

## ENSAYO EXPERIMENTAL SOBRE SUELO AGRÍCOLA DEL EFECTO DEL FANGO DESHIDRATADO Y FANGO COMPOSTADO DE LA EDAR DE ABANILLA (MURCIA) EN LA COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD MICROBIANA Y LA REDUCCIÓN DE POTENCIALES PATÓGENOS, DETERMINADOS MEDIANTE TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA.

**Pedro J. Simón Andreu**, Director técnico de la Entidad Regional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales de Murcia (ESAMUR)

**Carlos Lardín Mifsut**, Técnico de Explotación de la Entidad Regional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales de Murcia (ESAMUR)

**Antonio Picazo Mozo**, Investigador postdoctoral, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universitat de València

**Antonio V. Sánchez Betrán**, Director Técnico, RED CONTROL S.L.

**José Alfredo López**, Jefe de planta EDAR Abanilla, RED CONTROL S.L.

**Antonio Camacho González**, Catedrático de Ecología, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universitat de València

### Resumen

El incremento en la producción de fangos en los sistemas de depuración de aguas residuales es un problema asociado a la depuración de las aguas. Una opción es su utilización como fertilizante en agricultura, sobre todo como enmienda en suelos pobres en nutrientes o materia orgánica. La Unión Europea regula la utilización de estos fangos en agricultura obligando a un pretratamiento de los fangos antes de su uso, y así evitar los aportes de niveles significativos de contaminantes al suelo. El compostaje de los fangos activos puede reducir tanto su contenido en agua, como la abundancia de posibles patógenos microbianos y otros contaminantes. Existen pocos estudios experimentales que comparen, con métodos detallados de taxonomía molecular (NGS), la evolución temporal de la abundancia y estructura de las poblaciones de procariontes y en particular la de géneros potencialmente patógenos, en suelos tratados directamente con fangos de depuradora o, alternativamente, con fangos compostados. Los resultados del ensayo experimental realizado in situ en la EDAR de Abanilla (Murcia) muestran que existe un efecto significativo de los tratamientos ensayados sobre la composición de la comunidad microbiana del suelo y, en particular, en los patrones de eliminación de determinados taxones potencialmente patógenos aportados por los fangos deshidratados o el compost. A partir de las 5 semanas de incubación los rendimientos de eliminación de patógenos bacterianos se igualan, llegando en ambos casos a un 99%, aunque el fango compostado parte con la ventaja previa de una gran reducción de biomasa bacteriana y también de la proporción de potenciales patógenos que se da en el proceso de compostado, por lo que alcanza abundancias finales aún más bajas. No obstante, este es un ensayo centrado en patógenos bacterianos y para un uso final de estos lodos en suelos sería necesario un estudio integrado de otros contaminantes.

### Abstract

Increased sludge production in wastewater treatment systems is a problem associated with sewage treatment. One alternative is its use as a fertiliser in agriculture, especially as an amendment in soils poor in nutrients or organic matter. The European Union regulates the use of sludge in agriculture requesting a pre-treatment of the sludge prior to its use

in agriculture, thus avoiding the addition of pollutants to the soil. Composting activated sludge can reduce its water content, as well as the abundance of potential microbial pathogens and other contaminants. There are few experimental studies that compare, using detailed molecular taxonomical methods (NGS), the temporal evolution of the abundance and the structure of prokaryotic communities, particularly of potentially pathogenic taxa, in soils treated directly with sludge or with composted sludge. The results of the experiments carried out in situ at the Abanilla WWTP (Murcia) show that there is a significant effect of the treatments on the composition of the soil microbial community and, particularly, on the removal rates of certain potentially pathogenic taxa, among the different treatments applied to the agricultural soil. After 5 weeks of incubation, the relative yields of removal of potential bacterial pathogens provided by the sludge or the compost are similar for both types of amendments, nearly 99% in both cases, although the composted sludge had originally lower levels of bacterial biomass and potential pathogens, thus achieving lower abundance at the end of the experiment than the soils treated directly with dehydrated sludge. However, since this work focus on bacterial pathogens, an integrative study of other pollutants would be necessary prior to the direct use of sludge in soils.

## Introducción

La producción de fangos de depuradora se está incrementando en Europa, ya que cada vez se ponen en marcha más plantas de tratamiento de aguas residuales, generándose, por lo tanto, una gran cantidad de estos lodos (Carbonell et al., 2009; Andrés et al., 2011; Curci et al., 2020). Uno de los usos más interesantes y prometedores para estos lodos es su utilización como fertilizante en agricultura, sobre todo en suelos pobres en nutrientes o materia orgánica (Hudcová et al., 2019). La Unión Europea regula la utilización de estos fangos en agricultura mediante la directiva 86/278/EEC, que obliga al pretratamiento de los fangos antes de su uso en agricultura. La política actual de la Comisión Europea es fomentar el uso de los lodos de depuradora en el suelo siempre que la calidad de los lodos sea compatible con los requisitos ambientales y de salud pública, ya que parece ser una solución sostenible a largo plazo para su valorización (Schowanek et al., 2004). El uso en tierras agrícolas es el destino más relevante de estos lodos de Europa y ya desde principios de este siglo utiliza más del 50% de la producción de lodos (Sree Ramulu, 2002).

El uso de fangos de depuradora en agricultura aumenta la producción de las cosechas y reduce el daño causado en el suelo, ya que mejora las propiedades físicas y químicas del suelo, además de su actividad biológica. La fertilización con fangos aumenta la materia orgánica del suelo, aumentando su capacidad para retener nutrientes y agua, e incrementando su resistencia a la erosión (Antonious et al., 2011, Roig et al., 2012), y además aporta nutrientes inorgánicos como nitrógeno o fósforo (Frac et al., 2011). Por otra parte, el uso de fangos activos estimula la actividad de los microorganismos del suelo (Frac et al., 2011), produciéndose, por tanto, una mayor liberación de nutrientes que pueden mejorar el crecimiento de las plantas cultivadas. Paralelamente, el uso de compost obtenido a partir de la mezcla de residuos agrícolas y fangos activos contribuye a la sostenibilidad debido a que el compost así obtenido no se considera un residuo y presenta menos metales pesados que otros compuestos, junto con la ventaja de que tampoco presenta grandes riesgos sanitarios (Lau et al., 2017; Robledo-Mahon et al., 2018; Liu et al., 2018). Así, el compostaje de los fangos activos reduce su contenido en agua y la persistencia de posibles patógenos microbianos (Alvarenga et al., 2015), siendo también relevantes los menores niveles de metales pesados presentes en los fangos una vez compostados (Smith, 2009). Además, los fangos compostados presentan unos beneficios para la agricultura similares a los que, al menos potencialmente, se pueden suponer para los fangos no compostados. Sin embargo, no

existen apenas estudios que comparen, a nivel de la abundancia de microorganismos potencialmente patógenos, si el uso directo de fangos puede ser una alternativa al uso de compost en suelos agrícolas.

Las características y los posibles contaminantes de los lodos de depuradora usados directamente y, en menor medida, de los lodos compostados, dependen del origen de los aportes a las plantas de tratamiento de agua residual, por lo que pueden variar notablemente según sean domésticas, industriales o combinadas. La composición de la materia seca de los lodos se basa en sólidos orgánicos e inorgánicos, nutrientes y biomasa producida durante los procesos de degradación. La materia orgánica constituye del 40 al 80% en peso seco, dependiendo de la extensión y del tipo de tratamiento de los lodos. En el suelo agrícola de destino, los organismos del suelo, la microbiota y las plantas están directamente expuestos a los posibles contaminantes en suelos enmendados con lodos. De entre todos los contaminantes que potencialmente pueden aportar los lodos (compostados o no) uno de los más preocupantes son los patógenos microbianos. El uso de técnicas moleculares de secuenciación masiva permite el estudio detallado de la evolución temporal de estos grupos microbianos en suelos agrícolas tratados (Major et al., 2020).

El objetivo de este estudio es valorar el efecto que, sobre la composición de la comunidad microbiana de los suelos tratados y, en particular, sobre la abundancia de determinados taxones bacterianos potencialmente patógenos, puede generar la adición de fangos, compostados o no, de la EDAR de Abanilla, tomada como caso de estudio. Se pretende determinar la abundancia y evolución temporal de estos grupos microbianos en suelos agrícolas ante dos condiciones experimentales, la primera con la adición al suelo de lodos directamente obtenidos de la EDAR de Abanilla, y la segunda con lodos de depuradora tras un proceso previo de compostaje.

## Material y métodos

### Área de estudio, toma de muestras y diseño experimental

La EDAR estudiada (Figura 1) está situada en el municipio de Abanilla, en la provincia de Murcia. Presenta un caudal de entrada de 571.080 m<sup>3</sup>/año y su carga de diseño es de 17.540 h.e. Dispone de un tratamiento terciario mediante filtros de arena abiertos, previos a la desinfección. El tratamiento de los lodos consiste en espesamiento y deshidratación mecánica mediante dos decantadores centrífugos. La EDAR cuenta con varios sistemas de desinfección. Anteriormente el agua se higienizaba mediante una combinación de hipoclorito sódico en dos puntos de la línea de agua tratada junto con lámparas ultravioleta. Paralelamente, desde enero de 2019, se ensayó el efecto del uso de ozono en el agua de cara a la eliminación de patógenos y contaminantes emergentes y, a la vista de los buenos resultados obtenidos con este sistema de desinfección, en julio de 2020 se instaló la planta de ozono de forma definitiva en la EDAR como sistema principal de desinfección, utilizándose el hipoclorito y las lámparas U.V. sólo en casos puntuales, eliminando en su conjunto, la gran mayoría de los patógenos bacterianos en los tratamientos del agua (Simón-Andreu et al, 2020). El efluente depurado es vertido en su totalidad a una balsa para su reutilización para riego agrícola. Sin embargo, la retirada de lodos en distintas etapas del procedimiento de depuración hace necesario conocer la posible incidencia de potenciales patógenos bacterianos que se transfieran a dichos lodos, aspectos que se abordan en el presente estudio.



Figura 1. Imagen aérea de la EDAR de Abanilla.

Las muestras resultantes del experimento, que se detalla a continuación, se recogieron en cada una de las subparcelas (3 por tratamiento) establecidas en el diseño experimental, a los tiempos que se detallan en la figura 2. Para ello se utilizaron envases nuevos estériles, que se llevaron rápidamente al laboratorio donde, inmediatamente, las muestras fueron homogeneizadas y separadas en alícuotas para posteriores análisis.

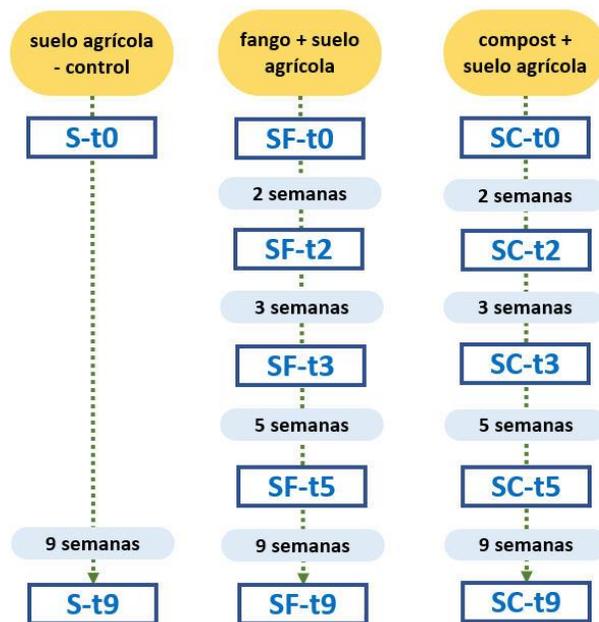


Figura 2 Diseño del tratamiento experimental de mezcla de fangos y compost con suelo agrícola. S- Control de suelo sin adiciones; SF – Tratamiento del suelo con fangos procedentes de la purga de fangos biológicos y posteriormente deshidratados de la EDAR de

Abanilla; SC Tratamiento del suelo con lodos de depuradora compostados. Cada tratamiento, así como el control sin adiciones, se realizó por triplicado (3 subparcelas). El número tras la letra "t" hace referencia al número de semanas transcurridas cuando se realizó el muestreo a partir del inicio del experimento de adición.

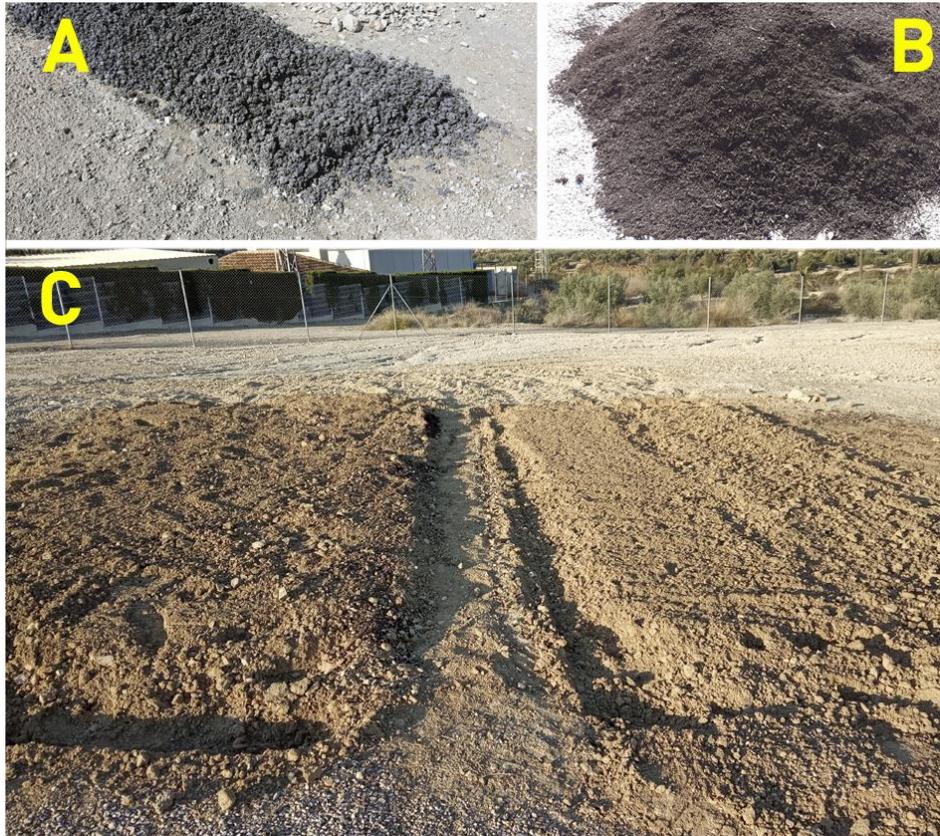


**Figura 3.** Zona ocupada por las parcelas dónde se realizaron los estudios y detalle de las mismas.

El experimento tuvo una duración total de 9 semanas. En el experimento se eligieron 3 tipos de parcelas de suelo calizo dentro de la propia EDAR de Abanilla (figura 3) (con tres subparcelas cada una), contiguas y de características similares, con unas dimensiones de 2 metros de ancho por 4 metros de largo (8 m<sup>2</sup> de área). La cantidad de fango deshidratado y compost aplicado fue de 200kg por parcela en cada caso.

- **Parcela 1:** Tipo de parcela control que no recibió ningún tratamiento. En cada subparcela se recogió una muestra inicial a tiempo cero (S-t0) y una muestra final tras 9 semanas (S-t9).
- **Parcela 2:** Tipo de parcela que recibió directamente el fango deshidratado de la EDAR de Abanilla. Estos fangos se homogenizaron mecánicamente con los primeros centímetros del suelo de manera similar a como se realizaría en un proceso de abonado agrícola. En cada subparcela se recogieron 5 muestras (t0, t2, t3, t5 y t9) a lo largo de las 9 semanas de experimentación desde el inicio del experimento (SF-t0) hasta la semana 9 (SF-t9).
- **Parcela 3:** Este tipo de parcela recibió el compost generado en planta de compostaje, que igualmente se homogenizó mecánicamente con de los primeros centímetros del suelo. Al igual que para el tratamiento con fangos, en cada subparcela se recogieron 5 muestras (t0, t2, t3, t5 y t9) a lo largo de las 9 semanas de experimentación (Figura 2), desde el inicio (SC-t0) hasta el final (semana 9, SC-t9) del experimento.

En total, para este experimento, se obtuvieron 36 muestras.



**Figura 4.** Fotografías que muestran A) el lodo deshidratado previo a la mezcla con el suelo B) el lodo compostado previo a la mezcla con el suelo C) parcelas tratadas tras la mezcla con el lodo compostado (izquierda) o con el lodo deshidratado (derecha).

#### Cuantificación de la abundancia bacteriana

La abundancia de bacterias totales y su actividad se estimó por citometría de flujo sobre submuestras fijadas con una solución de paraformaldehído: glutaraldehído a una concentración final en la muestra del 1%:0,05% (p/v), respectivamente. Para ello, una dilución de la submuestra se trató con una combinación de sonicación y un dispersante, (tetrasodium pyrophosphate, PPI) para poder extraer las bacterias de la matriz de sedimento y así poder realizar el recuento (Griebler et al., 2001). Para el recuento de la abundancia bacteriana total se utilizó un citómetro de flujo Coulter Cytomics FC500. La enumeración de la abundancia de bacterias totales se realizó tras una 1 hora de tinción con SybrGreen-I (1X). Los datos se recopilaban con el software Beckman Coulter para la adquisición "CXP Versión 2.2 Adquisición" y el análisis de los datos se realizó con el software Beckman Coulter para el análisis "Análisis CXP Versión 2.2". En este análisis de datos se discriminaron, en función de un valor umbral de voltaje en el canal FL1(SybrGreen-I), dos subgrupos del total de bacterias, uno con bajo contenido en DNA (LDNA) y otro con alto contenido en DNA (HDNA), siendo estas últimas la fracción de alta actividad.

### Estudio taxonómico de la comunidad bacteriana por secuenciación masiva

La extracción de ADN de cada una de las submuestras recogidas para el análisis molecular, y conservadas a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , se realizó siguiendo las instrucciones del kit comercial de extracción “Ezra Soil DNA isolation kit”. Una vez extraído y purificado, el ADN se cuantificó y, en la Unidad de Genómica de la *University of Michigan*, se secuenció la región V4 del gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosómico (16SrDNA). Este gen se encuentra presente en todas las bacterias y arqueas, y es filogenéticamente informativo, principalmente en su región V4. La secuenciación se llevó a cabo mediante la plataforma NGS Illumina MiSeq 2x250 bp.

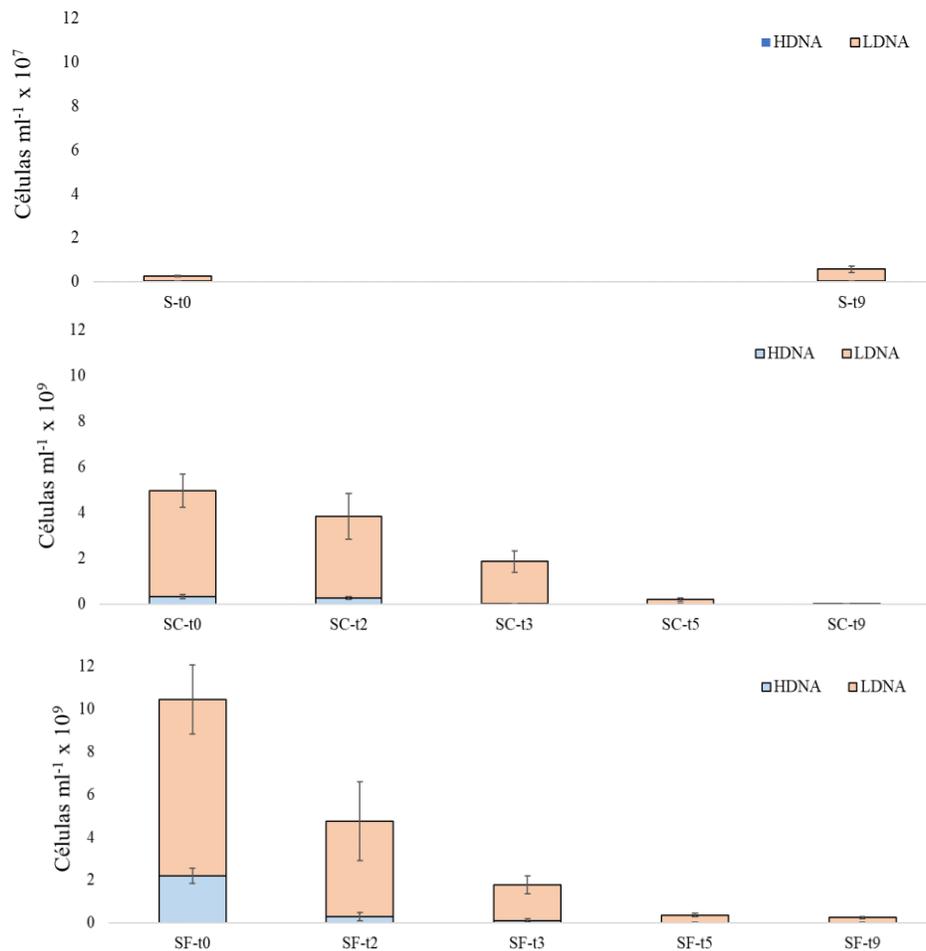
Para el análisis de las secuencias se usaron programas originales escritos en lenguaje Python o R. En primer lugar, se unieron las secuencias, directa e inversa, de cada una de las muestras analizadas, se filtraron por calidad y se agruparon las secuencias en unidades taxonómicas operativas (“Zero-radius Operational Taxonomic Units”, ZOTUs), que son similares a las tradicionales “OTUs” pero con la restricción añadida de que las secuencias que forman parte de esa unidad taxonómica tienen que compartir el 100% de la identidad en su código, lo que permite una discriminación taxonómica más precisa. La asignación taxonómica se realizó con RDP (Classifier), se eliminaron los alineamientos con valores de coincidencia menores del 90% en la base de datos de RDP y, además, se eliminaron las secuencias pertenecientes a mitocondrias y cloroplastos. Los 35 géneros con especies potencialmente patógenas que se siguieron en este estudio fueron seleccionados de la base de datos PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center) <https://www.patricbrc.org/>.

### Análisis estadísticos

A fin de evaluar, conjuntamente y con fiabilidad estadística, el conjunto de los resultados, se realizaron diferentes análisis ANOVA y PERMANOVA (software Primer 6.0) estableciendo los niveles de significatividad (nivel mínimo de significatividad  $p < 0,05$ ) para las diferencias entre los diferentes tratamientos experimentales analizados, incluyendo las subparcelas control.

## **Resultados y discusión**

Los resultados experimentales muestran que la abundancia total de bacterias, que era mucho más alta en las parcelas enmendadas con fango o compost de lo que lo era en el suelo previo a las adiciones (control), descendió de forma progresiva y significativa en ambos tratamientos a lo largo del experimento, siendo el descenso proporcionalmente más elevado en el caso de la mezcla con fango no compostado, aunque en términos absolutos las abundancias eran originariamente más bajas en las parcelas tratadas con compost que en las tratadas con fangos deshidratados (Figura 5). Excepto en las muestras de los tratamientos con fangos no compostados, los valores de %HDNA (porcentaje de bacterias más activas de la población), fueron en general muy bajos ya desde el principio de los experimentos, tanto en los tratamientos con fango no compostado como en los controles, descendiendo aún más si cabe durante el periodo de incubación. Este contraste ya indicaba diferencias a nivel funcional de los diferentes tratamientos.



**Figura 5.** Variación de la abundancia total y la contribución relativa de las subpoblaciones de bacterias HDNA y LDNA en el control (S) y en las distintas condiciones experimentales, suelo + fango (SF) y suelo + compost (SC), en el transcurso del ensayo.

La evolución temporal de la comunidad microbiana muestra que la composición taxonómica varió en función del tratamiento efectuado al suelo agrícola (suelo + lodo directo de la EDAR o suelo + lodo compostado) respecto a los controles de suelo sin tratar. En este sentido, se obtuvieron diferencias entre los dos tratamientos. Por ejemplo, a nivel taxonómico de familia, se observaron familias que aportaban los lodos, compostados o no, y que sin embargo no aparecían en el suelo control, como, por ejemplo, Sphingobacteriaceae y Streptomycetaceae. Por otro lado, se observaron otras familias bacterianas que aumentaron su abundancia respecto al suelo control en los diferentes tratamientos, como por ejemplo Micrococcaceae, Xanthomonadaceae, Rhizobiaceae, Planococcaceae o Pseudomonadaceae en el tratamiento con fangos no compostados; y las familias como Burkholderiaceae, Sphingomonadaceae y, en menor medida, Intrasporangiaceae, en el tratamiento con compost. Estos cambios en la composición taxonómica son parte de los efectos que el fertilizado con este tipo de lodos causa en la comunidad microbiana del suelo y, en cualquier caso, se trata de organismos habituales en suelos naturales. Estos cambios se produjeron a todos los niveles taxonómicos, lo que implica que la composición estructural y, por tanto, el patrón funcional de las comunidades en los diferentes tratamientos aplicados fue diferente.

Los principales géneros con especies potencialmente patógenas ausentes en el suelo y detectados tanto en el suelo tratado con fango deshidratado como en el tratado con fango compostado, fueron (Figura 6) *Actinomyces*, *Aeromonas*, *Alistipes*, *Arcobacter*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridium sensu stricto 12*, *Clostridium sensu stricto 13*, *Clostridium sensu stricto 9*, *Corynebacterium*, *Coxiella*, *Eggerthella*, *Enterococcus*, *Escherichia-Shigella*, *Fusobacterium*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Leptospira*, *Leptotrichia*, *Ochrobactrum*, *Oribacterium*, *Paeniclostridium*, *Prevotella 7*, *Prevotella 9*, *Rhodococcus*, *Rothia*, *Shewanella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Treponema*, y *Yersinia*.

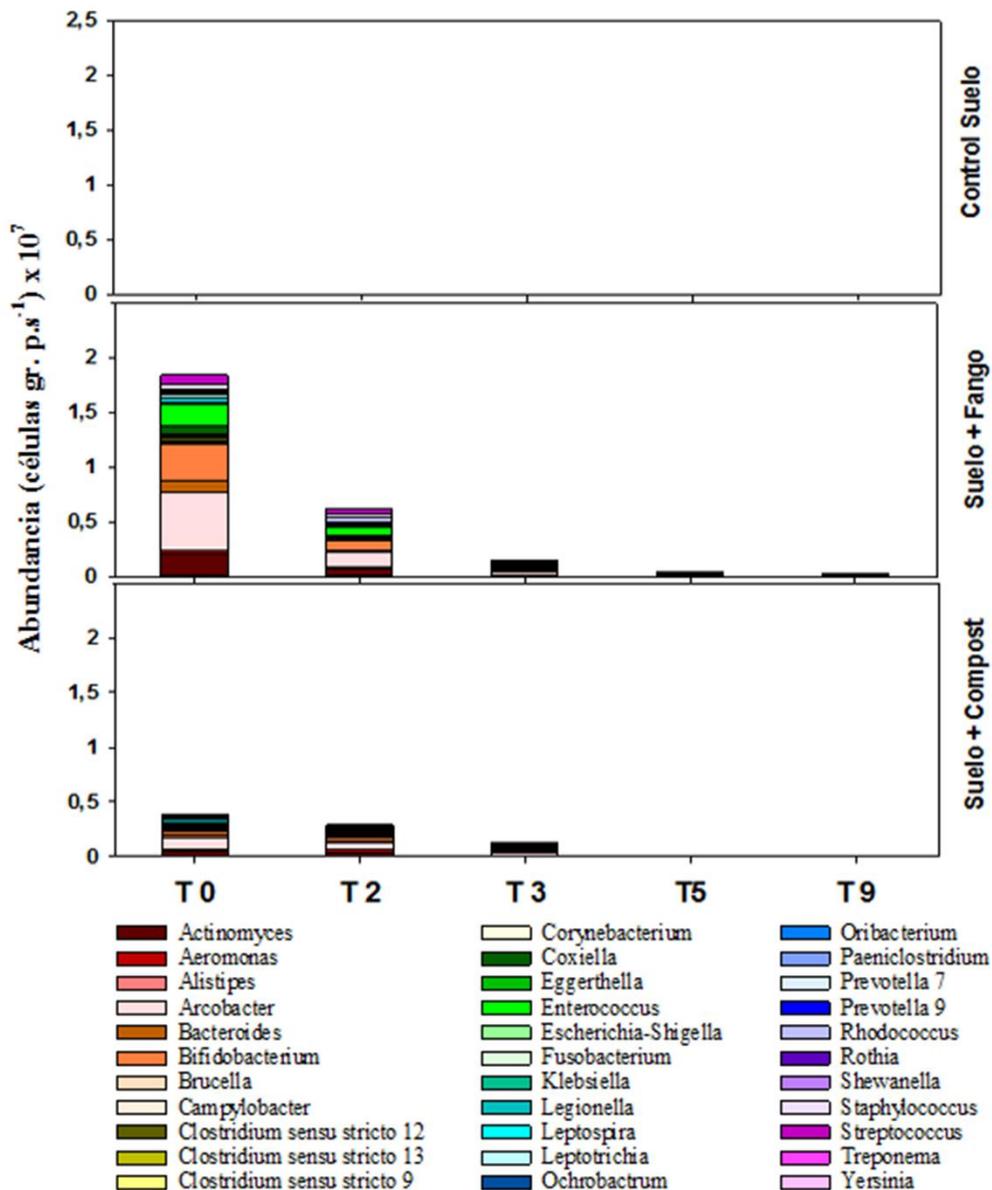
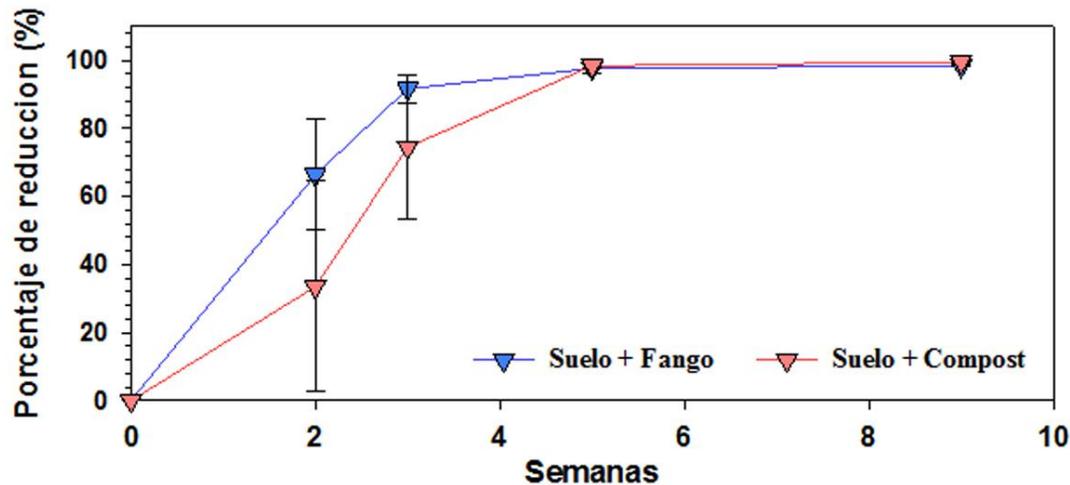


Figura 6. Evolución temporal de la abundancia de los principales géneros con potenciales especies patógenas en el control (S) y en las distintas condiciones experimentales, suelo + fango (SF) y suelo + compost (SC), en el transcurso del ensayo: Los distintos géneros se ordenan de abajo a arriba en las barras para distinguir mejor las similitudes en los colores empleados.

La figura 7 muestra la evolución temporal de los géneros con especies potencialmente patógenas en el experimento. Si bien tanto la adición de fango como de compost al suelo agrícola supuso un aporte inicial de microorganismos de estos grupos potencialmente patógenos al suelo, siendo de tres órdenes de magnitud superior para el ensayo de compost y cuatro órdenes de magnitud para el ensayo de fangos respecto al suelo sin adición, en ambos tratamientos se observó un descenso muy acusado de la abundancia de géneros con especies potencialmente patógenas ya a partir de las semanas 2 y 3 desde la adición de los tratamientos (Figura 6).



**Figura 7.** Evolución temporal de la disminución porcentual (respecto al tiempo inicial T0) de la abundancia absoluta de géneros potencialmente patógenos en las dos condiciones experimentales ensayadas.

Los descensos de abundancia absoluta de géneros con especies potencialmente patógenas (Figura 7) fueron progresivos en ambos tratamientos, aunque mostraron una mayor aceleración en el caso del fango no compostado, de tal modo que, a la tercera semana de ensayo las reducciones (respecto al tiempo inicial, suelo control) de su abundancia absoluta en este tratamiento eran ya de en torno al 90%, mientras que en el compost éstas estaban aún por debajo del 75%, si bien las abundancias absolutas iniciales en el suelo enmendado con compost eran menores. No obstante, en ambos casos, estos porcentajes (respecto al total de bacterias potencialmente patógenas en el tiempo inicial) se igualaron prácticamente a los tiempos finales (98-99%), sin que a tiempo final se observaran diferencias significativas en la eficiencia en la eliminación absoluta de géneros potencialmente patógenos entre ambos tratamientos, a pesar de que esta abundancia seguía siendo algo mayor que en el suelo no tratado.

Debido a que el proceso de compostaje previo ya elimina una elevada porción de éstos, la abundancia de microorganismos de géneros potencialmente patógenos en términos absolutos ya era inicialmente significativamente inferior en los suelos tratados con compost que en los enmendados con fango, por lo que, en relación a los aspectos concretos analizados en el presente estudio, el uso de compost resulta más idóneo para la regeneración de suelo agrícola en comparación con el uso de los lodos no compostados por lo que se refiere a la de carga de microorganismos de géneros de potenciales patógenos bacterianos. No obstante, la mezcla de los fangos deshidratados (no compostados) con un tiempo suficiente (varias semanas) también permite una eficiente reducción de la abundancia de potenciales patógenos bacterianos por lo que, por su sencillez, podría considerarse como una alternativa más

sencilla al compostado en los casos en los que la enmienda de suelos pudiera hacerse con la suficiente antelación al inicio de los cultivos.

## Conclusiones

A efectos de optimizar la posible implantación del proceso de mezcla, tanto de compost como, sobre todo, de lodos no compostados, con suelo agrícola, de los resultados del experimento se deduce que 5 semanas de incubación parecen ser suficientes para que la reducción significativa de la abundancia de los géneros bacterianos potencialmente patógenos casi se sature; por lo que una prolongación del tiempo de incubación más allá de 5 semanas no aportaría un rendimiento mucho mayor en el caso de la adición de fangos, si bien prácticamente hace desaparecer las pequeñas cantidades restantes en el caso del suelo tratado con compost.

En relación con la posible utilización de los fangos de la EDAR de Abanilla directamente como abono agrícola, el presente estudio demuestra que, se produce una reducción muy significativa de la abundancia de los géneros bacterianos potencialmente patógenos, si bien alguno de estos grupos aún se detecta al cabo de 9 semanas. No obstante, en el presente estudio se valora únicamente la incidencia y patrón de reducción de la abundancia de los taxones bacterianos potencialmente patógenos, sin entrar a valorar otros aspectos como la presencia de metales pesados, antibióticos, LAS, etc., que podrían dificultar el uso agrícola de estos fangos si se superaran los límites tolerados para su utilización como enmienda de suelos, y que deberían ser igualmente analizados para observar el cumplimiento de los estándares marcados.

## Referencias

- Alvarenga, P., Mourinha, C., Farto, M., Santos, T., Palma, P., Sengo, J. & Cunha-Queda, C. (2015). Sewage sludge, compost and other representative organic wastes as agricultural soil amendments: Benefits versus limiting factors. *Waste Management*, 40, 44-52.
- Andrés, P., Mateos, E., Tarrasón, D., Cabrera, C., & Figuerola, B. (2011). Effects of digested, composted, and thermally dried sewage sludge on soil microbiota and mesofauna. *Applied Soil Ecology*, 48(2), 236-242.
- Antonious, G. F., Dennis, S. O., Unrine, J. M., & Snyder, J. C. (2011). Ascorbic acid,  $\beta$ -carotene, sugars, phenols, and heavy metals in sweet potatoes grown in soil fertilized with municipal sewage sludge. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 46(2), 112-121.
- Carbonell, G., Pro, J., Gómez, N., Babín, M. M., Fernández, C., Alonso, E., & Tarazona, J. V. (2009). Sewage sludge applied to agricultural soil: ecotoxicological effects on representative soil organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(4), 1309-1319.
- Curci, M., Lavecchia, A., Cucci, G., Lacolla, G., De Corato, U., & Crecchio, C. (2020). Short-term effects of sewage sludge compost amendment on semiarid soil. *Soil Systems*, 4(3), 48.
- Frac, M., & Jezierska-Tys, S. (2011). Agricultural utilisation of dairy sewage sludge: its effect on enzymatic activity and microorganisms of the soil environment. *African Journal of Microbiology Research*, 5(14), 1755-1762.
- Griebler, C., Mindl, B., & Slezak, D. (2001). Combining DAPI and SYBR Green II for the enumeration of total bacterial numbers in aquatic sediments. *International Review of Hydrobiology*, 86(4-5), 453-465.
- Hudcová, H., Vymazal, J., & Rozkošný, M. (2019). Present restrictions of sewage sludge application in agriculture within the European Union. *Soil and Water Research*, 14(2), 104-120.

- Lau, C. H. F., Li, B., Zhang, T., Tien, Y. C., Scott, A., Murray, R. & Topp, E. (2017). Impact of pre-application treatment on municipal sludge composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. *Science of the Total Environment*, 587, 214-222.
- Liu, L., Wang, S., Guo, X., Zhao, T., & Zhang, B. (2018). Succession and diversity of microorganisms and their association with physicochemical properties during green waste thermophilic composting. *Waste Management*, 73, 101-112.
- Major, N., Schierstaedt, J., Jechalke, S., Nesme, J., Ban, S. G., Černe, M., & Schikora, A. (2020). Composted sewage sludge influences the microbiome and persistence of human pathogens in soil. *Microorganisms*, 8(7), 1020.
- Robledo-Mahón, T., Aranda, E., Pesciaroli, C., Rodríguez-Calvo, A., Silva-Castro, G. A., González-López, J., & Calvo, C. (2018). Effect of semi-permeable cover system on the bacterial diversity during sewage sludge composting. *Journal of Environmental Management*, 215, 57-67.
- Roig, N., Sierra, J., Martí, E., Nadal, M., Schuhmacher, M., & Domingo, J. L. (2012). Long-term amendment of Spanish soils with sewage sludge: effects on soil functioning. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 158, 41-48.
- Schowanek, D., Carr, R., David, H., Douben, P., Hall, J., Kirchmann, H., & Webb, S. (2004). A risk-based methodology for deriving quality standards for organic contaminants in sewage sludge for use in agriculture—conceptual framework. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 40(3), 227-251.
- Simón Andreu, P.J., Lardín Mifsut, C., Camacho Gonzalez, A., Picazo Mozo, A., Sánchez Betrán, A.V. & López, J.A. (2020). Estudio del efecto de los procesos de depuración y de desinfección sobre la microbiota en la EDAR de Abanilla, mediante técnicas de secuenciación masiva (NGS -Next Generation Sequencing) *Aguasresiduales.info*. <https://www.aguasresiduales.info/revista/articulos/estudio-del-efecto-de-los-procesos-de-depuracion-y-desinfeccion-sobre-la-microbiota-en-la-edar-de-abanilla-mediante-tecnicas-de-secuenciacion-masiva>
- Smith, S. R. (2009). A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environment international*, 35(1), 142-156.
- Sree Ramulu, U. S. (2001). Reuse of municipal sewage and sludge in agriculture. Scientific Publishers (India).