

**MECANISMOS DE ELIMINACIÓN DE PATÓGENOS EN
SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES**

**PATHOGEN REMOVAL MECHANISMS IN
WASTEWATER TREATMENT SYSTEMS**



Roberto Reinoso Tapia

León, 2008



UNIVERSIDAD DE LEÓN

ÁREA DE ECOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD Y GESTIÓN AMBIENTAL

**MECANISMOS DE ELIMINACIÓN DE PATÓGENOS EN
SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES**

**PATHOGEN REMOVAL MECHANISMS IN
WASTEWATER TREATMENT SYSTEMS**

Roberto Reinoso Tapia

León, 2008

ROBERTO REINOSO TAPIA

**MECANISMOS DE ELIMINACIÓN DE PATÓGENOS EN
SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES**

**PATHOGEN REMOVAL MECHANISMS IN
WASTEWATER TREATMENT SYSTEMS**

**Memoria de la Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Biología por la
Universidad de León**

Director:

**Prof. Dr. D. Eloy Bécares Mantecón
Área de Ecología
Universidad de León**

León, 2008

Lista de artículos incluidos en la tesis:

I: Reinoso, R., Bécares, E., and Smith, H.V. 2008. Effect of various environmental factors on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Applied Microbiology* 104, 980-986.

II: Reinoso, R., and Bécares, E. 2008. Environmental inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in waste stabilization ponds. *Microbial Ecology* (In press. doi: 10.1007/s00248-008-9378-7).

III: Reinoso, R., and Bécares, E. 2008. Occurrence and removal of bacteria and pathogenic parasites in northwestern Spain waste stabilisation ponds. *Ecological Engineering* (Submitted).

IV: Reinoso, R., Torres, L.A., and Bécares, E. 2008. Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater. *Science of The Total Environment* 395, 80-86.

V: Reinoso, R., and Bécares, E. 2008. The occurrence of intestinal parasites in swine slurry and their removal in activated sludge plants. *Bioresource Technology* (In press. doi: 10.1016/j.biortech.2007.11.056).

A mi familia, a Carmen y a todos mis amigos.

A todos los que me han apoyado.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Eloy Bécares Mantecón, por ser la persona que más ha confiado en mí y sin cuyo concurso esta tesis doctoral no hubiera sido posible. Gracias por haberme dado la oportunidad de comenzar en el complicado y a la vez apasionante mundo de la investigación, por ayudarme con todos los problemas que han ido surgiendo, por guiarme incansablemente por el tortuoso camino recorrido a lo largo de este tiempo y, en definitiva, por haber sido mi mentor. Gracias de corazón.

A mi familia, por ayudarme en TODO cuanto necesité y por el apoyo incondicional recibido. Sin duda alguna, no hay nadie que se merezca tanto esta tesis como vosotros. Y muy especialmente a mi hermana Natalia, por su valentía a la hora de ayudarme en los muestreos en las depuradoras, a mi abuela por su constante preocupación y sobre todo, a mis padres, porque si en esta vida llego a ser algo es básicamente gracias a ellos.

A Carmen, por su paciencia, por su cariño, por su comprensión y porque seguramente ha sido la persona que más ha tenido que “sufrir” mis enfados, desilusiones y dolores de cabeza. Gracias por estar ahí siempre que te he necesitado y por ser como eres. Eres una mujer excepcional.

A Javi y a Rubén, por el estrecho vínculo alcanzado en este tiempo, por todos los momentos inolvidables que hemos pasado juntos, y en definitiva, por la amistad que nos une.

A todos los integrantes del Instituto de Medio Ambiente, Iván, Patricia, Paula, Saúl, Antonio, Servi, Juan Carlos, María, etc., a los que ya no se encuentran en el IMA pero con los que he pasado momentos inolvidables, Cástor, Carlos, Ana, Rubio, Juan, Luis, Esther, etc., y muy especialmente a Linda, por su amistad y por todas las horas que hemos pasado juntos en las primeras etapas de esta tesis.

Al resto de estudiantes de doctorado del Área de Ecología: Jose, Carlos, Alejandra, Manu y los demás.

A Estanislao de Luis, por su ayuda a la hora de conseguir la beca que me permitió realizar la tesis en este departamento y comenzar de este modo mi carrera investigadora. Muchísimas gracias.

A todos los profesores del Área de Ecología de la Universidad de León, y en especial a Gemma, Camino y Marga, personas a las que tengo un cariño especial y que siempre recordaré por el excelente trato que me han dispensado. Y tampoco me quiero olvidar de Merce y Héctor, por su ayuda y por no ponerme nunca una mala cara a pesar de traerles muestras y más muestras para analizar.

A la Universidad de León por su apoyo institucional y económico.

A la empresa Guascor y al ayuntamiento de Fresno de la Vega y Cubillas de los Oteros, por las facilidades que me proporcionaron a la hora de los muestreos en las depuradoras.

A Huw Smith y a Tony Grimason, por aceptarme en sus grupos de investigación, por el excelente trato que me dispensaron durante mi estancia en Glasgow y por las clases magistrales que me impartieron mientras saboreábamos las típicas pintas escocesas.

A José Luis Alonso, por el inmejorable trato recibido durante mi estancia en Valencia, por dejarme utilizar su laboratorio con plena libertad y por ser amigo antes que jefe. No me quiero olvidar de Inmaculada, por el cariño con el que me recibió y por las charlas que tuvimos durante ese tiempo.

A todos mis amigos, por las innumerables ocasiones en las que les he aburrido contándoles las vicisitudes de mi tesis, por sus ánimos continuos y por estar siempre ahí.

A mis nuevos jefes, Alfredo Corell y Margarita Calonge, por el apoyo recibido en esta última etapa y por permitirme finalizar la tesis.

A todos ellos, MUCHAS GRACIAS.

"Luck is when preparation meets opportunity"

-Neil Peart-

Índice

Resumen / Summary.....	1
Capítulo 1. Introducción.....	5
1.1. Reutilización del agua residual.....	7
1.2. Patógenos y microorganismos indicadores.....	8
1.3. Sistemas de tratamiento de aguas residuales.....	17
1.4. Mecanismos de eliminación de patógenos en plantas depuradoras.....	24
Capítulo 2. Objetivos.....	27
Capítulo 3. Descripción de las depuradoras estudiadas.....	31
3.1. Lagunas de estabilización.....	33
3.2. Humedales artificiales.....	36
3.3. Fangos activados.....	38
Capítulo 4. Resultados.....	41
4.1. Efecto del pH, temperatura y amoníaco sobre la inactivación de ooquistes de <i>C. parvum</i>	43
4.2. Influencia de la luz solar y la profundidad sobre la inactivación de ooquistes en lagunajes.....	45
4.3. Eliminación de patógenos e indicadores fecales en lagunajes. Importancia de la sedimentación.....	48
4.4. Eliminación de patógenos e indicadores fecales en humedales artificiales.....	51
4.5. Presencia de parásitos intestinales en purines de cerdos y su eliminación en procesos de fangos activados.....	53
4.6. Estudio preliminar sobre el papel de la depredación en la eliminación de patógenos.....	55
Capítulo 5. Discusión general.....	59
5.1. Importancia de los factores fisicoquímicos en la inactivación de patógenos.....	61
5.2. Mecanismos de eliminación de patógenos en lagunajes y humedales artificiales.....	64
5.3. Eliminación de patógenos en sistemas de tratamiento de purines.....	65
Capítulo 6. Conclusiones / Conclusions.....	69
Capítulo 7. Bibliografía.....	75
Capítulo 8. Anexos.....	85
Capítulo 9. Artículos I – V.....	95

Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar los principales mecanismos de eliminación y/o inactivación de patógenos que tienen lugar en los sistemas de tratamiento de agua residual del noroeste de España (lagunajes, humedales artificiales y fangos activados) e intentar cuantificar el efecto de determinados factores ambientales sobre dicha inactivación.

Los experimentos realizados en laboratorio demostraron que la temperatura, el pH y el amoníaco redujeron significativamente la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium parvum*. Después de 4 días de exposición a 5 mg NH₃ l⁻¹ y 50 mg NH₃ l⁻¹, la viabilidad de los ooquistes decreció desde el 81% al 41.5% y 14.8%, respectivamente, lo que corrobora al amoníaco como un factor determinante de inactivación. La interacción entre todos estos factores incrementó las tasas de inactivación de los ooquistes demostrando el efecto sinérgico que puede producirse en estos sistemas.

Los experimentos realizados en el sistema de lagunaje demostraron que la luz solar fue el factor determinante de la inactivación. Los resultados indicaron que la exposición a la luz solar incrementó la tasa de inactivación de ooquistes de *C. parvum* en un 40% tras 4 días de exposición respecto a los ooquistes en oscuridad. Las condiciones físico-químicas de la laguna facultativa fueron las más agresivas para la supervivencia de ooquistes, en comparación con las lagunas anaeróbicas y de maduración, probablemente como consecuencia de los valores más altos de pH, temperatura y oxígeno disuelto registrados en esta laguna. Por el contrario, el estudio de sedimentación llevado a cabo en este mismo sistema reveló que las lagunas anaeróbicas fueron las más eficaces en la eliminación de parásitos presentando las tasas de sedimentación más altas (28 - 680 quistes/g peso seco), seguidas por la laguna facultativa (4.2 - 12.6 quistes/g peso seco) y por la laguna de maduración, donde no se encontró ningún tipo de estructura parasitaria. Sin embargo, todos estos valores fueron más bajos que los teóricamente esperados, probablemente debido al bajo tiempo de retención del sistema, lo que evidencia que otros procesos diferentes a la sedimentación, como por ejemplo la luz solar y el ambiente físico-químico de las lagunas son los principales mecanismos de eliminación de patógenos en los lagunajes estudiados.

En cuanto a los rendimientos de eliminación de patógenos, los resultados reflejaron que todos los sistemas de tratamiento analizados redujeron significativamente la concentración de

patógenos e indicadores fecales produciendo un efluente final acorde con la reglamentación propuesta por la OMS para uso de agua residual tratada para riego en agricultura. En el sistema de lagunaje, las lagunas anaeróbicas fueron las que obtuvieron las mayores tasas de eliminación de parásitos (3.63 - 5.04 y 3.89 - 5.45 \log_{10} (oo)quistes/huevos eliminados/m²/d en invierno y verano, respectivamente), confirmándose que la sedimentación fue el mecanismo de eliminación dominante en estas lagunas. En el sistema de humedales artificiales, nuestros resultados demostraron que el humedal de flujo superficial fue el más eficaz en la eliminación de parásitos cuando se consideraron tasas de eliminación (2.51 - 3.69 y 2.64 - 4.03 \log_{10} (oo)quistes/huevos eliminados/m²/d en invierno y verano, respectivamente). Por último, en el sistema de tratamiento de purines, el proceso de fangos activados fue el más eficaz con rendimientos de eliminación superiores al 80%, el proceso físico-químico alcanzó eliminaciones de (oo)quistes entre el 40 y el 44% mientras que el tamiz fue el tratamiento menos efectivo del sistema (8 - 16%) favoreciendo en algunos casos la liberación de (oo)quistes. El proceso de secado del fango también alcanzó elevados rendimientos (>4 \log_{10} para ooquistes de *Cryptosporidium*) aunque se detectaron concentraciones de 4.62 ooquistes/g materia seca en la enmienda final destinada al terreno (fertilizante).

Summary

The aim of this study was to determine the main pathogen removal mechanisms that occur in the north western Spain wastewater treatment systems (waste stabilization ponds, constructed wetlands and activated sludge) and to evaluate the effects of different environmental factors on pathogen inactivation.

Laboratory experiments demonstrated that temperature, pH and ammonia significantly reduced the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. The exposure of *C. parvum* oocysts to 5 mg NH₃ l⁻¹ and 50 mg NH₃ l⁻¹ for 4 days reduced their viability from 81% to 41.5% and 14.8%, respectively, indicating that ammonia is a determining factor for pathogen inactivation. Interactions between all these factors increased the inactivation rates of oocysts demonstrating the synergist effect that can occur in these systems.

Field experiments in waste stabilization ponds demonstrated that sunlight was the determining factor for pathogen inactivation. The results indicated that exposure to sunlight increased the inactivation rate of *C. parvum* oocysts by about 40% after 4 days of exposure compared with dark conditions. The physicochemical environment of the facultative pond was the least conducive for oocyst survival in the WSP system compared with anaerobic and maturation ponds, probably as a consequence of the highest values of temperature, pH and dissolved oxygen registered in this pond system. In contrast, the settling experiment revealed that the anaerobic ponds were the most effective for parasite removal with the highest settling rates (28 - 680 cysts g⁻¹ dry weight), followed by the facultative pond (4.2 - 12.6 cysts g⁻¹ dry weight) and the maturation pond, where no cysts were detected. Nevertheless, all these values were lower than expected, probably due to the low retention time of the system, suggesting that processes other than sedimentation, such as sunlight and the physicochemical environment of the ponds, are the main pathogen removal mechanisms in this system.

With respect to pathogen removal efficiencies, the results reflected that all the treatment systems studied significantly reduced the concentration of faecal indicators and pathogens from wastewater, producing a final effluent consistent with WHO guidelines and recent revisions for the use of treated wastewater in agricultural irrigation. In the waste stabilization pond system, the anaerobic ponds achieved the highest parasite removal rates (3.63 - 5.04 and 3.89 - 5.45 log₁₀ (oo)cysts/eggs m⁻² day⁻¹ removal in winter and summer, respectively),

confirming that sedimentation was the main removal mechanism in these ponds. In the constructed wetlands system, the results demonstrated that the superficial flow wetland was the most efficient in removing pathogenic parasites when considering superficial removal rates (2.51 - 3.69 and 2.64 - 4.03 \log_{10} (oo)cysts/eggs $\text{m}^{-2} \text{day}^{-1}$ removal in winter and summer, respectively). Finally, in the swine slurry treatment system, the activated sludge process was the most effective treatment with removal efficiencies $>80\%$, the physicochemical process achieved removals of 40 - 44%, while screening was the least effective process for removing parasites achieving a rate of only 8 - 16%, and causing in some cases the detachment of pathogens previously attached to suspended solids and the further increase in unattached parasites. The heat-drying treatment used for sludge in slurry plants also yielded high removals ($>4 \log_{10}$ units for *Cryptosporidium* oocysts) although concentrations of 4.62 oocysts g^{-1} dry weight were detected in dry sludge intended for agricultural use.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN



CHAPTER 1. INTRODUCTION

El consumo de agua en nuestra sociedad ha experimentado un notable incremento y muchas podrían ser las causas: riego de zonas verdes urbanas, actividades recreativas, uso industrial, actividad doméstica, riego agrícola, etc. Todo ello está provocando un alarmante incremento del consumo de agua hasta el punto de que las reservas existentes están resultando claramente insuficientes. Esta disminución incontrolada y a su vez exagerada de los recursos hídricos unida a la escasez de agua provocada por el descenso de la pluviometría de los últimos años obliga a plantear la necesidad de utilizar alternativas que permitan mantener unos niveles de agua necesaria para el consumo humano así como para las diferentes actividades industriales, agrícolas y recreación donde se necesitan. Ante tal circunstancia, resulta un hecho lógico y evidente la necesidad de plantearse la reutilización del agua residual, al menos para algunos fines concretos, y así racionalizar las reservas de agua destinándola a actividades de primera necesidad, como podría ser el suministro de agua potable (OMS, 1989).

1.1. Reutilización del agua residual

La reutilización del agua residual constituye actualmente una actividad consolidada y cotidiana en muchas partes del mundo, especialmente en países donde la escasez de agua es un problema acuciante. Su objetivo principal es conseguir que los recursos hídricos convencionales se dediquen a cubrir aquellas demandas que exigen una calidad más elevada del agua. Actualmente, son numerosos los usos que se da a las aguas residuales tratadas, tales como riego agrícola, reutilización industrial, recarga de acuíferos, riego de zonas verdes, lucha contra incendios, uso sanitario, uso medio ambiental, acuicultura, etc.

Ahora bien, la reutilización del agua residual conlleva un claro “riesgo sanitario” (Shuval et al., 1986), concepto asociado a la probabilidad de infección de la población por agentes patógenos. Y es que en las aguas residuales cabe detectar gran número de patógenos de diferente etiología (Baker and Herson, 1999), además de materia orgánica y metales pesados, si bien conviene apuntar que la sola presencia de patógenos no implica necesariamente la infección de la población que entra en contacto con ellos. Precisamente, este hecho ha motivado que muchos países, principalmente en vías de desarrollo, estén reutilizando las aguas residuales sin ningún tipo de tratamiento previo, trayendo como consecuencia un problema sanitario debido a la presencia de agentes patógenos. Por esta razón, la ejecución de planes y proyectos para depurar estas aguas residuales debe estar dentro de las políticas

sociales y económicas de cada uno de estos países y de las organizaciones internacionales con el fin de disminuir el riesgo sanitario que se presenta por su utilización.

1.2. Patógenos y microorganismos indicadores

El agua residual puede contener una amplia variedad de microorganismos potencialmente peligrosos para la salud humana, denominados patógenos, los cuales se pueden clasificar en tres grandes grupos: las bacterias, los virus y los parásitos (protozoos y helmintos). Sin embargo, a la hora de valorar el riesgo que conlleva la presencia de estos patógenos en las aguas residuales es necesario tener en cuenta una serie de variables, como por ejemplo, la persistencia en el medio, es decir, la capacidad que tiene el patógeno de sobrevivir fuera del hospedador en condiciones adversas, la dosis infectante mínima, la cual varía para cada agente patógeno y por último, las diferentes vías de transmisión y el grado de inmunidad de la población humana frente a los distintos patógenos.

En la tabla 1.2.1 se pueden observar los principales agentes infecciosos que podemos encontrar en un agua residual doméstica y las enfermedades a que pueden dar lugar. La transmisión de una enfermedad puede efectuarse bien directamente a través del contacto, la ingestión o la inhalación del agente infeccioso presente en el agua residual, o bien indirectamente a través del contacto con objetos previamente contaminados por ese agua residual. Para que una persona desarrolle la enfermedad se deben dar una serie de circunstancias: 1) el agente infeccioso debe estar presente en la población que genera el agua residual y, por tanto, en sus aguas residuales, 2) los agentes infecciosos deben sobrevivir a todos los procesos de tratamiento a los que se somete el agua residual, 3) la persona ha de entrar en contacto con el afluente de forma directa o indirecta y 4) los agentes infecciosos deben estar presentes en número suficiente en el momento del contacto para llegar a producir la enfermedad.

Tabla 1.2.1. Principales microorganismos patógenos presentes en el agua residual

Microorganismo patógeno	Enfermedad causada
Bacterias	
<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre tifoidea
<i>Salmonella sp.</i>	Salmonelosis
<i>Shigellae sp.</i>	Disentería bacilar
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenteritis, diarreas
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
<i>Campylobacter jejuni</i>	Diarreas
<i>Legionella sp.</i>	Legionelosis
<i>Yersinia enterocolítica</i>	Diarreas, fiebre, vómitos
Virus	
<i>Enterovirus (Echovirus, Coxsackie A y B, Poliovirus)</i>	Gastroenteritis, meningitis, poliomielitis etc.
<i>Virus de la Hepatitis A (VHA)</i>	Hepatitis A
<i>Virus de la Hepatitis E (VHE)</i>	Hepatitis E
<i>Rotavirus</i>	Gastroenteritis
<i>Calciavirus</i>	Gastroenteritis
<i>Agente de Norwalk</i>	Gastroenteritis
Protozoos	
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cryptosporidiasis
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebiasis (disentería amebiana)
<i>Balantidium coli</i>	Balantidiasis
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Gastroenteritis, diarreas
Helmintos	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariasis
<i>Trichuris trichiura</i>	Trichuriasis
<i>Taenia solium</i>	Taeniasis
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Estrongiloidiasis (anguilulosis humana)
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Ancylostomiasis humana
<i>Fasciola hepática</i>	Distomatosis hepáticas
<i>Toxocara canis</i>	Toxocariasis
<i>Hymenolepis sp.</i>	Gastroenteritis

Las **bacterias** que se encuentran con mayor frecuencia en el agua son las bacterias entéricas que colonizan el tracto gastrointestinal del hombre y son eliminadas a través de la materia fecal. Dentro de estas bacterias nos podemos encontrar con especies del género *Samonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter*, etc. Sin embargo, en el agua residual también nos podemos encontrar con bacterias causantes de enfermedades no entéricas (*Legionella*, *Mycobacterium*, *Leptospira*, etc.). Existe otro tipo de bacterias, no patógenas (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Streptococcus*, etc.) que también pueden producir, en ocasiones, enfermedades de tipo “oportunistas”, sobre todo en aquellas personas cuyos mecanismos de defensa naturales, locales o generales, se hallan disminuidos (Ashbolt et al., 1995). Debido a que la detección y recuento de todas estas bacterias es lenta y laboriosa, se ha buscado un grupo alternativo de indicadores que sean de más rápida y fácil detección y que cumplan las siguientes condiciones:

- Ser contaminantes comunes del tracto gastrointestinal tanto del hombre como de los animales de sangre caliente.
- Estar presentes en el tracto gastrointestinal en grandes cantidades.
- Permanecer por más tiempo en el agua que las bacterias patógenas.
- Comportarse de igual manera que los patógenos en los sistemas de desinfección.

En la práctica, todos estos criterios no pueden darse en un solo organismo, aunque las bacterias coliformes cumplen muchos de ellos, especialmente *Escherichia coli*, que es el principal indicador de contaminación fecal de origen humano o animal (Grant et al., 1996). Existen otros microorganismos que satisfacen algunos de estos criterios, aunque sin alcanzar el grado de las bacterias coliformes, y que en determinadas circunstancias, pueden usarse también como indicadores suplementarios de contaminación fecal, como por ejemplo, estreptococos fecales, *Clostridium perfringens*, etc (Ferguson et al., 1996).

Los **virus** son parásitos intracelulares obligados que sólo son capaces de multiplicarse dentro de la célula huésped. Existen más de 140 virus patógenos que pueden ser transmitidos al hombre a través del agua (International Nomenclature of Diseases, 1983). En principio cualquier virus excretado y capaz de producir infección a través de su ingestión puede ser transmitido mediante un tratamiento inadecuado del agua residual (Gerba et al., 1996). Sin embargo, su detección es complicada ya que algunos virus son más resistentes a la desinfección que los organismos coliformes, por lo que los indicadores tradicionales de

contaminación bacteriana no evalúan de manera eficiente la presencia o ausencia de virus en el agua, proponiéndose otro tipo de indicadores, como por ejemplo, los bacteriófagos (colifagos somáticos, bacteriófagos F⁺-RNA y los fagos que infectan a la bacteria *Bacteroides fragilis*) (Hernández-Delgado and Toranzos, 1995).

Los parásitos que son patógenos para el hombre se clasifican en dos grupos: los protozoos y los helmintos. Los **protozoos** son organismos unicelulares con un complejo ciclo de vida que pasa por diferentes estadios y en ocasiones por diferentes hospedadores y/o hábitat. Casi todos presentan una forma de resistencia (quiste) en algún momento de su ciclo con una envoltura muy impermeable que les hace resistir las condiciones adversas como la desecación y el bajo pH. En el tracto digestivo de gran parte de la población humana coexisten varios protozoos que incluyen amebas, flagelados, coccidios y ciliados. Muchos de estos microorganismos son reconocidos como comensales: *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* y *Trichomonas hominis*, mientras que *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba hartmanni*, *Iodamoeba buetschlii*, *Dientamoeba fragilis*, *Balantidium coli*, *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium parvum* se consideran como protozoos patógenos. También hay otras especies de protozoos que pueden causar desórdenes gástricos tanto en individuos inmunodeprimidos como inmunocompetentes: *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli*, *Chilomastix mesnili*, *Blastocystis hominis*. La principal vía de transmisión de todos estos parásitos es a través de la ruta fecal-oral por contacto directo o indirecto con las formas de resistencia de estos parásitos, incluyendo la transmisión persona a persona, la zoonótica y sobre todo, la asociada al consumo de agua contaminada.

Dentro de los protozoos patógenos, los que presentan mayor importancia en cuanto a la calidad del agua son los pertenecientes al género *Giardia* y *Cryptosporidium*. Estos parásitos han sido responsables de numerosos brotes infecciosos transmitidos por el agua debido en parte a su baja dosis infectiva y a su elevada resistencia a los desinfectantes comúnmente utilizados en las plantas de tratamiento de agua residual (Cacció et al., 2005). De ahí que esta tesis se centre en estos dos microorganismos y el riesgo potencial que representan, sin olvidar que otros protozoos patógenos pueden en un momento determinado ser importantes causas de diarreas e incluso causar la muerte. Con este estudio se pretende llamar la atención de las instituciones, empresas y personas cuyas misiones y actividades tienen que ver con la gestión y el control de la calidad del agua como elemento fundamental para el desarrollo y la buena salud de la población.

El género *Cryptosporidium* se incluye en el Phylum *Apicomplexa*, clase *Sporozoasida*, subclase *Coccidiasina*, orden *Eucoccidiorida*, suborden *Eimeriorina* y familia *Cryptosporididae*. De las 15 especies de *Cryptosporidium* descritas, dos son las mayoritarias en humanos, *C. parvum* y *C. hominis*, aunque otras especies o genotipos pueden afectar minoritariamente, *C. felis*, *C. canis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. suis* y los genotipos de cervido y de mono. *Cryptosporidium* presenta varios estadios en su ciclo de vida, entre los cuales está el ooquiste, que es una etapa latente que resiste a las condiciones ambientales (forma ovoide con 4 esporozoitos sin esporocistos y tamaño entre 4.5 y 8 μm). Este parásito puede causar infecciones intestinales tanto en humanos como en animales y no requiere de huéspedes intermediarios (ciclo vital monoxeno). Se multiplica en el intestino delgado y origina serios problemas en los mecanismos de absorción, pues genera una diarrea aguda que es autolimitada en adultos sanos (Cryptosporidiosis). También se considera el parásito más importante en la industria del agua, junto con *Giardia* sp., porque se le relaciona como agente etiológico responsable de un número importante de epidemias en diversas partes del mundo (Karanis et al., 2006).

En la figura 1.2.1 se puede observar el ciclo biológico de *Cryptosporidium*. El parásito se contrae por vía fecal-oral. Los ooquistes esporulados, que contienen cuatro esporozoitos, son excretados por el huésped infectado a través de las heces y posiblemente otras rutas, tales como las secreciones respiratorias (1). La transmisión de *C. parvum* y *C. hominis* se produce principalmente por contacto con agua contaminada aunque en ocasiones, las fuentes de alimento también pueden servir como vehículos de transmisión (2). Después de la ingestión (y posiblemente de la inhalación) por un huésped adecuado (3), se produce la desenquistación (a). Los esporozoitos son liberados y parasitan las células epiteliales del tracto gastrointestinal u otros tejidos tales como el sistema respiratorio (b) y se diferencian en trofozoitos (c). El ataque al epitelio intestinal conduce a una mala absorción y en pacientes inmunocompetentes a diarrea acuosa, no sanguinolenta. En estas células, los parásitos realizan la reproducción asexual (esquizogonia o merogonia) según el esquema: trofozoito » meronte tipo I » merozoito » meronte tipo II » merozoito » gamonte indiferenciado (d,e,f) y a continuación la reproducción sexual (gametogonia) produciendo microgamontes masculinos (g) y macrogamontes femeninos (h). El macrogamonte es fertilizado por los microgametos, dando lugar a un cigoto (i) y formándose un ooquiste (j,k) que se desarrolla por esporulación en el huésped infectado. Se producen dos tipos diferentes de ooquistes, unos de paredes gruesas (j), que es usualmente excretado por el huésped, y otros de paredes finas, cuyo objeto primario es

la autoinfección (**k**). Los ooquistes son infecciosos después de la excreción, lo que permite una transmisión directa e inmediata por vía fecal-oral.

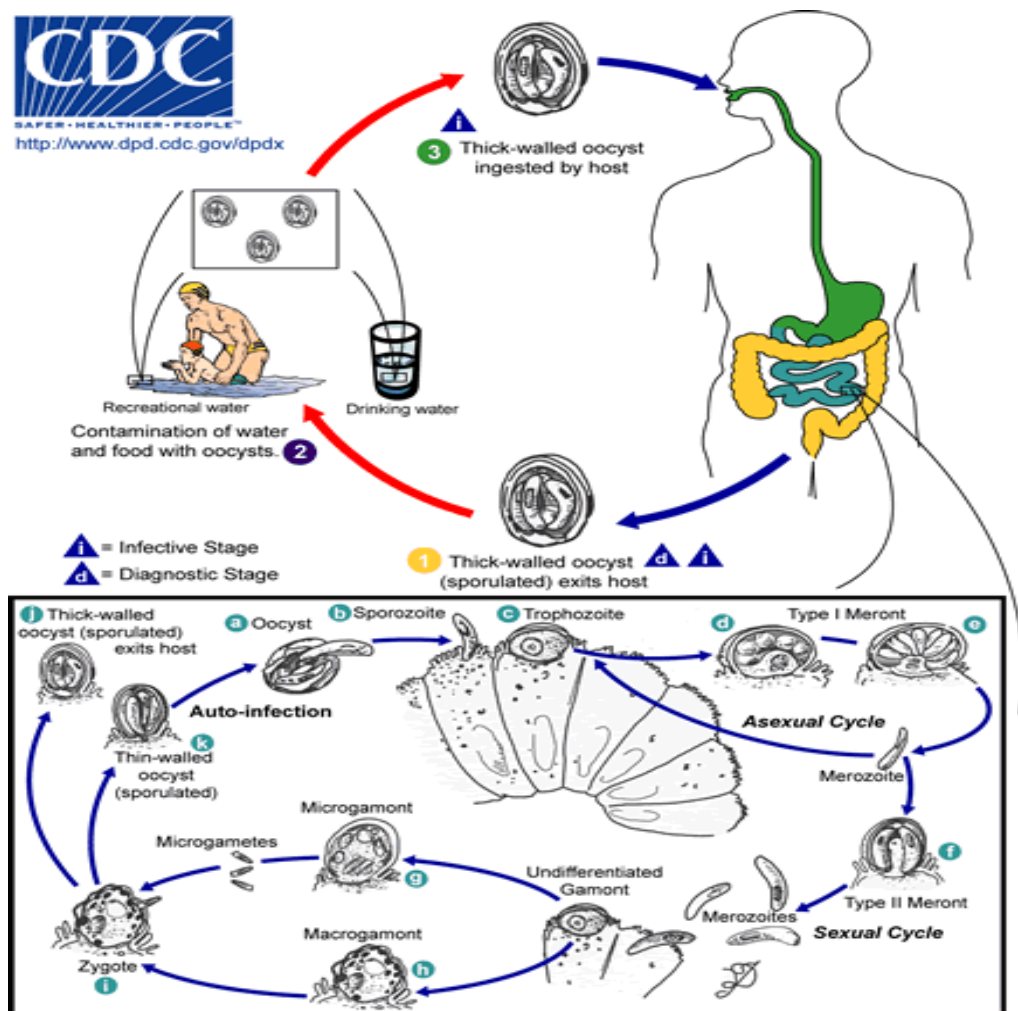


Figura 1.2.1. Ciclo vital de *Cryptosporidium parvum*

El género *Giardia* se incluye en el phylum *Sarcomastigophora*, subphylum *Mastigophora*, clase *Zoomastigophorea*, orden *Diplomonadida*, familia *Hexamitidae* que incluye un único género: *Giardia*. En este género se admiten diferentes especies, dependiendo de los criterios empleados por los diferentes autores. Siguiendo el criterio de especificidad del hospedador (Kulda and Nohynkova, 1996) se han descrito 41 especies diferentes de *Giardia*; sin embargo, de acuerdo con el morfológico de disposición de las estructuras microtubulares presentes en los cuerpos medios de los trofozoítos (Erlandsen et al., 1990), se admiten tres grupos de especies: *Giardia agilis*, *Giardia muris* y *Giardia intestinalis* (*duodenalis* o *lamblia*), estando

solamente este último grupo asociado con enfermedad en el hombre. A las cepas de procedencia exclusivamente humana se les denomina especies de *G. lamblia*, para diferenciarlas de aquéllas de origen animal, pero que pueden infectar al hombre, conocidas como especies de *G. intestinalis* o *G. duodenalis*. Este parásito presenta dos fases en su ciclo de vida, el trofozoíto (forma vegetativa) cuyo hábitat es el intestino delgado, siendo responsable de las manifestaciones clínicas, y el quiste (forma de resistencia e infecciosa) responsable de la transmisión del parásito, con un tamaño de 15 µm de longitud y 10 µm de ancho, una morfología ovalada y 4 núcleos que siempre aparecen dispuestos en alguno de los polos. El principal modo de transmisión de este patógeno es la ruta fecal-oral, y los niños y personas inmunosuprimidas son los grupos que presentan el riesgo más alto de contraer la infección. La patología originada por *G. lamblia* (giardiasis) se debe principalmente a los efectos que causan la acción mecánica de adherirse y fijarse al epitelio intestinal. Dichos efectos producen una alteración de las microvellosidades, que disminuyen su superficie de exposición al ser engrosadas, y esto conlleva la aparición de diversas alteraciones fisiológicas más o menos graves, según el mayor o menor deterioro del proceso de absorción, como dolores estomacales, diarrea, náuseas, fatiga, ardor epigástrico y otros síntomas compatibles con úlcera o gastritis.

En la figura 1.2.2 se representa el ciclo biológico de *Giardia lamblia*. Este parásito vive en forma de trofozoíto en la luz del intestino delgado (principalmente en el duodeno) adherido a las vellosidades intestinales por medio de los discos bilobulados. Se alimenta y se reproduce hasta que el contenido intestinal inicia el proceso de deshidratación, momento en el que comienza el enquistamiento del trofozoito: pierde los flagelos, adquiere una morfología ovalada y se rodea de una pared quística (5). Los quistes expulsados junto a las heces ya son infecciosos (1). Cuando dichos quistes son ingeridos por un nuevo hospedador (2), llegan al duodeno, donde se disuelve la pared quística (3), dando así lugar a un individuo tetranucleado que se divide inmediatamente en dos trofozoitos binucleados que se anclan al epitelio intestinal (4), cerrando así su ciclo vital.

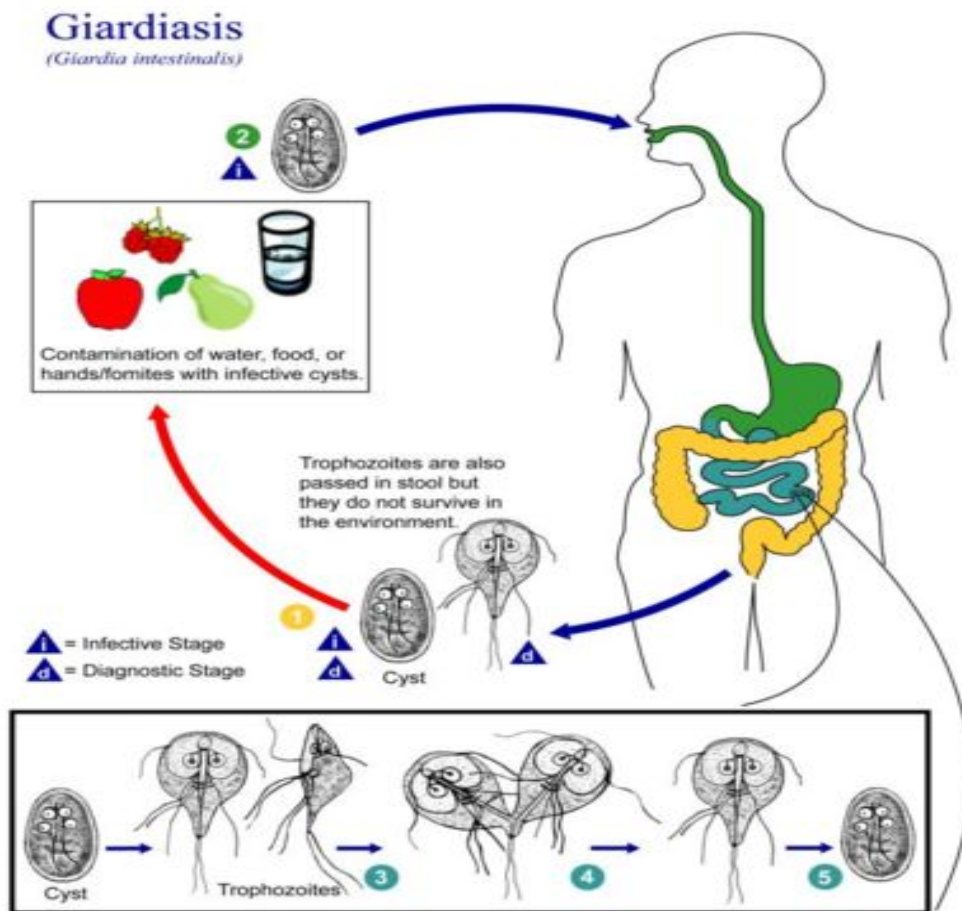


Figura 1.2.2. Ciclo vital de *Giardia lamblia*

Los **helmintos** son un grupo de parásitos de cuerpo alargado con simetría bilateral, órganos definidos y con un tamaño variable que oscila entre décimas de milímetro a varios metros. Se reproducen sexualmente formando huevos fértiles, que dan lugar a larvas de diversa morfología y tamaño variable, algunas de las cuales pueden presentar varios estadios muy diferenciados entre sí en uno (ciclo directo) o varios huéspedes intermediarios (ciclo indirecto) hasta transformarse en adultos. Las características epidemiológicas que hacen de los helmintos patógenos entéricos causantes de infección por contacto con agua contaminada son su alta persistencia en el medio ambiente, la mínima dosis infecciosa, la baja respuesta inmune y la capacidad de permanecer en el suelo o agua por largos periodos de tiempo (Khuroo, 1996). Las manifestaciones de la enfermedad por helmintos varían conforme el tipo y forma de desarrollo del parásito. Aunque la forma madura (adulto) de la mayor parte de los

helmintos no produce enfermedad grave, los huevos y larvas de algunos causan alteraciones que ponen en peligro la vida del enfermo.

Los helmintos pueden dividirse en dos grupos, los platelmintos (helmintos planos) y los nematelmintos (helmintos redondos). Los platelmintos son gusanos segmentados que presentan una morfología aplanada y órganos de fijación en forma de ventosas o ganchos. Entre los platelmintos existen dos grupos de interés en patología humana, los trematodos (*Fasciola hepática*, *Shistosoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, etc.) y los cestodos (*Taenia solium*, *T. saginata*, *Hymenolepis nana*, *H. diminuta*, etc.). Por el contrario, los nematelmintos (nemátodos) son gusanos de morfología cilíndrica, no segmentados y de tamaño muy variable (1 mm - 50 cm). Existen diversos nematelmintos parásitos del hombre como *Enterobius vermicularis*, *Acaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura*, *Trichinella spiralis*, diversas especies de filarias, etc.

Debido a las limitaciones en la detección de helmintos a nivel de laboratorio, se ha hecho necesaria la selección de un parásito que refleje de la mejor manera posible el comportamiento del resto de los helmintos, siendo *Ascaris lumbricoides* el más idóneo y el más utilizado en los últimos años, debido a que:

- Persiste en el medio ambiente durante muchos meses pero no se multiplica.
- El índice de parasitismo a escala mundial es muy alto.
- El riesgo de transmisión es alto debido a la elevada concentración de huevos que se puede encontrar.
- Se puede identificar fácilmente.

En la figura 1.2.3 se representa el ciclo biológico de *Ascaris lumbricoides*. Las hembras adultas miden de 20 a 40 cm y los machos de cuerpo fino y extremidad caudal incurvada son algo menores, 15 - 20 cm. Estas formas adultas de *Ascaris* se encuentran en el intestino delgado de los individuos infectados (1). Las hembras fertilizadas liberan desde el yeyuno, con las heces (2), los huevos fecundados (forma ovoide y cubierta rugosa externa de color pardo) que contienen el embrión (3). La ingestión de los huevos liberados al medio por una persona (4), permite que en el duodenal se libere la larva (5), que atraviesa la mucosa

intestinal y, a través de la circulación, llega al árbol bronquial (6) y es deglutida, volviendo al intestino donde alcanzan el estadio adulto (7).

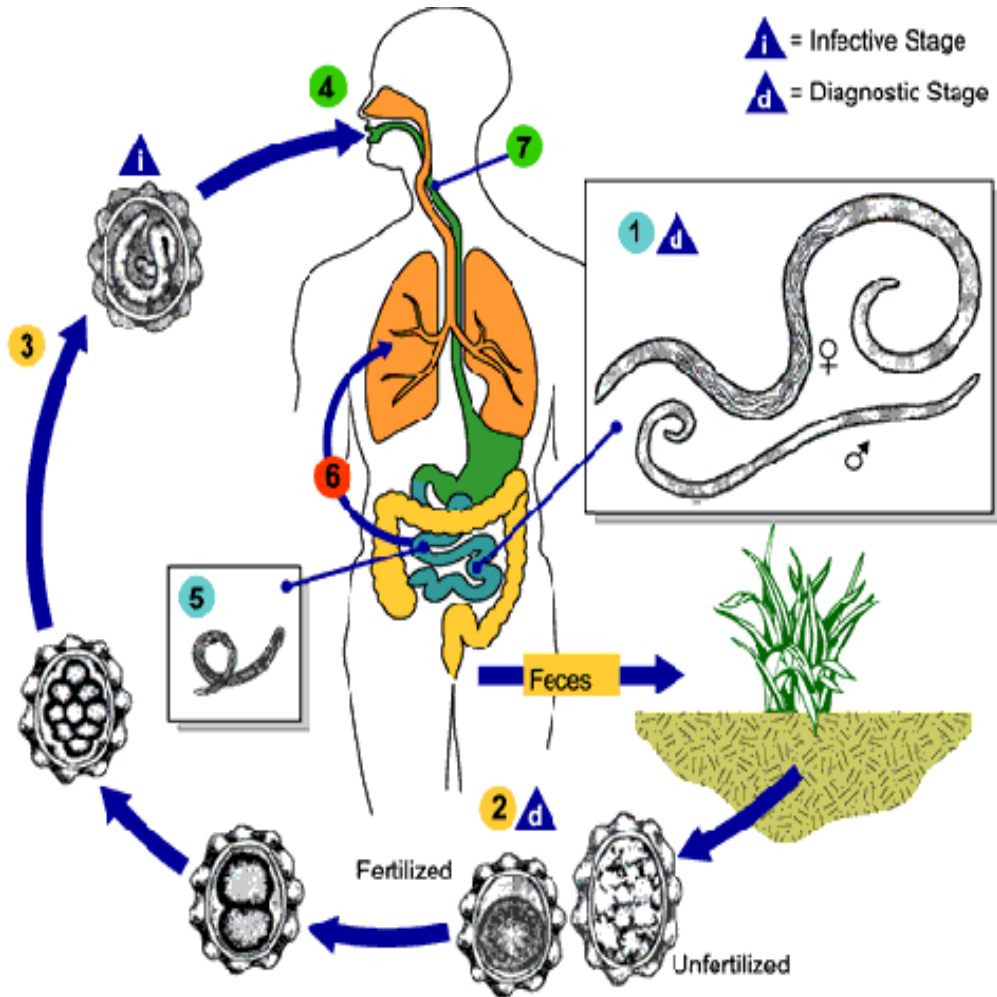


Figura 1.2.3. Ciclo vital de *Ascaris lumbricoides*

1.3. Sistemas de tratamiento de aguas residuales

Para analizar la situación de la depuración de aguas residuales, una vez conocidas las necesidades y los objetivos a cubrir, es necesario conocer los diferentes sistemas de tratamiento de aguas residuales que existen, con el fin de poder elegir en cada caso la alternativa que mejor se adapte a esas necesidades. Los diferentes sistemas usados en el tratamiento de las aguas residuales, se pueden clasificar según los siguientes criterios:

1. Según el método de eliminación

Los contaminantes del agua residual se pueden eliminar por i) métodos físicos, entre los que podemos destacar el desbaste de sólidos, desengrasado, desarenado, sedimentación, flotación, evaporación, desinfección y absorción, ii) métodos químicos, como la floculación, coagulación, neutralización, oxidación, reducción, intercambio iónico, absorción y desinfección (cloro, ozono) y iii) métodos biológicos, entre los que podemos incluir los fangos activados, lechos bacterianos, lechos de turba, lagunaje, humedales artificiales, biodiscos y sistemas de aplicación al suelo.

2. Según la intensidad del tratamiento

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales podemos clasificarlos en función de la intensidad del tratamiento aplicado: i) Pretratamiento y tratamiento primario (desbaste de sólidos, desarenador, desengrasador, decantación primaria, etc.), ii) Tratamiento secundario (fangos activados, lagunaje facultativo, lagunas aireadas, lechos de turba y biodiscos) y iii) Tratamiento terciario (procesos de nitrificación-desnitrificación, procesos de eliminación de fósforo, biodiscos, lechos bacterianos, lagunaje de maduración, lagunas de macrofitas, filtros verdes, sistemas de aplicación al suelo, ultrafiltración, ozonización y radiación ultravioleta).

3. Según el coste de la explotación

Se pueden clasificar en i) Tecnologías de bajo coste, métodos blandos o extensivos (lagunaje, lagunas de macrofitas, aplicación al suelo, filtros verdes, lechos de turba, lechos bacterianos y contactores biológicos rotativos) y ii) Métodos convencionales (procesos físico-químicos y fangos activados incluyendo el tratamiento convencional de fangos).

Una vez analizadas todas las opciones existentes para el tratamiento del agua residual, nos vamos a centrar en los sistemas analizados en esta tesis: lagunaje, humedales artificiales y fangos activados.

El **lagunaje** es un sistema de tratamiento de agua residual esencialmente biológico que consiste en el almacenamiento de las aguas residuales en una serie de lagunas construidas por el hombre durante un tiempo variable en función de la carga aplicada y de las condiciones climáticas, de forma que la materia orgánica resulte degradada mediante la actividad de los

microorganismos presentes en el medio acuático. El proceso de depuración tiene lugar gracias a reacciones biológicas, químicas y físicas, que ocurren en las lagunas y que tienden a estabilizar el agua residual (Mara, 2001). Los fenómenos que se producen tienen relación con la sedimentación, oxidación, fotosíntesis, digestión, aireación y evaporación (Maynard et al., 1999). En función de los tipos de microorganismos, que dependen, a su vez, de la presencia de oxígeno disuelto, las lagunas, también conocidas como estanques de estabilización, se clasifican en anaerobias, facultativas y aerobias o de maduración (Figura 1.3.1).

Una laguna anaeróbica es un reactor biológico natural que funciona con ausencia de oxígeno disuelto y de otros compuestos inorgánicos que pueden trabajar como aceptor de electrones (nitratos o sulfatos). Se denominan así puesto que por su diseño (profundidad generalmente superior a los 2 metros) el contenido en oxígeno disuelto en el cuerpo de la misma es prácticamente nulo. En estas lagunas se produce la retención de la mayor parte de los sólidos en suspensión que arrastra el agua, que van al fondo, junto con la materia orgánica particulada, que sufrirá un proceso de fermentación anaerobia por parte de bacterias anaeróbicas. En estos procesos, en los cuales se puede llegar hasta la formación de metano, participan cuatro grupos microbianos: las bacterias hidrolíticas (*Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Peptococcus*, etc.), las bacterias acidogénicas (*Acetovibrio*, *Butyrivibrio*, *Lactobacillus*, etc.), bacterias acetogénicas (*Acetogenicum*, *Syntrophobacter*, *Acetobacterium*, etc.) y las bacterias metanogénicas (*Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanospirillum*), todas ellas complementarias e imprescindibles para el proceso. Este proceso se divide en dos grandes etapas. En la primera, un grupo de bacterias facultativas formadoras de ácidos descomponen las cadenas complejas de la materia orgánica en ácidos grasos, aldehídos y alcoholes. En la segunda etapa, otro grupo de bacterias estrictamente anaerobias, formadoras de metano, transforman los productos intermedios en gas metano, amoníaco y anhídrido carbónico e hidrógeno. El proceso anaerobio, lo mismo que el aerobio transforma carbono, nitrógeno y fósforo en protoplasma celular.

En las lagunas facultativas se distingue una zona aerobia próxima a la superficie, una zona anaerobia en el fondo, donde se dan procesos de fermentación, y una zona intermedia que contiene bacterias facultativas y es la que da el nombre a las lagunas. El proceso aerobio de la materia orgánica hace que el carbono se utilice como fuente de energía para los microorganismos que al ser oxidado produce anhídrido carbónico. Los microorganismos que

participan son bacterias fundamentalmente, pero también hay hongos y protozoos. Estos microorganismos utilizan el carbono restante, así como el fósforo y el nitrógeno para formar nuevas células. El oxígeno necesario para la estabilización de la materia orgánica proviene de la re-aireación que se produce en la superficie y de la fotosíntesis que se lleva a cabo por medio de las algas presentes en la zona aerobia. En esta zona, las bacterias, utilizan el oxígeno producido por las algas y desprenden CO_2 que, a su vez, es utilizado por éstas, cerrando así el ciclo.

En las lagunas de maduración, las bacterias aeróbicas descomponen la materia orgánica y utilizan como aceptor de electrones al oxígeno generado por la actividad fotosintética de las microalgas. Al degradarse la materia orgánica se produce anhídrido carbónico y otros productos que son utilizados por las algas, creando un ciclo vital entre las algas y las bacterias, clave para la depuración del agua residual. Estas lagunas aeróbicas, también llamadas lagunas de maduración, son completamente aerobias gracias a la escasa profundidad con la que son diseñadas (entre 0.3 y 1 metro) lo cual permite la difusión del oxígeno atmosférico en todo el cuerpo acuático, además del aporte que supone la presencia de algas. Sólo una pequeña parte del oxígeno disuelto pasa del aire al agua mediante los mecanismos naturales de mezcla en superficie.

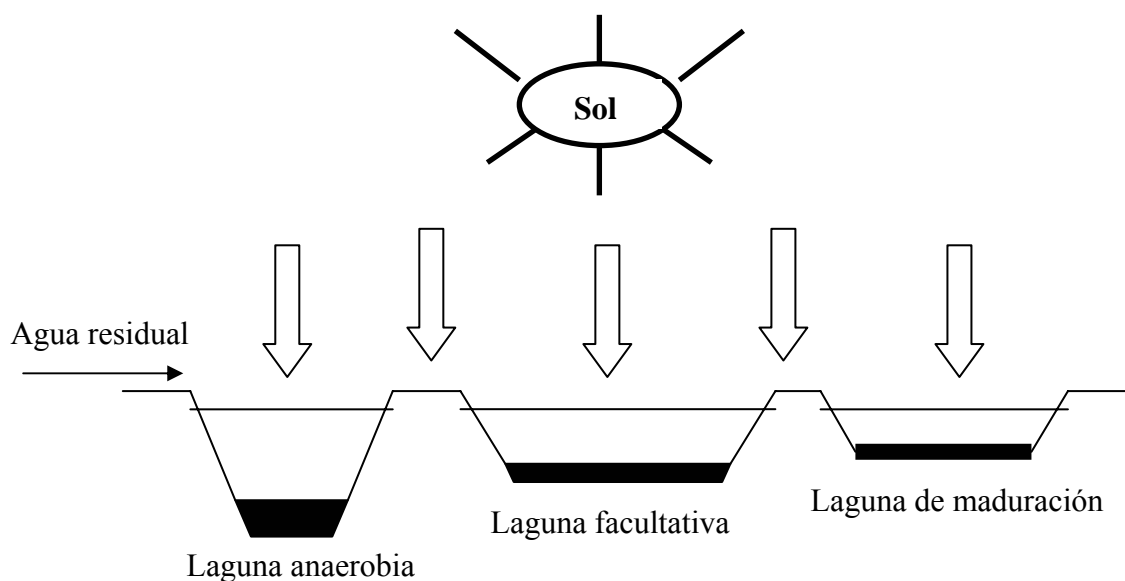


Figura 1.3.1. Esquema de un sistema de lagunaje

Los **humedales artificiales** son sistemas pasivos de depuración constituidos por lagunas o canales poco profundos (normalmente de menos de 1 m) plantados con plantas propias de zonas húmedas (macrófitos acuáticos) y en los que los procesos de descontaminación son ejecutados simultáneamente por componentes físicos, químicos y biológicos. Como se ha demostrado (Kadlec & Knight, 1996; Vymazal et al., 1998), la función básica de las plantas es generar una superficie adecuada donde se asiente una biopelícula bacteriana que se encargará de la degradación de la materia orgánica. Las plantas que se emplean en estos sistemas presentan una serie de adaptaciones que les permiten vivir pese a tener sus raíces completamente inundadas y en un ambiente anaerobio, ya que son capaces de generar un microambiente aerobio alrededor de las raíces que favorece la captación de nutrientes y evita la toxicidad de los metales pesados que se encuentren en disolución (Brix, 1994).

Los humedales artificiales se han clasificado tradicionalmente en dos tipologías atendiendo a si la circulación del agua es de tipo subterránea o superficial (Figura 1.3.2). En los humedales de flujo superficial (*surface flow constructed wetlands* o *free water surface constructed wetlands*) el agua está expuesta directamente a la atmósfera y circula preferentemente a través de los tallos de los macrófitos. En realidad este tipo de humedales se pueden entender como una modificación del lagunaje convencional con menor profundidad (no más de 0.4 m) y con plantas. En los humedales de flujo subsuperficial (*subsurface flow constructed wetlands*) la circulación del agua es subterránea a través de un medio granular (con una profundidad de la lámina de agua de alrededor de 0.6 m) y en contacto con los rizomas y raíces de los macrófitos. Este tipo de humedales se podrían entender como una modificación de los sistemas clásicos de infiltración en el terreno. Así pues los humedales de flujo subsuperficial forman parte de los sistemas naturales de depuración basados en la acción del terreno (como los filtros verdes y los sistemas de infiltración-percolación), mientras que los de flujo superficial pertenecen al grupo de los basados en la acción de mecanismos que suceden en el agua (como los lagunajes).

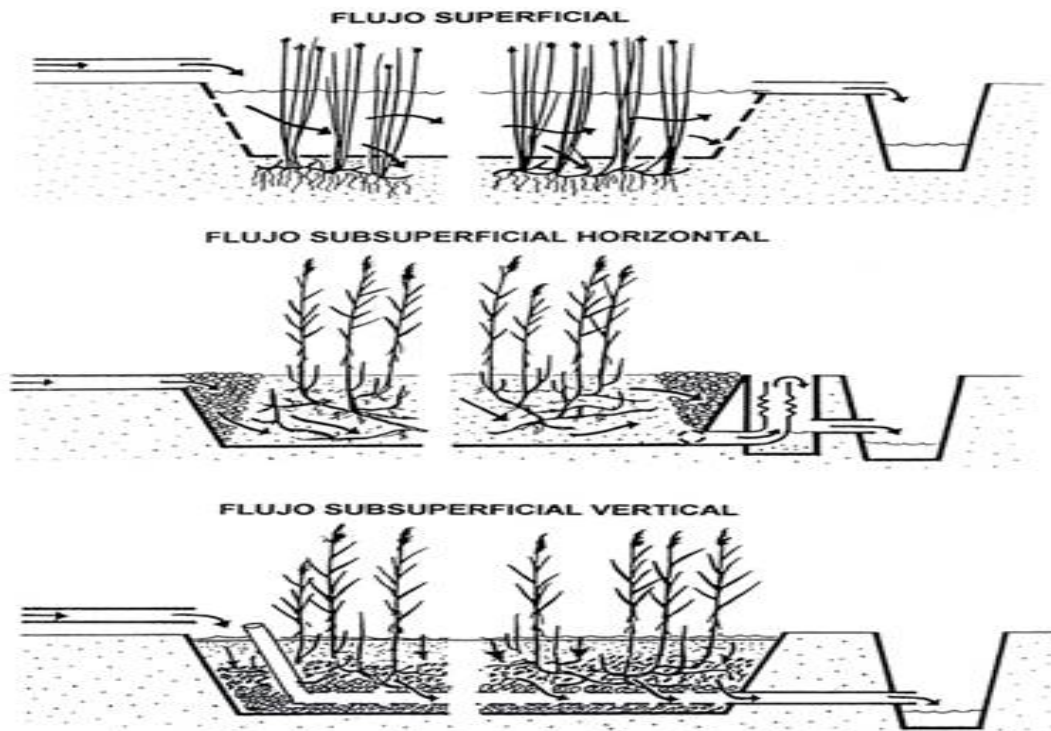


Figura 1.3.2. Esquema de humedales artificiales de flujo superficial y subsuperficial con flujo horizontal y con flujo vertical.

Los **fangos activados** son sistemas biológicos de tratamiento de agua residual que a diferencia de los sistemas de bajo coste necesitan un aporte de energía externa para su funcionamiento. El sistema consiste en una aceleración del proceso de degradación oxidativa de la materia orgánica que contiene el agua residual bruta mediante la acción de una serie de microorganismos aerobios (bacterias y protozoos). El metabolismo de estos microorganismos utiliza la materia orgánica como alimento, oxidándola y, por tanto, estabilizándola mediante un aporte exterior de oxígeno, resultando anhídrido carbónico, fangos estabilizados y agua depurada. La agitación evita sedimentos y homogeniza la mezcla de los flóculos bacterianos y el agua residual (licor de mezcla). Después de un tiempo de contacto suficiente, 5-10 horas, el licor de mezcla se envía a un decantador secundario (clarificador) destinado a separar el agua depurada de los fangos. Una parte de la masa celular decantada es recirculada a la entrada del reactor biológico para mantener la concentración de células deseada, mientras que otra fracción, correspondiente al exceso de fangos formado por el crecimiento biológico, es retirada enviándose a la línea de tratamiento de fangos (Figura 1.3.3).

La eliminación biológica de nutrientes (nitrógeno y fósforo) se consigue mediante la incorporación de zonas con o sin aireación que generan una secuencia de zonas anaerobias, anóxicas y aerobias. La eliminación biológica del nitrógeno se consigue por dos procesos sucesivos: nitrificación y desnitrificación. En la nitrificación es necesario aportar oxígeno para que el amonio presente en el agua se transforme en nitrito y nitrato. En el segundo proceso, desarrollado en condiciones anóxicas, este nitrato contenido en el agua es transformado a nitrógeno atmosférico mediante la acción bacteriana. El agua residual afluyente debe contener suficiente carbono orgánico para permitir la desnitrificación y establecer una población de bacterias capaz de realizar la eliminación biológica del fósforo (Barker and Dold, 1997; Maurer and Gujer, 1998).

En general, las bacterias que intervienen en el proceso de fangos activados incluyen los géneros *Pseudomonas*, *Zooglea*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Bdellovibrio*, *Mycobacterium*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Microthrix*, etc. Sin embargo, en estos sistemas intervienen otros microorganismos, como protozoos y rotíferos, que eliminan las bacterias dispersas que no crecen formando parte del flóculo, siendo por tanto fundamentales para obtener un efluente libre de bacterias dispersas y sólidos en suspensión.

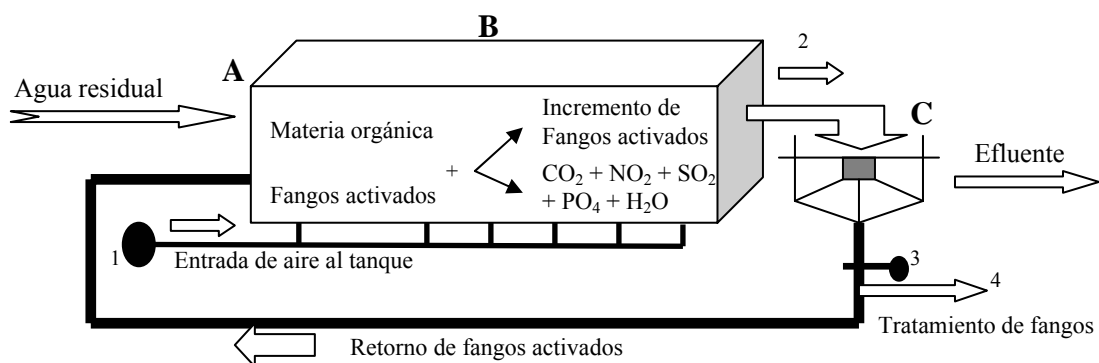


Figura 1.3.3. Esquema de una depuradora de agua residual con sistema de fangos activados. A: Entrada de agua residual; B: Tanque de aireación (Reactor biológico); C: Decantador secundario; 1. Inyector de aire; 2. Salida de agua y biosólidos al decantador secundario; 3. Regulador del retorno y eliminación de fangos; 4. Salida del exceso de fangos hacia su tratamiento.

1.4. Mecanismos de eliminación de patógenos en plantas depuradoras

Una vez conocido el riesgo sanitario que puede generar la reutilización del agua residual y teniendo en cuenta los diferentes tratamientos que actualmente existen en la comunidad de Castilla y León, es necesario analizar los principales mecanismos de eliminación de patógenos que se dan en cada uno de estos sistemas.

En los últimos años, son muchos los estudios que se han llevado a cabo con el fin de evaluar el efecto biocida de determinados desinfectantes comúnmente utilizados en los sistemas convencionales de tratamiento de agua residual, como el ozono, el cloro, el dióxido de cloro, las cloraminas, la luz UV, etc. (Korich et al., 1990; Johnson et al., 2005). Otro aspecto ampliamente estudiado en estos sistemas es la eliminación de patógenos mediante tratamientos primarios (tamices, decantadores primarios, floculación-coagulación, etc) y/o secundarios, como por ejemplo, los fangos activados (Chauret et al., 1999; Robertson et al., 2000; Sojka and Entry, 2000; Jiménez et al., 2001). Sin embargo, se ha hecho muy poco hincapié en la capacidad que tienen estos sistemas para tratar residuos ganaderos, los cuales se caracterizan por presentar concentraciones patogénicas muy elevadas y por ser ambientes idóneos para que determinados microorganismos sobrevivan durante largos periodos de tiempo pudiendo ocasionar un grave problema para la salud pública (Côté et al., 2006a,b; Venglovsky et al., 2006). Este hecho ha provocado que resulten necesarios estudios, como el realizado en esta tesis, con el objetivo de conocer mejor los mecanismos de eliminación de patógenos que tienen lugar en estos sistemas cuando reciben elevadas cargas parasitarias.

Los sistemas naturales de tratamiento de agua residual son otro tipo de tratamientos ampliamente estudiados en relación a su eficacia en la eliminación de patógenos, tanto de parásitos intestinales como de microorganismos indicadores (Grimason et al., 1993, 1996; Bouhoum et al., 2000; Perkins and Hunter, 2000; Karpisak et al., 2001; Vymazal et al., 2002; Hench et al., 2003; Stott et al., 2003). Sin embargo, una de las mayores limitaciones en este campo de investigación es la ausencia de estudios que comparen las tasas de eliminación de ambos grupos y la relación existente entre estos microorganismos. En los sistemas naturales, la eliminación de patógenos se alcanza en buena medida gracias a una serie de factores físicos, químicos y/o biológicos que actúan sobre ellos, como por ejemplo la radiación solar (Davies-Colley et al., 1997, 1999), la sedimentación (Amahmid et al., 2002; Nelson et al., 2004), la temperatura (Rossi et al. 1990; Fayer et al. 1991, 1998; Fayer 1994; Fayer and Nerad

1996; Jenkins et al. 1997), el pH (Robertson et al. 1992; Araki et al. 2001), el amoníaco (Ransome et al. 1993; Ruxton 1995; Fayer et al. 1996; Jenkins et al. 1998), el oxígeno disuelto (Curtis et al., 1992a), la filtración y la adsorción (Williams et al., 1995; Gerba et al., 1999), la depredación (Stott et al., 2003), etc. El problema de la mayoría de estos estudios es que fueron realizados con el objetivo de conocer el efecto individual de cada uno de estos factores sin tener en cuenta el efecto sinérgico que tiene lugar en estos sistemas. Otro inconveniente de estos trabajos fue la ausencia de datos reales de campo ya que la mayoría fueron realizados en laboratorio y con condiciones ambientales muy diferentes a las que realmente nos podemos encontrar en los sistemas de tratamiento de agua residual del noroeste de España. Por todo esto, resulta necesario un estudio que solvete las principales lagunas anteriormente citadas y que pueda servir de ayuda a la hora de la construcción y gestión de nuevas depuradoras.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS



CHAPTER 2. OBJECTIVES

El objetivo principal de esta tesis es determinar los principales mecanismos de eliminación de patógenos e indicadores fecales en tres sistemas de tratamiento de agua residual situados en el noroeste de España, dos de ellos de bajo coste que tratan agua residual doméstica (lagunas de estabilización y humedales artificiales) y otro convencional que trata purín de cerdo (fangos activados).

De manera más concreta, los objetivos específicos son:

1. Analizar, mediante experimentos en laboratorio, los efectos individuales y combinados de varios factores ambientales (pH, temperatura, amoníaco y tiempo de exposición) sobre la viabilidad de ooquistes de *Cryptosporidium parvum*.
2. Evaluar la inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en un sistema de lagunaje y determinar los efectos de la luz solar, profundidad y tipo de laguna sobre la viabilidad de los ooquistes.
3. Valorar la importancia cuantitativa de la sedimentación en la eliminación de parásitos en el sistema de lagunaje.
4. Analizar la eficacia de eliminación de patógenos e indicadores fecales de los diferentes sistemas de tratamiento de agua residual analizados en esta tesis y de cada una de sus etapas.
5. Comparar las tasas de eliminación de patógenos e indicadores fecales en los tres sistemas estudiados y evaluar las relaciones existentes entre estos dos grupos a lo largo de los sistemas.
6. Analizar la presencia de parásitos intestinales en el purín de cerdo de varias granjas de la comunidad autónoma de Castilla y León.
7. Determinar la calidad microbiológica del agua residual tratada y el riesgo sanitario que conlleva su reutilización en agricultura.

**CAPÍTULO 3. DESCRIPCIÓN DE LAS
DEPURADORAS ESTUDIADAS**



**CHAPTER 3. DESCRIPTION OF THE
WASTEWATER TREATMENT SYSTEMS STUDIED**

El estudio fue realizado en tres sistemas diferentes de tratamiento de agua residual situados en la comunidad autónoma de Castilla y León (Figura 3.1): dos sistemas naturales, lagunas de estabilización (Fresno de la Vega) y humedales artificiales (Cubillas de los Oteros) que tratan agua residual doméstica de pequeñas poblaciones rurales y un sistema convencional de fangos activados que trata purín de cerdo (Hornillos de Eresma y Turégano).

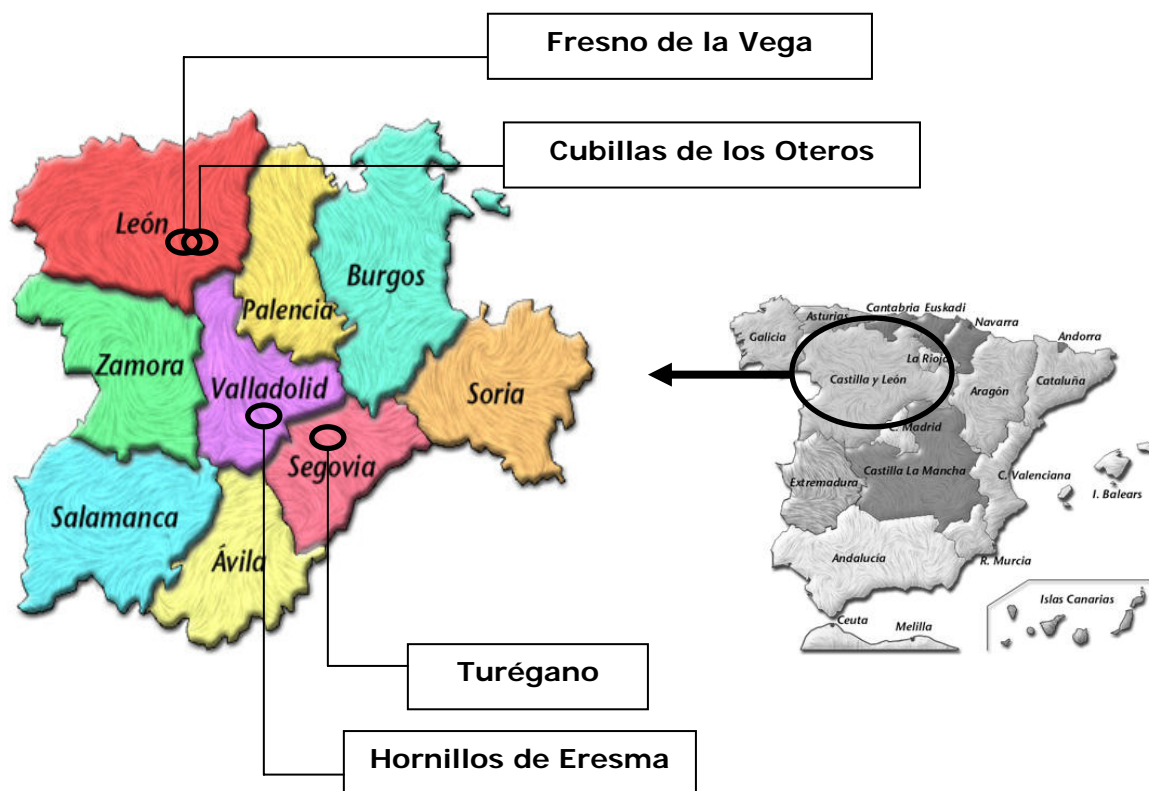


Figura 3.1. Situación geográfica de las depuradoras

3.1. Lagunas de estabilización

Se trata de un sistema de 12000 m² situado en Fresno de la Vega, una pequeña localidad situada al sur de la provincia de León que durante el periodo invernal no excede los 1300 habitantes equivalentes llegando a alcanzar los 1700 habitantes equivalentes en pleno verano y cuya actividad predominante es la agrícola aunque también existen pequeñas explotaciones familiares de ganado bovino y ovino. El sistema consta de 2 lagunas anaerobias en paralelo de 335 m² cada una y 3.75 metros de profundidad, una laguna facultativa de 8481 m² y 2 metros de profundidad y una laguna de maduración de 3169 m² y 1.5 metros de profundidad (Figura

3.1.1). El caudal medio de entrada al sistema durante el periodo de estudio fue de $3200 \text{ m}^3/\text{d}$ con una carga orgánica media de $7.8 \text{ g DBO}_5/\text{m}^2 \text{ día}$ y un tiempo de retención hidráulico (TRH) aproximado de 6 días.

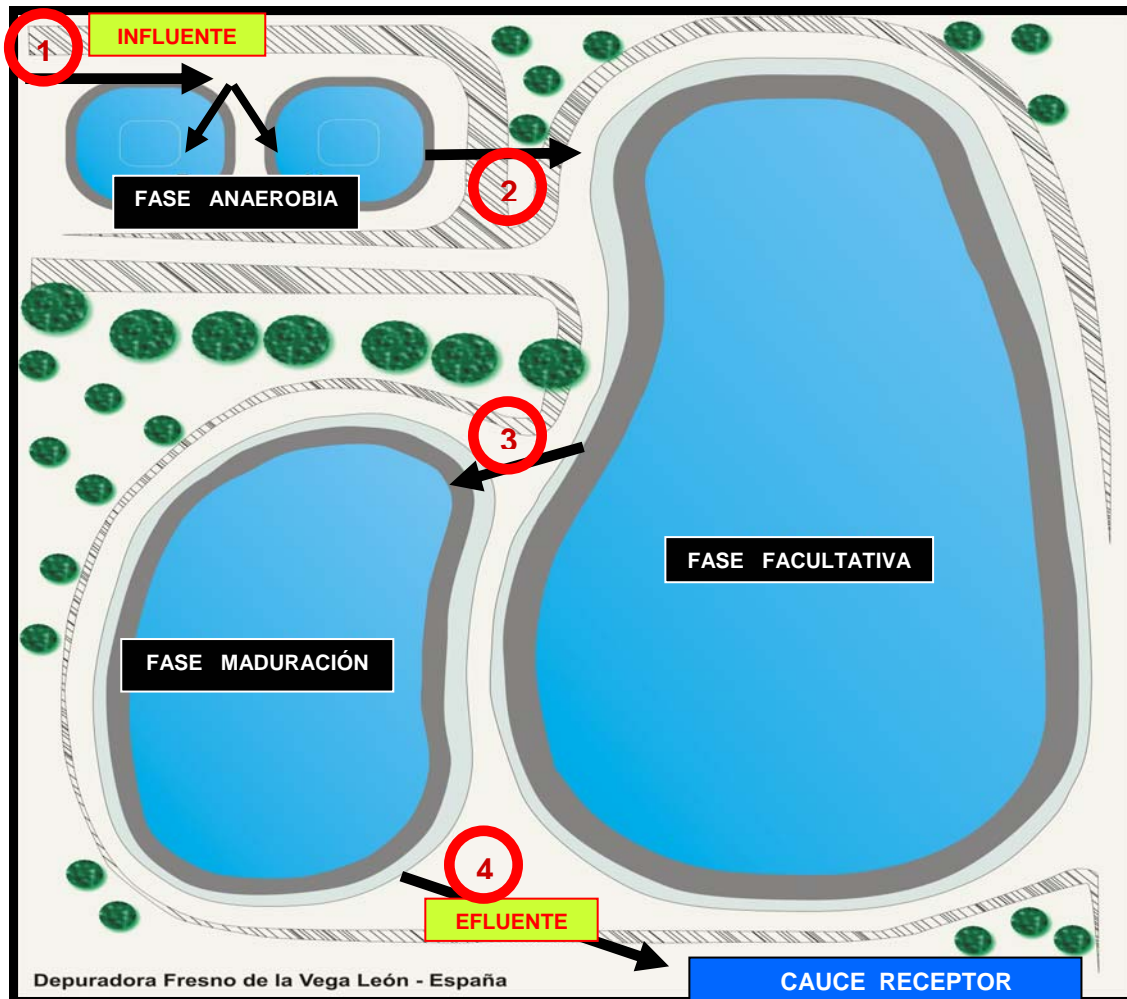


Figura 3.1.1. Esquema de la planta de tratamiento de Fresno de la Vega. Puntos de muestreo: (1) Agua residual bruta, (2) Efluente de las lagunas anaerobias, (3) Efluente de la laguna facultativa y (4) Efluente de la laguna de maduración (efluente final).



Figura 3.1.2. Laguna anaerobia



Figura 3.1.3. Laguna facultativa



Figura 3.1.4. Laguna de maduración

3.2. Humedales artificiales

Se trata de un sistema combinado de humedales artificiales situado en Cubillas de los Oteros, una pequeña localidad situada al sur de la provincia de León de aproximadamente 700 habitantes equivalentes dedicada principalmente a la actividad agrícola y ganadera. El sistema consta de una laguna facultativa de 1073 m², 1.6 m de profundidad y 76 días de TRH seguido por un humedal de flujo superficial plantado con *Typha latifolia* (44 m², 30 cm de grava silícea de 6-8 mm, 40 cm de agua y 1.2 días de TRH) y por un humedal de flujo subsuperficial plantado con *Salix atrocinerea* (585 m², 55 cm de grava silícea de 6-8 mm y 5.7 días de TRH) (Figura 3.2.1). El caudal medio de entrada al sistema durante el periodo de estudio (Diciembre 2004 - Septiembre 2005) fue de 20 m³/día con una carga orgánica de 1.17 g DBO₅/m²día.

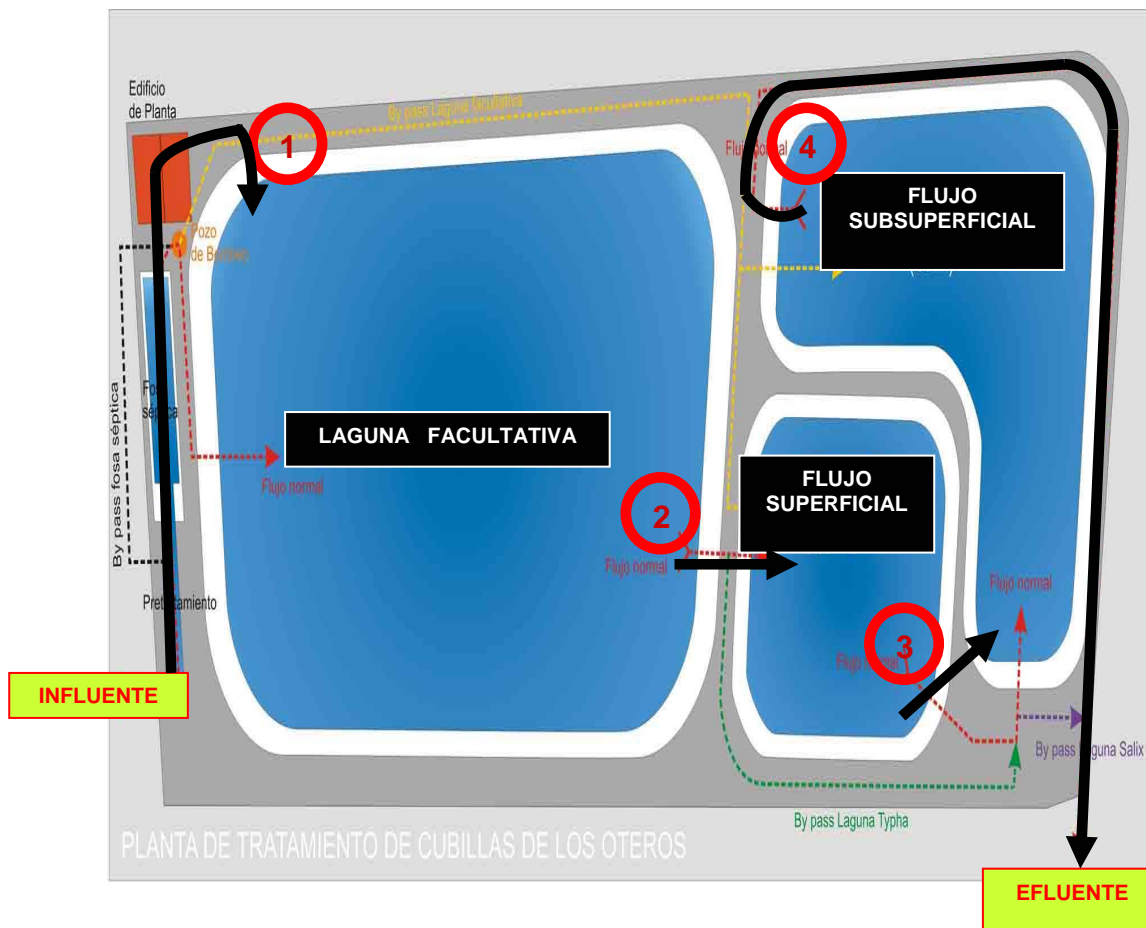


Figura 3.2.1. Esquema de la planta de tratamiento de Cubillas de los Oteros. Puntos de muestreo: (1) Agua residual bruta, (2) Efluente de la laguna facultativa, (3) Efluente del humedal de flujo superficial y (4) Efluente del humedal de flujo subsuperficial (efluente final).



Figura 3.2.2. Laguna facultativa



Figura 3.2.3. Humedal de flujo superficial



Figura 3.2.4. Humedal de flujo subsuperficial

3.3. Fangos activados

Este sistema fue simultáneamente analizado en dos plantas similares de tratamiento de purín de cerdo situadas en Hornillos de Eresma (Valladolid) y Turégano (Segovia). Estas plantas pertenecen al grupo GUASCOR y generan electricidad a partir de gas natural empleando el calor asociado para el tratamiento de los purines.

Los sistemas tratan aproximadamente 250-300 m³/día de purín de cerdo mediante un tratamiento por fangos activados (Figura 3.3.1). El purín bruto es transportado hasta un tanque de homogeneización-oxigenación de 1500 m³ y dos días de TRH donde se agita y oxigena continuamente para conseguir homogeneizar el purín. Desde aquí, pasa a un tratamiento primario de separación de sólidos en tres etapas: una separación de gruesos mediante tamices rotatorios de 0.5 mm de diámetro de poro, una decantación primaria y posteriormente una flotación. En esta última etapa se adiciona coagulante y floculante, y tras pasar por un tanque de presurización, se obtiene un lodo (4-6 % de materia seca) en la parte superior de la celda. Posteriormente, la fracción líquida obtenida en las etapas anteriores es tratada mediante un sistema biológico de fangos activados (nitrificación-desnitrificación). Esta fracción líquida depurada pasa por un decantador secundario y se almacena en un depósito de clarificado antes de someterse a una evaporación en unos equipos denominados DDs (digestores-deshidratadores) de configuración poliédrica, aprovechando el calor contenido en los circuitos de refrigeración de los motores Guascor generadores de electricidad a partir de la combustión de gas natural.

Las fracciones sólidas recolectadas en las distintas etapas del proceso se recogen en una mezcladora y son conducidas a un Trómel para su secado térmico a temperaturas superiores a 300 °C. En el secadero, las fracciones sólidas húmedas se ponen en contacto directo con los gases de escape procedentes de los 16 motores anteriormente citados. El producto seco se separa de la corriente gaseosa en un ciclón, obteniéndose una enmienda orgánica de elevada capacidad fertilizante que será utilizada en agricultura.

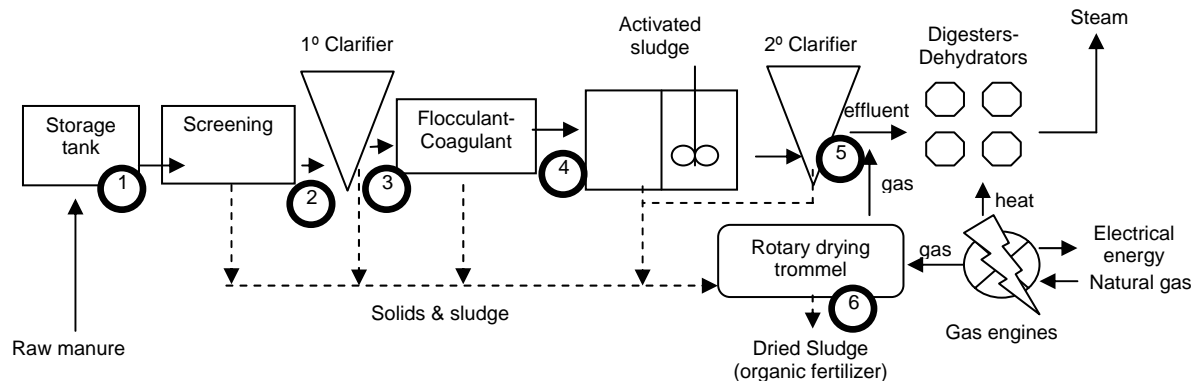


Figura 3.3.1. Esquema de las plantas de tratamiento de purín. Puntos de muestreo: (1) Purín bruto, (2) Efluente del tamizado, (3) Efluente del decantador primario, (4) Efluente del tratamiento de floculación/coagulación, (5) Efluente del decantador secundario y (6) Fango seco.



Figura 3.3.2. Planta de Hornillos de Eresma

CAPÍTULO 4. RESULTADOS



CHAPTER 4. RESULTS

En este capítulo se exponen los principales resultados obtenidos durante la realización de esta tesis, tanto los alcanzados en los sistemas intensivos de tratamiento de purines como los conseguidos en los sistemas naturales de tratamiento, incluidos los experimentos en laboratorio.

4.1. Efecto del pH, temperatura y amoníaco sobre la inactivación de ooquistes de *C. parvum*

El contenido de este capítulo ha sido publicado en Journal of Applied Microbiology (Reinoso, R., Bécares, E., and Smith, H.V. 2007. Effect of various environmental factors on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. J. Appl. Microbiol. 104, 980-986).

El objetivo principal de este estudio fue determinar, mediante experimentos en laboratorio, los efectos individuales y combinados del pH, temperatura, amoníaco y tiempo de exposición sobre la viabilidad de ooquistes de *C. parvum*. El estudio fue llevado a cabo en Glasgow, concretamente en el Scottish Parasite Diagnostic Laboratory (SPDL) utilizando ooquistes purificados procedentes del Moredun Scientific Ltd., Edinburgh, U.K.

El experimento se dividió en dos partes, por una parte se sometió a los ooquistes a diferentes temperaturas (4°C, 18°C y 25°C) y diferentes pHs (7 y 10) durante 1, 2, 4 y 6 días y su viabilidad fue comparada con controles no tratados. En la segunda parte, los ooquistes fueron expuestos a diferentes concentraciones de amoníaco (0 mg l⁻¹, 5 mg l⁻¹ y 50 mg l⁻¹) durante 1, 2 y 4 días a pH 7 y 25°C. Nuestro objetivo fue simular las condiciones ambientales normalmente encontradas en los sistemas naturales de tratamiento de agua residual del noroeste de España. La viabilidad de los ooquistes se determinó mediante un ensayo con tintes fluorogénicos (Campbell et al., 1992; 1993) basado en la morfología y en la inclusión/exclusión de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) y yoduro de propidio (PI).

Todos los factores analizados en este estudio (temperatura, pH, amoníaco y tiempo de exposición) y su interacción tuvieron efectos significativos ($P < 0.005$) sobre la viabilidad de ooquistes de *C. parvum*. Sin embargo, nuestros datos también demostraron que bajo las condiciones más agresivas (25 °C, pH 10 y tiempo de exposición de 6 días), el 51% de los ooquistes sobrevive. La temperatura y el pH causaron que la viabilidad de los ooquistes

decreciera gradualmente con el tiempo (Figura 4.1.1), siendo significativamente más baja ($P < 0.05$) (6 días a 4°C, a partir de 4 días a 18°C, a partir de 4 días a pH 7 y 25°C, a partir de 2 días a pH 10 y 25°C) que sus respectivos controles no tratados. La temperatura fue más influyente que el pH en la inactivación de ooquistes de *C. parvum*. Diferencias significativas fueron observadas ($P < 0.05$) cuando los ooquistes fueron suspendidos a pH 7 y pH 10 a 18°C y 25°C después de 6 días de exposición, pero no a 4°C. Del mismo modo, diferencias significativas ($P < 0.05$) fueron observadas cuando los ooquistes fueron suspendidos a i) 4°C y 25°C después de 6 días de exposición a pH 7, ii) a partir de 4 días de exposición a pH 10, iii) 4°C y 18°C después de 6 días de exposición a pH 10 y iv) 18°C y 25°C después de 6 días de exposición a pH 10.

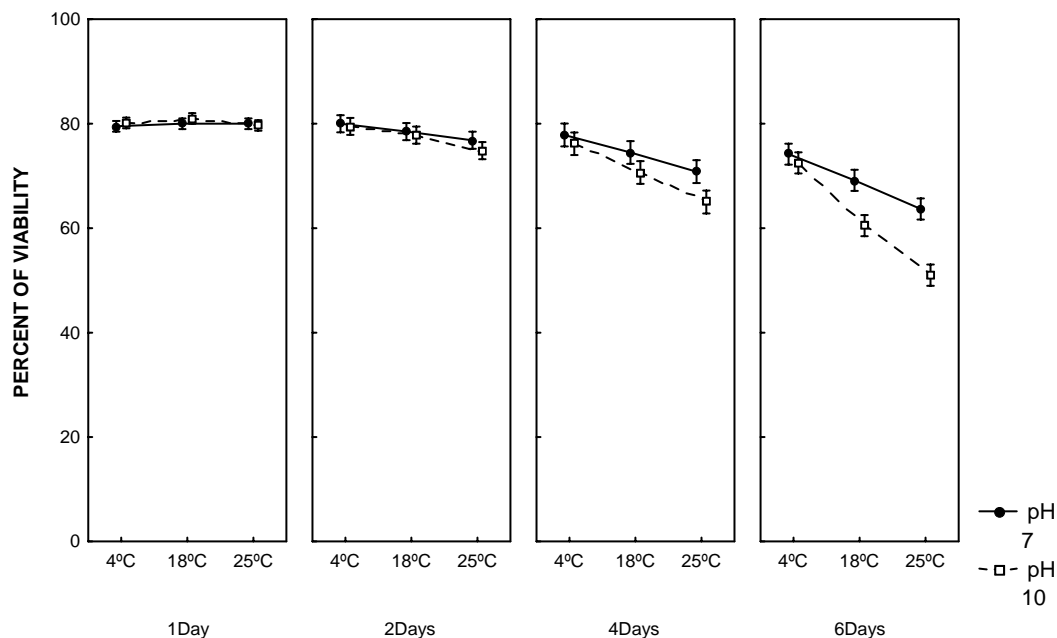


Figura 4.1.1. Viabilidad de ooquistes de *C. parvum* expuestos a diferentes temperaturas (4°C, 18°C y 25°C) y diferentes pHs, 7 (●) y 10 (□), durante 1, 2, 4 y 6 días. Cada dato representa la media \pm desviación estándar de dos réplicas con 300 ooquistes enumerados por réplica.

El amoníaco redujo significativamente ($P < 0.001$) la viabilidad de los ooquistes de *C. parvum* (Figura 4.1.2). Nuestro estudio demostró que bajas concentraciones de amoníaco (5 y 50 mg l⁻¹) durante periodos prolongados de tiempo (1, 2, 3 y 4 días) produjeron reducciones significativas ($p < 0.001$) en la viabilidad de *C. parvum*. Después de 4 días de exposición a 5 mg NH₃ l⁻¹ y 50 mg NH₃ l⁻¹, la viabilidad de los ooquistes se redujo desde el 81% al 41.5% \pm 0.24 y 14.8% \pm 0.71, respectivamente (Figura 4.1.2).

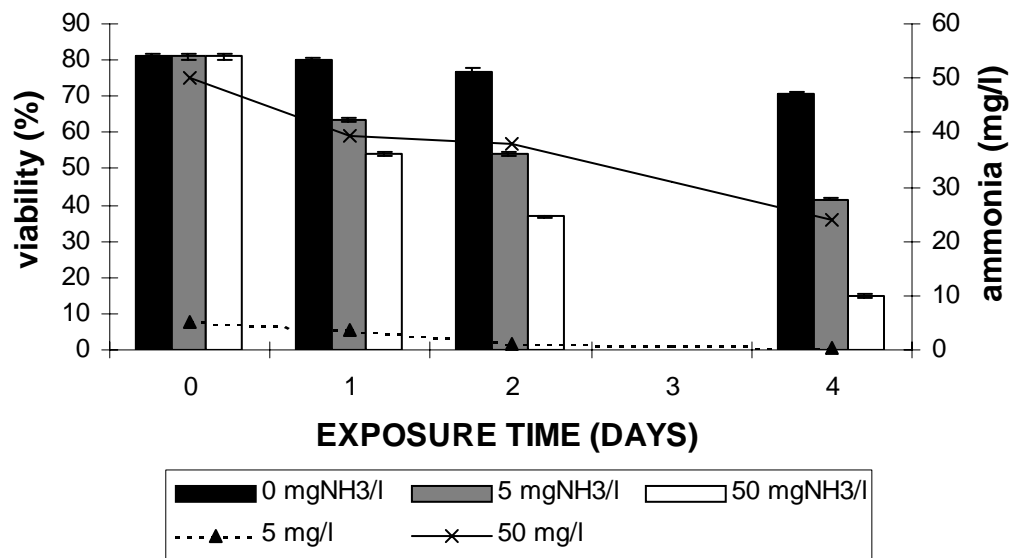


Figura 4.1.2. Efecto del amoníaco y del tiempo de exposición sobre la viabilidad de ooquistes de *C. parvum*. Cada dato representa la media \pm desviación estándar de dos réplicas con 300 ooquistes enumerados por réplica. Los ooquistes fueron expuestos a varias concentraciones iniciales de amoníaco, 0 (■), 5 (▣) y 50 mg l⁻¹ (□) durante 1, 2 y 4 días a pH 7 a 25°C (columnas). Las concentraciones de amoníaco fueron medidas durante el curso del experimento, 5 (▲) y 50 mg l⁻¹ (x) (líneas).

4.2. Influencia de la luz solar y la profundidad sobre la inactivación de ooquistes en lagunajes

Los resultados obtenidos en este capítulo han sido aceptados para su publicación en *Microbial Ecology* (Reinoso, R., and Bécares, E. 2008. Environmental inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in waste stabilization ponds. *Microb. Ecology* (In press. doi: 10.1007/s00248-008-9378-7).

El estudio fue llevado a cabo en el sistema de lagunaje de Fresno de la Vega (León), el cual se encuentra formado por dos lagunas anaerobias en paralelo seguido por una laguna facultativa y por una laguna de maduración. El objetivo de este estudio fue evaluar la supervivencia de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en este tipo de sistemas y determinar los efectos de la luz solar, profundidad y tipo de laguna sobre la viabilidad de los ooquistes.

El estudio se llevó a cabo durante Agosto de 2006 con dos lotes diferentes de ooquistes de

Cryptosporidium parvum procedentes de la Universidad de Arizona. Se utilizaron bolsas semipermeables de celulosa (14000 Da porosidad) para permitir a los ooquistes entrar en contacto con los iones presentes en el agua minimizando de este modo el efecto de la depredación y de la degradación por bacterias y hongos. Las bolsas con los ooquistes fueron colocadas en la superficie de cada laguna (para ver el efecto del tipo de laguna) y en el fondo de las lagunas anaerobia y facultativa (para comprobar el efecto de la profundidad). Bolsas con ooquistes protegidas de la luz solar fueron también colocadas en la superficie de la laguna de maduración para determinar el efecto de la luz solar. Como control, se utilizaron bolsas con ooquistes guardadas en oscuridad a 4°C. Las bolsas fueron retiradas de las lagunas al día, 2 días y 4 días, teniendo en cuenta los tiempos de retención hidráulicos del sistema. Una vez en el laboratorio, se determinó la viabilidad de los ooquistes mediante un ensayo con tintes fluorogénicos (Campbell et al., 1992; 1993) basado en la morfología y en la inclusión/exclusión de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) y yoduro de propidio (PI).

Todas las lagunas provocaron que la viabilidad de los ooquistes disminuyera gradualmente con el tiempo (Figura 4.2.1) siendo significativamente más baja ($P < 0.01$) al final del periodo de muestreo (4 días) que al comienzo del estudio. Además, todos los factores testados en este estudio, incluida la interacción entre factores, tuvieron efectos significativos ($P < 0.01$) sobre la viabilidad de *C. parvum*. La luz solar fue el factor más influyente en la disminución de la viabilidad de los ooquistes con una diferencia respecto a los ooquistes en oscuridad del 40% tras 4 días de exposición. Esta diferencia fue similar a la encontrada entre la viabilidad de los ooquistes en superficie y profundidad demostrando que el efecto de la profundidad se debió básicamente a la luz solar. Nuestros datos también demostraron que las condiciones físico-químicas de cada laguna influenciaron significativamente ($P < 0.01$) la inactivación de ooquistes de *C. parvum*. En este sentido, la laguna facultativa fue la más eficaz en la inactivación de ooquistes, tanto en superficie (12% de viabilidad después de 4 días de exposición) como en el fondo (53% de viabilidad) de la laguna.

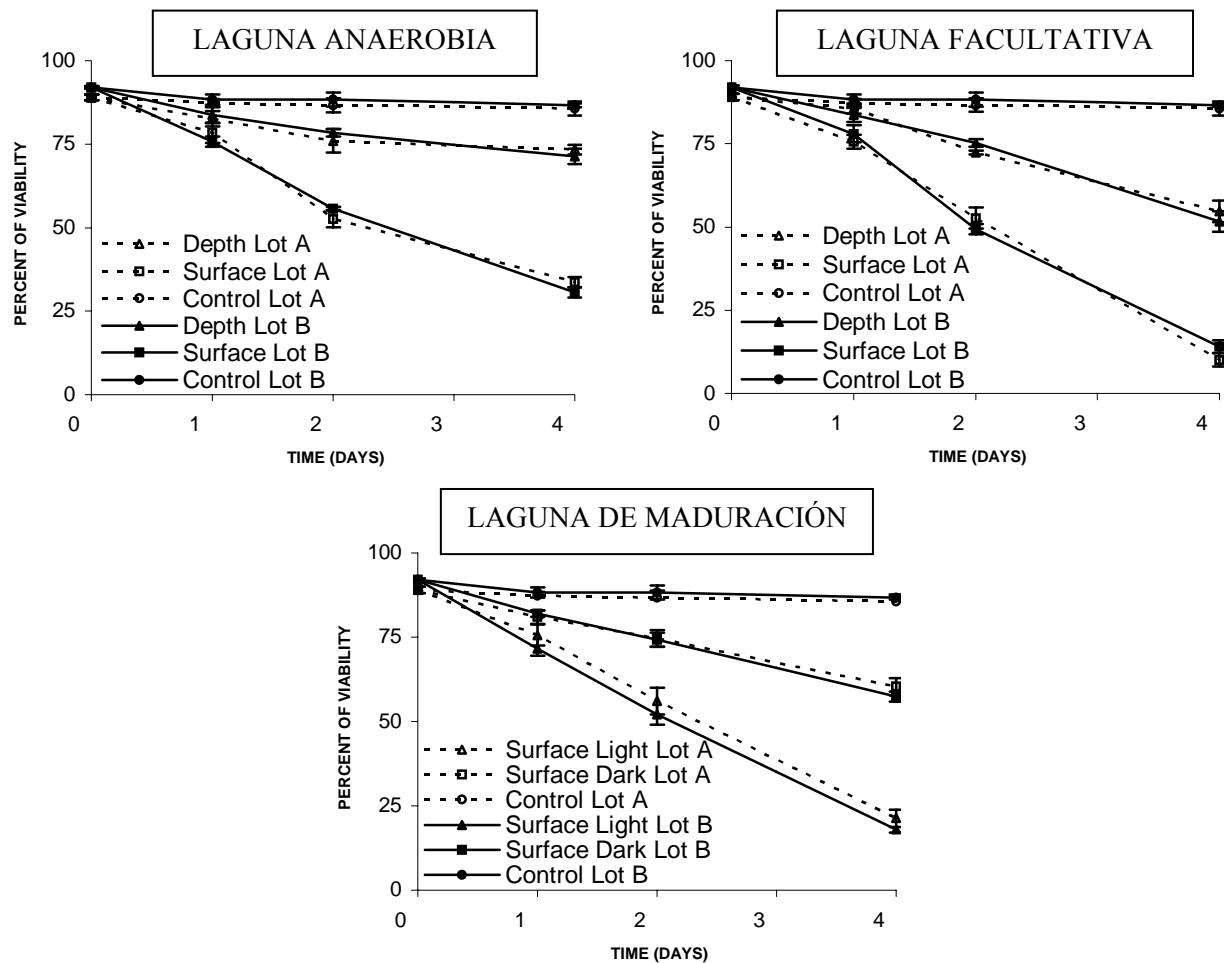


Figura 4.2.1. Viabilidad de ooquistes de *C. parvum* en el sistema de lagunaje.

Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que todos los ambientes presentaron tasas de inactivación para *C. parvum* significativamente más altas ($P < 0.05$) que sus respectivos controles ($0.0028 \text{ día}^{-1} \pm 0.0002$ y $0.0029 \text{ día}^{-1} \pm 0.001$ para el lote A y B, respectivamente). Bajo estas condiciones (ooquistes en agua estéril a 4°C y oscuridad), el análisis de regresión indicó que aproximadamente 1071 y 1034 días, respectivamente, serían necesarios para alcanzar una inactivación del 99.9%. Tiempos más bajos, 9, 16 y 25 días (lote A) y 11, 14 y 22 días (lote B) fueron estimados para alcanzar una inactivación del 99.9% en la superficie de la laguna facultativa, maduración y anaerobia, respectivamente (Tabla 4.2.1). Las tasas de inactivación también reflejaron que la luz solar fue el factor determinante en la inactivación de ooquistes de *C. parvum* y que la laguna facultativa fue el ambiente más agresivo tanto para los ooquistes colocados en superficie como en el fondo de la laguna.

Tabla 4.2.1. Tasas de inactivación (k_d) para *C. parvum* en las diferentes lagunas del sistema

Test	Lote	Laguna	Posición	Luz solar	K_d (día ⁻¹) ± DS	R ²	Días para alcanzar una inactivación del 99.9%
A-1	A	Anaerobia	Superficie	Si	0.1188 ± 0.0186	0.9759	25.25
A-2	A	Anaerobia	Fondo	No	0.0159 ± 0.0070	0.8382	188.68
A-3	B	Anaerobia	Superficie	Si	0.1306 ± 0.0009	0.9999*	22.97
A-4	B	Anaerobia	Fondo	No	0.0227 ± 0.0020	0.9919	132.74
F-1	A	Facultativa	Superficie	Si	0.3025 ± 0.0502	0.9731	9.91
F-2	A	Facultativa	Fondo	No	0.0645 ± 0.0030	0.9977*	46.51
F-3	B	Facultativa	Superficie	Si	0.2522 ± 0.0184	0.9946*	11.89
F-4	B	Facultativa	Fondo	No	0.0715 ± 0.0089	0.9844	41.95
M-1	A	Maduración	Superficie	Si	0.1871 ± 0.0197	0.9891	16.03
M-2	A	Maduración	Superficie	No	0.0432 ± 0.0026	0.9964*	69.44
M-3	B	Maduración	Superficie	Si	0.2043 ± 0.0225	0.9879	14.68
M-4	B	Maduración	Superficie	No	0.0524 ± 0.0034	0.9958*	57.25
C-1	A	Control ^a	-	-	0.0028 ± 0.0002	0.9926	1071.43
C-2	B	Control	-	-	0.0029 ± 0.0010	0.8928	1034.48

^a Control: ooquistes en agua estéril a 4°C y oscuridad

* Significativo a $P < 0.05$

4.3. Eliminación de patógenos e indicadores fecales en lagunajes. Importancia de la sedimentación

Los resultados obtenidos en este capítulo han sido enviados para su publicación a Ecological Engineering (Reinoso, R., and Bécares, E. 2008. Occurrence and removal of bacteria and pathogenic parasites in northwestern Spain waste stabilization ponds. Ecol. Engineering. Enviado).

El estudio fue llevado a cabo en el sistema de tratamiento de agua residual mediante lagunas de estabilización de Fresno de la Vega (León). El caudal medio de entrada al sistema durante el periodo de estudio (Diciembre 2003 - Septiembre 2004) fue de 3200 m³/día con una carga orgánica de 7.8 g DBO₅/m²día y un tiempo de retención hidráulico de 6 días.

Las muestras de agua residual fueron semanalmente recogidas en 4 puntos del sistema: agua residual bruta (P1) y efluentes de la laguna anaerobia (P2), laguna facultativa (P3) y laguna de maduración (P4). También se recogieron, tras un periodo de un año y gracias a cajas de sedimentación situadas en el fondo de las lagunas, muestras de sedimento de cada una de las lagunas. Una vez en el laboratorio se llevó a cabo la determinación tanto de parámetros físico-químicos (DBO₅, SST, SSV, NTK, NH₄⁺, PT) como de indicadores fecales (coliformes totales, *E.coli*, streptococos fecales y colifagos) (APHA, 1998). La concentración de ooquistes

de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* del agua residual se llevó a cabo con el método de floculación con carbonato cálcico (Vesey et al., 1993) mientras que para muestras de sedimento se utilizó el método de flotación con sacarosa (Bukhari et al., 1997). La visualización de estos (oo)quistes se llevó a cabo con anticuerpos monoclonales y microscopio de fluorescencia. La concentración y posterior identificación de helmintos en el agua residual y sedimento se realizó según el método descrito por Schwartzbrod (2003).

Todos los parámetros físico-químicos presentaron concentraciones significativamente más bajas ($P < 0.05$) en el efluente final que en el influente observándose una notable reducción durante el periodo de estudio (Tabla 4.3.1). La laguna anaerobia fue la más eficaz en la eliminación de estos parámetros, especialmente en invierno. Solamente la laguna de maduración, en verano, registró eliminaciones más altas que la laguna anaerobia para NTK (49.7%) y NH_4^+ (54%). La eliminación total del sistema varió de 1.4 unidades logarítmicas para colifagos en invierno a 5 unidades logarítmicas para *E.coli* en verano. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que casi no hubo variación estacional en la eliminación de microorganismos durante el periodo de estudio. La laguna facultativa fue la más eficaz en la eliminación de estreptococos fecales (verano e invierno) y coliformes totales (solamente en invierno). Por el contrario, las eficacias más altas para los colifagos fueron registradas en la laguna de maduración, tanto en invierno como en verano.

Tabla 4.3.1. Concentraciones del influente y efluente final y eficacias de eliminación de parámetros físico-químicos y microbiológicos en el sistema de lagunas de estabilización. (Valores medios \pm desviación estándar, $n = 11$ en invierno y 15 en verano). AP: laguna anaeróbica; FP: laguna facultativa; MP: laguna de maduración; WSP_s: sistema completo.

Parámetros F-Q	Invierno						Verano					
	Influente	Eliminación (%)				Efluente final	Influente	Eliminación (%)				Efluente final
		AP	FP	MP	WSP _s			AP	FP	MP	WSP _s	
DBO ₅ (mg/l)	32.1 \pm 9.9	65.9	55.6	3.7	83.5	4.9 \pm 1.8	29.8 \pm 12.2	50.9	30.9	16.2	59.4	10.9 \pm 5.6
SST (mg/l)	52.9 \pm 27.3	61.8	36.9	24.7	78.9	8.9 \pm 5.3	45.2 \pm 53.9	67.1	18.4	20.5	57.8	12.6 \pm 6.9
SSV (mg/l)	38.3 \pm 21.5	58.0	51.6	17.4	77.3	5.5 \pm 2.2	29.1 \pm 26.2	60.9	33.5	10.8	57.1	8.7 \pm 5.4
NTK (mg/l)	11.5 \pm 5.4	48.6	25.4	26.3	64.7	3.1 \pm 1.0	8.3 \pm 3.0	39.1	43.1	49.7	81.8	1.4 \pm 0.6
NH ₄ ⁺ (mg/l)	5.9 \pm 1.7	31.6	20.7	29.9	60.8	2.1 \pm 0.4	4.3 \pm 1.8	30.1	47.8	54.0	79.6	0.7 \pm 0.5
PT (mg/l)	0.7 \pm 0.3	36.8	4.1	4.9	36.9	0.4 \pm 0.1	0.9 \pm 0.4	31.7	7.3	9.9	33.3	0.6 \pm 0.1
Indicadores fecales	Eliminación (log)						Eliminación (log)					
Coliformes totales (log UFC/100 ml)	5.6 \pm 0.6	1.0	1.2	0.6	2.8	2.8 \pm 0.3	6.8 \pm 0.6	1.2	1.0	0.3	2.5	4.3 \pm 0.6
<i>E. coli</i> (log UFC/100 ml)	5.3 \pm 0.8	1.3	0.8	0.9	3.0	2.4 \pm 0.4	6.5 \pm 0.7	1.2	2.8	1.0	5.0	1.5 \pm 0.9
Estreptococos fecales (log UFC/100 ml)	4.3 \pm 0.8	0.6	1.8	0.6	3.0	1.3 \pm 0.5	5.1 \pm 0.4	0.9	2.4	0.6	3.9	1.2 \pm 0.6
Colifagos (log UFP/100 ml)	2.0 \pm 0.5	0.3	0.4	0.7	1.4	0.6 \pm 0.8	5.3 \pm 1.3	0.1	1.3	1.3	2.7	2.6 \pm 1.7

En cuanto a los parásitos patógenicos, la eliminación total del sistema varió del 96% para *Cryptosporidium* al 100% para helmintos (Figura 4.3.1) siendo la laguna anaerobia la más eficaz en la eliminación de estos parásitos con diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto a la laguna facultativa y a la laguna de maduración. El análisis del sedimento también demostró que la laguna anaeróbica fue la más eficaz en la eliminación de parásitos. Las concentraciones registradas en el sedimento de esta laguna variaron de 28.4 huevos/g peso seco a 6.8×10^2 quistes/g peso seco. Por el contrario, las muestras de sedimento recogidas en la laguna de maduración no contenían ni (oo)quistes de protozoos ni huevos de helmintos. En este estudio, las tasas de acumulación de sedimento variaron de $34.9 \text{ m}^3/\text{año}$ en la laguna de maduración a $101.8 \text{ m}^3/\text{año}$ en la laguna facultativa. Por último, respecto a las relaciones entre parásitos intestinales y parámetros microbiológicos/físico-químicos, nuestro estudio demostró que solamente se detectaron correlaciones (r -Spearman, $P < 0.01$) entre estos grupos en el agua residual bruta, en el efluente de la laguna anaerobia y cuando consideramos todas las muestras (influyente y efluentes).

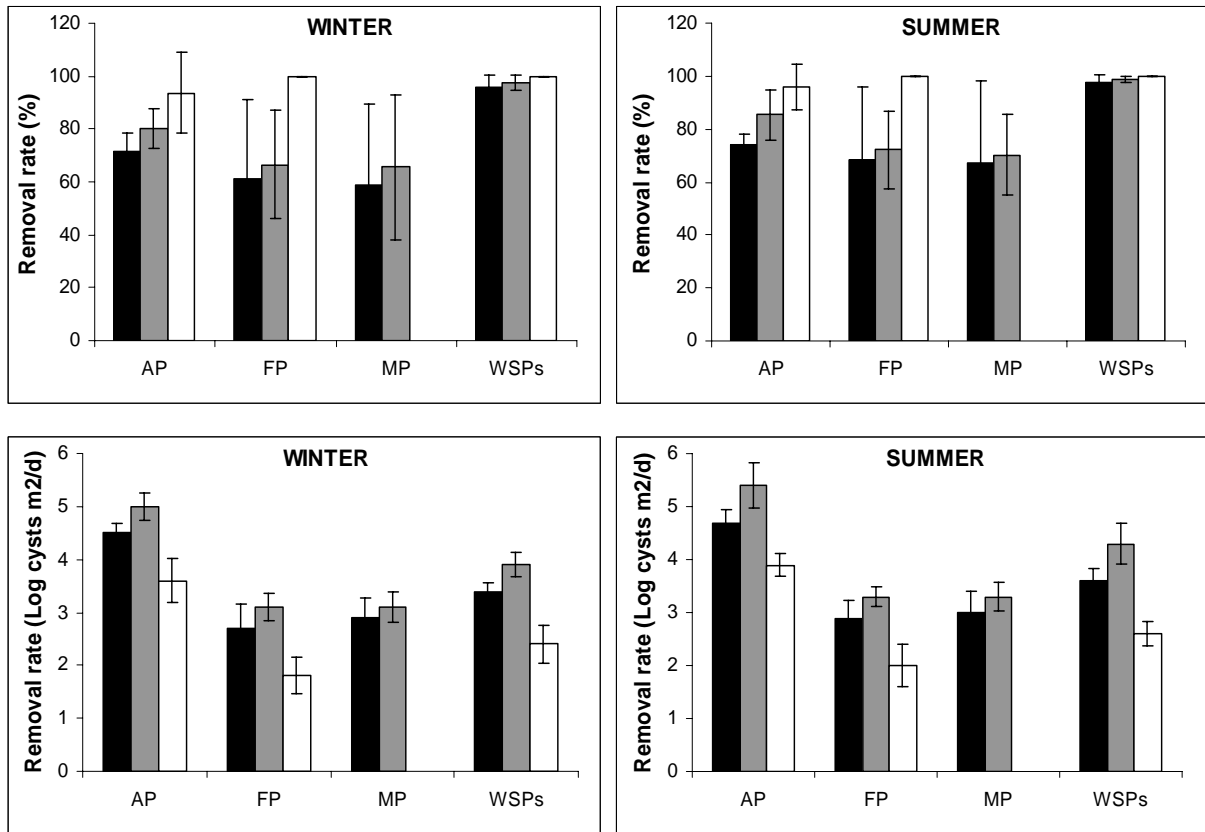


Figura 4.3.1. Tasas medias de eliminación (en % o en log (oo)quistes/huevos $m^{-2}d^{-1}$) de *Cryptosporidium* (■), *Giardia* (■) y helmintos (□) en cada laguna; las barras de error muestran la desviación estándar (n = 11 en invierno y 15 en verano).

4.4. Eliminación de patógenos e indicadores fecales en humedales artificiales

El contenido de este capítulo ha sido aceptado para su publicación en Science of the Total Environment (Reinoso, R., Torres, L.A., and Bécares, E. 2008. Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater. Science of the Total Environ. 395, 80-86).

El estudio fue realizado en el humedal artificial combinado de Cubillas de los Oteros (León), el cual se encuentra formado por una laguna facultativa, un humedal de flujo superficial plantado con *Typha latifolia* y un humedal de flujo subsuperficial plantado con *Salix atrocinerea*. El caudal medio de entrada al sistema durante el periodo de estudio (Diciembre 2004 - Septiembre 2005) fue de $20 m^3/día$ con una carga orgánica de $1.17 g DBO_5/m^2día$ y un tiempo de retención hidráulico aproximado de 83 días.

Se recogieron mensualmente muestras de agua residual bruta y de los diferentes efluentes de cada tratamiento transportándose rápidamente al laboratorio para su análisis. Para la determinación de coliformes totales, *E.coli* y estreptococos fecales se utilizó el método de filtración en membrana y medios específicos para cada grupo de bacterias (APHA, 1998). La bacteria anaerobia *Clostridium perfringens* fue detectada por el método de dilución en tubo usando medio SPS (Angelotti et al., 1962) mientras que para los colifagos se siguió el método descrito por Adams (1959). Ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* fueron concentrados por el método de floculación con carbonato cálcico (Vesey et al., 1993). Para su visualización se utilizaron anticuerpos monoclonales y microscopio de fluorescencia siendo la eficacia de recuperación de este método del 44%. La concentración de helmintos del agua residual y su posterior identificación fue realizada según el método descrito por Bouhoum and Schwartzbrod (1989).

La eliminación total del sistema varió del 78% para los colifagos a más del 99.99% para los helmintos (Tabla 4.4.1). El humedal de flujo subsuperficial alcanzó la eliminación más alta para *Cryptosporidium* (98.8%), *Giardia* (97.6%) y colifagos (94.8%). Por el contrario, la laguna facultativa fue quien mayor eficacia presentó para bacterias indicadoras (78-96%). Los helmintos solamente fueron detectados en el agua residual bruta y en el efluente de la laguna facultativa.

Tabla 4.4.1. Densidades microbianas medias del influente y efluente final (en unidades \log_{10} para bacterias y colifagos) y eficacia de eliminación (en %) de cada tratamiento del humedal artificial.

	Influente ^a	Eliminación (%)				Efluente final ^a
		Laguna Facultativa (FP)	Humedal de flujo superficial (SF)	Humedal de flujo subsuperficial (SSF)	Sistema de tratamiento completo ^b	
<i>Cryptosporidium</i> (ooquistes/L)	45.7* (7.55)	75.78	47.8	98.89	99.87	<1
<i>Giardia</i> (quistes/L)	280.94* (99.14)	87.49	63.08	97.69	99.91	<1
Helmintos (huevos/L)	9.56* (10.05)	92.46	>99.99	-	>99.99	<1
Coliformes totales (UFC/100mL)	6.75* (0.66)	84.82	36.07	69.27	97.12	4.40 (1.53)
<i>E.coli</i> (UFC/100mL)	6.35* (0.55)	96.81	37.56	72.02	99.33	3.23 (1.6)
Estreptococos fecales (UFC/100mL)	5.31* (0.78)	89.61	61.97	54.67	99.29	2.62 (0.96)
<i>Clostridium perfringens</i> (UFC/mL)	2.61* (0.87)	78.44	33.93	47.68	94.63	1.08 (0.62)
Colifagos (UFP/100mL)	4.86 (1.45)	53.92	14.58	94.88	78.39	2.62 (3.11)

^a Media aritmética (desviación estándar en paréntesis) de 10 muestras (3 réplicas por muestra) recogidas mensualmente durante 1 año. Los valores seguidos por un asterisco son significativamente diferentes (Tukey HSD test, $p < 0.05$) cuando comparamos las concentraciones del influente y efluente.

^b La eliminación total del sistema, expresada como porcentaje (%), fue calculada por diferencia entre el influente y el efluente final (efluente del humedal de flujo subsuperficial).

Nuestros resultados reflejaron que el humedal de flujo superficial fue el más efectivo en la eliminación de (oo)quistes y huevos cuando se consideraron tasas de eliminación, tanto en invierno como en verano (Tabla 4.4.2). Por el contrario, la laguna facultativa obtuvo las tasas de eliminación más altas para todas las bacterias en invierno pero no en verano. Nuestros datos también demostraron que apenas hubo variación estacional en la eliminación microbiana durante el periodo de estudio observándose solamente diferencias entre ambos periodos para *Giardia* y estreptococos fecales en el humedal de flujo superficial (Tabla 4.4.2). Respecto a las relaciones entre parásitos intestinales y microorganismos indicadores es necesario destacar que solamente se observaron correlaciones en el agua residual bruta y cuando consideramos todas las muestras (influyente y efluentes).

Tabla 4.4.2. Tasas de eliminación^a en los diferentes humedales del sistema en invierno (n = 4) y verano (n = 6). Laguna facultativa (FP), humedal de flujo superficial (SF) y humedal de flujo subsuperficial (SSF).

	INVIERNO				VERANO			
	FP	SF	SSF	Sistema completo	FP	SF	SSF	Sistema completo
<i>Cryptosporidium</i>	2.81	3.21	2.13	2.7	2.79	3.38	2.28	2.71
<i>Giardia</i>	3.66	3.69	2.42	3.49	3.6	4.03*	2.58	3.47
Helmintos	2.06	2.51	-	1.89	2.08	2.64	-	1.92
Coliformes totales	9.02	6.88	5.76	8.87	8.83	7.01	7.74	8.7
<i>E.coli</i>	8.81	2.01	4.74	8.61	8.38	6.38	5.28	8.2
Estreptococos fecales	7.45	1.79	3.94	7.25	7.55	7.93*	4.9	7.43
<i>Clostridium perfringens</i>	7.28	3.92	4.32	7.18	6.29	4.1	3.56	6.17
Colifagos	6.04	-	-	-	3.37	2.93	8.12	7.15

^a Las tasas de eliminación fueron expresadas como log ufc ó (oo)quistes eliminados m⁻²día⁻¹. Los valores seguidos por un asterisco son significativamente diferentes (Tukey HSD test, $p < 0.05$) cuando comparamos invierno y verano en el mismo humedal.

4.5. Presencia de parásitos intestinales en purines de cerdo y su eliminación en procesos de fangos activados

El contenido de este capítulo ha sido aceptado para su publicación en Bioresource Technology (Reinoso, R., and Bécares, E. 2008. The occurrence of intestinal parasites in swine slurry and their removal in activated sludge plants. Bioresource Technol. In press. doi: 10.1016/j.biortech.2007.11.056).

Este estudio fue simultáneamente realizado en trece granjas intensivas de cerdos y dos plantas de tratamiento de purín (fangos activados) situadas en la comunidad autónoma de Castilla y

León (noroeste de España). Las muestras de purín fueron mensualmente recogidas de cada una de las etapas de los sistemas de tratamiento y del tanque de almacenamiento de cada granja. Además, muestras de fango seco fueron también recogidas en la planta 1.

La concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* del purín se llevó a cabo con el método de flotación con sacarosa (Bukhari et al., 1997). La visualización de estos (oo)quistes se realizó con anticuerpos monoclonales y microscopio de fluorescencia. La concentración y posterior identificación de helmintos en el purín se realizó según el método descrito por Schwartzbrod (2003).

Ooquistes de *Cryptosporidium* fueron detectados en el 53% (7/13) de las granjas estudiadas con concentraciones que variaron desde 1.67×10^4 a 2.33×10^5 ooquistes/L. Quistes de *Giardia* fueron solamente detectados en la granja F (7%) con una densidad media de 3.33×10^3 quistes/L mientras que los helmintos fueron detectados en el 38% (5/13) de las granjas estudiadas con concentraciones que variaron desde 100 a 2600 huevos/L (Tabla 4.5.1).

Tabla 4.5.1. Presencia de patógenos en trece granjas intensivas de cerdos del noroeste de España.

Granja	<i>Cryptosporidium</i>		<i>Giardia</i>		Helmintos	
	Media ^a (ooquistes/L)	DS ^b	Media ^a (quistes/L)	DS	Media ^a (huevos/L)	DS
A	n.d. ^c	-	n.d.	-	n.d.	-
B	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
C	9.67×10^4	3.21×10^4	n.d.	-	6.67×10^2	1.53×10^2
D	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
E	2.33×10^5	6.03×10^4	n.d.	-	2.6×10^3	3.46×10^2
F	1.53×10^5	2.08×10^4	3.33×10^3	5.77×10^3	n.d.	-
G	1.37×10^5	1.52×10^4	n.d.	-	n.d.	-
H	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
I	3.33×10^4	5.77×10^3	n.d.	-	1.0×10^2	1.0×10^2
J	4.33×10^4	1.53×10^4	n.d.	-	n.d.	-
K	n.d.	-	n.d.	-	8.67×10^2	2.51×10^2
L	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
M	1.67×10^4	1.15×10^4	n.d.	-	3.33×10^2	1.52×10^2
MEDIA	5.48×10^4	7.64×10^4	2.56×10^2	9.24×10^2	3.51×10^2	7.34×10^2

^a n=3

^b DS: Desviación estándar

^c n.d.: No detectado

La eliminación total del sistema para ooquistes de *Cryptosporidium* fue del 93.5% ($1.24 \log_{10}$) y 86.7% ($0.88 \log_{10}$) en la planta 1 y 2, respectivamente. Helmintos y quistes de *Giardia*

fueron eliminados con eficacias superiores al 99.9%. Nuestros resultados también revelaron que el tratamiento de fangos activados fue el más eficaz de todo el sistema, 78-81% para *Cryptosporidium* y >99.9% para helmintos (Tabla 4.5.2). Respecto a la presencia de parásitos en el fango seco, ooquistes de *Cryptosporidium* fueron detectados en el 71% (5/7) de las muestras con concentraciones de 3.5×10^3 a 1.03×10^4 ooquistes/Kg SST. Ni quistes de *Giardia* ni huevos de helmintos fueron detectados en el fango seco. Teniendo en cuenta estos valores, nosotros estimamos una eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* por el trómel de secado de 4.3 unidades logarítmicas.

Tabla 4.5.2. Presencia de patógenos en purín de cerdo y eficacia de eliminación de cada etapa del sistema de tratamiento (Planta 1 y 2) en el noroeste de España. La unidad de floculación (Floc/Coag) no estuvo operativa en la planta 2.

Planta	(Oo)quistes / huevos	Influyente (Media \pm DS) ^a	Eliminación	Tratamiento				
				Tamizado	Decantador primario	Floc/ coag	Fangos activados y decantador secundario	Tratamiento completo
1 (n=9)	<i>Cryptosporidium</i>	5.62 \pm 0.29	%	8.77	25.92	44.57	78.11	93.57
			Log ₁₀	0.05	0.15	0.28	0.73	1.24
	Helmintos	1.7 \pm 0.21	%	>99.99	n.d.	n.d.	n.d.	>99.99
			Log ₁₀	-	n.d.	n.d.	n.d.	-
			%	11.11	59.38	40	>99.99	>99.99
			Log ₁₀	0.21	0.44	0.38	-	-
2 (n=2)	<i>Cryptosporidium</i>	5.32 \pm 0.01	%	10.89	20.97	-	81.22	86.75
			Log ₁₀	0.05	0.1	-	0.73	0.88
	Helmintos	n.d. ^b	%	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.
			Log ₁₀	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.
			%	16.67	75	-	>99.99	>99.99
			Log ₁₀	0.09	0.92	-	-	-

^a La concentración de patógenos fue expresada como log₁₀ (oo)quistes ó huevos L⁻¹.

^b n.d.: No detectado

4.6. Estudio preliminar sobre el papel de la depredación en la eliminación de patógenos

La depredación es un mecanismo biológico que según algunos autores podría estar involucrado en la eliminación de patógenos en sistemas de tratamiento de agua residual (Stott et al., 2003). Estos autores demostraron, mediante experimentos en laboratorio, que determinadas especies de ciliados (*Euplotes patella*, *Stylonychia mytilus*, *Paramecium caudatum*, etc.), rotíferos (*Philodina*, *Monostyla*, *Epiphanes*, *Euchlanis*, *Brachionus*, and *Asplanchna*) y amebas (*Acanthamoeba culbertsoni*) son capaces de ingerir ooquistes de *Cryptosporidium*, y por tanto, provocar su eliminación. Sin embargo, los resultados preliminares obtenidos en este estudio, realizado en el Instituto de Ingeniería del Agua y

Medio Ambiente de la Universidad Politécnica de Valencia, ponen en duda este mecanismo de eliminación de patógenos.

Nuestro objetivo fue determinar la importancia de la depredación y dilucidar si existe una depredación selectiva por parte de los protistas hacia los ooquistes o hacia las bacterias. Para ello, se realizó un experimento basado en la depredación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* y bacterias por la microfauna (ciliados, flagelados, rotíferos, etc.) presente en los reactores de fangos activados de varias depuradoras convencionales de Valencia. También se llevó a cabo otro experimento con el fin de diferenciar entre la capacidad de los protistas para depredar ooquistes viables y no viables. Todos los ensayos fueron realizados con concentraciones de 10^5 ooquistes/ml. En el primer experimento, un volumen de 100µl de la solución de ooquistes fue incubado (1 hora a 37°C) con 50µl de anticuerpo monoclonal conjugado con fluoresceína de isocianato (FITC) (Crypto/Giardia-REAL IFA test, Durviz, Valencia, Spain). Esta solución con los ooquistes teñidos fue lavada varias veces para eliminar el exceso de anticuerpo y mezclada con las bacterias (1.5×10^5 bacterias/µl), previamente teñidas con DAPI. Posteriormente, volúmenes de 15µl de la solución (ooquistes + bacterias) fueron mezclados (1 hora a 37°C) con 30µl de muestra de las depuradoras y observadas bajo microscopio de fluorescencia (3 portas con 15µl de la mezcla/porta). En el segundo experimento, el procedimiento fue similar salvo que no añadimos bacterias y que diferenciamos entre ooquistes viables (Universidad de Arizona) y no viables (Biotechnology Frontiers).

Los resultados obtenidos demostraron, a diferencia de lo anteriormente publicado, que la depredación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* por la microbiota de los reactores biológicos no es un mecanismo esencial de eliminación de este patógeno ya que sólo se registraron 4 casos aislados de ingestión de ooquistes por la microfauna presente y siempre por el grupo de los ciliados: 2 individuos del género *Euplotes* con 2 ooquistes cada uno en su interior y 2 individuos del género *Paramecium* con 1 y 4 ooquistes en su interior, respectivamente. En todos los casos se trató de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* irradiados no-viables pero debido al bajo número de individuos que ingirieron ooquistes será necesario un estudio posterior para determinar si realmente existen diferencias entre ooquistes viables y no viables. También se observó que la mayoría de las especies encontradas en el agua residual de los fangos biológicos ingerían bacterias, lo que nos hace pensar que existe una depredación selectiva por parte de la microfauna hacia las bacterias y no hacia los

ooquistes, algo lógico si tenemos en cuenta que el tamaño de las bacterias es bastante inferior al de los ooquistes y por tanto el esfuerzo a la hora de ingerirlas va a ser menor. Es necesario puntualizar que los trabajos realizados hasta el momento sobre este tema (Fayer et al., 2000; Stott et al., 2001) se realizaron con especies aisladas de ciliados y rotíferos, y con una concentración de bacterias mucho menor que la encontrada en los sistemas de fangos activados, lo que puede explicar la alta tasa de depredación observada.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN GENERAL



CHAPTER 5. GENERAL DISCUSSION

En este capítulo se pretende llevar a cabo un análisis de los principales mecanismos de eliminación de patógenos en sistemas de tratamiento de agua residual comparando los resultados alcanzados en esta tesis con los ya existentes sobre este tema.

5.1. Importancia de los factores fisicoquímicos en la inactivación de patógenos

Con el fin de determinar el efecto que tienen estos factores sobre los patógenos, concretamente sobre el protozoo parásito *Cryptosporidium parvum*, se llevaron a cabo dos tipos de experimentos. El primero, realizado en laboratorio (Scottish Parasite Diagnostic Laboratory, Glasgow), evaluó el efecto del pH, temperatura, amoníaco y tiempo de exposición sobre la viabilidad de los ooquistes simulando el rango de condiciones ambientales normalmente encontradas en los sistemas de tratamiento de agua residual basados en algas del noroeste de España, mientras que el segundo, realizado en el propio sistema (lagunaje de Fresno de la Vega), analizó el efecto de la luz solar, el ambiente físico-químico de cada laguna y su profundidad sobre la supervivencia de los ooquistes.

Los resultados obtenidos en los estudios de laboratorio (**artículo I**) demostraron que el amoníaco incrementó la tasa de inactivación de ooquistes de *C. parvum* convirtiéndose en el factor más importante de los aquí estudiados. Es necesario también puntualizar que en este estudio, las concentraciones de amoníaco a las que fueron sometidos los ooquistes (5 y 50 mg NH₃ l⁻¹) fueron muy inferiores a las anteriormente estudiadas (Ransome et al., 1993; Ruxton, 1995; Fayer et al., 1996; Jenkins et al., 1998). Aún así, se demostró que bajas concentraciones de amoníaco durante largos periodos de tiempo, como sucede en este experimento y probablemente en los sistemas naturales de tratamiento de agua residual del noroeste de España, son capaces de reducir de una manera muy considerable la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum*. Esto es debido a la capacidad que presenta el amoníaco para atravesar la pared de los ooquistes e inactivar los esporozoitos y los mecanismos involucrados en la esquistación (Smith et al., 2005). Es necesario añadir que esta pared se vuelve más permeable al aumentar el pH y la temperatura del agua permitiendo fácilmente al amoníaco ejercer su efecto tóxico sobre los ooquistes (Smith and Ronald, 2002).

La temperatura y el pH son otros dos factores ampliamente estudiados en relación a su efecto desinfectante sobre los ooquistes de *C. parvum* (Robertson et al., 1992; Walker et al., 2001).

Sin embargo, la mayoría de estos estudios están realizados con temperaturas y pHs extremos (Campbell et al., 1992; Fayer, 1994; Fayer and Nerad, 1996) que no se adecuan a los valores que normalmente se dan en los sistemas naturales de tratamiento de agua residual. Por ello, nuestro estudio se centró en someter a los ooquistes a unos valores más habituales de pH (7 y 10) y temperatura (4, 18 y 25 °C) con el fin de poder determinar el efecto real que tienen estos factores en los sistemas naturales de tratamiento de agua residual del noroeste de España. Nuestros resultados demostraron que tanto el pH como la temperatura disminuyeron la viabilidad de los ooquistes, probablemente como consecuencia del incremento de la permeabilidad de la pared de los ooquistes que provocan estos factores. Sin embargo, es necesario indicar que un gran porcentaje de estos ooquistes permaneció viable al final del periodo de exposición demostrando la robustez ambiental de *C. parvum*. Resultados similares han sido descritos por otros autores quienes corroboran el efecto biocida del pH y la temperatura sobre la viabilidad de *C. parvum* pero matizando, al igual que nosotros, que estos ooquistes pueden permanecer viables durante varias semanas e incluso meses a estos valores de pH y temperatura (Jenkins et al., 1997; Fayer et al., 1998).

La segunda parte de este estudio (**artículo II**) se centró en evaluar otro factor físico-químico involucrado en la eliminación de patógenos, la radiación solar. Es ampliamente conocido que el componente UV de la radiación solar provoca una serie de daños en la molécula de ADN de los organismos patógenos que finalmente impiden la división celular y causan la muerte. Además, se ha demostrado que las longitudes de onda germicidas son las que se corresponden a las regiones UVC y UVB, entre los 200 y 315nm, siendo los 265nm la longitud de onda más efectiva para la inactivación de microorganismos ya que el ADN expuesto a esta energía presenta un máximo de absorción (Davies-Colley et al., 1997). Sin embargo, pocos estudios han evaluado su efecto directamente en el campo, como es este caso. Nuestros resultados demostraron que los ooquistes de *C. parvum* son capaces de sobrevivir en oscuridad en las lagunas durante varias semanas mientras que sólo unos pocos días serían necesarios para su completa inactivación en condiciones de exposición a la luz solar. De este modo se confirma la idea de que la exposición a luz solar es el factor determinante en la inactivación de ooquistes de *C. parvum* en sistemas de lagunaje, como previamente ya habían indicado otros autores para otro tipo de microorganismos (Curtis et al., 1992b; Davies-Colley et al., 1999).

Otro objetivo de este estudio fue confirmar “in situ” los resultados obtenidos en el estudio anterior (artículo I - laboratorio) acerca del efecto de determinadas variables físico-químicas

sobre la viabilidad de los ooquistes. Como hemos visto anteriormente, son muchos los estudios que evalúan, mediante experimentos en laboratorio, los efectos individuales de determinados factores físico-químicos sobre la viabilidad de *C. parvum*. Sin embargo, muy pocos estudios analizan estos factores bajo condiciones de campo utilizando bolsas o containers semipermeables con patógenos en su interior (Robertson et al., 1992; Araki et al., 2001). Nuestros resultados indicaron que el ambiente físico-químico de la laguna facultativa, muy similar al de la laguna de maduración en cuanto a temperatura y pH, fue el más agresivo para la supervivencia de ooquistes, probablemente como consecuencia de los elevados valores de oxígeno disuelto registrados en esta laguna. Esto es fácilmente explicable si tenemos en cuenta que el efecto biocida de la luz solar, a parte del daño directo que provoca la radiación UV sobre el ADN de los microorganismos, puede incrementarse por su interacción con los fotosensibilizadores presentes en el agua, que posteriormente reaccionan con el oxígeno generando moléculas altamente reactivas, como el peróxido de hidrógeno, con gran poder desinfectante (Curtis et al., 1992a). A esto hay que añadirle que determinadas variables ambientales como el pH y la temperatura, son capaces de incrementar la permeabilidad de la pared de los ooquistes permitiendo a estas moléculas de oxígeno penetrar en el interior de los ooquistes aumentando su efecto biocida (Davies-Colley et al., 1999; Morita et al., 2002). Por el contrario y a pesar de registrar los valores más altos de amonio, el ambiente físico-químico de la laguna anaeróbica fue el menos dañino para los ooquistes, lo que nos hace pensar que este factor no tiene tanta importancia en la inactivación de ooquistes como habíamos indicado en el apartado anterior (artículo I), o por lo menos cuando sus concentraciones son tan bajas ($< 3.5 \text{ mg l}^{-1}$).

Por último, nuestros datos también revelaron que la diferencia observada en la viabilidad de los ooquistes colocados en la superficie y en el fondo de las lagunas se debió básicamente al efecto de la luz solar y no a factores físico-químicos. Estos resultados coinciden con previas investigaciones donde se observó que las tasas de inactivación de bacterias indicadoras fueron más rápidas cerca de la superficie que a profundidad, probablemente como consecuencia de la fuerte atenuación que sufre la luz solar cuando penetra en la columna de agua (Davies-Colley et al., 2000).

5.2. Mecanismos de eliminación de patógenos en lagunajes y humedales artificiales

Los sistemas naturales de tratamiento de agua residual, debido a sus bajos costes energéticos y de mantenimiento y a sus buenos rendimientos en la eliminación de patógenos, han sido ampliamente utilizados como alternativa frente a los sistemas convencionales para el saneamiento de pequeñas poblaciones (Bécares, 2006; Puigagut et al., 2007). Sin embargo, existen todavía muchos interrogantes sobre los principales mecanismos de eliminación de patógenos que tienen lugar en estos sistemas.

Como hemos demostrado en el capítulo anterior (artículo II), la luz solar y el ambiente físico-químico de las lagunas de estabilización son dos de los principales mecanismos de eliminación de patógenos en los sistemas de lagunaje. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la eliminación de patógenos en estos sistemas, principalmente en las primeras lagunas (anaeróbicas), se debe al proceso de sedimentación, favorecido por tiempos de retención largos y por la adsorción de los patógenos a los sólidos decantables (Grimason et al., 1996; Amahmid et al., 1999, 2002; Nelson et al., 2004). Con el fin de dilucidar la importancia de este proceso en la eliminación de patógenos, se llevó a cabo un experimento de sedimentación basado en containeres situados en el fondo de las lagunas (**artículo III**). Los resultados indicaron que las lagunas anaeróbicas fueron las más efectivas en la eliminación de parásitos seguidas por la laguna facultativa y por la laguna de maduración, confirmando lo anteriormente mencionado. Sin embargo, las concentraciones de parásitos encontradas en el sedimento de dichas lagunas fueron más bajas de las que en principio podríamos esperar teniendo en cuenta el rendimiento de eliminación de las lagunas (influyente menos efluente), probablemente por el bajo tiempo de retención del sistema, lo que nos hace suponer que la sedimentación no es uno de los principales mecanismos de eliminación de patógenos en este sistema, o por lo menos no durante el periodo que duró este estudio.

Los resultados alcanzados en el **artículo IV** (humedales artificiales) ponen de manifiesto que en estos sistemas pueden estar implicados toda una serie de mecanismos cuya importancia va a variar dependiendo del tipo de humedal. Por ejemplo, en la laguna facultativa, como ya hemos demostrado en capítulos anteriores, los principales mecanismos que actúan son la luz solar, las condiciones físico-químicas, la sedimentación y el tiempo de retención hidráulica. Sin embargo, en los humedales de flujo superficial y subsuperficial, debido a la interacción planta-suelo, predominan otro tipo de mecanismos aparte de los ya mencionados para lagunas,

como por ejemplo, la filtración, la adsorción de microorganismos al complejo raíz-sustrato, la actividad bacteriana (biopelícula), la producción de oxígeno en la rizosfera, etc. (Williams et al., 1995; Gerba et al., 1999).

5.3. Eliminación de patógenos en sistemas de tratamiento de purines

La utilización agrícola de efluentes ganaderos es una práctica muy común en la comunidad autónoma de Castilla y León. El problema surge cuando estos residuos son aplicados al terreno sin un tratamiento previo ya que pueden convertirse en un grave problema sanitario debido a la ingente cantidad de patógenos que pueden albergar. En los últimos años, la ganadería porcina en Castilla y León ha experimentado un notable incremento aumentando también el volumen de residuos producidos (Esteban Turzo, 2000). Este hecho ha provocado que las autoridades competentes en materia ambiental tengan que poner freno a esta práctica promoviendo sistemas de tratamiento de purines capaces de eliminar todos los patógenos que transportan, o al menos, reducir su concentración hasta unos niveles seguros para su utilización en agricultura.

Los resultados obtenidos en el **artículo V** demuestran que en las granjas de ganado porcino de Castilla y León se encuentran presentes ciertos parásitos intestinales potencialmente peligrosos para la salud pública, como por ejemplo *Cryptosporidium*, *Giardia*, helmintos, etc. Hasta ahora sólo se habían registrado 4 casos de infecciones por estos parásitos en granjas de cerdos en España (Villacorta et al., 1991; Fleta et al., 1995; Quílez et al., 1996; Bornay-Llinares et al., 2006) pero las elevadas concentraciones observadas en el purín de varias de las granjas analizadas en este trabajo indican que esta infección puede ser también muy común en esta comunidad.

Nuestros resultados también indicaron que las plantas de tratamiento de Hornillos y Turégano reciben diariamente grandes cantidades de purín con una elevada carga parasitaria, especialmente del parásito *Cryptosporidium*. A pesar de los excelentes rendimientos de eliminación obtenidos por estas plantas, muy similares a los descritos por anteriores investigaciones en sistemas de este mismo tipo (Ottoson et al., 2006; Robertson et al., 2006), es necesario destacar que el efluente final registró una concentración media de ooquistes de *Cryptosporidium* muy elevada, probablemente debido a la alta carga parasitaria de entrada a

planta, lo que demuestra que este parásito es capaz de atravesar estos sistemas de tratamiento, siendo necesario un tratamiento adicional de filtración o cloración si se quisiera reutilizar este efluente para riego agrícola (Blumenthal et al., 2000). Incluso poniéndonos en el peor de los casos de que sólo el 0,01% de los parásitos que contiene el efluente fuera viable, esto supondría una descarga media diaria de cerca de un millón de ooquistes viables de *Cryptosporidium*, lo que supondría un importante riesgo de infección para la salud pública.

La mayoría de los autores coinciden en afirmar que los tratamientos secundarios son más importantes en la eliminación de quistes de protozoos que los tratamientos primarios (Chauret et al., 1999; Robertson et al., 2000). Nuestro estudio corrobora esas afirmaciones ya que tanto en Hornillos como en Turégano, el sistema de fangos activados presentó mejores rendimientos de eliminación para ooquistes de *Cryptosporidium* que el tratamiento primario. El caso contrario sucede con los helmintos, que son eliminados muy eficazmente con los tratamientos primarios normales (tamices, desarenadores, decantadores primarios, etc.), aunque estos patógenos pueden presentar también elevados rendimientos de eliminación en sistemas de fangos activados. Todo esto es fácilmente explicable si tenemos en cuenta que la velocidad de sedimentación de los ooquistes de *Cryptosporidium* se encuentra entre 2.2 y 2.8 cm/h (Whitmore and Robertson, 1995) y que los tanques de sedimentación primarios suelen estar diseñados para eliminar partículas con velocidades de sedimentación comprendidas entre 0.5 y 1.5 m/h, velocidades mucho más cercanas a las que presentan los helmintos debido a su mayor tamaño, lo que explica que los ooquistes de *Cryptosporidium* sean capaces de atravesar mejor los tratamientos primarios que los helmintos.

Otro aspecto a destacar en este estudio es la mejora que experimenta el tratamiento primario cuando un tratamiento físico-químico (floculación-coagulación) es añadido al sistema, tanto para los ooquistes de *Cryptosporidium* como para los helmintos. La adición de un floculante y un coagulante al purín permite la desestabilización de las cargas de las partículas en suspensión y la formación de flóculos (más fácilmente sedimentables) que operan bajo las condiciones coagulación-floculación, con la consiguiente eliminación de los patógenos que forman parte de ese material suspendido (Vanotti and Hunt, 1999; Entry and Sojka, 2000; Entry et al., 2003). También hay que señalar que estos tratamientos producen menos fango que otros procesos, lo que supone otra gran ventaja respecto al resto. El tamiz fue el proceso menos efectivo del sistema en la eliminación de parásitos, resultando incluso negativo en algunos muestreos, como previamente demostraron algunos investigadores (Bukhari et al.,

1997; Cacció et al., 2003). Esto es debido a que el tamiz disgrega o rompe las partículas que le llegan con la consiguiente liberación de los patógenos que se encontraban agregados a esas partículas.

Por último, hay que hacer hincapié en la enmienda final de la planta (fango seco) ya que este residuo va a ser aplicado directamente al campo como fertilizante orgánico. El proceso de secado por calor utilizado en estos sistemas obtuvo porcentajes de eliminación de parásitos muy elevados confirmando su idoneidad frente a otros tratamientos como el compostaje, las digestiones aeróbicas y anaeróbicas, la estabilización con caliza, etc. (Vanotti et al., 2005; Côté et al., 2006b). Además, es necesario destacar que probablemente todas las estructuras parasitarias presentes en el fango son inactivadas por las elevadas temperaturas alcanzadas en este proceso minimizando de este modo el riesgo de infección por estos parásitos y confirmando el efecto de la temperatura sobre la destrucción de patógenos (Jenkins et al., 1999; Venglovsky et al., 2006).

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES



CHAPTER 6. CONCLUSIONS

Los resultados presentados en esta tesis permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. Los experimentos de laboratorio demostraron que la temperatura, el pH, el tiempo de exposición y especialmente su interacción redujeron significativamente la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium parvum*. No obstante, el amoníaco fue el factor más importante en la inactivación de ooquistes provocando que su viabilidad se redujera, tras 4 días de exposición, del 81% al 41.5% ($5 \text{ mg NH}_3 \text{ l}^{-1}$) y 14.8% ($50 \text{ mg NH}_3 \text{ l}^{-1}$).
2. Los experimentos realizados en el lagunaje confirmaron los resultados obtenidos en el laboratorio demostrando el efecto biocida del pH y la temperatura. Sin embargo, nuestros resultados demostraron que la luz solar fue el factor más importante para la inactivación de ooquistes en este sistema. Así mismo, se comprobó que las condiciones físico-químicas de cada laguna tuvieron un efecto diferente sobre la inactivación, siendo la laguna facultativa la más eficaz de todo el sistema.
3. El estudio de sedimentación llevado a cabo en el sistema de lagunaje reveló que las lagunas anaeróbicas fueron las más eficaces en la eliminación de parásitos, seguidas por la laguna facultativa y la laguna de maduración. Sin embargo, las bajas concentraciones encontradas en el sedimento de todas estas lagunas, probablemente como consecuencia del bajo tiempo de retención del sistema, indicaron que la sedimentación no fue el principal mecanismo de eliminación de patógenos en este sistema. En general, puede decirse que el 40% de los (oo)quistes/huevos que entran al sistema de lagunaje son eliminados por la luz solar, el 15% por la sedimentación y el resto por otros factores (ej. fisicoquímicos, depredación, etc.).
4. En el sistema de lagunaje, las lagunas anaeróbicas, debido a su mayor sedimentación, fueron las más efectivas en la eliminación de parásitos (4.6 , 5.2 y $3.7 \log_{10}$ (oo)quistes/huevos eliminados $\text{m}^{-2} \text{ día}^{-1}$, respectivamente), seguidas por la laguna facultativa y por la laguna de maduración.
5. En el sistema combinado de humedales artificiales, el tipo de humedal tuvo un efecto claro sobre la tasa de eliminación de los microorganismos siendo la laguna facultativa más eficiente que los humedales en la eliminación de bacterias y el humedal de flujo

- subsuperficial más eficiente que el resto de sistemas en la eliminación de parásitos protozoos y colifagos. Por el contrario, el humedal de flujo superficial fue el más eficaz en la eliminación de parásitos cuando se consideraron tasas de eliminación superficiales (3.3, 3.8 y 2.6 \log_{10} (oo)quistes/huevos eliminados $\text{m}^{-2} \text{ día}^{-1}$, respectivamente).
6. La comparación de las diferentes unidades de tratamiento de purines (tamiz, fisicoquímico y fango activado) demostró que los procesos de fangos activados fueron los más eficaces en la eliminación de patógenos, y que el secado térmico de los fangos, aunque eficaz en la eliminación ($>4 \log_{10}$), no esteriliza totalmente de patógenos este subproducto.
 7. Todos los sistemas de tratamiento de agua residual analizados en este estudio redujeron significativamente la concentración de patógenos produciendo un efluente final adecuado para su utilización en agricultura según las normas de la OMS. La comparación entre los tres sistemas reveló que el sistema combinado de humedales artificiales obtuvo mejores rendimientos de eliminación para ooquistes de *Cryptosporidium* (99.9%) que el lagunaje (97%) y que el sistema de fangos activados (90%), no encontrándose diferencias entre los tres sistemas para el resto de los parásitos. Por el contrario, cuando se consideraron tasas de eliminación superficiales, el lagunaje fue más eficaz en la eliminación de parásitos (3.5, 4.1 y 2.5 \log_{10} (oo)quistes/huevos eliminados $\text{m}^{-2} \text{ día}^{-1}$, respectivamente) que el sistema de humedales artificiales (2.7, 3.5 y 1.9 \log_{10} (oo)quistes/huevos eliminados $\text{m}^{-2} \text{ día}^{-1}$, respectivamente).
 8. Las relaciones entre los parásitos y las bacterias indicadoras dependen del sistema de tratamiento estudiado. La ausencia de correlaciones significativas en varios de los sistemas demuestra la diferencia en la supervivencia de ambos grupos y la relativamente escasa correlación entre patógenos y sus indicadores.

The results presented in this thesis lead to the following conclusions:

1. Laboratory experiments demonstrated that temperature, pH, exposure time and especially their interaction, significantly reduced the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Nevertheless, the exposure of *C. parvum* oocysts to 5 mg NH₃ l⁻¹ and 50 mg NH₃ l⁻¹ for 4 days reduced their viability from 81% to 41.5% and 14.8%, respectively, indicating that ammonia is a determining factor for pathogen inactivation.
2. The field experiments carried out in waste stabilization ponds confirmed the laboratory-based results demonstrating the biocidal effect of pH and temperature. However, the findings indicated that exposure to sunlight was the most influential factor for *C. parvum* oocyst inactivation in the WSP system. Likewise, the physicochemical environment of each pond had a different effect on oocyst inactivation, the facultative pond being the most effective in the WSP system.
3. The settling experiment carried out in the waste stabilization pond system revealed that the anaerobic ponds were the most effective for parasite removal, followed by the facultative and maturation ponds. However, the low concentrations found in the sediments, which was probably due to the low retention time of the system, indicated that sedimentation was not the main pathogen removal mechanism in this system. In general, it can be concluded that 40% of the (oo)cysts/eggs are removed by sunlight, 15% by sedimentation and the remainder by other factors such as physicochemical factors, depredation, etc.
4. In the waste stabilization pond system, the anaerobic ponds were the most effective in removing parasites (4.6, 5.2 and 3.7 log₁₀ (oo)cysts/eggs m⁻² day⁻¹ removed, respectively) due to their high sedimentation capabilities, followed by the facultative and maturation ponds.
5. In the combined constructed wetlands system, the type of wetland had a clear influence on the removal rate of microorganisms. The facultative pond was more efficient than wetlands in bacterial removal and the subsuperficial flow wetland more efficient than the other treatments for removing protozoan parasites and coliphages. In

- contrast, the superficial flow wetland was the most efficient in removing pathogenic parasites when considering superficial removal rates (3.3, 3.8 and 2.6 \log_{10} (oo)cysts/eggs $\text{m}^{-2} \text{day}^{-1}$ removed, respectively).
6. The comparison between the different swine slurry treatments (screening, physicochemical treatment and activated sludge) demonstrated that the activated sludge processes were the most efficient for pathogen removal and that the heat-drying treatment used for sludge does not totally sterilize this residue despite of the high removals ($>4 \log_{10}$ units) achieved.
 7. All wastewater treatment systems studied significantly reduced the concentration of faecal indicators and pathogens from wastewater, producing a final effluent suitable for agricultural irrigation, according to WHO guidelines. The comparison between all systems revealed that the constructed wetlands system obtained higher removal efficiencies for *Cryptosporidium* oocysts (99.9%) than the waste stabilization ponds system (97%) and activated sludge processes (90%), although no differences were found for the other parasites studied. In contrast, the waste stabilization pond system was more efficient in removing pathogenic parasites when considering superficial removal rates (3.5, 4.1 and 2.5 \log_{10} (oo)cysts/eggs $\text{m}^{-2} \text{day}^{-1}$ removed, respectively) than the constructed wetlands system (2.7, 3.5 and 1.9 \log_{10} (oo)cysts/eggs $\text{m}^{-2} \text{day}^{-1}$ removed, respectively).
 8. The relationships between pathogenic parasites and faecal indicators depend on treatment system(s) studied. The lack of significant correlations in some systems demonstrates the difference in the survival of both these groups and the relatively scanty correlation between pathogens and their indicators.

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA



CHAPTER 7. REFERENCES

Bibliografía

- Adams, M. H. 1959. Coliphages. Interscience Publisher, Inc., New York.
- Amahmid, O., Asmama, S., Bouhoum, K., 1999. The effect of waste water reuse in irrigation on the contamination of food crops by *Giardia* cysts and *Ascaris* eggs. Inter. J. of Food Microbiol., 49 (1), 19-26.
- Amahmid, O., Asmama, S., Bouhoum, K., 2002. Urban wastewater treatment in stabilization ponds: occurrence and removal of pathogens. Urban water 4, 255-262.
- Angelotti, R., Hall, H.E., Foter, M.J., and Lewis, K.M. 1962. Quantitation of *Clostridium perfringens* in food. Appl. Microbiol. 10, 193-199.
- APHA, AWWA, EFA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, DC, USA.
- Araki, S., Martín-Gómez, S., Bécares, E., De Luis Calabuig, E., Rojo-Vazquez, F. 2001. Effect of high-rate algal ponds on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Appl. Environ. Microbiol. 67, 3322–3324.
- Ashbolt, N.J., Ball, A., Dorsch, M., Turner, C., Cox, P., Chapman, A., and Kirov, S.M. 1995. The identification and human health significance of environmental aeromonas. Water Sci. Technol. 31, 263-270.
- Baker, K. H., and Herson, D. S. 1999. Detection and occurrence of indicator organisms and pathogens. Water Environ. Res. 71, 530-550.
- Barker, P.S. and Dold, P.L. 1997. General model for biological nutrient removal activated sludge system: model presentation. Water Environ. Research 69 (5), 969-984.
- Bécares, E. 2006. Limnology of natural systems for wastewater treatment. Ten years of experiences at the experimental field for low-cost sanitation in Mansilla de las Mulas (León, Spain). Limnética 25, 143-154.
- Blumenthal, U.J., Mara, D.D., Peasey, A., Ruiz-Palacios, G. and Stott, R. 2000. Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. Bulletin of the World Health Organization 78 (9), 1104-1115.
- Bornay-Llinares, F.J., Navarro-i-Martínez, L., García-Orenes, F., Araez, H., Pérez-Murcia, M.D. and Moral, R. 2006. Detection of intestinal parasites in pig slurry: A preliminary study from five farms in Spain. Livestock Science 102, 237-242.
- Bouhoum, K., and Schwartzbrod, J. 1989. Quantification of helminth eggs in wastewater. Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin 188, 322-330.

- Bouhoum, K., Amahmid, O., Asmama, S., 2000. Occurrence and removal of protozoan cysts and helminth eggs in waste stabilization ponds in Marrakech. *Water Sci. Technol.* 42 (10-11), 159-164.
- Brix, H. 1994. Use of constructed wetlands in water pollution control: historical development, present status, and future perspectives. *Water Sci. Tech.* 30 (8), 209-223.
- Bukhari, Z., Smith, H.V., Sykes, N., Humphreys, S.W., Paton, C.A., Girdwood, R.W.A., Fricker, C.R. 1997. Occurrence of *Cryptosporidium* spp oocysts and *Giardia* spp cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England. *Water Sci. Tech.* 35, 385-390.
- Cacciò, S.M., De Giacomo, M., Aulicino, F.A., Pozio, E. 2003. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (6), 3393-3398.
- Cacció, S.M., Thompson, R.C.A., McLauchlin, J., and Smith, H.V. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 21, 430-437.
- Campbell, A.T., Robertson, L.J., and Smith, H.V. 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts, correlation of *in vitro* excystation with inclusion/exclusion of fluorogenic vital dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3488-3493.
- Campbell, A.T., Robertson, L.J., and Smith, H.V. 1993. Detection of oocysts of *Cryptosporidium* by enhanced chemiluminescence. *J. Microbiol. Methods* 17, 297-303.
- Chauret, C., Springthorpe, S. and Sattar, S. 1999. Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. *Can. J. Microbiol.* 45: 257-262.
- Côté, C., Villeneuve, A., Lessard, L., Quessy, S., 2006a. Fate of pathogenic and nonpathogenic microorganisms during storage of liquid hog manure in Québec. *Livestock Sci.* 102, 204-210.
- Côté, C., Massé, D.I., Quessy, S. 2006b. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. *Biores. Technol.* 97, 686-691.
- Curtis, T.P., Mara, D.D., Silva, S.A. 1992a. Influence of pH, oxygen and humic substances on ability of sunlight to damage faecal coliforms in waste stabilization pond water. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1335-1343.
- Curtis, T.P., Mara, D.D., Silva, S.A. 1992b. The effect of sunlight on faecal coliforms in ponds: implications for research and design. *Water Sci. Technol.* 26 (7,8), 1729-1738.

- Davies-Colley, R.J., Donnison, A.M., Speed, D.J. 1997. Sunlight wavelengths inactivating faecal indicator micro-organisms in waste stabilization ponds. *Water Sci. Technol.* 35 (111), 219–225.
- Davies-Colley, R.J., Donnison, A.M., Speed, D.J., Ross, C.M., Nagels, J.W. 1999. Inactivation of faecal indicator micro-organisms in waste stabilization ponds: interactions of environmental factors with sunlight. *Water Res.* 33, 1220–1230.
- Davies-Colley, R.J., Donnison, A.M., Speed, D.J. 2000. Towards a mechanistic understanding of pond disinfection. *Water Sci. Technol.* 42 (10–11), 149–158.
- Entry, J.A., Sojka, R.E. 2000. The efficacy of polyacrilamide related compounds to remove microorganisms and nutrients from animal wastewater. *J. Environ. Qual.* 29, 1905-1914.
- Entry, J.A., Phillips, I., Stratton, H., Sojka, R.E. 2003. Polyacrilamide + Al₂(SO₄)₃ and polyacrilamide + CaO remove coliform bacteria and nutrients from swine wastewater. *Environ. Poll.* 121, 453-462.
- Erlandsen, S.L., Bemrich, W.J., Wells, C.L. 1990. Axenic culture and characterization of *Giardia ardea* from the great blue heron (*Ardea herodias*). *J. Parasitol.* 76, 717-724.
- Esteban Turzo, P. 2000. Los purines: Actuaciones en Castilla y León. *Residua 2000. IV Conferencia Internacional sobre gestión de residuos. Valladolid (20-21 Noviembre) 2000.* 9pp.
- Fayer, R., Nerad, T., Rall, W., Lindsay, D.S. and Blagburn, B.L. 1991. Studies on cryopreservation of *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* 77, 357-361.
- Fayer, R. 1994. Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2732–2735.
- Fayer, R. and Nerad, T. 1996. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1431–1433.
- Fayer, R., Graczyk, T.K., Cranfield, M.R., and Trout, J.M. 1996. Gaseous disinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 908–3909.
- Fayer, R., Trout, J.M., and Jenkins, M.C. 1998. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J. Parasitol.* 84, 1165–1169.
- Fayer, R., Trout, J.M., Walsh, E., and Cole, R. 2000. Rotifers ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47 (2), 161-163.
- Ferguson, C.M., Coote, B.G., Ashbolt, N.J., and Stevenson, I.M. 1996. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Water research* 30, 2045-2054.

- Fleta, J., Sánchez-Acedo, C., Clavel, A., and Quílez, J. 1995. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extra-intestinal tissues of sheep and pigs. *Veterinary Parasitology* 59, 201-205.
- Gerba, C.P., Rose, J.B., Haas, C.N., and Crabtree, K.D. 1996. Waterborne rotavirus: A risk assessment. *Water research* 30, 2929-1940.
- Gerba, C.P., Thurston, J.A., Falabi, J.A., Watt, P.M., Karpiscak, M.M. 1999. Optimization of artificial wetland design for the removal of indicator microorganisms and pathogenic protozoa. *Water Sci. Technol.* 40, 363-368.
- Grant, S.B., Pendroy, C.P., Bellin, C.L., Mayer, J.K., and Palmer, C.J. 1996. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in raw and treated municipal sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3466-3469.
- Grimason, A.M., Smith, H.V., Thitai, W.N., Smith, P.G., Jackson, M.H., Girdwood, R.W.A., 1993. Occurrence and removal of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in Kenyan waste stabilisation ponds. *Water Sci. Technol.* 27, 97-104.
- Grimason, A.M., Wiandt, S., Baleux, B., Thitai, W.N., Bontoux, J., Smith, H.V., 1996. Occurrence and removal of *Giardia* sp. cysts by Kenyan and French waste stabilisation pond systems. *Water Sci. Technol.* 33 (7), 83-89.
- Hench, K.R., Bissonnette, G.K., Sexstone, A.J., Coleman, J.G., Garbutt, K., Skousen, J.G. 2003. Fate of physical, chemical, and microbial contaminants in domestic wastewater following treatment by small constructed wetlands. *Water Res.* 37, 921-927.
- Hernández-Delgado, E.A., and Toranzos, G.A. 1995. In situ replication studies of somatic and male-specific coliphages in a tropical pristine river. *Water Sci. Technol.* 31, 247-250.
- International Nomenclature of Diseases, 1983. *Infectious Diseases*. 1st Edition. Viral Diseases. Council for International Organizations of Medical Sciences, Switzerland.
- Jenkins, M.B., Anguish, L.J., Bowman, D.D., Walker, M.J., and Ghiorse, W.C. 1997. Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3844– 3850.
- Jenkins, M.B., Bowman, D.D. and Ghiorse, W.C. 1998. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ammonia. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 784–788.
- Jenkins, M.B., Walker, M.J., Bowman, D.D., Anthony, L.C., Ghiorse, W.C. 1999. Use of a sentinel system for field measurements of *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in soil and animal waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1998-2005.
- Jiménez, B., Maya-Rendón, C., Salgado-Velázquez, G., 2001. The elimination of helminth ova, faecal coliforms, Salmonella and protozoan cysts by various physicochemical processes in wastewater and sludge. *Water Sci. Tech.* 43(12), 179-182.

- Johnson, A.M., Linden, K., Ciociola, K.M., De Leon, R., Widmer, G., Rochelle, P.A. 2005. UV inactivation of *Cryptosporidium hominis* as measured in cell culture. *Appl Environ. Microbiol.* 71, 2800–2802.
- Kadlec, R.H., and Knight, R.L. 1996. *Treatment Wetlands*. CRC Press, Florida, 893 pp.
- Karanis, P., Kourenti, C., and Smith, H.V. 2006. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J. Water Health* (In press).
- Karpiscak, M.M., Sanchez, L.R., Freitas, R.J., Gerba, C.P. 2001. Removal of bacterial indicators and pathogens from dairy wastewater by a multi-component treatment system. *Water Sci. Technol* 44(11-12):183-190.
- Khuroo, M.S. 1996. Ascariasis. *Gastroenterology Clinics of North America* 25, 553-577.
- Korich, D.G., Mead, J.R., Madore, M.S., Sinclair, N.A., Sterling, C.R. 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and mono chloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl Environ. Microbiol.* 56, 1423–1428.
- Kulda, J., and Nohynkova, E. 1996. *Giardia* in humans and animals. En: Kreier JP (ed.) *Parasitic protozoa* 2^a ed. San Diego: Academic Press, 1996; 10:225-242.
- Mara, D. 2001. Appropriate wastewater collection, treatment and reuse in developing countries. *Proceedings of the Institution of Civil Engineers-Municipal Engineer*, 145, 299-303.
- Maurer, M. and Gujer, W. 1998. Dynamic modeling of enhanced biological phosphorus and nitrogen removal in activated sludge systems. *Water Quality International*. Vancouver, Canadá, 192-199.
- Maynard, H.E., Ouki, S.K., and Williams, S.C. 1999. Tertiary lagoons: A review of removal mechanisms and performance. *Water research* 33, 1-13.
- Morita, S., Namikoshi, A., Hirata, T., Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S., Motoyama, N., Fujiwara, M. 2002. Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5387–5393.
- Nelson, K.L., Jiménez-Cisneros, B., Tchobanoglous, G., Darby, J.L., 2004. Sludge accumulation, characteristics and pathogen inactivation in four primary waste stabilization ponds in central Mexico. *Water Res.* 38, 111-127.
- OMS, 1989. Directrices sanitarias sobre el uso de aguas residuales en agricultura y acuicultura. Informe de un Grupo Científico de la OMS. OMS, Serie de Informes Técnicos n° 778. Ginebra.

- Ottoson, J., Hansen, A., Björleinius, B., Norder, H., Stenström, T.A. 2006. Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. *Water Res.* 40, 1449–1457.
- Perkins, J., and Hunter, C. 2000. Removal of enteric bacteria in a surface flow constructed wetland in Yorkshire, England. *Water Res.* 34(6):1941-1947.
- Puigagut, J., Villaseñor, J., Salas, J.J., Bécares, E., García, J. 2007. Subsurface-flow constructed wetlands in Spain for the sanitation of small communities: A comparative study. *Ecol. Eng.* 30, 312-319.
- Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., Clavel, A., del Cacho, E., and López-Bernad, F. 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology* 67, 83-88.
- Ransome, M.E., Whitmore, T.N. and Carrington, E.G. 1993. Effect of disinfectants on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Water Supply* 11, 103–117.
- Robertson, L.J., Campbell, A.T., and Smith, H.V. 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3494–3500.
- Robertson, L.J., Paton, C.A., Campbell, A.T., Smith, P.G., Jackson, M.H., Gilmour, R.A., Black, S.E., Stevenson, D.A. and Smith, H.V. 2000. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. *Water Res.* 34, 2310-2322.
- Robertson, L.J., Hermansen, L., Gjerde, B.K. 2006. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (8), 5297–5303.
- Rossi, P., Pozio, E. and Besse, M.G. 1990. Cryopreservation of *Cryptosporidium* oocysts. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 68.
- Ruxton, G.D. 1995. Mathematical modelling of ammonia volatilization from slurry stores and its effects on *Cryptosporidium* oocyst viability. *J. Agric. Sci.* 124, 55–60.
- Schwartzbrod, J., 2003. Quantification and viability determination for helminth eggs in sludge (Modified EPA Method 1999). University of Nancy.
- Shuval, H., Yekutieli, P., and Fattal, B. 1986. An epidemiological model of the potential health risk associated with various pathogens in wastewater irrigation. *Water Sci. Tech.* 18, 191-198.
- Smith, H.V. and Ronald, A. 2002. *Cryptosporidium*: the analytical challenge. In *Cryptosporidium: The Analytical Challenge*, chapter 1 ed Smith, M. and Thompson, K. pp. 1–43 Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.

- Smith, H.V., Nichols, R.A.B., and Grimason, A.M. 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion – getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol.* 21, 133–142.
- Sojka, R.E., Entry, J.A., 2000. Influence of polyacrilamide application to soil on movement of microorganisms in runoff water. *Environ. Poll.* 108, 405-412.
- Stott, R., May, E., Matsushita, E., Warren, A. 2001. Protozoan predation as a mechanism for the removal of *Cryptosporidium* oocysts from wastewater in constructed wetlands. *Water Sci. Technol.* 44, 191-198.
- Stott, R., May, E., Ramirez, E., Warren, A. 2003. Predation of *Cryptosporidium* oocysts by protozoa and rotifers: implications for water quality and public health. *Water Sci. Technol.* 47 (3), 77-83.
- Vanotti, M.B., Hunt, P.G. 1999. Solids and nutrient removal from flushed swine manure using polyacrylamides. *Transactions of the ASAE* 42 (6), 1833-1840.
- Vanotti, M.B., Millner, P.D., Hunt, P.G., Ellison, A.Q. 2005. Removal of pathogen and indicator microorganisms from liquid swine manure in multi-step biological and chemical treatment. *Biores. Technol.* 96, 209-214.
- Venglovsky, J., Martinez, J., Placha, I. 2006. Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. *Livestock Sci.* 102, 197-203.
- Vesey, G., Slade, J.S., Byrne, M., Shepherd, K., and Fricker, C.R. 1993. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 82-86.
- Villacorta, I., Ares-Mazas, E. and Lorenzo, M.J. 1991. *Cryptosporidium parvum* in cattle, sheep and pigs in Galicia (N.W. Spain). *Veterinary Parasitology* 38, 249-252.
- Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P.F., Green, M.B., and Haberl, R. 1998. *Constructed Wetlands for Wastewater Treatment in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, 366 pp.
- Vymazal, J. 2002. The use of sub-surface constructed wetlands for wastewater treatment in the Czech Republic: 10 years' experience. *Ecol. Eng.* 18, 633-646.
- Walker, M., Leddy, K., and Hagar, E. 2001. Effects of combined water potential and temperature stresses on *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5526–5529.
- Whitmore, T.N. and Robertson, L.J. 1995. The effect of sewage sludge treatment processes on oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *J. Appl. Bact.* 78, 34-38.
- Williams, J., Bahgat, M., May, E., Ford, M., Butler, J. 1995. Mineralisation and pathogen removal in gravel bed hydroponic constructed wetlands for wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 32, 49-58.

CAPÍTULO 8. ANEXOS



CHAPTER 8. ANNEXS

Anexo A. Protocolo de concentración y cuantificación de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en agua residual. Método floculación con CaCO_3 (Vesey et al., 1993)

1. Recoger un volumen de muestra de 10 litros de cada punto a analizar.
2. Añadir 100 ml de una solución de cloruro cálcico (CaCl_2) 1 M y 100 ml de una solución de bicarbonato sódico (NaHCO_3) 1 M.
3. Ajustar el pH de la mezcla a $10 \pm 0,05$ con hidróxido sódico (NaOH) 4 N, dejándolo decantar durante 4 horas.
4. Decantar el sobrenadante y resuspender los flóculos añadiendo ácido sulfámico (H_2NSO_3) al 10%.
5. Centrifugar a 4000 r.p.m durante 10 minutos.
6. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet con una solución de PBS 1X– Tween-80 al 0,01%. Repetir el proceso de lavado 2 veces más (la última con agua miliQ) hasta dejarlo en 1 ml.
7. Colocar una alícuota de 100 μl del concentrado final en una placa de microscopía (esta alícuota se someterá a la detección y cuantificación mediante inmunofluorescencia directa) y dejarla secar a temperatura ambiente.
8. Fijar la muestra con metanol y secar a temperatura ambiente.
9. Añadir 25 μl del anticuerpo (FITC-mAb) y colocar la placa en una cámara húmeda para incubar en oscuridad durante 1 hora a 37 °C.
10. Aspirar el exceso de anticuerpo
11. Aplicar 50 μl de PBS 1X y dejarlo durante 2 minutos.
12. Aspirar el PBS y volver a aplicar 50 μl de PBS 1X, dejarlo durante 2 minutos.
13. Aspirar el PBS y aplicar 50 μl de una solución 1:5000 DAPI en PBS, dejarlo durante 2 minutos.
14. Aspirar el DAPI y aplicar 50 μl de agua miliQ, dejarlo durante 2-3 segundos.
15. Aspirar el agua y dejarlo secar a temperatura ambiente.
16. Aplicar 10 μl del medio de montaje, colocar encima el cubre y examinar bajo microscopio de fluorescencia (con el objetivo de 40X y sin aceite de inmersión).

Anexo B. Protocolo de concentración y cuantificación de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en purín de cerdo. Método sacarosa (Bukhari et al., 1997)

1. Homogeneizar la muestra (agitar el bote que contiene el purín durante unos segundos) y recoger un volumen de 1 ml de cada punto a analizar.
2. Trasladarlo a un tubo falcon (50 ml) previamente rotulado y rellenar el tubo con agua miliQ.
3. Agitar y centrifugar a 4000 r.p.m durante 5 minutos.
4. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet con agua miliQ. Repetir el proceso de lavado 2 veces más hasta dejarlo en 5 ml.
5. Añadir un volumen igual de una solución de sacarosa 1 M (specific gravity 1.18) y centrifugar a 4000 r.p.m durante 15 minutos con el fin de concentrar los quistes en la interfase agua/sacarosa.
6. Recoger dicha interfase y trasladarla a otro tubo falcon (50 ml).
7. Rellenar con agua miliQ.
8. Centrifugar a 4000 r.p.m durante 5 minutos.
9. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet con agua miliQ. Repetir el proceso de lavado 2 veces más hasta dejarlo en 1 ml.
10. Colocar una alícuota de 100 µl del concentrado final en una placa de microscopía (esta alícuota se someterá a la detección y cuantificación mediante inmunofluorescencia directa) y dejarla secar a temperatura ambiente.
11. Fijar la muestra con metanol y secar a temperatura ambiente.
12. Añadir 25 µl del anticuerpo (FITC-mAb) y colocar la placa en una cámara húmeda para incubar en oscuridad durante 1 hora a 37 °C.
13. Aspirar el exceso de anticuerpo.
14. Aplicar 50µl de PBS 1X y dejarlo durante 2 minutos.
15. Aspirar el PBS y volver a aplicar 50µl de PBS 1X, dejarlo durante 2 minutos.
16. Aspirar el PBS y aplicar 50µl de una solución 1:5000 DAPI en PBS, dejarlo durante 2 minutos.
17. Aspirar el DAPI y aplicar 50µl de agua miliQ, dejarlo durante 2-3 segundos.
18. Aspirar el agua y dejarlo secar a temperatura ambiente.
19. Aplicar 10 µl del medio de montaje, colocar encima el cubre y examinar bajo microscopio de fluorescencia (con el objetivo de 40X y sin aceite de inmersión).

Anexo C. Protocolo de concentración y cuantificación de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en fango (sedimento)

1. Recoger un volumen de muestra de 100 ml de cada punto a analizar.
2. Añadir una solución de Tween 80 al 10% al volumen de muestra anterior (1:100), es decir, añadir 1 ml de Tween 80 al 10% a 100 ml de fango.
3. Mezclar y agitar vigorosamente durante 5 minutos.
4. Coger una alícuota de 20 ml de fango y mezclarla con 30 ml de agua miliQ (vortex durante 2 minutos).
5. Después de la homogenización, pasar la muestra a través de una serie de dos cribas de malla paulatinamente más fina (primero por 2 mm y luego por 300µm) para eliminar las fibras y otros materiales grandes.
6. Colocar las muestras en botes de centrífuga de plástico y centrifugar a 4000 r.p.m. durante 10 minutos.
7. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet con una solución de PBS 1X– Tween-80 al 0,01%. Repetir el proceso de lavado 2 veces más (la última con agua miliQ) hasta dejarlo en 1 ml.
8. Colocar una alícuota de 100 µl del concentrado final en una placa de microscopía (esta alícuota se someterá a la detección y cuantificación mediante inmunofluorescencia directa) y dejarla secar a temperatura ambiente.
9. Fijar la muestra con metanol y secar a temperatura ambiente.
10. Añadir 25 µl del anticuerpo (FITC-mAb) y colocar la placa en una cámara húmeda para incubar en oscuridad durante 1 hora a 37 °C.
11. Aspirar el exceso de anticuerpo.
12. Aplicar 50µl de PBS 1X y dejarlo durante 2 minutos.
13. Aspirar el PBS y volver a aplicar 50µl de PBS 1X, dejarlo durante 2 minutos.
14. Aspirar el PBS y aplicar 50µl de una solución 1:5000 DAPI en PBS, dejarlo durante 2 minutos.
15. Aspirar el DAPI y aplicar 50µl de agua miliQ, dejarlo durante 2-3 segundos.
16. Aspirar el agua y dejarlo secar a temperatura ambiente.
17. Aplicar 10 µl del medio de montaje, colocar encima el cubre y examinar bajo microscopio de fluorescencia (con el objetivo de 40X y sin aceite de inmersión).

Anexo D. Protocolo de concentración, identificación y recuento de huevos de helmintos en agua residual. Método Bailenger modificado (Bouhoum and Schwartzbrod, 1989)

1. Recoger un volumen de muestra de 10 litros de cada punto a muestrear.

Sedimentación

2. Someter a cada muestra a un proceso de sedimentación en un recipiente abierto de paredes rectas durante 24 horas.
3. Eliminar el 90% del sobrenadante y transferir el pellet-sedimento (\pm 1L) a un vaso de precipitados de 1000 ml.

Acondicionamiento

4. Añadir 35 gotas de Tritón X-100 al volumen de muestra anterior (\pm 1L), agitar manualmente o con la ayuda de un agitador magnético durante 5 minutos y filtrar mediante malla de 1mm de diámetro, ayudado con agua de lavado.
5. Dejar sedimentar la muestra final durante 24 horas.
6. Eliminar el sobrenadante y recoger aproximadamente 100 ml de sedimento.

Concentración

7. Transferir el sedimento obtenido a dos tubos de 50 ml y centrifugar a 2400 r.p.m. durante 15 minutos.
8. Eliminar el líquido sobrenadante y resuspender el sedimento obtenido en una solución amortiguadora acetoacética (solución tampón acetato-acético pH= 4,5: acetato sódico 15 g; ácido acético 3,6 ml; agua destilada hasta 1l) en un volumen igual al volumen del sedimento, homogeneizando la muestra.
9. Agregar un volumen de éter-dietílico o de acetato de etilo igual al doble del volumen de la suspensión anterior.
10. Agitar vigorosamente y centrifugar a 2400 r.p.m. durante 15 minutos (se obtiene una distribución difásica con: fase etérea superior, tapón sólido lipófilo intermedio, fase acuosa inferior y sedimento sólido).
11. Eliminar la fase etérea, el tapón lipófilo, la fase acuosa y conservar el sedimento.
12. Resuspender el sedimento en un volumen igual a 5 veces el del sedimento en una solución de $ZnSO_4$ (33 %, densidad relativa de 1,18) y centrifugar a 2400 r.p.m. durante 15 minutos.

Observación, identificación y recuento

13. Recoger cuidadosamente, con la ayuda de una pipeta Pasteur, la película fina de la parte superior del sobrenadante donde se encuentran concentrados los huevos y transferirla a un portaobjetos de MacMaster.
14. Antes de proceder al estudio microscópico de la preparación en el portaobjetos, dejar éste en reposo en la platina del microscopio durante algunos minutos para que las estructuras queden flotando en la superficie del líquido contenido en la cámara.
15. Realizar la observación al microscopio con el objetivo de 20X, revisando toda la capa superficial del tubo de centrifuga.

Determinación cuantitativa

El cálculo para la determinación del número total de huevos de helmintos por litro que contiene la muestra inicial de agua residual se calcula con la siguiente fórmula:

$$N = X / P \times V / S$$

N = número de huevos (litro)

X = número de huevos contados

P = volumen del producto en la cámara de recuento (ml)

V = volumen total de la solución final de trabajo (ml)

S = volumen de la muestra de agua residual (litros)

Debido al bajo número de huevos que se observaron normalmente, no se usó esta fórmula de recuento, si no que se observó la totalidad de los mililitros del sobrenadante recogidos por flotación, observándose todo el espacio de la cámara Mac Master y no exclusivamente el interior de la retícula.

Anexo E. Protocolo de concentración, identificación y recuento de huevos de helmintos en fango y purín de cerdo (Schwartzbrod, 2003)

1. Recoger un volumen de muestra de 100 ml de cada punto a muestrear.

Acondicionamiento

2. Añadir 30 gotas de Tritón X-100 al volumen de muestra anterior (\pm 100 ml), diluir cada muestra en 100 ml de agua destilada, agitar a alta velocidad con una batidora durante 1 minuto y filtrar mediante malla de 1mm de diámetro, ayudado con agua de lavado.
3. Dejar sedimentar la muestra final durante 24 horas.
4. Eliminar el sobrenadante y recoger aproximadamente 100 ml de sedimento (siempre acompañado de un cierto volumen de sobrenadante).

Concentración

5. Transferir el sedimento obtenido a dos tubos de 50 ml y centrifugar a 2400 r.p.m. durante 15 minutos.
6. Eliminar el líquido sobrenadante y resuspender el sedimento obtenido en una solución amortiguadora acetoacética (solución tampón acetato-acético pH= 4,5: acetato sódico 15 g; ácido acético 3,6 ml; agua destilada hasta 11) en un volumen igual al volumen del sedimento, homogeneizando la muestra.
7. Agregar un volumen de éter-dietílico o de acetato de etilo igual al doble del volumen de la suspensión anterior.
8. Agitar vigorosamente y centrifugar a 2400 r.p.m. durante 15 minutos (se obtiene una distribución difásica con: fase etérea superior, tapón sólido lipófilo intermedio, fase acuosa inferior y sedimento sólido).
9. Eliminar la fase etérea, el tapón lipófilo, la fase acuosa y conservar el sedimento.
10. Resuspender el sedimento en un volumen igual a 5 veces el del sedimento en una solución de $ZnSO_4$ (33 %, densidad relativa de 1,18) y centrifugar a 2400 r.p.m. durante 15 minutos.

Observación, identificación y recuento

11. Recoger cuidadosamente, con la ayuda de una pipeta Pasteur, la película fina de la parte superior del sobrenadante donde se encuentran concentrados los huevos y transferirla a un portaobjetos de MacMaster.

12. Antes de proceder al estudio microscópico de la preparación en el portaobjetos, dejar éste en reposo en la platina del microscopio durante algunos minutos para que las estructuras queden flotando en la superficie del líquido contenido en la cámara.
13. Realizar la observación al microscopio con el objetivo de 20X, revisando toda la capa superficial del tubo de centrifuga.

Determinación cuantitativa

El cálculo para la determinación de los huevos por Kilogramo de materia seca en muestras de fangos líquidos, asumiendo una densidad del fango igual a 1, es el siguiente:

$$N = \frac{n \times V}{MS / 100} \times 1000$$

N = número de huevos por Kilogramo de materia seca (h/Kg m.s.)

n = número de huevos contados

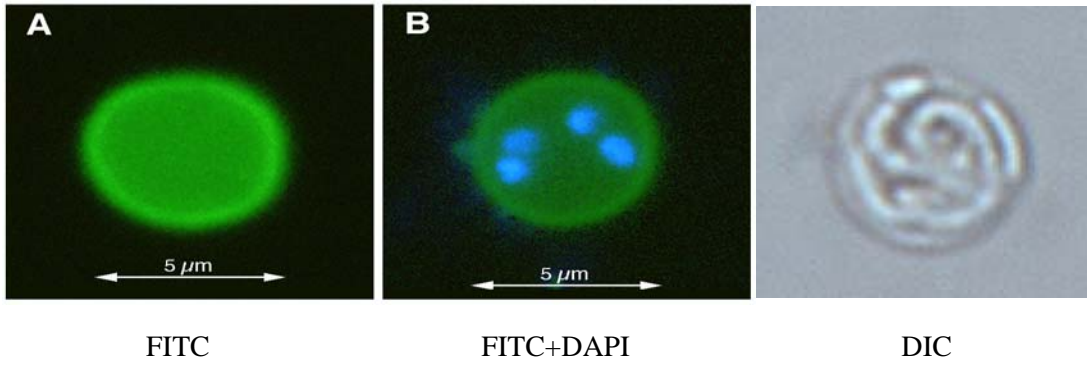
V = volumen de fango analizado en ml

MS = materia seca del fango analizado (% en peso)

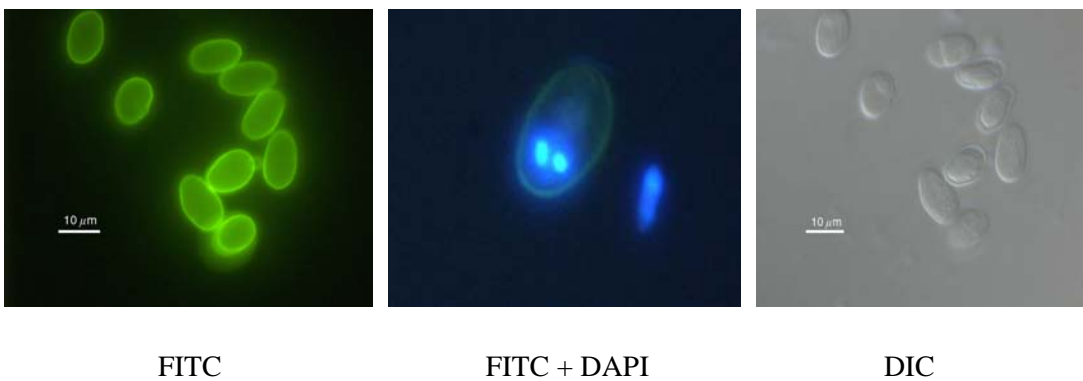
Debido al bajo número de huevos que se observaron normalmente, no se usó esta fórmula de recuento, si no que se observó la totalidad de los mililitros del sobrenadante recogidos por flotación, observándose todo el espacio de la cámara MacMaster y no exclusivamente el interior de la retícula.

Anexo F. Fotografías de los principales parásitos encontrados en esta tesis

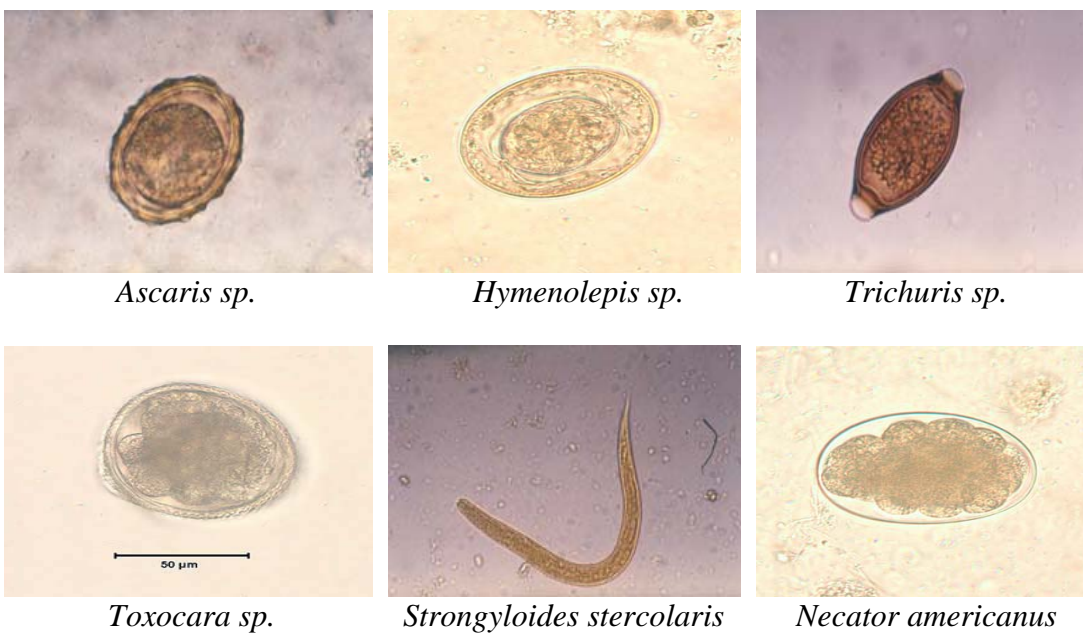
- *Cryptosporidium sp.*



- *Giardia sp.*



- **Helmintos**



CAPÍTULO 9. ARTÍCULOS I-V



CHAPTER 9. PAPERS I-V

ORIGINAL ARTICLE

Effect of various environmental factors on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocystsR. Reinoso^{1,2}, E. Becares³ and H.V. Smith²

1 Environmental Research Institute, University of León, León, Spain

2 Scottish Parasite Diagnostic Laboratory, Stobhill Hospital, Glasgow, Scotland, United Kingdom

3 Department of Ecology, Faculty of Biological and Environmental Sciences, University of León, León, Spain

Keywordsammonia, *Cryptosporidium parvum*, pH, temperature, viability, water.**Correspondence**

Roberto Reinoso, Environmental Research Institute, University of León, La Serna 58, 24007 León, Spain. E-mail: rreit@unileon.es

2007/1769: received 15 December 2006, revised 26 June 2007 and accepted 12 September 2007

doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03620.x

Abstract**Aims:** To evaluate individual and combined effects of temperature (4, 18 and 25°C), pH (7 and 10), ammonia (5 and 50 mg l⁻¹) and exposure time (1, 2, 4 and 6 days) on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water.**Methods and Results:** The viability of oocysts was evaluated using the fluorogenic vital dyes assay (4',6-diamidino-2-phenylindole and propidium iodide). All the factors analysed (temperature, pH, ammonia and exposure time) and their interaction were statistically significant ($P < 0.005$). Exposure of oocysts to pH 10 for 6 days at 25°C reduced oocyst viability from ~80% to 51%. Similarly, the exposure of *C. parvum* oocysts to 5 mg NH₃ l⁻¹ and 50 mg NH₃ l⁻¹ for 4 days reduced their viability from between ~80% to 41.5% and 14.8%, respectively.**Conclusions:** The interaction between pH, temperature and exposure time may have adverse effects on the survival of *C. parvum* oocysts in water. Low concentrations of ammonia, as commonly found in alga-based wastewater systems, over a long period of time can produce high *C. parvum* oocyst inactivation rates.**Significance and Impact of the Study:** This study provides relevant data on the inactivation of *C. parvum* oocysts in alga-based wastewater-treatment systems in the northwest of Spain.**Introduction**

The increased requirement for wastewater reuse has resulted in attention being focussed on wastewater-treatment processes and their ability to inactivate or reduce the numbers of pathogens to acceptable levels (Cooper 1991). The apicomplexan parasite, *Cryptosporidium*, is responsible for numerous outbreaks of human disease (Cacció *et al.* 2005; Karanis *et al.* 2006). Cryptosporidiosis is also of veterinary importance as livestock can be infected with various *Cryptosporidium* species that cause morbidity, with subsequent economic consequences. *Cryptosporidium* infects a large range of host species, and the infected hosts can excrete large numbers of viable, environmentally robust oocysts that contaminate wastewater, watersheds, surface and ground waters.

Cryptosporidium parvum is the major species responsible for clinical disease in humans and other neonatal mammals. The broad host range of *C. parvum*, together with the high output of oocysts, ensures a high level of contamination in the environment and both infected human beings and livestock can contribute to the numbers of waterborne oocysts both through sewage effluent discharges, including those containing contributions from abattoirs, and the disposal of sewage sludge to land.

Cryptosporidium spp. oocysts are common contaminants of water, and have been responsible for numerous outbreaks of waterborne disease (Fayer *et al.* 2000; Gold and Smith 2001), yet oocysts can be detected in drinking water in the absence of disease in the community (Smith and Grimason 2003; Savioli *et al.* 2006). Robertson *et al.* (2000) demonstrated that, while conventional sewage

treatment works can reduce the number of oocysts discharged into receiving waters, oocyst viability was only slightly reduced by passage through sewage treatment processes.

Oocyst survival in the environment, particularly in raw water and wastewater, has also been studied. Numerous studies have evaluated the effects of individual environmental factors on *C. parvum* oocyst viability, including temperature (Rossi *et al.* 1990; Fayer *et al.* 1991, 1998; Fayer 1994; Fayer and Nerad 1996; Jenkins *et al.* 1997), pH (Robertson *et al.* 1992; Araki *et al.* 2001), ammonia (Ransome *et al.* 1993; Ruxton 1995; Fayer *et al.* 1996; Jenkins *et al.* 1998) and ultraviolet light (Lorenzo-Lorenzo *et al.* 1993; Campbell *et al.* 1995). However, little information is available on the synergistic effects of these factors on *C. parvum* oocyst viability, particularly in relation to their inactivation in wastewater-treatment plants. Araki *et al.* (2001) demonstrated that the physico-chemical environment of high-rate algae ponds was responsible for the naturally occurring, high inactivation rates. Ammonia, pH and light were presumably the factors responsible for oocyst death under those experimental conditions. In the present study, we investigated both the individual and combined effects of pH, temperature, ammonia and exposure time on *C. parvum* oocyst viability, using the fluorogenic vital dyes assay (Campbell *et al.* 1992), in order to simulate environmental conditions known to be present in alga-based wastewater-treatment systems in the north-west of Spain.

Materials and methods

Source of *Cryptosporidium* oocysts

Purified *C. parvum* oocysts were purchased from the Moredun Scientific Ltd., Edinburgh, UK, and stored in reverse osmosis water at 4°C until used (1 week after shedding). These oocysts were propagated in lambs and purified by acid flocculation according to Hill *et al.* (1990) by Moredun Scientific Ltd, UK.

Experimental design

Four different environmental factors (temperature, pH, ammonia and exposure time) were selected and combined for monitoring oocyst survival. Initially, *C. parvum* oocysts were exposed to different temperatures (4, 18 and 25°C) and different pH levels (7 and 10) for 1, 2, 4 and 6 days and their viability, compared with untreated controls, determined. Subsequently, *C. parvum* oocysts were exposed to different concentrations of ammonia (0, 5 and 50 mg l⁻¹) for 1, 2 and 4 days at pH 7 and at 25°C. For each trial, oocysts were initially suspended in Hanks'

balanced salt solution (HBSS; pH 7.2) at a concentration to 10⁶ ml⁻¹ (20 µl of 10⁸ purified *C. parvum* oocysts in 980 µl of HBSS) and subjected to different experimental treatments. The viability of the appropriate control was assessed and compared with its experimental counterpart. All treatments were conducted in duplicate.

Determination of ammonia concentrations

Ammonia concentrations were determined using a colorimetric method based on the spectrophotometric determination of the indophenol blue complex formed by the reaction of ammonia with phenol and alkaline hypochlorite in an alkaline medium (Berthelot reaction) (Berthelot 1859). A stock solution containing 2500 mg l⁻¹ ammonium-N was prepared by dissolving 1.179 g (NH₄)₂SO₄ in distilled water and diluting to 100 ml. Working solutions (diluted standard solutions) in the range 10–100 µg N per 100 ml were prepared by suitable dilution of the stock solution. Three millilitres each of sodium hypochlorite (12.5 g NaOH and 4.5 ml of sodium hypochlorite in 500 ml water) and phenol (25 g phenol and 125 mg of Na nitroprusside in 500 ml water) reagents were added to 10 ml each of the diluted standard solutions (0, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 µg N per 100 ml), mixed thoroughly, and incubated for 45 min in the dark at room temperature to develop the colour. The blue colour (indophenol) that develops is stable for at least 1 h. The absorbance of the standards (calibration curve) and the samples over time was measured in an UV-visible spectrophotometer. The spectrophotometer was set to 0 absorbance at 635 nm against the contents of the tube containing 0 µg N per 100 ml (blank). The concentrations of ammonia over time were calculated according to the following equation:

$$\text{Concentration of NH}_3 = (\text{Abs sample}/\text{Abs standard}) \\ \times \text{concentration of the standard}$$

where Abs is the absorbance at 635 nm.

Assessment of oocyst viability using fluorogenic vital dyes (DAPI/ PI) assay

Oocyst viability was determined using the fluorogenic vital dyes assay described by Campbell *et al.* (1992, 1993) based on the morphology and the inclusion or exclusion of two vital dyes, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and propidium iodide (PI). To maximize vital dye uptake, oocysts were acidified by incubation in acidified HBSS (pH 2.75, 1 h, 37°C). Each sample was washed three times with HBSS (pH 7.2) and concentrated to 100 µl. Then, 10 µl of working solution of DAPI (2 mg ml⁻¹ in absolute methanol) and 10 µl of working

solution of PI (1 mg ml⁻¹ in 0.1 mol l⁻¹ PBS (phosphate buffered saline), pH 7.2) were added and incubated for 1.5 h at 37°C. Following incubation, 6 µl of FITC (fluorescein isothiocyanate)-labelled anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody (FITC-mAb; Crypt-a-glo, A400FLR-20x) were added and the samples were incubated for a further 30 min. Labelled oocysts were washed three times with HBSS (pH 7.2) and analysed immediately by epifluorescence and Nomarski differential interference contrast (DIC) microscopy. A 10-µl subsample per replicate sample was viewed under both epifluorescence and DIC optics on an Olympus BH2 microscope equipped with a blue filter (480 nm excitation, 520 nm emission) for the detection of FITC-mAb-labelled oocysts, a UV filter block (350 nm excitation, 450 nm emission) for DAPI and a green filter block (500 nm excitation, 630 nm emission) for PI. Proportions of: (i) viable oocysts that include DAPI but exclude PI (DAPI+/PI-); (ii) nonviable oocysts that include DAPI and PI (DAPI+/PI+); (iii) potentially infectious oocysts that do not include either DAPI or PI, but have 'viable type' contents by DIC microscopy (DAPI-/PI-, viable after further trigger); (iv) empty oocysts which have no recognizable contents by DIC microscopy and which include neither DAPI nor PI (DAPI-/PI-, nonviable) were quantified by enumerating 100 oocysts in each subsample. Three replicate counts were performed for each subsample. The sum of DAPI+/PI- and DAPI-/PI- with the content oocysts was the number of viable oocysts.

Assessment of oocyst viability using the maximized *in vitro* excystation assay

The viability of stock oocysts was also determined using the maximized *in vitro* excystation assay (Robertson *et al.* 1993). Stock solutions of bile [1% bovine bile in Hanks' minimum essential medium (HMEM)] and sodium hydrogen carbonate (0.4% NaHCO₃ in distilled water) were prepared. Oocysts were incubated in 1 ml of acidified HBSS (pH 2.75) for 1 h at 37°C in order to maximize excystation. Following acidification, oocysts were washed thoroughly (three times) with HBSS (pH 7.2) to remove any residual acid and re-suspended in HBSS (pH 7.2) to a volume of 100 µl. Then, 250 µl of freshly prepared mixture of 200 µl bile and 50 µl NaHCO₃ were added to each sample. The suspensions were mixed on a Vortex mixer and incubated for 30 min at 37°C. Following incubation, 10 µl aliquots of oocyst suspension were removed to determine sporozoite ratio. The oocysts were incubated for a further 3.5 h at 37°C and the proportions of intact, partially excysted and totally excysted oocysts (empty oocysts) were determined. The percentage of excystation was calculated as follows:

$$\frac{[(\text{No. empty} + \text{no. partially excysted oocysts}) / \text{total no. oocysts counted}] \times 100}{}$$

where the number of empty oocysts present before excystation is subtracted from the number after excystation.

Statistics

Statistical analysis was performed using the repeated measures analysis of variance (ANOVA) with $P < 0.05$ as the criterion of significance. The data were logarithmically transformed when necessary to fulfil ANOVA assumptions.

Results

Using the fluorogenic vital dyes assay, the viability of untreated oocysts was between 80% and 82% ± 0.71 during the duration of the trials, and 89% ($n = 2$) using the maximized *in vitro* excystation assay. Both pH and temperature caused oocyst viability to decrease slightly over time (Fig. 1), being significantly lower ($P < 0.05$) (6 days at 4°C, 4 days onwards at 18°C, 4 days onwards at pH 7 at 25°C, 2 days onwards at pH 10 at 25°C) than their respective untreated controls. Temperature was more influential than pH in *C. parvum* oocyst inactivation. Significant differences ($P < 0.05$) were observed when oocysts were suspended at pH 7 and 10 at 18°C and 25°C after 6 days' exposure, but not at 4°C. Likewise, significant differences ($P < 0.05$) were observed when oocysts were suspended at: (i) 4 and 25°C after 6 days exposure at pH 7; (ii) from 4 days exposure onwards at pH 10; (iii) 4 and 18°C after 6 days exposure at pH 10; and (iv) 18 and 25°C after 6 days' exposure at pH 10 (Fig. 1). Our results indicate that increasing alkalinity, temperature and exposure time increase oocyst killing (increased occurrence of DAPI+/PI+ oocysts) and reduced oocyst viability (reduced occurrence of DAPI+/PI- oocysts). The lowest occurrence of DAPI+/PI- oocysts (50%) and the highest occurrence of DAPI+/PI+ oocysts (45%) occurred after 6 days' exposure at 25°C at pH 10 (Fig. 1).

Interactions between pH, temperature and exposure time were also investigated, and the results of the ANOVA are summarized in Table 1. The results indicate that all factors investigated in this analysis, including interaction between factors, had significant effects ($P < 0.001$) on *C. parvum* oocyst viability (Table 1). However, we also demonstrate that, even under the most aggressive conditions (temperature 25°C, pH 10 and exposure time of 6 days) that 51% ± 0.47% of oocysts survive.

Ammonia significantly reduced ($P < 0.001$) *C. parvum* oocyst viability. Low concentrations of ammonia (5 and 50 mg l⁻¹) over prolonged periods of time (1, 2, 3 and 4 days) produced significant reductions ($P < 0.001$) in *C.*

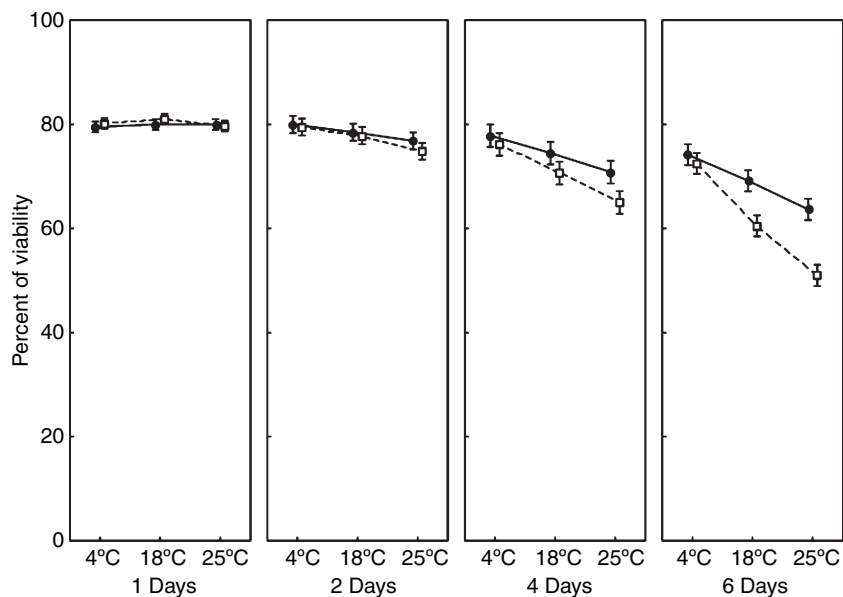


Figure 1 Viability of *C. parvum* oocysts exposed to different temperatures (4°C, 18°C and 25°C) and different pHs, 7 (●) and 10 (□) for 1, 2, 4 and 6 days. Each datum point represents the mean \pm standard error of two replicates, with 300 oocysts enumerated per replicate.

Table 1 Statistical analyses of interactions between pH, temperature and time, and between ammonia and time

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F ratio	P value
Interactions between pH, temperature and time (ANOVA)					
Intercept	167.1752	1	167.1752	2875.584	0.000000
pH	0.0050	1	0.0050	86	0.000089
Temperature	0.0174	2	0.0087	150	0.000008
Time	0.0619	3	0.0206	568	0.000000
pH \times temperature	0.0021	2	0.0010	18	0.002989
Time \times pH	0.0058	3	0.0019	53	0.000000
Time \times temperature	0.0136	6	0.0023	63	0.000000
Time \times pH \times temperature	0.0022	6	0.0004	10	0.000069
Error	0.0007	18	0.0000		
Interactions between ammonia and time (ANOVA)					
Intercept	51.77389	1	51.77389	6532.621	0.000000
Ammonia	0.46036	2	0.23018	2904.3	0.000012
Time	0.22293	2	0.11147	2121.2	0.000000
Time \times ammonia	0.14794	4	0.03699	703.8	0.000000
Error	0.00032	6	0.00005		

ANOVA, analysis of variance.

\times Interaction.

parvum oocyst viability (Fig. 2). After 4 days at 5 and 50 mg NH₃ per litre, oocyst viability was reduced from 81% to 41.5% \pm 0.24 and 14.8% \pm 0.71, respectively (Fig. 2). Significant differences ($P < 0.05$) were observed in oocyst viability at different ammonia concentrations (0, 5 and 50 mg l⁻¹). For each sampling time, the concentration of ammonia was measured (Fig. 2). Increasing ammonia concentration and exposure time resulted in the increased occurrence of both DAPI+/PI+ and empty oocysts and a

reduced occurrence of DAPI+/PI- oocysts. Initially, about 80% of the oocyst population were viable, but after 4 days' exposure to 5 mg NH₃ per litre, the proportion of viable (DAPI+/PI-) oocysts (41%) was slightly less than the proportion of dead (DAPI+/PI+) oocysts (48%), while after 4 days' exposure to 50 mg NH₃ per litre, the proportion of DAPI+/PI- oocysts (14%) was considerably less than the proportion of DAPI+/PI+ oocysts (73%). During this time, the proportion of empty oocysts increased to a level that was significantly higher than in the stock, untreated oocysts (Fig. 2, Table 1; $P < 0.05$).

Discussion

The survival of *C. parvum* oocysts in aquatic habitats may be affected by different environmental factors (Lim *et al.* 1999; Olson *et al.* 1999; Nasser *et al.* 2003). The repeated measure ANOVA used in the present study showed that all factors analysed (temperature, pH, ammonia and exposure time) and their interaction were statistically significant ($P < 0.005$; Table 1). Similar results, but with different variables, were obtained by other authors in previous studies. Freire-Santos *et al.* (1999, 2000) analysed the combined influence of salinity and temperature on *C. parvum* oocyst viability and Walker *et al.* (2001) studied the combined effect of water potential and temperature stress on *C. parvum* oocysts. In both situations, interaction between these factors was statistically significant ($P < 0.005$).

Numerous studies have been published identifying the effect of exposure to extreme temperatures (< -5 and $> 35^\circ\text{C}$) on *C. parvum* oocyst viability (Fayer *et al.* 1991; Fayer and Nerad 1996; Jenkins *et al.* 1997). Fayer (1994)

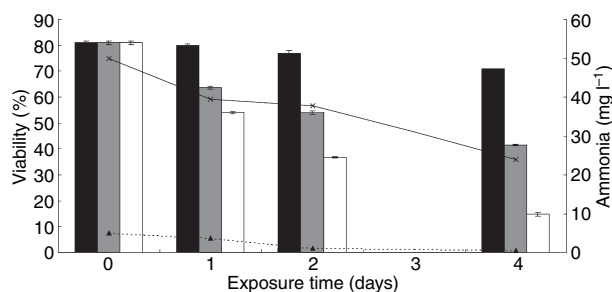


Figure 2 Effect of ammonia and time on *C. parvum* oocyst viability. Each bar represents the mean \pm standard error of two replicates, with 300 oocysts enumerated per replicate. Oocysts were exposed to various initial ammonia concentrations, 0 (■), 5 (▒) and 50 mg l⁻¹ (□) for 1, 2 and 4 days at pH 7 at 25°C (columns). The ammonia concentrations were measured during the course of the experiment, 5 (▲) and 50 mg l⁻¹ (x) (lines).

found that *C. parvum* oocysts suspended in water were rendered noninfectious when temperatures reached 64.2°C or higher for 2 min or longer, although some oocysts held in 59.7°C water for 5 min retained their infectivity. The same author later showed that two out of 10 tested mice produced light infections after ingesting oocysts treated at 35°C for a week (Fayer *et al.* 1998). Temperatures below 0°C do not kill all oocysts but snap freezing has shown to substantially reduce oocysts viability (Robertson *et al.* 1992). Fayer and Nerad (1996) demonstrated that freezing aqueous suspensions of oocysts at -70°C for 1 h or -20°C for 24 h or longer rendered oocysts noninfectious for mice. In contrast, an earlier study reported that a small proportion of oocysts was capable of surviving at least 775 h at -22°C (Robertson *et al.* 1992). Likewise, the effect of exposure to high and low pH on *C. parvum* oocyst viability have been documented (Robertson *et al.* 1992; Drozd and Schwartzbrod 1996; Araki *et al.* 2001). Campbell *et al.* (1992) reported that 1-h exposure to 0.1 mol l⁻¹ HCl (~pH 1) inactivated a significant fraction of suspended oocysts. Similarly, the same author showed an important reduction in the proportion of viable oocysts by 1-h incubation in 0.1 mol l⁻¹ NaOH (~pH 13). These results demonstrate the importance of pH and temperature as significant factors in the inactivation of oocysts. Increasing acidity and temperature increases the oocyst wall permeability, enabling the transduction of external signals to sporozoites across the oocyst wall, resulting in parasite-specific intracellular responses that initiate excystation (Smith *et al.* 2005). However, little information is available on how long oocysts might retain infectivity after exposure to those temperatures and pH most commonly encountered in temperate environments.

In the present study, we selected and combined three temperatures (4, 18 and 25°C) and two pH (7 and 10) in

order to simulate the range of environmental conditions normally found in alga-based wastewater-treatment systems in the northwest Spain. While we demonstrate that temperature, pH and exposure time affect the inactivation of *C. parvum* oocysts (Fig. 1), our results also indicated that, under these experimental conditions, a great percentage of oocysts remains viable. Similar data were reported by Jenkins *et al.* (1997), who concluded that, although the proportion of potentially infective oocysts decrease with time, *C. parvum* oocysts can remain viable, potentially infective, for several months when stored at 4°C, and for 8 weeks when stored at 25°C. The same author later found that *C. parvum* oocysts remained infective at 15°C after 7 months based on infectivity tests and for 8 months based on FISH (fluorescent *in situ* hybridization)-methodology (Jenkins *et al.* 2003). Fayer *et al.* (1998) indicated that experimental mice became infected with oocysts held at 25°C for 12–16 weeks, indicating that small numbers of oocysts can persist through a temperate summer season. These data demonstrate the robustness of *C. parvum* oocysts to ambient temperature and suggest that long retention times or interaction with others factors are necessary to provide high oocyst inactivation in alga-based wastewater-treatment systems (Grimason *et al.* 1993; Araki *et al.* 2001).

Ammonia was the most influential factor tested in the inactivation of *C. parvum* oocysts, being responsible for the high inactivation rates observed (Fig. 2). Fayer *et al.* (1996) reported that oocysts exposed to an atmosphere of pure ammonia at 21 to 23°C for 24 h were totally inactivated; Ruxton (1995) reported unpublished data suggesting that a 24-h exposure to 1020 mg NH₃ per litre would completely inactivate oocysts, while Jenkins *et al.* (1998) showed that 24-h exposure to 1020 mg NH₃ per litre inactivated 64.5% of *C. parvum* oocysts.

We exposed oocysts to a lower ammonia concentration (<50 mg l⁻¹) for a longer time period than previously reported (Ransome *et al.* 1993; Ruxton 1995; Fayer *et al.* 1996; Jenkins *et al.* 1998) in order to simulate the environmental conditions encountered in our alga-based wastewater-treatment systems. Despite these low concentrations, *C. parvum* oocyst viability following 4 days' exposure to 5 and 50 mg NH₃ per litre was 41.5% and 14.8%, respectively, demonstrating that exposure to low concentrations of free ammonia can also reduce *C. parvum* oocyst survival. Increasing the ammonia concentration and exposure time increases the inactivation of *C. parvum* oocysts (Fig. 2), confirming previous observations (Ransome *et al.* 1993; Jenkins *et al.* 1998).

However, unlike previous research, in this study, the loss of nitrogen as gaseous ammonia was considered by measuring the ammonia concentration at each time of sampling (Fig. 2). Free ammonia and ionized ammonia

represent two forms of reduced inorganic nitrogen which exist in equilibrium depending upon the pH and temperature of the waters in which they are found in the environment. At high pH and temperature values, most of ammonium is converted to ammonia, which is very susceptible to volatilize being potentially toxic to the oocysts. Previous observations have demonstrated that oocysts exposed to ammonia at temperatures around 25°C would be inactivated more quickly than at temperatures close to freezing (Jenkins *et al.* 1998). These data suggest that, at 25°C, as oocyst wall permeability increases (Smith and Ronald 2002), ammonia (initial concentrations of 5 and 50 mg l⁻¹) is capable of permeating the oocyst wall, inactivating the sporozoites and possibly the mechanisms involved in excystation (Smith *et al.* 2005).

Acknowledgements

This work was supported by the Scottish Parasite Diagnostic Laboratory, Glasgow. R. Reinoso was funded by the University of León. Part of this work was also funded by the Instituto Tecnológico Agrario, Junta de Castilla y León.

References

- Araki, S., Martín-Gómez, S., Bécares, E., De Luis Calabuig, E. and Rojo-Vazquez, F. (2001) Effect of high-rate algal ponds on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3322–3324.
- Berthelot, M. (1859) Violet d'aniline. *Rép Chim Appl* **1**, 282–284.
- Cacció, S.M., Thompson, R.C.A., McLaughlin, J. and Smith, H.V. (2005) Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* **21**, 430–437.
- Campbell, A.T., Robertson, L.J. and Smith, H.V. (1992) Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts, correlation of *in vitro* excystation with inclusion/exclusion of fluorogenic vital dyes. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3488–3493.
- Campbell, A.T., Robertson, L.J. and Smith, H.V. (1993) Detection of oocysts of *Cryptosporidium* by enhanced chemiluminescence. *J Microbiol Methods* **17**, 297–303.
- Campbell, A.T., Robertson, L.J., Snowball, M.R. and Smith, H.V. (1995) Inactivation of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by ultraviolet irradiation. *Water Res* **29**, 2583–2586.
- Cooper, R.C. (1991) Public health concerns in wastewater reuse. *Water Sci Tech* **24**, 55–65.
- Drozdz, C. and Schwartzbrod, J. (1996) Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1227–1232.
- Fayer, R. (1994) Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2732–2735.
- Fayer, R. and Nerad, T. (1996) Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1431–1433.
- Fayer, R., Nerad, T., Rall, W., Lindsay, D.S. and Blagburn, B.L. (1991) Studies on cryopreservation of *Cryptosporidium parvum*. *J Parasitol* **77**, 357–361.
- Fayer, R., Graczyk, T.K., Cranfield, M.R. and Trout, J.M. (1996) Gaseous disinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* **62**, 908–909.
- Fayer, R., Trout, J.M. and Jenkins, M.C. (1998) Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J Parasitol* **84**, 1165–1169.
- Fayer, R., Morgan, U. and Upton, J.S. (2000) Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* **30**, 1305–1322.
- Freire-Santos, F., Oteiza-López, A.M., Vergara-Castiblanco, C.A. and Ares-Mazás, M.E. (1999) Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. *Vet Parasitol* **87**, 1–7.
- Freire-Santos, F., Oteiza-López, A.M., Vergara-Castiblanco, C.A. and Ares-Mazás, M.E. (2000) Study of the combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques. *Vet Parasitol* **89**, 253–259.
- Gold, D. and Smith, H.V. (2001) Pathogenic protozoa and drinking water. In *Detection Methods for Algae, Protozoa and Helminths* ed Ziglio, G. and Palumbo, F. Chapter 12, pp. 143–162. Chichester, UK: John Wiley and Sons.
- Grimason, A.M., Smith, H.V., Thitai, W.N., Smith, P.G., Jackson, M.H. and Girdwood, R.W.A. (1993) Occurrence and removal of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in Kenyan waste stabilisation ponds. *Wat Sci Tech* **27**, 97–104.
- Hill, B.D., Blewett, D.A., Dawson, A.M. and Wright, S.E. (1990) Analysis of the kinetics, isotype and specificity of serum and coproantibody in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*. *Res Vet Sci* **48**, 76–81.
- Jenkins, M.B., Anguish, L.J., Bowman, D.D., Walker, M.J. and Ghiorse, W.C. (1997) Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3844–3850.
- Jenkins, M.B., Bowman, D.D. and Ghiorse, W.C. (1998) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ammonia. *Appl Environ Microbiol* **64**, 784–788.
- Jenkins, M.B., Trout, J.M., Higgin, J.A., Dorsch, M., Veal, D. and Fayer, R. (2003) Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitol Res* **89**, 1–5.
- Karanis, P., Kourenti, C. and Smith, H.V. (2006) Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health* (In press).

- Lim, Y.A.L., Ahmad, R.A., Osman, A. and Zulkeflie, Z. (1999) Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in river and soil environments. *Trop Biomed* **16**, 7–15.
- Lorenzo-Lorenzo, M.J., Ares-Mazás, M.E., Villacorta-Martínez de Maturana, I. and Durán, D. (1993) Effect of ultraviolet disinfection of drinking water on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Parasitol* **79**, 67–70.
- Nasser, A.M., Zaruk, N., Tenenbaum, L. and Netzan, Y. (2003) Comparative survival of *Cryptosporidium*, Coxsackievirus A9 and *Escherichia coli* in stream, brackish and sea waters. *Water Sci Tech* **47**, 91–96.
- Olson, M.E., Goh, J., Phillips, M., Guselle, N. and McAllister, T.A. (1999) *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts survival in water, soil, and cattle feces. *J Environ Qual* **28**, 1991–1996.
- Ransome, M.E., Whitmore, T.N. and Carrington, E.G. (1993) Effect of disinfectants on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Water Supply* **11**, 103–117.
- Robertson, L.J., Campbell, A.T. and Smith, H.V. (1992) Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3494–3500.
- Robertson, L.J., Campbell, A.T. and Smith, H.V. (1993) In vitro excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology* **106**, 13–29.
- Robertson, L.J., Paton, C.A., Campbell, A.T., Smith, P.G., Jackson, M.H., Gilmour, R.A., Black, S.E., Stevenson, D.A. et al. (2000) *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. *Water Res* **34**, 2310–2322.
- Rossi, P., Pozio, E. and Besse, M.G. (1990) Cryopreservation of *Cryptosporidium* oocysts. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **84**, 68.
- Ruxton, G.D. (1995) Mathematical modelling of ammonia volatilization from slurry stores and its effects on *Cryptosporidium* oocyst viability. *J Agric Sci* **124**, 55–60.
- Savioli, L., Smith, H.V. and Thompson, A. (2006) *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol* **22**, 203–208.
- Smith, H.V. and Grimason, A.M. (2003) *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater. In: *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology* ed. Mara, D. and Horan, N. pp. 619–781. Elsevier Science.
- Smith, H.V. and Ronald, A. (2002) *Cryptosporidium*: the analytical challenge. In *Cryptosporidium: The Analytical Challenge*, chapter 1 ed Smith, M. and Thompson, K. pp. 1–43 Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
- Smith, H.V., Nichols, R.A.B. and Grimason, A.M. (2005) *Cryptosporidium* excystation and invasion – getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol* **21**, 133–142.
- Walker, M., Leddy, K. and Hagar, E. (2001) Effects of combined water potential and temperature stresses on *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5526–5529.

Environmental Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Waste Stabilization Ponds

Roberto Reinoso · Eloy Bécares

Received: 25 September 2007 / Accepted: 11 February 2008
© Springer Science + Business Media, LLC 2008

Abstract The survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in a waste stabilization pond system in northwestern Spain and the effects of sunlight and the depth and type of pond on oocyst viability were evaluated using an assay based on the exclusion or inclusion of two fluorogenic vital dyes, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and propidium iodide (PI). All tested factors had significant effects ($P < 0.01$) over time on *C. parvum* oocyst viability. Sunlight exposure was the most influential factor for oocyst inactivation. A 40% reduction was observed after 4 days exposure to sunlight conditions compared with dark conditions. The type of pond also caused a significant reduction in *C. parvum* oocyst viability ($P < 0.01$). Inactivation rates reflected that the facultative pond was the most aggressive environment for oocysts placed both at the surface (presence of sunlight) and at the bottom (absence of sunlight) of the pond, followed by the maturation pond and the anaerobic pond. The mean inactivation rates of oocysts in the ponds ranged from 0.0159 to 0.3025 day⁻¹.

Introduction

The protozoan parasite *Cryptosporidium parvum* is a zoonotic pathogen capable of infecting the epithelial cells

lining the digestive tract of numerous host species, including humans. Their oocysts, environmentally robust, have been responsible for numerous outbreaks of waterborne diseases worldwide causing serious implications for public health [16, 17, 35]. Numerous studies have evaluated the resistance of oocysts to disinfectants used in water and wastewater treatment plants, i.e., ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, UV light [23, 24]. However, less attention has been directed to survival of *C. parvum* oocysts in natural aquatic environments where a wide range of environmental pressures are present, including climatic conditions [34].

Waste stabilization ponds (WSPs) have been widely used for biological treatment of domestic sewage being particularly efficient in the removal of pathogens [18, 38]. Previous studies have indicated that sunlight may be the main factor for the inactivation of microorganisms in these systems [8, 9], suggesting that disinfection models incorporating sunlight are more satisfactory than those that do not [26]. Sunlight disinfection in WSPs may be limited by factors affecting the penetration of solar radiation into pond water such as depth [25], algal concentration [31], or mixing [28]. Furthermore, previous investigations have demonstrated that environmental variables such as pH, dissolved oxygen (DO), and humic substances may interact with sunlight modifying the mechanisms of radiation-induced damage on microorganisms [6].

Other factors widely demonstrated to be responsible for inactivation of *C. parvum* oocysts under laboratory conditions are temperature [12, 13, 15, 20], pH [3, 11], water potential [39], and ammonia [14, 21]. However, few studies have evaluated the effects of these factors on survival of oocysts under field conditions. Robertson *et al.* [33], using semi-permeable containers exposed oocysts under tap and river water environments demonstrating that *C. parvum*

R. Reinoso (✉)
Environmental Research Institute, University of León,
La Serna 58,
24007 León, Spain
e-mail: rreit@unileon.es

E. Bécares
Department of Ecology,
Faculty of Biological and Environmental Sciences,
University of León,
24071 León, Spain

ooocysts can survive under these conditions for prolonged periods of time. Araki *et al.* [2], demonstrated that the physicochemical environment of high-rate algal ponds, including sunlight exposure, was responsible for a high reduction in the infectivity of *C. parvum* oocysts. This article presents the results of a study undertaken to determine the survival of *C. parvum* oocysts placed in various waste stabilization ponds in northwestern Spain and to evaluate the synergistic effect of sunlight and the depth and type of pond on oocyst viability.

Methods

Site Description

The study was carried out during August 2006 in a waste stabilization pond system in Fresno de la Vega (León, northwestern Spain). The system was continuously fed with diluted domestic raw wastewater with a mean flow of 3200 m³/day. The system consists of two anaerobic ponds in parallel (335 m² surface, 3.75 m depth, and 0.4 days of hydraulic retention time [HRT]), followed by a facultative pond (8481 m² surface, 2 m depth, and 4.1 days HRT) and a maturation pond (3169 m² surface, 1.5 m depth and 1 day HRT)(Fig. 1).

Oocyst Preparation

Experiments were performed with two different lots of Iowa strain *C. parvum* oocysts propagated in bovine hosts at the Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona. Each oocyst lot was shipped in a 1.5-mL micro-centrifuge tube containing 0.01% (v/v) Tween 20®, 100 U penicillin and 100 µg/mL of gentamicin. Portions of the oocyst stock were separated and cleaned by transfer to a 15-mL centrifuge tube containing 0.01 M phosphate buffer solution (PBS), centrifuged at 1120×g for 10 min and the resulting supernatant aspirated until the volume was approximately 0.2 mL. The oocyst pellet was

re-suspended in 0.01 M PBS (pH 7.0) and stored at 4°C until used. The time elapsed from oocyst shedding to shipment, cleaning, and testing for each inactivation experiment is presented in Table 1.

Experimental Design

Regenerated cellulose semi-permeable bags (14,000-Da porosity) were used to allow oocysts to come into contact with ions naturally present in the pond environment whilst minimizing the effect of predation and bacterial/fungal degradation. Bags were filled with 1 mL of sterile water and 10⁶ *C. parvum* oocysts. Three bags were placed at the surface of each pond and at the bottom of the anaerobic and facultative ponds (Fig. 1). Three other bags sunlight-protected with aluminum foil were placed in the maturation pond. Empty bags without oocysts but with 1 mL of sterile water were also placed in the same position as bags containing oocysts to test the osmotic interchange through the semi-permeable membrane and to test for water conditions inside the bags. Three bags with oocysts were stored in the dark at 4°C in sterile water and used as a control. Bags were removed at 1-, 2-, and 4-day intervals from their respective environments taking into consideration the theoretical hydraulic retention times of the different ponds.

Assessment of Oocyst Viability

Oocyst viability was determined using the fluorogenic vital dyes assay of Campbell *et al.* [3, 4] based on the morphology and the inclusion or exclusion of two vital dyes, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and propidium iodide (PI).

Physicochemical Analysis

The physicochemical characteristics of the ponds (pH, temperature, dissolved oxygen, and ammonium concentration) were analyzed according to Standard Methods for the

Figure 1 Schematic diagram of waste stabilization ponds system and emplacement of semipermeable bags

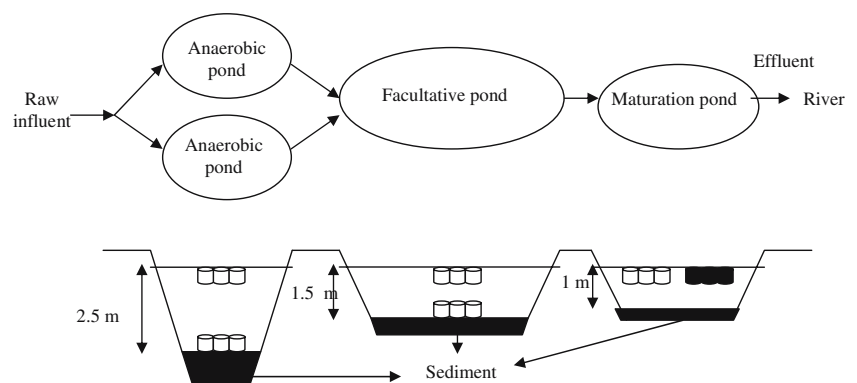


Table 1 Summary of inactivation tests and experimental conditions

Test	Lot	Time (days) from oocyst shedding to			Pond	Position	Sunlight
		Shipping	Cleaning	Testing			
A-1	A	18	41	43	Anaerobic	Surface	Yes
A-2	A	18	41	43	Anaerobic	Bottom	No
A-3	B	37	42	43	Anaerobic	Surface	Yes
A-4	B	37	42	43	Anaerobic	Bottom	No
F-1	A	18	41	47	Facultative	Surface	Yes
F-2	A	18	41	47	Facultative	Bottom	No
F-3	B	37	42	47	Facultative	Surface	Yes
F-4	B	37	42	47	Facultative	Bottom	No
M-1	A	18	41	51	Maturation	Surface	Yes
M-2	A	18	41	51	Maturation	Surface	No
M-3	B	37	42	51	Maturation	Surface	Yes
M-4	B	37	42	51	Maturation	Surface	No
C-1	A	18	41	43	Control ^a	–	–
C-2	B	37	42	43	Control	–	–

^a Control: oocysts in sterile water at 4°C and dark

Examination of Water and Wastewater [1]. The ambient weather conditions during the study period were also noted. The entire experiment was conducted during the summer on cloud-free days with an estimated solar irradiance of 1000 Wm⁻².

Data Analysis

Statistical analyses were carried out using the STATISTICA 6.0 software package [37]. A repeated measures analysis of variance (ANOVA) was used to determine the effect of each factor selected (sunlight exposure, depth and type of pond) on the viability of oocysts after each sampling time. Pair-wise comparisons were also performed using Tukey honestly significant difference (HSD) post hoc tests. Inactivation rates were determined using a linear regression by the following

equation: $\log_{10}N_t/N_0 = -kt + b$, where N_0 is the initial percentage of viable oocysts, N_t is the percentage of viable oocysts at time t , in days, b is the intercept value, and $-k$ is the slope of the line of best fit. Days to reach 99.9% inactivation were also calculated using this equation.

Results

Physicochemical Conditions between Ponds

The mean physicochemical characteristics of the wastewater in the different ponds and inside the cellulose semi-permeable bags ($n=3$; $t=1, 2, \text{ and } 4$ days) are shown in Table 2. The Tukey’s test found significant differences ($P < 0.05$) among the different types of ponds. Both facultative

Table 2 Physicochemical characteristics of the wastewater in the different ponds and in the cellulose semipermeable bags during the study period ($n=3$; $t=1, 2, \text{ and } 4$ days)

Parameter ^a	Anaerobic pond ^b				Facultative pond ^c				Maturation pond ^d	
	WSP		Bags		WSP		Bags		WSP	Bags
	Surf.	Bott.	Surf.	Bott.	Surf.	Bott.	Surf.	Bott.	Surf.	Surf.
pH	7.62	7.62	7.67	7.65	9.02	8.92	8.9	8.81	9.01	8.99
T^a (°C)	20.8	20.37	20.9	20.5	23.83	23.37	24.07	23.4	24.17	24.47
DO (ppm)	2.98	2.74	3.03	2.78	9.04	8.05	8.68	7.76	4.61	4.69
NH_4^+ (mg/l)	3.18	3.3	3.06	3.13	1.85	1.83	1.87	1.74	1.91	1.81

DO dissolved oxygen

^a T^a , water temperature

^b Anaerobic pond: Surf., surface; Bott., bottom (2.5 m)

^c Facultative pond: Surf., surface; Bott., bottom (1.5 m)

^d Maturation pond: Surf., surface

and maturation pond showed pH and temperature values significantly higher ($P < 0.05$) than those of the anaerobic pond. In contrast, the anaerobic pond registered NH_4^+ -values statistically higher ($P < 0.01$) than the other two ponds, with concentrations ranging from 2.7 to 3.5 mg $N - \text{NH}_4^+ / l$ (Table 2). The physicochemical conditions of the facultative and maturation ponds were quite similar, except for dissolved oxygen (DO), which was significantly higher ($P < 0.01$) in the facultative pond than in the maturation pond. No statistically significant differences were observed when comparing water inside and outside the bags.

Inactivation of *C. parvum* Oocysts Under Different Environments

The initial viability of untreated oocysts before the inactivation experiments was 89% (lot A, $n=3$) and 92% (lot B, $n=2$). All ponds caused oocyst viability to decrease gradually over time (Fig. 2a,b,c), being significantly lower ($P < 0.01$) on the final day of sampling (4 days exposure) compared with the start of the experiment. Likewise, significant differences ($P < 0.01$) were observed from 2 days onward between the controls and oocysts placed in waste stabilization ponds demonstrating the biocidal effect of these environments. Statistical analyses showed that the resistance to environmental inactivation of lot A oocysts was not significantly different from that of lot B oocysts. All tested factors in this study, including interaction between factors, had significant effects ($P < 0.01$) on *C. parvum* oocyst viability. The viability of sunlight exposed oocysts located at the surface of the maturation pond was significantly lower ($P < 0.01$) than those located at the surface of the pond in the dark (about 40% reduction after 4 days exposure). The Tukey's test indicated that there were significant differences ($P < 0.01$) from 2 days onward between *C. parvum* oocyst viability under sunlight conditions and dark conditions (Table 1, Fig. 2c). In a similar way, significant differences ($P < 0.01$) were also found between the viability of oocysts stored at the surface and bottom of the anaerobic and facultative ponds from day 2 onward (Table 1, Fig. 2a,b). These differences were similar to those observed in the maturation pond between sunlight and dark conditions indicating that sunlight exposure is a significant factor in determining the survival of oocysts in such environments. Our data demonstrated that the physicochemical conditions of each pond (Table 2) significantly influenced ($P < 0.01$) *C. parvum* oocyst inactivation (Fig. 2a,b,c). The facultative pond was the most efficient in the inactivation of oocysts both at the surface (12% viability after 4 days exposure) and the bottom (53% viability) of the pond. Our results showed significant differences ($P < 0.01$) in the viability of oocysts exposed to different pond environments after 4 days, especially the

differences between the facultative pond and anaerobic pond (~20% viability after 4 days exposure).

Inactivation Kinetic of *C. parvum* Oocysts in Waste Stabilization Ponds

Table 3 shows the inactivation rates (K_d) of *C. parvum* oocysts in the different ponds and treatments. The R^2 values for the goodness of fit were above 0.8 ($P < 0.05$) in all cases. All environments presented inactivation rates significantly greater ($P < 0.05$) than controls ($0.0028 \text{ day}^{-1} \pm 0.0002$ and $0.0029 \text{ day}^{-1} \pm 0.001$ for lots A and B, respectively). Under these conditions (oocysts in sterile water at 4°C and dark), the regression analysis indicated that approximately 1071 and 1034 days, respectively, would be necessary to reach 99.9% inactivation of *C. parvum* oocyst. Lower times, 9, 16, and 25 days (lot A) and 11, 14 and 22 days (lot B) were estimated to reach 99.9% inactivation in the surface water of facultative, maturation, and anaerobic ponds, respectively (Table 3). In contrast, the survival of oocysts in absence of sunlight was significantly ($P < 0.01$) longer than in sunlight conditions. Our results also showed that the oocyst inactivation rate in the facultative pond was greater than the other ponds both for oocysts placed at the surface and bottom of the ponds (Table 3). The Tukey's test indicated significant differences ($P < 0.05$) in oocyst inactivation rates between the three ponds except when facultative and maturation ponds were compared.

Discussion

Previous studies have examined the inactivation of *C. parvum* oocysts in different aquatic environments using semi-permeable containers [2, 33, 34]. In the present study, transparent cellulose semi-permeable bags similar to those previously reported were used to determine the survival of oocysts in WSPs in northwest Spain. Our results showed that the physicochemical characteristics of wastewater inside and outside the bags were similar, demonstrating that the diffusion of small molecules (ammonia, phosphates, etc.) through the membrane was optimum and that *C. parvum* oocysts were exposed to the same water conditions than in the ponds. These bags excluded predation, bacterial/fungal degradation, and the effect of large molecules as potential factors for oocysts inactivation, leaving sunlight, temperature, pH, dissolved oxygen and ammonia as the main factors responsible for the reduction of oocyst viability in WSPs.

It has been suggested that sunlight is the single most important factor causing natural disinfection in WSPs [7, 25]. Previous studies have demonstrated its effectiveness against a range of fecal indicator microorganisms using

Figure 2 **a** Viability of *C. parvum* oocysts in the anaerobic pond. Each datum point represents the mean \pm standard error of three replicates. **b** Viability of *C. parvum* oocysts in the facultative pond. Each datum point represents the mean \pm standard error of three replicates. **c** Viability of *C. parvum* oocysts in the maturation pond. Each datum point represents the mean \pm standard error of three replicates

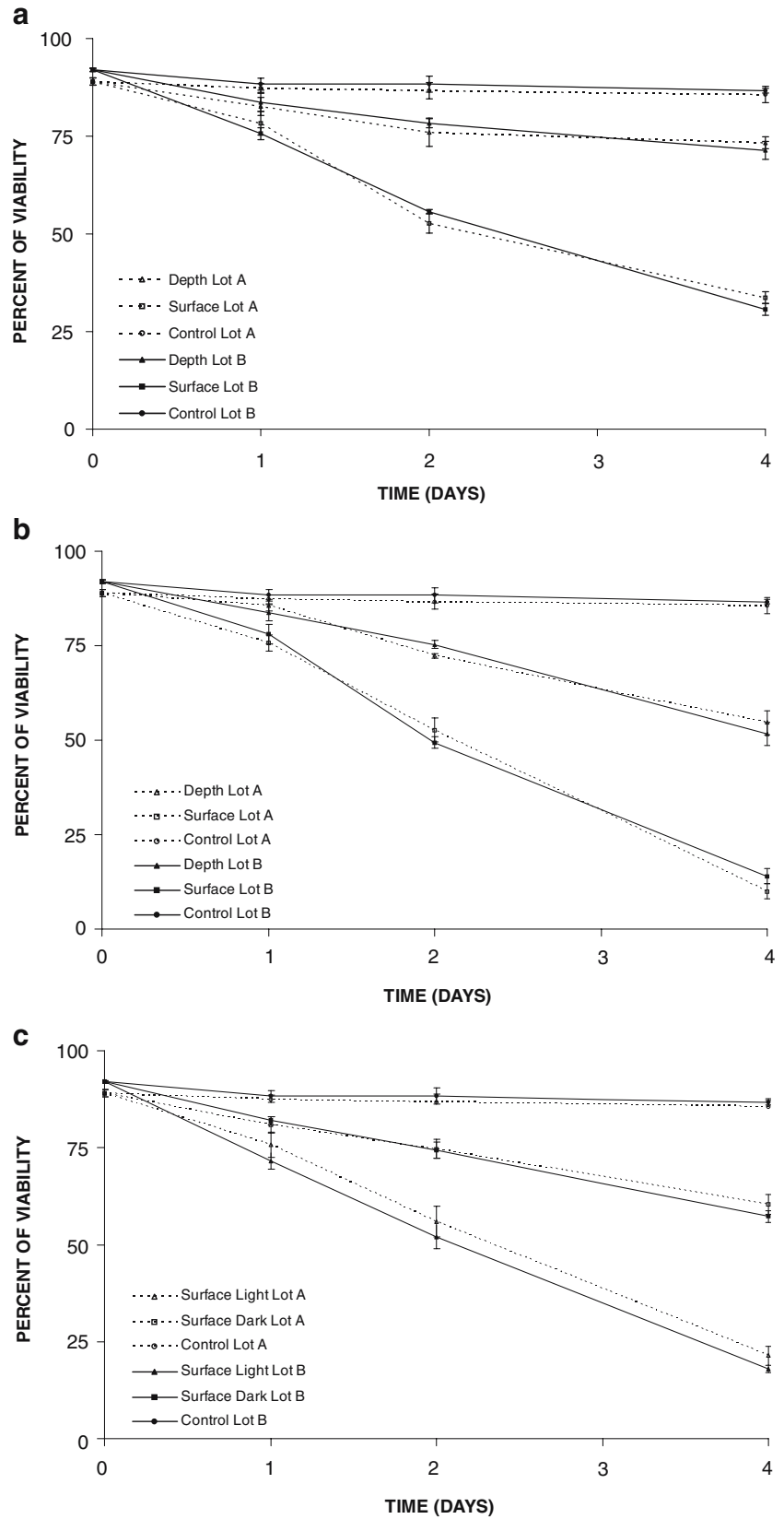


Table 3 Inactivation rates (kd) for *C. parvum* in the different ponds of WSPs system

Test	Lot	Pond	Position	Sunlight	K_d (day ⁻¹) ± SD	R^2	Days to reach 99.9% inactivation
A-1	A	Anaerobic	Surface	Yes	0.1188±0.0186	0.9759	25.25
A-2	A	Anaerobic	Bottom	No	0.0159±0.0070	0.8382	188.68
A-3	B	Anaerobic	Surface	Yes	0.1306±0.0009	0.9999*	22.97
A-4	B	Anaerobic	Bottom	No	0.0227±0.0020	0.9919	132.74
F-1	A	Facultative	Surface	Yes	0.3025±0.0502	0.9731	9.91
F-2	A	Facultative	Bottom	No	0.0645±0.0030	0.9977*	46.51
F-3	B	Facultative	Surface	Yes	0.2522±0.0184	0.9946*	11.89
F-4	B	Facultative	Bottom	No	0.0715±0.0089	0.9844	41.95
M-1	A	Maturation	Surface	Yes	0.1871±0.0197	0.9891	16.03
M-2	A	Maturation	Surface	No	0.0432±0.0026	0.9964*	69.44
M-3	B	Maturation	Surface	Yes	0.2043±0.0225	0.9879	14.68
M-4	B	Maturation	Surface	No	0.0524±0.0034	0.9958*	57.25
C-1	A	Control ^a	–	–	0.0028±0.0002	0.9926	1071.43
C-2	B	Control	–	–	0.0029±0.0010	0.8928	1034.48

^a Control: oocysts in sterile water at 4°C and dark

*Significant at $P < 0.05$

small reactors operated under controlled physicochemical conditions [9]. McGuigan *et al.* [27], using a batch-process solar disinfection system (SODIS), demonstrated that exposure times of >10 h to simulated solar irradiation (830 W m⁻²) rendered *C. parvum* oocysts non-infective. However, field data are lacking that reflect the actual effect of natural sunlight on the survival of oocysts in aquatic environments. Our study demonstrated that sunlight exposure in WSPs increased the rate of *C. parvum* oocyst inactivation compared with dark conditions (both dark bags and oocysts at depth). This difference increased over time until reaching a maximum of 40% at the end of the sampling period (4 days of exposure), demonstrating the deleterious effect of sunlight in these systems under these conditions. The inactivation rates for *C. parvum* oocyst found in this study indicated that oocysts may survive for several weeks in the dark in these ponds, whereas only a few days are necessary to achieve complete inactivation under sunlight conditions (Table 3). These results are in agreement with earlier studies reported in seawater and tap water, which showed oocyst infectivity decreased more rapidly in the presence of sunlight than in the dark [19, 30]. Several papers have demonstrated that the biocidal effect of sunlight is due to direct damage induced by UV irradiation as a consequence of the interaction of radiation energy with molecular targets [5, 29]. However, previous studies have indicated that sunlight may be absorbed by photosensitizers present in the water that react with oxygen producing highly reactive oxygen molecules such as hydrogen peroxide and superoxide, which have a disinfectant effect [6, 9]. Deterioration of the oocyst surface as a result of sunlight exposure and an increase in oocyst wall permeability induced by exposure to slightly alkaline conditions and ambient temperatures (e.g., 20°C) may facilitate the

transport of UV radiation products into the interior of the oocysts enhancing the biocidal effect [27].

The effect of pond depth on inactivation of *C. parvum* oocysts was also investigated in this study. Our data showed higher inactivation rates for *C. parvum* oocysts placed at the surface compared with those placed at the bottom of the anaerobic and facultative ponds (Table 3). Taking into consideration that the physicochemical characteristics of these two environments were similar, that the depths to which we placed the bags were 2.5 and 1.5 m, respectively (Fig. 1), and assuming dark conditions (Secchi disk visibility: 0.6 m in anaerobic pond and 0.44 m in facultative pond), we suggest that the differences observed in this study between *C. parvum* oocyst viability in surface and at depth were due to sunlight effect and not to physicochemical differences. These findings are similar to those previously reported, which indicated that die-off rates of indicator bacteria were faster near the water surface than at depth [10, 25]. These authors speculate that this variation is due to the strong light-attenuation produced in the water column of WSPs and a decrease in the efficiency of sunlight disinfection over depth.

Certain physicochemical characteristics of the aquatic environment may be significant in the inactivation of *C. parvum* oocysts. Factors such as pH, temperature, ammonia, and DO may increase the inactivation of oocysts in WSPs [2, 15, 33]. Furthermore, their interaction with sunlight has also been demonstrated as being potentially responsible for inactivation of microorganisms in these systems [6, 9]. In this study, the facultative pond was found to be the most aggressive environment for oocyst survival, followed by the maturation pond and the anaerobic pond. We observed relatively high differences (~20% after 4 days exposure) between oocyst viability in the facultative pond

and anaerobic pond probably as a consequence of the highest values of temperature, pH, and DO registered in the facultative pond. However, these differences were lower between the facultative and maturation ponds because of the physicochemical similarity of both ponds, with dissolved oxygen being the only environmental variable explaining these differences. Jenkins *et al.* [22] demonstrated that survival of oocysts in sterile water at 4°C ($K_d=0.0077 \text{ day}^{-1}$) was four times longer than at 20°C ($K_d=0.0298 \text{ day}^{-1}$) or 30°C ($K_d=0.0327 \text{ day}^{-1}$). We also recorded higher inactivation rates (Table 3), even in the absence of sunlight, for oocysts in the different ponds than for oocysts in sterile water at 4°C ($K_d=0.00285 \text{ day}^{-1}$). These results are in concordance with an earlier paper [32] in which we prove that increased oocyst inactivation rates with increased temperature and pH. Smith *et al.* [36] indicated that increasing alkalinity and temperature increases oocyst wall permeability before excystation. Therefore, oocysts exposed to similar conditions in an aquatic environment such as WSPs may spontaneously excyst or allow water ingress causing osmotic stress and/or sporozoite lyses. Davies-Colley *et al.* [9] demonstrated that high levels of DO in water may enhance sunlight-mediated inactivation of microorganisms by increasing the photo-oxidation damage processes, although its effect on oocyst viability remains to be determined.

Another potential factor responsible for oocyst inactivation in wastewater is exposure to ammonia due to its ability to permeate the oocyst wall (at ambient temperatures) and inactivate sporozoites [36]. However, the low concentrations of ammonium found in these ponds (<3.5 mg/L), due to the diluted influent, suggest that this factor had little effect on inactivation of oocysts during the study period.

In conclusion, the results of this study clearly demonstrate that the inactivation of *C. parvum* oocysts located at the surface of WSPs and exposed to sunlight is significantly greater than those placed at the bottom of ponds in the dark. Thus, sunlight is considered as the main factor causing natural inactivation of *C. parvum* oocysts in WSPs. Independent of sunlight, the type of pond had a significant effect on oocyst inactivation. Oocyst rates of inactivation were significantly higher in the facultative pond than the anaerobic and maturation ponds. The different dissolved oxygen, pH, and temperature values found in the ponds could be the main responsible factors of this diverse pattern.

Acknowledgments This study was financially supported by the Castilla and León Institute for Agricultural Technology (ITACyL) under contract LE-02-2005 entitled “Health Risks in Using Waste Water in Agriculture”. We gratefully acknowledge the contribution of Professor A.M. Grimason, Department of Civil Engineering, University of Strathclyde for constructive comments and critical review of the manuscript. We would also like to thank Natalia Reinoso for her technical assistance during this project. R. Reinoso was funded by the University of León.

References

1. APHA, AWWA, EFA (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edn. Washington, DC, USA
2. Araki S, Martín-Gómez S, Bécas E, De Luis Calabuig E, Rojo-Vazquez F (2001) Effect of high-rate algal ponds on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 67:3322–3324
3. Campbell AT, Robertson LJ, Smith HV (1992) Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts, correlation of *in vitro* excystation with inclusion/exclusion of fluorogenic vital dyes. *Appl Environ Microbiol* 58:3488–3493
4. Campbell AT, Robertson LJ, Smith HV (1993) Detection of oocysts of *Cryptosporidium* by enhanced chemiluminescence. *J Microbiol Methods* 17:297–303
5. Craik SA, Weldon D, Finch GR, Bolton JR, Belosevic M (2001) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium and low-pressure ultraviolet irradiation. *Water Res* 35:1387–1398
6. Curtis TP, Mara DD, Silva SA (1992a) Influence of pH, oxygen, and humic substances on ability of sunlight to damage faecal coliforms in waste stabilization pond water. *Appl Environ Microbiol* 58:1335–1343
7. Curtis TP, Mara DD, Silva SA (1992b) The effect of sunlight on faecal coliforms in ponds: implications for research and design. *Water Sci Technol* 26(7,8):1729–1738
8. Davies-Colley RJ, Donnison AM, Speed DJ (1997) Sunlight wavelengths inactivating faecal indicator micro-organisms in waste stabilization ponds. *Water Sci Technol* 35(111):219–225
9. Davies-Colley RJ, Donnison AM, Speed DJ, Ross CM, Nagels JW (1999) Inactivation of faecal indicator micro-organisms in waste stabilization ponds: interactions of environmental factors with sunlight. *Water Res* 33:1220–1230
10. Davies-Colley RJ, Donnison AM, Speed DJ (2000) Towards a mechanistic understanding of pond disinfection. *Water Sci Technol* 42(10–11):149–158
11. Drozd C, Schwartzbrod J (1996) Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol* 62:1227–1232
12. Fayer R (1994) Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Appl Environ Microbiol* 60:2732–2735
13. Fayer R, Nerad T (1996) Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 62:1431–1433
14. Fayer R, Graczyk TK, Cranfield MR, Trout JM (1996) Gaseous disinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 62:908–909
15. Fayer R, Trout JM, Jenkins MC (1998) Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J Parasitol* 84:1165–1169
16. Fayer R, Morgan U, Upton JS (2000) Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 30:1305–1322
17. Gold D, Smith HV (2001) Pathogenic protozoa and drinking water. In: Ziglio G, Palumbo F (eds) *Detection methods for algae, protozoa and helminths*. Wiley, Chichester, UK, pp 143–162, Chapter 12
18. Grimason AM, Smith HV, Thitai WN, Smith PG, Jackson MH, Girdwood RWA (1993) Occurrence and removal of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in Kenyan waste stabilisation ponds. *Water Sci Technol* 27:97–104
19. Huffman DE, Slifko TR, Salisbury K, Rose JB (2000) Inactivation of bacteria, virus and *Cryptosporidium* by a point-of-use device using pulsed broad spectrum white light. *Water Res* 34(9):2491–2498

20. Jenkins MB, Anguish LJ, Bowman DD, Walker MJ, Ghiorse WC (1997) Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 63:3844–3850
21. Jenkins MB, Bowman DD, Ghiorse WC (1998) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ammonia. *Appl Environ Microbiol* 64:784–788
22. Jenkins MB, Bowman DD, Fogarty EA, Ghiorse WC (2002) *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in three soil types at various temperatures and water potentials. *Soil Biol Biochem* 34:1101–1109
23. Johnson AM, Linden K, Ciociola KM, De Leon R, Widmer G, Rochelle PA (2005) UV inactivation of *Cryptosporidium hominis* as measured in cell culture. *Appl Environ Microbiol* 71:2800–2802
24. Korich DG, Mead JR, Madore MS, Sinclair NA, Sterling CR (1990) Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl Environ Microbiol* 56:1423–1428
25. Mayo AW (1989) Effect of pond depth on bacterial mortality rate. *J Environ Eng* 115(5):964–977
26. Mayo AW (1995) Modelling coliform mortality in waste stabilization ponds. *J Environ Eng* 121:140–152
27. McGuigan KG, Méndez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazás E, Kehoe SC, Boyle M, Sichel C, Fernández-Ibáñez P, Meyer BP, Ramalingham S, Meyer EA (2006) Batch solar disinfection inactivates oocysts of *Cryptosporidium parvum* and cysts of *Giardia muris* in drinking water. *J Appl Microbiol* 101:453–463
28. Moeller JR, Calkins J (1980) Bactericidal agents in wastewater lagoons and lagoon design. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 52:2442–2451
29. Morita S, Namikoshi A, Hirata T, Oguma K, Katayama H, Ohgaki S, Motoyama N, Fujiwara M (2002) Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 68:5387–5393
30. Nasser AM, Zaruk N, Tenenbaum L, Netzan Y (2003) Comparative survival of *Cryptosporidium*, Coxsackievirus A9 and *Escherichia coli* in stream, brackish and sea waters. *Water Sci Technol* 47(3):91–96
31. Qin D, Bliss PJ, Barnes D, FitzGerald PA (1991) Bacterial (total coliform) die-off in maturation ponds. *Water Sci Tech* 23:1525–1534
32. Reinoso R, Bécares E, Smith HV (2007) Effect of various environmental factors on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Appl Microbiol* DOI 10.1111/j.1365-2672.2007.03620.x
33. Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV (1992) Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl Environ Microbiol* 58:3494–3500
34. Robertson LJ, Gjerde BK (2006) Fate of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the Norwegian aquatic environment over winter. *Microb Ecol* 52:597–602
35. Smith HV, Grimason AM (2003) *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater. In: Mara D, Horan N (eds) *The handbook of water and wastewater microbiology*. Elsevier Science, Amsterdam, pp 619–781
36. Smith HV, Nichols RAB, Grimason AM (2005) *Cryptosporidium* excystation and invasion—getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol* 21:133–142
37. StatSoft, Inc (2001) STATISTICA 6.0. Tulsa (OK), USA
38. Stott R, May E, Mara DD (2003) Parasite removal by natural wastewater treatment systems: performance of waste stabilisation ponds and constructed wetlands. *Water Sci Technol* 48(2):97–104
39. Walker M, Leddy K, Hagar E (2001) Effects of combined water potential and temperature stresses on *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 67:5526–5529

Occurrence and removal of bacteria and pathogenic parasites in northwestern Spain waste stabilisation ponds

Roberto Reinoso^{a,*}, Eloy Bécares^b

^aEnvironmental Research Institute, University of León, La Serna 58, 24007 León, Spain.

^bDepartment of Biodiversity and Environmental Management, Faculty of Biological and Environmental Sciences, University of León, 24071 León, Spain.

* Corresponding author. Environmental Research Institute, University of León, La Serna 58, León 24007, Spain. Tel: +34 987 293133. Fax: +34 987 291563. E-mail address: rreit@unileon.es (R. Reinoso)

ABSTRACT

A waste stabilization ponds (WSPs) system formed by two anaerobic ponds (AP), a facultative pond (FP) and a maturation pond (MP) was studied from December 2003 until September 2004 in north-western Spain in order to evaluate their efficiency in the removal of faecal indicator bacteria (total coliforms, *E.coli*, faecal streptococci), coliphages, helminth eggs and protozoan cysts (*Cryptosporidium* and *Giardia*). Furthermore, sludge samples were collected from the bottom of the ponds to assess the settling rates and thus determine the main pathogen removal mechanisms in the WSPs system. The overall removal ranged from 1.4 log units for coliphages in the cold period to 5.0 log units for *E.coli* in the hot period. *Cryptosporidium* oocysts were reduced by an average of 96%, *Giardia* cysts by 98% and helminth eggs by 100%. The anaerobic ponds showed surface removal rates significantly higher (4.6, 5.2 and 3.7 log (oo)cysts/eggs removed $m^{-2}day^{-1}$, respectively) than facultative and maturation ponds. Sludge samples also revealed that anaerobic ponds were the most effective in parasite removal. However, the concentration of pathogens in the sludge was lower than we expected, probably due to the low retention time of the system, suggesting that other processes than sedimentation such as sunlight and physico-chemical environment of the ponds were the main pathogen removal mechanism in this system.

Keywords: Waste stabilization ponds; Pathogenic parasites; Faecal indicators; Removal rates; Water reuse.

1. Introduction

Wastewater reuse for agriculture purposes is becoming increasingly common in many areas of the world, especially in arid and semiarid regions where water resources are scarce. However, epidemiological studies have shown that this practice increases the prevalence of

parasitic infections among exposed populations because of the presence of pathogenic microorganisms in raw wastewater, i.e. protozoan parasites and helminth eggs (Cifuentes et al., 1992; Bouhoum and Schwartzbrod, 1998; Amahmid et al., 1999). Consequently, there is a need to find treatment technologies that reduce the sanitary risk related to wastewater reuse producing high quality effluents suitable for agricultural irrigation (Juanicó and Milstein, 2004; Jimenez, 2007).

Waste stabilisation ponds (WSPs) have been considered as a well-established method of biological wastewater treatment being particularly efficient in the removal of pathogens (Grimason et al., 1993; Bouhoum et al., 2000; Stott et al., 2003). However, there is still much debate regarding the importance of the mechanisms by which, pathogens are removed in WSPs. Sedimentation, sunlight, predation, natural die-off and environmental variables such as temperature, pH, dissolved oxygen, water potential and ammonia are some of the many processes involved in the reduction of intestinal parasites in WSPs. In earlier papers (Reinoso et al., 2007; Reinoso and Bécares, 2008) we evaluated the effects of sunlight and WSPs physico-chemical conditions on *Cryptosporidium parvum* oocysts viability. Our results demonstrated that sunlight exposure increased the rate of *C. parvum* oocyst inactivation compared with dark conditions reaching a maximum difference of 40% after 4 days of exposure. We also observed that pH, temperature and ammonia caused oocyst viability to decrease slightly over time demonstrating the biocidal effect of these factors.

The aim of this study was to gather more information on the pathogen removal mechanisms in WSPs. A better understanding of these processes may provide the basis for improvement in the design, operation and maintenance of waste stabilization ponds. The specific aims were (i) to evaluate the efficiency of a WSPs system in the removal of organic matter, nutrients, total coliforms, *E.coli*, faecal streptococci, coliphages, helminth eggs and protozoan parasites (*Cryptosporidium* and *Giardia*), (ii) to determine the existence of seasonal

variation during the study period and (iii) to investigate the relationships between faecal indicators, physicochemical parameters and pathogenic parasites in the different aquatic environments of the system. Furthermore, a settling experiment using specific containers was carried out to evaluate the proportion of (oo)cysts and eggs removed by sedimentation and the accumulation rate of the sludge in each pond.

2. Material and methods

2.1. Site description

The study was carried out in a waste stabilisation pond system in Fresno de la Vega (León, north-western Spain). The system consists of two anaerobic ponds in parallel with 335 m² surface, 3.75 m depth and 0.4 days of hydraulic retention time (HRT) each, followed by a facultative pond (8481 m² surface, 2 m depth and 4.1 days HRT), and by a maturation pond (3169 m² surface, 1.5 m depth and 1 day HRT)(Fig. 1). The system was continuously fed with diluted domestic raw wastewater with a mean flow of 3200 m³/d with a organic load of 7.8 gBOD₅/m² day.

2.2. Sample collection

Wastewater samples were weekly taken from December 2003 until September 2004 at four stations: raw wastewater (P1) and the effluents of the anaerobic pond (P2), facultative pond (P3) and maturation pond (P4). Samples were collected in sterile plastic containers (10 L for parasitic pathogens and 1 L for physicochemical and bacteriological parameters) and transported to the laboratory for analysis. In addition, sludge samples were collected after one-year period from the bottom of the ponds using specific containers (Fig. 1).

2.3. Microbiological analyses

Concentration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the wastewater samples was performed by calcium carbonate flocculation procedure (Vesey et al., 1993). For sludge samples, oocysts and cysts were concentrated by sucrose gradient flotation procedure (Bukhari et al., 1997). Staining for visualization of oocysts/cysts was performed using specific fluorescent monoclonal antibodies (Aqua-Glo G/C Direct, Waterborne, Inc., New Orleans, La.) and epifluorescence microscope at 200 x and 400 x magnifications [Olympus BX 60 F5 equipped with Nomarski differential interference contrast (DIC) optics, a blue filter (480 nm-excitation, 520 nm-emission) for the detection of fluorescein isothiocyanate (FITC)-mAb labelled oocysts and an ultraviolet (UV) filter block (350 nm-excitation, 450 nm-emission) for 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)]. The recovery efficiency of these methods, when wastewater samples (10L) and sludge samples (5 g) previously determined to be negative for *Cryptosporidium* oocysts were seeded with 1×10^4 purified *Cryptosporidium parvum* oocysts (Iowa Strain Lot# 60710, Sterling Parasitol. Lab., Tucson, Arizona), ranged 10 % to 60 % (mean: $44.1 \pm 10.8\%$ and $32.3 \pm 18.7\%$, respectively, n=5). Testing of recovery efficiency for *Giardia* was not performed. The concentration and further identification of intestinal helminth eggs in wastewater and sludge was carried out in accordance with the method developed by Schwartzbrod (2003).

2.4. Physicochemical analyses

Physicochemical parameters (BOD₅, TSS, VSS, TKN, NH₄⁺, TP) were analysed following Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998). Measurements were also taken *in situ* for the determination of water temperature, dissolved oxygen, pH, and conductivity. The mean solid content (TSS) and the accumulation rate of the sludge (m³/yr or m³/pers yr) were also determined.

2.4. Data analyses

Statistical analyses were carried out using the STATISTICA 6.0 software package (StatSoft, Inc., 2001). One-way analysis of variance (ANOVA) was used to check the influence of each factor considered (type of pond and seasonal variation) in the removal of microorganisms. In order to determine the existence of seasonal variation during the study, two periods were defined, the cold period (December-March) and the hot period (June-September). Assumptions for ANOVA test were previously checked and data were logarithmically transformed ($\log_{10} X+1$) when necessary. Subsequent pair-wise comparisons were performed using Tukey HSD post hoc tests (HSD, honestly significant difference).

3. Results

3.1. Physicochemical conditions in the ponds

The physicochemical characteristics of the raw wastewater before and after each treatment step are shown in Table 1. Both facultative and maturation pond presented dissolved oxygen values significantly higher ($P < 0.05$) than the anaerobic pond and raw wastewater demonstrating their good oxygenation conditions. These ponds maintained a dissolved oxygen level > 6 mg/L during the entire year, with facultative pond water samples recording the highest levels (9.9 mg/L during the cold period). Results showed that the pH value increased from neutrality in raw wastewater and anaerobic pond to alkaline values in the facultative and maturation pond. The maturation pond registered the highest pH values during the study period with significant differences ($P < 0.05$) between the cold (7.7) and hot period (8.7). The ANOVA test also revealed significant differences ($P < 0.05$) in the conductivity values between raw wastewater and the other water samples with the highest values occurring in the cold period ($P < 0.05$). On the other hand, no statistically significant differences were observed in the temperature values when comparing different wastewater samples.

3.2. Treatment system efficiencies

3.2.1. Physicochemical parameters

All parameters showed mean concentrations significantly higher ($P < 0.05$) in the influent than in the final effluent (Table 2). There was a substantial decrease of BOD₅ in the WSPs system with significant differences between the cold period (83.5%) and hot period (59.4%). However, no other statistical differences ($P < 0.05$) were observed between both periods for the rest of parameters. The anaerobic pond obtained the highest removals during the study period with removal rates $> 60\%$ for TSS and VSS. Only in the hot period, the maturation pond showed higher removals for the TKN (49.7%) and NH₄⁺ (54%) than the anaerobic pond.

3.2.2. Microbiological parameters

The mean values (n=26) for the influent and final effluent concentrations, and removal efficiencies for the three ponds and the entire system are shown in Table 2. Other than coliphages in the cold period, all microorganisms showed mean concentrations significantly higher (1-5 orders of magnitude) in the influent than in the final effluent. The overall removal in the system ranged from 1.4 log units for coliphages in the cold period to 5.0 log units for *E.coli* in the hot period. The evaluation of the pair-wise post-hoc comparisons showed that there were almost no seasonal variation in microbial removal during the study period. Significant differences ($P < 0.05$) between both periods were only observed for *E.coli* with the highest removal rates recorded in the hot period. The facultative pond was the most effective in the removal of faecal streptococci (both in winter and summer) and total coliforms (only in winter). In contrast, the highest removal efficiencies for coliphages were reported in the maturation pond (both in winter and summer).

3.2.3. Parasitological parameters

Table 3 shows the occurrence and concentration of pathogenic parasites in the WSPs system. In raw wastewater, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts and helminth eggs were detected in 26/26 (100%) of analyzed samples with an average of 14.9 oocysts/L, 67.1 cysts/L and 1.8 eggs/L, respectively. About 60% of the helminth eggs isolated from raw wastewater were *Ascaris* spp., the remaining eggs were *Trichuris* spp., *Hymenolepis* spp. and *Toxocara* spp. (Figure 2). At the system exit, *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts were detected in 50% and 73% of analyzed samples, respectively, with average concentrations < 1 (oo)cyst/L. No helminth eggs were found at the outlet of the system. The overall removal ranged from 96% for *Cryptosporidium* oocysts to 100% for helminths (Figure 3). The anaerobic pond was the most effective in the removal of oocysts and cysts, both in winter and summer. On the contrary, the highest removal efficiencies for helminth eggs were reported in the facultative pond although the anaerobic pond also achieved excellent removals ($>93\%$). Figure 3 shows the microbial removal rates (\log (oo)cyst/eggs removed $\text{m}^{-2}\text{day}^{-1}$) in the different ponds of the system. The anaerobic pond obtained the highest removal rates for all parasites, both in winter and summer, with significant differences with regard to facultative and maturation ponds. The ANOVA test revealed that there was almost no seasonal variation in the removal rates during the study period. Significant differences ($P < 0.05$) were only observed for *Giardia* in the entire system between the hot period ($4.3 \log$ cysts removed $\text{m}^{-2}\text{day}^{-1}$) and the cold period ($3.9 \log$ cysts removed $\text{m}^{-2}\text{day}^{-1}$).

3.3. Relationships between pathogenic parasites and chemical-microbiological parameters

The statistical analysis of the association between the occurrence of parasites and the physico-chemical and microbiological parameters is summarized in Table 4. Significant correlations (r -Spearman, $p < 0.01$) were found both in raw wastewater and effluent of

anaerobic pond between pathogenic parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, and helminths) and parameters as BOD₅, TSS, VSS, TP, total coliforms and coliphages. However, no other significant correlations were observed for any of the studied sampling points. On the other hand, significant correlations (*r*-Spearman, $p < 0.01$) were also reported between the occurrence of parasites and the physico-chemical and microbiological parameters when considering all samples (influent and effluents).

3.4. Parasitological content of the waste stabilization ponds sludge samples

Table 5 shows the average concentrations of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts and helminth eggs in the sludge of the three ponds. The anaerobic pond reported the highest concentrations for all parasites with concentrations ranging from 28.4 eggs/g d.w. to 6.8×10^2 cysts/g d.w. Sludge samples taken in the maturation pond neither contained protozoan (oo)cysts nor helminth eggs. The sludge accumulation rates ranged from 34.9 m³/yr in the maturation pond to 101.8 m³/yr in the facultative pond and the solid content of the sludge ranged from 12.9% in the anaerobic pond to 23.7% in the facultative pond.

DISCUSSION

The efficiency of stabilization ponds for bacteria and pathogenic parasites removal from wastewater has been widely demonstrated worldwide (Grimason et al., 1996; Amahmid et al., 2002; Kouraa et al., 2002). Experimental data suggest that these systems may remove up to 6 log units of bacteria and practically all the protozoan and helminth eggs producing a final effluent that meet the WHO guidelines and recent revisions for use of treated wastewater in agricultural unrestricted irrigation (Blumenthal et al., 2000). Our results are in accordance with such studies and confirm the suitability of the waste stabilization ponds for removing pathogens from domestic wastewater. These performances were higher than those observed in

conventional treatment processes such as activated sludge or primary treatments where reductions of 1-2 log units for bacteria and 70-99% for protozoan and helminth eggs were found (Robertson et al., 2000; Jiménez et al., 2001; Ottoson et al., 2006; Reinoso and Bécarea, 2007).

On the other hand, the minimum retention period of the ponds required to ensure the complete removal of the pathogens is yet unclear. For instance, Jiménez et al., (2007) indicated that a minimum retention time of 5-20 days depending on the initial concentration is required for efficiently remove helminth eggs while that almost 38 days would be necessary to remove protozoan cysts (Grimason et al., 1996; Mara, 2003). The different size of the parasites and therefore the different settling velocities, $108\text{-}425 \mu\text{m s}^{-1}$ for helminths, $0.67 \mu\text{m s}^{-1}$ for *G. lamblia* and $0.27 \mu\text{m s}^{-1}$ for *C. parvum* (Mara 2003; Dai and Boll, 2006) may explain this difference. In our study, the WSPs system achieved removal rates $>95\%$ for all parasites with only 6 days of theoretical retention time (10% of the original design). This low time was due to the inflow increase showed during the study period as consequence of infiltration waters. Even so, the system produced a final effluent with an acceptable microbiological quality for wastewater reuse.

Our physicochemical results also reflected the well performance of the WSPs system, being the anaerobic ponds the most effective, especially in the cold period. However, only BOD₅ removal was significantly higher in winter than summer. Similarly, small seasonal variations were observed between both periods regarding bacteria removal, which varied with the type of pond and indicator bacteria. These results are different to those described by García et al. (2008), who in a maturation pond reported higher removal efficiencies during the summer than during winter for total coliforms, faecal coliforms and faecal streptococci. No significant differences were found between the hot and cold periods for pathogenic parasites, probably due to the low retention time of the system. With regard to the relationships between

the occurrence of parasites and the physico-chemical and bacteriological parameters, it is necessary to indicate that such relations varied along pond effluents due to different behaviour of the pathogens in natural systems (Reinoso et al., 2008).

Sunlight disinfection, sedimentation, natural die-off, predation and physico-chemical conditions have been identified as the many factors involved in the removal and/or destruction of pathogens in WSPs. Some authors have suggested that sunlight may be the single most important factor causing natural disinfection in WSPs (Curtis et al., 1992b; Davies-Colley et al., 1999). However, this process may be limited by factors affecting the penetration of solar radiation into pond water such as depth, algal concentration or mixing. In a previous paper (Reinoso and Bécáres, 2008), we determined that the survival of *C. parvum* oocysts in a maturation pond in absence of sunlight ($K_d = 0.0432 \text{ day}^{-1}$) was four times longer than in sunlight conditions ($K_d = 0.1871 \text{ day}^{-1}$) demonstrating the biocidal effect of sunlight. On the contrary, other studies have demonstrated that the performance of waste stabilization ponds in removing protozoan cysts and helminth eggs is mainly attributed to the process of sedimentation favored by the adsorption of the pathogens onto settleable solids and by relatively long retention times (Amahmid et al., 2002; Nelson et al., 2004). In this study, a settling experiment was designed to quantify the proportion of (oo)cysts and eggs removed by this mechanism. Our results suggested that anaerobic ponds were the most effective in parasite removal followed by facultative pond and maturation pond. These findings were similar to those previously reported which indicated that the majority of (oo)cysts, eggs and suspended solid material are removed by primary ponds (Jiménez et al., 2007). However, the low retention time of the ponds caused that the concentration of pathogens in the sludge was lower than we expected. Taking into consideration the influent and effluents concentrations, we estimated that the removal of (oo)cysts and eggs by sedimentation meant 8-15% of the total removal in the anaerobic pond and 3-5% in the facultative pond. Therefore, it is

necessary to indicate that other factors than settling, such as sunlight exposure and the physico-chemical conditions of the ponds (pH, temperature and dissolved oxygen) were the main factors involved in the removal of parasites in this system, as previously we had demonstrated (Reinoso et al., 2007; Reinoso and Bécares, 2008).

CONCLUSIONS

This study demonstrated that our WSPs system, with only 6 days of total retention time, significantly reduced the concentration of pathogenic and indicator microorganisms from wastewater producing a final effluent suitable for agricultural irrigation. The surface removal rates reflected that anaerobic ponds were the most effective in removing parasites followed by facultative pond and maturation pond. However, sludge samples indicated that sedimentation was not the main removal mechanism during the study period. Other factors such as sunlight, pH, temperature and dissolved oxygen were comparatively more important in reduction of intestinal parasites in this system.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by the “Junta de Castilla y León” (Spain) under contract entitled “Parasite removal mechanisms in natural wastewater treatment systems”. R. Reinoso was funded by the University of León. The authors extend their gratitude to Alexandra Torres for their technical assistance and helpful guidance during this project.

REFERENCES

Amahmid, O., Asmama, S., Bouhoum, K., 1999. The effect of waste water reuse in irrigation on the contamination of food crops by *Giardia* cysts and *Ascaris* eggs. International Journal of Food Microbiology, 49 (1), 19-26.

- Amahmid, O., Asmama, S., Bouhoum, K., 2002. Urban wastewater treatment in stabilization ponds: occurrence and removal of pathogens. *Urban water* 4, 255-262.
- APHA, AWWA, EFA, 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. Washington, DC, USA.
- Blumenthal, U.J., Mara, D.D., Peasey, A., Ruiz-Palacios, G., Stott, R. 2000. Approaches to establishing microbiological quality guidelines for treated wastewater use in agriculture: recommendations for the revision of the current WHO guidelines. *WHO Bulletin*, 78(9), 1104-1116.
- Bouhoum, K., Schwartzbrod, J., 1998. Epidemiological study of intestinal helminthiasis in a Marrakech raw sewage spreading zone. *Zentralblatt Hygiene Umweltmed*, 200, 553-561.
- Bouhoum, K., Amahmid, O., Asmama, S., 2000. Occurrence and removal of protozoan cysts and helminth eggs in waste stabilization ponds in Marrakech. *Water Sci. Technol.* 42 (10-11), 159-164.
- Bukhari, Z., Smith, H.V., Sykes, N., Humphreys, S.W., Paton, C.A., Girdwood, R.W.A., Fricker, C.R., 1997. Occurrence of *Cryptosporidium* spp oocysts and *Giardia* spp cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England. *Water Sci. Tech.* 35, 385-390.
- Cifuentes, E., Blumenthal, U., Ruiz-Palacios, G., Bennet, S., 1992. Biological health risks associated with the composting of wastewater plant sludge. *J. Wat. Poll. Control. Fed.* 56, 1269-1276.
- Curtis, T.P., Mara, D.D., Silva, S.A., 1992b. The effect of sunlight on faecal coliforms in ponds: implications for research and design. *Water Sci. Technol.* 26 (7,8), 1729-1738.
- Dai, X., Boll, J., 2006. Settling velocity of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. *Water res.* 40, 1321-1325.
- Davies-Colley, R.J., Donnison, A.M., Speed, D.J., Ross, C.M., Nagels, J.W., 1999.

- Inactivation of faecal indicator micro-organisms in waste stabilization ponds: interactions of environmental factors with sunlight. *Water Res.* 33, 1220-1230.
- García, M., Soto, F., González, J.M., Bécares, E., 2008. A comparison of bacterial removal efficiencies in constructed wetlands and algae-based systems. *Ecological Eng.* (In press: doi:10.1016/j.ecoleng.2007.11.012).
- Grimason, A.M., Smith, H.V., Thitai, W.N., Smith, P.G., Jackson, M.H., Girdwood, R.W.A., 1993. Occurrence and removal of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in Kenyan waste stabilisation ponds. *Water Sci. Technol.* 27, 97-104.
- Grimason, A.M., Wiandt, S., Baleux, B., Thitai, W.N., Bontoux, J., Smith, H.V., 1996. Occurrence and removal of *Giardia* sp. cysts by Kenyan and French waste stabilisation pond systems. *Water Sci. Technol.* 33 (7), 83-89.
- Juanicó, M., Milstein, A., 2004. Semi-intensive treatment plants for wastewater reuse in irrigation. *Water Sci. Technol.* 50 (2), 55-60.
- Jiménez, B., Maya-Rendón, C., Salgado-Velázquez, G., 2001. The elimination of helminth ova, faecal coliforms, Salmonella and protozoan cysts by various physicochemical processes in wastewater and sludge. *Water Sci. Tech.* 43 (12), 179-182.
- Jimenez, B., 2007. Helminth ova removal from wastewater for agriculture and aquaculture reuse. *Water Sci. Technol.* 55 (1-2), 485-493.
- Kouraa, A., Fethi, F., Fahde, A., Lahlou, A., Ouazzani, N., 2002. Reuse of urban wastewater treated by a combined stabilisation pond system in Benslimane (Morocco). *Urban water* 4, 373-378.
- Mara, D., 2003. Domestic wastewater treatment in developing countries. Ed. Earth Scan, London.
- Nelson, K.L., Jiménez-Cisneros, B., Tchobanoglous, G., Darby, J.L., 2004. Sludge accumulation, characteristics and pathogen inactivation in four primary waste

- stabilization ponds in central Mexico. *Water Res.* 38, 111-127.
- Ottoson, J., Hansen, A., Björleinius, B., Norder, H., Stenström, T.A., 2006. Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. *Water Res.* 40, 1449-1457.
- Reinoso, R., Bécares, E., Smith, H.V., 2007. Effect of various environmental factors on the viability *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Appl. Microbiol.* (In press: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03620.x).
- Reinoso, R., Bécares, E., 2007. The occurrence of intestinal parasites in swine slurry and their removal in activated sludge plants. *Bioresource Technology* (In press: doi:10.1016/j.biortech.2007.11.056).
- Reinoso, R., Bécares, E., 2008. Environmental inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in waste stabilization ponds. *Microbial Ecology* (Submitted).
- Reinoso, R., Torres, L.A., Bécares, E., 2008. Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater. *Science Of The Total Environment* (Submitted).
- Robertson, L.J., Paton, C.A., Campbell, A.T., Smith, P.G., Jackson, M.H., Gilmour, R.A., Black, S.E., Stevenson, D.A., Smith, H.V., 2000. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. *Water Res.* 34, 2310-2322.
- Schwartzbrod, J., 2003. Quantification and viability determination for helminth eggs in sludge (Modified EPA Method 1999). University of Nancy.
- StatSoft, Inc. 2001. *STATISTICA* 6.0, Tulsa (OK), USA.
- Stott, R., May, E., Mara, D.D., 2003. Parasite removal by natural wastewater treatment systems: performance of waste stabilisation ponds and constructed wetlands. *Water Sci. Technol.* 48 (2), 97-104.

Vesey, G., Slade, J. S., Byrne, M., Shepherd, K., Fricker, C. R., 1993. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 82-86.

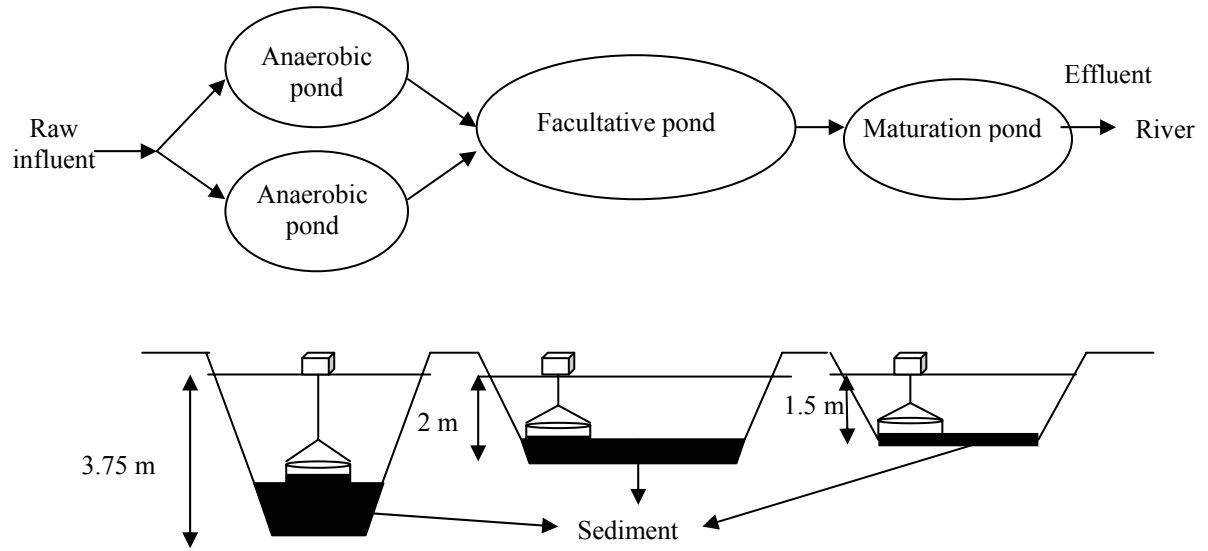


Figure 1. Schematic diagram of the WSPs system and emplacement of the settling containers.

Table 1

Physicochemical characteristics of water samples in each pond (mean values \pm standard deviation, n = 11 in cold period and 15 in hot period). RW: raw wastewater; AP: anaerobic pond; FP: facultative pond; MP: maturation pond.

		Cold period	Hot period	All the year
Temperature ($^{\circ}$ C)	RW	13.1 \pm 0.6	20.1 \pm 1.4	17.1 \pm 3.7
	AP	11.6 \pm 0.9	20.2 \pm 1.3	16.6 \pm 4.5
	FP	8.1 \pm 1.9	21.8 \pm 2.1	15.9 \pm 7.2
	MP	7.1 \pm 2.1	21.7 \pm 1.9	15.5 \pm 7.6
pH	RW	7.8 \pm 0.3	7.9 \pm 0.8	7.8 \pm 0.6
	AP	7.4 \pm 0.2	7.8 \pm 0.6	7.6 \pm 0.5
	FP	7.7 \pm 0.3	8.2 \pm 0.6	8.0 \pm 0.5
	MP	7.7 \pm 0.5	8.7 \pm 0.7	8.3 \pm 0.8
Conductivity (μ S/cm)	RW	512 \pm 53	433 \pm 131	466 \pm 111
	AP	446 \pm 48	349 \pm 78	390 \pm 82
	FP	471 \pm 27	340 \pm 69	395 \pm 85
	MP	475 \pm 23	330 \pm 65	391 \pm 89
Dissolved oxygen (mg/l)	RW	4.1 \pm 1.1	3.2 \pm 1.6	3.6 \pm 1.5
	AP	2.9 \pm 0.7	3.5 \pm 2.9	3.3 \pm 2.2
	FP	7.4 \pm 1.6	5.9 \pm 2.7	6.6 \pm 2.3
	MP	9.9 \pm 1.6	8.2 \pm 3.1	8.9 \pm 2.7

Table 2

Influent and final effluent concentrations and removal efficiencies for chemical and bacteriological parameters in the WSPs system (mean values \pm standard deviation, n = 11 in cold period and 15 in hot period). AP: anaerobic pond; FP: facultative pond; MP: maturation pond; WSP_s: Cumulative waste stabilization ponds.

Chemical parameters	Cold period						Hot period					
	Influent	Removal (%)				Final effluent	Influent	Removal (%)				Final effluent
		AP	FP	MP	WSP _s			AP	FP	MP	WSP _s	
BOD ₅ (mg/l)	32.1 \pm 9.9	65.9	55.6	3.7	83.5	4.9 \pm 1.8	29.8 \pm 12.2	50.9	30.9	16.2	59.4	10.9 \pm 5.6
TSS (mg/l)	52.9 \pm 27.3	61.8	36.9	24.7	78.9	8.9 \pm 5.3	45.2 \pm 53.9	67.1	18.4	20.5	57.8	12.6 \pm 6.9
VSS (mg/l)	38.3 \pm 21.5	58.0	51.6	17.4	77.3	5.5 \pm 2.2	29.1 \pm 26.2	60.9	33.5	10.8	57.1	8.7 \pm 5.4
TKN (mg/l)	11.5 \pm 5.4	48.6	25.4	26.3	64.7	3.1 \pm 1.0	8.3 \pm 3.0	39.1	43.1	49.7	81.8	1.4 \pm 0.6
NH ₄ ⁺ (mg/l)	5.9 \pm 1.7	31.6	20.7	29.9	60.8	2.1 \pm 0.4	4.3 \pm 1.8	30.1	47.8	54.0	79.6	0.7 \pm 0.5
TP (mg/l)	0.7 \pm 0.3	36.8	4.1	4.9	36.9	0.4 \pm 0.1	0.9 \pm 0.4	31.7	7.3	9.9	33.3	0.6 \pm 0.1
Indicator organisms	Removal (log)						Removal (log)					
Total coliforms (log CFU/100 ml)	5.6 \pm 0.6	1.0	1.2	0.6	2.8	2.8 \pm 0.3	6.8 \pm 0.6	1.2	1.0	0.3	2.5	4.3 \pm 0.6
<i>E.coli</i> (log CFU/100 ml)	5.3 \pm 0.8	1.3	0.8	0.9	3.0	2.4 \pm 0.4	6.5 \pm 0.7	1.2	2.8	1.0	5.0	1.5 \pm 0.9
Faecal streptococci (log CFU/100 ml)	4.3 \pm 0.8	0.6	1.8	0.6	3.0	1.3 \pm 0.5	5.1 \pm 0.4	0.9	2.4	0.6	3.9	1.2 \pm 0.6
Coliphages (log PFU/100 ml)	2.0 \pm 0.5	0.3	0.4	0.7	1.4	0.6 \pm 0.8	5.3 \pm 1.3	0.1	1.3	1.3	2.7	2.6 \pm 1.7

Table 3

Occurrence and concentration of pathogenic parasites in raw wastewater and pond effluents

	<i>Cryptosporidium</i>			<i>Giardia</i>			Helminths		
	Percentage positive (%)	Concentration range (oocysts/L)	Average concen. (oocysts/L)	Percentage positive (%)	Concentration range (cysts/L)	Average concen. (cysts/L)	Percentage positive (%)	Concentration range (eggs/L)	Average concen. (eggs/L)
Raw wastewater	100	5.3 - 40.1	14.9	100	17.5 – 217	67.1	100	0.2 - 5.9	1.8
Anaerobic	100	1.6 – 8.3	3.9	100	2.9 – 14.4	8.1	31	0 - 0.4	0.1
Facultative	69	0 – 2.7	1.2	85	0 – 5.3	2.4	0	0	0
Maturation	50	0 – 1.4	0.4	73	0 – 1.6	0.7	0	0	0

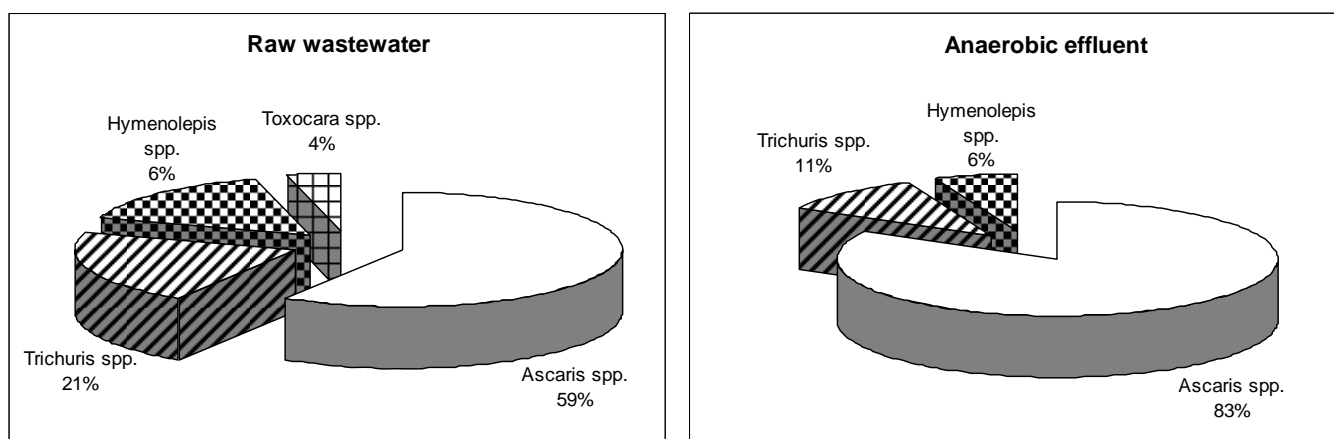


Figure 2. Species composition (%) of helminth eggs in raw wastewater and anaerobic effluent

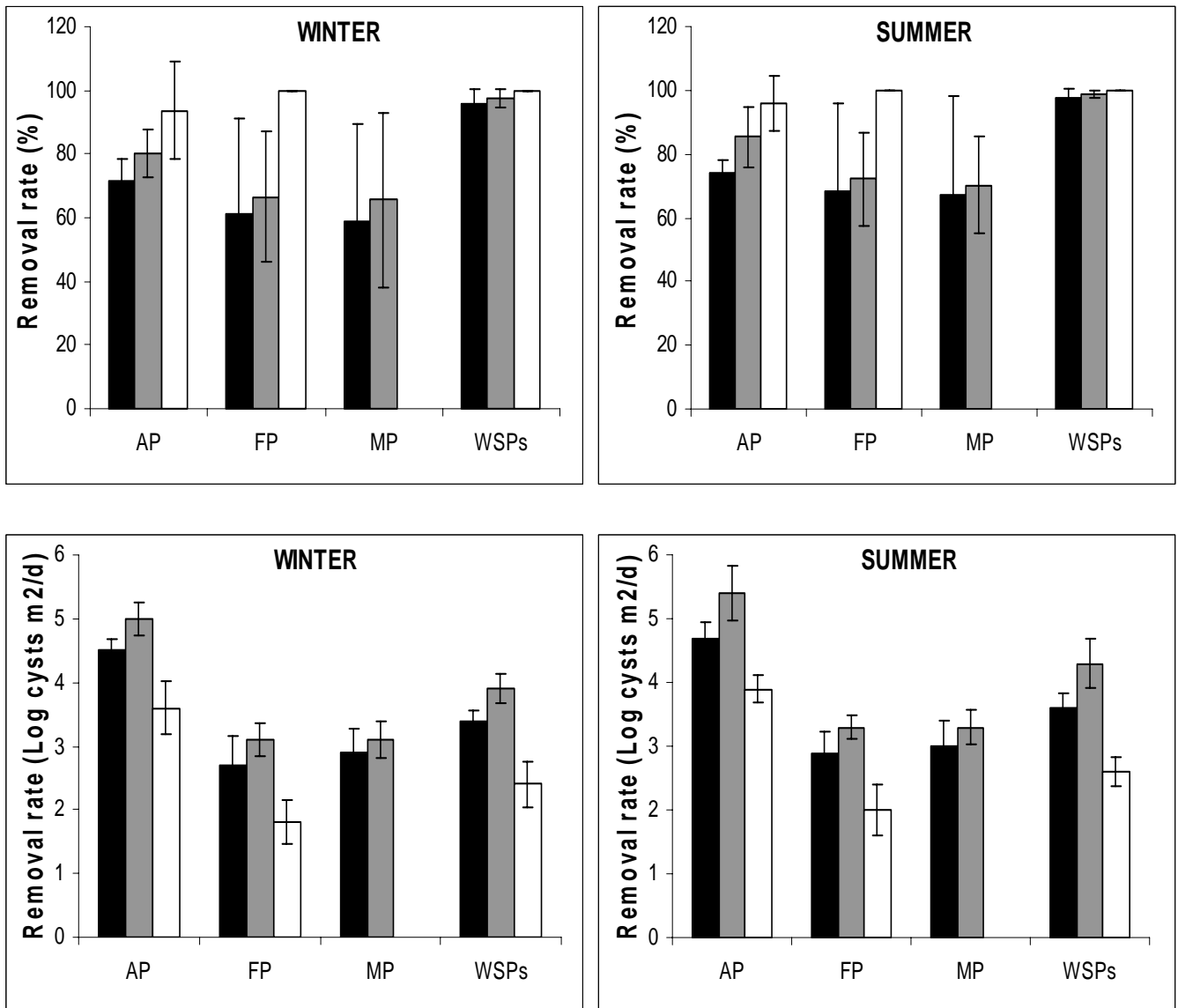


Figure 3. Average removal rates (in % or in log cysts/eggs m⁻²d⁻¹) of *Cryptosporidium* (■), *Giardia* (■) and helminths (□) in each pond; error bars show the standard deviation (n = 11 in cold period and 15 in hot period)

Table 4

Significant correlations (R-Spearman correlations coefficients, $p < 0.05$) between the number of parasites detected and the physicochemical and microbiological parameters of the water samples analysed in each pond and when considering all samples from the influent and effluents.

	Parasites	BOD ₅	TSS	VSS	TKN	NH ₄ ⁺	TP	Total coliforms	<i>E.coli</i>	Faecal streptococci	Coliphages
Influent	<i>Cryptosporidium</i>	0.59	-	-	-	-	0.59	-	-	-	0.54
	<i>Giardia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.48
	Helminths	0.64	0.55	0.51	-	-	-	-	-	-	-
Effluent of anaerobic pond	<i>Cryptosporidium</i>	0.7	-	-	-	-	0.52	-	-	-	0.42
	<i>Giardia</i>	0.65	-	-	-	-	0.61	0.48	-	-	0.7
All samples	<i>Cryptosporidium</i>	0.69	0.58	0.65	0.80	0.68	0.49	0.76	0.79	0.81	0.46
	<i>Giardia</i>	0.73	0.52	0.62	0.81	0.68	0.49	0.79	0.84	0.87	0.47
	Helminths	0.72	0.64	0.69	0.71	0.61	0.48	0.67	0.71	0.71	0.31

Table 5

Mean concentrations of *Cryptosporidium*, *Giardia* and helminths in the sediment of the ponds

Pond type	% Solid in the sediment	Accumulation rate		<i>Cryptosporidium</i> (oocysts/g dry weight)	<i>Giardia</i> (cysts/g d.w.)	Helminths (eggs/g d.w.)
		m ³ /yr	m ³ /pers yr			
Anaerobic	12.9	38.9	0.026	1.1x10 ²	6.8x10 ²	28.4
Facultative	23.7	101.8	0.068	4.2	12.6	-
Maturation	23.1	34.9	0.023	-	-	-

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/scitotenv

Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater

Roberto Reinoso^{a,*}, Linda Alexandra Torres^a, Eloy Bécares^b

^aEnvironmental Research Institute, University of León, La Serna 58, 24007 León, Spain

^bDepartment of Biodiversity and Environmental Management, Faculty of Biological and Environmental Sciences, University of León, 24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2007

Received in revised form

5 February 2008

Accepted 24 February 2008

Keywords:

Natural systems

Wastewater treatment

Pathogens

Faecal indicators

Parasites

Constructed wetlands

Water reuse

ABSTRACT

A combined constructed wetland formed by a facultative pond (FP), a surface flow wetland (SF) and a subsurface flow wetland (SSF) was studied from December 2004 until September 2005 in north-western Spain in order to evaluate their efficiency in the removal of pathogenic and indicator microorganisms and to determine their relationships. Microbial removal ranged from 78% for coliphages to over 99% for helminth eggs, depending on the treatment system. The highest removal of indicator bacteria (total coliforms, *E. coli*, faecal streptococci and *Clostridium perfringens*) occurred in the stabilization pond, reaching 84%, 96%, 89% and 78%, respectively. However, the greatest removal of protozoan pathogens (*Cryptosporidium* and *Giardia*) and coliphages was found in the SSF wetland, 98%, 97% and 94%, respectively. In contrast, the SF wetland was most efficient in the removal of pathogenic parasites when considering superficial removal rates. Seasonal differences in organism removal were not statistically significant during the study period. First-order removal rate constants ranged from 0.0027 to 0.71 m/d depending on the microorganism and type of wetland. Significant correlations were found between pathogenic parasites and faecal indicators in the influent of the treatment system but not in the other sampling points suggesting that such relations varied along the system due to the different survival rates of the microorganisms.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Natural wastewater treatment systems have been widely used over the last few years as an alternative to conventional systems for the sanitation of small communities due to their minimum electric requirements and low maintenance costs (Mara et al., 1992; Brix, 1994; Vymazal, 2002; Bécares, 2006; Puigagut et al., 2007). Previous studies have focused attention on the ability of these systems to reduce microorganisms from wastewater, especially indicator microorganisms like the coliform group of bacteria (total and faecal coliforms) and the faecal streptococci group of bacteria (e.g. García and

Bécares, 1997; Perkins and Hunter, 2000; Hench et al., 2003). Alternative faecal indicators (coliphages, spore-forming anaerobic bacterium *Clostridium perfringens*) and pathogenic microorganisms, i.e., protozoan parasites and helminths, have also been incorporated in order to provide better information on disinfection capacities in natural systems for wastewater treatment (Grimason et al., 1996; Karpiscak et al., 2001; Stott et al., 2003). Encysted organisms are extremely resistant to the environmental stress and persist for longer time than conventional indicator bacteria being able to survive in water for several weeks depending on the temperature, physico-chemical characteristics, sunlight, etc., (Fayer et al.,

* Corresponding author. Environmental Research Institute, University of León, La Serna 58, León 24007, Spain. Tel.: +34 987 238001; fax: +34 987 291563.

E-mail address: rreit@unileon.es (R. Reinoso).

1998; Araki et al., 2001; Karim et al., 2004). These observations are consistent with those made previously in surface waters and freshwaters sediments (Davies et al., 1995; Medema et al., 1997). However, one of the major limitations in this field of investigation is the lack of studies comparing removal rates of indicator bacteria and pathogenic parasites in natural wastewater treatment systems.

The aims of this study were (i) to evaluate the efficiency of a combined constructed wetland (facultative pond, surface flow wetland and subsurface flow wetland) in the removal of total coliforms, *E. coli*, faecal streptococci, *C. perfringens*, coliphages, helminth eggs and protozoan parasites (*Cryptosporidium* and *Giardia*) (ii) to study the relationships between faecal indicators and pathogenic parasites in the different aquatic environments of the system and (iii) to determine the mechanisms responsible for their removal.

2. Materials and methods

2.1. Site description

The study was performed in a full wastewater treatment plant in Cubillas de los Oteros, a small village (150 inhabitants) in the province of León (north-western Spain). This system was continuously fed with domestic raw wastewater at a flow rate of 20.04 m³ day⁻¹ with an organic load of 1.17 g BODm⁻² day⁻¹. The system consists of a facultative pond of 1073 m² surface, 1.6 m depth, 75.9 days hydraulic retention time (HRT) and an inlet organic load of 1.86 g BODm⁻² day⁻¹ followed by a surface flow wetland planted with *Typha latifolia* (44 m², 30 cm layer of 6–8 mm gravel, 40 cm depth of water, 1.2 days HRT and an inlet organic load of 19.1 g BODm⁻² day⁻¹) and by a subsurface flow wetland planted with *Salix atrocinerea* (585 m², 55 cm layer of 6–8 mm gravel, 5.7 days HRT and an inlet organic load of 2.14 g BODm⁻² day⁻¹).

2.2. Sample collection

Wastewater samples were monthly collected from December 2004 until September 2005 from the different stages of the treatment system in sterile plastic containers (10 L for pathogenic parasites and 1 L for bacteria and coliphages) and transported to the laboratory for analysis. All samples were kept refrigerated until the microbiological analyses, which were done a few hours after sampling.

2.3. Microbiological analyses

Total coliforms, *E. coli* and faecal streptococci were detected by the membrane filtration method according to Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998), using 0.45 µm pore-size membrane filters (Millipore Corp., Bedford, MA) and selective agars, Chromocult® (*E. coli* and total coliforms) and KF-streptococcus (faecal streptococci). *C. perfringens* was determined by tube dilution using SPS agar (Angelotti et al., 1962). Coliphages were detected by the double agar layer method using *Escherichia coli*, strain ATCC 13706, as described by Adams (1959). All bacteriological media were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts were concentrated by calcium carbonate flocculation procedure (Vesey et al., 1993). Staining for visualization of oocysts/cysts was performed using specific fluorescent monoclonal antibodies (Aqua-Glo G/C Direct, Waterborne, Inc., New Orleans, La.) and epifluorescence microscope at 200 x and 400 x magnifications (Olympus BX 60 F5 equipped with Nomarski DIC optics, a blue filter (480 nm-excitation, 520 nm-emission) for the detection of FITC-mAb labelled oocysts and a UV filter block (350 nm-excitation, 450 nm-emission) for DAPI. The recovery efficiency of this method ranged from 30% to 60% (mean 44.1±10.8%, n=5). For these recovery studies, wastewater samples (10 L) previously determined to be negative for *Cryptosporidium* were seeded with

Table 1 – Influent and final effluent average microbial densities (in log₁₀ units for bacteria and coliphages) and removal efficiency (in %) at each stage of the combined constructed wetland

	Influent ^a	Removal (%)				Final effluent ^a
		Facultative pond (FP)	Surface flow wetland (SF)	Subsurface flow wetland (SSF)	Cumulative treatment system ^b	
<i>Cryptosporidium</i> (oocysts/L)	45.7* (7.55)	75.78	47.8	98.89	99.87	<1
<i>Giardia</i> (cysts/L)	280.94* (99.14)	87.49	63.08	97.69	99.91	<1
Helminths (eggs/L)	9.56* (10.05)	92.46	>99.99	–	>99.99	<1
Total coliforms (CFU/100 mL)	6.75* (0.66)	84.82	36.07	69.27	97.12	4.40 (1.53)
<i>E. coli</i> (CFU/100 mL)	6.35* (0.55)	96.81	37.56	72.02	99.33	3.23 (1.6)
Faecal streptococci (CFU/100 mL)	5.31* (0.78)	89.61	61.97	54.67	99.29	2.62 (0.96)
<i>Clostridium perfringens</i> (CFU/mL)	2.61* (0.87)	78.44	33.93	47.68	94.63	1.08 (0.62)
Coliphages (PFU/100 mL)	4.86 (1.45)	53.92	14.58	94.88	78.39	2.62 (3.11)

^a Arithmetic mean (standard error in parentheses) of 10 samples (3 replicate/sample) collected monthly over 1 year sampling period. Values followed by an asterisk are significantly different (Tukey HSD test, $p < 0.05$) when compared between influent and effluent concentrations.

^b The cumulative treatment system removal was assessed by the difference between the influent and final effluent (SSF effluent), expressed as a percent (%).

Table 2 – Significant differences (ANOVA, Tukey HSD post-hoc test, $p < 0.05$) in the removal efficiency of the microorganisms between the different wetlands

	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	Helminths	TC	<i>E. coli</i>	FS	<i>Clostridium perfringens</i>	Coliphages
FP-SF	0.00013	0.00013	–	0.00572	0.00332	–	0.04585	–
FP-SSF	0.00012	0.00078	–	–	–	–	–	–
SF-SSF	0.00013	0.00013	–	–	–	–	–	0.00866

Facultative pond (FP), surface flow wetland (SF) and sub-surface flow wetland (SSF).

1×10^4 purified *Cryptosporidium parvum* oocysts (Iowa Strain Lot# 60710, Sterling Parasitol. Lab., Tucson, Arizona). The concentration and further identification of intestinal helminth eggs in wastewater was performed using the modified Baillenger method applied to wastewater (Bouhoum and Schwartzbrod, 1989). The number of eggs L^{-1} in wastewater was subsequently determined by the McMaster technique. All microbiological analyses were conducted by triplicate.

2.4. Data analyses

Statistical analyses were carried out using the STATISTICA 6.0 software package (StatSoft, Inc., 2001). One way analysis of variance (ANOVA) was used to check the influence of each factor considered (type of wetland and seasonal variation) in the removal of microorganisms. Assumptions for ANOVA test were previously checked and data were logarithmically transformed ($\log_{10} X + 1$) when necessary. Subsequent pair-wise comparisons were performed using Tukey HSD post hoc tests (HSD, honestly significant difference). Organisms removal kinetic constants were estimated following the equation: $\ln C_0/C_1 = k_1/HLR$ (García et al., 2004), where C_0 and C_1 are the influent and effluent organism concentration, k_1 is the first-order kinetic constant and HLR is the hydraulic loading rate.

3. Results

3.1. Microbial removal by constructed wetlands system

A summary of the average microbial concentration both in the influent and final effluent and average percent removal in the

wetland is presented in Table 1. Other than coliphages, all microorganisms showed mean concentrations significantly higher (1–3 orders of magnitude) in the influent than in the final effluent. The overall removal in the system ranged from 78.39% for coliphages to >99.99% for helminths. The SSF wetland achieved the highest removal of protozoan pathogens (*Cryptosporidium* and *Giardia*) and coliphages, 98.8%, 97.6% and 94.8%, respectively. In contrast, the highest removal efficiencies for indicator bacteria were reported in the facultative pond (78–96%). Helminths, mainly *Ascaris lumbricoides* and *Hymenolepis* species (*H. nana* and *H. diminuta*), were only detected in raw wastewater and pond effluent. Eggs of *Trichuris trichiura*, *Toxocara* spp. and *Strongyles* were occasionally found.

Statistical differences ($p < 0.05$) in the removal of the microorganisms were highly dependent on the type of wetland (Table 2), with higher differences for (oo)cysts than faecal indicators. Table 3 shows the microbial removal rates (cfu/cyst removed $m^{-2} day^{-1}$) in the different wetlands of the system. The SF wetland was most effective in the removal of (oo)cysts and eggs, both in winter and summer. In contrast, the facultative pond obtained the higher removals for all bacteria in winter but not in summer. The evaluation of the pair-wise post-hoc comparisons showed that there were almost no seasonal variation in microbial removal during the study period. Significant differences ($p < 0.05$) were only observed in SF wetland between both periods (winter and summer) for *Giardia* and faecal streptococci.

In order to determine the effect of HLR in organism removal, kinetic constants (k_d) were assessed for each microorganism in the different wetlands of the system, both in winter and summer (Table 4). Due to the low differences in the flow during the study period, the linear regressions were not

Table 3 – Removal loading rates^a in the different wetlands in winter ($n=4$) and summer period ($n=6$). Facultative pond (FP), surface flow wetland (SF) and sub-surface flow wetland (SSF)

	Winter				Summer			
	FP	SF	SSF	Total treatment system	FP	SF	SSF	Total treatment system
<i>Cryptosporidium</i>	2.81	3.21	2.13	2.7	2.79	3.38	2.28	2.71
<i>Giardia</i>	3.66	3.69	2.42	3.49	3.6	4.03*	2.58	3.47
Helminths	2.06	2.51	–	1.89	2.08	2.64	–	1.92
Total coliforms	9.02	6.88	5.76	8.87	8.83	7.01	7.74	8.7
<i>E. coli</i>	8.81	2.01	4.74	8.61	8.38	6.38	5.28	8.2
Faecal streptococci	7.45	1.79	3.94	7.25	7.55	7.93*	4.9	7.43
<i>Clostridium perfringens</i>	7.28	3.92	4.32	7.18	6.29	4.1	3.56	6.17
Coliphages	6.04	–	–	–	3.37	2.93	8.12	7.15

^a The removal rates were expressed as log cfu or cysts removed $m^{-2} day^{-1}$. Values followed by an asterisk are significantly different (Tukey HSD test, $p < 0.05$) when compared between winter and summer within the same wetland.

Table 4 – Organisms decay constants (k_d ; m/d) in the different wetlands of the system for both winter ($k_{d,w}$) and summer ($k_{d,s}$)

Microorganisms	FP		SF		SSF	
	$k_{d,w}$	$k_{d,s}$	$k_{d,w}$	$k_{d,s}$	$k_{d,w}$	$k_{d,s}$
<i>Cryptosporidium</i>	–	–	0.0096	0.0842	0.0119	0.0359
<i>Giardia</i>	–	0.0027	–	–	0.0284	0.0721
Helminths	–	0.0312	–	–	–	–
Total coliforms	0.0494	0.0102	–	0.0688	0.0885	0.0903
<i>E. coli</i>	0.0529	–	–	0.7173	0.1002	–
Faecal streptococci	–	0.0087	–	–	–	–
<i>Clostridium perfringens</i>	–	–	–	0.0159	–	0.1803
Coliphages	–	–	–	–	–	–

Only significant regressions are shown. Facultative pond (FP), surface flow wetland (SF) and sub-surface flow wetland (SSF).

significant in some cases. The positive slopes of the linear regressions ranged from 0.0027 to 0.71 m/d, depending on particular organism and type of wetland.

3.2. Relationship between intestinal parasites and indicator microorganisms

Significant correlations (r -Spearman, $p < 0.05$) were found in raw wastewater between pathogenic parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, and helminths) and faecal indicators as total coliforms, *E. coli* and faecal streptococci (Table 5). However, no other significant correlations were observed for any of the studied sampling points. This absence of correlation could be due to the different rates of survival of the microorganisms in each wetland. On the other hand, significant statistical correlations (r -Spearman, $p < 0.01$) were reported between the parasites and faecal indicators, except coliphages, when considering all samples (influent and effluents).

4. Discussion

Different processes may be involved in the removal of microorganisms in a natural wastewater treatment system. Their fate, distribution and survival is influenced by the type of wetland and associated factors that cause their removal or inactivation. In this study, we evaluated the removal efficiency of pathogenic and indicator organisms by a combined constructed wetland indicating the main decay factors for each microorganism.

Wetlands system effectively removed all microorganisms studied (Table 1), with reductions ranging from 78% to >99%, which are within the broad ranges previously reported in constructed wetlands treating domestic wastewater (Soto et al., 1999; Greenway, 2005; Morsy et al., 2007). Our findings showed that faecal streptococci and *E. coli*, commonly used as indicator bacteria, were the most reduced microorganisms (approximately 3 log). However, these reductions were not enough to achieve a final effluent that would meet the WHO guidelines faecal bacteria limit and recent revisions for use of treated wastewater in agricultural unrestricted irrigation (Blumenthal et al., 2000).

The type of wetland significantly influenced the removal efficiency of the microorganisms during the study period (Table 2). The facultative pond, due to their long retention time (>75 days), obtained the highest removal of indicator bacteria, both percentage and surface removal rates. Protozoan parasites and helminths were also effectively removed in this pond. These removal efficiencies were 1–2 orders of magnitude higher than previously reported by García et al. (2006) in a similar pond of 15 m² surface and 20 days HRT, where TC and FS removal rates of 7.05 and 5.84 log-cfu m⁻² day⁻¹ were found, respectively. Several processes could contribute to the higher bacterial removal observed in the facultative pond. Adsorption onto settleable solids and further sedimentation (Grimason et al., 1996) and solar irradiation (Curtis et al., 1992; Davies-Colley et al., 1997) are thought to be the main bacterial removal mechanisms in the pond although other factors as predation by antagonistic organisms (Manage et al., 2002), physico-chemical conditions (Araki et al., 2000, 2001) and toxins excreted by certain algae (Oufdou et al., 2001) could also affect the removal of microorganisms.

The SSF wetland was significantly more efficient in the removal of coliphages and protozoan cysts than SF and FP. However, the highest surface removal rates for pathogenic parasites were reported in SF wetland, probably due to their smaller surface (Table 3). Comparable coliphage removals, ranging from 90% to 95%, were found by previous authors in similar subsurface flow constructed wetlands (Thurston et al., 2001; Hench et al., 2003). Thurston et al. (2001) also observed in this type of wetlands that *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts were reduced by an average of 87% and 64%, respectively, values slightly lower than those obtained in this study (Table 1). On the contrary, bacterial removal rates found in our wetlands (Table 3) were lower than reported by García et al. (2006) in similar wetlands, 10.23 and 7.29 log-cfu m⁻² day⁻¹ for total coliforms and faecal streptococci, respectively, in a SF wetland (3 days HRT) and 9.32 and 7.70 log-cfu m⁻² day⁻¹, respectively, in a SSF wetland (3 days HRT). Filtration

Table 5 – Significant correlations (r -Spearman correlations coefficients, $p < 0.05$) between pathogenic parasites and faecal indicators in the influent and when considering all samples from the influent and effluents

	Parasites	Total Coliforms	<i>E. coli</i>	Faecal Streptococci	<i>Clostridium perfringens</i>	Coliphages
Influent	<i>Cryptosporidium</i>	0.91	0.81	0.8	–	–
	<i>Giardia</i>	0.73	–	0.83	–	–
	Helminths	0.87	0.87	0.71	–	–
All samples	<i>Cryptosporidium</i>	0.73	0.67	0.8	0.65	–
	<i>Giardia</i>	0.72	0.69	0.8	0.63	–
	Helminths	0.7	0.68	0.77	0.63	–

and adsorption of microorganisms to root-substrate complexes and associated biofilm (Williams et al., 1995; Gerba et al., 1999; Sleytr et al., 2007) were shown to be the main removal mechanisms of intestinal parasites in these wetlands. Others mechanisms of microbial removal could be sedimentation (Quiñónez-Díaz et al., 2001; Stott et al., 2003; Karim et al., 2004) or predation (Decamp et al., 1999; Stott et al., 2001).

With regards to seasonal differences, some authors have observed higher removal efficiencies during the hot season (El Hamouri et al., 1994; Karathanasis et al., 2003) whereas others have not found seasonal changes (García et al., 2006). In our study, only the removal rates of *Giardia* cysts and faecal streptococci in SF wetland were significantly higher ($p < 0.05$) in summer than winter period and no seasonal differences were observed for the rest of organisms. Some authors suggest that the performance of these systems in winter is worse due to reduced dissolved oxygen concentration in the root zone and lower microbial activity (Armstrong et al., 1990; Rivera et al., 1995). However, Quiñónez-Díaz et al. (2001) indicated that shading by vegetation may reduce exposure from UV light decreasing the removal of microorganisms. Mezrioui and Baleux (1992) and Hatano et al. (1993) demonstrated that the effect of temperature and seasonal variation on removal of microorganisms may vary with different pathogen species and type of wetland vegetation.

Previous works have demonstrated that the HLR is an important factor for the design of constructed wetlands (García et al., 2004). However, the lack of good adjustments in the linear regressions showed in the present study for most organisms (Table 4), due to the scarce flow variability in the system, demonstrated a no clear effect on the removal of microorganisms suggesting that other factors as temperature, hydraulic retention time, solar irradiation, physico-chemical characteristics, etc., should be taken into consideration when microorganisms decay models are assumed.

There are few papers at present evaluating the relationships between indicator organisms and pathogenic parasites in natural systems for wastewater treatment (Lemarchand and Lebaron, 2003; Karim et al., 2004; Savichtcheva and Okabe, 2006). Studies carried out in surface, river and marine waters have reported good correlations, especially between the *Cryptosporidium* oocysts concentrations and the levels of faecal bacteria (Hsu et al., 1999; Hörman et al., 2004). In this study, we found significant correlations (r -Spearman, $p < 0.05$) between intestinal parasites and indicator bacteria in the influent of wetlands system and also when considering all samples (influent and effluents) demonstrating that these relations may also occur in wastewater (Table 5). Previous studies have shown contradictory results about these pathogen-indicator correlations in wastewater. Lemarchand and Lebaron, (2003) in France, observed significant correlations between *Cryptosporidium* and faecal coliforms (r -Spearman = 0.44, $p < 0.05$) in treated wastewater effluents. On the contrary, no significant Spearman correlations between concentrations of indicator organisms and pathogens were observed by Harwood et al. (2005) in several wastewater reclamation facilities in the United States. However, these authors using a binary logistic regression detected weak correlations between faecal coliforms concentrations and *Giardia* presence/absence (r -square = 0.222), and between total coliforms and infectious *Cryptosporidium* pre-

sence/absence (r -square = 0.241), suggesting that there was pathogen-indicator interaction. Similarly, Karim et al. (2004) found die-off rates for faecal coliforms ($0.256 \log_{10} \text{ day}^{-1}$) approximately 10x faster than for *Giardia* cysts ($0.029 \log_{10} \text{ day}^{-1}$) in two constructed surface-flow wetlands demonstrating that pathogens and indicators may have different trends in the aquatic environments. Our results also showed that these relations varied along wetland effluents, in which no significant relationships were reported, probably as consequence of the different behaviour of the microorganisms in the natural systems, which is governed by numerous factors, as for example, type of wetland, water flow, physico-chemical conditions, climatic characteristics, organism survival, sedimentation, filtration, etc.

5. Conclusions

The combined use of different natural wastewater treatment systems removed significant amounts of pathogenic and indicator microorganisms. However, these reductions were not enough for a safety reuse of the final effluent. The type of wetland had a clear effect on the decay rate of the microorganisms being FP more efficient than SF and SSF in bacterial removal and SSF more efficient than SF and FP in protozoan parasites and coliphages removal. With the exception of *Giardia* and Streptococci in SF wetland, no other significant differences were found between winter and summer when considering removal loading rates. In addition, we found significant relationships between pathogenic parasites and faecal indicators in the influent of the wetlands system although these relations varied along the wetlands system due to different behaviour and survival of the microorganisms in each wetland.

Acknowledgments

This study was financially supported by the Castilla and León Institute for Agricultural Technology (ITACyL) under contract LE-02-2005 entitled "Health Risks in Using Waste Water in Agriculture". R. Reinoso was funded by the University of León. The authors extend their gratitude to Dr. Juan Antonio Alvarez for their technical assistance and helpful guidance during this project.

REFERENCES

- Adams MH. Coliphages. New York: Interscience Publisher, Inc.; 1959.
- Angelotti R, Hall HE, Foter MJ, Lewis KM. Quantitation of *Clostridium perfringens* in food. *Appl Microbiol* 1962;10:193–9.
- APHA, AWWA, EFA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. 1998. Washington, DC, USA.
- Araki S, González JM, De Luis E, Bécares E. Viability of nematode eggs in HRAP. The effect of the physico-chemical conditions. *Water Sci Technol* 2000;42(10/11):371–4.
- Araki S, Martín-Gómez S, Bécares E, De Luis E, Rojo-Vazquez F. Effect of high-rate algal ponds on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(7):3322–4.

- Armstrong W, Armstrong J, Beckett PM. Measurement and modelling of oxygen release from roots of *Phragmites australis*. In: Cooper PF, Findlater BC, editors. *Constructed Wetlands in water pollution control*. New York, USA: Pergamon Press; 1990. p. 41–51.
- Bécares E. Limnology of natural systems for wastewater treatment. Ten years of experiences at the experimental field for low-cost sanitation in Mansilla de las Mulas (León, Spain). *Limnética* 2006;25:143–54.
- Blumenthal UJ, Mara DD, Peasey A, Ruiz-Palacios G, Stott R. Approaches to establishing microbiological quality guidelines for treated wastewater use in agriculture: recommendations for the revision of the current WHO guidelines. *WHO Bull* 2000;78(9):1104–16.
- Bouhoum K, Schwartzbrod J. Quantification of helminth eggs in wastewater. *Zent bl Hyg Umweltmed* 1989;188:322–30.
- Brix H. Constructed wetlands for municipal wastewater treatment in Europe. In: Mitsch WJ, editor. *Global Wetlands: Old World and New*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 1994. p. 325–33.
- Curtis TP, Mara DD, Silva SA. The effect of sunlight on faecal coliforms in ponds. Implications for research and design. *Water Sci Technol* 1992;26(7–8):1729–38.
- Davies CM, Long JAH, Donald M, Ashbolt NJ. Survival of faecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1888–96.
- Davies-Colley RJ, Donnison AM, Speed DJ. Sunlight wavelengths inactivating faecal indicator microorganisms in waste stabilisation ponds. *Water Sci Technol* 1997;35(11–12):219–25.
- Decamp O, Warren A, Sánchez R. The role of ciliated protozoa in subsurface flow wetlands and their potential bioindicators. *Water Sci Technol* 1999;40:91–8.
- El Hamouri B, Khallayoune K, Bouzoubaa K, Rhallabi N, Chalabi M. High rate algal pond performances in faecal coliforms and helminth egg removals. *Water Res* 1994;28(1):171–4.
- Fayer R, Trout JM, Jenkins MC. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J Parasitol* 1998;84:1165–9.
- García J, Aguirre P, Mujeriego R, Huang Y, Ortiz L, Bayona JM. Initial contaminant removal performance factors in horizontal flow reed beds used for treating urban wastewater. *Water Res* 2004;38:1669–78.
- García M, Bécares E. Bacterial removal in three pilot-scale wastewater treatment systems for rural areas. *Water Sci Technol* 1997;35:197–200.
- García M, Soto F, González JM, Bécares E. A comparison of bacterial removal efficiencies in constructed wetlands and algae-based systems. *Procc. 10th Intern. Conf. Wetland Systems for Water Pollution Control*, Lisbon, Portugal; 2006. p. 355–65.
- Gerba CP, Thurston JA, Falabi JA, Watt PM, Karpiscak MM. Optimization of artificial wetland design for the removal of indicator microorganisms and pathogenic protozoa. *Water Sci Technol* 1999;40:363–8.
- Greenway M. The role of constructed wetlands in secondary effluent treatment and water reuse in subtropical and arid Australia. *Ecol Eng* 2005;25:501–9.
- Grimason AM, Wiandt S, Baleux B, Thitai WN, Bontoux J, Smith HV. Occurrence and removal of *Giardia* sp. cysts by Kenyan and French waste stabilisation pond systems. *Water Sci Technol* 1996;33(7):83–9.
- Harwood VJ, Levine AD, Scott TM, Chivukula V, Lukaski J, Farrah SR, et al. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(6):3163–70.
- Hatano K, Trettin CC, House CH, Wollum AG. Microbial populations and decomposition activity in three subsurface flow constructed wetlands. In: Moshiri GA, editor. *Constructed wetlands for water quality improvement*. Lewis Publications; 1993. p. 541–8.
- Hench KR, Bissonnette GK, Sexstone AJ, Coleman JG, Garbutt K, Skousen JG. Fate of physical, chemical, and microbial contaminants in domestic wastewater following treatment by small constructed wetlands. *Water Res* 2003;37:921–7.
- Hörman A, Rimhanen-Finne R, Maunula L, von Bonsdorff CH, Torvela N, Heikinheimo A, et al. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses and indicator organisms in surface water in south western Finland. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:87–95.
- Hsu BM, Huang C, Hsu CLL, Hsu YF, Yeh JH. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Kau-Ping river and its watershed in southern Taiwan. *Water Res* 1999;33(11):2701–7.
- Karathanasis AD, Potter CL, Coyne MS. Vegetation effects on faecal bacteria, BOD and suspended solid removal in constructed wetlands treating domestic wastewater. *Ecol Eng* 2003;20:157–69.
- Karim MR, Manshadi FD, Karpiscak MM, Gerba CP. The persistence and removal of enteric pathogens in constructed wetlands. *Water Res* 2004;38:1831–7.
- Karpiscak MM, Sanchez LR, Freitas RJ, Gerba CP. Removal of bacterial indicators and pathogens from dairy wastewater by a multi-component treatment system. *Water Sci Technol* 2001;44(11–12):183–90.
- Lemarchand K, Lebaron P. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with faecal indicators. *FEMS Microbiol Lett* 2003;218:203–9.
- Manage PM, Kawabata Z, Nakano S, Nishibe Y. Effect of heterotrophic nanoflagellates on the loss of virus-like particles in pond water. *Ecol Res* 2002;17:473–9.
- Mara DD, Mills SW, Pearson HW, Alabaster GP. Waste stabilisation ponds: A viable alternative for small community treatment systems. *JIWEM* 1992;6:72–8.
- Medema GJ, Bahar M, Schets FM. Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, faecal enterococci and *Clostridium perfringens* in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms. *Water Sci Technol* 1997;35:249–52.
- Mezrioui N, Baleux B. Effects de la température, du pH et du rayonnement solaire sur la survie de différentes bactéries d'intérêt sanitaire dans une eau usée épurée par lagunage. *Rev Sci Eau* 1992;5:573–91.
- Morsy EA, Al-Herrawy AZ, Ali MA. Assessment of *Cryptosporidium* removal from domestic wastewater via constructed wetland systems. *Water Air Soil Pollut* 2007;179:207–15.
- Oufdou K, Mezrioui N, Oudra B, Loudiki M, Barakate M, Sbiyya B. Bioactive compounds from *Pseudanabaena* species (Cyanobacteria). *Microbios* 2001;106:21–9.
- Perkins J, Hunter C. Removal of enteric bacteria in a surface flow constructed wetland in Yorkshire, England. *Water Res* 2000;34(6):1941–7.
- Puigagut J, Villaseñor J, Salas JJ, Bécares E, García J. Subsurface-flow constructed wetlands in Spain for the sanitation of small communities: a comparative study. *Ecol Eng* 2007;30:312–9.
- Quiñónez-Díaz MJ, Karpiscak MM, Ellman ED, Gerba CP. Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a constructed wetland receiving untreated domestic wastewater. *J Environ Sci Health A36* 2001;7:1311–20.
- Rivera F, Warren A, Ramirez E, Decamp O, Bonilla P, Gallegos E, et al. Removal of pathogens from wastewaters by the Root Zone Method (RZM). *Water Sci Technol* 1995;32(3):211–8.
- Savichtcheva O, Okabe S. Alternative indicators of faecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Res* 2006;40:2463–76.
- Sleytr K, Tietz A, Langergraber G, Haberl R. Investigation of bacterial removal during the filtration process in constructed wetlands. *Sci Total Environ* 2007;380:173–80.

- Soto F, García M, De Luis E, Bécares E. Role of *Scirpus lacustris* in bacterial and nutrient removal from wastewater. *Water Sci Technol* 1999;40(3):241–7.
- StatSoft, Inc. *STATISTICA 6.0*, Tulsa (OK), USA; 2001.
- Stott R, May E, Matsushita E, Warren A. Protozoan predation as a mechanism for the removal of *Cryptosporidium* oocysts from wastewater in constructed wetlands. *Water Sci Technol* 2001;44:191–8.
- Stott R, May E, Mara DD. Parasite removal by natural wastewater treatment systems: performance of waste stabilization ponds and constructed wetlands. *Water Sci Technol* 2003;48(2):97–104.
- Thurston JA, Gerba CP, Foster KE, Karpiscak MM. Fate of indicator microorganisms, *Giardia* and *Cryptosporidium* in subsurface flow constructed wetlands. *Water Res* 2001;35(6):1547–51.
- Vesey G, Slade JS, Byrne M, Shepherd K, Fricker CR. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *J Appl Bacteriol* 1993;75:82–6.
- Vymazal J. The use of sub-surface constructed wetlands for wastewater treatment in the Czech Republic: 10 years' experience. *Ecol Eng* 2002;18:633–46.
- Williams J, Bahgat M, May E, Ford M, Butler J. Mineralisation and pathogen removal in gravel bed hydroponic constructed wetlands for wastewater treatment. *Water Sci Technol* 1995;32:49–58.



Short Communication

The occurrence of intestinal parasites in swine slurry and their removal in activated sludge plants

 Roberto Reinoso^{a,*}, Eloy Becares^b
^a Environmental Research Institute, University of León, La Serna 58, León 24007, Spain

^b Department of Ecology, Faculty of Biological and Environmental Sciences, University of León, León 24071, Spain

Received 22 February 2007; received in revised form 20 November 2007; accepted 21 November 2007

Abstract

Thirteen intensive pig farms and two activated sludge treatment plants for pig slurry in north-western Spain were studied from April 2005 to June 2006 in order to evaluate the presence of enteric pathogens (*Cryptosporidium*, *Giardia* and helminths) and the efficiency with which they were removed. These parasites were present on 53%, 7% and 38% of the farms studied, respectively, with concentrations of 10^4 – 10^5 oocysts per litre (L) for *Cryptosporidium*, 10^3 cysts/L for *Giardia* and 10^2 – 10^3 eggs/L for helminths. The overall removal of parasites in the pig slurry treatment plants ranged from 86.7% to over 99.99%. The results revealed a constant reduction at each stage of the treatment system, with activated sludge processes being the most effective treatment in reducing pathogens in pig slurry, 78–81% for *Cryptosporidium* oocysts and over 99.9% for helminth eggs. A heat drying procedure for sludge removed 4.3 log units of *Cryptosporidium* oocysts, demonstrating the excellent effectiveness of this treatment for reducing pathogens in sludge intended to be applied to land.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

 Keywords: Swine slurry; Activated sludge; *Cryptosporidium*; *Giardia*; Helminths

1. Introduction

The spreading of slurry onto pasture and tillage land is a common practice used for the disposal of animal waste from intensive animal husbandry units (Hutchison et al., 2004). However, the presence of pathogenic microorganisms in this manure, i.e. bacteria, parasites, viruses or fungi, can pose a serious environmental problem in areas with a high incidence of this type of farming. Pig farms generate large volumes of waste with high concentrations of intestinal parasites, i.e. *Ascaris suum*, *Trichuris suis*, *Strongyla* spp., *Balantidium coli*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, some of which may survive in slurry for long periods (Côté et al., 2006a,b; Venglovsky et al., 2006). These wastes must be efficiently treated in order to avoid pathogens reaching

the environment where they may contaminate soil, water or food.

The aims of this study were to investigate the presence of intestinal parasites (protozoan cysts and helminths) in pig slurries from swine farms in Castilla and León autonomous region in north-western Spain, to determine the efficiency of pathogen removal in each stage of an activated sludge treatment system designed to treat pig slurry and to evaluate the disinfectant effect of their sludge drying procedures.

2. Methods*2.1. Description of the activated sludge plants*

The study was conducted from April 2005 to June 2006 at thirteen intensive pig farms (A–M) of complete production cycle ($x = 478$) and two activated sludge treatment plants for pig slurry (Plant 1 and 2) in the Castilla and León autonomous region in north-western Spain. These

* Corresponding author. Tel.: +34 987 293133; fax: +34 987 291563.
E-mail address: rreit@unileon.es (R. Reinoso).

plants process approximately 250–300 cubic meters per day (m^3/day) of pig slurry using a full conventional activated sludge treatment. The raw pig slurry from farms is stored in a homogenisation–oxygenation tank of 1500 m^3 capacity with two days of hydraulic retention time (HRT) before reaching the treatment stage. The slurry from this tank is treated in a solid–liquid separation unit consisting of three stages: (a) rotary screens with a 0.5 mm pore diameter, (b) primary clarification (154 m^3) and (c) flocculation through the addition of 40% ferric chloride as coagulant, combined with small quantities of a polyacrylamide cationic polymer of high molecular weight (Hyfloc FIC-100) as flocculant. The separated liquid is transferred to an activated sludge unit consisting of a nitrification–denitrification (A/O process) tank (3500 m^3 in volume with seven days of HRT) and passed to a secondary clarifier. The purified liquid is then subjected to evaporation in digester-dehydrators using the heat generated by gas engines which produce electricity and heat from natural gas. No liquid effluent is generated by these plants. The solid fraction collected in the different stages of the treatment is subjected to a heat drying procedure using a rotary trommel at high temperatures (from $200 \text{ }^\circ\text{C}$ at the beginning of the trommel to $60 \text{ }^\circ\text{C}$ at the end) using the excess heat from the gas engines and producing a dried sludge which will be directly used as organic fertilizer.

2.2. Sample collection

Approximately 1 L of slurry was collected monthly from the different stages in the treatment plants and from the main storage tank of each farm, placed in a sterile plastic container and transported to the laboratory for analysis. In addition, 20 g of dried sludge (after drying trommel) were collected at intervals from Plant 1. The mean solid content of this sludge, total suspended solids (TSS), was

determined according to Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998). All samples other than the dried sludge samples were kept at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ until microbiological analysis was performed, this being done less than 24 h after sampling.

2.3. Sample analysis

Cryptosporidium oocysts and *Giardia* cysts were concentrated by sucrose gradient flotation procedure (Bukhari et al., 1997). Staining for visualization of oocysts/cysts was performed using specific fluorescent monoclonal antibodies (Crypto/Giardia-REAL IFA test, Durviz, Valencia, Spain) and epifluorescence microscope at $200\times$ and $400\times$ magnifications [Olympus BX 60 F5 equipped with Nomarski differential interference contrast (DIC) optics, a blue filter (480 nm-excitation, 520 nm-emission) for the detection of fluorescein isothiocyanate (FITC)-mAb labelled oocysts and an ultraviolet (UV) filter block (350 nm-excitation, 450 nm-emission) for 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)]. The recovery efficiency of this method, when 1 mL of pig slurry previously determined to be negative for *Cryptosporidium* oocysts was seeded with 1×10^4 purified *Cryptosporidium parvum* oocysts (Iowa Strain Lot# 60710, Sterling Parasitol. Lab., Tucson, Arizona), ranged from 10% to 60% (mean $36.5 \pm 19.6\%$, $n = 6$). Testing of recovery efficiency for *Giardia* was not performed. The concentration and further identification of intestinal helminth eggs in pig slurry and dried sludge was carried out in accordance with the method developed by Schwartzbrod (2003).

2.4. Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using the statistical software programme Statistica 6.0 (StatSoft, 2001). Data were logarithmically transformed ($\log_{10} X + 1$). The

Table 1
Pathogen occurrence on thirteen intensive pig farms in north-western Spain

Farm	<i>Cryptosporidium</i>		<i>Giardia</i>		Helminths	
	Mean ^a (oocysts/L)	SD ^b	Mean ^a (cysts/L)	SD	Mean ^a (eggs/L)	SD
A	n.d. ^c	–	n.d.	–	n.d.	–
B	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–
C	9.67×10^4	3.21×10^4	n.d.	–	6.67×10^2	1.53×10^2
D	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–
E	2.33×10^5	6.03×10^4	n.d.	–	2.6×10^3	3.46×10^2
F	1.53×10^5	2.08×10^4	3.33×10^3	5.77×10^3	n.d.	–
G	1.37×10^5	1.52×10^4	n.d.	–	n.d.	–
H	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–
I	3.33×10^4	5.77×10^3	n.d.	–	1.0×10^2	1.0×10^2
J	4.33×10^4	1.53×10^4	n.d.	–	n.d.	–
K	n.d.	–	n.d.	–	8.67×10^2	2.51×10^2
L	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–
M	1.67×10^4	1.15×10^4	n.d.	–	3.33×10^2	1.52×10^2
Mean	5.48×10^4	7.64×10^4	2.56×10^2	9.24×10^2	3.51×10^2	7.34×10^2

^a $n = 3$.

^b SD: standard deviation.

^c n.d.: not detected.

removal of parasites (% or \log_{10}) was quantified from paired samples. Significant differences between the different treatments were evaluated using analysis of variance (ANOVA) and two-sided *t* tests.

3. Results

3.1. Occurrence of intestinal parasites on pig farms

Table 1 shows the occurrence of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts and helminth eggs on thirteen intensive pig farms in the Castilla and León Autonomous Region in north-western Spain. *Cryptosporidium* oocysts were detected in 53% (7/13) of farms at concentrations ranging from 1.67×10^4 to 2.33×10^5 oocysts/L. *Giardia* cysts were only detected in farm F (7%) with a mean density of 3.33×10^3 cysts/L while helminth eggs were detected in 38% (5/13) of studied farms with concentrations ranged from 100 to 2600 eggs/L. Three helminth species were identified in this study: *Ascaris suum*, *Trichuris suis* and *Strongylus* spp., being *A. suum* the most prevalent helminth in pig slurry (81.7%).

3.2. Pathogen removal by treatment systems

Table 2 shows the mean number of (oo)cysts/eggs per litre in the input flow of plants (raw slurry) and the mean efficiency at removing parasites of each step of the treatment systems. The overall removal efficiency of *Cryptosporidium* oocysts was 93.5% ($1.24 \log_{10}$) and 86.7% ($0.88 \log_{10}$) in Plant 1 and Plant 2, respectively. Furthermore, the overall removal efficiency of *Giardia* cysts and helminth eggs in both plants was higher than 99.9%. As previous study, nematode eggs were detected only in pig slurry (*A. suum*, *T. suis* and strongylid eggs). In general, the highest removal level was observed in activated sludge treatment, where a reduction of 78–81% and of more than 99.9% was reported

for *Cryptosporidium* oocysts and helminth eggs, respectively. Statistical significant differences ($p < 0.05$) were found between activated sludge treatment and the rest of treatments in the removal of *Cryptosporidium* oocysts.

3.3. Microbiological content of dried sludge

The presence of intestinal parasites in dried sludge was also analysed. *Cryptosporidium* oocysts were detected in 71% (5/7) of the dried sludge samples at concentrations ranging from 3.5×10^3 to 1.03×10^4 oocysts/kg TSS. Neither *Giardia* cysts nor helminth eggs were detected in the dried sludge. The removal of *Cryptosporidium* oocysts by the drying trommel was estimated to be $4.3 \log_{10}$ considering that loading to the trommel was about 1.26×10^{11} oocysts/d in 145 tm/d of fresh sludge treated. The mean solid content of dried sludge after the trommel was 95.6 % ($n = 7$).

4. Discussion

The results of this study revealed that intestinal parasites, i.e. *Cryptosporidium*, *Giardia* and helminths, are present on pig farms in the north-western part of Spain. Concentrations of 10^4 – 10^5 oocysts/L for *Cryptosporidium* (Table 1) were found in slurry from some intensive pig farms suggesting that infection by such parasites may be common on farms in this region. Application of slurry to the land combined with a considerable presence of oocysts may represent a potential public health risk through possible pathogen transmission to water and/or food, unless slurry treatments avoid their coming into contact with the environment. The analysis conducted at two swine slurry treatment plants reflected high levels of parasites in the inflows of both plants, confirming what was mentioned above. *Cryptosporidium* oocysts and helminth eggs were present in all the raw slurry samples, whereas *Giardia* cysts

Table 2
Pathogen occurrence in raw slurry and removal at each step of the treatment system at two plants (Plant 1 and Plant 2) in north-western Spain

Plant	(Oo)cysts/eggs	Influent (Mean \pm SD) ^a	Removal	Treatment				
				Screening	Primary clarifier	Floc/coag	Activated sludge and secondary clarifier	Complete treatment
1 ($n = 9$)	<i>Cryptosporidium</i>	5.62 ± 0.29	%	8.77	25.92	44.57	78.11	93.57
			\log_{10}	0.05	0.15	0.28	0.73	1.24
	<i>Giardia</i>	0.78 ± 1.55	%	>99.99	n.d.	n.d.	n.d.	>99.99
			\log_{10}	–	n.d.	n.d.	n.d.	–
	Helminths	1.7 ± 0.21	%	11.11	59.38	40	>99.99	>99.99
			\log_{10}	0.21	0.44	0.38	–	–
2 ($n = 2$)	<i>Cryptosporidium</i>	5.32 ± 0.01	%	10.89	20.97	–	81.22	86.75
			\log_{10}	0.05	0.1	–	0.73	0.88
	<i>Giardia</i>	n.d. ^b	%	n.d.	n.d.	–	n.d.	n.d.
			\log_{10}	n.d.	n.d.	–	n.d.	n.d.
	Helminths	1.76 ± 0.33	%	16.67	75	–	>99.99	>99.99
			\log_{10}	0.09	0.92	–	–	–

Both the percentage of removal (%) and the log units removed (\log_{10}) are indicated. The flocculation unit (Floc/Coag) was not in operation at Plant 2.

^a The occurrence was expressed as \log_{10} (oo)cysts or eggs L^{-1} .

^b n.d.: not detected.

were rarer (18.1%). The occurrence of these parasites in the input flow was considerably greater than reported elsewhere for similar treatment plants (Bukhari et al., 1997; Robertson et al., 2000). The overall removal efficiencies of the treatment plants analysed ranged from 86.7% to 99.9% (Table 2). These reductions are in agreement with removal rates reported for other activated sludge treatments (Ottoson et al., 2006; Robertson et al., 2006), although the final effluent contained a considerable quantity of parasites (10^4 oocysts/L) as an outcome of the heavy pathogenic loads present in the input flows. If the fact that parasites can survive in slurry for several days, as has been described in previous studies (Côté et al., 2006b; Venglovsky et al., 2006), is taken into account, on the assumption that only 0.01% of these parasites were viable there would be a potential daily discharge of one million of viable *Cryptosporidium* oocysts, which represents a serious health risk to humans and animals.

In the recent years, highly variable levels of removal of intestinal parasites have been reported in primary and secondary treatments (Jiménez et al., 2001). However, little is known about such treatments for agricultural wastes. Most authors contend that secondary treatments, especially activated sludge processes, are more effective in removal of protozoan cysts than primary treatments. In Scotland, Robertson et al. (2000) achieved removal levels in activated sludge treatments ranging from 53% to 98% for *Cryptosporidium* oocysts and from 66% to 94% for *Giardia* cysts. In primary treatments they noted much lower levels of removal (4–22% for *Cryptosporidium* oocysts and 24–42% for *Giardia* cysts). Similarly, Chauret et al. (1999) in Canada, achieved removal efficiencies for *Giardia* spp. of 94% and 23% in activated sludge processes and primary treatments, respectively. The results being reported here confirm that removal of protozoan cysts was greater in the activated sludge process than with primary treatment (screen and clarifier). These primary treatments are more adequate for larger organisms, such as helminths, which settle easily in these tanks. In fact, the removal rate for helminths in primary clarifiers (59–75%) was greater than that for *Cryptosporidium* oocysts (20–26%). Screening was the least effective process for removing parasites, achieving a rate of only 8–16%. This was probably due to the desegregation of pathogens adhering to suspended solids and further increases in free parasites, as also observed other authors (Bukhari et al., 1997; Cacciò et al., 2003). According to Jiménez and Chavez (1998), primary treatments with physical and chemical process may become an excellent alternative to conventional physico-chemical treatments. In our study, the combination of ferric chloride with a polyacrylamide (PAM) cationic polymer improved the efficiency of parasite removal by 40–44% at Plant 1 (see Table 2). Sojka and Entry (2000) also reported large reductions in the numbers of microorganisms (total and faecal coliforms, faecal streptococci) after applying PAM. When PAM is combined with FeCl_3 and added to slurry, FeCl_3 quickly disassociates, freeing Fe^{+3} to bind with parasitic microorganisms.

The anionic charges on PAM flocculate suspended particles and parasites adhering to them enhance the separation of solids from liquid swine manure (Entry and Sojka, 2000; Entry et al., 2003).

The final part of this investigation was focused on characterization of the dried sludge produced by the treatment plants, since this sludge is frequently used as an organic fertilizer. The heat-drying procedure used in this study demonstrated reductions >4 log units for *Cryptosporidium* oocysts, confirming the effect of temperature on the destruction of parasites (Jenkins et al., 1999; Venglovsky et al., 2006). This reduction was greater than reported for other technologies such as anaerobic and aerobic digestion, lime stabilization or composting (Vanotti et al., 2005; Côté et al., 2006b). Moreover, it should be noted as very likely that all the parasites found were inactivated by the high temperatures reached through the use of surplus heat from the gas engines.

5. Conclusions

These results show the strong prevalence of intestinal parasites in swine slurry from intensive pig farms in north-western Spain. Reductions in the numbers of these parasites by activated sludge treatment plants which treat swine slurry using the heat and part of the electricity produced by co-generation technology were also demonstrated. The heat-drying treatment used for sludge in these plants yielded considerable reductions in enteric pathogens, guaranteeing the microbiological quality of sludge intended for agricultural purposes. However, additional viability studies will be required to verify this aspect further.

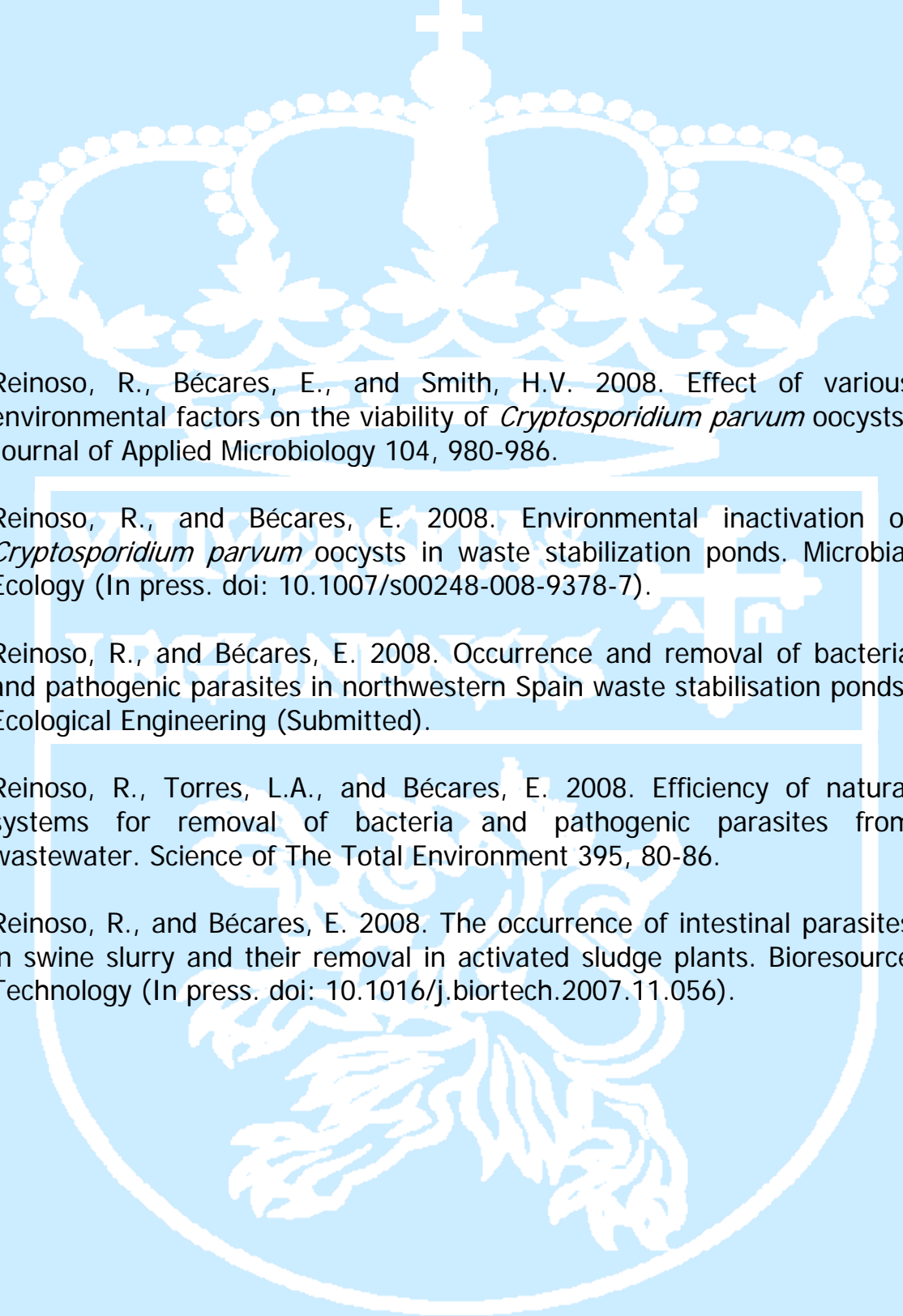
Acknowledgements

This study was financially supported by the Castilla and León Institute for Agricultural Technology (ITACyL) under contract LE-02-2005 entitled “Health Risks in Using Waste Water in Agriculture” and by the GRUPO GUASCOR, they provided us with the slurries and samples from their plants. R. Reinoso was funded by the University of León. The authors are grateful to Linda Torres for her technical assistance.

References

- APHA, AWWA, EFA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Twentieth ed. Washington, DC, USA.
- Bukhari, Z., Smith, H.V., Sykes, N., Humphreys, S.W., Paton, C.A., Girdwood, R.W.A., Fricker, C.R., 1997. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England. *Water Sci. Technol.* 35, 385–390.
- Cacciò, S.M., De Giacomo, M., Aulicino, F.A., Pozio, E., 2003. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (6), 3393–3398.
- Chauret, C., Springthorpe, S., Sattar, S., 1999. Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and microbial indicators during wastewater

- treatment and anaerobic sludge digestion. *Can. J. Microbiol.* 45, 257–262.
- Côté, C., Massé, D.I., Quessy, S., 2006b. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. *Bioresource Technol.* 97, 686–691.
- Côté, C., Villeneuve, A., Lessard, L., Quessy, S., 2006a. Fate of pathogenic and nonpathogenic microorganisms during storage of liquid hog manure in Québec. *Livest. Sci.* 102, 204–210.
- Entry, J.A., Sojka, R.E., 2000. The efficacy of polyacrilamide related compounds to remove microorganisms and nutrients from animal wastewater. *J. Environ. Qual.* 29, 1905–1914.
- Entry, J.A., Phillips, I., Stratton, H., Sojka, R.E., 2003. Polyacrilamide + $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ and polyacrilamide + CaO remove coliform bacteria and nutrients from swine wastewater. *Environ. Pollut.* 121, 453–462.
- Hutchison, M.L., Walters, L.D., Avery, S.M., Synge, B.A., Moore, A., 2004. Levels of zoonotic agents in British livestock manures. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 207–214.
- Jenkins, M.B., Walker, M.J., Bowman, D.D., Anthony, L.C., Ghiorse, W.C., 1999. Use of a sentinel system for field measurements of *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in soil and animal waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1998–2005.
- Jiménez, B., Chavez, A., 1998. Removal of helminth eggs in an advanced primary treatment with sludge blanket. *Environ. Technol.* 19, 1061–1071.
- Jiménez, B., Maya-Rendón, C., Salgado-Velázquez, G., 2001. The elimination of helminth ova, faecal coliforms, Salmonella and protozoan cysts by various physicochemical processes in wastewater and sludge. *Water Sci. Technol.* 43 (12), 179–182.
- Ottoson, J., Hansen, A., Björleinius, B., Norder, H., Stenström, T.A., 2006. Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. *Water Res.* 40, 1449–1457.
- Robertson, L.J., Paton, C.A., Campbell, A.T., Smith, P.G., Jackson, M.H., Gilmour, R.A., Black, S.E., Stevenson, D.A., Smith, H.V., 2000. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. *Water Res.* 34, 2310–2322.
- Robertson, L.J., Hermansen, L., Gjerde, B.K., 2006. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (8), 5297–5303.
- Schwartzbrod, J., 2003. Quantification and Viability Determination for Helminth Eggs in Sludge (Modified EPA Method 1999). University of Nancy.
- Sojka, R.E., Entry, J.A., 2000. Influence of polyacrilamide application to soil on movement of microorganisms in runoff water. *Environ. Pollut.* 108, 405–412.
- StatSoft, Inc., 2001. STATISTICA 6.0, Tulsa, OK, USA.
- Vanotti, M.B., Millner, P.D., Hunt, P.G., Ellison, A.Q., 2005. Removal of pathogen and indicator microorganisms from liquid swine manure in multi-step biological and chemical treatment. *Bioresource Technol.* 96, 209–214.
- Venglovsky, J., Martinez, J., Placha, I., 2006. Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. *Livest. Sci.* 102, 197–203.



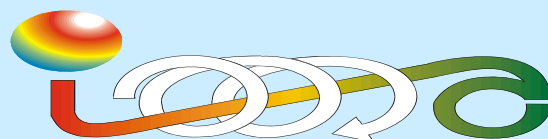
Reinoso, R., Bécares, E., and Smith, H.V. 2008. Effect of various environmental factors on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Applied Microbiology* 104, 980-986.

Reinoso, R., and Bécares, E. 2008. Environmental inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in waste stabilization ponds. *Microbial Ecology* (In press. doi: 10.1007/s00248-008-9378-7).

Reinoso, R., and Bécares, E. 2008. Occurrence and removal of bacteria and pathogenic parasites in northwestern Spain waste stabilisation ponds. *Ecological Engineering* (Submitted).

Reinoso, R., Torres, L.A., and Bécares, E. 2008. Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater. *Science of The Total Environment* 395, 80-86.

Reinoso, R., and Bécares, E. 2008. The occurrence of intestinal parasites in swine slurry and their removal in activated sludge plants. *Bioresource Technology* (In press. doi: 10.1016/j.biortech.2007.11.056).



INSTITUTO DE MEDIO AMBIENTE