44 (6):1841-52
- Pal, A., Gin, K., Lin, A., Reinhard, M. (2010) Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci Total Environ*, 408 (24): 6062–9.
- Pangasa, A.; Jex, A. R., Nolan, M. J., Campbell, B. E., Haydon, S. R., Stevens, M., Gasser, R. B. (2010) Highly sensitive non-isotopic restriction endonuclease fingerprinting of nucleotide variability in the gp60 gene within *Cryptosporidium* species, genotypes and subgenotypes infective to humans, and its implications. *Electrophoresis*, 31: 1637–1647
- Payment, P., Franco, E. (1993) *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl Environ Microbiol*, 59 (8): 2418–2424
- Polgreen, P. M., Sparks, J. D., Polgreen, L. A., Yang, M., Harris, M. L., Pentella, M. A., Cavanaugh, J. E. (2012) A statewide outbreak of *Cryptosporidium* and its association with the distribution of public swimming pools. *Epidemiol Infect*, 140(8): 1439–1445



- Ramírez, N., Ward, A. L., Sreevatsan, S. (2004) A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*, 6:773–785
- RD 140/2003. Real decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.  
<http://www.boe.es/boe/dias/2003/02/21/pdfs/A07228-07245.pdf>
- RD 1620/2007. Real decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.  
<http://www.boe.es/boe/dias/2007/12/08/pdfs/A50639-50661.pdf>
- Rodríguez-Manzano, J., Alonso, J. L., Ferrús, M. A., Moreno, Y., Amorós, I., Calgua, B., Hundesa, A., Guerrero-Latorre, L., Carratala, A., Rusiñol, M., Girones, R. (2012) Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water. *Water Sci Technol* 66 (12): 2517-23
- Rohli, R. V., Vega, A. J. (2011) *Climatology - Chapter 6: The Global Hydrologic Cycle and surface water balance.*
- Rosal, R., Rodea-Palomares, I., Boltes, K., Fernández-Piñas, F., Leganés, F., Gonzalo, S., Petre, A. (2010) Ecotoxicity assessment of lipid regulators in water and biologically treated wastewater using three aquatic organisms. *Environ Sci Pollut Res*, 17 (1): 135-144
- Ryu, H., Alum, A., Mena, K. D., Abbaszadegan, M. (2007) Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-potable reclaimed water. *Water Sci Technol* 55 (1-2):283-90
- Sala, Ll., Millet, X. (1997) Aspectos básicos de la reutilización de las aguas residuales regeneradas para el riego de campos de golf. *Apuntes de las Jornadas Técnicas del Golf*, 1995.
- Sciacca, F., Rengifo-Herrera, J. A., Wéthé, J., Pulgarin, C. (2010) Dramatic enhancement of solar disinfection (SODIS) of wild *Salmonella* sp. in PET bottles by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition on natural water of Burkina Faso containing dissolved iron. *Chemosphere*, 78 (9): 1186-1191
- Sichel, C., Blanco, J., Malato, S., Fernández-Ibáñez, P. (2007) Effects of experimental conditions on *E. coli* survival during solar photocatalytic water disinfection. *J Photochem Photobiol A: Chemistry*, 189 (2-3): 239-246

- Slifko, T. R., Friedman, D., Rose, J. B., Jakubowski, W. (1997) An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Appl Environ Microbiol* 63: 3669–3675
- Stasinakis, A. S. (2008) Use of selected Advanced oxidation processes (AOPs) for wastewater treatment – A mini review. *Global NEST Journal*, 10 (3): 376-385
- State of Queensland EPA (2005) Queensland water recycling guidelines. The State of Queensland environmental protection agency. Brisbane, Australia.  
[http://www.derm.qld.gov.au/water/regulation/recycling/pdf/rotate\\_guidelines.pdf](http://www.derm.qld.gov.au/water/regulation/recycling/pdf/rotate_guidelines.pdf)
- Teunis, P. F. M., Havelaar, A. H. (2000) The Beta Poisson model is not a single hit model. *Risk Anal*, 20(4):511-518
- UNDP (2000) The millenium development goals. Eight goals for 2015. United Nations development program.  
<http://www.undp.org/content/undp/en/home/mdgoverview.html>
- UNDP (2006) Human development report: Beyond scarcity: power, poverty and the global water crisis. United Nations development program.  
<http://hdr.undp.org/en/media/HDR06-complete.pdf>
- UN-Water (2009) United Nations - Water Statistics: Graphs and Maps: Water pollution, Environmental Degradation and Disasters.  
[http://www.unwater.org/statistics\\_pollu.html](http://www.unwater.org/statistics_pollu.html)
- UNWPP (2010) United Nations World Population Prospects: The 2010 Revision— Highlights and Advanced tables. United Nations. Population Division. Department of Economic and Social Affairs. New York.  
[http://esa.un.org/unpd/wpp/Documentation/pdf/WPP2010\\_Highlights.pdf](http://esa.un.org/unpd/wpp/Documentation/pdf/WPP2010_Highlights.pdf)
- USEPA (2001) Low-Pressure membrane filtration for pathogen removal: application implementation, and regulatory issues. United States Environmental Protection Agency.  
[http://www.epa.gov/ogwdw/disinfection/lt2/pdfs/report\\_lt2\\_membranefiltration.pdf](http://www.epa.gov/ogwdw/disinfection/lt2/pdfs/report_lt2_membranefiltration.pdf)
- USEPA (2005) Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by filtration/IMS/FA. United States Environmental Protection Agency.  
<http://www.epa.gov/nerlcwww/documents/1623de05.pdf>
- USEPA (2006) National primary drinking water regulations: ground water rule; final rule (40CFR Parts 9, 141, and 142). United States Environmental Protection Agency.  
<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-WATER/2006/November/Day-08/w8763.pdf>

- Vulliet, E., Cren-Olivé, C. (2011) Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Eviron Pollut*, 159 (10): 2929-2934
- Wang, X., Hu, C., Hu, X., Wei, D. (2011) Sequential use of ultraviolet light and chlorine for reclaimed water disinfection. *J Environ Sciences* 23 (10): 1605e1610.
- Wang, X., Hu, X., Wang, H., Hu, C. (2012) Synergistic effect of the sequential use of UV irradiation and chlorine to disinfect reclaimed water. *Water Res*, 46 122: 1225e1232
- WHO (2001) *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. Chapter 10: Acceptable risk. Paul Hunter i Lorna Fewtrell. World Health organisation.  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwg/iwachap10.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/iwachap10.pdf)
- WHO (2001) *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. Chapter 13: Indicators of microbial water quality. Ashbolt, N. J., Grabow, W. O. K., Snozzi, M. IWA Publishing. World Health organisation.  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwg/whoiwa/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/whoiwa/en/)
- WHO (2009) *Risk Assessment of Cryptosporidium in Drinking Water*. Public Health and Environment Water, Sanitation, Hygiene & Health. World Health organisation. WHO/HSE/WSH/09.04  
[http://whqlibdoc.who.int/hq/2009/WHO\\_HSE\\_WSH\\_09.04\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2009/WHO_HSE_WSH_09.04_eng.pdf)
- Wu, J., Long, S. C., Das, D., Dorner, S. M. (2011) Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. *J Water Health* 9: 265–278