

## Uso de lodos de depuradora en agricultura: patógenos y resistencias a antibióticos

### *The agricultural use of water treatment plant sludge: pathogens and antibiotic resistance*

### *Uso de lamas de estações de tratamento na agricultura: patogénicos e resistência a antibióticos*

**Ignacio Nadal Rocamora, Clarissa Gondim Porto, Leticia Platero Alonso, Federico Navarro-García**

Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

**Cita:** Nadal Rocamora I, Gondim Porto C, Platero Alonso L, Navarro-García F. Uso de lodos de depuradora en agricultura: patógenos y resistencias a antibióticos. *Rev. salud ambient.* 2015; 15(2):113-120.

**Recibido:** 31 de octubre de 2015. **Aceptado:** 2 de diciembre de 2015. **Publicado:** 15 de diciembre de 2015.

**Autor para correspondencia:** Federico Navarro-García.

Correo e: [fnavarro@farm.ucm.es](mailto:fnavarro@farm.ucm.es)

Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Plaza de Ramón y Cajal, s/n. E-28080 Madrid.

**Financiación:** El proyecto contó con financiación del Ministerio de Ciencia y Tecnología, referencia CGL2006-13915 y del Ministerio de Medio Ambiente, referencia 022/PC08/3-04.2. El trabajo de Clarissa Gondim Porto fue financiado mediante una beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo (AECID-Ministerio de Asuntos Exteriores).

**Declaración de conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que hayan influido en la realización y la preparación de este trabajo.

**Declaraciones de autoría:** Todos los autores contribuyeron al diseño del estudio y la redacción del artículo. Asimismo, todos los autores aprobaron la versión final.

## Resumen

La aplicación de lodos de depuradora es una práctica habitual en agricultura como método de recuperación de suelos degradados que podría no estar exenta de peligrosidad cuando se evalúa desde los puntos de vista ambiental y sanitario. Habitualmente se ha detectado en el suelo tratado con estos residuos un incremento transitorio de las poblaciones microbianas bien patógenas, bien indicadoras, cuya persistencia en el tiempo es variable y atribuida a las características del suelo (tipo de materiales en el suelo), de las enmiendas (origen y tratamiento que han sufrido) o el clima (principalmente humedad y temperatura). Los lodos de depuradora, por su origen, podrían producir la transferencia al ser humano a través de la cadena trófica de 1) microorganismos patógenos y 2) microorganismos resistentes a antibióticos y producir la diseminación de resistencias a antibióticos, por el incremento y mantenimiento de estos en el suelo por periodos variables de tiempo. Sin embargo, la legislación española que regula la aplicación de lodos en el sector agrario ha optado por un criterio microbiológico muy limitado. Por ello, estimamos que se deberían establecer mejores parámetros que informen apropiadamente del estado sanitario de los suelos tratados con lodos de depuradora que incluyeran, además, aspectos que actualmente no se evalúan como la resistencia a antibióticos.

**Palabras clave:** lodo de depuradora; contaminación fecal; microorganismo patógeno; indicador microbiano; resistencia a antibióticos; legislación; España; Unión Europea.

## Abstract

The use of water treatment plant sludge to restore degraded soils is customary agricultural practice, but it could be dangerous from the point of view of both health and the environment. A transient increase of either pathogenic or indicator microbial populations, whose persistence in time is variable and attributed to the characteristics of the soil (types of materials in the soil), any amendments (origin and treatments it has undergone) or the weather (humidity and temperature mainly), has often been detected in soils treated with this kind of waste. Given their origin, water treatment plant sludges could lead to the transmission of a) pathogens and b) antibiotic-resistant microorganisms to human beings through the food chain and cause the spreading of antibiotic resistances as a result of their increase and persistence in the soil for variable periods of time. However, Spanish legislation regulating the use of sludges in the farming industry is based on a very restricted microbiological criterion. Thus, we

believe better parameters should be established to appropriately inform of the state of health of soils treated with water treatment plant sludge, including aspects which are not presently assessed such as antibiotic resistance.

**Keywords:** Water treatment plant sludge; faecal contamination, pathogenic microorganism; microbial indicator; antibiotic resistance; legislation; Spain; European Union.

### Resumo

A aplicação de lamas de estações de tratamento de águas residuais é uma prática habitual na agricultura como método de recuperação de solos degradados que pode não estar isenta de perigos quando avaliada dos pontos de vista ambiental e sanitário. Habitualmente tem-se detetado no solo tratado com este tipo de resíduos um incremento transitório das populações microbianas quer patogénicas, quer indicadoras, cuja persistência no tempo é variável e atribuída às características do solo (tipo de materiais no solo), das correções (origem e tratamento aplicado) ou o clima (principalmente a humidade e a temperatura). As lamas das estações de tratamento, pela sua origem, poderiam proporcionar a transferência para o ser humano através da cadeia alimentar de 1) microrganismo patogénicos e 2) microrganismos resistentes a antibióticos e produzir a disseminação de resistências a antibióticos, pelo aumento e manutenção destes no solo por períodos de tempo variáveis. Contudo, a legislação espanhola que regula a aplicação de lamas no setor agrícola optou por um critério microbiológico muito limitado. Por essa razão, consideramos que se deveriam estabelecer melhores parâmetros que informem devidamente sobre o estado sanitário dos solos tratados com lamas e que incluam também aspetos que atualmente não se avaliam como a resistência a antibióticos.

**Palavras-chave:** lamas de estações de tratamento; contaminação fecal; microrganismo patogénico; indicador microbiano; resistência a antibióticos; legislação; Espanha; União Europeia.

## LOS LODOS DE DEPURADORA Y SU USO EN AGRICULTURA

Los lodos de depuradora urbana son los residuos obtenidos por concentración de la fase sólida procedente de la depuración de las aguas residuales urbanas. Estas aguas se pueden categorizar en dos tipos: aguas negras (procedentes de las excretas humanas, orina y heces) y aguas grises (cuyo origen es la limpieza de calles y edificios, así como las aguas domiciliarias empleadas para higiene personal y doméstica), que en España se suelen tratar conjuntamente puesto que la separación en las ciudades de ambos tipos de agua es complicada<sup>1</sup>. Este lodo, por tanto, tiene su origen en excretas humanas principalmente, en las que se encuentra un porcentaje elevado de microorganismos próximo al 55 % del peso seco total de la fracción sólida de estas<sup>2</sup>, algunos de los cuales son potencialmente patógenos. Por lo tanto, desde un punto de vista microbiológico, los lodos de depuradora urbana pueden suponer un riesgo sanitario y, por esta razón, estos residuos precisan de un tratamiento apropiado, especialmente si se va a realizar un uso posterior de los mismos distinto al almacenamiento o destrucción. Dentro de las distintas fases del tratamiento a que se someten los residuos de la depuración de las aguas residuales, es en los procesos de estabilización y compostaje de los lodos de depuradora cuando se reduce en gran número la cantidad de microorganismos incluyendo bacterias patógenas (por ejemplo, *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter*), parásitos, protozoos y virus.

Sin embargo, se ha descrito que aun así se pueden transmitir a los suelos manteniéndose viables en ellos durante periodos de tiempo prolongados<sup>3</sup>, por lo que no se puede asegurar completamente que tras los procesos de estabilización y compostaje los lodos estén exentos de posibles patógenos<sup>4,5</sup>. Dentro de los posibles usos, el empleo de los lodos de depuradora como enmienda agrícola es un procedimiento habitual, aunque polémico por la posible contaminación química y microbiológica de suelos y aguas y la diseminación de patógenos en el medio ambiente<sup>6</sup>. No obstante, actualmente en España aproximadamente el 80 % de los lodos de depuradora urbana son utilizados como enmiendas en los suelos<sup>7</sup> y en los Estados Unidos de América, cerca del 60 %<sup>8</sup>.

### LEGISLACIÓN EXISTENTE SOBRE EL USO DE LODOS DE DEPURADORA EN AGRICULTURA DESDE EL PUNTO DE VISTA MICROBIOLÓGICO

El uso de lodos de depuradora con fines agrícolas está regulado en España desde 1990. Su aplicación en cultivos hortofrutícolas está prohibida durante su ciclo vegetativo o menos de 10 meses antes de la recolección y durante la recolección misma cuando sus órganos o partes vegetativas a comercializar y consumir en fresco están normalmente en contacto directo con el suelo<sup>9</sup>. Esta prohibición se basa principalmente en la posibilidad de adquisición de sustancias contaminantes a través de la cadena alimentaria, en concreto los metales pesados. Sin embargo, la presencia de microorganismos patógenos

habitualmente es analizada en vegetales cuando el agua de riego utilizada es de origen reciclado<sup>10</sup>.

En España, a pesar de que sí existe legislación sobre los valores máximos permisibles de microorganismos patógenos o indicadores en productos fertilizantes, agrupada en el Real Decreto 824/2005 sobre productos fertilizantes<sup>11</sup>, esta excluye específicamente a los lodos de depuradora y no existe una legislación que indique valores máximos admitidos de microorganismos patógenos en ellos, a diferencia de otros países como los Estados Unidos de América, en el que la Agencia Nacional de Protección al Medio Ambiente (USEPA), indica que el nivel máximo permitido de coliformes fecales presentes en los lodos digeridos anaeróbicamente puede llegar hasta un máximo de  $6 \times 10^6$  unidades formadoras de colonia (UFC) por cada 100 mL<sup>3</sup>. En países comunitarios como Francia también existe una norma de aplicación a los productos de uso fertilizante (NFU 44-095:2006) que exige la investigación de dos tipos de microorganismos en los lodos y establece niveles distintos en función de si se cultivan hortalizas u otro tipo de vegetales. Por un lado, determina microorganismos indicadores entre los que incluye a *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y a los enterococos y, por otro lado, investiga la presencia de los microorganismos patógenos *Listeria monocytogenes* y *Salmonellas* pp. Los niveles máximos permitidos en los lodos de aplicación en cultivos hortofrutícolas son diez veces inferiores a los exigidos para el resto de cultivos<sup>12</sup>. Solo muy recientemente, en España es obligatorio declarar los niveles de *Salmonella* en 25 g de producto elaborado junto con el número más probable de *Escherichia coli* por gramo de producto elaborado para poder ser usado como fertilizante, aunque no se indican valores máximos permisibles<sup>13</sup>. Aunque en la Unión Europea no existe una normativa común, también se ha propuesto a *Salmonella* y *Escherichia coli* como microorganismos marcadores para comprobar la reducción de posibles microorganismos patógenos de tal manera que el lodo producido no debe contener *Salmonella* en 50 g (materia fresca) y el tratamiento debe producir una reducción de la población de *Escherichia coli* de 6 log 10 o ser menor de  $5 \times 10^2$  UFC/g de producto final<sup>14</sup>.

### ¿LA APLICACIÓN DE LODOS DE DEPURADORA TRANSFIERE MICROORGANISMOS PATÓGENOS A LOS SUELOS?

Los estudios realizados para determinar este aspecto se han centrado en el seguimiento de marcadores bacterianos frecuentemente usados en el análisis de agua o alimentos como son los coliformes y los enterococos. Así pues, la pregunta es si esos microorganismos pueden sobrevivir en el

suelo y durante cuánto tiempo. En nuestra propia experiencia, tras la adición de lodos de depuradora, esos microorganismos parecen persistir en el suelo durante periodos prolongados de tiempo. Así, el periodo de permanencia de los coliformes fecales en un suelo agrícola puede ser superior a un año desde la adición de los lodos, dependiendo de la cantidad utilizada<sup>15</sup>, llegando a extender su presencia hasta 2 años después de la adición de lodos de depuradora en las parcelas en las que se utilizaron dosis medias y altas ( $80$  y  $160 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ )<sup>15</sup>. Sin embargo, en otro ensayo con lodos de distinta procedencia, los coliformes desaparecieron un año después de la adición, lo que indica que las características particulares de las enmiendas son de suma importancia para la presencia y mantenimiento en los suelos de estos microorganismos, pudiendo estimular, incluso, el crecimiento de los propios coliformes presentes en el suelo<sup>16</sup>. Otros autores, usando diversos modelos, tanto en el laboratorio como ensayos de campo, han detectado periodos de residencia más cortos, próximos a los 100 días<sup>17-20</sup>. La persistencia se puede deber a otros factores como la humedad, el pH en los suelos, la climatología, o la cantidad de materia orgánica<sup>21</sup> que permitirían el recrecimiento en el suelo tratado con lodo<sup>18,22</sup>, tal y como se ha comprobado en suelos semiáridos, donde la supervivencia de los coliformes se duplica en terrenos irrigados respecto de la de suelos sin irrigación<sup>17</sup>. Factores habitualmente relacionados con la disminución de los microorganismos en el medio ambiente, como es la luz solar, se ha comprobado, en cambio, que pueden no ser eficaces en la disminución de las poblaciones de coliformes o enterococos en heces en el suelo en periodos cortos de tiempo<sup>23</sup>.

Respecto a los enterococos, microorganismos presentes en el intestino de los mamíferos y muy resistentes a los procedimientos de higienización aplicados a los lodos<sup>4</sup>, la aplicación puede producir un aporte inicial muy importante. En uno de nuestros ensayos, se produjo un incremento de la presencia de microorganismos de entre 3 y 4 órdenes de magnitud (utilizando dosis elevadas, de  $160 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), que se mantiene en parcelas enmendadas con lodos aerobios durante un año, disminuyendo posteriormente. En el caso de suelos tratados con lodos anaerobios esa persistencia llega incluso hasta los 2 años después de la aplicación, pero a niveles menores que los hallados en los suelos tratados con aerobios durante el primer año<sup>15</sup>.

Otro marcador bacteriano analizado habitualmente en el agua de consumo humano es el de clostridios sulfito reductores. Este hecho podría parecer justificado precisamente en el caso de los lodos de depuradora puesto que la presencia de gran cantidad

de microorganismos anaerobios, como son las distintas especies del género *Clostridium*, es habitual tras los procesos de generación de los lodos y ha sido detectado en análisis moleculares de los mismos<sup>15,24</sup>. Lo que quizá no sea tan frecuente es que la proporción de esporas de clostridios sulfito reductores sea de 10 a 100 veces superior en las parcelas tratadas con lodos durante al menos 2 años<sup>15,24</sup> aunque otros autores los han detectado durante periodos más breves<sup>19</sup>, por lo que quizá podría contemplarse el uso de este marcador como un indicador de la influencia de los lodos en el suelo a largo plazo, a pesar de que otros autores no han detectado esos incrementos<sup>12</sup>. Por otro lado, los clostridios pueden ser también un buen marcador de la peligrosidad en el manejo de los lodos puesto que sus esporas pueden transferirse con facilidad en aerosoles<sup>25</sup>, aunque estudios previos no han demostrado su presencia en los aerosoles producidos durante la manipulación de los lodos de depuradora<sup>26</sup>.

Si la presencia de estos microorganismos en el suelo es superior en número y duración, ¿podría incrementarse el riesgo de transferencia al ser humano a través de la cadena trófica o por la manipulación del suelo de manera profesional?

#### **a. ¿SE PUEDEN TRANSMITIR ESTOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS A LA CADENA TRÓFICA DESDE EL SUELO ENMENDADO?**

La transferencia de patógenos a la cadena trófica por el consumo de vegetales regados con aguas residuales o contaminadas con heces es un proceso clásico en la transmisión de enfermedades gastrointestinales<sup>10</sup>. En el caso de los lodos de depuradora urbana, la utilización de un producto que pudiera portar posibles agentes patógenos en una proporción más o menos elevada, podría ser también el origen de diversas enfermedades si se transmiten a través de la cadena trófica. Algunos estudios han demostrado la transferencia a vegetales de patógenos presentes en lodos. Por ejemplo, el uso de un lodo de depuradora artificial dopado con *Listeria innocua* y *Clostridium sporogenes* en un suelo agrícola en el que se sembró perejil permitió comprobar que estas bacterias sobrevivieron durante un periodo prolongado y se transfirieron a las hojas de la planta, principalmente por el salpicado que produce la lluvia o el riego, siendo suficiente una cantidad muy baja (1 UFC de *Listeria innocua* por gramo de suelo) para que se produjera la transmisión y su persistencia en las hojas del perejil<sup>27</sup>. Experimentos similares con lechugas y la cepa patógena O157:H7 de *Escherichia coli* confirman este método de transmisión<sup>28</sup>. Otros autores, en cambio, no detectan la transferencia de *Listeria* o *Escherichia coli* a los vegetales crecidos en los suelos enmendados con lodos, pero sí

la presencia de cantidades importantes de enterococos, aunque se argumenta que es debido a que algunas especies de este grupo son habitantes naturales de las plantas y con los métodos analíticos utilizados no es posible diferenciarlos de los de origen fecal<sup>12</sup>. A pesar de la discrepancia de resultados, estos datos refuerzan la importancia del control que debería llevarse a cabo sobre los lodos de depuradora previamente a su uso, por el principio de precaución, para evitar la posible introducción de posibles microorganismos patógenos en el suelo por el uso de estos productos que pudieran terminar en nuestras mesas a través de los alimentos.

#### **b. RIESGO DE ADQUISICIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS POR MANIPULACIÓN DE ENMIENDAS O SUELO POR PARTE DE PROFESIONALES**

La aplicación de los lodos o el laboreo posterior (arado, siembra, recogida de las cosechas) de los suelos enmendados podría producir una posible contaminación directa del personal implicado en estos procesos mediante contacto directo a través de la piel o la adquisición por vía oral de alguno de los patógenos presentes en estos lodos. Aunque las medidas de protección habituales contribuyen a minimizar el riesgo que supone la manipulación de este material, los aerosoles que se forman durante el proceso de fabricación, apilado, carga o aplicación del lodo presentan valores especialmente elevados de bacterias mesófilas y esporas de *Aspergillus fumigatus*<sup>29</sup>, especialmente en suelos áridos. En este caso, no solamente el trabajador que utiliza el material puede sufrir una exposición no deseada al producto proveniente de esos aerosoles que se forman en el proceso, sino que estos pueden diseminarse hacia puntos más lejanos. Se ha podido comprobar que el suelo aerosolizado puede portar hasta 10<sup>8</sup> UFC por gramo de suelo aunque la mayor parte son microorganismos nativos del suelo<sup>30</sup>. De hecho, Brooks y colaboradores sugieren que el riesgo de adquisición ambiental de bacterias y parásitos presentes en las enmiendas ha de evaluarse considerando el espacio y el tiempo, ya que, por una parte, este riesgo es elevado para las bacterias dentro de los primeros 30 días desde la aplicación, aunque en el caso de los virus este riesgo es todavía elevado después de ese periodo<sup>31</sup>. Por otra parte, la proximidad al punto de vertido u operación incrementa el riesgo de adquisición de agentes patógenos como algunos enterovirus (Coxsackie A21) o bacterias como *Salmonella*. A distancias superiores a los 31 metros desde el punto en que se trabaja con el lodo, el riesgo disminuye de manera importante por lo que se estima que ese debe ser el perímetro de seguridad mínimo para trabajos realizados en las proximidades de zonas residenciales<sup>26</sup>.

## ¿EXISTEN OTROS RIESGOS DERIVADOS DEL USO DE LOS LODOS DE DEPURADORA COMO ENMIENDAS QUE NO SON EVALUADOS ACTUALMENTE? LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

La presencia de patógenos en el suelo podría indicar, a su vez, la existencia de microorganismos resistentes a antibióticos<sup>32</sup>. Existen grupos bacterianos que se asocian con determinados tipos de resistencias a antibióticos, como los enterococos y la resistencia a vancomicina, o las enterobacterias y la resistencia a betalactámicos mediada por betalactamasas<sup>10</sup>. La resistencia a antimicrobianos es el proceso por el cual aumenta la cantidad de antimicrobiano que hay que utilizar para eliminar a un microorganismo que previamente era sensible a una cantidad menor de esa sustancia. La resistencia a antimicrobianos puede surgir bien porque los microorganismos no son sensibles a ellos de manera natural, bien porque los microorganismos presentan mecanismos que se activan o inducen ante la presencia de esas sustancias, o bien porque suceden cambios en sus genomas. Estos cambios pueden ocurrir al azar (mutaciones), o mediante procesos clásicos naturales de transferencia horizontal de genes de resistencia (transformación, transducción o conjugación), llamados así porque contribuyen a incrementar la resistencia a antibióticos. Algunos de estos genes, incluso, permiten resistir a tipos distintos de antibióticos, fenómeno que se conoce como multiresistencia<sup>33</sup>. Es muy preocupante la aparición de resistencias a antimicrobianos, puesto que perdemos las herramientas terapéuticas que nos permiten eliminar a los microorganismos patógenos. Actualmente, a nivel mundial, existe un incremento importante del número de patologías causadas por bacterias patógenas que son resistentes o multiresistentes a antibióticos clínicamente importantes utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas<sup>34,35</sup>. Existen varios motivos para este fenómeno, entre los que se encuentran el mal uso de estos fármacos en cuanto a sus pautas de administración o la utilización indiscriminada en alimentación animal de antibióticos, procesos que permiten la selección de bacterias que portan genes de resistencia y que son eliminadas con las excretas<sup>36</sup>. En nuestra experiencia, en los suelos de labor tratados con elevadas cantidades de lodos de depuradora de diversa procedencia se incrementó de manera muy importante el número de bacterias resistentes a ampicilina durante un periodo de 2 años<sup>15,37</sup>, aspecto que también ha sido puesto de manifiesto por algunos autores<sup>38,39</sup>. Otros autores, en cambio, no han detectado cambios importantes en el número de bacterias resistentes arguyendo que la resistencia a antibióticos es un proceso natural presente en el suelo<sup>32,40</sup>. El incremento

de las poblaciones de enterococos y coliformes en los suelos derivado de la aplicación de lodos de depuradora podría justificar también el incremento en el número de microorganismos resistentes a antibióticos, puesto que se trata de bacterias capaces de adquirir mecanismos de resistencia mediante transferencia horizontal<sup>41</sup>.

El incremento de la cantidad de microorganismos resistentes a antibióticos en los suelos tratados con lodos de depuradora podría ser debido al menos a cuatro factores: 1) la introducción en el suelo de bacterias resistentes procedentes de los lodos; 2) la introducción de bajas concentraciones de antibióticos que favorecen (seleccionan) el desarrollo de microorganismos resistentes a éstos y que les permite proliferar más que el resto, que son inhibidas; 3) la transferencia de genes de resistencia de las poblaciones del lodo a los microorganismos nativos del suelo, dotándoles de nuevas características, más eficaces para proliferar sobre sus competidores; y 4) la introducción de compuestos, como detergentes, surfactantes y metales pesados, que favorecen la transferencia de genes de resistencia. Lógicamente, ninguna de estas explicaciones es mutuamente excluyente. La relación entre el uso de enmiendas basadas en residuos fecales y la transmisión de resistencias a las poblaciones de microorganismos del suelo parece estar bastante bien establecida en el caso del uso de purines<sup>42,43</sup> y, de hecho, cuando estos proceden de granjas de cerdos tratados con antibióticos betalactámicos, se ha podido demostrar que la presencia de bajas concentraciones de ampicilina en los purines favorece el proceso de transferencia de resistencias a *Escherichia coli* en el suelo<sup>44,45</sup>. Por el contrario, la aplicación en un suelo de un lodo de depuradora dopado con pequeñas cantidades de ciprofloxacino no promovió el incremento del número de bacterias resistentes a este antibiótico<sup>46</sup>, por lo que la respuesta no debe ser igual al mismo antibiótico en distintos suelos ni en el mismo suelo a distintos antibióticos. La contaminación por metales pesados en los suelos puede también seleccionar indirectamente bacterias resistentes a antibióticos, como se ha podido comprobar en el caso de sedimentos fluviales contaminados con mercurio<sup>47</sup>.

Aunque la transferencia de microorganismos resistentes a antibióticos directamente de los animales al ser humano se conoce<sup>48</sup>, no hay prácticamente estudios que describan la transferencia de resistencias a antimicrobianos a vegetales o a animales criados en parcelas tratadas con lodos de depuradora con un paso intermedio a través del suelo. Un ejemplo de esta posibilidad se encuentra en los resultados del análisis de las heces de un ave silvestre común en España

(chova piquirroja, *Pyrhocorax pyrrhocorax*). En ellas, existían microorganismos resistentes a antibióticos que presentaban perfiles de resistencias distintos según la zona de muestreo. Así, las aves próximas a zonas residenciales (Madrid) presentaban en sus heces bacterias que portaban marcadores de resistencia a antibióticos de origen clínico, mientras que aquellas que procedían de zonas rurales (Segovia) presentaban una microbiota fecal con marcadores de resistencia de origen veterinario. Los autores sugieren que la alimentación a partir de cultivos y campos tratados con lodos urbanos o procedentes de animales contribuye a la adquisición de estos perfiles distintos de resistencias<sup>49</sup>.

La presencia de genes de resistencia a antibióticos en suelos agrícolas tratados con lodos de depuradora puede ser abundante<sup>50</sup>, aunque quizá la capacidad de transferencia de esas resistencias sea muy limitada<sup>51</sup>. En el caso de los vegetales crecidos en ese tipo de suelos solamente aparecen resistencias a antibióticos en los vegetales cuando no se respeta el periodo de tiempo indicado por la normativa desde que se aplica el lodo hasta que se produce la recolección<sup>52</sup>.

Por último, no hay que desdeñar tampoco la posible contaminación con bacterias resistentes a antibióticos de las aguas superficiales destinadas al recreo o al suministro de la población simplemente por erosión hídrica de suelos tratados con lodos de depuradora<sup>53</sup>.

Todos estos datos sugieren que es preciso conocer mejor los procesos que suceden en el suelo tras la adición de los lodos de depuradora, así como controlar mejor el contenido de dichos lodos mediante un tratamiento apropiado con el fin de evitar la transmisión de microorganismos patógenos y/o de resistencias a antibióticos a la población humana<sup>54</sup>.

### ¿SON, PUES, REALMENTE SEGUROS LOS LODOS DE DEPURADORA PARA SU APLICACIÓN EN AGRICULTURA?

Ante la disparidad de los resultados descritos en la bibliografía, que probablemente sean debidos a la heterogeneidad de suelos, climas y lodos, sería necesario reevaluar los marcadores que se han de usar para determinar la influencia en el suelo y el medio ambiente de estas enmiendas. La preocupación oficial principal hasta ahora ha consistido en la determinación de los niveles de metales pesados que permanecen en los suelos como resultado de la aplicación de los lodos. Sin embargo, a la luz de los datos existentes, a nuestro juicio, siguen sin establecerse parámetros microbianos ni sus límites máximos que sirvan para determinar si un lodo es

aceptable para su uso como enmienda y, posteriormente, para evaluar el efecto que produce su aplicación en los lodos en el suelo. Quizá también, estos marcadores debieran evaluar parámetros que actualmente no se determinan, como es el caso del incremento de la resistencia a antibióticos, hecho que tiene una gran repercusión clínica en nuestros días.

### AGRADECIMIENTOS

El trabajo en nuestro laboratorio ha sido posible merced a la financiación del proyecto de investigación CGL2006-13915 concedido por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de España y del proyecto 022/PC08/3-04.2 concedido por el Ministerio de Medio Ambiente de España. El trabajo de Clarissa Gondim Porto fue financiado mediante una beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo (AECID-Ministerio de Asuntos Exteriores).

### BIBLIOGRAFÍA

1. Hispagua. Manual de depuración de aguas residuales urbanas. Zaragoza: Hispagua, Sistema Español de Información sobre el Agua. 2008.
2. Stephen AM, Cummings JH. The microbial contribution to human faecal mass. *J. Med. Microbiol.* 1980;13(1):45-56.
3. United States Environmental Protection Agency. Land application of sewage sludge and domestic septage: process design manual. Cincinnati, OH: Center for Environmental Research Information, USEPA. 1995.
4. Bonjoch X, Blanch A. Resistance of faecal coliforms and enterococci populations in sludge and biosolids to different hygienisation treatments. *Microbial Ecol.* 2009;57(3):478-83.
5. Chen YC, Murthy SN, Hendrickson D et ál. The effect of digestion and dewatering on sudden increases and regrowth of indicator bacteria after dewatering. *Water Environ. Res.* 2011;83(9):773-83.
6. Gerba CP, Smith JE, Jr. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J. Environ. Qual.* 2005;34(1):42-8.
7. Anuario de estadística 2010 del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino de España. Madrid: Secretaría General Técnica, Subdirección General de Estadística del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 2010.
8. Navia R, Mittelbach M. Could sewage sludge be considered a source of waste lipids for biodiesel production? *Waste Manage. Res.* 2012;30(9):873-4.
9. Real Decreto 1310-1990, de 29 de octubre, por el cual se regula la utilización de los lodos de depuradora en el sector agrario.
10. Rotger Anglada R. Microbiología sanitaria y clínica. Madrid: Ed. Síntesis. 1997.

11. Real Decreto 824-2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes.
12. Brochier V, Gourland P, Kallassy M et ál. Occurrence of pathogens in soils and plants in a long-term field study regularly amended with different composts and manure. *Agr.Ecosyst. Environ.* 2012; 160:91-8.
13. Orden AAA/1072/2013, de 7 de junio, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario.
14. European Union. Working document on sludge, 3<sup>rd</sup> draft. 2000.
15. Gondim-Porto C. Análisis microbiológico de un suelo agrícola mediterráneo tras la aplicación de lodos de depuradora urbana. Tesis Doctoral. Madrid, España: Dept. Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.2012.
16. Unc A, Gardner J, Springthorpe S. Recovery of *Escherichia coli* from soil after addition of sterile organic wastes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(3):2287-9.
17. García-Orenes F, Roldán A, Guerrero C et ál. Effect of irrigation on the survival of total coliforms in three semiarid soils after amendment with sewage sludge. *Waste Manage.* 2007;27(12):1815-19.
18. Lang NL, Bellett-Travers MD, Smith SR. Field investigations on the survival of *Escherichia coli* and presence of other enteric micro-organisms in biosolids-amended agricultural soil. *J. Appl. Microbiol.* 2007;103(5):1868-82.
19. de las Heras J, Manas P, Labrador J. Effects of several applications of digested sewage sludge on soil and plants. *J. Environ.Sci.Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 2005;40(2):437-51.
20. Estrada IB, Aller A, Aller F et ál. The survival of *Escherichia coli*, faecal coliforms and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants. *Bioresour. Technol.* 2004;93(2):191-8.
21. Epstein E. Land application of sewage sludge and biosolids. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, CRC Press Company. 2003.
22. Zaleski KJ, Josephson KL, Gerba CP et ál. Potential regrowth and recolonization of salmonellae and indicators in biosolids and biosolid-amended soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71(7):3701-8.
23. Oladeinde A, Bohrmann T, Wong K et ál. Decay of fecal indicator bacterial populations and bovine-associated source-tracking markers in freshly deposited cow pats. *Appl.Environ. Microbiol.* 2014;80(1):110-8.
24. Nadal-Rocamora I. Alteraciones fisiológicas, metabólicas y de la composición de las poblaciones bacterianas de la microbiota de un suelo agrícola tras la aplicación de residuos orgánicos urbanos. Tesis Doctoral. Madrid, España: Dept. Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. 2015.
25. Viau E, Peccia J. Evaluation of the enterococci indicator in biosolids using culture-based and quantitative PCR assays. *Water Res.* 2009;43(19):4878-87.
26. Brooks JP, Tanner BD, Josephson KL et ál. A national study on the residential impact of biological aerosols from the land application of biosolids. *J.Appl. Microbiol.* 2005; 99(2):310-22.
27. Girardin H, Morris CE, Albagnac C et ál. Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005;54(2):287-95.
28. Oliveira M, Viñas I, Usall J et ál. Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *Int. J. Food Microbiol.* 2012;156(2):133-40.
29. Sánchez-Monedero MÁ, Roig A, Cayuela ML et ál. Emisión de bioaerosoles asociada a la gestión de residuos orgánicos. *Ingeniería* 2006;10(1):39-47.
30. Brooks JP, Gerba CP, Pepper IL. Diversity of aerosolized bacteria during land application of biosolids. *J. Appl. Microbiol.* 2007;103(5):1779-90.
31. Brooks JP, McLaughlin MR, Gerba CP et ál. Land application of manure and Class B biosolids: an occupational and public quantitative microbial risk assessment. *J. Environ. Qual.* 2012;41(6):2009-23.
32. Brooks JP, Maxwell SL, Rensing C et ál. Occurrence of antibiotic-resistant bacteria and endotoxin associated with the land application of biosolids. *Can. J. Microbiol.* 2007; 53(5):616-22.
33. Chee-Sanford JC, Mackie RI, Koike S et ál. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J.Environ. Qual.* 2009;38(3):1086-108.
34. Levy SB. The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers. Cambridge: Harper Collins Publishers. 2002.
35. Shears P. Resistance as a worldwide problem. En: *Bacterial resistance to antimicrobials*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2008. 363-75.
36. Aarestrup FM. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin.Pharmacol. Toxicol.* 2005; 96(4):271-81.
37. Platero L, Nadal-Rocamora I, Gondim-Porto C et ál. Resistencia a antibióticos en terrenos agrícolas mediterráneos tras la aplicación de enmiendas de origen urbano. En: *XI Congreso Español y II Iberoamericano de Sanidad Ambiental*. Bilbao: SESA. 2011.
38. Zorzghi H, Gerba CP, Brooks JP et ál. Long-term effects of land application of Class B biosolids on the soil microbial populations, pathogens, and activity. *J.Environ. Qual.* 2010;39(1):402-8.
39. Munir M, Xagorarakis I. Levels of antibiotic resistance genes in manure, biosolids, and fertilized soil. *J. Environ. Qual.* 2011;40(1):248-55.
40. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW et ál. Sampling the antibiotic resistome. *Science* 2006;311(5759):374-77.
41. Hölzel CS, Schwaiger K, Harms K et ál. Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria. *Environ Res.* 2010;110(4):318-26.

42. Binh CT, Heuer H, Kaupenjohann M et ál. Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2008; 66(1):25-37.
43. Heuer H, Smalla K. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ. Microbiol.* 2007;9(3):657-66.
44. Binh CT, Heuer H, Gomes NC et ál. Short-term effects of amoxicillin on bacterial communities in manured soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007;62(3):290-302.
45. Ghosh S, LaPara TM. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *ISME J.* 2007;1(3):191-203.
46. Youngquist CP, Liu J, Orfe LH et ál. Ciprofloxacin residues in municipal biosolids compost do not selectively enrich populations of resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014;80(24):7521-26.
47. Nielsen MN, Winding A. Microorganisms as indicators of soil health. Denmark: 2002.
48. Mølbak K. Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans--the public health consequences. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 2004; 51(8-9):364-9.
49. Blanco G, Lemus JA, Grande J. Microbial pollution in wildlife: Linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. *Environ. Res.* 2009; 109(4):405-12.
50. Ross J, Topp E. Abundance of antibiotic resistance genes in bacteriophage following soil fertilization with dairy manure or municipal biosolids, and evidence for potential transduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015;81(22):7905-13.
51. Riber L, Poulsen PHB, Al-Soud WA et ál. Exploring the immediate and long-term impact on bacterial communities in soil amended with animal and urban organic waste fertilizers using pyrosequencing and screening for horizontal transfer of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2014;90(1):206-24.
52. Rahube TO, Marti R, Scott A et ál. Impact of fertilizing with raw or anaerobically digested sewage sludge on the abundance of antibiotic-resistant coliforms, antibiotic resistance genes, and pathogenic bacteria in soil and on vegetables at harvest. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(22):6898-907.
53. Selvaratnam S, Kunberger JD. Increased frequency of drug-resistant bacteria and fecal coliforms in an Indiana Creek adjacent to farmland amended with treated sludge. *Can. J. Microbiol.* 2004;50(8):653-6.
54. Pruden A, Larksson J, Amézquita A et ál. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ. Health Perspect.* 2013;121(8):878-85