



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

## **Noves tècniques per al control i desinfecció de virus contaminants d'aigua**

Eva Forés Gil



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

# **NOVES TÈCNIQUES PER AL CONTROL I DESINFECCIÓ DE VIRUS CONTAMINANTS D'AIGUA**

**Eva Forés Gil**



**TESI DOCTORAL  
Novembre 2022**







UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Programa de Doctorat de Biotecnologia

Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística  
Secció de Microbiologia, Virologia i Biotecnologia  
Facultat de Biologia

## **Noves tècniques per al control i desinfecció de virus contaminants d'aigua**

Memòria presentada per Eva Forés Gil per optar al grau de  
Doctora per la Universitat de Barcelona

Directora i tutora

Sílvia Bofill Mas

Directora

Rosina Girones Llop

Doctoranda

Eva Forés Gil

Barcelona, 2022



*A les dones de la meua vida.*

*L'element més violent en la societat,  
és la ignorància.*

*Emma Goldman*



Aquesta tesi ha estat finançada amb un Ajut per a Personal Investigador Predoctoral en Formació de la Universitat de Barcelona (APIF) de l'Institut de Recerca de l'Aigua (IdRA).



## AGRAÏMENTS

*Cal avisar al lector que estos agraiïments estan transcrits del valencià oral, ja que tots aquells que me coneixeu sabeu que tot i que parle una variant del català septentrional, compte amb les peculiaritats pròpies del meu poble. D'esta manera, m'agradarie posar en valor el meu propi dialecte del que tantes vegaes s'han rist, però que defenc amb orgull, ja que és part de mi, me definix i és signe identitari de la meua cultura, a més, aixina quan llegiu estos agraiïments, en certa manera, és com si vos estiguere parlant al costaet.*

*M'han tirat la canya moltes vegaes però ninguna com la de Sílvia. Pensave que mai guanyarie una beca, però després del seu correu en una convocatòria de beques dient: Et torno a tirar la canya, 4 anys més tard ací estic, escrivint els agraiïments del llibre que la gent m'insistix en què escrigue, tot i que el contingut no crec que sigue el que esperaven.*

*Fer una tesi no és fàcil, sobretot a nivell emocional, i joder, fer un doctorat centrat en virus a l'ambient enmig d'una pandèmia mundial, no sé si és una broma de mal gust, una distopia o una pel·lícula de ciència ficció. El que tinc clar, és que sense l'ajuda de tota la gent que segurament ara mateix estigue llegint estos agraiïments, no ho haguere aconseguit.*

*En primer lloc, agrair a Sílvia i Rosina, gràcies per donar-me l'oportunitat d'entrar al laboratori. Per ensenyar-me què és realment la recerca, que no es reduix a fer experiments, sinó més bé és saber gestionar, gestionar el material, gestionar a gent, gestionar diners, gestionar temps, gestionar emocions i sobretot frustracions. Fer el doctorat és un aprenentatge a nivell personal, més que professional. I bàsicament s'aconsegueix envoltant-se de gent, preferiblement de bons referents, jo crec sincerament que l'he clavat, perquè he tingut les millors. Referents que no sé perquè han sigut principalment totes dones en este món de senyors, i no podrie haver estat més feliç.*

*Primer que res demanar disculpes al meu equip, he après molt de vatros, però ha sigut impossible que feu que sigue una persona ordenada, ho intentat de veres, però l'entropia acudix a mi. Encara aixina, he eixit endavant, i és gràcies a la gent que m'ha acompanyat.*

*Especialment a Sandra, no me podrie imaginar una millor companya, només mirar-me la cara ja sabies què me passave, sempre disposà a ajudar, a escoltar, a tindre solució per a tot, a entendre'm i comprendre'm, a ordenar-me la vida i els pensaments, a parar el teu mon per salvar-me el cul, moltes*

gràcies de tot cor. A Marta, no la petita, la que és molt pareguda a mi però més lista, perquè m'has fet sentir sempre com una més de la família, donant-me a esmorzar com un bebé adormit més de la taula. Gràcies per respondre sempre, pels consells, per l'ajuda infinita i les solucions d'últim moment que són salvadores. Gràcies per haver parit a Anna, i Anna per ensenyar-me que l'amistat no té edat i que de vegades es creen vincles tant genials que asusten. A l'altra Marta, ara sí, la petita, o petit. Gràcies per aguantar-me tantes tardes marejant-te sense enviar-me a fer la mar i encara aixina preocupar-te per mi, soc el teu futur, aprèn de mi i no repetisques els meus errors. A Cris, per fer cas a l'orugrita quan requerie atenció, sinó probablement haguere mort. Gràcies pels quicos, pels que se mingen dins i els que se fumen fora. Realment me senc molt afortunat d'haver coincidit amb totes vatros al lab. Perquè a més de bona gent, sou molt bones en el que feu. Sou el meu referent, sou companyes, sou professionals amb criteri, eficients, resolutives, ordenades, més que jo però això no té ningun mèrit, sou mestres i sou amigues, gràcies per fer-me la vida més fàcil. Al Chiquito, perquè al final és el més listo de Vircont, gràcies per les birres a última hora i per la simpatia i el ritme tropical que te caracteritze. Als xiquets nouvinguts a vircont, Júlia, Ignasi i Jorge, gràcies per l'alegria que me doneu pels matins, pareix ser que soc un referent per a vatros, veig lo bé que vos o passeu al lab, no pergueu el temps i aprengueu tot el que pugueu, qui sap, pot ser que algun dia estigueu en la meua posició.

Al grup d'amics fantàstic que ha eixit del departament, a Gala Micro i al meu millor amic +34669275355 per estar disposats a tot, a Geno Ub A.K.A. mi pxxxxx, gràcies per ser taaant eficient, a Ale Ub o Dr Prieto jaja (creuteu més perquè eres un crack), a Pedro Lab, per ser un outlier com jo, a Manu Lab i Cris García Hulia, els més sensats, a Alvaro Martin (Sandra), gràcies pels DMs, i Oscar Hudio i Sara Nienke per escolar totes les meues aventures que no es poden contar. No sé perquè me voleu tant.

Als altres amics, a Xavi, gràcies per la teua intensitat i sinceritat, a Elena, quina dona! Gràcies per compartir tots eixos moments, a Robert, gràcies per deixar-me ser el teu animal tòtem, a Andrés, gràcies per la teua alegria, a Edu, tot i ser tant diferents al final hem seguit vides paral·leles, et dessitge lo millor, als microlloros que me van acollir quan vaig arribar al departament. A totes aquelles persones no virconianes que m'aconsellen i escolten, en especial a les mares de BGM, Aiora i Raquel. A tots els companys del departament que sempre m'han ajudat quan ho he necessitat, Dani, gràcies per tots els consells sobre com domar fags, a Pol pels papers i erlenmeyers, a Míriam per animar-me contínuament amb la tesi. A tot l'equip de MARS, sou molt majos!

*A la gent bacán de Xile, en especial a Ale, per ser la Sandra xilena, a Mariel per cuidar-me com una filla més, a Fran i Nacho per passejar-me i a Simón per alegrar-me. A Caro per portar-me de carrete i a José i Ximena per ser tant bons amfitrions.*

*A totes les bambolles generades des de la pandèmia, perquè no tot és treballar, i sense els seus ànims i suport tampoc estaria ací.*

*A Miquel, quina sort trobar-te, gràcies per entendre que fer muixerangues no li agrada a tots els valencians, per presentar-me a Teresa, que l'adore, Ane i matemàtics diversos, sense vatros la pandèmia no haguere sigut tant divertida.*

*Als amics que a pesar de la distància els veig més que a la meua família, a Roger, gràcies per les visites a deshora compensades en mescal i pijames, a Marc pels sopars improvisats i deixar-nos disfrutar de la filharmònica d'Amsterdam. A Laura, per ser tant autèntica i divertida. A Vero i Àngel, perquè encara que passe el temps l'estima, complicitat i comprensió que tenim no s'acaba, sé que tinc casa i família a Tenerife i Alacant, i vatros allà on estigue.*

*A Ana, de lo milloret que m'emporte del màster, amiga de veritat, gran consellera, generosa com ningú, disposada a tot, sensata i conseqüent com la que més. Gràcies per presentar-me a Isa, Pili, Paola, Jose, Quique, Sergi, Ot i Tripi, Quina colla! I quines festes al Carmel!*

*Als amics del poble que anem sempre al nostre rollo, els meus Xerokis del cor, Ferran, Jesús, Asier, Xavi, Toni, esteu com una col, sou fantàstics. A Vanessa, per retrobar-nos anys després i vore que al final no érem tant diferents. A Bego i Mònica, perquè la pinya és molta pinya. I a Isaac i per estar sempre ahí.*

*A Blanca, gràcies per descobrir-me l'amor per la lectura, per tots els moments que hem compartit, per tot lo que m'has ensenyat a tots els nivells. Eres una de les persones més divertides, interessant i intel·ligents que he conegut mai, aixina que espere que trobes ràpid la fórmula del formatge sense lactosa, t'estime infinit xurri!. Al Pere, per passejar-nos a totes i deixar-nos ta casa com si fos nostra, si eixe terrat poguere parlar...*

*A Aina, la meua dona, no sé perquè no estem casaes. Gràcies per la teua intel·ligència emocional, per la teua comprensió, per ensenyar-me tant i no jutjar, per acompanyar-me a atres continents, per cuidar-me i per compartir l'estil de vida cocaine chic, per pintar-me les ungles 7 días i fer el punki en placetes. Realment, soc molt feliç quan fem birres i ens contem les penes que al final no ho són.*

*A la meua família, als meus pares que sempre m'han recolzat en tot, a la meua germana per alimentar-me i per ser un referent de què per molts palos que te done la vida sempre te pots reinventar i eixir endavant. A les bruixes de la meua família, i als meus auelos que me diuen que a vore quan acabe d'estudiar, que ja estarà bé.*

*A Barcelona, als Sounds Systems, als vermuts, a les birres, al hand poke, al ioga, a la guitarra a ratos, als llibres, als patins, a les meues plantes, a Dua Lipa i la música disco, al mambo, i a totes les coses que m'han fet feliç i m'han permès acabar la tesi sense tornar-me boja.*

*Aquesta tesi va dedicada a les dones de la meua vida que són les que realment han estat ahí d'una manera o un altra, a Sandra, Marta, Marta I., Cris, Sara, Geno, Ana, Blanca, Aina, ma mare, la meua germana, les meues aueles, no és la tesi que m'imaginave, però és la que m'ha eixit.*

*Novembre del 2022,  
Barcelona.*

## Contingut

<b>ABREVIACIONS</b> .....	1
<b>RESUM DE LA TESI</b> .....	5
<b>SUMMARY OF THE THESIS</b> .....	7
<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	11
1. Aigua i Salut.....	11
1.1. Impacte del canvi climàtic sobre la qualitat de l'aigua .....	12
1.2. Contaminació fecal de l'aigua .....	14
1.3. Principals virus humans contaminants d'aigua .....	16
1.4. Virus emergents .....	21
1.5. Epidemiologia basada en aigües residuals.....	22
2. Control de la qualitat de l'aigua i de la contaminació viral .....	24
2.1. Regulacions i normatives .....	24
2.2.1. Regulacions i normatives a nivell global .....	24
2.2.2. Regulacions i normatives espanyoles.....	25
2.2.3. Microorganismes indicadors per al control de la contaminació fecal .....	27
3. Mètodes per concentrar i detectar virus a l'aigua.....	31
3.1. Mètodes de concentració .....	33
3.2. Ús de controls de procés per a la caracterització de mètodes ..	39
4. Tractaments de reutilització d'aigües i desinfecció .....	43
4.1. Mètodes clàssics de desinfecció .....	44
4.2. Tractaments de desinfecció d'aigua a nivell domiciliar .....	51
4.3. Processos d'electro-oxidació avançada per la desinfecció d'aigües .....	52
5. Virus model seleccionats.....	57
<b>2. OBJECTIUS</b> .....	61
<b>3. INFORME DELS ARTICLES</b> .....	65
3.1. LLISTAT D'ARTICLES INCLOSOS A LA TESI .....	65
3.2. INFORME DE COAUTORIA .....	66

3.3. INFORME SOBRE ELS FACTORS D'IMPACTE .....	68
<b>4. ARTICLES .....</b>	<b>71</b>
4.1. VirWaTest, UN MÈTODE PER A LA DETECCIÓ DE VIRUS EN MOSTRES D'AIGUA EN EL PUNT D'ÚS.....	71
4.2. AVALUACIÓ D'UN MÈTODE DE CONCENTRACIÓ DE VIRUS BASAT EN ULTRAFILTRACIÓ I ELUCIÓ D'ESCUMA HUMIDA (WET FOAM ELUTION) A PARTIR DE MOSTRES D'AIGUA DE GRAN VOLUM .....	85
4.3. AVALUACIÓ DE DOS MÈTODES RÀPIDS BASATS EN ULTRAFILTRACIÓ PER A LA CONCENTRACIÓ DE SARS-COV-2 A PARTIR D'AIGÜES RESIDUALS.. .....	99
4.4. AVALUACIÓ DE L'EFICIÈNCIA DE DESINFECCIÓ DE PATÒGENS DE L'OXIDACIÓ ELECTROQUÍMICA AVANÇADA PER CONVERTIR-SE EN UNA TECNOLOGIA SOSTENIBLE PER A LA REUTILITZACIÓ DE L'AIGUA .....	101
<b>5. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>149</b>
<b>6. CONCLUSIONS.....</b>	<b>165</b>
<b>7. REFERÈNCIES.....</b>	<b>169</b>
<b>8. ANNEXOS .....</b>	<b>188</b>

## ABREVIACIONS

**ADN** Àcid desoxiribonucleic (de l'anglès "Desoxirribonucleic Acid")

**ADS** Seqüenciació massiva d'amplicons (de l'anglès "Amplicon Deep Sequencing")

**AdV** Adenovirus

**ARN** Àcid ribonucleic (de l'anglès "Ribonucleic Acid")

**BDD** Diamant dopat amb bor (de l'anglès, "Boron Doped Diamond")

**BKPyV** Poliomaviurs BK (de l'anglès "BK Polyomavirus")

**BOE** Butlletí Oficial de l'Estat

**CDC** Centre per al control i prevenció de malalties (de l'anglès, "Center of Disease Control")

**CEPAL** Comissió Econòmica per a Amèrica Llatina i el Carib

**CeUF** Ultrafiltració centrífuga (de l'anglès, "Centrifugal Ultrafiltration")

**CG** Còpies genòmiques

**CoV** Coronavirus

**CT** Concentració de desinfectant pel temps aplicat

**CVB5** Cocksackie virus B5

**DALYs** Pèrdua tolerable d'anys de vida ajustats a la discapacitat (de

l'anglès "Disability Adjusted Life Years")

**DEUF** Ultrafiltració sense sortida (de l'anglès "Dead-end Ultrafiltration")

**DMA** Directiva Marc de l'Aigua

**DSA** Ànode dimensionalment estable (de l'anglès "Dimensionally Stable Anode")

**dsDNA** ADN bicatenari (de l'anglès "single strand DNA")

**dsRNA** ARN mono-catenari (de l'anglès "single strand RNA")

***E. coli*** *Escherichia coli*

**EAOP** processos electroquímics avançats (de l'anglès "Electrochemical Advanced oxidation processes")

**EDARs** Estacions depuradores d'aigües residuals

**EO** Electrooxidació

**EPA** Agència de Protecció Ambiental (de l'anglès "Environmental Protection Agency")

**et al.** I col·laboradors

**EUA** Estats Units d'Amèrica

**EV** Enterovirus

**FIB** Indicador de contaminació fecal bacteriana (de l'anglès "Faecal Indicator Bacteria")

## Abreviacions

**HAdV** Adenovirus humà (de l'anglès "Human adenovirus")

**JCPyV** Poliomavirus JC (de l'anglès "JC Polyomavirus")

**Kb** Quilo-bases

**kDa** Quilo-Dalton

**kWh/m<sup>3</sup>** Kilowatts hora metre cúbic

**LRV** Valor de reducció logarítmica (de l'anglès, "Log Reduction Value")

**MERS** Coronavirus de la síndrome respiratòria de l'Orient Mitjà (de l'anglès "Middle East respiratory syndrome")

**MgV** Mengovirus

**MHV** Virus de l'hepatitis murina (de l'anglès, "Murine Hepatitis Virus")

**min** Minuts

**mJ/cm<sup>2</sup>** Mili joules centímetre quadrat

**MNV** Norovirus murí (de l'anglès "Murine norovirus")

**MPC** Control de procés molecular (de l'anglès "Molecular Process Control")

**MST** Traçar la font de microorganismes (de l'anglès "Microbial Source Tracking")

**NoV** Norovirus

**ODS** Objectius de Desenvolupament Sostenible

**OMS** Organització Mundial de la Salut

**PAA** Àcid paracètic

**PCR** Reacció en cadena de la polimerasa (de l'anglès "Polymerase Chain Reaction")

**PFU** Unitats Formadores de placa (de l'anglès "Plaque Forming Units")

**pH** Potencial hidrogeniònic

**pI** punt isoelèctric

**Ppb** Parts per bilió

**Ppm** Parts per milió

**PSA** Plans de Seguretat de l'Aigua

**q(RT)PCR** PCR de transcripció inversa quantitativa en temps real (de l'anglès "Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR")

**QMRA** Anàlisi quantitativa del risc microbià (de l'anglès "Microbial Risk Assessment")

**qPCR** Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa (de l'anglès "quantitative polymerase chain reaction")

**RCA** República Centreafricana

**RCS** Espècies reactives de clor (de l'anglès "Reactive Chlorine Species")



**ROS** Espècies reactives d'oxigen (de l'anglès "Reactive Oxygen Species")

**RoV** Rotavirus

**SARS** Síndrome agut respiratori sever (de l'anglès "Severe Acute Respiratory Syndrome")

**SD** Desviació estàndard (de l'anglès "Standard deviation")

**spp.** espècie

**ssDNA** ADN monocatenari (de l'anglès "single strand DNA")

**TES** Seqüenciació amb enriquiment de dianes (de l'anglès "Target Enrichment Sequencing")

**TuV** Tulane Virus

**UC** Ultracentrifugació

**UE** Unió Europea

**UF** Ultrafiltració

**UFC** Unitats Formadores de Colònies

**UN** Nacions Unides (de l'anglès "United Nations")

**UV** Radiació ultraviolada

**VIRADEL** Adsorció i elució de virus (de l'anglès VIRAl Adsorption and ELution)

**WBE** Epidemiologia basada en aigües residuals (de l'anglès "Wastewater Based Epidemiology")

**WHO** Organització mundial de la salut (de l'anglès "World Health Organization")

**WPC** Control de procés complet (de l'anglès "Whole Process Control")



## RESUM DE LA TESI

Arrel de la necessitat de garantir la disponibilitat d'aigua en un context d'escassetat i assegurar-ne un bon ús que no suposi un risc microbiològic per la població, aquesta Tesi Doctoral ha estat centrada en l'optimització, el desenvolupament i la validació de noves tècniques pel control de virus contaminants d'aigua.

Per una banda, s'han optimitzat i desenvolupat mètodes ràpids, sensibles, metodològicament senzills i adaptables per a la concentració i detecció *in situ* de virus en diferents contextos; i per una altra, s'ha avaluat l'aplicabilitat i eficiència de desinfecció dels sistemes electroquímics d'oxidació avançada com a tractaments sostenibles per a la reutilització d'aigües.

Pel que respecta a mètodes de concentració d'aigua per a la detecció de virus, en primer lloc s'ha adaptat el mètode de floculació orgànica amb llet descremada perquè sigui aplicable a contextos de baixa renda donat el seu baix cost econòmic, o a situacions d'emergència humanitària en què no es disposi d'un laboratori equipat, a més l'equipament s'ha adaptat perquè no es requereixi de corrent elèctrica. Aquest mètode, ha estat validat en dos contextos reals, un camp de refugiats ubicat a Banghi (República Centreafricana) i a la zona de Pedernales (Equador) afectada per un terratrèmol. El mètode i protocol desenvolupats, van demostrar ser metodològicament senzills per tal de ser duts a terme per usuaris no experts, demostrant ser un mètode eficient detectant contaminació viral en les mostres d'aigua testades, podent ser una eina útil en la prevenció de brots vírics en els països amb menys recursos, els quals són els més afectats per les malalties de transmissió hídrica donades les limitacions existents de sanejament de l'aigua.

La resta de mètodes de concentració avaluats, estan basats en l'ús d'ultrafiltres per a la detecció de virus en aigua. Per una banda, s'ha caracteritzat un mètode ràpid per a l'anàlisi de grans volums d'aigua en aigües superficials i aigua de mar, aplicant la nova tecnologia d'elució d'escuma humida amb la que es redueix el temps de processat de la mostra així com la simplificació metodològica del mètode. A més, s'ha adaptat perquè sigui realitzable en el mateix punt de presa de la mostra, sent validat en dos contextos diferents, un on es va realitzar la concentració completa de mostres *in situ*, i l'altre on es va realitzar la filtració i posterior enviament del filtre al laboratori per a la seva anàlisi, demostrant la versatilitat del mètode. Finalment, el mètode es va optimitzar amb un segon pas de concentració utilitzant un dispositiu d'ultrafiltració centrífuga (Centricon® Plus-70) per tal

## Resum de la tesi

d'augmentar-ne la sensibilitat. El mètode ha estat testat mitjançant diverses tècniques, permetent la detecció de virus mitjançant mètodes tan d'infectivitat com moleculars, incloent la detecció per qPCR i tècniques de seqüenciació massiva, com són l'enriquiment per dianes i posterior seqüenciació massiva d'amplicons.

Amb l'arribada de la pandèmia de la COVID-19, i arrel de l'escassetat de subministraments de material necessaris per a l'anàlisi del SARS-CoV-2 en aigües residuals, es van caracteritzar dos mètodes ràpids de concentració d'aigües residuals per la detecció de virus embolcallats. Així doncs, es va validar un dispositiu d'ultrafiltració centrífuga (Centricon® Plus-70) i la pipeta concentradora automatitzada CP-Select™, com a mètodes ràpids, i el cas de la pipeta concentradora, factible per a treballar en vitrines de bioseguretat. Validant així, mètodes d'anàlisi d'aigües residuals perquè puguin ser implementats en laboratoris d'anàlisi rutinaris sense requerir de personal altament especialitzat.

En la segona part de la tesi, s'ha avaluat l'aplicabilitat i eficiència de desinfecció dels sistemes electroquímics d'oxidació avançada com a tractaments sostenibles per a la reutilització d'aigües, testant dos tipus de materials, un ànode de Ruteni i un ànode de BDD en matrius naturals. Els assajos realitzats, han estat centrats en la inactivació de microorganismes patògens amb un focus especial en els virus, així com en l'avaluació de la idoneïtat dels microorganismes índex utilitzats clàssicament en els tractaments de desinfecció, la determinació dels subproductes tòxics i els requeriments energètics del sistema. Amb tot, s'ha demostrat que els sistemes electroquímics poden ser aplicats com a pas final de desinfecció d'aigües naturals, encara que els microorganismes índex han de ser revisats, donada la major sensibilitat de bacteris i bacteriòfags, en relació a altres microorganismes, però demostrant ser efectius per tal d'assolir un logaritme de reducció de virus humans amb baixos requeriments energètics, tenint potencial per ser sistemes descentralitzats de depuració d'aigües, tot i que han de ser adaptats per evitar la formació de subproductes tòxics.

## SUMMARY OF THE THESIS

Given the need to guarantee the availability of water in a context of scarcity and ensure a good use that does not pose a microbiological risk to the population, this Thesis has been focused on developing and validating new techniques for the control of viruses contaminants of water.

Firstly, fast, sensitive, methodologically simple, and adaptable methods have been developed for their application in situ for the detection of viruses in different contexts; and secondly, the applicability and disinfection efficiency of advanced oxidation electrochemical systems have been evaluated as sustainable treatments for water reuse.

Regarding the development of water concentration methods for the detection of viruses, in the first place the skimmed milk organic flocculation method has been adapted so that it is applicable to low-income situations given its low economic cost, or to situations of a humanitarian emergency in which there is no equipped laboratory, in addition, the equipment has been adapted so that no electricity is required. This method has been validated in two real contexts, a refugee camp located in Banghi (Central African Republic) and in Pedernales (Ecuador) affected by an earthquake. The method and protocol developed proved to be methodologically simple to be carried out by non-expert users, proving to be an efficient method for detecting viral contamination in the tested matrices, being a useful tool in the prevention of viral outbreaks in countries with fewer resources, which are the most affected by water-borne diseases given the lesser sanitation of the water sources.

The rest of the concentration methods evaluated are based on the use of ultrafilters for the detection of viruses in water. Firstly, a fast method has been characterized for the analysis of large volume water samples in surface water and seawater, applying the new wet foam elution technology with which the processing time of the sample is reduced as well as the methodological simplification of the method. In addition, it has been adapted so that it can be carried out at the same sampling point, being validated in two different contexts, one where the complete concentration of samples was carried out in situ, and the other where the filtration was carried out and later sending the filter to the laboratory for analysis, demonstrating the versatility of the method. Finally, the method was optimized with a second concentration step using a centrifugal ultrafiltration device (Centricon® Plus-70) to increase sensitivity. The method has been tested using various techniques, allowing the

## Summary of the thesis

detection of viruses using infectivity and molecular techniques, including detection by qPCR and new generation sequencing techniques, such as target enrichment and amplicon deep sequencing.

With the advent of the COVID-19 pandemic, and due to the shortage of material supplies necessary for the analysis of SARS-CoV-2 in wastewater, two rapid methods of wastewater concentration were characterized for the detection of enveloped viruses. Thus, a centrifugal ultrafiltration device (Centricon® Plus-70) and the CP-Select™ automated concentrator pipette were validated as fast methods, methodologically simple and in the case of the concentrator pipette, allowing to work under biosafety conditions. Thus, wastewater analysis methods have been validated, so they can be implemented in routine analysis laboratories without requiring highly specialized personnel.

In the second part of the thesis, the applicability and disinfection efficiency of advanced oxidation electrochemical systems have been evaluated as sustaining treatments for water reuse, testing two types of materials, a Ruthenium anode, and an anode of BDD in natural matrices. The disinfection trials carried out have been focused on the inactivation of bacteria, viruses, bacterial spores and protozoa, as well as on the evaluation of the suitability of the index microorganisms classically used in disinfection treatments, the determination of toxic by-products and energy requirements of the system. The main results of these studies have shown that electrochemical systems can be applied as a final step in the disinfection of natural waters, although the index microorganisms must be reviewed, given the greater sensitivity of bacteria and bacteriophages, but proving to be effective to achieve a one logarithm reduction of virus with low energy requirements, having the potential to be implemented as decentralized water purification systems, although they must be adapted to avoid the formation of toxic by-products.

The background is a vibrant, abstract composition of thick, expressive brushstrokes. The color palette is diverse, featuring shades of magenta, cyan, blue, green, and white. The strokes are layered and textured, creating a sense of movement and depth. The overall effect is reminiscent of a modern, expressive painting or digital artwork.

# **INTRODUCCIÓ**





# 1. INTRODUCCIÓ

## 1. Aigua i Salut

L'any 2010, l'Assemblea de les Nacions Unides (UN) va reconèixer explícitament el dret humà a l'abastament i sanejament de l'aigua. Això es tradueix en què l'aigua ha d'estar disponible de forma continuada, salubre, físicament accessible, assequible i de qualitat acceptable, per a l'ús personal i domèstic ja que, la millora en el proveïment i en la gestió dels recursos hídrics millora la salut de la població, impulsa el creixement econòmic dels països i contribueix a la reducció de la pobresa (UN 2010).

Segons dades de l'Organització Mundial de la Salut (OMS), l'any 2020 el 74% de la població mundial (5.800 milions de persones) tenia accés a un subministrament segur d'aigua. Tanmateix, 2.300 milions pateixen escassetat d'aigua, abastint-se de fonts contaminades fecalment, la qual cosa implica la presència de contaminació microbiana. L'ús de fonts d'aigua contaminada microbiològicament implica un risc per a la salut i la transmissió de malalties (Figura 1). Així doncs, s'estima que 829.000 morts anuals són degudes a diarrea causada per la insalubritat de l'aigua, dels quals, 178.000 corresponen a menors de 5 anys (WHO 2022).

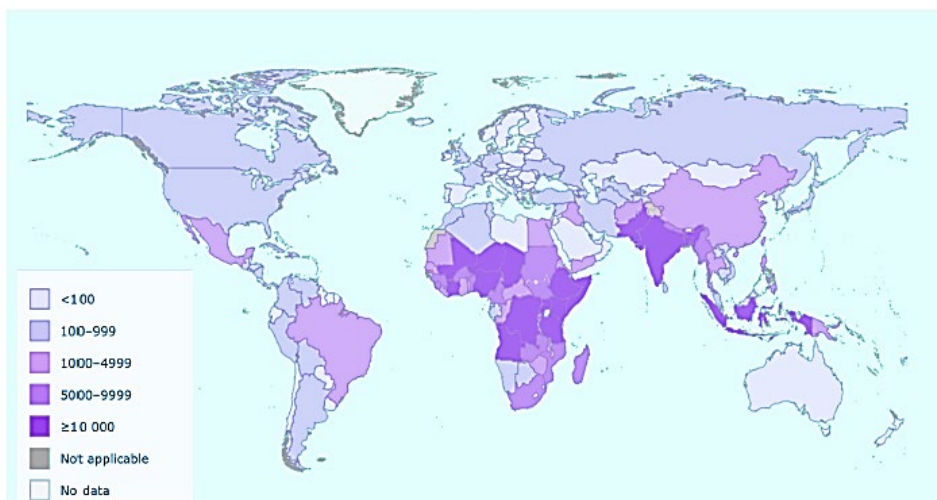


Figura 1. Proporción de la població que no utilitza serveis de sanejament gestionats de manera segura (IHME, Global Burden of Disease, 2019).

Les perspectives de futur indiquen que la situació actual empitjorarà arrel del canvi climàtic i de l'augment de la població (Rossati, 2017). Així, l'Organització Meteorològica Mundial estima que l'any 2025 dues de cada tres persones sofriran restriccions en l'abastiment de l'aigua, mentre que les Nacions Unides consideren que l'any 2050, una de cada quatre persones viurà en un país amb problemes crònics d'escassetat d'aigua. Com a conseqüència, algunes alternatives a l'abastament d'aigua estant guanyant protagonisme, com la reutilització de les aigües residuals destinades per al reg, fent possible la recuperació de recursos com són l'aigua, nutrients i energia. No obstant, la reutilització d'aigües implica un risc associat per a la salut, per la qual cosa és necessària una gestió adequada per assegurar-ne la seva qualitat i quantitat. L'OMS recomana un seguit d'accions clau per a millorar l'accés a l'aigua a nivell global (WHO, 2017). Entre elles destaquen la necessitat de dur-ne a terme una gestió segura, mitjançant la implementació de regulacions que considerin els riscos locals de cada regió, el desenvolupament de mètodes de monitoreig i seguiment dels riscos, la minimització de la contaminació de l'aigua mitjançant l'aplicació de sistemes de tractament multi-barrera i la prevenció de la recontaminació durant la distribució, emmagatzematge i manipulació (WHO 2022). Seguint aquestes mesures, es podrien assolir en certa manera els Objectius de Desenvolupament Sostenible (ODS) proposats per les Nacions Unides per l'any 2030, més concretament l'objectiu 6: Garantir la disponibilitat d'aigua i la seva gestió sostenible per a tothom.

### 1.1. Impacte del canvi climàtic sobre la qualitat de l'aigua

Donat l'augment en nombre i intensitat d'esdeveniments climàtics extrems, hi ha una creixent preocupació sobre com el canvi climàtic podria afectar la salut pública. Els canvis climàtics accelerats ja estan afectant la salut humana, en part, alterant l'epidemiologia dels patògens sensibles al clima (Mirzaei et al., 2016), i facilitant la disseminació d'alguns virus a noves regions geogràfiques (Wigginton et al., 2015). Per una banda, la dinàmica epidemiològica de les malalties oportunistes està profundament impulsada per la variabilitat ambiental (Anttila et al., 2015; Shamkhali Chenar and Deng, 2017). Per exemple, l'augment de la temperatura i el nivell del mar han donat lloc a l'augment de malalties infeccioses relacionades amb toxines transmeses per l'aigua com són el còlera i les intoxicacions per marisc. L'augment de la temperatura en certes regions, esdevé en nous nínxols ecològics per a vectors de malalties com són els mosquits i paparres (Rossati, 2017). Hi ha estudis que relacionen canvis climàtics ràpids en regions concretes amb brots de grip aviària (H5N1). A nivell mundial, els augments exponencials dels brots de grip

aviària no són només una qüestió de mutacions casuals en els virus de la grip, sinó també el resultat de factors socials i ambientals (Canavan, 2019).

D'altra banda, l'augment en la intensitat i freqüència del desastres naturals derivats del canvi climàtic, com són les inundacions, tsunamis, terratrèmols, ciclons tropicals (per exemple, huracans i tifons) i tornados, també estan associats amb malalties infeccioses, incloent malalties diarreiques, infeccions respiratòries agudes, malària, leptospirosi, xarampió, dengue, hepatitis, febre, meningitis, així com tètanus i mucormicosi cutània, sent els països de baixa renda els més afectats (Kouadio et al., 2012).

Episodis de pluges extremes i inundacions mobilitzen patògens dispersant-los per l'ambient en breus períodes de temps, generant una important escorrentia superficial o un increment de la infiltració que arrossega els microorganismes fins a punts de captació d'aigües. A més, l'abocament d'aigües residuals és comú sobretot en episodis de precipitacions intenses, quan els sistemes de clavegueram no poden assumir tot el volum d'aigua d'entrada i per tal de protegir els sistemes de depuració d'aigües, mitjançant sobreexidors, aboquen l'aigua residual directament fora de la xarxa (Farkas et al., 2018; Hata et al., 2014).

Com a conseqüència, s'estan utilitzant models matemàtics per estimar la càrrega global d'algunes malalties infeccioses com a resultat del canvi climàtic. Segons els models, l'any 2030 s'esperen un 10% més de malalties diarreiques, que afecten principalment els nens petits, i si la temperatura global augmenta entre 2 i 3 °C, com s'espera, la població amb risc de patir malària podria augmentar entre un 3% i un 5% (Rossati, 2017).

Per tant, l'estudi del paper que juguen els esdeveniments climàtics en la distribució de malalties transmiseses per l'aigua, tenint en compte les diferències regionals, podria ser clau per desenvolupar noves mesures de prevenció (Gullón et al., 2017; Shamkhali Chenar and Deng, 2017).

Els desastres naturals i les malalties infeccioses continuaran sent una amenaça global i tindran un gran impacte en el desenvolupament dels països. Per la qual cosa, s'han de reforçar els sistemes nacionals de vigilància i l'establiment de protocols de gestió de la informació sanitària. En situacions de desastre, l'educació sobre la higiene i el rentat de mans, el subministrament de quantitats adequades d'aigua segura, les instal·lacions de sanejament i un refugi adequat són molt importants per a la prevenció de les malalties infeccioses (Kouadio et al., 2012).

## Introducció

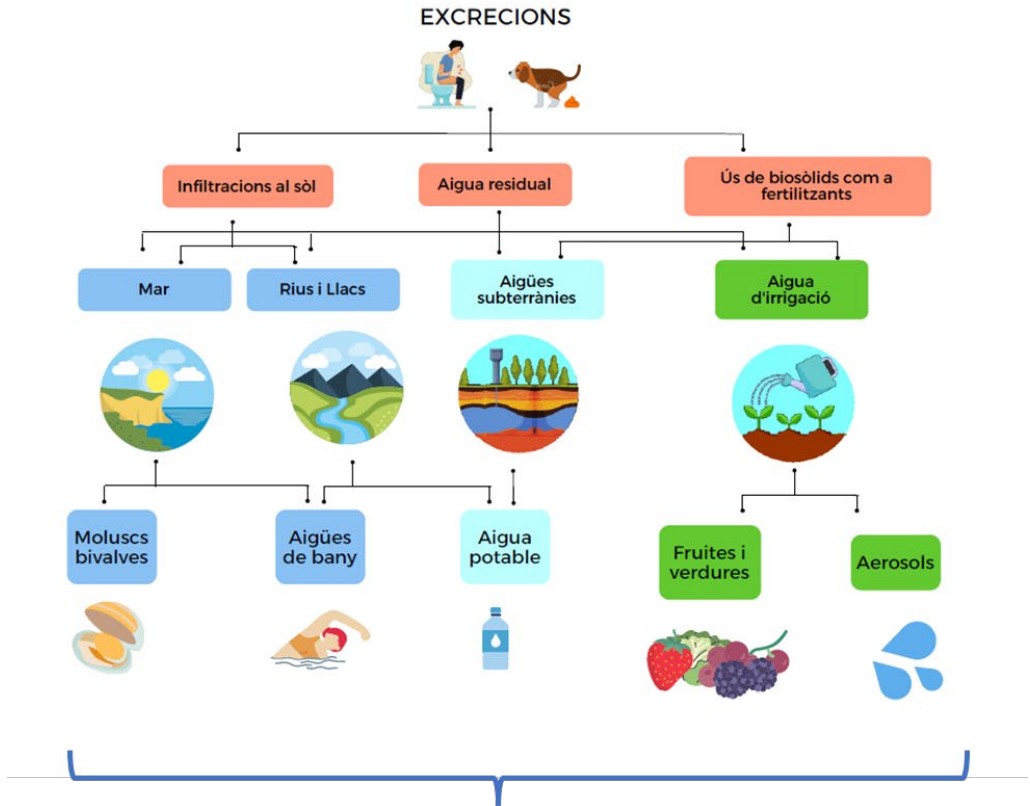
### 1.2. Contaminació fecal de l'aigua

La contaminació fecal és la principal font de la contaminació microbiològica de l'aigua, ja sigui d'origen humà o animal. La femta i l'orina presenten microorganismes patògens que suposen un risc per la població si aquests arriben a les diferents fonts d'aigua.

Les fonts de contaminació poden classificar-se segons si el seu origen és puntual o d'origen difós. Tot i que els microorganismes patògens poden estar presents de manera natural en ambients aquàtics, s'introdueixen més freqüentment com a resultat d'activitats humanes, ja sigui de forma directa a causa de la defecació d'animals de ramaderia al sòl o a les aigües superficials o a través de vies com són les fuites de clavegueres i sistemes sèptics, l'escorrentia urbana, l'escorrentia agrícola i l'escorrentia de fems d'animals utilitzats a l'agricultura com a fertilitzants (Farkas et al., 2020; Hata et al., 2014; Jurado et al., 2019).

Així doncs, tenint en compte els diferents usos de l'aigua, com ara l'aigua de beguda, necessitats domèstiques, usos recreatius, i usos agrícoles, inclòs el regadiu, la producció d'aliments i els animals de granja, el seu ús o consum pot suposar un risc per als humans si les fonts d'aigua (per exemple, aigües subterrànies, aigua de mar, etc.) o aigües superficials estan contaminades amb aigües residuals (Fong et al., 2010; Lowther et al., 2012; Sinclair et al., 2009).

Donat que les diferents vies de transmissió pels quals els patògens poden arribar a l'ambient són diverses i en la majoria dels casos l'aigua és el seu vehicle, quan el sanejament de l'aigua i la higiene són escasses, l'aigua de beguda, els aliments contaminats o les mans, són les vies més importants de transmissió dels patògens hídrics comunament transmesos per la via fecal-oral. A banda, les malalties transmeses per l'aigua poden ser causades per una gran varietat de microorganismes, pertanyents fonamentalment a 3 grans grups taxonòmics: Bacteris, virus, o protozous. De simptomatologia variada, aquests poden transmetre's a la població a través de l'aigua contaminada mitjançant la ingestió (via gastrointestinal), inhalació (via respiratòria) o a través del contacte de la pell, mucoses, ferides i ulls. La Figura 2 agrupa les diferents vies de transmissió a la població dels principals patògens relacionats amb l'aigua.



## VIES DE TRANSMISSIÓ

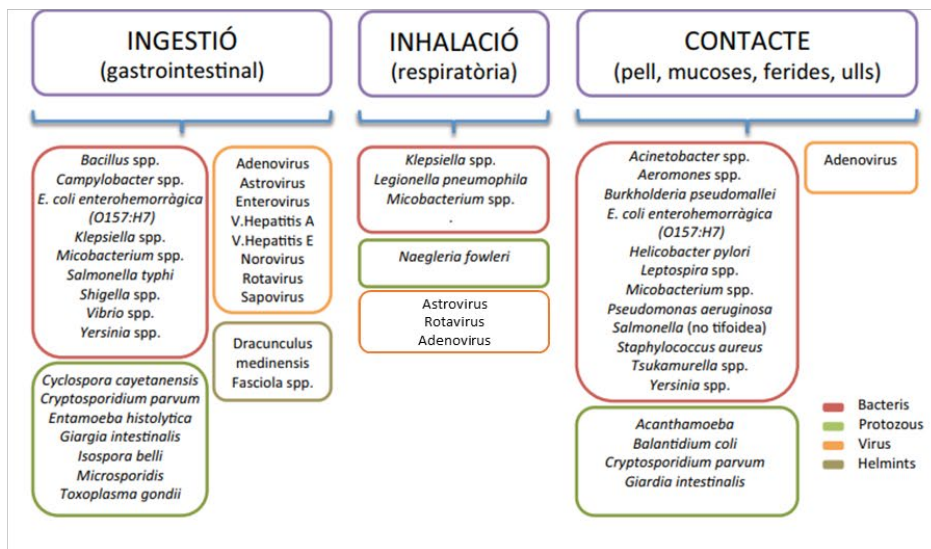


Figura 2. Vies de transmissió d'agents patògens relacionats amb l'aigua.  
Adaptada de Rusiñol, 2014

## Introducció

### 1.3. Principals virus humans contaminants d'aigua

Tot i que una gran varietat de microorganismes poden causar malalties transmeses per l'aigua, el virus representen la primera causa de gastroenteritis no bacterianes al món (Shamkhali Chenar and Deng, 2017) i estant relacionats a més, amb moltes altres síndromes clíniques. La majoria dels virus contaminants d'aigua i aliments, es caracteritzen per l'absència d'embolcall lipídic que fa que siguin altament estables al medi ambient, fent-los capaços de resistir a condicions adverses durant llargs períodes de temps (Rzezutka and Cook, 2004). A més, les estacions depuradores d'aigües residuals (EDARs) sovint no són eficients en l'eliminació per complet de contaminants vírics, ja que els tractaments de desinfecció clàssicament utilitzats estan dirigits a l'eliminació de paràmetres químics i bacterians. Així doncs, s'ha descrit repetidament la presència de contaminació vírica en efluent d'EDARs arreu del món, fet que pot suposar un risc microbiològic, ja que tot i estar diluïts en l'ambient, els virus solen tenir una baixa dosi infecciosa (10-100 partícules víriques de Norovirus poden causar infecció) (Farkas et al., 2020; Thebault et al., 2013).

La simptomatologia més comuna dels virus transmesos per aigua i aliments solen ser gastroenteritis auto-limitants, encara que depenent de l'agent etiològic també poden provocar hepatitis, infeccions respiratòries, i conjuntivitis, i en grups de risc com els nens, dones embarassades i persones immuno-suprimides poden produir complicacions més greus com meningitis, encefalitis, paràlisis, desordres neurològics, avortaments o fins i tot la mort. Tot i que, en tots els casos l'evolució de la infecció dependrà de varis factors com són la via de transmissió, la dosi infecciosa, l'edat, l'estat immunològic del pacient i de la disponibilitat d'accedir a assistència sanitària (Koopmans and Duizer, 2004).

Els virus més importants contaminants d'aigua i aliments estan descrits a la Taula 1, inclouen famílies amb genoma ADN i famílies amb genoma d'ARN.

Taula 1. Característiques dels principals grups de virus contaminants d'aigua

Família (genoma, mida)	Gènere	Nom comú	Transmissió	Malaltia associada
	<i>Enterovirus</i>	Enterovirus humans (A-D)	Fecal-oral o respiratori	Gastroenteritis, malaltia boca-mà-peu, encefalitis, meningitis, conjuntivitis, poliomielitis, paràlisis
<i>Picornaviridae</i> ssRNA 28-30 nm	<i>Kobuvirus</i>	Aichivirus	Fecal-oral	Gastroenteritis
	<i>Parechovirus</i>	Parechovirus	Fecal-oral o respiratori	Gastroenteritis, infeccions respiratòries, miocarditis, encefalitis, hepatitis
	<i>Hepatovirus</i>	Virus de la hepatitis A	Fecal-oral	Hepatitis aguda
<i>Astroviridae</i> ssRNA 28-30 nm	<i>Mamastrovirus</i>	Astrovirus	Fecal-oral	Gastroenteritis, principalment en nens
<i>Calciviridae</i> ssRNA 27-38 nm	<i>Norovirus</i>	Norovirus	Fecal-oral	Gastroenteritis
	<i>Saprovirus</i>	Saprovirus	Fecal-oral	Gastroenteritis
<i>Hepeviridae</i> ssRNA 25-34 nm	<i>Hepevirus</i>	Virus de la hepatitis E	Fecal-oral Zoonosi	Hepatitis aguda, greu en dones embarassades (G1 i G2) Problemes neurològics en gent gran i immunosuprimits (G 3)

## Introducció

<i>Reoviridae</i> dsRNA 70-75 nm	<i>Rotavirus</i>	Rotavirus	Fecal-oral	Gastroenteritis freqüent en individus joves i vells
<i>Parvoviridae</i> ssDNA 26-28 nm	<i>Bocaparvovirus</i>	Bocavirus	Respiratori, aerosols	Gastroenteritis i malalties respiratòries
<i>Polyomaviridae</i> dsDNA 50-60 nm	<i>Polyomavirus</i>	Poliomavirus	Fecal-oral o respiratori	BKPyV: Nefropaties , infeccions respiratòries, cistitis JCPyV: Leucoencefalopatia multifocal progressiva MCPyV: Associats al carcinoma de cèl·lules Merkel
<i>Adenoviridae</i> dsDNA 90-100 nm	<i>Mastadenovirus</i>	Adenovirus (A-G)	Fecal-oral o respiratori	Gastroenteritis, conjuntivitis, malalties respiratòries, cistitis

### 1.3.1. Adenoviridae

Els adenovirus humans (HAdV), pertanyen a la família *Adenoviridae*, consistint en almenys 51 serotips, s'han definit i classificat en sis espècies diferents (A–F) sota el gènere *Mastadenovirus* (Kuo et al., 2010). De doble cadena d'ADN (dsADN), són virus no embolcallats d'una mida entre 70 i 100 nm, amb un genoma de 36-37 kb.

Estan implicats en malalties de diversa severitat, incloent gastroenteritis moderades, infeccions respiratòries o oculars (Lynch and Kajon, 2016). Al voltant del 60% de les infeccions tenen lloc en nens menors de 4 anys, on aproximadament el 50% són asimptomàtiques. La seva transmissió depèn del serotip (Hunter 1997). Els serotips HAdV40 i HAdV41, transmesos per la via fecal-oral, són un dels principals agents causants de gastroenteritis en nens petits, amb una incubació de 3 a 10 dies, provoca una diarrea aquosa, sent excretats en concentracions molt elevades (Haramoto et al., 2007).

Els adenovirus s'han proposat com a indicadors de la contaminació viral fecal per la seva prevalença, ja que poden ser excretats durant mesos o anys en femtes sense produir símptomes clínics, per la seva especificitat d'hoste i estabilitat a les aigües residuals humanes arreu del món (Bofill-Mas et al., 2006, Pina et al., 1998) i per la seva resistència a certs estressors ambientals i desinfectants, degut a l'alta estabilitat del seu genoma d'ADN de doble cadena en comparació amb els virus d'ARN (Ogorzaly et al., 2010; Thurston-Enriquez et al., 2005).



### 1.3.2. *Poliomaviridae*

*Polyomaviridae* és una família de virus petits, amb una mida d'entre 40 i 60 nm, sense embolcall, amb genomes dsDNA d'aproximadament 5.000 parells de bases. Es tracta d'una família de virus que infecta principalment mamífers i ocells. La majoria d'aquests virus són molt comuns i normalment asimptomàtics en la majoria de les poblacions humanes estudiades. Tanmateix, alguns membres són coneguts patògens humans, que causen infeccions simptomàtiques o càncer en el seu hoste natural (Moens et al., 2017). Pertanyent al gènere *Alfapoliomavirus*, el poliomavirus de cèl·lules de Merkel (MCPyV), està relacionat amb el carcinoma de cèl·lules de Merkel, un càncer de pell rar però agressiu. Mentre que els membres pertanyents al gènere *Betapoliomavirus*, com els poliomavirus humans BK i JC, produeixen infeccions ubiqües i persistents en individus sans, però en persones immunocompromeses poden provocar malalties clíniques. BKPyV pot causar nefropatia en pacients amb trasplantament renal, suggerint que té un paper en el càncer de pròstata. JCPyV s'associa amb la leucoencefalopatia multifocal progressiva, i pot estar implicat en càncer de còlon i cervell (Calvignac-Spencer et al., 2016).

A l'igual que els HAdV, són detectats al llarg de l'any en aigua amb contaminació fecal amb una elevada prevalença a totes les àrees geogràfiques estudiades. Per exemple, aquests virus es detecten en el 98% de les mostres d'aigua residual, per la qual cosa han estat proposats com a indicadors de la contaminació fecal d'origen humà (Bofill-Mas et al., 2000).

### 1.1.1. *Caliciviridae*

Els calicivirus són un grup divers de virus d'ARN de sentit positiu de mida petita 27-30 nm, amb simetria icosaèdrica, monocatenaris i que infecten humans i animals. Els gèneres de la família són *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus* i *Nebovirus*. Entre ells, el gènere *Norovirus* són causants de la major part de gastroenteritis no bacterianes associades a aigua i aliments, sobretot en fruits vermells i mol·luscs, i amb una marcada estacionalitat hivernal (Fields et al., 2013; Shamkhali Chenar and Deng, 2017).

Responsables de gastroenteritis autolimitants de 28-60 h (Glass et al., 2009), aproximadament un de cada cinc casos de gastroenteritis aguda és causada per norovirus, provocant al voltant de 685 milions de casos a l'any i més de 200.000 morts, dels quals 50.000 són nens en països de baixa renda (CDC, 2021). Donada la seva ubiqüitat, que tenen una dosi infecciosa molt baixa (entre 10 – 1000 partícules virals) (Teunis et al., 2008), i que són molt estables a l'ambient (poden romandre infecciosos durant llargs períodes de temps

## Introducció

inclús a pHs molts baixos (Duizer et al., 2004), els norovirus representen un dels patògens vírics més importants a nivell mundial.

Degut a mutacions i recombinació entre diferents fragments homòlegs d'ARN, el gènere presenta una elevada variabilitat genètica, subdividit en 5 genogrups i diversos serotips. Els genogrups GI, GII i GIV infecten específicament humans, encara que la majoria d'infeccions són causades pels genogrups GI i GII. Més concretament, el genotip GII.4 és el més freqüentment detectat en els brots causats a Europa i EUA, amb el 81,4% de brots associats a GII i 44,2% al GII.4 (CDC, 2021; Zheng et al., 2010).

La detecció de norovirus es realitza a través de mètodes moleculars ja que actualment no existeixen tècniques de cultiu cel·lular eficients per replicar-los a nivell de laboratori. Mentre que l'estudi de la seva estabilitat front a tractaments de desinfecció s'ha de realitzar mitjançant altres virus de característiques semblants (Cromeans et al., 2010). Entre els models més utilitzats trobem els bacteriòfags MS2 i ΦX174 i sobretot els norovirus murins (MNV) i Tulane virus (TV) degut a les seves similituds estructurals i genètiques (Farkas, 2015; Wobus et al., 2006).

### 1.1.2. Picornaviridae

Els *Picornaviridae* comprèn una de les famílies de virus més grans i importants, responsables d'una gran varietat de malalties en humans i animals amb grans repercussions econòmiques. La família *Picornaviridae* consisteix en virus d'ARN monocatenari de sentit positiu (+ssARN), sense embolcall, amb una mida de 30 nm. D'entre els picornavirus que afecten humans, molts enterovirus, es troben principalment a l'intestí a les vies respiratòries superiors mentre que els hepatovirus (virus de l'hepatitis A) es troben a l'intestí i fetge (Fields et al., 2013).

Pertanyent al gènere *Enterovirus*, els Coxsackievirus B5 (CVB5) provoquen malalties de simptomatologia variada. Inclouent mal de cap, febre, mal de coll, malestar gastrointestinal, fatiga extrema, dolor de pit i miàlgia així com la malaltia de mans peus i boca (Kimmis et al., 2018). La gravetat de la infecció varia en funció de l'edat de l'hoste i de l'estat immunològic, així com de la síndrome de malaltia que es presenta i del sistema d'òrgans atacat. El període d'incubació també varia dins de les símptomes, i la transmissió màxima es produeix durant les dues primeres setmanes de la infecció. Les infeccions són freqüents entre nadons i nens, encara que no hi ha cap vacuna específica ni teràpia antiviral (Tariq and Kyriakopoulos. 2012).

Donat que és un dels genotips més prevalents en aigües residuals (Torii et al., 2022) i que té una elevada resistència front als processos de desinfecció i que és fàcilment cultivable i quantificable mitjançant tècniques d'infectivitat, és un virus àmpliament utilitzat en assajos de desinfecció com a virus model de virus entèrics.

#### 1.4. Virus emergents

Els virus emergents o re-emergents són aquells que han aparegut recentment i/o que han incrementat la seva prevalença, patogenicitat o distribució geogràfica i/o que poden augmentar en un futur pròxim. Exemples de virus re-emergents són el cas del xarampió (Fraser-Bell, 2019) o la poliomielitis (Mbaeyi et al., 2021).

En el camp de la virologia ambiental, els virus sense embolcall, són els més abundants i comunament estudiats, ja que els virus embolcallats, generalment es consideren inestables en el medi. Tanmateix, alguns virus embolcallats, però, poden sobreviure durant llargs períodes de temps a les aigües residuals i les aigües superficials. Els virus de la grip aviària i alguns coronavirus, per exemple, són relativament estables a l'aigua i també ocasionalment es transmeten als humans per via respiratòria per provocar brots de malalties greus (Ye et al., 2016). Així doncs, s'han descrit brots rellevants a nivell global provocats per virus embolcallats transmesos principalment per via respiratòria o per contacte directe com els brots d'Influenza, els causats per coronavirus o l'ebola entre d'altres (Wigginton et al., 2015).

Anàlisis retrospectius assenyalen que durant els últims 70 anys, més del 80 per cent dels brots relacionats amb malalties infeccioses emergents són causades per patògens zoonòtics o transmesos per vectors, dels quals la majoria són virus. Per la qual cosa, la recerca està sent dirigida a l'estudi del viroma dels reservoris més comuns causants de malalties zoonòtiques. On els ratpenats i els rosegadors són els dos reservoris més importants, sent hostes de molts virus zoonòtics que poden travessar les barreres d'espècies per infectar humans, inclosos *Lissavirus*, *Ebolavirus* i *Coronavirus*. En particular, s'ha suggerit que els ratpenats són reservoris potencials del SARS-CoV-2, l'agent causant de la COVID-19 (Zhou et al., 2022).

##### 1.4.1. *Coronaviridae*

Relacionat tradicionalment amb refredats comuns, els coronavirus són virus embolcallats de 60 a 220 nm de diàmetre amb un genoma d'entre 25 i 32 kb i ARN de cadena senzilla (ssARN). A dia d'avui els coronavirus són responsables de 3 grans episodis rellevants. El SARS-CoV-1 va sorgir a Hong Kong l'any 2003 causant de malalties respiratòries amb altes taxes de mortalitat. L'any 2012 el

## Introducció

MERS-CoV va ser responsable de 456 morts a l'Àrabia Saudita (Wigginton et al., 2015). I a finals de 2019 el SARS-CoV-2 va ser identificat en Wuhan, Xina com a responsable d'una nova malaltia respiratòria aguda coneguda com COVID-19, convertint-se en el primer coronavirus pandèmic (Gorbalenya et al., 2020). El brot va ser declarat una emergència de salut pública d'interès internacional el 30 de gener del 2020 i l'OMS l'11 de febrer de 2020 va anunciar un nom per a la nova malaltia del coronavirus: la COVID-19. L'11 de març, l'OMS va actualitzar l'estat del brot de COVID-19 d'epidèmia a pandèmia. A data de novembre del 2022, s'han registrat en el món al voltant de 633 milions de casos i 6,6 milions de morts (WHO, 2022).

El SARS-CoV-2 és un coronavirus relacionat amb el síndrome agut respiratori sever (SARS), membre emergent del gènere *Betacoronavirus*. La principal via de transmissió són les gotes i aerosols generats per la respiració, esternuts, tos, i contacte estret amb de les persones infectades. La majoria de les persones que s'infecten amb la COVID-19, o són asimptomàtics o experimenten des de símptomes respiratoris lleus a moderats i es recuperen sense tractament especial encara que en alguns casos pot arribar a provocar la mort (Sharma et al., 2021). Donat que en molts casos els portadors són asimptomàtics, fet que afavoreix el contagi, ha fet que sorgeixin noves variants ràpidament. Aquestes variants, s'han associat a les fluctuacions observades amb les ones pandèmiques, ja que posseeixen mutacions que afecten la infectivitat i l'antigenicitat virals (Itarte et al., 2021), demostrant així característiques d'evasió immune i un augment de les capacitats infeccioses, conduint a una reducció en l'eficàcia de les vacunes (Forchette et al., 2021).

### 1.5. Epidemiologia basada en aigües residuals

Des que l'any 1939 que el virus de la pòlio va ser detectat a aigües residuals (Nelson, 2022), l'epidemiologia basada en aigües residuals (*Wastewater Based Epidemiology, WBE*) s'ha utilitzat per la detecció de virus emergents, detectant-se per exemple la circulació del virus de l'hepatitis E en països industrialitzats (Clemente-Casares et al., 2003), o reflectint l'efecte de la vacunació en la circulació de soques de virus com els de l'hepatitis A o els rotavirus (Matthijnssens and Van Ranst, 2012; Pintó et al., 2007).

Pel que fa els virus amb embolcall, donat que la seva via de transmissió no sol ser la via fecal oral i que són considerats inestables en el medi ambient, no solen ser focus d'estudi, per la qual cosa la informació disponible de virus embolcallats en aigües és escassa (Wigginton et al., 2015). Alguns virus embolcallats, com són el virus respiratori sincitial, el rinovirus, els

coronavirus i la grip estacional poden ser excretats en femta, per la qual cosa han estat detectats en aigües residuals (Arena et al., 2012; Ye et al., 2016).

Arran de la pandèmia de la COVID-19, l'estudi de virus embolcallats en aigües ha guanyat protagonisme, i en concret el seguiment del SARS-CoV-2. Donat que és un virus que també s'excreta en femta, fins al 55 % de les persones infectades el pot excretar en concentracions de l'ordre de  $10^2 - 10^7$  CG/gr de femta (Medema et al., 2020; Zhang et al., 2020), la vigilància microbiològica de les aigües residuals funciona com a indicador epidemiològic de l'estat de salut d'una comunitat. Així doncs, les concentracions de virus a les aigües residuals són indicadores del nombre de persones infectades a la comunitat, proporcionant una correlació significativa entre la concentració de SARS-CoV-2 a les aigües residuals i la prevalença de COVID-19 a la població (Medema et al., 2020). El monitoreig del SARS-CoV-2 en aigües residuals, tot i no ser una font d'infeccions, ha esdevingut clau per a conèixer l'estat de la pandèmia, actuant com a potencial eina per al seguiment de l'evolució de la malaltia i com a suport per a la implementació d'accions de control (Randazzo et al., 2020).

Conseqüentment, un gran nombre d'administracions a nivell global han desenvolupat xarxes de vigilància epidemiològica basades en l'anàlisi de les aigües residuals. En la plataforma web COVIDPopps19 es poden consultar els més de 3600 punts de vigilància del SARS-CoV-2 que hi ha arreu del món en els 70 països participants (<https://www.covid19wbec.org/covidpoops19>). A Catalunya per exemple, s'analitza setmanalment l'evolució de la concentració del virus (<https://sarsaigua.icra.cat>) des de l'any 2020, realitzant el seguiment de 56 plantes de tractament d'aigües residuals les quals representen el 80% de la població (Coromines et al., 2020; Guerrero-Latorre et al., 2022).

Aquestes xarxes de vigilància a nivell global han esdevingut una eina molt potent per al control no només del SARS-CoV-2, sinó també d'altres virus emergents com és el cas de la verola del mico, un virus d'ADN de doble cadena (dsADN) embolcallat que pertany al gènere *Orthopoxvirus* de la família *Poxviridae*. El maig de 2022, es van identificar múltiples casos de verola del mico en diversos països no endèmics. Actualment, amb quasi 60000 casos confirmats i 19 morts, s'estan realitzant estudis per entendre millor l'epidemiologia, les fonts d'infecció i els patrons de transmissió, on les xarxes de vigilància d'aigües residuals tenen un paper fonamental (ECDC 2022).

## 2. Control de la qualitat de l'aigua i de la contaminació viral

### 2.1. Regulacions i normatives

#### 2.2.1. Regulacions i normatives a nivell global

Per a garantir la qualitat de l'aigua, els països han adoptat diferents normes. A més, en tractar-se moltes vegades d'un recurs compartit per diferents països, el consens és necessari per establir polítiques de gestió comunes.

Així doncs, a nivell mundial depenent del desenvolupament econòmic de les regions, podem trobar diferents models de gestió de les aigües. A nivell europeu, sota les regulacions de la Unió Europea, es va aprovar l'any 2000 la Directiva 2000/60/CE per la qual s'estableix un marc comunitari d'actuació a l'àmbit de la política d'aigües, més coneguda com la Directiva Marc de l'Aigua (DMA), on tots els països membres han de seguir per tal d'assegurar el bon estat de les masses d'aigua. La resta de països, tenen regulacions específiques, unes més restrictives que altres, com la *National Water Quality Management Strategy* a Austràlia, *The Canada Water Act* a Canadà i, sent un referent a nivell legislatiu, L'Agència de Protecció Ambiental (*Environmental Protection Agency*, EPA) dels Estats Units.

D'altra banda, altres regions amb profundes desigualtats socioeconòmiques, tot i tenir les seves regulacions específiques, disposen d'organitzacions, ja sigui a nivell continental o regional, que intenten establir regulacions o recomanacions comunes en els diferents usos de l'aigua. A l'Àfrica, Les Directrius de polítiques de sanejament africanes (*African Sanitation Policy Guidelines*) són una iniciativa liderada pel Consell de ministres africans sobre l'aigua (*The African Ministers' Council on Water*), amb l'objectiu de promoure la cooperació, la seguretat, el desenvolupament social i econòmic i l'erradicació de la pobresa entre els estats membres mitjançant la gestió eficaç dels recursos hídrics del continent. Al continent asiàtic, *L'Asian Water Development Outlook* avalua la seguretat nacional de l'aigua a l'Àsia i el Pacífic, centrant-se en cinc dimensions clau: desastre rural, econòmic, urbà, ambiental i relacionat amb l'aigua. Proporcionant una instantània país per país de l'estat de la seguretat de l'aigua de la regió, permetent als responsables polítics, les institucions financeres i els planificadors fer una gestió més eficient de l'aigua. Finalment, a l'Amèrica Llatina, tot i no existir un marc comú de regulacions, la Divisió de Recursos Naturals de la Comissió Econòmica per a Amèrica Llatina i el Carib (CEPAL), realitza informes dels diferents avenços en les polítiques reguladores del sector de l'aigua potable i sanejament, on cal destacar la menció especial als conflictes socials derivats de l'aigua. Al considerar-se un recurs estratègic, la seva manca deriva en conflictes

categoritzats com conflictes per l'ús, pels usuaris, per actors no usuaris, intergeneracionals, interjurisdiccionals i institucionals.

Totes les regulacions i informes desenvolupats a nivell global en matèria d'aigua han d'estar alineades amb l'Agenda 2030 per al Desenvolupament Sostenible, aprovada per la 70a Assemblea General de les Nacions Unides durant la Cimera de Desenvolupament Sostenible 2015, on l'objectiu 6, estableix que s'ha de garantir la disponibilitat i la gestió sostenible de l'aigua.

Pel que respecta al control microbiològic dels virus en aquestes regulacions, l'any 2011 les guies de l'OMS per a la qualitat de l'aigua potable classifiquen els adenovirus, astrovirus, calicivirus, enterovirus, el virus de l'hepatitis A i E, i els rotavirus com a patògens importants amb certa evidència d'alt risc per a la salut (WHO, 2011a, 2011b). L'any 2017, l'EPA inclouïa paràmetres específics relacionats amb els virus entèrics, destacant els adenovirus, calicivirus (incloent Norovirus), enterovirus i el virus de la hepatitis A en la llista de candidats a contaminants, a més de determinar els valors de reducció necessaris en el tractament d'aigües regenerades així com l'ús de bacteriòfags com a indicadors.

Finalment, l'any 2020, es publica el Reglament (UE) 2020/741 del Parlament Europeu del 25 de maig on especifica els requisits mínims per la reutilització de l'aigua i en el mateix any, s'actualitza la normativa relativa a la qualitat d'aigua destinada al consum humà i es publica la Directiva (UE) 2020/2184 del Parlament Europeu el 16 de desembre del 2020. En aquesta actualització s'especifica que durant els programes de control operatiu del subministrament, si hi ha presència de colifags somàtics en aigua sense tractar a concentracions > 50 PFU/100 ml, s'han d'analitzar després de les etapes de tractament per tal de determinar i avaluar el risc microbiològic associat a la presència de virus patògens.

### 2.2.2. Regulacions i normatives espanyoles

La Directiva 2000/60/CE, coneguda com la Directiva Marc de l'Aigua (DMA), va ser traslladada a l'ordenament jurídic espanyol mitjançant la Llei 62/2003. En general, els valors límits dels diferents paràmetres físico-químics i microbiològics recollits a la legislació són variables depenent de l'ús final al qual està destinat l'aigua, sempre sent els més restrictius en el cas de l'aigua potable. Donada la importància del control sanitari de l'aigua, l'any 2018, l'ordenament jurídic espanyol va establir mitjançant Reial decret 902/2018 l'obligatorietat de la creació i l'aplicació de Plans de Seguretat de l'Aigua (PSA), promoguts des del 2004 per l'OMS en les Directrius sobre la qualitat de l'aigua potable en zones que subministren aigua a més de 50.000 habitants. Avaluant

## Introducció

així, el risc en totes les etapes del subministrament de l'aigua potable des de la seva captació fins al consumidor.

D'altra banda, derivat de la necessitat de reutilitzar l'aigua de forma sostenible, l'any 2007, es va publicar el Reial Decret 1620/2007 del 7 de desembre, que estableix el règim jurídic de reutilització d'aigües depurades. Conseqüentment, i derivat del risc associat per que pot suposar la conversió d'un residu com és l'aigua residual a un recurs, el RD diferencia els diferents usos que se'n pot donar depenent de la qualitat de l'aigua, establint qualitats diferents límits en funció del risc que suposi l'activitat per a la salut humana. Així doncs, es distingeixen 6 tipus de qualitat (A, B, C, D, E i F), resumits en la Taula 2, tenint en compte fonamentalment els límits indicats respecte a *E. coli*, nematodes intestinals i *Legionella spp.*

Taula 2. Tipus de qualitat segons els límits bacteriològics del RD de reutilització

USOS	TIPUS DE QUALITAT	<i>E. coli</i> UFC/100ml	Nematodes	<i>Legionella</i> <i>spp.</i> UFC/100 ml
Torres de refrigeració residencials	A	Absència	Absència	Absència
Recàrrega d'aqüífers injecció directa		Absència	< 1 ou /10L	< 100
Serveis urbans	B	Absència	< 1 ou /10L	No es fixa límit
Reg agrícola sense restriccions		< 100 - 200	< 1 ou /10L	< 100
Reg de camps de golf	C	< 1000	< 1 ou /10L	No es fixa límit
Reg de productes agrícoles que no es consumeixen frescos		< 10000	No es fixa límit	No es fixa límit
Reg pastura animals productors		< 10000	No es fixa límit	No es fixa límit
Recàrrega d'aqüífers per percolació	D	< 10000	< 1 ou /10L	< 100
Reg de cultius llenyós, vivers i cultius industrials		< 10000	< 1 ou /10L	< 100
Masses d'aigua sense accés públic	E	No es fixa límit	No es fixa límit	No es fixa límit
Reg de boscos i zones verdes no accessibles al públic		No es fixa límit	No es fixa límit	No es fixa límit
Ambientals: manteniment aiguamolls, cabals mínims	F	La qualitat s'estudia cas per cas		

Els paràmetres que cal controlar sempre són: Nematodes intestinals, *E. coli*, sòlids en suspensió i terbolesa. Els dos primers com a indicadors microbiològics i els altres dos com a fisicoquímics. Així mateix, i depenent del tipus d'aplicació o destí de l'aigua regenerada, el RD de reutilització exigeix controlar un altre tipus de paràmetres, com ara la *Legionella spp.* en cas que



es produeixi aerosolització, o el nitrogen i el fòsfor total en el cas de recàrrega d'aqüífers o replenament d'estanys amb risc d'eutrofització.

No obstant això, amb la publicació del Reglament (UE) 2020/741 del Parlament Europeu relatiu als requisits mínims per la reutilització de l'aigua que serà aplicable a tots els estats membres a partir del 26 de juny del 2023. S'especifica que només per avaluar les instal·lacions de regeneració d'aigua, i no com a control rutinari de la seva qualitat, per tal d'avaluar el compliment dels objectius de rendiment (reducció de log10), com a controls de validació de les aigües regenerades per al reg implica el seguiment dels microorganismes indicadors associats a cada grup de patògens (*E. coli*, colifags i espores de *Clostridium perfringens*/ bacteris formadors d'espores reductores de sulfat). Sent els colifags F- específics, colifags somàtics o colifags, utilitzats com a indicadors índex de virus patògens. Tanmateix, la normativa deixa lliure als usuaris d'analitzar *Campylobacter*, rotavirus o *Cryptosporidium*, enlloc dels microorganismes proposats necessitant  $\geq 5$ ,  $\geq 6$  i  $\geq 4$  logaritmes de reducció respectivament.

### 2.2.3. Microorganismes indicadors per al control de la contaminació fecal

Per al control de la qualitat microbiològica de l'aigua, s'utilitzen indicadors de contaminació fecal. Degut a què l'anàlisi de tots els possibles patògens presents en una mostra és inviable i a la falta de mètodes apropiats per a la seva detecció, l'ús de microorganismes indicadors representen una solució front a aquesta situació. Un indicador és un microorganisme que per les seves característiques presenta un comportament similar als dels patògens.

Els criteris definits per l'OMS que identifiquen un microorganisme indicador de contaminació fecal són els següents (WHO 2017):

- Ser detectable mitjançant mètodes senzills, ràpids i econòmics.
- Estar present universalment en excrements humans i animals en nombres elevats.
- No ser un microorganisme patògen.
- Estar present en nombres més elevats que els patògens fecals.
- No multiplicar-se a l'aigua sota condicions naturals.
- Persistir o inactivar-se a l'aigua de manera similar als patògens fecals.
- Respondre tractaments de desinfecció de manera similar als patògens fecals.

## Introducció

Actualment, no s'ha identificat cap indicador que compleixi tots els requisits establerts per l'OMS. A més, és important entendre exactament per a què s'ha d'utilitzar un indicador específic, abans d'establir quina informació pot o no pot proporcionar (Momba et al., 2019). En la Taula 3 es resumeixen els diferents tipus d'indicadors.

Taula 3. Definició dels diferents tipus d'indicadors

<b>Grup</b>	<b>Definició</b>	<b>Exemple d'ús</b>
Indicador de procés	Grup d'organismes que demostra l'eficàcia d'un procés	Coliforms per a la desinfecció amb clor
Indicador fecal	Grup d'organismes que indica la presència de contaminació fecal	<i>E. coli</i> , indicatiu de què hi poden haver patògens
Organisme índex	Un grup o espècie microbiana indicativa de la presència de patògens	<i>E. coli</i> com a índex de <i>Salmonella</i>
Microorganisme model ( <i>surrogate</i> )	Un grup o espècie microbiana indicativa del comportament dels patògens	Bacteriòfags d'ARN F com a models per a la reducció de virus entèrics humans en sistemes de tractament i desinfecció

Hi ha diferents tipus d'indicadors, resumits en la Figura 3, però en les anàlisis de qualitat d'aigües es fan servir habitualment els indicadors bacterians de contaminació fecal (*Fecal Indicator Bacteria*, FIB). Aquests s'utilitzen per a detectar la presència (o absència) de contaminació fecal i controlar l'eficàcia dels processos de desinfecció o depuració. Assumint que els mateixos organismes es poden fer servir tant com a indicadors de contaminació fecal com d'eficàcia d'un procés o tractament.

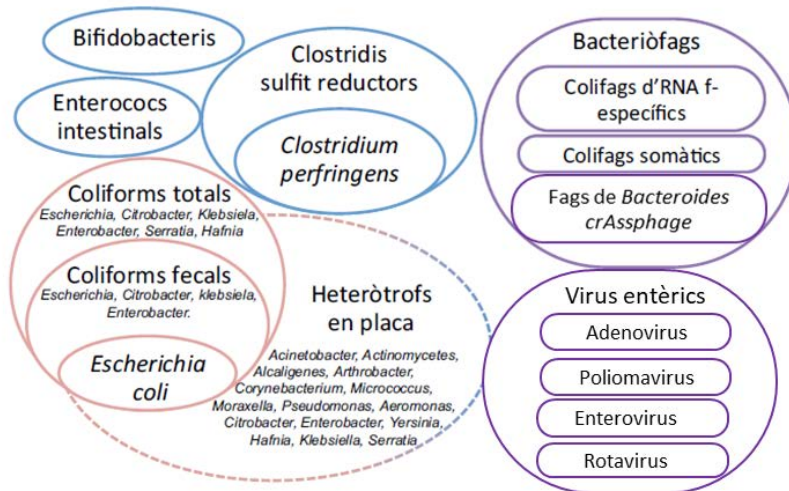


Figura 3. Microorganismes indicadors de la contaminació fecal a l'aigua.  
Adaptada de Rusiñol, 2014

*Escherichia coli* (*E. coli*), l'indicador de contaminació fecal més utilitzat, és un bacteri Gram negatiu en forma de bacil que es troba habitualment a l'intestí inferior dels organismes de sang calenta (endotèrms) sent el membre predominant de la porció anaeròbica facultativa de la flora normal del còlon humà. L'únic hàbitat natural del bacteri és l'intestí gros dels animals de sang calenta i, amb algunes excepcions, generalment no sobreviu bé fora del tracte intestinal, per tant la seva presència en mostres ambientals, aliments o aigua sol indicar una contaminació fecal recent o pràctiques de sanejament deficientes a les instal·lacions de processament d'aliments (Odonkor and Ampofo, 2013).

Tanmateix, els FIB no tenen un origen exclusivament fecal, no són específics d'hoste, poden créixer a l'ambient i són més sensibles als tractaments de desinfecció. A més no correlacionen ni amb la presència ni amb la concentració de virus i protozous (Cabral, 2010; Sano et al., 2016).

Els virus excretats a l'ambient, són específics d'hoste i per tant no poden replicar-se fora del mateix, tot i això representen un problema de salut pública degut a què la seva dosi infectiva és molt baixa (Kundu et al., 2013; Thebault et al., 2013). L'excreció de virus es perllonga normalment durant setmanes, alguns inclús són excretats de forma persistent, i molts virus entèrics són molt estables a l'ambient i als diversos tractaments de desinfecció (Carratalà et al., 2013; Rzezutka and Cook, 2004).

## Introducció

Els adenovirus i els poliomavirus han estat proposats com a indicadors de contaminació fecal, ja que poden fer infeccions persistents, generalment asimptomàtiques, sent excretats en orina (JCPyV) o femta (HAdV) pels individus afectats. A més són molt resistents a l'ambient i a alguns tractaments de desinfecció, i s'han detectat en gran diversitat de mostres durant tot l'any en totes les àrees geogràfiques estudiades (Bofill-Mas et al., 2006; Hundesa et al., 2006; Pina et al., 1998). D'altra banda, el fet de què n'hi hagi d'específics d'humans i d'animals, fa que siguin bons indicadors com a eines per traçar la contaminació ambiental microbiana mitjançant MST (*Microbial Source Tracking*).

Un altre indicador viral recentment proposat, és el bacteriòfag crAssphage (de l'anglès cross-assembly phage). Descobert el 2014 mitjançant l'anàlisi computacional de seqüències metagenòmiques fecals, és el grup de bacteriòfags més abundants del viroma fecal humà, infectant els *Bacteroides* intestinals (Dutilh et al., 2014). Donada la seva elevada especificitat d'origen humà, abundància (detectat en aproximadament el 90% del viroma intestinal humà) i ubiqüitat, fa que sigui utilitzat com a microorganisme indicador de contaminació fecal vírica (Dutilh et al., 2014; García-Aljaro et al., 2017). Tanmateix, poc se sap encara sobre l'eliminació de crAssphage mitjançant processos de tractament d'aigües residuals, la seva correlació amb virus patògens i si existeix alguna variació estacional en la seva abundància a les aigües residuals no tractades (Ahmed et al., 2020b).

La monitorització a llarg termini d'organismes indicadors proporciona una indicació fiable del grau potencial de contaminació patogènica d'una matriu ambiental i, per tant, permet establir riscos potencials i relatius de manera conseqüent. Per això, és necessari desenvolupar mètodes sensibles i escollir indicadors que realment permeten traçar i identificar la contaminació en aigües i els seus riscos associats (Wu et al., 2011).

Això no obstant, no hi ha un indicador que significativament pugui predir la presència de tots els possibles patògens. Per tant, s'haurien de considerar diferents organismes per a diferents propòsits.

### 3. Mètodes per concentrar i detectar virus a l'aigua

La detecció de la contaminació viral a l'ambient és de vital importància pel que respecta a la seguretat de l'aigua. Tanmateix, avui en dia no existeixen mètodes estandaritzats per a la seva detecció que siguin de fàcil implementació, econòmics i eficients. En les diferents matrius d'aigua, el virus es troben distribuïts de manera heterogènia, i degut a que es solen trobar en baixes concentracions, la seva detecció a l'ambient és complexa.

Malauradament, no existeix un mètode ideal de concentració, el fet de que cada virus mostra un comportament diferent depenent de la matriu i del mètode aplicat, dificulta la seva estandarització (Bofill-Mas and Rusiñol, 2020; Ikner et al., 2012).

Tot i això, qualsevol mètode de concentració hauria de complir les següents generalitats: 1) Capaç de concentrar un gran volum de mostra a un volum final petit; 2) Concentrar la major diversitat de virus possible; 3) Demostrar una eficiència de recuperació acceptable; 4) Metodològicament senzill i ràpid; 5) Econòmicament assequible i; 6) Repetible i reproducible.

L'elecció del mètode de concentració, més que del patogen a detectar, dependrà de l'equipament i recursos disponibles als laboratoris, tenint en compte que la majoria de mètodes requereixen d'equipaments costosos i de la necessitat de personal especialitzat. És necessari doncs desenvolupar mètodes senzills i econòmics, ja que donada la importància del monitoreig de virus en aigües, les tècniques haurien de ser assequibles en contextos d'escassetat de recursos o països de baixa renda, els quals, degut a que tenen menor sanejament de l'aigua, solen ser els més afectats per les malalties de transmissió hídrica (WHO 2022). A més a més, idealment els mètodes haurien de poder ser adaptats per la concentració al terreny, fet que facilitaria el mostreig i anàlisi de grans volums d'aigua. Ja que les quantitats de virus entèrics humans a l'ambient varien molt segons els tipus d'aigua en què es troben. En aigües residuals o llots, els virus es troben en concentracions molt elevades, per la qual cosa es poden detectar fàcilment a partir de volums relativament petits (<100 ml), mentre que per a la seva detecció en aigües superficials, recreatives i de consum, es requereixen volums més grans (10-1000 L o més) degut a què es troben en concentracions virals més baixes, tot i que s'han reportat concentracions puntuals molt elevades degut a episodis puntuals de contaminació, com fuites en sistemes de clavegueram o episodis de pluja torrencials.

# Introducció

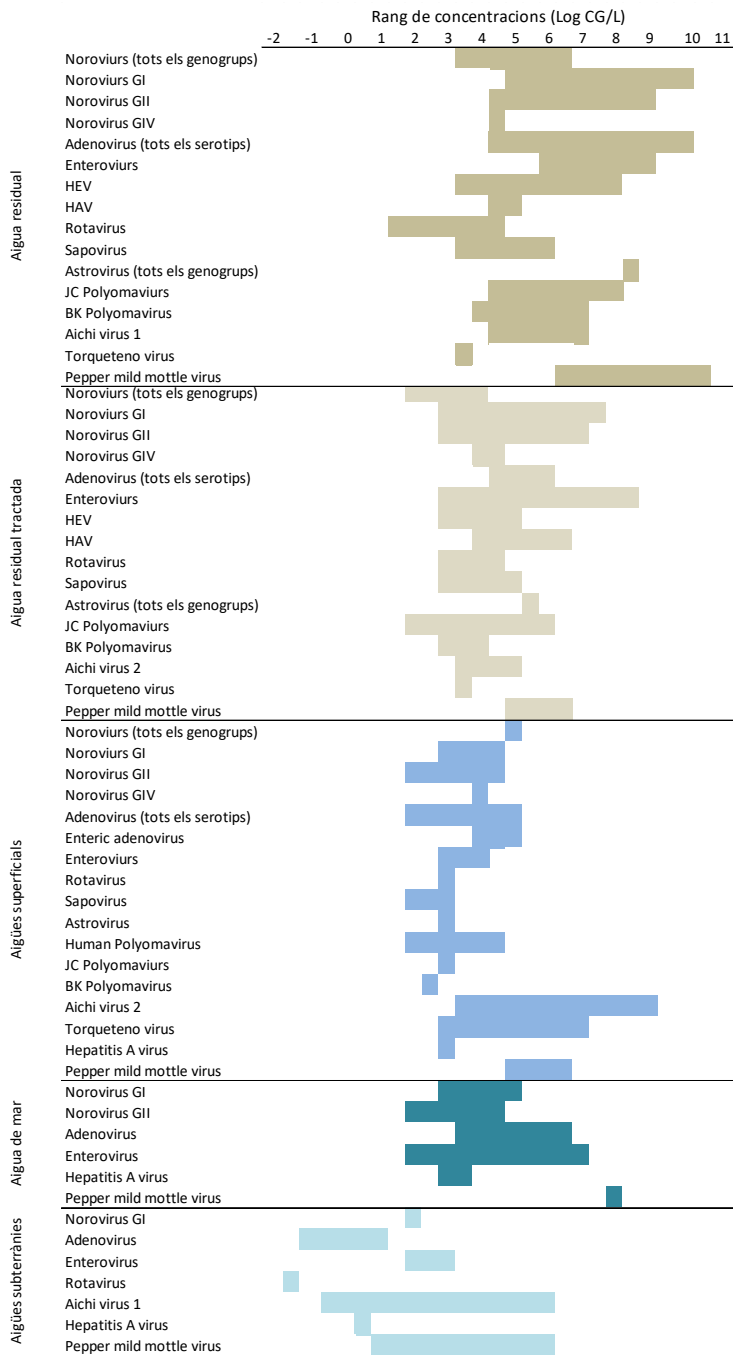


Figura 4. Rang de concentracions virals màximes en varis tipus d'aigües ambientals contaminades reportades en múltiples publicacions. Modificada de Haramoto et al., 2018 i Corpuz et al., 2020.

### 3.1. Mètodes de concentració

Tot i que s'utilitzen alguns mètodes de concentració d'un sol pas, la majoria dels mètodes de concentració viral consisteixen en dos passos on diversos volums en funció de la mostra, des d'uns mil·lilitres d'aigua residual a centenars de litres d'aigua de beguda, són concentrats a pocs mil·lilitres mitjançant un mètode de concentració primari, i més tard, a uns quants microlitres mitjançant un secundari, necessaris per la detecció i quantificació. Per aquest motiu, la majoria dels estudis utilitzen un o més mètodes en sèrie per concentrar virus en mostres d'aigua. Actualment, existeix una gran diversitat de mètodes fonamentats en diversos processos fisicoquímics, basats en l'adsorció de les partícules víriques a diferents matrius, o bé en la retenció d'aquestes per la seua mida (Bofill-Mas and Rusiñol, 2020).

Els virus i altres (bio-)col·loides posseeixen una càrrega superficial en medis polars com l'aigua que és depenent del pH. Aquesta càrrega electrostàtica determina la mobilitat de les partícules víriques i el seu comportament col·loidal, jugant un paper clau en els processos d'adsorció dels virus. El valor de pH al qual la càrrega superficial neta canvia el seu signe s'anomena punt isoelèctric (pI) i és un paràmetre característic del virió, estant en equilibri amb la química ambiental de l'aigua (Michen and Graule, 2010). Tenint en compte que el pH dels diferents tipus d'aigües sol oscil·lar entre 6.5 i 8.5, i que la majoria de virus tenen un pI al voltant d'un pH de 4-5, els virus a l'ambient solen tenir una càrrega negativa neta.

Conseqüentment, els mètodes basats en processos d'adsorció, com són els mètodes **VIRADEL (VIRal Adsorption and ELution)**, ja sigui mitjançant l'ús de membranes o filtres carregats positiva o negativament i els mètodes basats en l'ús de **floculants o coagulants**, com són el clorur de ferro, la llet desnatada, el clorur de lantà, el sulfat d'alumini, el clorur d'alumini i el polietilenglicol, estan basats en què els virus es posen en contacte amb una matriu on seran adsorbits sota condicions específiques de pH. Un cop adsorbits, en els mètodes VIRADEL els virus es recuperen mitjançant processos d'elució si han sigut adsorbits a filtres o membranes, mentre que en els mètodes de floculació i coagulació, per recuperar els virus adsorbits als coagulants o floculants, es descarta la solució en la que estaven suspesos originàriament mitjançant centrifugació, recuperant el flocul sedimentat en un volum final més petit (Ikner et al., 2012; Langenfeld et al., 2021).

Aquest tipus de metodologies, a excepció dels filtres electropositius, requereixen d'un pre-acondicionament de la mostra, limitant el volum a processar. A banda de requerir l'addició de sals (per exemple,  $MgCl_2$ ), es

## Introducció

necessita un canvi de pH de la matriu per tal de què els virus s'hi puguin adsorbir, ja sigui a les membranes o filtres, o als floculants i coagulants, fet que limita l'aplicació d'aquests mètodes a grans volums d'aigua (> 10L). Normalment, i depenent del tipus d'aigua, la concentració que s'assoleix després d'una primera concentració de la mostra no és suficient per la detecció dels virus, per la qual cosa, és necessari aplicar un segon pas de concentració.

Com a alternativa als mètodes VIRADEL i la floculació, trobem mètodes basats en la mida i densitat de les partícules víriques, com és la concentració mitjançant la ultracentrifugació i ultrafiltració.

Pel que respecta a la **ultracentrifugació (UC)**, tot i que és capaç de concentrar una gran diversitat de virus aplicant la força de la gravetat i temps (per exemple, 100.000 xg durant 1h), el volum que pot processar és molt limitat, per la qual cosa es sol utilitzar per concentrar volums petits o com a mètode secundari (Pina et al., 1998). A banda, s'ha de tenir en compte que una ultracentrífuga és un equipament d'alt cost, que difícilment es poden permetre laboratoris d'anàlisi rutinari o en països de baixa renda.

Pel que fa a la **ultrafiltració (UF)**, els virus són retinguts per la seva mida o pes molecular (Figura 5) i per l'adsorció a les membranes de l'ultrafiltre mitjançant forces de van der Waals i/o enllaços hidròfobs.

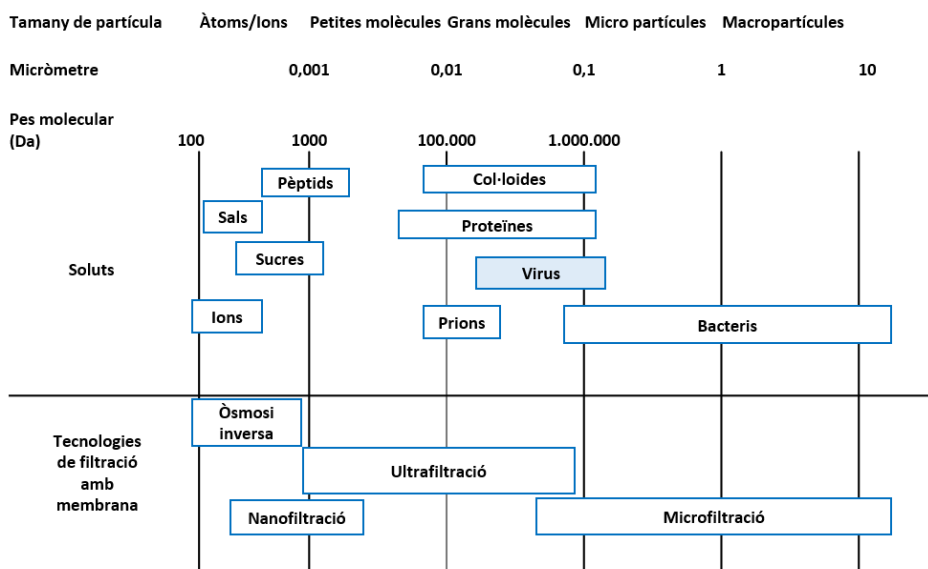


Figura 5. Espectre de separació per a membranes de filtració.  
Adaptada de Fröhlich et al., 2012.



Actualment hi ha diverses metodologies d'ultrafiltració que difereixen principalment pel tipus de corrents de flux generats per facilitar la separació de les partícules pel seu pes molecular. Aquests inclouen el flux sense sortida (dead-end UF) i diversos tipus de flux creuat (per exemple flux tangencial o flux de vòrtex) (Ikner et al., 2012). L'avantatge dels mètodes d'ultrafiltració, a banda de que són mètodes no selectius i que poden concentrar una gran varietat de microorganismes, (Haramoto et al., 2018), és que poden processar grans volums de mostra, encara que estan molt limitats per la terbolesa de la mateixa i que habitualment els filtres utilitzats i les bombes necessàries per dur a terme la ultrafiltració solen tenir un cost elevat.

D'altra banda, també existeixen dispositius que combinen la ultrafiltració acoblada a l'ús de centrífugues de sobretaula, anomenats **CeUF (centrifugal ultrafiltration)**, com són els dispositius Centricon® o Amicon®. La principal limitació d'aquests dispositius és el petit volum que són capaços de concentrar, a l'igual que la ultracentrifugació, per la qual cosa es solen utilitzar com a mètodes secundaris.

En la Figura 6, es resumeixen els principals mètodes de concentració, especificant el tipus i volum d'aigua, i les solucions utilitzades com a adsorbents o eluents en la concentració primària i secundària.

# Introducció

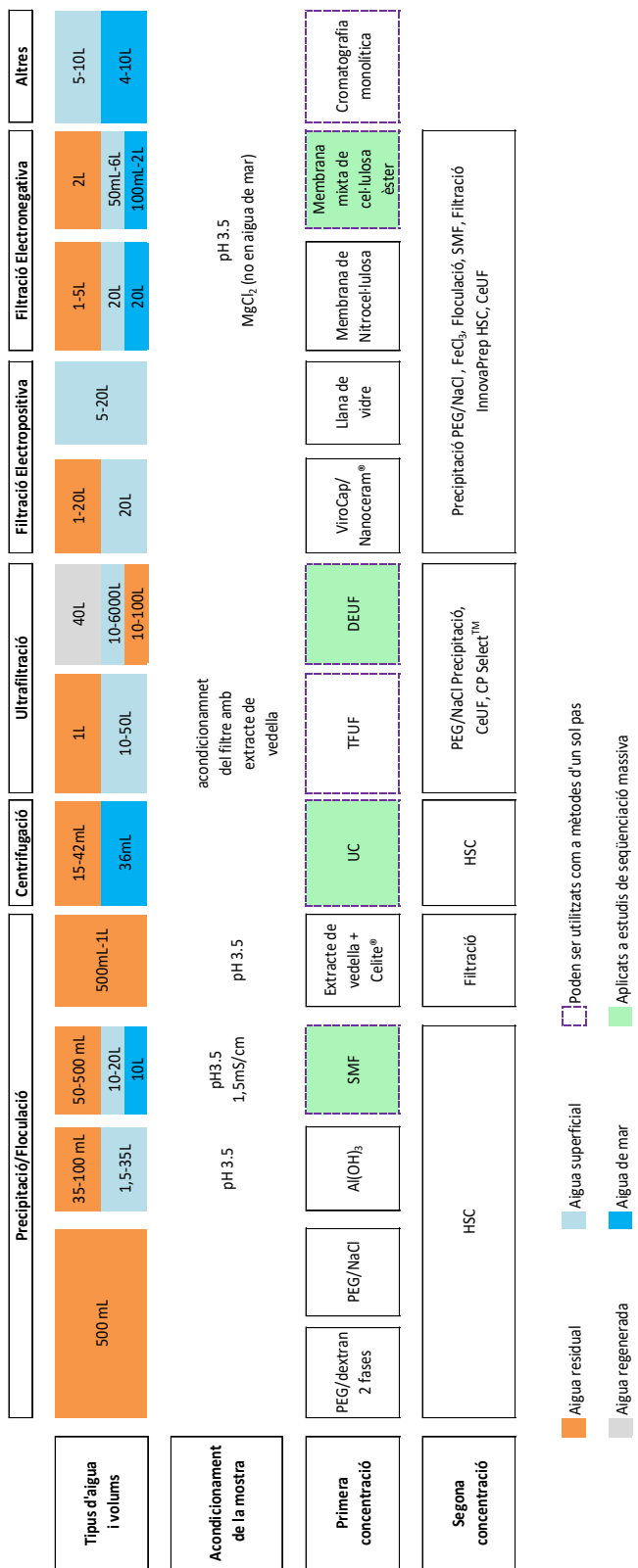


Figura 6. Principals mètodes de concentració, tipus i volum d'aigua analitzat, i solucions utilitzades com a adsorbents o eluents en la concentració primària i secundària. PEG, polietilenglicol; SMF, floculació amb llet descremada; UC, ultracentrifugació; TFUF, Ultrafiltració de flux tangencial; DEUF, Ultrafiltració sense sortida; HSC, Centrifugació High Speed; CeUF, Ultrafiltració centrifug. Adaptada de de Bofill-Mas and Rusiñol, 2020.

Cada mètode té avantatges i inconvenients (Taula 4), però de forma general, quants més passos té un mètode de concentració més lent, costós, poc estandarditzable i en definitiva menys eficient serà. Per la qual cosa, quan es consideren mètodes de concentració, diversos factors, com la qualitat de l'aigua o el volum de la mostra, són importants perquè afecten fàcilment l'eficiència de la concentració de virus. A més també s'ha de tenir en compte el tipus estructural de virus, embolcallat o no, i la tècnica amb la qual es vols detectar, ja sigui per detectar o quantificar virus específics per tècniques moleculars, mitjançant infectivitat o per fer estudis de metagenòmica, ja que depenent del mètode de concentració utilitzat ens limitarà les tècniques de detecció que puguem aplicar. Per exemple l'embolcall lipídic dels virus embolcallats fa que els virus siguin més sensibles als dissolvents orgànics, la temperatura i el pH per tant, molts mètodes d'extracció i purificació utilitzats per als virus sense embolcall no són òptims per als virus amb embolcall ja que l'ús de solucions de cloroform o clorur de cesi, per exemple, destrueixen la capa externa lipídica (Wigginton et al., 2015).

A més, al concentrar grans volums d'aigua en volums més petits, i que la detecció es realitza mitjançant tècniques moleculars, s'ha de tenir en compte que les matèries orgàniques presents en mostres ambientals (per exemple, àcids húmics) o els productes químics afegits durant la concentració/elució (per exemple, extracte de vedella o polifosfat de sodi (NaPP)) poden inhibir les extraccions d'ADN/ARN i els passos posteriors de detecció (Hata et al., 2011; Sidstedt et al., 2015).

## Introducció

*Taula 4. Avantatges i desavantatges dels principals mètodes de concentració de virus en aigua. PEG, polietilenglicol; SMF, floculació amb llet descremada;; TFUF, Ultrafiltració de flux tangencial; DEUF, Ultrafiltració sense sortida*

Principi de concentració	Mètode de concentració	Avantatges	Inconvenients
Precipitació/ Floculació	Tots	Útil per a mostres tèrboles Baix cost	No es poden processar grans volums d'aigua Pot requerir pre-acondicionament/centrifugació Requereix molt de temps
	PEG	Permet analitzar grans volums de mostra	Recuperacions variables
	SMF	Adaptable al terreny Mètode d'un sol pas	La llet descremada pot afegir inhibidors a la qPCR
Centrifugació	Tots	Bones recuperacions Útil per a mostres tèrboles	Equipament car No es poden processar grans volums d'aigua
	Tots	Concentració simultània de diversos patògens Útil per a grans volums Pot ser automatitzat	Pot requerir pre-acondicionament del filtre No és adequat per mostres tèrboles
Ultrafiltració	TFUF		
	DEUF	Depenent del tipus d'aigua pot fer-se en un sol pas Adaptable al terreny	Material car
	CP Select™	Ràpid i reproducible	Equipament car No es poden processar grans volums d'aigua
Ultrafiltració Centrifuga (CeUF)	Tots (Centricon®, Amicon®)	Mètode d'un sol pas Ràpid i simple	Equipament i material cars No es poden processar grans volums d'aigua
	Tots	De baix cost L'extracció es pot realitzar directament des de la membrana Bones recuperacions	No és adequat per mostres tèrboles Requereix de pre-acondicionament No es poden processar grans volums d'aigua
Filtració Electronegativa	Tots	Útil per a grans volums Adaptable al terreny No requereix pre-acondicionament	No és adequat per mostres tèrboles
	NanoCeram®/ Virocap®	Un cop concentrada la mostra es pot enviar per al seu anàlisi al laboratori de referència Adaptables al terreny	Equipament car
Filtració Electropositiva	Llana de vidre	Pot ser automatitzat	Filtració lenta Recuperacions variables

Finalment cal mencionar l'ús de **mostrejadors passius** com a alternativa als mètodes descrits anteriorment. Normalment, la presa de mostres per aquest tipus d'anàlisi es realitza agafant mostres puntuals, o bé mitjançant l'ús de mostrejadors automàtics per tal d'obtenir mostres composades, sobretot en estudis d'epidemiologia d'aigües residuals, ja que donat que la composició de les aigües residuals varia substancialment segons l'hora del dia i les activitats humanes associades, una mostra composta és més representativa (Schang et al., 2021).

El mostreig passiu és una alternativa econòmica i pràctica al mostreig actiu. Aquest mètode, utilitzat des de fa anys en la detecció de diversos contaminants químics (Mackay, 2016) requereix de la instal·lació d'un dispositiu en una captació d'aigües durant un període conegut, permetent que els virus de l'aigua interactuïn amb ell. A l'interior del dispositiu, el qual pot tenir diferents configuracions (per exemple, colador, vaixell, caixa de mistos, torpede) es deposita una membrana o material on els virus quedin retinguts, on en acabar el temps de mostreig, aquestes membranes són retirades i analitzades mitjançant mètodes moleculars. Tanmateix, tot i ser una molt bona aproximació, un dels principals inconvenients d'utilitzar aquest tipus de sistemes és que els resultats no són quantificables donada la impossibilitat de saber el cabal exacte que ha estat en contacte amb el mostrejador (Schang et al., 2021; Wilson et al., 2022).

3.2. Ús de controls de procés per a la caracterització de mètodes  
A l'hora de desenvolupar i caracteritzar un mètode per concentrar virus en qualsevol tipus de matriu s'han de tenir en compte una sèrie de consideracions. Pel que fa al mostreig, cal recollir una mostra de suficient volum, representativa i homogènia de la matriu a analitzar. En quant al procés de concentració, independentment del mètode escollit, s'ha de tenir en compte el volum final en el qual es concentrarà la mostra, de tal manera que podem conèixer el factor de concentració del mètode i la representativitat del mateix, és a dir quin volum de mostra inicial s'està analitzat realment en l'anàlisi molecular. A banda, s'ha de tenir en consideració que al concentrar l'aigua també es concentraran inhibidors, que hauran de ser eliminats en la major mesura possible en el pas d'extracció, el qual no tindrà una eficiència del 100%. Finalment, en la detecció molecular s'ha de tenir en compte

## Introducció

l'especificitat de la tècnica, la sensibilitat i l'eficiència de cada assaig, dels quals es podrà obtenir el límit de detecció i de quantificació de la mateixa.

Per obtenir resultats precisos, tots els passos s'han de dur a terme amb nivells acceptables d'eficiència. Per avaluar l'eficiència dels processos, s'han d'utilitzar els anomenats controls de procés o controls interns.

Els controls de procés es poden classificar en tres tipus d'acord amb els punts en què els s'incorporen a la mostra: (1) controls de procés complet (*Whole Process Control, WPC*), que s'afegeixen a la mostra abans del procés de concentració; (2) controls de processos moleculars (*Molecular Process Control, MPC*), que s'afegeixen abans de les extraccions d'àcids nucleics; i (3) controls durant el procés de detecció (*(RT-)qPCR control*) (Figura 7) (Haramoto et al., 2018).

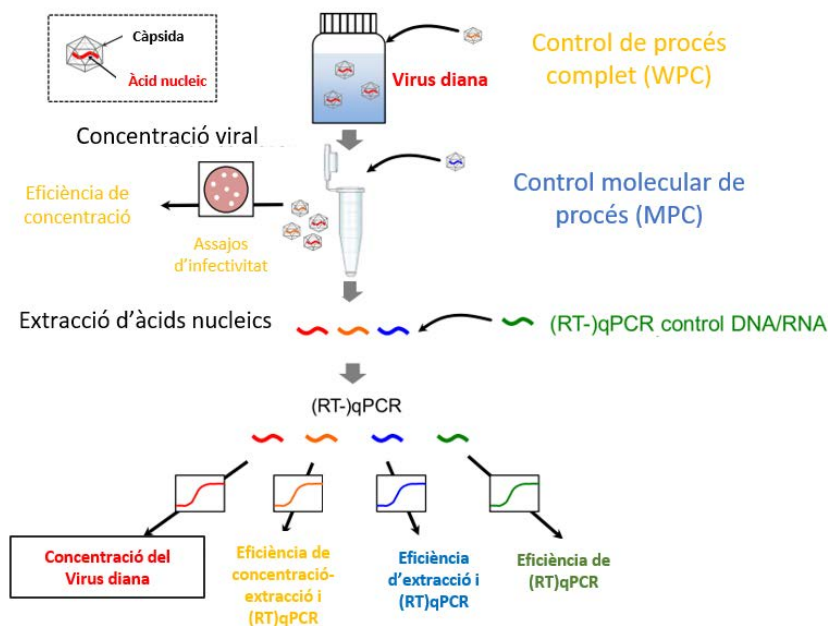


Figura 7. Control de procés utilitzats per avaluar l'eficiència de cadascun dels passos necessaris per la detecció molecular de virus. Adaptada de Haramoto et al., 2018

Pel que respecta a l'ús de controls de procés complet (WPC) s'han de tenir en compte una sèrie d'aspectes fonamentals, els quals són l'ús de virus models (*surrogates*) adequats, la matriu a analitzar i el càlcul de les recuperacions virals del mètode.

Per determinar l'eficiència del procés pel qual es concentren les partícules víriques, s'afegeixen quantitats conegudes d'un virus model i es recuperen després del pas de concentració. Els controls fàcilment cultivables, com ara els colífags MS2 i  $\Phi$ X174, el norovirus murí (MNV) o el mengovirus (MgV) s'utilitzen freqüentment com a WPC. No obstant això, la representativitat del control en molts casos és qüestionable. Per una banda, cada virus es comporta diferent depenent del mètode de concentració utilitzat, mostrant elevada variabilitat en les recuperacions virals de fins a sis ordres de magnitud (Pettersen et al., 2015). Un altre problema és que s'assumeix en molts casos un comportament similar del virus control al del virus diana, per exemple, un estudi de Pettersen i col·laboradors va revelar que l'eficiència de recuperació del MgV utilitzats com a surrogates no correlacionava amb la dels AdVs i NoVs naturalment presents en les mostres (Pettersen et al., 2015). De la mateixa manera, Hennechart-Collette i col·laboradors van suggerir que un control que pot ser un bon *surrogate* en una matriu concreta pot no ser-ho en altres tipus de matrius, ja que per exemple, MNV és un bon model de NoV-GI en enciam però no en aigua embotellada o en tomàquet semi-sec (Hennechart-Collette et al., 2015).

D'altra banda, la forma en què es quantifica el control de procés per tal de calcular la recuperació del mètode pot infraestimar la recuperació real. Sovint els estocs virals són quantificats directament enlloc de quantificar-los un cop afegits a la matriu a analitzar, sense tenir en compte l'efecte de la matriu, esbiaixant així els percentatges de recuperació o sense tenir en compte el fenomen d'agregació de les partícules virals, fent que s'obtinguin recuperacions majors al 100% (Rhodes et al., 2016).

Finalment, durant els processos d'extracció d'àcids nucleics i detecció també s'hauran d'incloure controls tant positius com negatius. Durant l'extracció diverses partícules virals poden ser utilitzades com per exemple, el MgV, MHV o MS2 entre d'altres, i com a control negatiu a sovint s'utilitza el mateix tampó d'elució del kit d'extracció. Respecte als controls de detecció, com a controls positius es poden utilitzar cultius vírics, plàsmids o gBlocks® (fragment d'ADN sintètic) i com a control negatiu utilitzar aigua comercial lliure de material genètic enlloc de mostra. A banda, per minimitzar els efectes de la inhibició de la q(RT-)PCR es realitzen dilucions 1/10 per tal d'eliminar inhibidors presents i afavorir l'amplificació (Hamza et al., 2011).

## Introducció

Per la qual cosa, a l'hora de caracteritzar un mètode de concentració, és necessari utilitzar controls de procés adequats, des dels passos de concentració fins la detecció, sent el més semblant possible estructuralment als dels virus diana, s'han de quantificar correctament i s'ha de caracteritzar el mètode per a cada matriu en el que sigui aplicable, ja que depenent de les característiques de la matriu, un mètode de concentració concret podrà variar en quant a volum de mostra a processar, factor de concentració, en la representativitat i en definitiva en la recuperació viral.

Amb tot, si s'utilitzen mètodes de detecció viral mal caracteritzats o no s'apliquen els controls de procés degudament, pot donar lloc a falsos negatius (Haramoto et al., 2018).



#### 4. Tractaments de reutilització d'aigües i desinfecció

Actualment, les depuradores d'aigües residuals urbanes (EDAR) redueixen substancialment els contaminants de les aigües residuals, produint efluent que són descarregats a rius o a mars. No obstant això, l'escassetat d'aigua juntament amb l'augment de la població i la intensificació de les activitats agrícoles i industrials han desencadenat el desenvolupament de mètodes eficients per obtenir aigua depurada o regenerada segura per a regs de cultiu, recàrrega d'aqüífers i producció d'aigua potable (The European Parliament and the Council, 2020).

Com a exemples més rellevants de reutilització d'aigües cal mencionar l'estat de Califòrnia, amb el projecte *Pure Water Southern California*, on es construirà l'estació d'aigua regenerada més gran del món, amb capacitat de produir fins a 600.000 m<sup>3</sup>/dia, suficients per a abastir a més de 500.000 habitatges, o el cas d'Israel, on aproximadament el 84% de les aigües residuals domèstiques són reutilitzades per al reg ([www.health.gov.il](http://www.health.gov.il)). A nivell espanyol, Espanya és el líder europeu en reutilització d'aigua on entre el 7 i el 13% de l'aigua residual tractada és reutilitzada (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, 2020).

Les pautes establertes per l'OMS per assegurar la depuració i desinfecció de les aigües residuals es basen en sistemes de barrera múltiple (WHO 2006). Aquest tipus de sistemes estan basats en tractaments seqüencials de depuració i eliminació de contaminants a través de diferents tractaments (barreres) fins a assegurar una aigua d'excel·lent qualitat.

De forma general, els tractaments de regeneració d'aigües estan basats en un primer pas d'eliminació de sòlids en suspensió, seguit de l'eliminació de químics dissolts, desinfecció i eliminació de compostos orgànics traça, estabilització de l'aigua i un últim pas per assegurar una qualitat organolèptica acceptable. La taula 5 resumeix els objectius generals de cada tractament i els processos unitaris corresponents.

## Introducció

Taula 5. Tractaments i processos per la regeneració d'aigües.

Tractament	Processos
1 Eliminació de sòlids en suspensió	Coagulació/ Floculació /Sedimentació Filtració amb medis granulars Microfiltració (MF) Ultrafiltració (UF)
2 Eliminació de químics dissolts	Osmosis inversa (OI) Electrodiàlisi (ED)/Electrodiàlisi inversa (EDI) Nanofiltració (NF) Carbó activat granulat (CAG) Intercanvi iònic Filtració activa biològica (FAB)
3 Desinfecció i eliminació de compostos orgànics traça	Desinfecció amb llum ultraviolada (UV) Clor / cloramines / Diòxid de clor Àcid peracètic (PAA) Pasteurització Ozó Processos d'oxidació avançada (UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/Cl <sub>2</sub> ) (POA)
4 Estabilització (ajust de pH i remineralització)	Hidròxid de sodi / Clorur Càlcic Addició de calç/ descarbonatació
5 Gust, olor i control de color	O <sub>3</sub> /Carbó biològicament activat MF/OI

### 4.1. Mètodes clàssics de desinfecció

Atès que els virus entèrics humans no poden créixer fora de les seves cèl·lules hoste, l'eliminació eficient i/o la inactivació d'aquests virus a les plantes de tractament d'aigües residuals contribueix en gran mesura a reduir la quantitat de virus abocats al medi. No obstant això, és molt difícil aconseguir l'eliminació completa dels virus amb els processos convencionals de tractament d'aigües residuals (Haramoto et al., 2018).

Les directrius nacionals i internacionals per a la reutilització d'aigües residuals estipulen que els riscos d'infecció per virus s'han de regular mitjançant sistemes de barreres múltiples, on els tractaments estan dissenyats en funció de l'eficiència d'eliminació de cada tractament a fi d'obtenir una reducció total suficient de microorganismes patògens (Rachmadi et al., 2020a).

Per tal d'assolir els estàndards basats en la pèrdua tolerable d'anys de vida ajustats a la discapacitat (DALY) per persona i any, es requereix una reducció de virus de 2 a 3 i de 6 a 7 logaritmes per a aigua regenerada destinada a usos restringits i no restringits respectivament. D'altra banda, altres estudis recomanen una reducció addicional de 2 i 3 logaritmes per garantir la salubritat de l'aigua destinada per reg de cultius (Gerba et al., 2018; Gonzales-Gustavso et al., 2019).

Les tècniques d'eliminació de sòlids com la filtració, la floculació, la coagulació i la sedimentació, i les tècniques de desinfecció com, l'addició de compostos clorats, la irradiació UV i l'ozonització es consideren efectives per reduir els virus a les aigües residuals i produir aigua regenerada virològicament segura.

Tot i això, els mecanismes d'inactivació viral proposats pels desinfectants són molt diversos (Wigginton and Kohn, 2012), resumits en danys en proteïnes virals o danys en el genoma (Figura 8). Perquè un virus sigui infecciós, ha de tenir intactes les seves funcions bàsiques. Unió al seu hoste, injecció del genoma, replicació i traducció. Si una d'aquestes funcions es veu compromesa, condueix a la inactivació viral. No obstant això, a causa de la diferent composició i estructura tridimensional de les proteïnes i els àcids nucleics, el mecanisme virucida dels desinfectants resulta ser diferent per a diferents tipus de virus (Ge et al., 2021). A més, l'eficàcia del desinfectant varia en gran mesura segons el tipus i la soca dels virus i el seu estat físic. Així doncs, virus altament relacionats poden presentar diferents cinètiques de desinfecció quan es tracten amb el mateix biocida (Battigelli et al., 1991; Ge et al., 2021; Gerba et al., 2018).

L'efecte biocida d'un desinfectant s'expressa com un valor de CT, que és un producte de la concentració de desinfectant (C) i el temps d'exposició (T) sota unes condicions determinades de pH i temperatura. Els valors de CT permeten realitzar comparacions de l'efectivitat d'inactivació entre microorganismes front a una mateixa dosi de desinfectant (US EPA Office of Water, 2010).

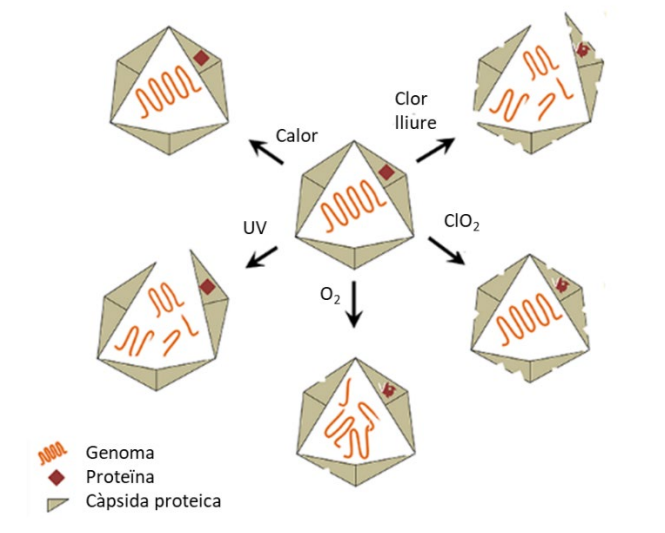


Figura 8. Mecanismes d'inactivació viral dels diferents desinfectants. Extreta de Wigginton et al., 2012.

#### 4.1.1. Clor, Cloramines i Diòxid de clor

La desinfecció amb clor és la forma de desinfecció més utilitzada en els tractaments d'aigües. El clor es pot aplicar com a gas clor, hipoclorit de sodi (NaClO) en forma líquida o hipoclorit de calci (Ca(ClO)<sub>2</sub>) en forma sòlida.

El clor es dismuta amb l'aigua per formar ions clorur, àcid hipoclorós (HOCl), considerat el principal desinfectant, hipoclorit (OCl<sup>-</sup>) i hidrogen (H<sup>+</sup>) depenent del pH en aigua, sent més estable en condicions de pH àcides (Deborde and von Gunten, 2008). Pel que fa al mecanisme d'acció del clor, el seu potencial oxidant no selectiu afecta diversos components cel·lulars, danyant les càpsides virals i destruint els àcids nucleics exposats (Wigginton et al., 2012), a més degut al seu baix pes molecular fa que pugui difondre entre les membranes cel·lulars (Albrich and Hurst, 1982).

Un altra forma clorada amb un alt potencial d'oxidació és el diòxid de clor (ClO<sub>2</sub>). És un virucida més eficaç que el clor però molt inestable i es descompon fàcilment per la qual cosa s'ha de generar in situ.

Quan es cloren efluent secundaris que contenen nitrogen el clor reacciona per formar cloramines on les formes dominants són la monoclорamina (NH<sub>2</sub>Cl)

i la dicloramina ( $\text{NHCl}_2$ ), i la forma menys comuna és la tricloramina ( $\text{NCl}_3$ ). Aquests tipus de cloramines també serveixen com a desinfectants, però, són significativament menys efectives per inactivar patògens, especialment virus, a més que reaccionen més lentament en comparació amb el clor lliure (Cheremisinoff, 2002).

Un dels principals problemes d'utilitzar clor com a desinfectant és que pot combinar-se amb la matèria orgànica per formar subproductes de desinfecció tòxics i mutagènics, com són trihalometans, àcids haloacètics i clorat (EPA, 1999), els quals s'han de controlar post-tractament per no superar els nivells acceptables pel consum (Krasner et al., 2006), establerts en 100 ppb ( $\mu\text{g/L}$ ) per l'OMS i 80 ppb per l'EPA. La formació i distribució de subproductes de desinfecció (DBP) depèn de la dosi de cloració, dels nivells de precursors orgànics, temps de contacte, pH i la concentració de bromur.

Finalment, després de les reaccions del clor amb altres molècules, l'àcid hipoclorós i l'hipoclorit restants seran l'anomenat clor lliure disponible romanent a l'aigua com a desinfectant residual que pot ser útil en cas de contaminacions posteriors. Conseqüentment, la inactivació dels diferents patògens, per tant, dependrà de la quantitat de clor lliure disponible, del pH i temperatura i de la matèria orgànica i inorgànica present en l'aigua.

Entre els agents desinfectants disponibles, el clor lliure (en forma d'hipoclorit de sodi) i la mono cloramina segueixen sent els desinfectants més utilitzats a causa del seu baix cost i eficàcia per a la inactivació de patògens (Collivignarelli et al., 2018). No obstant això, pel que fa a la inactivació viral els valors d'eficiència d'eliminació de virus depenen molt del desinfectant, del virus i de les condicions d'operació, de manera que les eficiències poden variar molt fins i tot dins del mateix reactor per a un tractament determinat (Sano et al., 2016). En la Figura 9 extreta de Rachmadi et al., 2020 es poden observar les diferents susceptibilitats dels virus front a un mateix desinfectant.

## Introducció

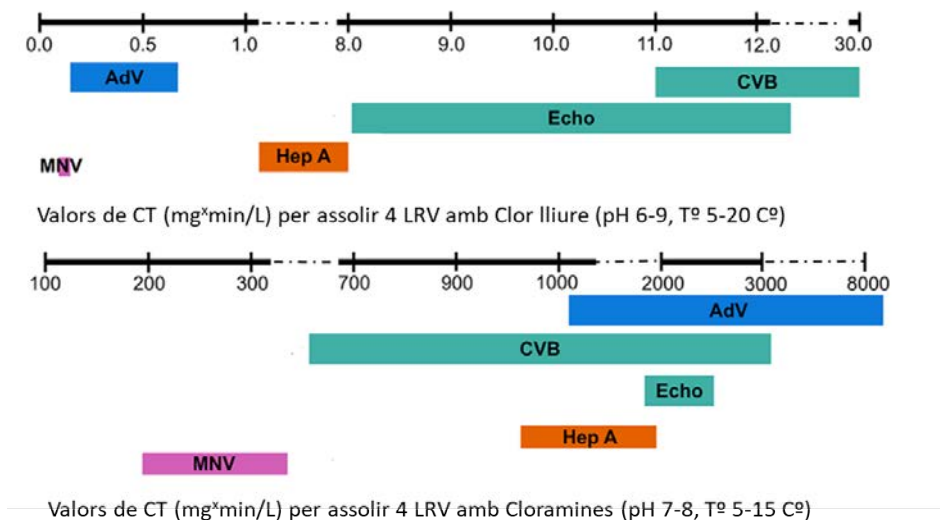


Figura 9. Valors de CT necessaris per reduir 4 logaritmes mitjançant clor lliure (dalt) i cloramines (baix) a condicions específiques de pH i temperatura.  
Extreta de Rachmadi et al., 2020

### 4.1.2. Àcid peracètic (PAA)

El PAA es pot utilitzar com a desinfectant d'aigües residuals, tot i que actualment només hi ha poques EDAR que utilitzen PAA, però té una llarga història d'ús a les indústries alimentàries, mèdiques i farmacèutiques, ja que un dels principals avantatges és que no forma subproductes de desinfecció nocius coneguts. El PAA es lliura com una barreja en equilibri d'àcid acètic, peròxid d'hidrogen, PAA i aigua. El rendiment del PAA com a desinfectant depèn de la qualitat de l'aigua i les condicions de funcionament (Smith, 2014). L'àcid peracètic inactiva bacteris, fongs i llevats gram-positius i gram-negatius en <5 minuts a <100 ppm (mg/mL). En presència de matèria orgànica, es requereixen 200-500 ppm. Per als virus, el rang de dosificació és més ampli (12-2250 ppm), per exemple per inactivar poliovirus en extracte de llevat es necessita una dosi de 1500 a 2250 ppm durant 15 minuts (US EPA, 2018).

#### 4.1.3. Ozó

L'ozó (O<sub>3</sub>) és un potent oxidant, capaç de descompondre els compostos orgànics, inclosos els compostos responsables del mal gust i olor i components traces de components químics. Al reaccionar amb l'aigua genera diversos tipus de radicals lliures i ions com són HO·, HO<sub>2</sub>·, O, O<sub>2</sub>. Aquests radicals lliures oxiden les estructures virals fins la pèrdua de la capacitat infecciosa de manera diferencial dependent del virus (Figura 10).

L'ozó bé pot oxidar l'embolcall viral si n'hi ha, les proteïnes de la càpsida, els residus d'aminoàcids exposats donant lloc a una capacitat de plegament anormal i a canvis d'estructures o també s'ha descrit oxidació preferent en certes bases atacant els dobles enllaços carboni-nitrogen (Murray et al., 2008).

Tot i que és un fort oxidant, els principals inconvenients de l'ozó és que a banda de que la seva utilització és més cara que el clor, al ser un gas tant volàtil no té poder residual i ha de ser generat in situ.

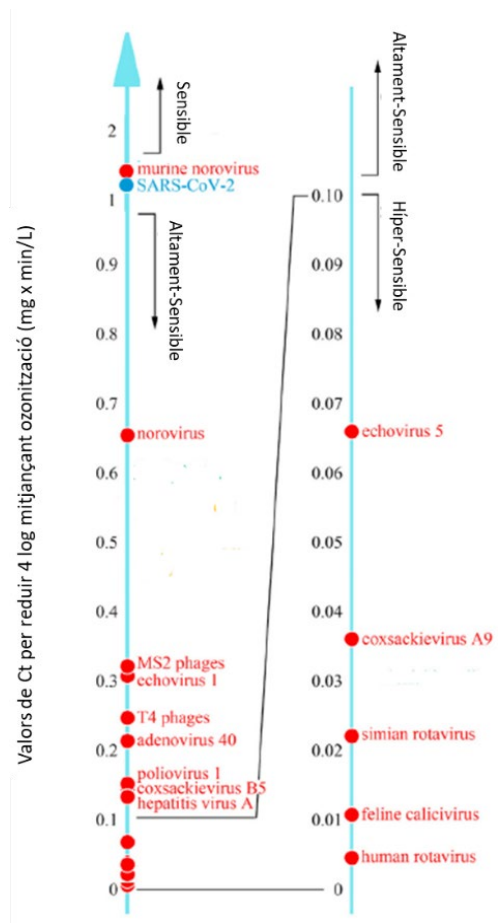


Figura 10. Valors de CT necessaris per reduir 4 logaritmes de diferents virus mitjançant ozonització.

Figura extreta de Kong et al., 2021

#### 4.1.4. UV

La llum UV es considera un mètode de desinfecció biofísica principalment per la seva capacitat per evitar que els microorganismes es repliquin. Classificada en tres grups segons la seva longitud d'ona, UVA (315-290 nm), UVB (280-315 nm) i UVC (100-280 nm). La UVC, molt a prop del 260 nm la longitud d'ona que més absorbeixen els àcids nucleics, produeix danys al genoma dels microorganismes principalment per la dimerització de timines o uracils, a més els radicals hidroxil produïts durant

## Introducció

la fotocàtlisi danyen la càpsida proteica contribuint així a la inactivació (Smith, 2014; US EPA, 2018).

La resistència dels virus a la irradiació UV és generalment més elevada que la dels bacteris. La inactivació de 4 logs de bacteris es pot obtenir fàcilment amb una dosi UV de 10 mJ/cm<sup>2</sup>. Mentre que les dosis per assolir la mateixa taxa d'eliminació de virus varien molt entre 10 i 140 mJ/cm<sup>2</sup> (Figura 11) (Kong et al., 2021).

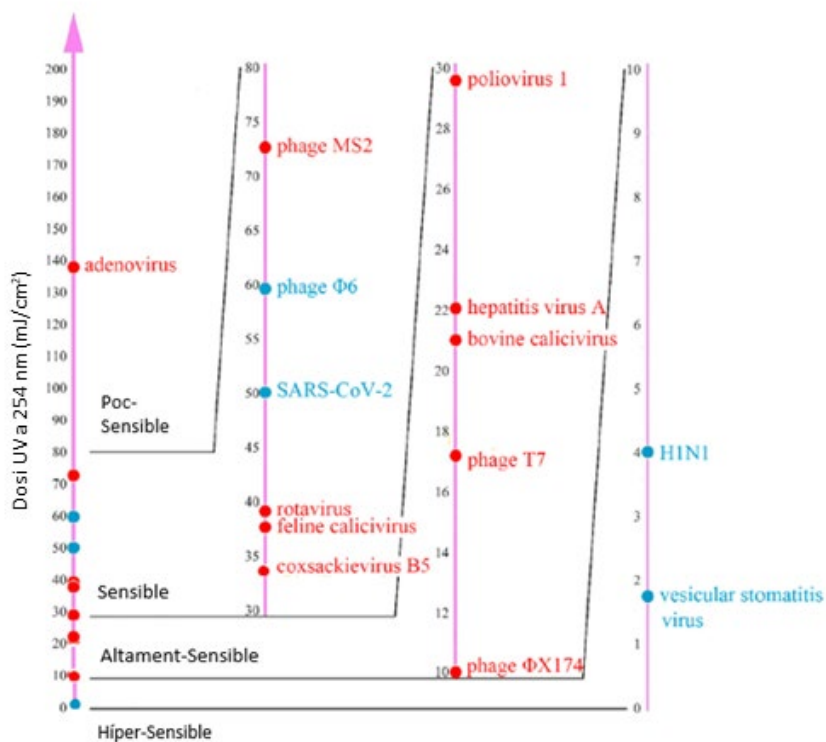


Figura 5. Dosi UV a 254 nm necessària per a reduir 4 logaritmes de diferents virus.  
Figura extreta de Kong et al., 2021.

El manual d'orientació de la USEPA per al compliment dels requisits de filtració i desinfecció per als sistemes públics d'aigua que utilitzen fonts d'aigua superficial, estableix que calen valors de Ct de 3, 4 i 6 mg × min/L per obtenir un 2, 3 i 4 logaritmes de reducció de en aigua a 10 °C i pH 6-9 de clor lliure. Mentre que les pautes d'aigua potable de l'OMS estableixen que un valor de CT oscil·la entre 2 i 30 mg × min/L per obtenir una reducció de 2 log<sub>10</sub> a 0-10 °C i pH 7-9.8.



Aquest manuals i pautes a seguir estableixen valors de forma generalitzada, sense establir valors de CT de referència per a cada virus entèric enumerat com a contaminant de l'aigua per la USEPA i l'OMS i sense tenir en compte les diferents susceptibilitats i resistències dels virus, ni el tipus d'aigua, fet que pot suposar un risc microbiològic.

### 4.2. Tractaments de desinfecció d'aigua a nivell domiciliar

En moltes regions del món no tenen accés ni a una xarxa de distribució ni al sanejament de l'aigua. Així doncs, els tractaments d'aigua a nivell domiciliar, (Household Water Treatments and Safe Storage) o tractaments d'aigua al punt d'ús (Point-of-Use water treatments), han esdevingut una alternativa per millorar la qualitat de l'aigua i reduir les malalties diarreiques (Mohamed et al., 2016; WHO and UNICEF, 2019).

Els mètodes de desinfecció utilitzats àmpliament per al tractament de l'aigua domèstica són: Filtres d'aigua ceràmics, filtres de sorra, cloració en recipients tancats i amb aixeta, desinfecció amb llum solar, desinfecció tèrmica i la combinació de sistemes de floculació i cloració.

Existeixen un seguit de productes comercials per tractar l'aigua a nivell domiciliar com són per exemple els sobres de floculació-cloració, (Flocculation-Chlorination Sachets) o els filtres portàtils FAIRCAP que es poden acoblar a botelles de plàstic. Tanmateix, per poder comercialitzar un producte com a tractament d'aigua domiciliar l'OMS estableix guies i requeriments mínims de qualitat, per exemple per poder validar un sistema de filtració ha d'estar avaluat microbiològicament seguint el protocol International Scheme to Evaluate Household water Treatment Technologies. Filtration Batch System Technology.

Selecció del mètode de tractament més adequat per a les circumstàncies específiques d'una llar o comunitat sovint és una decisió complexa. L'opció més adequada per a una llar o comunitat depèn de les condicions existents d'aigua i sanejament, la qualitat de l'aigua, l'acceptabilitat cultural, la viabilitat d'implementació, les cadenes de subministrament, la disponibilitat de tecnologia i altres condicions locals (Centers for Disease Control and Prevention, 2019).

## Introducció

### 4.3. Processos d'electro-oxidació avançada per la desinfecció d'aigües

Els processos electroquímics avançats (EAOP) han sorgit com una alternativa sostenible i eficaç per a la remediació d'aigües que contenen contaminants orgànics persistents i, en menor mesura, per a la desinfecció de l'aigua (Gassie and Englehardt, 2017; Moreira et al., 2017; Rajasekhar et al., 2020).

Aquests mètodes estan basats en una sèrie de reaccions químiques, que tenen lloc dins de la cel·la electroquímica on hi ha un procés d'oxidació a l'ànode, i un de reducció al càtode amb despesa d'energia elèctrica, on els elèctrodes es troben situats en paral·lel amb les cares enfrontades amb una separació mínima (Figura 12).

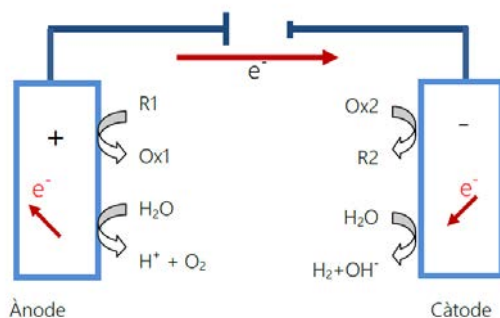


Figura 6. Reaccions químiques d'oxidació (ànode) i de reducció (càtode) que es donen en una cel·la electroquímica.

Els tractaments d'electrooxidació (EO), són els EAOP més senzills per les mínimes restriccions experimentals i l'alta versatilitat per tractar efluent amb característiques molt diferents (Martínez-Huitle et al., 2015). Els ànodes amb un gran sobrepotencial d'evolució d'oxigen s'utilitzen per a la generació in situ d'espècies reactives d'oxigen (ROS). El radical hidroxil ( $\bullet OH$ ) predomina com a ROS principal, però va acompanyat de peròxids, radical superòxid i oxigen singlet ( $O_2$ ), tots ells amb un alt poder oxidatiu.

Així doncs, els mecanismes de degradació de contaminants o inactivació de microorganismes es du a terme mitjançant l'oxidació anòdica directa i mitjançant diferents tipus de reaccions d'oxidació mediatades, com les que impliquen el clorur com a precursor d'oxidants. Quan la solució aquosa conté ions clorur, es generen espècies reactives de clor (RCS) o clor actiu (és a dir,

$\text{Cl}_2$ ,  $\text{HClO}$  i  $\text{ClO}^-$ ) mitjançant la combinació amb els ROS generats a la superfície de l'ànode (Sirés et al., 2014).

Els paràmetres més importants que afecten el procés electroquímic són la composició de la dissolució tractada, la hidrodinàmica del sistema, el tipus de material dels elèctrodes i la densitat de corrent o potencial aplicats, ja que determinen la distribució d'oxidants i subproductes.

A més dels ions presents en el medi, el material de l'ànode també és un factor a tenir en compte en l'electrooxidació perquè està relacionat amb la quantitat i l'activitat de les espècies oxidants generades. Els elèctrodes es classifiquen en elèctrodes actius o no actius, segons el comportament dels radicals hidroxil (OH) produïts per la descomposició oxidativa de l'aigua sobre la superfície de l'elèctrode. Per als ànodes actius, com els ànodes dimensionalment estables (DSA) com  $\text{IrO}_2$  i  $\text{RuO}_2$ , la mineralització dels orgànics és baixa perquè la majoria de l'OH fisisorbit sobre la superfície de l'ànode es converteix en "superòxid" quimiosorbit amb un baix poder d'oxidació (Dbira et al., 2019; Moreira et al., 2017; Rajasekhar et al., 2020; Sirés et al., 2014). Per contra, en els ànodes no actius com els ànodes de diamant dopats amb bor (BDD), els OH generats són més actius perquè s'adsorbeixen menys als ànodes i són més lliures en el medi, presentant una gran capacitat per degradar la càrrega orgànica (Dbira et al., 2019). Per tant, s'espera que el clor activat es produeixi més en ànodes dimensionalment estables (DSA) que en ànodes de diamant dopats amb bor (BDD), a causa de la seva major capacitat electrocatalítica amb espècies de clor. En canvi, l'ànode BDD genera més OH perquè són menys adsorbits i més lliures en el medi (Bruguera-Casamada et al., 2016).

Pel que respecta a la densitat de corrent o potencial aplicats, a major intensitat i llargs períodes de temps, es generen subproductes de desinfecció (DBP) tòxics i mutagènics, com els trihalometans, àcids haloacètics i clorat (Ghernaout and Elboughdiri, 2020; Jasper et al., 2017) i, per tant, el seu control és essencial. Com ja s'ha comentat en l'apartat 4.1., quan s'utilitzen formes clorades com a desinfectant, la presència de precursor orgànics esdevé en l'aparició de DBP. Així doncs, durant l'oxidació mediada pel clor també es formen DBP els quals depenen fortament de la dosi de cloració, la composició de l'aigua (nivells de precursors orgànics), el temps de contacte, el pH, la concentració de bromur i de la densitat de corrent aplicada, que quant major sigui, major producció d'oxidants es formaran amb la formació conseqüent de subproductes.

## Introducció

Pel que fa a la viabilitat tècnica dels EAOP per degradar diverses classes de compostos orgànics persistents i alguns patògens en diferents matrius, s'han reportat altes taxes d'eliminació de contaminants (Kokkinos et al., 2021a; Li et al., 2021; Mousset et al., 2021; Sanchis et al., 2021; Sirés et al., 2014). No obstant això, els assajos de desinfecció microbiana s'han centrat principalment en la inactivació bacteriana i, en general, en l'ús de solucions sintètiques. Aquest fet, sumat a l'ampli ventall d'EAOP i als nombrosos paràmetres a mantenir sota control, condueix a dades i conclusions contradictòries de complexa interpretació, limitant l'aplicabilitat real d'aquests sistemes avançats (Anfruns-Estrada et al., 2017; Huang et al., 2016a; Rajasekhar et al., 2020; Valero et al., 2017).

Tot i això, un punt fort d'aquests mètodes és el baix consum d'energia requerit, que obre la porta al tractament sostenible de l'aigua amb dispositius alimentats amb energies renovables (Ganiyu et al., 2020). En aquest context, es poden desenvolupar unitats descentralitzades de tractament d'aigües per tractar aigües residuals de petites comunitats o per aplicar un tractament final de desinfecció a l'aigua d'irrigació (Huang et al., 2016b; Mousset et al., 2021; Sirés et al., 2014).

D'altra banda, existeixen altres tècniques d'EAOP com són l'electro-fenton, fotoelectro-fenton o la separació de fases que s'apliquen al tractament d'aigües residuals i industrials. En l'electro-fenton es produeixen radicals altament reactius d'hidroxil ( $\text{OH}\cdot$ ) en condicions àcides, pressió i temperatura ambient, usant peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) catalitzat generalment amb ferro. Existeixen diferents configuracions i modificacions com el Fotoelectro-Fenton en què s'aplica una fase amb radiació ultraviolada de 180-400 nm per augmentar la capacitat oxidativa, ja que augmenta la velocitat de regeneració del  $\text{Fe}^{2+}$  al fotoreduir-se l'espècie  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$  present a la dissolució i d'altra banda, els complexos formats pel  $\text{Fe}^{3+}$  i els àcids carboxílics generats són fotodescarboxilats, permetent una major mineralització dels contaminants. Finalment, els sistemes de separació de fases, es basen en la producció electroquímica d'un agent coagulant. Normalment s'empra un ànode de ferro o alumini que genera contínuament al medi ions  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Al}^{3+}$ . Dins de la separació de fases trobem l'electroflotació, l'electrofloculació i l'electrocoagulació (Sirés et al., 2014).

L'ús de reactors amb elèctrodes en configuració en forma de placa estan limitats a causa de la seva baixa àrea de contacte, requerint més superfície

d'elèctrode, més quantitat d'elèctrodes o temps de contacte més llargs per aconseguir una desinfecció eficient. Per la qual cosa, estan sorgint alternatives com són els nous materials tridimensionals (3D) a base de carboni, els quals s'utilitzen àmpliament com a elèctrodes d'ànode i/o càtode a causa de la seva gran superfície específica, conductivitat excepcional i estabilitat química (Ni et al., 2020). A més a més, són alternatives més econòmiques que no els elèctrodes esmentats anteriorment. Un exemple són els reactors tridimensionals on l'ànode/càtode el construeixen a partir d'òxid de grafè líquid al qual li afegeixen urea o altres compostos com bor per afavorir la producció d'espècies oxidants, donant així diferents característiques al material (Norra et al., 2022). El grafè líquid s'afegeix sobre llana de vidre perquè tingui un suport i formar així el que s'anomena esponja de grafè. En aquest cas, tant l'ànode com el càtode del reactor són dos esponges iguals de grafè, on en la superfície de cada esponja es col·loca una malla d'acer inoxidable pel que passa el corrent. Existeixen poc estudis que avaluen la capacitat de desinfecció d'aquest sistema, ja que estan més centrats en eliminar contaminants orgànics persistents. Tanmateix, dels estudis realitzats de desinfecció descriuen eliminacions de fins a 5 logaritmes per a *E. coli* a temps baixos de contacte i amb pocs requeriments energètics (5.70 kWh/m<sup>3</sup>). On el principal mecanisme d'inactivació bacteriana es basa en l'electrosorció dels bacteris a la superfície de l'ànode i la lisi cel·lular a causa de la ruptura de les parets cel·lulars per electroporació (Ni et al., 2020; Norra et al., 2022).

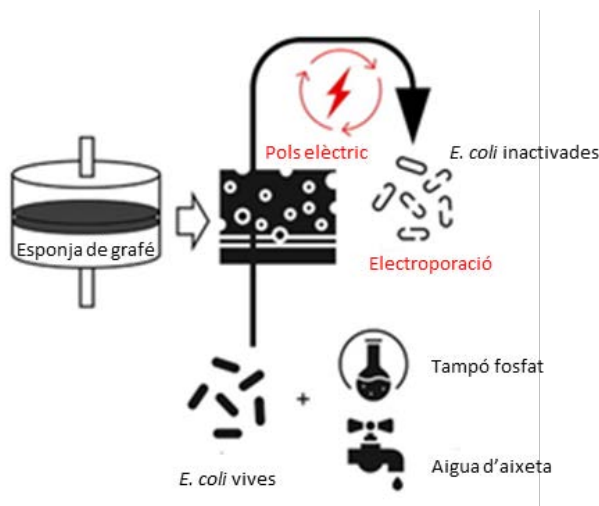


Figura 7. Representació conceptual d'inactivació bacteriana mitjançant reactors de grafè (extreta de Norra et al., 2022).

## Introducció

La autora de la tesi amb l'equip del laboratori han realitzat assajos preliminars amb aquest tipus de sistema amb virus humans obtenint reduccions de CVB5 del 80% amb temps de contacte molt breus.

Tot i que els sistemes electroquímics semblen ser una opció prometedora, avui en dia estan molt limitats en quant al tipus d'aigua que poden tractar, i sobretot per l'escalat dels prototips per al tractament de grans volums d'aigua.

## 5. Virus model seleccionats

Per l'elaboració d'aquesta tesi doctoral s'han utilitzat diversos virus model (Taula 6) per validar i caracteritzar mètodes de concentració i desinfecció d'aigües.

Taula 6. Principals característiques dels virus model utilitzats per la validació i caracterització de mètodes.

Virus model ( <i>Família</i> )	Genoma	Mida (nm)	Hoste	Característica	Aplicació en aquesta tesi
HAdV <i>Adenoviridae</i>	ADN 36-37 kb	70-100	Humans	Patogen humà Indicador de contaminació fecal humana	Caracterització de mètodes de concentració
JCPyV <i>Polyomaviridae</i>	ADN 5,3 kb	50-60			
CVB5 <i>Picornaviridae</i>	ARN 7,4 kb	30		Patogen humà Replicació senzilla mitjançant cultiu cel·lular	
<i>Bacteriòfag MS2</i> <i>Leviviridae</i>	ARN 3,7 kb	26	Enterobacteris	Genoma similar a les famílies <i>Picornaviridae</i> , <i>Calciviridae</i> i <i>Astroviridae</i> Fàcilment cultivables	Caracterització de mètodes de concentració Validació de mètodes de desinfecció
<i>Bacteriòfag ΦX174</i> <i>Microviridae</i>	ADN 5,4 kb	30		Semblança a viurs entèrics d'ADN Fàcilment cultivables	
MHV <i>Coronaviridae</i>	ARN 31 kb	85	Ratolins	Estructuralment semblant al SARS-CoV-2 Replicació senzilla mitjançant cultiu cel·lular	Caracterització de mètodes de concentració
TuV <i>Calciviridae</i>	ARN 7,3-8,3 kb	27-40	Macaco Rhesus ( <i>Macaca mulatta</i> )	Estructuralment semblant al HuNoV Replicació senzilla mitjançant cultiu cel·lular	Assajos de desinfecció com a virus model de HuNoV





The background is a vibrant, abstract composition of thick, expressive brushstrokes. The color palette is diverse, featuring deep blues and purples in the lower-left quadrant, bright cyan and turquoise in the center, and a range of pinks and magentas in the upper-right. The strokes are layered and textured, creating a sense of movement and depth. The overall effect is a dynamic, multi-colored field.

**OBJECTIUS**



## 2. OBJECTIUS

L'objectiu global de la tesi és avançar en el control de la contaminació viral a l'aigua, optimitzant, desenvolupant i caracteritzant mètodes per a la detecció, quantificació i desinfecció de patògens, considerant el marc de transició energètica i ecològica i la necessitat de reutilització d'aigua mitjançant l'aplicació de tecnologies sostenibles.

Els objectius plantejats s'organitzen en dos blocs temàtics: El primer, centrat en l'optimització, desenvolupament i validació de nous mètodes de concentració d'aigües, per a la detecció de virus a l'ambient aplicables a diferents contextos. I el segon, centrat en l'avaluació de l'eficiència de desinfecció de sistemes electroquímics d'oxidació avançada, com a tecnologia sostenible per a la reutilització d'aigües.

Els objectius específics han estat:

1. Desenvolupar tecnologies i equipament per a la detecció de virus en mostres d'aigua en àrees de baixa renda i situacions de crisi humanitària.
2. Avaluar, caracteritzar i optimitzar, un mètode ràpid, i portàtil, de concentració de grans volums d'aigua per a la detecció de virus.
3. Avaluar i caracteritzar mètodes ràpids de detecció per a virus embolcallats en aigües residuals amb focus en la detecció de SARS-CoV-2.
4. Avaluar l'aplicabilitat i eficiència de desinfecció de dos sistemes electroquímics d'oxidació avançada com a tractaments sostenibles per a la reutilització d'aigües.
5. Determinar les cinètiques d'inactivació de diversos microorganismes front a la desinfecció electroquímica d'aigües naturals i avaluar la idoneïtat dels indicadors microbians actuals.



The background is an abstract composition of thick, expressive brushstrokes in a variety of colors including shades of blue, cyan, green, magenta, and pink. The strokes are layered and textured, creating a sense of movement and depth. The colors transition from cooler blues and greens at the top to warmer pinks and magentas at the bottom.

**INFORME DELS  
ARTICLES**



### 3. INFORME DELS ARTICLES

#### 3.1. LLISTAT D'ARTICLES INCLOSOS A LA TESI

La present tesi està basada en les següents publicacions detallades per ordre de presentació:

- Aguado, D., **Forés, E.**, Guerrero-Latorre, L., Rusiñol, M., Martínez-Puchol, S., Codony, F., Girones, R., Bofill-Mas, S. VirWaTest, A Point-of-Use Method for the Detection of Viruses in Water Samples. Journal of Visualized Experiments (147), e59463, doi:10.3791/59463 (2019).
- **Forés, E.**, Rusiñol, M., Itarte, M., Martínez-Puchol, S., Calvo, M., Bofill-Mas, S., 2022. Evaluation of a virus concentration method based on ultrafiltration and wet foam elution for studying viruses from large-volume water samples. A: Sci Total Environ. 829, 154431. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154431>.
- **Forés, E.**, Bofill-Mas, S., Itarte, M., Martínez-Puchol, S., Hundesa, A., Calvo, M., Borrego, C. M., Corominas, Ll., Girones, R. i Rusiñol, M., 2021. Evaluation of two rapid ultrafiltration-based methods for SARS-CoV-2 concentration from wastewater. A: Sci Total Environ. 768, 144786. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144786>.
- **Forés, E.**, Mejías-Molina, C., Ramos, A., Itarte, M., Hundesa, A., Rusiñol, M., Martínez-Puchol, S., Esteve-Bricullé, P., Espejo-Valverde, A., Sirés, I., Calvo, M., Araujo, R.M., Girones, R. Evaluation of pathogen disinfection efficiency of electrochemical advanced oxidation to become a sustainable technology for water reuse. Manuscrit en procés de revisió a la revista Chemosphere.

### 3.2. INFORME DE COAUTORIA

- Aguado, D., **Forés, E.**, Guerrero-Latorre, L., Rusiñol, M., Martínez-Puchol, S., Codony, F., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2019. VirWaTest, A Point-of-Use Method for the Detection of Viruses in Water Samples. *Journal of Visualized Experiments* (147), e59463, doi:10.3791/59463.

L'estudi forma part del projecte VirWaTest, finançat per *Humanitarian Innovation Fund* (HIF) en el que la doctoranda va participar activament. L'estudiant va participar en el disseny experimental, realització d'experiments, anàlisi de dades, organització de mostres i validació dels mètodes, conjuntament amb els altres coautors. El treball realitzat es va centrar en el desenvolupament i validació dels mètodes de concentració d'aigües i extracció d'àcids nucleics VirWaTest, mètodes adaptables a situacions de crisis humanitàries o a contextos de baixa renda.

- **Forés, E.**, Rusiñol, M., Itarte, M., Martínez-Puchol, S., Calvo, M., Bofill-Mas, S., 2022. Evaluation of a virus concentration method based on ultrafiltration and wet foam elution for studying viruses from large-volume water samples. *A: Sci Total Environ.* 829, 154431. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154431>

L'estudi va formar part dels projectes nacionals MetaPadFood (AGL2017-86797-C2-1-R) i UNBIASED (RTI2018-097346-B-I00), i del projecte europeu URBANWAT (PCI2019-103643). La doctoranda va participar activament en el disseny experimental, mostres, processament de mostres, anàlisi de dades i escriptura del manuscrit sota la supervisió de les codirectores de tesi.

- **Forés, E.**, Bofill-Mas, S., Itarte, M., Martínez-Puchol, S., Hundesa, A., Calvo, M., Borrego, C. M., Corominas, Ll., Girones, R. i Rusiñol, M., 2021. Evaluation of two rapid ultrafiltration-based methods for SARS-CoV-2 concentration from wastewater. *A: Sci Total Environ.* 768, 144786. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144786>

L'estudi va formar part dels projectes nacionals MetaPadFood (AGL2017-86797-C2-1-R) i UNBIASED (RTI2018-097346-B-I00), del projecte europeu URBANWAT (PCI2019-103643) i del monitoreig d'aigua residual per a l'estudi de la incidència de SARS-CoV-2 en els que la doctoranda ha participat activament. L'estudiant va participar en el processament de mostres, anàlisis

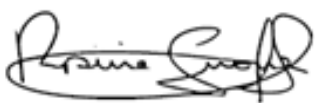


de dades i escriptura del manuscrit conjuntament amb la resta d'autors, sota la supervisió de les seves codirectores de tesi.

- **Forés, E.**, Mejías-Molina, C., Ramos, A., Itarte, M., Hundesa, A., Rusiñol, M., Martínez-Puchol, S., Esteve-Bricullé, P., Espejo-Valverde, A., Sirés, I., Calvo, M., Araujo, R.M., Girones, R. Evaluation of pathogen disinfection efficiency of electrochemical advanced oxidation to become a sustainable technology for water reuse. Manuscrit en procés de revisió a la revista Chemosphere.

L'estudi va formar part del projecte nacional MetaPadFood (AGL2017-86797-C2-1-R) en el que la doctoranda va participar activament en el disseny experimental, participació en mostrejos, desenvolupament de protocols, processament de mostres, anàlisi de paràmetres vírics i anàlisi global de dades i escriptura del manuscrit sota la supervisió de les codirectores de tesi.

Signat,



Dra. Rosina Girones Llop  
Barcelona, Novembre 2022



Dra. Sílvia Bofill Mas  
Barcelona, Novembre 2022

### 3.3. INFORME SOBRE ELS FACTORS D'IMPACTE

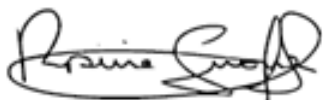
Els treballs que formen part de la present tesi doctoral s'han publicat o sotmès a publicació en revistes científiques rellevants per a la línia d'investigació en la qual la doctoranda ha participat durant els 4 anys de tesi.

L'article "VirWaTest, A Point-of-Use Method for the Detection of Viruses in Water Samples" s'ha publicat a la revista *Journal of Visualized Experiments*. L'índex d'impacte de la revista a l'any 2019 era de 1.163 (Q3).

Els articles "Evaluation of a virus concentration method based on ultrafiltration and wet foam elution for studying viruses from large-volume water samples" i "Evaluation of two rapid ultrafiltration-based methods for SARS-CoV-2 concentration from wastewater" s'han publicat a la revista *Science of the Total Environment* l'any 2021 i 2022 respectivament. L'índex d'impacte de la revista durant aquest període era de 7.963 (Q1).

L'article "Evaluation of pathogen disinfection efficiency of electrochemical advanced oxidation to become a sustainable technology for water reuse" està sota revisió a la revista *Chemosphere* (Q1).

Signat,



Dra. Rosina Girones Llop  
Barcelona, Novembre 2022



Dra. Sílvia Bofill Mas  
Barcelona, Novembre 2022

The background is a vibrant, abstract composition of thick, expressive brushstrokes. The color palette is diverse, featuring shades of deep blue, bright cyan, magenta, and pink, all set against a white base. The strokes are layered and textured, creating a sense of movement and depth. The overall effect is reminiscent of a modern, expressive painting or digital art style.

# ARTICLES



## 4. ARTICLES

### 4.1. VirWaTest, UN MÈTODE PER A LA DETECCIÓ DE VIRUS EN MOSTRES D'AIGUA EN EL PUNT D'ÚS

*“VirWaTest, A Point-of-Use Method  
for the Detection of Viruses in Water Samples”*

Aguado, D., Forés, E., Guerrero-Latorre, L., Rusiñol, M., Martínez-Puchol, S., Codony, F., Girones, R., Bofill-Mas, S.

*Journal of Visualized Experiments (147)*, doi:10.3791/59463

Els virus excretats pels éssers humans i els animals poden contaminar les fonts d'aigua i suposar un risc per a la salut humana quan aquesta aigua s'utilitza per beure, el reg d'aliments, el rentat, etc. Els indicadors clàssics com els enterobacteris fecals no sempre correlacionen amb la presència de patògens virals, per la qual cosa la detecció de patògens i indicadors virals és rellevant per a adoptar mesures de mitigació de riscos, especialment en escenaris de crisi humanitària i en zones on els brots virals transmesos pel aigua són freqüents. Actualment, hi ha diverses opcions comercials que permeten la quantificació dels bacteris indicadors fecals (FIB) en el punt d'ús. No obstant això, aquestes opcions comercials no estan disponibles per a detectar virus, ja que la seva detecció està basada en mètodes moleculars que no són fàcilment reproduïbles en contextos d'emergència humanitària.

El present estudi descriu un mètode que permet la concentració de virus a partir de mostres d'aigua de 10 L, així com l'extracció i detecció d'àcids nucleics en el mateix punt d'ús, amb un equip senzill i portàtil. Es va desenvolupar també un equipament portàtil, adaptant diferents components i processos al treball fora dels laboratoris especialitzats. Això permet analitzar mostres d'aigua per a la presència de diversos virus en escenaris de crisi humanitària, i en qualsevol context en què no es disposi d'un laboratori equipat. Alternativament, el mètode permet concentrar virus presents en les mostres d'aigua i l'enviament del concentrat a un laboratori a temperatura ambient per al seu posterior anàlisi.

El mètode desenvolupat consta de tres passos diferents:

El primer, la concentració de les partícules virals, mitjançant una adaptació del mètode de floculació de llet descremada. El mètode original es va modificar perquè fos independent d'una font d'alimentació, més senzill i sense passos de centrifugació. Es va determinar la recuperació del mètode en aigües subterrànies per al bacteriòfag MS2 i l'indicador fecal de contaminació humana HAdV, obtenint recuperacions del 3,01% al 18,02% per a MS2 i del 17,52% al 44,22% per a HAdV.

El segon pas, l'extracció d'àcids nucleics VirWaTest, basat en l'ús partícules magnètiques. És fàcil i ràpid i permet processar diverses mostres al mateix temps i mostra una eficiència de recuperació equivalent a mètodes comercials. Aquest mètode es va comparar amb un mini kit d'ARN comercial (QIAamp Viral RNA Mini Kit) basat en l'ús de columnes de sílice. Es van concentrar 33 mostres d'aigua de riu i subterrània mitjançant el mètode de floculació de llet descremada i es van realitzar ambdós extraccions d'àcids nucleics. Els resultats de la comparació van mostrar que la recuperació del mètode VirWaTest va ser significativament més alta en 23/33 casos per a HAdV, així com per a MS2.

El tercer i últim pas, correspon a la detecció molecular mitjançant qPCR. L'adaptació es basa en la preparació prèvia dels tubs de PCR mitjançant l'assecat a l'aire d'encebadors (*primers*), sondes i suspensions estàndard i l'amplificació dels àcids nucleics gràcies a un termociclador portàtil que pot operar amb una bateria.

Per avaluar la viabilitat del mètode de concentració desenvolupat i comprovar que pot ser realitzat per usuaris no experts, dos equips d'Oxfam Water, Sanitation and Hygiene (WASH), un ubicat a Banghi (RCA, República Centreafricana), i l'altre a la zona de Pedernales (Equador), van recollir i concentrar cinc i sis mostres d'aigua de pou respectivament. Els concentrats virals d'ambdós llocs es van enviar al laboratori de Barcelona per a l'extracció d'àcids nucleics VirWaTest i la posterior quantificació viral. Una de les cinc mostres de Banghi va resultar positiva per a HAdV a una concentració de  $3,46 \times 10^2$  CG/L, mentre que la totalitat de les mostres concentrades a l'Equador van ser positives per HAdV amb valors de concentració que oscil·laven entre  $3,27 \times 10^1$  i  $1,80 \times 10^2$  GC/L. El bacteriòfag MS2 que va ser utilitzat com a control de procés intern, va ser detectar en totes les mostres, demostrant que el mètode es va realitzar correctament des de la concentració fins a la detecció.

Així doncs, el mètode VirWaTest, ha permès realitzar la detecció de virus en situacions on no es disposava d'un laboratori equipat, posant a disposició un

mètode de detecció viral de baix cost econòmic, reproduïble, metodològicament senzill i realitzable per personal no científic. Amb tot, el mètode desenvolupat és aplicable a estudis al terreny i a àrees de baixa renda, ajudant en la prevenció de brots vírics en situacions d'escassetat de recursos.





## Video Article

# VirWaTest, A Point-of-Use Method for the Detection of Viruses in Water Samples

David Aguado<sup>1</sup>, Eva Fores<sup>1</sup>, Laura Guerrero-Latorre<sup>1,2</sup>, Marta Rusiñol<sup>1</sup>, Sandra Martínez-Puchol<sup>1</sup>, Francesc Codony<sup>3,4</sup>, Rosina Girones<sup>1</sup>, Sílvia Bofill-Mas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Viruses Contaminants of Water and Food (VIRCONT), Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Section of Microbiology, Virology and Biotechnology, University of Barcelona

<sup>2</sup>Grupo de Investigación Biodiversidad, Medio Ambiente y Salud (BIOMAS), Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias (FICA), Ingeniería en Biotecnología, Universidad de las Américas

<sup>3</sup>Municipal Laboratory - Waters of Mataró

<sup>4</sup>GenIUL

Correspondence to: Sílvia Bofill-Mas at [sbofill@ub.edu](mailto:sbofill@ub.edu)

URL: <https://www.jove.com/video/59463>

DOI: [doi:10.3791/59463](https://doi.org/10.3791/59463)

Keywords: Immunology and Infection, Issue 147, Human viruses, adenoviruses, hepatitis E virus, fecal pollution, viral concentration, viral detection, PCR, point-of-use, humanitarian, sanitation, outbreak.

Date Published: 5/11/2019

Citation: Aguado, D., Fores, E., Guerrero-Latorre, L., Rusiñol, M., Martínez-Puchol, S., Codony, F., Girones, R., Bofill-Mas, S. VirWaTest, A Point-of-Use Method for the Detection of Viruses in Water Samples. *J. Vis. Exp.* (147), e59463, doi:10.3791/59463 (2019).

## Abstract

Viruses excreted by humans and animals may contaminate water sources and pose a risk to human health when this water is used for drinking, food irrigation, washing, etc. The classical fecal bacteria indicator does not always check for the presence of viral pathogens so the detection of viral pathogens and viral indicators is relevant in order to adopt measures of risk mitigation, especially in humanitarian scenarios and in areas where water-borne viral outbreaks are frequent.

At present, several commercial tests allowing the quantification of fecal indicator bacteria (FIB) are available for testing at the point of use. However, such commercial tests are not available for the detection of viruses. The detection of viruses in environmental water samples requires concentrating several liters into smaller volumes. Moreover, once concentrated, the detection of viruses relies on methods such as nucleic acid extraction and molecular detection (e.g., polymerase chain reaction [PCR]-based assays) of the viral genomes.

The method described here allows the concentration of viruses from 10 L water samples, as well as the extraction of viral nucleic acids at the point of use, with simple and portable equipment. This allows the testing of water samples at the point of use for several viruses and is useful in humanitarian scenarios, as well as at any context where an equipped laboratory is not available. Alternatively, the method allows concentrating viruses present in water samples and the shipping of the concentrate to a laboratory at room temperature for further analysis.

## Video Link

The video component of this article can be found at <https://www.jove.com/video/59463/>

## Introduction

During the first phases of any humanitarian emergency, access to clean water supplies, sanitation, and hygiene are critical for the survival of those affected. Therefore, monitoring water quality is a priority to prevent waterborne outbreaks. It is well-known that contaminated water is frequently the origin of diseases, but it is often difficult to determine the sources of viral outbreaks such as Hepatitis E virus (HEV), even with the availability of conventional laboratory methods. The control of water quality is based on the quantification of FIB<sup>1,2,3,4</sup>. However, it has been extensively documented that there is no correlation between the absence of FIB and the presence of viral waterborne pathogens such as rotavirus (RoV), norovirus (NoV), or HEV<sup>5,6</sup>. Thus, using the water quality criteria based on FIB might result in an underestimation of risks associated with the presence of waterborne viral pathogens. The surveillance of indicator viruses, such as human adenoviruses (HAdV), or specific pathogens would be helpful in defining the exposure to viral pathogens and identifying the potential source of human infection<sup>7,8,9,10</sup> and in validating the efficacy of sanitation measures<sup>11</sup>.

Until now, the detection of viruses in these scenarios relied on skilled staff and complex logistics. VirWaTest ([virwatest.org](http://virwatest.org)) is aimed at the development of a simple, affordable, and portable method for the concentration and subsequent detection of viruses from water samples at the point of use.

The virus concentration is based on the principle of organic flocculation of 10 L water samples, by which viruses are recovered in smaller volumes<sup>12,13</sup>. The flocs are collected and added to a buffer that lyses the viruses and prevents the nucleic acids from degradation when they stored at room temperature for not more than 2 weeks.

The nucleic acid extraction method is based on the use of magnetic particles to which the nucleic acids get adsorbed. They can be transferred from one washing buffer to another and finally into the elution buffer by using a magnetic pipette to which the particles attach. Viral nucleic acid suspensions obtained can be shipped to a reference laboratory where the detection can be performed using molecular methods based on PCR. For each nucleic acid extraction, two different quantities are tested to rule out enzymatic inhibition originated by the sample. Alternatively, with minimum equipment availability, PCR tests can be run at the point of use. The entire process is designed to be performed independently of a power supply (Figure 1).

A quantitative PCR assay to detect HAdV, excreted by humans and found in wastewater samples in high concentrations, has been adapted to be run at the point of use. HAdV are used as human fecal viral indicators. A PCR for the quantification of MS2 bacteriophage has been also adapted since MS2 is used in VirWaTest as process control. The method can be customized for the detection of any virus of interest.

After development, the VirWaTest method has been applied by the users in two different settings in the Republic of Central Africa (RCA) and Ecuador, providing feedback on the application of the protocol in real situations.

To our knowledge, this is the first procedure that allows the concentration and detection of viruses at the point of use, independent of any power supply, large equipment, and freezing/cooling conditions. It is recommended to collect two replicates of each water sample in order to obtain robust results.

## Protocol

### 1. Preparation and packaging

NOTE: The materials/equipment to be packed is listed in **Table 1**. Use gloves to handle the reagents required for the process control, the concentration reagents, the nucleic acid extraction reagents and the detection reagents. Wear protective glasses to handle the reagents required for nucleic acid extraction.

#### 1. Process control

1. Prepare MS2 bacteriophage stock culture (American Type Culture Collection [ATCC] 15597-B1) containing  $1 \times 10^{10}$  PFU/mL in the laboratory by following the ISO procedure 10705-1:1995<sup>14</sup>.
2. Then, aliquot 10  $\mu$ L of the suspension per tube containing  $1 \times 10^8$  PFU into 10 mL tubes and let the water evaporate at 37 °C. Use one tube per water sample.
3. Additionally, prepare one tube containing 10 mL of sterile distilled water per collected sample.

#### 2. Concentration reagents

1. For the preflocculated skimmed milk solution (PSM), use the following amounts to concentrate five 10 L water samples.
  1. Prepare a plastic tube containing 5 g of skimmed milk.
  2. Prepare a zipper plastic bag containing 16.66 g of sea salts.
  3. Prepare a plastic bottle containing 500 mL of distilled water.
2. Prepare the reagents required for pH adjustment. Use the following amounts to adjust the pH of the PSM and of five 10 L water samples.
  1. Add 5 g of citric acid 1-hydrate to a 10 mL plastic tube.  
CAUTION: Citric acid causes serious irritation when it comes in contact with eyes. If this occurs, rinse the eye cautiously with water for several minutes. If irritation persists, seek medical advice.
  2. Put 2 g of sodium hydroxide into a 10 mL plastic tube.  
CAUTION: Sodium hydroxide can cause severe skin burns and eye damage. If swallowed, rinse the mouth. Do not induce vomiting. If it comes in contact with the eyes, rinse cautiously with water for several minutes. Then, seek medical advice.
  3. Put 25 mL of sterile distilled water into a plastic container.
  4. Put 50 mL of sterile distilled water into a plastic container.
3. Prepare the sample conditioning sachet used for the flocculation, the preservative solution used to preserve the nucleic acids, and the neutralizing sachet to neutralize the discarded water and materials. Use the following amounts for each 10 L water sample to be tested.
  1. Put 15 g of sea salts and 8 g of citric acid 1-hydrate into a zipper plastic bag for the conditioning sachet.
  2. Add 2 mL of lysis buffer (**Table of Materials**) and 0,3 mL of nucleic acid preserving agent (**Table of Materials**) to a 5 mL tube.  
CAUTION: Lysis buffer contains guanidine thiocyanate and Triton X-100. Contact with acid liberates toxic gas, and it is harmful if swallowed, inhaled, or comes in contact with the skin. If swallowed, rinse the mouth. Do not induce vomiting. If it comes in contact with the skin, wash with plenty of water. Then, seek medical advice. Nucleic acid preserving agent causes skin and eye irritation and is harmful if swallowed. If it comes in contact with the skin or the eyes, rinse with abundant water for several minutes. In any case, especially if swallowed and feeling unwell, seek medical advice.
  3. Put 40 g of detergent powder into four zipper plastic bags.  
CAUTION: Powder detergent causes eye irritation. If it comes in contact with the eyes, rinse with abundant water for several minutes. If irritation persists or if swallowed, seek medical advice.

#### 3. Nucleic acid extraction reagents

1. Put 50  $\mu$ L of magnetic particles (**Table of Materials**) and 1 mL of ethanol 96% into a 5 mL tube which constitute the Binding Buffer.  
CAUTION: The magnetic particles buffer contains sodium azide, which forms a toxic gas when it comes in contact with acids or heavy metal ions and is toxic if ingested or when it comes in contact with skin. If ingested or in contact with skin, rinse the mouth or the skin with abundant water and seek medical advice. Ethanol is a highly flammable liquid and vapor and causes serious eye irritation. Keep

away from heat, hot surfaces, sparks, and any other ignition source. If it comes in contact with the skin or the eyes, rinse with abundant water. In case of ingestion of large amounts of water and/or if inhaled, go outside into the fresh air. In any case, seek medical advice.

2. Add 500  $\mu\text{L}$ , 600  $\mu\text{L}$ , and 200  $\mu\text{L}$  of washing buffers 1, 2, and 3, respectively (**Table of Materials**), to three 2 mL tubes.  
CAUTION: Washing buffers contain guanidinium thiocyanate and guanidinium chloride, which are harmful if inhaled or swallowed and irritate the skin and eyes. Contact with acids releases very toxic gas. If they come in contact with the skin or eyes, rinse with abundant water. If swallowed, rinse the mouth with abundant water. Do not induce vomiting. Always seek medical advice.
3. Add 120  $\mu\text{L}$  of elution buffer (**Table of Materials**) to a 0.5 mL tube.

#### 4. HAdV and MS2 detection reagents

NOTE: Two different nucleic acid extraction reactions may be analyzed simultaneously in each PCR assay if an 8-well thermocycler is used. For all PCR assays, prepare molecular biology water aliquoted into 1.5 mL tubes.

##### 1. HAdV detection

1. Prepare a mix containing 10  $\mu\text{L}$  of 22.5  $\mu\text{M}$  AdF forward primer, 10  $\mu\text{L}$  of 22.5  $\mu\text{M}$  AdR reverse primer, and 5  $\mu\text{L}$  of 11.25  $\mu\text{M}$  AdP probe (**Table 2**).
2. Add 2.5  $\mu\text{L}$  of the mix to tubes 1 to 8 of a tube strip. Let it dry at room temperature, close the tubes, and keep them protected from the light.
3. Cut the strip dividing it into two strips: tubes 1-5 and tubes 6-8.
4. Prepare a serial dilution of DNA suspensions containing the nucleotide sequence of the amplified HAdV region. Air-dry 1  $\mu\text{L}$  of suspensions containing  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$ , and  $1 \times 10^9$  GC/mL into tubes 6-8.  
NOTE: Keep the tubes containing the primers, probe, and the air-dried suspensions protected from light.

##### 2. MS2 detection

1. Prepare a mix containing 10  $\mu\text{L}$  of 25  $\mu\text{M}$  pecson-2F forward primer, 10  $\mu\text{L}$  of 25  $\mu\text{M}$  pecson-2R reverse primer, and 2.5  $\mu\text{L}$  of 25  $\mu\text{M}$  PecP-2 probe (**Table 2**).
2. Add 2.25  $\mu\text{L}$  of the mix to tubes 1 to 8 of a tube strip. Let it dry at room temperature, close the tubes, and keep them protected from the light.
3. Cut the strip dividing it into two strips: tubes 1-5 and tubes 6-8.
4. Proceed as in step 1.4.1.4 but use a standard suspension designed for MS2 instead.

## 2. Viral concentration

NOTE: Use gloves at all times during the sample collection, reagent preparation, flocculation, flocs collection, and waste disposal procedures. Wear protective glasses during the reagent preparation procedure.

### 1. Sample collection

1. Collect a 10 L water sample in a flat bottom bucket with a lid. Collect a minimum of two replicates for each sample.  
NOTE: It is important to use clear buckets to visualize the pellet. If the water sample contains suspended material (e.g., sand, algae), let it sediment and, then, collect the water supernatant in a new bucket.
2. Register the collected volume, as well as the location and collection date, for each water sample.
3. Put a magnetic stirrer connected to a battery under a bucket support and place the bucket containing the water sample on its support.  
NOTE: Look for a flat surface in a fresh place and keep the buckets containing the water samples from direct sunlight.

### 2. Reagents preparation

#### 1. pH adjustment reagents

1. Pour the citric acid powder and the sodium hydroxide pellets into the pots containing 25 and 50 mL of distilled water, respectively.
2. Gently shake by hand until the citric acid and the sodium hydroxide are completely dissolved.  
CAUTION: Do not pour the water over the sodium hydroxide pellets. Instead, pour the sodium hydroxide pellets over the water.

#### 2. Preflocculated skimmed milk

1. Place a stand-up bag on a magnetic stirrer and pour 500 mL of distilled water in it. Drop a stirring magnet inside the bag and turn on the magnetic stirrer.
2. Pour the contents of a sea salt sachet and of a skimmed milk tube into the stand-up bag and stir for 5 min at medium speed to dissolve them.
3. Add 3 mL of citric acid to the PSM solution using a Pasteur pipette to make sure the pH lies between 3.4 and 3.6. Measure the pH of the PSM solution using pH indicator strips. Add smaller amounts of citric acid and sodium hydroxide as the pH gets closer to 3.5.
4. Turn off the magnetic stirrer and make sure the flocs are visible. Use a flashlight to help to visualize the flocs.

### 3. Flocculation

1. Drop a stirring magnet into the water, set the magnetic stirrer at maximum speed, and turn it on. Make sure the stirring magnet starts spinning.
2. Add 10 mL of distilled water to a process control tube. Invert the tube a few times to rehydrate the viral stock and pour the solution into the water.
3. Pour the contents of one sample conditioning sachet into the water and stir for 5 min.
4. Measure the pH of the water sample using pH indicator strips. Add a few drops of citric acid or sodium hydroxide to the water sample to make sure the pH lies between 3.4 and 3.6. Add smaller amounts of citric acid and sodium hydroxide as the pH gets closer to 3.5.

5. Add 100 mL of the PSM solution using a 100 mL container.
6. Seal the bucket with the lid, set the magnetic stirrer at minimum speed, and leave the water stirring for 8 h.
7. Turn off the magnetic stirrer and let the water still for at least 5 h to allow the flocs to settle.

#### 4. Floc collection

1. Build a siphoning system composed of a pipette controller, two pipettes, and a plastic tube, to aspirate the water supernatant for discharging the water on the flocs.
  1. Attach a 10 mL tape-end pipette to the pipette controller. Then, attach the tip of the pipette to the plastic tube.
  2. Remove the filter of a 10 mL open-tip pipette using tweezers and attach the pipette to the plastic tube.
2. Place an empty bucket on the floor.
3. Immerse the tip of the open-tip pipette in the water. Make sure to keep it close to the water surface to avoid disturbing the flocs. Aspirate the water supernatant until it reaches the tape-end pipette.
4. Pinch the plastic tube by the end attached to the tape-end pipette and detach it from the pipette.
5. Place the tube in an empty bucket. Release the pressure on the tube to let the water flow into the empty bucket.
6. Pinch the plastic tube to stop the water flow when the water level is about to reach the stirring magnet and move the pipette away from the bucket.
7. Shake the bucket to resuspend the flocs and pour them into a 500 mL stand-up plastic bag. Allow the flocs to settle for 1 h more.
8. Carefully aspirate the water supernatant using a 50 mL pipette and a manual pipette controller, avoiding disturbing the flocs.
9. Aspirate the flocs using a 100 mL pipette and transfer them to a 50 mL graduated centrifuge tube. Note down the final volume of sample concentrate and transfer 1 mL of it to a 5 mL tube containing the preservative solution, using a Pasteur pipette.
 

NOTE: It is important that the centrifuge tube is graduated so the final volume of the concentrated sample can be measured as accurately as possible and registered.
10. Perform the nucleic acid extraction in the field. Alternatively, store the preservative solution containing the viruses at 20-30 °C for up to 15 days or ship them to a reference laboratory for further analysis.

#### 5. Waste disposal and material reuse

1. Add the contents of a neutralizing agent sachet to the bucket containing the discarded water. Mix the water, and then, leave it still for 30 min.
2. Dispose of the treated water as general waste.
3. Place the pipettes and the plastic tube inside the bucket. Fill the bucket with water and pour in the contents of one neutralizing agent sachet.
4. Wash them for at least 30 min to sterilize them and rinse them with abundant clean water to remove any remaining neutralizing agent.

### 3. Nucleic acid extraction

NOTE: Use gloves and always wear protective glasses during the nucleic acid extraction procedure.

#### 1. Magnetic pipette operation

1. Get familiarized with the operation of the magnetic pipette before performing the extraction.

#### 2. Nucleic acid extraction

1. Arrange the tubes containing the reagents required for the extraction in a rack, from left to right: binding buffer, washing buffers, and elution buffer. Set the appropriate number of tubes according to the number of samples or replicates being analyzed.
2. Transfer 1 mL of sample concentrate to the tube containing the binding buffer, using a disposable Pasteur pipette. Invert the tube 8x to 10x to homogenize the solution.
3. Incubate the solution at room temperature for 10 min while continuously mixing, either using a solar-powered orbital or manually.
4. Collect the magnetic particles using the magnetic pipette and a clean tip, which can be reused for the three washing buffers.
5. Release the magnetic particles into the tube containing 500  $\mu$ L of washing buffer 1. Wash them by gently shaking the solution with the tip for 30 s and collect them.
6. Transfer the magnetic particles to the tube containing 600  $\mu$ L of washing buffer 2. Wash them by gently shaking the solution with the tip for 30 s and collect them.
7. Transfer the magnetic particles to the tube containing 200  $\mu$ L of washing buffer 3. Wash them by gently shaking the solution with the tip for 30 s and collect them.
8. Release the magnetic particles into the tube containing the elution buffer and discard the tip.
9. Incubate the solution at room temperature for 5 min while continuously mixing, using the solar-powered orbital.
 

NOTE: Mixing the magnetic particles in the elution buffer is a crucial step. In case of lacking an orbital, continuously mix by hand during the incubation time.
10. Replace the tip on the magnetic pipette by a new one and collect the magnetic particles from the elution buffer. Make sure to completely remove the magnetic particles from the elution buffer since they can interfere with molecular detection methods.
11. Discard the tip with the particles attached to it. Proceed with the PCR analysis, ship the elution buffer to a reference laboratory, or store the elution buffer in at 4 °C for further analysis.

### 4. Viral detection with a battery-operated eight-tube real-time thermocycler

NOTE: Use gloves and always wear protective glasses during the nucleic acid detection procedure. Replace the gloves for new ones when performing a new PCR experiment to avoid cross-contamination.

### 1. HAdV quantitative PCR

1. Add 14  $\mu$ L of nuclease-free water to tubes 2, 4, and 5.
2. Add 4  $\mu$ L of PCR mix to tubes 1-5.
3. Add 14  $\mu$ L of nucleic acid extraction from sample A to tube 1 and 14  $\mu$ L from sample B to tube 3.
4. Add 2  $\mu$ L of extracted nucleic acids from sample A to tube 2 and 2  $\mu$ L from sample B to tube 4. Close the five-tube strip.
5. Add 14  $\mu$ L of nuclease-free water to tubes 6, 7, and 8.
6. Add 4  $\mu$ L of this mix to tubes 6, 7, and 8, and close them.
7. Put both strips in the thermocycler and select the appropriate run (**Table 3**).
8. Discard the water tube and keep the extracted nucleic acid in the freezer, if possible, or, if not, in a fresh place protected from light in case a second test needs to be performed.
9. Clean the micropipettes, the rack, the working material, and all material properly with a nucleic acid cleaner, and discard the plastic bag containing the used tip, gloves, and tubes.  
CAUTION: Nucleic acid remover is a very flammable liquid and steam. Do not breathe in the spray mist and avoid any contact of the liquid with the eyes or the skin. Otherwise, immediately rinse with abundant water and seek medical advice.
10. Collect the results and analyze the obtained data.

### 2. MS2 quantitative PCR

1. Add 14  $\mu$ L of nuclease-free water to tubes 2, 4, and 5.
2. Add 4  $\mu$ L of PCR mix and 0.5  $\mu$ L of reverse transcriptase enzyme to tubes 1-5.
3. Add 14  $\mu$ L of nucleic acid extraction from sample A to tube 1 and 14  $\mu$ L from sample B to tube 3.
4. Add 1  $\mu$ L of extracted nucleic acids from sample A to tube 2 and 1  $\mu$ L from sample B to tube 4. Close the five-tube strip.
5. Add 15.5  $\mu$ L of nuclease-free water to tubes 5, 6, 7, and 8, and close them.
6. Add 4  $\mu$ L of PCR mix and 0.5  $\mu$ L of reverse transcriptase enzyme to tubes 6, 7, and 8.
7. Put both strips in the thermocycler and select the appropriate run (**Table 3**).
8. Proceed as described in steps 4.1.8 to 4.1.10.

## Representative Results

### Method development

This procedure has been developed in the Laboratory of Viruses Contaminants of Water and Food with the collaboration of GenIUL and Oxfam Internom. It comprises of three different steps. The first one, the viral particle concentration, is an adaptation of a skimmed milk flocculation method previously described<sup>12,17,18</sup>. The original method was modified as to be independent of a power supply, simpler, and without centrifugation steps.

The recovery of the VirWaTest concentration method was tested in HAdV and MS2 bacteriophage-spiked groundwater samples. The viral recovery of the VirWaTest concentration and extraction method was estimated to be 3.01% to 18.02% for MS2 and 17.52% to 44.22% for HAdV. These recoveries were calculated from the values obtained by quantitative PCR during the development of the method compared to the initial concentrations of HAdV and MS2 in the water samples after spiking them with known concentrations of these viral stocks.

The VirWaTest magnetic nucleic acid extraction was compared to a commercial RNA mini kit (e.g., QIAamp Viral RNA Mini Kit), a column-based extraction method used in the laboratory, by testing 33 river and groundwater samples spiked with HAdV and MS2 and concentrated by skimmed milk flocculation. The comparison results showed that the VirWaTest method recovery was higher in 23/33 cases for HAdV, as well as for MS2 (**Table 4**). A Wilcoxon test showed *p*-values of 0.0005569 for HAdV and 0.02791 for MS2. VirWaTest nucleic acid extraction provides significantly higher viral recoveries than the commercial one.

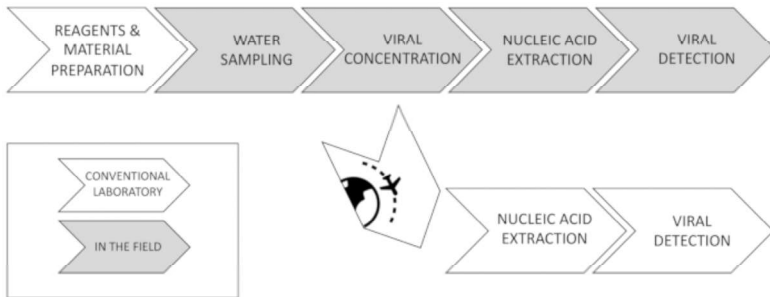
### Detection of HAdV in environmental water samples concentrated by the VirWaTest method

To test the developed method for viral concentration in the field, the Oxfam Water, Sanitation and Hygiene (WASH) team, located in Banghi (RCA) in March 2017, collected and concentrated viruses from five well water samples.

Also, in the area of Pedernales (Ecuador), which was affected by earthquakes in 2016 and 2017, six well water samples were collected by an Oxfam WASH team in February 2017, and its viruses were concentrated by the VirWaTest concentration method. Viral concentrates from both settings were sent to the laboratory in Barcelona for VirWaTest nucleic acid extraction and viral quantification.

In Ecuador, naturally occurring HAdV were detected in six out of the six samples analyzed, with concentration values ranging from  $3.27 \times 10^1$  to  $1.80 \times 10^2$  GC/L, whereas one out of the five samples collected and concentrated in Banghi (RCA) tested positive for HAdV, at a concentration of  $3.46 \times 10^2$  GC/L (**Table 5**).

MS2, added to all tested samples as internal process control, was detected in all samples tested, showing that the method was correctly performed from concentration to detection.



**Figure 1: VirWaTest method.** Overview of the steps the VirWaTest method is composed of. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Materials	Concentration	Nucleic Acid Extraction	Detection
Equipment	Magnetic Stirrer (2 Units) Battery (2 Units) Battery/Stirrer Connectors (2 Units) Power Adapters (2 Units) Bucket Support (2 Units) Rope (1 Unit) Stirring Magnet (3 Units) Tweezers (1 Unit) Silicon Tubing (1 Unit) Pipette Controller (1 Unit) Marker (1 Unit)	Magnetic Pipette (1 Unit) Solar Rotary Platform (1 Unit) Multi-Size Tube Rack (1 Unit) Timer (1 Unit)	Thermocycler (1 Unit) Battery (1 Unit) Computer Tube Rack (1 Unit) 0.5 µL - 10 µL Micropipette (1 Unit) 2 µL - 20 µL Micropipette (1 Unit)
Consumables and Reagents (for every 2 water samples/replicates)	Bucket (3 Units) pH Indicator Strips Tape-End 10 mL Pipette (2 Units) Open-Tip 10 mL Pipette (2 Units) Tape-End 50 mL Pipette (2 Units) Tape-End 100 mL Pipette (2 Units) Pasteur Pipette (4 Units) Stand-Up Plastic Bag (4 Units) Plastic Container with 25 mL of distilled water (1 Unit) Plastic Container with 50 mL of distilled water (1 Unit) 100 mL Empty Container (1 Unit) Gloves (6 Pairs) Process Control (2 Tubes) Tube with 10 mL of distilled water (2 Units) Citric Acid (1 Tube) Sodium Hydroxide (1 Tube) Skimmed Milk (1 Tube) Citric Acid Sachet (1 Unit) Distilled Water (1 500 mL Bottle) Sample Conditioning (2 Sachets) Preservative Solution (2 Tubes) Neutralizing Agent (4 Sachets)	Magnetic Pipette Tips (2 Units) Pasteur Pipette (2 Units) Binding Buffer (2 Tubes) Washing Buffer 1 (2 Tubes) Washing Buffer 2 (2 Tubes) Washing Buffer 3 (2 Tubes) Elution Buffer (2 Tubes) Gloves (6 Pairs)	10 µL Micropipette Tips (1 box) 20 µL Micropipette Tips (1 box) DNA qPCR Mix (1 Tube) RNA qPCR Mix (1 Tube) Reverse Transcriptase Enzyme (1 Tube) Molecular Biology Water (1 Tube) HAdV Tube Strip with primers, probe and standard (1 Unit) MS2 Tube Strip with primers, probe and standard (1 Unit) Nucleic Acid Remover Gloves (6 Pairs)

**Table 1: VirWaTest contents.** Equipment, consumables, and reagents that have to be prepared for the concentration, extraction, and detection of viruses in two water samples/replicates.

Virus	Primers	Genbank Accession No.	Position	Sequence (5'–3')	Length	Reference
Human Adenovirus (HAdV)	AdF	J01917.1	18869–18887	CWTACATGCACATCKCSGG	19	Herrroth et al., 2002 <sup>15</sup>
	AdR		18919–18937	CRCGGGCRAAYTGCACCAG	19	
	AdP1		18890–18916	6-FAM-CCGGGCTCAGGTACTIONCCGAGGCGTCCT-BMN-Q535	27	
MS2 Bacteriophage (MS2)	pecson-2F	NC_001417.2	344–363	AAGGTGCCTACAAGCGAAGT	20	Pecson et al., 2009 <sup>16</sup>
	pecson-2R		659–678	TTCGTTTAGGGCAAGGTAGC	20	
	PecP-2		369–388	6-FAM-ATCGTGGGGTCGCCGTACG-BHQ-1	20	

**Table 2: Oligonucleotides for quantitative PCR experiments.** Primers and probe designed to bind to nucleic acid sequences of HAdV and MS2.

Temperature	Time	Cycles	Temperature	Time	Cycles
95 °C	12 min	1	55 °C	15 min	1
			95 °C	10 min	1
95 °C	15 s	40	95 °C	15 s	40
60 °C	1 min		60 °C	1 min	

**Table 3: Thermal conditions for quantitative PCR experiments.** Temperature, time, and cycles used for HAdV and MS2 amplification.

	QIAgen	VirWaTest		QIAgen	VirWaTest
Median	2.53 x 10 <sup>3</sup>	2.43 x 10 <sup>3</sup>		4.74 x 10 <sup>4</sup>	5.13 x 10 <sup>4</sup>
Mean	1.74 x 10 <sup>4</sup>	3.12 x 10 <sup>4</sup>		4.24 x 10 <sup>4</sup>	5.97 x 10 <sup>4</sup>
SD	5.66 x 10 <sup>5</sup>	2.23 x 10 <sup>6</sup>		4.49 x 10 <sup>4</sup>	1.63 x 10 <sup>5</sup>
	p-value (Wilcoxon) for HAdV: 0.0005569				
	p-value (Wilcoxon) for MS2: 0.02791				
Virus tested	Samples Tested	QIAgen	VirWa Test		
HAdv	33	10	23		
MS2	33	10	23		

**Table 4: VirWaTest nucleic acid extraction development.** Median, mean, and SD values obtained when comparing the Qiagen and VirWaTest extraction methods in 33 groundwater samples for HAdV and MS2.

Country	Site	Sample	HAdV GC/L
RCA	Eau de la SODECA	1	ND
	Ile Bongossoua, Village 1	2	ND
	Ile Bongossoua, Village 3	3	ND
	Bangui, Puits Quartier Fondo	4	ND
	Bangui, Puits Quartier Yambassa	5	3.64 x 10 <sup>2</sup>
Ecuador	Borehole A	6	7.96 x 10 <sup>1</sup>
	Borehole B	7	1.80 x 10 <sup>2</sup>
	Borehole C	8	8.88 x 10 <sup>1</sup>
	Well water A	9	6.06 x 10 <sup>1</sup>
	Well water B	10	1.12 x 10 <sup>2</sup>
	Well water C	11	3.27 x 10 <sup>1</sup>

**Table 5: Quantification of HAdV using the VirWaTest Method.** Quantitative PCR results, expressed in GC/liter, for HAdV quantified in water samples collected and concentrated from RCA and Ecuador.

## Discussion

The VirWaTest method enables the concentration of viruses and nucleic acid extraction from water samples at the point of use by non-experienced users. It is an affordable, rapid, and simple protocol. The concentration is based on the principle of organic flocculation using skimmed milk, by which the low pH and high conductivity conditions make skimmed milk proteins aggregate into flocs the viruses adsorb to. When the flocs sediment, it is easy to collect them, making it possible to concentrate 10 L of water, whereas traditional ultracentrifugation cannot deal with big water volumes.

The method has been modified for being practicable at the point of sampling without using any electric equipment except for a battery-operated magnetic stirrer. Some other approaches based on water filtration have been adapted to the concentration of viruses and can also be performed at the point of use. However, suspended material present in water samples often clogs the filters; thus, the small volume that may be concentrated with these systems is a serious limitation.

This is the first description of a method for concentrating viruses from water samples at the point of use, regardless of the turbidity of the sample. The VirWaTest concentration method allows several samples to be processed simultaneously if the appropriate material is available. Moreover, skimmed milk flocculation has been shown to be useful for bacteria and parasite concentration<sup>19</sup>.

The preparation of the appropriate material is crucial for performing the procedure properly. Consider the number of water samples to be analysed and prepare the reagents and material before moving to the place where the test is needed for the preparation of the reagents and material. Several samples can be processed at the same time if the appropriate amount of material is available.

Before starting the concentration of a water sample, a known concentration of a viral stock will be used to spike the sample as process control. This method uses a dried viral stock which is rehydrated with distilled water before being added to the water sample at the point of use. This is useful to rule out false-negative results at the end of the procedure and gives an indication of the performance of the method.

Viral concentrates obtained with the VirWaTest may be further tested in the field applying the VirWaTest nucleic acid extraction and detection methods or, alternatively, concentrates may be sent to a reference laboratory at room temperature. The preservative solution added to the concentrate enables viruses to remain stable for up to 2 weeks (unpublished results).

VirWaTest nucleic acid extraction is a magnetic particle-based method. It is easy and fast and allows several samples to be processed at the same time and shows equivalent and even better recovery efficiency than methods currently used for viral nucleic acid extractions. The nucleic acids may be sent to reference labs at room temperature or, if users are confident in performing molecular detection, a quantitative PCR assay can be performed at the point of use of the original water sample.

Also, if a small laboratory facility is available, the VirWaTest concentration protocol may be coupled to standard nucleic acid extraction kits that depend on a centrifuge and standard PCR-based methods that require a freezer to maintain the reagents but that use standard thermocyclers, which are less expensive than battery-operated ones.

However, since a power supply is sometimes not available, we have optimized detection assays for MS2 bacteriophages as process control and HAAdV as a viral fecal indicator, and the methodology can be customized for any other virus of interest, such as hepatitis viruses, RoV, NoV, or others, to be run in the field without needing a freezer for maintenance of the reagents, nor conventional thermocyclers but only a battery-operated one. Several battery-operated thermocyclers are commercially available. Alternatively, if a power supply is available, other conventional qPCR equipment may be used. If an eight-tube thermocycler is used, up to two nucleic acid extractions (two different samples or two replicates from the same sample) can be tested in the same PCR assay. For each nucleic acid extraction, two different quantities will be tested to rule out enzymatic inhibition originated by the sample. The adaptation is based on the previous preparation of PCR tubes by air-drying primers, probes, and standard suspensions. Several lyophilized commercial qPCR solutions exist that could be used by applying the same procedure as described here. We have described one possibility that we considered to be easy to perform.

Comparison assays performed during the development of the method showed that the VirWaTest methods of concentration, extraction, and detection are efficient for the quantification of viruses in water samples.

The limit of detection (LOD) of the described procedure is variable since the volume collected after concentration is variable. Also, the LOD can be slightly different for different viruses. If a volume of approximately 10 L is collected, the LOD for HAAdV would be around  $1 \times 10^2$  viral GC/L. So, relatively small concentrations of HAAdV can be detected by the VirWaTest method. In Pedernales (Ecuador), six out of the six samples tested presented HAAdV, in concentrations close to the LOD, ranging from  $3.27 \times 10^1$  to  $1.80 \times 10^2$  GC/L. In Banghi (RCA), HAAdV were detected in one out of the five samples analyzed, at a concentration of  $3.46 \times 10^2$  GC/L. The presence of HAAdV, as well as the presence of MS2 as the control process in the tested samples, shows the method is useful for the recovery of viral particles from water samples, even when performed by nonexperienced users.

Feedback obtained until now indicates that viral concentration is an easy procedure to perform, with no major problems when applied at the point of use of the samples, although 8 h and 5 h steps are required. It is important to note that these steps occur without any human assistance. Moreover, a faster method based on filtration is being developed as an alternative for nonturbid waters. However, flocculation seems to be, until now, the unique method that allows the concentration of samples presenting high turbidity. Viral concentrates may be then sent to any laboratory around the world at room temperature, which also makes it easier to test viruses since sampling areas do not always have good transportation services providing cooling conditions. Alternatively, the extraction and detection protocols presented here allow testing for viral detection at the point of use of the samples.

As far as we know, this is the first method reported to be useful for the concentration and testing for the presence of viruses in water samples in the field. Further efforts should be conducted to apply the procedure to the evaluation of the presence of human viral pathogens of interest in



several other humanitarian crisis scenarios. Also, the user's feedback will be necessary to provide insights into the potential implementation to make the procedure friendlier.

## Disclosures

The authors have nothing to disclose.

## Acknowledgments

VirWaTest was a research project funded by the HIF (Humanitarian Innovation Funds) program of ELHRA (Enhancing Learning & Research for Humanitarian Assistance). The authors acknowledge the WASH teams who kindly collaborated in this study. The analysis of samples in Ecuador was funded by Oxfam Ecuador and Dirección de Investigaciones de la Universidad de las Américas (AMB.BRT.17.01). S. Bofill-Mas is a Serra-Hunter fellow at the University of Barcelona.

## References

1. The Sphere Project. *The Sphere Project: Humanitarian Charter and Minimum Standards in Humanitarian Response*. Practical Action Publishing, Rugby, UK. [https://www.spherestandards.org/wp-content/uploads/2018/06/Sphere\\_Handbook\\_2011\\_English.pdf](https://www.spherestandards.org/wp-content/uploads/2018/06/Sphere_Handbook_2011_English.pdf) (2011).
2. Bartram, J. et al. *Water Safety Plan Manual: Step-by-step risk management for drinking-water suppliers*. WHO Press, Geneva, Switzerland. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/75141> (2009).
3. World Health Organization. *Guidelines for Drinking-water Quality*. WHO Press, Geneva, Switzerland. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151\\_eng.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf?ua=1) (2011).
4. Unicef, World Health Organization. *25 Years Progress on Sanitation and Drinking Water*. WHO Press, Geneva, Switzerland. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/177752/1/9789241509145\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/177752/1/9789241509145_eng.pdf?ua=1) (2015).
5. Girones, R. et al. Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. *Water Research*. **44** (15), 4325-4339 (2010).
6. Rodriguez-Manzano, J. et al. Standard and new fecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water. *Water Science and Technology*. **66** (12), 2517-2523 (2012).
7. Puig, M. et al. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. **60** (8), 2963-2970 (1994).
8. Carter, M. J. Enterically infecting viruses: Pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology*. **98** (6), 1354-1380 (2005).
9. Bofill-Mas, S., Pina, S., Girones, R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Applied and Environmental Microbiology*. **66** (1), 238-245 (2000).
10. Bofill-Mas, S. et al. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Applied and Environmental Microbiology*. **72** (12), 7894-7896 (2006).
11. Rames, E., Roiko, A., Stratton, H., Macdonald, J. Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. *Water Research*. **96**, 308-326 (2016).
12. Calgua, B. et al. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *Journal of Virological Methods*. **153** (2), 79-83 (2008).
13. Bofill-Mas, S. et al. Cost-effective method for microbial source tracking using specific human and animal viruses. *Journal of Visualized Experiments*. **58**, 5-9 (2011).
14. International Organization for Standardization. *ISO 10705-1:1995: Water quality - Detection and enumeration of bacteriophages - Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages*. <https://www.iso.org/standard/18794.html> (1995).
15. Hernroth, B. E., Conden-Hansson, A. C., Rehnstam-Holm, A. S., Girones, R., Allard, A. K. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Applied and Environmental Microbiology*. **68** (9), 4523-4533 (2002).
16. Pecson, B. M., Martin, L. V., Kohn, T. Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: Advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. *Applied and Environmental Microbiology*. **75** (17), 5544-5554 (2009).
17. Calgua, B., Barardi, C.R.M., Bofill-Mas, S., Rodriguez-Manzano, J., Girones, R. Detection and quantification of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *Journal of Virological Methods*. **171** (1), 1-7 (2011).
18. Bofill-Mas, S. et al. Cost-effective method for microbial source tracking using specific human and animal viruses. *Journal of Visualized Experiments*. (58), e2820 (2011).
19. Gonzales-Gustavson, E. et al. Characterization of the efficiency and uncertainty of skimmed milk flocculation for the simultaneous concentration and quantification of water-borne viruses, bacteria and protozoa. *Journal of Microbiological Methods*. **134**, 46-53 (2017).



#### 4.2. AVALUACIÓ D'UN MÈTODE DE CONCENTRACIÓ DE VIRUS BASAT EN ULTRAFILTRACIÓ I ELUCIÓ D'ESCUMA HUMIDA (WET FOAM ELUTION) A PARTIR DE MOSTRES D'AIGUA DE GRAN VOLUM

*“Evaluation of a virus concentration method based on ultrafiltration and wet foam elution for studying viruses from large-volume water samples.”*

Forés, E., Rusiñol, M., Itarte, M., Martínez-Puchol, S., Calvo, M., Bofill-Mas, S.

*Science of the Total Environment* 829 (2022) 154431,  
doi:10.1016/j.scitotenv.2022.154431

Avaluar la presència de virus en mostres de grans volums d'aigua implica emprar mètodes complexes que requereixen de dos passos i equipament de laboratori sovint molt costós. En aquest estudi, s'ha avaluat un mètode de concentració de grans volums d'aigua, anomenat *Large Volume Concentration kit* (LVC), basat en una ultrafiltració de tipus “sense sortida” o *Dead end Ultrafiltration* (DEUF) seguit de la tecnologia amb elució d'escuma humida o *Wet Foam Elution™*, en diferents tipus d'aigües i per a diferents microorganismes.

Un cop realitzada la ultrafiltració de la mostra, el contingut de l'ultrafiltre es recupera mitjançant l'elució d'escuma humida. Aquesta es basa en la utilització d'una llauna que conté l'eluent compostat per aigua, tensioactius (menys del 0,1%), i un tampó de pH pressuritzat amb diòxid de carboni. Durant el procés de recuperació del concentrat, el contingut de la llauna és alliberat a l'interior de l'ultrafiltre, on el diòxid de carboni s'expandeix arrastrant els microorganismes retinguts en el filtre. El gas es col·lapsa en líquid podent ser recuperat per la part inferior del filtre com a concentrat final.

En primer lloc, es va seleccionar el tipus d'eluent més adequat per la recuperació de virus. Es van testar dos tipus d'eluent, un compostat per una barreja de PBS i Tween-20 (0.075%) i un altre compostat per 25 mM Tris i Tween-20 (0.075%). Una mostra d'aigua subterrània dopada amb HAdV, ΦX174, MS2 i CVB5 va ser dividida en sis rèpliques de 10 L, ultrafiltrades i eluïdes amb ambdós tipus d'eluent. Tot i que la comparació dels tampons d'elució va mostrar que l'elució de Tris va proporcionar valors de recuperació mitjans més alts per a HAdV, ΦX174 i CVB5 i valors similars per a MS2, els

resultats van mostrar que no hi havia diferències estadísticament significatives entre els dos tampons utilitzats. Per la qual cosa, l'eluent escollit per caracteritzar el mètode va ser aquell compost per 25 mM Tris i Tween-20 (0.075%).

L'eficiència de recuperació del mètode es va avaluar mitjançant experiments de dopatge amb diferents microorganismes indicadors i patògens, quantificats a través de diferents tècniques de detecció, incloent assajos d'infectivitat i assajos moleculars com qRT-PCR. Així doncs, es van determinar els percentatges de recuperació del mètode per a *E. coli*, dos bacteriòfags com són ΦX174 i MS2 i un virus patògen humà, Coxsackie virus B5 (CVB5), en dues matrius d'aigua, aigua de pou i aigua de mar. El mètode LVC d'un sol pas va demostrar ser eficient per la concentració de tots els microorganismes testats, tot i que l'anàlisi estadístic de les dades va revelar diferències estadísticament significatives entre les recuperacions dels diferents virus en una mateixa matriu, i diferències per a un mateix virus quan es recupera en matrius diferents.

Seguidament, per tal d'augmentar la sensibilitat, es va optimitzar el mètode afegint un segon pas de concentració basat en l'ús dels ultrafiltres Centricon® Plus-70, el qual es basen en una ultrafiltració centrífuga (CeUF). El LVC kit optimitzat amb un segon pas de concentració es va comparar amb el mètode de concentració viral basat en la floculació de llet descremada. Obtenint valors mitjans de recuperació de MS2 per a LVC i SMF de  $22,91 \pm 12,47\%$  i  $8,97 \pm 0,07\%$ , respectivament. Tot i que ambdós mètodes van presentar quantificacions similars, totes les mostres (3/3) van ser positives per a HAdV quan s'aplicava el mètode LVC, mentre que el 67% (2/3) van ser positives amb el mètode SMF.

Finalment, es va aplicar el mètode a diferents matrius d'aigua per tal de detectar contaminació viral en aigües de riu, aigua de mar i aigües subterrànies. El LVC kit acoblat a un pas de concentració secundari basat en dispositius CeUF, va permetre detectar virus naturals com HAdV, NoV GI i NoV GII en diferents matrius d'aigua. Com a control del procés es va utilitzar MS2, obtenint una recuperació viral mitjana del  $22,0 \pm 12,47\%$ . El HAdV, utilitzat com a indicador de contaminació fecal humà, va ser detectat a les mostres d'aigua de riu (100% de les mostres positives), seguit de les mostres d'aigua de mar (83,33%) i finalment en aigües subterrànies (66,67%). Encara que el volum que el mètode pot processar depèn de la natura de la mostra, es poden filtrar fàcilment fins a 100 L, assolint un factor de concentració del mètode de

fins a 500× i quan s'aplica un segon pas de concentració secundària pot arribar fins a 250.000× presentant límits de detecció significativament baixos.

Pel que fa a la validació del mètode per realitzar la concentració *in situ*, es van realitzar dues aproximacions. En la primera, es van concentrar mostres de 50 L d'aigua de riu en el punt de mostreig mitjançant una bomba peristàtica alimentada per un generador, detectant concentracions de NoV-GII de  $1.34 \times 10^1$  CG/L. A més, els eluïts van ser analitzats mitjançant tècniques de seqüenciació de nova generació com l'enriquiment de dianes o *Target Enrichment Sequencing* (TES), detectant la presència de diverses famílies víriques com són *Astroviridae* i *Picornaviridae* i mitjançant tècniques d'*Amplicon Deep Sequencing* (ADS) on es va detectar la presència dels serotips NoV GI.4, GI.1, GI.5, GII.4 i GII.13 en mostres d'aigua de riu tot i ser negatives per q(RT)PCR. En la segona, i mitjançant l'ús d'una bomba manual, es va filtrar aigua de pou en un camp de refugiats de Guara Guara localitzat a Moçambic. L'ultrafiltre va ser enviat al laboratori per al seu anàlisi, detectant concentracions d'HadV de  $3,01 \times 10^3$  CG/L, demostrant la senzillesa metodològica i adaptabilitat del mètode.

Com a resultat de l'estudi, s'ha validat el mètode LVC kit per a la concentració de virus en grans volums d'aigua, caracteritzant les recuperacions virals de diferents virus model en diferents matrius d'aigua, i s'ha optimitzat aplicant un segon pas de concentració augmentant així la sensibilitat del mètode. A més, s'ha adaptat per la seva aplicació *in situ* en diferents contextos i s'ha demostrat la seva aplicabilitat mitjançant diferents tècniques. Amb tot, el mètode LVC kit resulta un mètode eficient, ràpid i sensible per la detecció de virus en aigües.





## Evaluation of a virus concentration method based on ultrafiltration and wet foam elution for studying viruses from large-volume water samples



Eva Forés <sup>a,b</sup>, Marta Rusiñol <sup>a,c,\*</sup>, Marta Itarte <sup>a,b</sup>, Sandra Martínez-Puchol <sup>a,b</sup>, Miquel Calvo <sup>a</sup>, Sílvia Bofill-Mas <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Viruses Contaminants of Water and Food, Genetics, Microbiology & Statistics Department at the University of Barcelona (UB), Barcelona, Catalonia, Spain

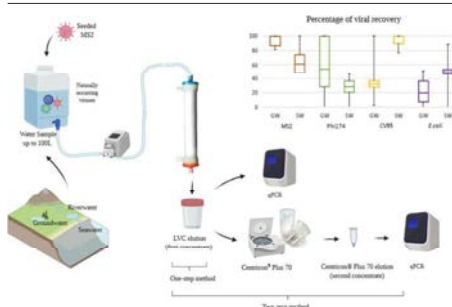
<sup>b</sup> The Water Research Institute (IDRA), Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>c</sup> Institute of Environmental Assessment & Water Research (IDAEA), CSIC, Barcelona, Catalonia, Spain

### HIGHLIGHTS

- LVC kit is a rapid method for viral detection in water samples up to 100 L.
- The novel wet foam elution technology allows viral elution in the field.
- Method sensitivity can be increased by coupling a secondary concentration step.
- HAdV, NoV GI and NoV GII have been detected in freshwater and sea water.
- Cell culture and viral NGS studies can be conducted with the LVC eluates.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 December 2021

Received in revised form 4 March 2022

Accepted 5 March 2022

Available online 9 March 2022

Editor: Warish Ahmed

#### Keywords:

Viral detection

Viral metagenomics

Large volume concentration

Freshwater

Sea water

Ultrafiltration

### ABSTRACT

Assessing the presence of viruses in large-volume samples involves cumbersome methods that require specialized training and laboratory equipment. In this study, a large volume concentration (LVC) method, based on dead-end ultrafiltration (DEUF) and Wet Foam Elution™ technology, was evaluated in different type of waters and different microorganisms. Its recovery efficiency was evaluated through different techniques (infectivity assays and molecular detection) by spiking different viral surrogates (bacteriophages PhiX174 and MS2 and Coxsackie virus B5 (CVB5) and *Escherichia coli* (*E. coli*)). Furthermore, the application of a secondary concentration step was evaluated and compared with skimmed milk flocculation. Viruses present in river water, seawater and groundwater samples were concentrated by applying LVC method and a centrifugal ultrafiltration device (CeUF), as a secondary concentration step and quantified with specific qPCR Human adenoviruses (HAdV) and noroviruses (NoVs). MS2 was used as process control, obtaining a mean viral recovery of  $22.0 \pm 12.47\%$ . The presence of other viruses was also characterized by applying two different next-generation sequencing approaches. LVC coupled to a secondary concentration step based on CeUF allowed to detect naturally occurring viruses such as HAdV and NoVs in different water matrices. Using HAdV as a human fecal indicator, the highest viral pollution was found in river water samples (100% of positive samples), followed by seawater (83.33%) and groundwater samples (66.67%). The LVC method has also proven to be useful as a virus concentration method in the field since HAdV and NoVs were detected in the river water and groundwater samples concentrated in the field. All in all, LVC method presents high concentration factor and a low limit of detection and provides viral concentrates useful for subsequent molecular analysis such as PCR and massive sequencing.

\* Corresponding author at: Laboratory of Viruses Contaminants of Water and Food, Genetics, Microbiology & Statistics Department at the University of Barcelona (UB), Barcelona, Catalonia, Spain.

E-mail address: [mrusinol@ub.edu](mailto:mrusinol@ub.edu) (M. Rusiñol).

## 1. Introduction

Humans and animals excrete viruses in feces and urine. Among these, members of the *Picornaviridae*, *Caliciviridae*, *Reoviridae*, *Hepeviridae* and *Adenoviridae* families, cause gastroenteritis (adenovirus, norovirus, rotavirus, and astrovirus) or hepatitis (hepatitis A and E viruses) as well as other pathologies such as meningitis (enterovirus and others). Their most important routes of transmission are the fecal-oral route and/or the direct contact with infected individuals (Cook, 2013). Therefore, many viral infections occur through consumption or contact with sewage-contaminated water arising from the discharge of untreated or inadequately treated sewage into the aquatic environment (Farkas et al., 2020). Whereas diffuse source pollution occurs when fecal pollution leach into surface waters and groundwater as a result of rainfall, soil infiltration or surface runoff, point source pollution comes from specific discharges. Hence, untreated wastewater can contaminate water sources through different routes. Large volumes of untreated wastewater can be discharged via sewer overflows during heavy rainfall events, tidal infiltration, snowmelt or system failures and blockages. Considering the different uses of water, such as drinking, household needs, recreational uses, as well as agricultural uses including irrigation and farming animals, its use or consumption may pose a risk to humans if the water sources (e.g., groundwater, seawater or surface water) are contaminated by sewage (Fong et al., 2010; Lowther et al., 2012; Sinclair et al., 2009).

Apart from the aforementioned enteric viruses, other viruses have been identified in wastewater such as polyomaviruses (Bofill-Mas et al., 2000), papillomaviruses (La Rosa et al., 2013), small circular viruses (Phan et al., 2015) and coronaviruses including SARS-CoV-2 (Martínez-Puchol et al., 2021; Medema et al., 2020) among others.

The presence of viruses in aquatic environments has been widely studied in water bodies around the world (Farkas et al., 2020). Apart from the commonly analyzed viral indicators (e.g., HAdV, JC polyomavirus (JCPyV), or pepper mild mottled virus (PMMV)), several reports describe the presence of pathogenic viruses such as NoVs, enterovirus and rotavirus in surface waters (Hata et al., 2014; Jurzik et al., 2010; Rusiñol et al., 2015; Sassi et al., 2018).

HAdV, hepatitis A virus, NoVs and sapoviruses have been describe to occur in coastal and brackish water (Dias et al., 2018a, 2018b; Farkas et al., 2018; Fongaro et al., 2015; Kaas et al., 2019; Moresco et al., 2012; Rusiñol et al., 2015; Symonds et al., 2018). Moreover, NoV as the etiological agent responsible for several groundwater-related outbreaks (Carrique-Mas et al., 2003; Giammanco et al., 2014; Moreira and Bondelind, 2017; Papadopoulos et al., 2006; Riera-Montes et al., 2011; Vantarakis et al., 2011).

The infective dose of these pathogens is known to be low (Kirby et al., 2015; Thebault et al., 2013), and has reported to be of between 0.5 and 6 TCID<sub>50</sub> (Yezli and Otter, 2011). Given that they are present in water matrices at low concentrations, in some cases below of 10<sup>2</sup> GC/L (Farkas et al., 2020, 2018; Hata et al., 2014), the detection of waterborne viruses is somehow cumbersome, because large volumes of water are needed to concentrate viruses in smaller volumes suitable for molecular detection, requiring two step processes, skilled staff, long periods of time, resulting most of the time in low viral recovery efficiencies or presence of viruses in the concentrate below the limit of detection of the detection method.

Several methodologies are available to concentrate viruses from water samples as reviewed by Bofill-Mas and Rusiñol, 2020. Most virus concentration methods consist of two steps where a few to hundreds of liters of water are concentrated into smaller volumes by a primary concentration method and then into a few milliliters by a secondary concentration method. Viruses are concentrated from water using different strategies based on the structural properties of viruses, mainly relying on their surface charge (commonly negative) or size (20 to 300 nm). The main methods based on charge are flocculation-precipitation with organic/inorganic flocculant such as skimmed milk flocculation (SMF), beef extract, polyethyleneglycol dextran PEG/Dex, PEG/NaCl, Al(OH)<sub>3</sub> (Calgua et al., 2013a, 2013b; Deboosere et al., 2012, 2011) and virus adsorption-elution (VIRADEL methods) using electronegative (nitrocellulose membranes) or electropositive filters (ViroCap/

Nanoceram®, glasswool) (Blanco et al., 2019; Ikner et al., 2012). Of all the methods based on size exclusion, those involving filtration (dead end ultrafiltration (DEUF), tangential flow ultrafiltration (TFUF), centrifugal ultrafiltration (CeUF)) are widely used and have been extensively reviewed in the literature (Bofill-Mas and Rusiñol, 2020; Cashdollar and Wymer, 2013; Ikner et al., 2012). A combination of both approaches is commonly used and there are other virus concentration methods that do not rely exclusively on size exclusion or surface charge, such as ultracentrifugation and lyophilization (Calgua et al., 2013a, 2013b; Hjelmsø et al., 2017; Ye et al., 2016). Every single method has its own limitations. In some cases, they are difficult to perform and require specialized staff and laboratory facilities, making their field deployment unfeasible.

Among many concentration methods used for viral recovery, ultrafiltration is based on the retention of low size particles to concentrate viruses in dead-end, tangential, or axial flow configuration (Gallardo et al., 2019; Ikner et al., 2012).

Ultrafiltration does not require sample preacidification, can concentrate multiple pathogens simultaneously and achieve good recoveries (Forés et al., 2021; Ye et al., 2016) allowing water volumes of up to 1000 L to be concentrated (Gunnarsdottir et al., 2020; Pascual-Benito et al., 2020; Smith and Hill, 2009). Most ultrafiltration methods require a second concentration step since the elution of viruses from filters requires the use of 200–500 mL of eluent.

The aim of this study was to validate and characterize a large volume concentration (LVC) protocol for the detection of viruses in large-volume samples as a fast and user-friendly procedure based on dead-end ultrafiltration (DEUF) followed by the Wet Foam Elution™ technology. This protocol can be used either as a one-step method or as a primary method in a two-step procedure. To accomplish this aim, groundwater and seawater samples spiked with several different viruses and *E. coli* were tested and the recovery of the viruses was estimated. The method was also applied to the molecular analysis of the presence of naturally occurring viruses in different types of water. Finally, the possibility of adapting the procedure to *in situ* concentration of large-volume water samples was explored.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganisms and cell lines

*Escherichia coli* (EC) (CECT 515) was cultured in trypticasein soy broth (TSB) EP/USP (Pronadisa) and quantified after filtration and dilution in ringer ¼ solution (Scharlau) by plating on trypticasein soy agar (TSA) EP/USP/ISO (Condalab).

Human adenovirus type 35 (HAdV-35) (ATCC® VR-718™) and Cocksackie virus B5 (CVB5) (ATCC® VR-185™) were produced by infecting A549 (ATCC® CCL-185™) and BGM (ECACC 90092601) cells, respectively. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Life Technologies) containing 2 × (maintenance medium) or 10 × (growth medium) of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). DMEM was supplemented with 2% glutamine and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Life Technologies). All viruses were released from cells by freezing and thawing the cultures three times. A centrifugation step at 3000 × g for 10 min was then applied to eliminate cell debris. The supernatant obtained was ultracentrifuged for 1 h at 34,500 × g and resuspended in PBS, before being quantified using specific qPCR assays (see Section 2.5) and stored in 10-mL aliquots at –80 °C until use.

PhiX174 (ATCC13706-B1) and MS2 bacteriophages (ATCC 23631) were cultured in *E. coli* WG5 (ATCC 13706), following ISO 10705-2:2000, and in *Salmonella typhimurium* WG49 (NCTC 12484), following ISO 10705-1:1995, respectively.

### 2.2. Sample collection

#### 2.2.1. Naturally water samples used for method validation

Water samples were collected in sterile plastic carboys and transported to the laboratory under cold conditions (4 °C). The turbidity was measured



using the HI98703 turbidimeter (Hanna Instruments Inc.) just after seeding  $10^7$  GC/mL of MS2 (1:100, v/v) as a process control. Groundwater with turbidities of  $0.35 \pm 0.25$  NTU (nephelometric turbidity units) and seawater with turbidities of  $6.94 \pm 3.20$  NTU were used to characterize the LVC method.

Groundwater, seawater and river water samples were collected from Barcelona urban area, three different coastal sites close to Barcelona and four different Catalan rivers. Samples were collected in sterile plastic carboys and processed *in situ* or transported to the laboratory under cold conditions. The processing of all samples was done immediately upon arrival at the laboratory.

### 2.3. *E. coli* determination

*E. coli* determination, was carried out with the 96-well microplate systems (MUG/EC 355-3782, BioRad®), according to ISO 9308-2:2012 (International Organization for Standardization, 2012).

### 2.4. Nucleic acid extraction and RT-qPCR quantification

Viral nucleic acids (NA) were extracted using the QIAmp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) in an automated QIAcube platform (Qiagen, Inc., Valencia, CA), according to the manufacturer's protocol. The volume of the viral concentrates used for the extraction was 140  $\mu$ L, which was finally eluted with 60  $\mu$ L of the kit elution buffer. A negative control of the viral nucleic acid extraction was added per each batch of 11 samples.

Based on previous research, specific real-time qPCRs were used to quantify HAdV (Hernroth et al., 2002) and PhiX174 (Verreault et al., 2010), while RT-qPCR was used to quantify CVB5 (Rusiñol et al., 2020), MS2 (Pecson et al., 2009), NoV-GI (Da Silva et al., 2007; Hoehne and Schreier, 2006; Svraka et al., 2007) and NoV-GII (Kageyama et al., 2003; Loisy et al., 2005). Viral nucleic acids were amplified using hydrolysis probes TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0 (Thermo Fisher Scientific) or the RNA UltraSense™ One-Step RT-qPCR System (Invitrogen) for DNA and RNA viruses, respectively. Quantification was performed in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Undiluted and 10-fold dilutions of the nucleic acid extracts were analyzed in duplicate. All the qPCR and RT-qPCR assays included non-template controls to demonstrate that the mix did not produce fluorescence. The standards for viral quantification were prepared using synthetic gBlocks® Gene Fragments (IDT) and quantified with a Qubit® fluorometer (Thermo Fisher Scientific). For all the standards, 10-fold dilutions were prepared from  $10^0$  to  $10^7$  copies per reaction. All the qPCR assays performed were considered acceptable under the following parameters: mean Slope, between  $-3.1$  and  $-3.5$ ;  $r_2$ , 0.999; and mean Efficiency, between 85 and 110%.

### 2.5. Infectivity assays

Infectious CVB5 viral particles present in viral concentrates were determined by plaque assays after inoculating cell monolayers with 1 mL of 10-fold dilutions of the concentrates in 90-mm<sup>2</sup> Falcon™ standard tissue culture dishes (Thermo Fisher Scientific). After 1 h of adsorption at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, the infected cells were overlaid with 12 mL of DMEM 2 × containing 2% of Oxoid™ Purified Agar (Thermo Fisher Scientific). Following a 48-h incubation at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, the agar was carefully removed and the attached cells were fixed and stained for 45 min with 6 mL of 1% crystal violet (Merck) in 11.4% formaldehyde (Panreac) and 5% 2-propanol (Panreac).

PhiX174 and MS2 bacteriophages were quantified in *E. coli* WG5 and *S. typhimurium* WG49, following ISO 10705-2 and 10705-1, respectively.

### 2.6. Large volume concentration (LVC) method

Water samples were filtered using the Large Volume Concentration (LVC) kit from InnoVap® (CC01116-T), which couples a Rexeed-25A

polysulfone hollow-fiber ultrafilter with a Wet Foam Elution™ canister containing the elution fluid. The kit also contains tubing, clamps, and can fitting. The ultrafiltration setup is shown in Fig. 1a. Water samples were forced through the membranes of the filter cell in a dead-end configuration (DEUF), using a Solinst® peristaltic pump (Model 410) set at 350 rpm. Filters were eluted using the patented Wet Foam Elution™ technology by pressing the elution canister into the supplied fitting at the top of the filter cell. The elution fluid contains water, a low concentration of a surfactant (less than 0.1%), a pH buffer, all infused with carbon dioxide. During the extraction process, the dissolved carbon dioxide expands and comes out of the solution to form microbubbles. These microbubbles increase the volume of the fluid by sevenfold or more as it recovers the biological organisms from the filter consumable. Upon elution, the foam immediately off-gasses and collapses into a liquid and the concentrated sample is ready for analysis or further concentration.

The elution volume used varied from approximately 30 to 75 mL depending on the type of sample (Fig. 1b).

#### 2.6.1. Selection of elution buffer

Elution fluid canisters (HCO8000) containing a mixture of PBS and Tween-20 (0.075%) ( $n = 3$ ) or a mixture of 25 mM Tris and Tween-20 (0.075%) ( $n = 3$ ) were compared for the recovery of HAdV, PhiX174, MS2 and CVB5 present in an artificially spiked groundwater sample which was divided into six 10-L replicates, ultrafiltered and eluted with both types of canisters.

#### 2.6.2. Characterization of the LVC method for fresh and seawater samples

To investigate the performance of LVC (25 mM Tris and Tween-20 (0.075%) elution) as a one-step concentration method for large-volume samples, *E. coli*, PhiX174, MS2 and CVB5 were used to spike 100-L groundwater and seawater samples, which were divided into ten 10-L replicates each. The microorganisms were quantified after ultrafiltration by infectivity assays (*E. coli*, PhiX174, MS2 and CVB5). The recovery value was calculated as follows:

$$\text{Microbial recovery (\%)} = \frac{\text{Concentrate titer (GC, PFU or CFU}_{\mu\text{L}}) \times \text{Sample Vol. (mL)}}{\text{Inoculum titer (GC, PFU or CFU}_{\mu\text{L}}) \times \text{Sample Vol. (mL)}} \times 100$$

#### 2.6.3. Optimization of the LVC method by adding a secondary concentration step

Three 10-L river water samples were primarily concentrated by the LVC method, as described above, followed by a secondary concentration step involving ultrafiltration with Centricon® Plus-70 devices with a cut-off of 30 kDa (Merck Millipore), following the manufacturer's instructions.

The theoretical limit of detection (LoD) of the whole method (including primary and secondary concentration steps and RT-qPCR detection) was calculated by running six replicates of 10-fold dilutions of target DNA/RNA suspensions around the detection end point (2.5, 5, 25 and 50 GC/reaction) for each virus analyzed. The concentration that produced at least 95% of the positive replicates was assumed to be the LoD of the qPCR assay, which was transformed into the LoD of the entire method using the sample volume tested and assuming 100% efficiency.

#### 2.6.4. Comparison of the LVC method and the secondary concentration step with the skimmed milk flocculation method

The three 10-L river water samples described in Section 2.6.3 were also concentrated using the skimmed milk flocculation (SMF) procedure. This method, previously described to concentrate viruses from river water samples (Calgua et al., 2013a, 2013b), relies on the adsorption of viral particles to flocculated skimmed milk. It was used here as a reference method to validate the LVC method for environmental samples. The LoD of this concentration method was also estimated as described above.

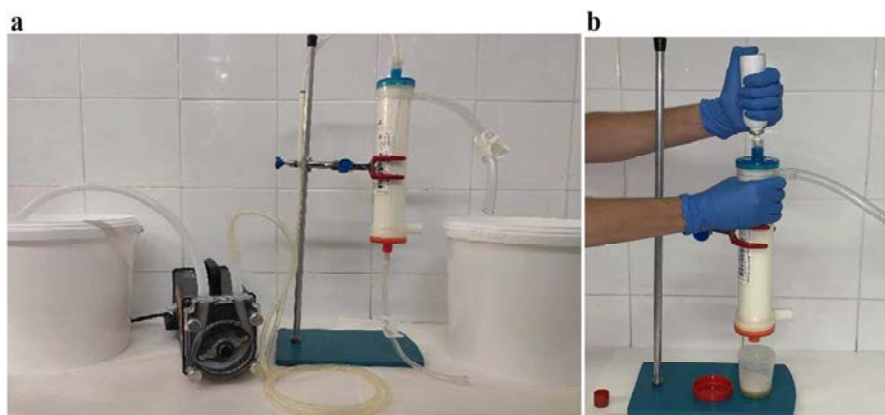


Fig. 1. a. Ultrafiltration setup. b. Elution setup.

### 2.7. Application of the LVC method to viruses present in diverse environmental samples

Environmental surveillance of HAdV, NoV-GI and NoV-GII was performed in 7 river water (10 L), 6 seawater (50 L) and 12 groundwater (100 L) samples collected from different locations in Catalonia (Northeast Spain) and presenting different turbidities. All the samples were collected in sterile carboys, spiked with MS2 as a control and shipped to the laboratory under cold conditions. Viral particles were concentrated by LVC and a secondary concentration step performed with Centricon® Plus-70 centrifugal ultrafiltration units, obtaining a final volume of 200–300  $\mu$ L.

### 2.8. Application of the LVC method for the concentration of viruses in the field

To evaluate the efficiency and applicability of the LVC method in the field, two different approaches were applied. Firstly, four 50-L groundwater and two 100-L river water samples collected from different locations in Catalonia (Northeast Spain) and presenting different turbidities were concentrated in the field by adapting the LVC to the field as shown in Fig. S1a (Supplementary Material). Eluates were transported to the laboratory for further analysis. In this case, the Hyundai HY900Si inverter generator was used to feed the pump. Secondly, one filter unit was sent to the Guara Guara refugee camp in Mozambique and several liters of groundwater were filtrated by manual pumping (Fig. S1b). The cartridge was then sent to the laboratory in Barcelona by plane, which took 10 days. Upon arrival, Tris elution with wet foam canisters was performed. In both cases, a secondary concentration step was performed with the Centricon® Plus-70 CeUF units, obtaining a final volume of 200–300  $\mu$ L.

### 2.9. Viral metagenomics

Viral nucleic acid extractions obtained from 2 river water and 6 groundwater samples were used to conduct target enrichment next-generation sequencing (TES) and amplicon deep sequencing (ADS) for NoV-GI and NoV-GII, as recently described by Itarte et al. (2021).

Briefly, for the TES, sequencing libraries were constructed with the KAPA HyperPlus Library Preparation Kit (KAPA Biosystems, Roche) and hybridized with probes to select viruses infecting vertebrates using the VirCapSeq-VERT Capture Panel (Roche). This procedure was applied to examine the sample for the presence of vertebrate viral sequences.

For the ADS assay, specific nested PCRs for the selected genogroups were performed using primers incorporating Illumina adapters to study the genetic diversity of the NoV detected in this samples. In both cases, libraries and amplicons were sequenced in an Illumina 2 × 300 bp platform.

### 2.10. Data visualization and statistical analysis

Statistical analysis was conducted with the R package (R Core Team, 2021). Welch's test was used in order to compare the two eluents, while a paired *t*-test was performed for the comparison of both methods.

To evaluate a potential association between MS2 recoveries and enzymatic inhibition, a Pearson's correlation coefficient test was run. Significance for all the comparisons was indicated by a *p*-value less than 0.05. Data of infectivity obtained from the characterization of the LVC method for fresh and seawater samples (Section 2.6.2), was analyzed considering a full two factorial model with organism, water type and their interaction as sources of variation. We used a generalized least squares approach implemented in the gls method (Pinheiro et al., 2021), in order to correct the heterokedasticity shown by the data. Welch's test was used for all the pairwise comparisons between organisms and water types of interest, adjusting this multiple testing procedure with the *p.adjust* method of R, using a false discovery rate level of 5%.

## 3. Results and discussion

This manuscript analyzed the performance of wet foam elution as a procedure to elute viruses from ultrafilter cells. Wet foam elution is supposed to be much more efficient than liquid rinsing since it contains gas that promotes eluent expansion, maximizing the contact with the filter surface. Its viscosity creates a more uniform flow across the filter surface, with the microbubbles in the foam behaving as deformable solids. As they travel across the surface of the filter, they move as a ridged body with a narrow lubricating layer, effectively squeegeeing the particles off of the surface. As the microbubbles in the foam make impact against one other and burst, the turbulence and energy produced help to lift the particles adhering to the membrane (Innovaprep, 2019).

### 3.1. Selection of the LVC elution buffer

One groundwater sample was divided into six aliquots and spiked with HAdV, PhiX174, MS2 and CVB5 before being concentrated by LVC. Tris elution was performed in three of the aliquots and PBS elution in the other three. Recovery values were determined by qPCR for HAdV and by infectivity assays for CVB5, MS2 and PhiX174. Although, comparison of the elution buffers showed that Tris elution provided higher mean recovery values for HAdV, PhiX174 and CVB5 and similar values for MS2 (Table S1, Supplementary Material) although no significant differences between the buffers used statistically determined (*p*-values > 0.05).

Infectivity assays provided recovery values higher than 100% in some cases, as has been previously reported in the literature (Cooksey et al.,

**Table 1**

Mean recovery values, minimum (min), maximum (max), standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) of seeded viruses in Groundwater (N: 10) and Seawater (N: 10).

	Groundwater				Seawater			
	<i>E. coli</i>	PhiX174	MS2	CVB5	<i>E. coli</i>	PhiX174	MS2	CVB5
Min	0.96	3.12	6.79	1.14	17.48	7.66	7.47	27.69
Max	51.33	300.00	270.71	144.00	88.89	47.19	402.86	516.92
Mean	22.58	88.60	158.12	45.72	51.50	27.91	91.14	175.64
SD	18.88	100.78	93.18	49.88	17.63	12.33	112.32	143.16
CV	0.84	1.14	0.59	1.09	0.34	0.44	1.23	0.82

2019; Smith and Hill, 2009). This phenomenon may be caused by the under-quantification of viral stocks used for the spiking, which might contain viral aggregates. Viral stocks tend to aggregate when resuspended in solutions with a pH close to the isoelectric point of the virus under the influence of certain salt concentrations in solution, cationic polymers, and suspended organic matter. The conditions under which aggregates form are highly dependent on the type of virus, type of salts in the solution and pH (Gerba and Betancourt, 2017). Previous studies have also indicated a clear effect of the matrix in which the viral stock is suspended on the final recovery value obtained (Forés et al., 2021). In any case, both elution fluid canisters contain surfactant compounds that may disaggregate the viruses present in the cartridge, providing a highly disaggregated concentrate. Viral disaggregation using detergents has been widely reported in the literature (Brakke, 1959; Gerba and Betancourt, 2017; Konz et al., 2005; Mattle et al., 2011; Sobsey et al., 1988). This could have explained the values higher than 100% for CVB5 and the bacteriophages. For HAdV that was quantified by qPCR, recovery values higher than 100% were not observed.

Taking all this into consideration and based on the results obtained, the Tris elution buffer was selected to be used in the rest of the study.

### 3.2. Characterization of the LVC method for freshwater and seawater samples

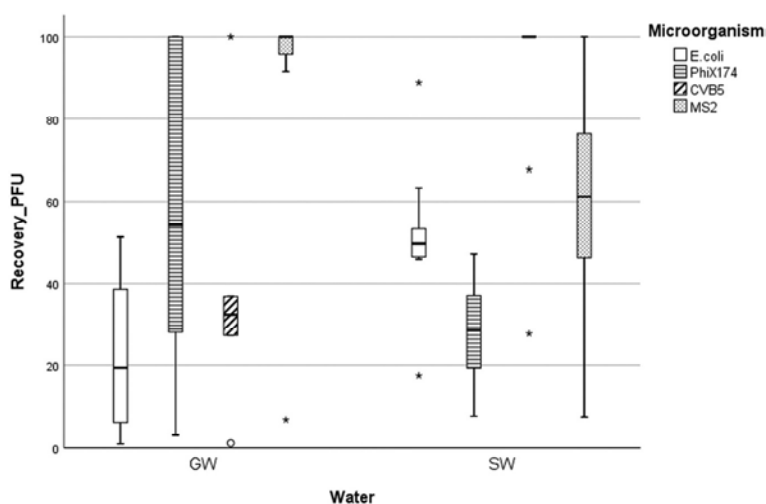
LVC and viral elution with pressurized Tris buffer were evaluated by concentrating 10 groundwater and 10 seawater samples spiked with *E. coli*, PhiX174, MS2 and CVB5. Viral recovery values were determined by infectivity assays for *E. coli*, CVB5, MS2 and PhiX174.

Mean recoveries values for the artificially spiked samples were:  $22.58 \pm 18.88\%$  for *E. coli*,  $88.60 \pm 100.78\%$  for PhiX174,  $158.12 \pm 93.18\%$  for MS2 and  $45.72 \pm 49.88\%$  for CVB5 in groundwater samples; and  $51.50 \pm 17.63\%$  for *E. coli*,  $27.91 \pm 12.33\%$  for PhiX174,  $91.14 \pm 112.32\%$  for MS2 and  $175.64 \pm 143.16\%$  for CVB5 in seawater samples. In general, DNA viruses and MS2 were recovered more efficiently from groundwater than from seawater, whereas CVB5 recovery was higher in seawater samples (Table 1 and Fig. 2). Values over 100% were considered as 100% for plotting the recoveries. The concentration factor of the method, considering it as a one-step method, allowed the concentration of 10 L into a range of 20 to 75 mL, producing a 133–500-fold concentration factor and a sample volume of 1.17–8.75 mL analyzed per qPCR reaction. These values could have been even higher if a second concentration step had been performed.

Using Rexeed-25S in the same DEUF configuration, the recovery efficiency for a list of microbes was assessed by Smith and Hill (2009). They reported that the average recovery efficiencies of DEUF for MS2 seeded in 100 L of water were  $57 \pm 7.7\%$ ,  $82 \pm 14\%$  and  $73 \pm 13\%$  for water samples with a low range (0.29 NTU), mid-range (1.5 NTU) and high range (4.3 NTU) of turbidity, respectively. This agrees with the recoveries obtained in this study and support Rexeed-25A filters as an effective way of recovering different microorganisms from large-volume water samples with moderate to high turbidity. Previous studies using Rexeed-25A ultrafilters in the tangential flow configuration (TFUF) reported mean recovery values of 70% and 60% for the dsDNA bacteriophages T3 and HS2 in river water and seawater, respectively (Langenfeld et al., 2021).

Overall, viruses were recovered more efficiently from groundwater, except for CVB5 and *E. coli*, which were recovered more efficiently from seawater. It should be noted that different viruses may show different behaviors when using the same concentration method (De Keuckelaere et al., 2013; Forés et al., 2021) and the same virus can behave differently for the same method if the matrix it is embedded in is different.

Statistical analysis showed significant differences for the interactions between the microorganism and the type of water sample (two-way ANOVA *p*-values: microorganism, 0.0156; water, 0.0003; and microorganism:water, 0.0205). Regarding the paired comparisons between different microorganisms evaluated in groundwater, none of the microorganisms showed significant differences in their mean recovery values once the *p*-values had been adjusted. Regarding the paired comparisons between the microorganisms for the seawater samples, only PhiX174 and *E. coli* (adjusted *p*-value, 0.045) showed a significant difference in their mean recovery values. Finally, in the paired comparisons between both



**Fig. 2.** Barplots showing LVC mean recovery values (%) obtained by infectivity assays (PFU) for different microorganisms used to spike groundwater (GW) and seawater (SW).

**Table 2**

Characterization of LVC compared to SMF using quantification of seeded and naturally occurring viruses. Limit of detection (LOD), samples volumes equivalent and concentration factor are shown. ND, non detected.

	Seeded MS2		Natural HAdV	
	LVC + CeUF	SMF	LVC	SMF
	Recovery (%)		GC/L of sample	
RIV1	35.27	8.85	3.25E+03	6.96E+03
RIV2	23.13	8.97	6.38E+03	4.23E+03
RIV3	10.34	8.97	2.33E+02	N.D.
LOD (GC/10 L of sample)	2420–3010	6850–8000	907–1130	2571–3000
Sample volume equivalent	100–175 mL	13–15 mL		
Concentration factor	15,000–20,000 ×	2000–2857 ×		

water samples for every single microorganism, only *E. coli* (adjusted *p*-value, 0.016) showed significant differences in their recoveries for the two different types of water.

### 3.3. Optimization of the LVC method by adding a secondary concentration step

When a secondary concentration step was applied to river water samples, mean recovery value of seeded MS2 was  $22 \pm 12.47\%$  and the quantifications obtained for naturally occurring HAdV were within the range of  $2.33 \times 10^2$  to  $6.38 \times 10^3$  GC/L. Rusiñol et al. (2015, 2014), reported similar values from Llobregat River (mean value  $10^3$  GC/L). The sample volume analyzed per reaction of qPCR increased from 1.17–8.7 mL to 105–175 mL, while the concentration factor increased from  $133\text{--}550 \times$  to  $15,000\text{--}20,000 \times$ , providing greater sensitivity to the method. However, when the concentration factor increases, qPCR inhibitors were observed. Hence, 10-fold dilutions of the samples are recommended for molecular detection.

### 3.4. Comparison of the LVC method + secondary concentration to SMF method

The LVC method followed by a second concentration step was compared to the SMF method, which has been extensively used for virus

**Table 3**

Viral quantification in environmental samples concentrated by LVC + CeUF for naturally occurring viruses and enzymatic inhibition observed in each sample. Enzymatic levels of inhibition have been considered in the qPCR as follows: (–), no inhibition; (+), direct quantification at the same Ct than diluted sample; (++) , Ct of the direct quantification higher than in the diluted sample; and, (+++) , No Ct seen in the direct quantification but only in the diluted one.

Water type	Sample	Sample volume (L)	MS2 recovery (%)	HAdV	NoV GI	NoV GII	Enzymatic inhibition	Mean turbidity (NTU)	Location
Seawater GC/50 L	SW1	50	ND	1.43E+02	NT	NT	+++	6.94 ± 3.20	Catalan coast
	SW2		6.1	1.07E+02			+++		
	SW3		4.6	ND			+++		
	SW4		4.5	1.25E+03	9.46E+02	9.72E+02	+		
	SW5		5.6	1.20E+04	4.52E+04	1.21E+04	+++		
	SW6		2.8	6.09E+02	<LOD	2.41E+02	+		
Groundwater GC/100 L	GW1	100	21.42	3.14E+01	ND	ND	–	3.2 ± 2.27	Barcelona Urban area
	GW2		4.58	ND	ND	ND	++		
	GW3		92.24	ND	ND	ND	–		
	GW4		78.07	ND	ND	ND	–		
	GW5		1.62	2.38E+01	ND	ND	++		
	GW6		132.54	2.25E+02	ND	ND	–		
	GW7		68.35	7.85E+01	ND	ND	–		
	GW8		NT	1.18E+01	ND	ND	–		
	GW9		NT	4.67E+02	5.89E+01	ND	++		
	GW10		NT	9.01E+01	ND	ND	–		
	GW11		52.91	ND	ND	ND	–		
	GW12		44.41	4.67E+00	1.69E+02	ND	++		
Riverwater GC/L	RV1	10	23.69	3.47E+04	6.36E+03	1.33E+04	–	6.01 ± 1.00	Besós Llobregat
	RV2		23.13	6.38E+03	1.33E+03	ND	++		
	RV3		10.34	2.33E+02	1.81E+02	<LOD	++		
	RV4		10.32	5.71E+02	<LOD	ND	+++		
	RV5		5.94	1.73E+02	1.19E+02	ND	+++		
	RV6		35.27	3.25E+03	<LOD	<LOD	++		
	RV7		38.24	9.26E+02	1.50E+03	5.32E+02	++		

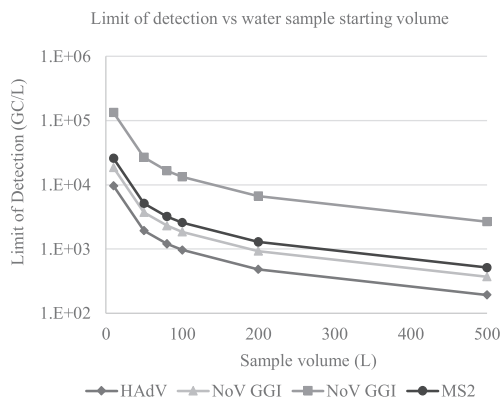
concentration from diverse types of environmental samples (Assis et al., 2017; Calgua et al., 2013a, 2013b; Calgua et al., 2008; Gonzales-Gustavson et al., 2017a, 2017b; Melgaço et al., 2018).

Table 2 shows the recovery values of spiked MS2 and naturally occurring HAdV and describes the equivalent sample volume, concentration factor and LoD of each method for the concentration of 10-L water samples. Mean MS2 recovery values for the LVC and SMF were  $22.91 \pm 12.47\%$  and  $8.97 \pm 0.07\%$ , respectively. All tested samples (3/3) were positive for HAdV when applying the LVC method, while 67% (2/3) tested positive when using the SMF method, with both methods presenting similar quantifications. This can be explained by the equivalent sample volume analyzed for each method. A higher sample volume in the PCR can be used with the LVC method compared to the SMF method, as commented before. This also means that the LVC method has a smaller LoD than the SMF method. Finally, the observed differences between both methods were statistically significant (paired *t*-test *p*-values were 0.027 for MS2 and 0.02 for HAdV).

### 3.5. Application of the LVC method for the concentration of viruses from different types of environmental samples

Seawater, groundwater and river water were tested for the presence and concentration of naturally occurring HAdV, NoV-GI and NoV-GII. MS2 was used as a control and used to spike all the tested samples. A second concentration step was performed in these samples using Centricon® Plus-70 CeUF units, which allowed the concentration by up to  $250,000 \times$  of a 100-L sample and the analysis of 4375–2187 mL of water per qPCR reaction. Enzymatic inhibition was monitored, with seawater followed by river water showing the highest enzymatic inhibition. MS2, which was used as a process control, showed recovery values in accordance with those obtained for the characterization of the method. Nevertheless, a strong influence of the type of water sample was observed. There was an inverse relationship between MS2 recovery values and enzymatic inhibition (Pearson's correlation coefficient,  $-0.66$ ). River water samples presented the highest level of human fecal viral pollution, as expected.

Table 3 shows the main results obtained. HAdV, an indicator of human fecal contamination, was present in 5/6 seawater samples (83.33%) at concentrations ranging from  $2.14$  to  $2.39 \times 10^2$  GC/L, 8/12 (66.67%) urban



**Fig. 3.** Estimated LOD according to the starting sample volume. LOD has been calculated assuming 7.5, 7.2, 51.8 and 10 GC as the minimum amount of genomes detected in one qPCR or RT-qPCR reaction for HAdV, NoVGI, NoVGII and MS2 respectively and a mean volume of sample concentrate for each concentration methodology. A 100% recovery has been assumed for the whole concentration, nucleic extraction and detection process.

groundwater samples with concentrations ranging from 4.67 to  $4.67 \times 10^2$  GC/100 L and 7/7 river water samples with values ranging from  $2.33 \times 10^1$  to  $3.47 \times 10^3$  GC/L.

Two groundwater samples positive for HAdV also tested positive for NoV-GI while 6/7 (85%) and 4/7 (57%) river water samples tested positive for NoV-GI and GII, with concentrations ranging from  $1.81 \times 10^1$  to  $6.36 \times 10^2$  GC/L and  $5.32 \times 10^1$  to  $1.33 \times 10^3$  GC/L, respectively.

These results are in accordance with previous ones described in the literature. Rusiñol et al. (2015) found concentrations around  $10^3$  GC/L for HAdV and up to  $10^4$  GC/L for NoV-GII in the Llobregat River, while Jurado et al. (2019) describe concentrations of  $10^3$  GC/L for HAdV and  $10^1$  and  $10^3$  GC/L for NoV-GI and NoV-GII respectively in Besós River, whose concentrations correlated with the distance of the sampling point from the source of contamination (wastewater treatment plant). Seawater samples were collected after heavy rainfall events and the quantifications obtained for HAdV and NoV were also in accordance with those of other studies. For example, after rainfall events, Farkas et al. (2018) described HAdV concentrations ranging from  $10^2$  to  $10^4$  GC/L at Conwy estuary, Wales, while Rusiñol et al. (2015) reported concentrations ranging from  $10^1$  to  $10^5$  GC/L in the Catalan coast and Kaas et al. (2019) found that the concentrations of human fecal indicators and NoV-GII were approximately  $10^4$  GC/L at the Tahiti coast. As for the groundwater samples, several studies have described the presence of enteric viruses in groundwater at similar concentrations as the ones reported above. Viral pollution in groundwater is mainly due to system failures and blockages (Kauppinen et al., 2018), rainy periods followed by prolonged floodwater injections into groundwater (Fongaro et al., 2015; Masciopinto et al., 2019), or the proximity of a polluted river (Jurado et al., 2019), with viruses present

for long periods of time after episodes of pollution. Groundwater pollution is influenced by many factors, such as aquifer typology and the hydraulics and flow dynamics of groundwater, pathogen structure, episodes of extreme climate, proximity of the source of pollution and system failures (Fongaro et al., 2015; Masciopinto et al., 2019). However, a natural decrease in pathogens has also been described when polluted water infiltrates an aquifer (Jurado et al., 2019). Therefore, the HAdV quantifications reported in this study indicate low, but widespread viral pollution in the urban area of Barcelona.

Fig. 3 shows theoretical estimates of the LoD of the different viruses tested in this study, depending on the volume of groundwater filtered. The concentration factor of the method depended on the sample volume. When 10 L of water were processed, the concentration factor ranged from  $15,000 \times$  to  $20,000 \times$ , allowing the analysis of an equivalent sample volume per reaction of qPCR ranging from 105 to 175 mL. For large-volume samples (100 L), the concentration factor was  $250,000 \times$ , meaning that an equivalent sample volume of 4.37 L of groundwater was being tested in the qPCR. In addition, the LVC kit was a very sensitive method for detecting viruses, presenting a LoD (GC/L) ranging from 1.01 GC/L for HAdV to 13.91 GC/L for NoV-GII. This explains the low HAdV concentrations detected in the groundwater samples. Therefore, it seems significant to concentrate a minimum of 100 L of the water sample, with volumes from 100 to 500 L guaranteeing the detection of viruses.

### 3.6. Application of the LVC method for the concentration of viruses *in situ*

Two different experiments were conducted as described in the Materials and methods section. Table 4 shows the main results obtained for the samples concentrated completely *in situ*, one river water sample was positive for NoV-GII by with a concentration of  $1.34 \text{ E} + 01$  GC/L. Another groundwater sample was filtered *in situ* and the filter unit transported to the laboratory at room temperature. This sample was positive for HAdV at a concentration of  $3.01 \text{ E} + 03$  GC/L in the first concentrate obtained after elution. The LVC system proved to be easy to use in the field. Samples can be ultrafiltered directly through the cartridge (single-pass method), pumping the water directly from the source, or, if sampling with a pressurized system, the system pressure can be used to force the water through the ultrafilter without the need for pumping. The elution takes place rapidly thanks to the pressurized wet foam canisters in the DEUF configuration, which does not require cartridge back flushing (TFUF). This provides the possibility of testing viruses in water samples from remote areas.

### 3.7. Viral metagenomics

Viral concentrates obtained by using LVC from two river water and six groundwater samples were used to conduct two different metagenomic approaches, TES and ADS, as described in Materials and methods. Massive sequencing results have been extensively described as part of a larger study (Itarte et al., 2021).

TES provided a list of human viral pathogens belonging to *Astroviridae*, serotypes HAstV-1 and HAstV-5, and *Picornaviridae*, serotype Aichi virus 1 (Table 5).

**Table 4**

Detection of naturally occurring viruses applying LVC kit in the point-of-use. ND, non detected; NT, non tested.

Method	Location	Type of water	Sample volume (L)	Naturally occurring viruses	qPCR (GC/L)	Positive samples	Mean turbidity (NTU)
LVC Kit, elution and transport	Mataró	GW	50	HAdV	ND	0/2	$0.3 \pm 0.1$
				NoV GI	ND	0/2	
				NoV GII	ND	0/2	
	Òrrius	GW	50	HAdV	ND	0/2	$0.42 \pm 0.2$
				NoV GI	ND	0/2	
				NoV GII	ND	0/2	
	Cardedeu	RW	50	HAdV	ND	0/2	$2.00 \pm 0.5$
				NoV GI	ND	0/2	
				NoV GII	$1.34\text{E} + 01$	1/2	
LVC Kit, cartridge shipment to UB laboratory	Guara Guara (Mozambique)	GW	10	HAdV	$3.01\text{E} + 03$	1/1	NT

**Table 5**

Target Enrichment Sequencing (TES) results of human viral pathogens. ND, non detected; GW, groundwater; RW, riverwater.

Type of water	TES			
	Family	Genus	Species	Genogroup/genotype/serotype
GW	<i>Circoviridae</i>	<i>Cyclovirus</i>	<i>Human associated cyclovirus 6</i>	NG12
GW	<i>Parvoviridae</i>	<i>Dependoparvovirus</i>	<i>Adeno-associated dependoparvovirus A</i>	AAV2
RW	<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	<i>Mamastrovirus 1</i>	HAstV-1 and HAstV-5
	<i>Picornaviridae</i>	<i>Kobuvirus</i>	<i>Aichivirus A</i>	<i>Aichi virus 1</i>

ADS revealed the presence of NoV serotypes GI.4, GI.1, GI.5, GII.4 and GII.13 in river water samples even though the sample was negative by q(RT)PCR. These results prove that the LVC method can be successfully applied when performing the metagenomics of large water volumes.

#### 4. Conclusions

- LVC involving an ultrafilter cell and elution with a pressurized buffer was useful for one-step virus concentration for all the water matrices and viruses tested. The volume that the method can process depends on the sample nature and up to 100 L can be easily filtered. The concentration factor of the LVC method is up to 500 ×. When a secondary concentration step is coupled to LVC, it can be of 250,000 ×.
- The use of Innovaprep® wet foam elution, which is applied after the DEUF filter cell concentration, reduces the duration of the process and makes it less cumbersome. This makes it possible to deploy the method in the field (which can be conducted by non-specialized staff).
- The LVC method is efficient and can be coupled with CeUF if higher sensitivity is needed for virus concentration from water samples, allowing the quantification and characterization of viruses by molecular assays such as PCR-based methods and next-generation sequencing techniques.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154431>.

#### CRedit authorship contribution statement

**Eva Forés:** Investigation, Methodology, Formal analysis, Validation, Visualization, Writing - original draft. **Marta Rusiñol:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Validation, Resources, Writing-review & editing, Project administration. **Marta Itarte:** Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing-review & editing. **Sandra Martínez-Puchol:** Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing-review & editing. **Miquel Calvo:** Data curation, Formal analysis, Software, Writing-review & editing. **Sílvia Bofill-Mas:** Conceptualization, Writing-review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

This study was partly supported by grant PCI2019-103643, RTI2018-097346-B-I00 and AGL2017-86797-C2-1-R AGL funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER “A way of making Europe”, by the European Union. Sílvia Bofill-Mas is a Serra-Hunter Fellow at the University of Barcelona. Eva Forés is an APIF fellow at the University of Barcelona. Marta Itarte is a fellow of the Catalan Government “AGAUR” (FI) at the University of Barcelona. We thank Rosina Girones for her scientific assessment and Mauricio Córdova for his collaboration in the application of the method *in situ*.

#### References

- Assis, A.S.F., Otenio, M.H., Drumond, B.P., Fumian, T.M., Miagostovich, M.P., da Rosa e Silva, M.L., 2017. Optimization of the skimmed-milk flocculation method for recovery of adenovirus from sludge. *Sci. Total Environ.* 583, 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.045>.
- Blanco, A., Abid, I., Al-Otaibi, N., Pérez-Rodríguez, F.J., Fuentes, C., Guix, S., Pintó, R.M., Bosch, A., 2019. Glass wool concentration optimization for the detection of enveloped and non-enveloped waterborne viruses. *Food Environ. Virol.* 11, 184–192. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09378-0>.
- Bofill-Mas, S., Pina, S., Girones, R., 2000. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 238–245. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.238-245.2000>.
- Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., 2020. Recent trends on methods for the concentration of viruses from water samples. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 16, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.01.006>.
- Brakke, M.K., 1959. Dispersion of aggregated barley stripe mosaic virus by detergents. *Virology* 9, 506–521.
- Calgua, B., Rodríguez-Manzano, J., Hundesa, A., Suñen, E., Calvo, M., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2013. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J. Virol. Methods* 187, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.10.012>.
- Calgua, B., Fumian, T., Rusiñol, M., Rodríguez-Manzano, J., Mbayed, V.A., Bofill-Mas, S., Miagostovich, M., Girones, R., 2013. Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. *Water Res.* 47, 2797–2810. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.043>.
- Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Wyn-Jones, A.P., López-Pila, J.M., Girones, R., 2008. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J. Virol. Methods* 153, 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.003>.
- Carriège-Mas, J., Andersson, Y., Petersén, B., Hedlund, K.O., Sjögren, N., Gessecke, J., 2003. A Norwalk-like virus waterborne community outbreak in a Swedish village during peak holiday season. *Epidemiol. Infect.* 131, 737–744. <https://doi.org/10.1017/S0950268803008604>.
- Cashdollar, J.L., Wymer, L., 2013. Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. *J. Appl. Microbiol.* 115, 1–11. <https://doi.org/10.1111/jam.12143>.
- Cooksey, E.M., Singh, G., Scott, L.C., Aw, T.G., 2019. Detection of coliphages and human adenoviruses in a subtropical estuarine lake. *Sci. Total Environ.* 649, 1514–1521. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.322>.
- Cook, N., 2013. Viruses in Food and Water: Risks, Surveillance and Control. Elsevier Ltd., pp. 1–523. <https://doi.org/10.1533/9780857098870>.
- Da Silva, A.K., Le Saux, J.C., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., Le Guyader, F.S., 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7891–7897. <https://doi.org/10.1128/AEM.01428-07>.
- Deboosere, N., Horn, S.V., Pinon, A., Gachet, J., Coldefy, C., Buchy, P., Vialette, M., 2011. Development and validation of a concentration method for the detection of influenza A viruses from large volumes of surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3802–3808. <https://doi.org/10.1128/AEM.02484-10>.
- Deboosere, N., Horn, S.V., Delobel, A., Gachet, J., Buchy, P., Vialette, M., 2012. Viral elution and concentration method for detection of influenza A viruses in mud by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 179, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.10.013>.
- De Keuckelaere, A., Baert, L., Duarte, A., Stals, A., Uyttendaele, M., 2013. Evaluation of viral concentration methods from irrigation and processing water. *J. Virol. Methods* 187, 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.11.028>.
- Dias, E., Ebdon, J., Taylor, H., 2018. The application of bacteriophages as novel indicators of viral pathogens in wastewater treatment systems. *Water Res.* 129, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.022>.
- Dias, J., Pinto, R.N., Vieira, C.B., de Abreu Corrêa, A., 2018. Detection and quantification of human adenovirus (HADV), JC polyomavirus (JCPyV) and hepatitis A virus (HAV) in recreational waters of Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 133, 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.031>.
- Farkas, K., Cooper, D.M., McDonald, J.E., Malham, S.K., de Rougemont, A., Jones, D.L., 2018. Seasonal and spatial dynamics of enteric viruses in wastewater and in riverine and estuarine receiving waters. *Sci. Total Environ.* 634, 1174–1183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.038>.
- Farkas, K., Walker, D.I., Adriaenssens, E.M., McDonald, J.E., Hillary, L.S., Malham, S.K., Jones, D.L., 2020. Viral indicators for tracking domestic wastewater contamination in the aquatic environment. *Water Res.* 181, 115926. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115926>.

- Fong, T.T., Phanikumar, M.S., Xagorarakis, I., Rose, J.B., 2010. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 715–723. <https://doi.org/10.1128/AEM.01316-09>.
- Fongaro, G., Padilha, J., Schissi, C.D., Nascimento, M.A., Bampi, G.B., Viancelli, A., Barardi, C.R.M., 2015. Human and animal enteric virus in groundwater from deep wells, and recreational and network water. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 20060–20066. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5196-x>.
- Forés, E., Bofill-Mas, S., Itarte, M., Martínez-Puchol, S., Hundersa, A., Calvo, M., Borrego, C.M., Corominas, L.L., Girones, R., Rusiñol, M., 2021. Evaluation of two rapid ultrafiltration-based methods for SARS-CoV-2 concentration from wastewater. *Sci. Total Environ.* 768. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144786>.
- Gallardo, V.J., Morris, B.J., Rhodes, E.R., 2019. The use of hollow fiber dialysis filters operated in axial flow mode for recovery of microorganisms in large volume water samples with high loadings of particulate matter. *J. Microbiol. Methods* 160, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.04.005>.
- Gerba, C.P., Betancourt, W.Q., 2017. Viral aggregation: impact on virus behavior in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 51, 7318–7325. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05835>.
- Giammanco, G.M., Di Bartolo, I., Purpari, G., Costantino, C., Rotolo, V., Spoto, V., Geraci, G., Bosco, G., Petralia, A., Guercio, A., Macaluso, G., Calamusa, G., De Grazia, S., Ruggeri, F.M., Vitale, F., Maida, C.M., Mammìna, C., 2014. Investigation and control of a norovirus outbreak of probable waterborne transmission through a municipal groundwater system. *J. Water Health* 12, 452–464. <https://doi.org/10.2166/wh.2014.227>.
- Gonzales-Gustavson, E., Cárdenas-Youngs, Y., Calvo, M., da Silva, M.F.M., Hundersa, A., Amorós, I., Moreno, Y., Moreno-Mesonero, L., Rosell, R., Ganges, L., Araujo, R., Girones, R., 2017. Corrigendum to “Characterization of the efficiency and uncertainty of skimmed milk flocculation for the simultaneous concentration and quantification of water-borne viruses, bacteria and protozoa” *J. Microbiol. Methods* 134 (2017) 46–53]. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.07.016>.
- Gonzales-Gustavson, E., Cárdenas-Youngs, Y., Calvo, M., da Silva, M.F.M., Hundersa, A., Amorós, I., Moreno, Y., Moreno-Mesonero, L., Rosell, R., Ganges, L., Araujo, R., Girones, R., 2017b. Characterization of the efficiency and uncertainty of skimmed milk flocculation for the simultaneous concentration and quantification of water-borne viruses, bacteria and protozoa. *J. Microbiol. Methods* 134, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.01.006>.
- Gunnarsdottir, M.J., Gardarsson, S.M., Figueras, M.J., Puigdomènech, C., Juárez, R., Saucedo, G., Arnedo, M.J., Santos, R., Monteiro, S., Avery, L., Pagaling, E., Allan, R., Abel, C., Eglitis, J., Hamsch, B., Hügl, M., Rajkovic, A., Smigic, N., Udovicki, B., Albrechtsen, H.J., López-Avilés, A., Hunter, P., 2020. Water safety plan enhancements with improved drinking water quality detection techniques. *Sci. Total Environ.* 698, 134185. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134185>.
- Hata, A., Katayama, H., Kojima, K., Sano, S., Kasuga, I., Kitajima, M., Furumai, H., 2014. Effects of rainfall events on the occurrence and detection efficiency of viruses in river water impacted by combined sewer overflows. *Sci. Total Environ.* 468–469, 757–763. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.093>.
- Hemroth, B.E., Girones, R., Allard, A.K., 2002. Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator Organisms in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*: The First Scandinavian Report. 68, pp. 4523–4533. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4523>.
- Hjelmö, M.H., Hellmér, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Lukjancenko, O., Seidel, M., Ekäsäer, D., Aarstrup, F.M., Löfström, C., Bofill-Mas, S., Abril, J.F., Girones, R., Schultz, A.C., 2017. Evaluation of methods for the concentration and extraction of viruses from sewage in the context of metagenomic sequencing. *PLoS One* 12, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170199>.
- Hoehne, M., Schreier, E., 2006. Detection of norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infect. Dis.* 6, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-69>.
- Innovaprep, 2019. <https://www.innovaprep.com/products/large-volume-concentrator-kit>.
- Ikner, L.A., Gerba, C.P., Bright, K.R., 2012. Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review. *Food Environ. Virol.* <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9080-2>.
- ISO 10705-1, 1995. *Water Quality — Detection and Enumeration of Bacteriophages — Part 1: Enumeration of F-specific RNA Bacteriophages*.
- ISO 10705-2, 2000. *Water Quality — Detection and Enumeration of Bacteriophages — Part 2: Enumeration of Somatic Coliphages*.
- ISO 9308-2, 2012. *Water Quality — Enumeration of Escherichia coli and Coliform Bacteria — Part 2: Most Probable Number Method*.
- Itarte, M., Martínez-Puchol, S., Forés, E., Hundersa, A., Timoneda, N., Bofill-Mas, S., Girones, R., Rusiñol, M., 2021. Ngs techniques reveal a high diversity of rna viral pathogens and papillomaviruses in fresh produce and irrigation water. *Foods* 10. <https://doi.org/10.3390/foods10081820>.
- Jurado, A., Bofill-Mas, S., Vázquez-Suñé, E., Pujades, E., Girones, R., Rusiñol, M., 2019. Occurrence of pathogens in the river-groundwater interface in a losing river stretch (Besòs River Delta, Spain). *Sci. Total Environ.* 696, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134028>.
- Jurzik, L., Hamza, I.A., Puchert, W., Überla, K., Wilhelm, M., 2010. Chemical and microbiological parameters as possible indicators for human enteric viruses in surface water. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.05.005>.
- Kaas, L., Gogorzaly, L., Lecellier, G., Berteaux-Lecellier, V., Cauchie, H.M., Langlet, J., 2019. Detection of human enteric viruses in french polynesian wastewaters, environmental waters and Giant clams. *Food Environ. Virol.* 11, 52–64. <https://doi.org/10.1007/s12560-018-9358-0>.
- Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K., 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1548–1557. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1548-1557.2003>.
- Kauppinen, A., Pitkänen, T., Miettinen, I.T., 2018. Persistent norovirus contamination of groundwater supplies in two waterborne outbreaks. *Food Environ. Virol.* 10, 39–50. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9320-6>.
- Kirby, A.E., Teunis, P.F., Moe, C.L., 2015. Two human challenge studies confirm high infectivity of Norwalk virus. *J. Infect. Dis.* 211, 166–167. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu385>.
- Konz, J.O., Lee, A.L., Lewis, J.A., Sagar, S.L., 2005. Development of a purification process for adenovirus: controlling virus aggregation to improve the clearance of host cell DNA. *Biotechnol. Prog.* 21, 466–472. <https://doi.org/10.1021/bp049644r>.
- La Rosa, G., Fratini, M., Accardi, L., D'Oro, G., Della Libera, S., Muscillo, M., Di Bonito, P., 2013. Mucosal and cutaneous human papillomaviruses detected in raw sewage. *PLoS One* 8, 75–77. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052391>.
- Langenfeld, K., Chin, K., Roy, A., Wigginton, K., Duhaime, M.B., 2021. Comparison of ultrafiltration and iron chloride flocculation in the preparation of aquatic viromes from contrasting sample types. *PeerJ* 9, 1–32. <https://doi.org/10.7717/peerj.11111>.
- Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M., Le Guyader, F.S., 2005. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J. Virol. Methods* 123, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.023>.
- Lowther, J.A., Gustar, N.E., Powell, A.L., Hartnell, R.E., Lees, D.N., 2012. Two-year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5812–5817. <https://doi.org/10.1128/AEM.01046-12>.
- Martínez-Puchol, S., Itarte, M., Rusiñol, M., Forés, E., Mejías-Molina, C., Andrés, C., Antón, A., Quer, J., Abril, J.F., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2021. Exploring the diversity of coronaviruses in sewage during COVID-19 pandemic: don't miss the forest for the trees. *Sci. Total Environ.* 800, 149562. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149562>.
- Masciopinto, C., De Giglio, O., Scarscia, M., Fortunato, F., La Rosa, G., Sufredini, E., Pazzani, C., Prato, R., Montagna, M.T., 2019. Human health risk assessment for the occurrence of enteric viruses in drinking water from wells: role of flood runoff injections. *Sci. Total Environ.* 666, 559–571. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.107>.
- Mattle, M.J., Crouzy, B., Brenneke, M., Wigginton, R.K., Perona, P., Kohn, T., 2011. Impact of virus aggregation on inactivation by peracetic acid and implications for other disinfectants. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7710–7717. <https://doi.org/10.1021/es201633s>.
- Medema, G., Heijnen, L., Elsing, G., Italiaander, R., Brouwer, A., 2020a. Presence of SARS-CoV-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in the Netherlands. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 7 (7), 511–516. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>.
- Melgaço, F.G., Corrêa, A.A., Ganime, A.C., Brandão, M.L.L., Miagostovich, M.P., Medeiros, V. de M., Rosas, C.de O., Lopes, S.M.dos R., 2018. Evaluation of skimmed milk flocculation method for virus recovery from tomatoes. *Braz. J. Microbiol.* 49, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.04.014>.
- Moreira, N.A., Bondelind, M., 2017. Safe drinking water and waterborne outbreaks. *J. Water Health* 15, 83–96. <https://doi.org/10.2166/wh.2016.103>.
- Moresco, V., Viancelli, A., Nascimento, M.A., Souza, D.S.M., Ramos, A.P.D., Garcia, L.A.T., Simões, C.M.O., Barardi, C.R.M., 2012. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.10.026>.
- Papadopoulos, V.P., Vlachos, O., Isidoridou, E., Kasmeridis, C., Pappa, Z., Goutzouvelidis, A., Filippou, F., 2006. A gastroenteritis outbreak due to norovirus infection in Xanthi, north-east Greece: management and public health consequences. *J. Gastrointest. Liver Dis.* 15, 27–30.
- Pascual-Benito, M., Emiliano, P., Casac-Mangas, R., Dacal-Rodríguez, C., Gracenea, M., Araujo, R., Valero, F., García-Aljaro, C., Lucena, F., 2020. Assessment of dead-end ultrafiltration for the detection and quantification of microbial indicators and pathogens in the drinking water treatment processes. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 230, 113628. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113628>.
- Pecson, B.M., Vale, L., Kohn, T., 2009. Quantitative PCR for Determining the Infectivity of Bacteriophage MS2 Upon Inactivation by Heat, UV-B Radiation, and Singlet Oxygen: Advantages and Limitations of an Enzymatic Treatment To Reduce False-Positive Results. 75, pp. 5544–5554. <https://doi.org/10.1128/AEM.00425-09>.
- Phan, T.G., Mori, D., Deng, X., Rajidrajith, S., Ranawaka, U., Fan Ng, T.F., Bucardo-Rivera, F., Orlandi, P., Ahmed, K., Delwart, E., 2015. Small circular single stranded DNA viral genomes in unexplained cases of human encephalitis, diarrhea, and in untreated sewage. *Virology* 482, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.011>.
- Pinheiro, Jose, Bates, Douglas, DebRoy, Saikat, Sarkar, Deepayan, R Core Team, 2021. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- R Core Team, 2021. A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Riera-Montes, M., Brus Sjölander, K., Allestam, G., Hallin, E., Hedlund, K.O., Löfdahl, M., 2011. Waterborne norovirus outbreak in a municipal drinking-water supply in Sweden. *Epidemiol. Infect.* 139, 1928–1935. <https://doi.org/10.1017/S0950268810003146>.
- Rusiñol, M., Fernandez-cassi, X., Hundersa, A., Vieira, C., Kern, A., Eriksson, I., Ziros, P., Kay, D., Miagostovich, M., Vargha, M., Allard, A., Vantarakis, A., Wyn-Jones, P., Girones, R., 2014. Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas. *Water Res.* 59, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.013>.
- Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Carratalà, A., Abril, J.F., Silvera, C., Figueras, M.J., Gelati, E., Rodó, X., Kay, D., Wyn-Jones, P., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2015. Evidence of viral dissemination and seasonality in a Mediterranean river catchment: implications for water pollution management. *J. Environ. Manag.* 159, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.05.019>.
- Rusiñol, M., Hundersa, A., Cárdenas-Youngs, Y., Fernández-Bravo, A., Pérez-Cataluña, A., Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Calvo, M., Alonso, J.L., Figueras, M.J., Araujo, R., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2020. Microbiological contamination of conventional and reclaimed irrigation water: evaluation and management measures. *Sci. Total Environ.* 710. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136298>.

- Sassi, H.P., Tuttle, K.D., Betancourt, W.Q., Kitajima, M., Gerba, C.P., 2018. Persistence of viruses by qPCR downstream of three effluent-dominated rivers in the western United States. *Food Environ. Virol.* 10, 297–304. <https://doi.org/10.1007/s12560-018-9343-7>.
- Sinclair, R.G., Jones, E.L., Gerba, C.P., 2009. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1769–1780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04367.x>.
- Smith, C.M., Hill, V.R., 2009. Dead-end hollow-fiber ultrafiltration for recovery of diverse microbes from water. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5284–5289. <https://doi.org/10.1128/AEM.00456-09>.
- Sobsey, M.D., Fuji, T., Shields, P.A., 1988. Inactivation of hepatitis A virus and model viruses in water by free chlorine and monochloramine. *Wat. Sci. Technol.* 20, 385–391.
- Svraka, S., Duizer, E., Vennema, H., De Bruin, E., Van Der Veer, B., Dorresteijn, B., Koopmans, M., 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in the Netherlands from 1994 through 2005. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1389–1394. <https://doi.org/10.1128/JCM.02305-06>.
- Symonds, E.M., Nguyen, K.H., Harwood, V.J., Breitbart, M., 2018. Pepper mild mottle virus: a plant pathogen with a greater purpose in (waste) water treatment development and public health management. *Water Res.* 144, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.06.066>.
- Thebault, A., Teunis, P.F.M., Le Pendu, J., Le Guyader, F.S., Denis, J.B., 2013. Infectivity of GI and GII noroviruses established from oyster related outbreaks. *Epidemics* 5, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2012.12.004>.
- Vantarakis, A., Mellou, K., Spala, G., Kokkinos, P., Alamanos, Y., 2011. A gastroenteritis outbreak caused by noroviruses in Greece. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 3468–3478. <https://doi.org/10.3390/ijerph8083468>.
- Verreault, D., Rousseau, G.M., Gendron, L., Massé, D., MS, DC, 2010. Comparison of polycarbonate and polytetrafluoroethylene filters for sampling of airborne bacteriophages. *Aerosol Sci. Technol.* 44, 197–201. <https://doi.org/10.1080/02786820903518899>.
- Ye, Y., Ellenberg, R.M., Graham, K.E., Wigginton, K.R., 2016. Survivability, partitioning, and recovery of enveloped viruses in untreated municipal wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5077–5085. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00876>.
- Yezli, S., Otter, J.A., 2011. Minimum infective dose of the major human respiratory and enteric viruses transmitted through food and the environment. *Food Environ. Virol.* 3, 1–30. <https://doi.org/10.1007/s12560-011-9056-7>.



#### 4.3. AVALUACIÓ DE DOS MÈTODES RÀPIDS BASATS EN ULTRAFILTRACIÓ PER A LA CONCENTRACIÓ DE SARS-COV-2 A PARTIR D'AIGÜES RESIDUALS.

*“Evaluation of two rapid ultrafiltration-based methods for SARS-CoV-2 concentration from wastewater.”*

E. Forés, S. Bofill-Mas, M. Itarte, S. Martínez-Puchol, A. Hundesa, M. Calvo, C.M. Borrego, L.L. Corominas, R. Girones, M. Rusiñol

*Science of the Total Environment* 768 (2021) 144786,  
[doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144786](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144786)

L'epidemiologia basada en l'estudi d'aigües residuals s'ha dut a terme generalment per a la detecció de virus nus com els causants de la poliomielitis, hepatitis o gastroenteritis. Arrel de la pandèmia de la COVID-19, ha sorgit la necessitat de desenvolupar i implementar mètodes ràpids per a la quantificació de la presència de virus embolcallats, com el SARS-CoV-2, en aigües residuals com a eina de monitoreig, control i prevalença de la COVID en la població o altres infeccions virals causades per virus embolcallats.

Els mètodes d'ultrafiltració com són els Centricon® Plus-70, han estat descrits com a mètodes eficients per a la concentració de SARS-CoV-2 a partir d'aigua residual. Tanmateix, a conseqüència de la pandèmia, van sorgir problemes de subministrament d'aquests ultrafiltres i altres materials, impossibilitant l'anàlisi rutinari del SARS-CoV-2. Per la qual cosa, va sorgir la necessitat de validar altres mètodes ràpids per a l'anàlisi de virus en aigües residuals. Així doncs, l'objectiu d'aquest estudi ha estat el d'avaluar dos mètodes ràpids basats en processos d'ultrafiltració per a la detecció del SARS-CoV-2 en aigües residuals. Un dispositiu d'ultrafiltració centrífuga (Centricon® Plus-70) i la pipeta concentradora automatitzada CP-Select™.

Per caracteritzar i comparar els dos mètodes, es van utilitzar un conjunt de 22 mostres d'aigua residual dopades amb el virus de l'hepatitis murina (MHV), membre de la família *Coronaviridae*, i el bacteriòfag MS2, i es van quantificar virus indicadors de contaminació fecal humana que es troben naturalment en les mostres d'aigua residual, com són adenovirus humans (HAdV), el poliomavirus JC (JCPyV) i finalment el patògen viral SARS-CoV-2. Un pas previ a la ultrafiltració, és l'eliminació de material en suspensió realitzant un pas de centrifugació, del qual es va analitzar l'impacte. Així doncs, es va avaluar el

percentatge de virus retinguts en el pellet obtingut de centrifugar les mostres prèviament a la ultrafiltració, pas necessari per eliminar partícules més grans i així evitar l'obstrucció quan s'utilitzen mètodes d'ultrafiltració. Finalment, es va avaluar la variabilitat de recuperació dels mètodes depenent de com es feia la quantificació de l'estoc viral utilitzat com a control de procés.

A partir de les eficiències de recuperació, es van observar diferències significatives entre ambdós mètodes per a MHV, sent Centricon® Plus-70 (24%) el mètode més eficient. No obstant, les concentracions de SARS-CoV-2, HAAdV i JCPyV i MS2 com a control de procés, no van donar lloc a l'observació de diferències estadísticament significatives entre mètodes. Aquest resultat suggereixen que la quantificació de virus presents de manera natural en aigua residual poden complementar l'avaluació de noves metodologies per la detecció viral, tot i que no permetrien calcular les eficiències de recuperació de virus del mètode.

De l'anàlisi de la fracció sòlida de les mostres, es va determinar que al voltant del 23% del SARS-CoV-2 detectat es descartaria durant el pas d'eliminació de partícules en suspensió i que no es tindria en compte en la detecció posterior mitjançant qRT-PCR. Pel que fa a la quantificació de l'estoc viral de MS2, no es van observar diferències al quantificar l'estoc directament o fer-ho un cop s'ha afegit a la mostra a quantificar. Tanmateix, en el cas del MHV es va observar un efecte de matriu que suggereix que la forma en què es quantifica l'estoc viral pot influir en els valors de recuperació obtinguts, mostrant recuperacions virals més elevades quan es quantifica immers en la matriu, per tant cal tenir en compte que la matriu pot afectar als càlculs de recuperació.

Com a resultat principal de l'estudi, es van avaluar dos mètodes de concentració de virus en aigües residuals per la detecció de virus embolcallats, donant una resposta ràpida a la necessitat de posar a la disposició mètodes ràpids i metodològicament senzills per la detecció del SARS-CoV-2 de forma rutinària. A banda, els mètodes van ser caracteritzats per a dos virus model, avaluant la idoneïtat dels virus utilitzats com a controls de procés, a més d'avaluar l'efecte de la matriu en què estan immersos, proposant com a alternativa l'anàlisi dels virus presents naturalment a les mostres com a indicadors del funcionament correcte dels mètodes aplicats.



## Evaluation of two rapid ultrafiltration-based methods for SARS-CoV-2 concentration from wastewater



E. Forés<sup>a,b</sup>, S. Bofill-Mas<sup>a,b</sup>, M. Itarte<sup>a,b</sup>, S. Martínez-Puchol<sup>a,b</sup>, A. Hundesa<sup>a</sup>, M. Calvo<sup>c</sup>, C.M. Borrego<sup>d,e</sup>, L.L. Corominas<sup>d,f</sup>, R. Girones<sup>a,b</sup>, M. Rusiñol<sup>g,\*</sup>

<sup>a</sup> Section of Microbiology, Virology and Biotechnology, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Spain

<sup>b</sup> The Water Institute of the University of Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Section of Statistics, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Catalan Institute for Water Research (ICRA), Scientific and Technological Park of the University of Girona, Emili Grahit 101, E-17003 Girona, Spain

<sup>e</sup> Group of Molecular Microbial Ecology, Institute of Aquatic Ecology, University of Girona, E-17003 Girona, Spain

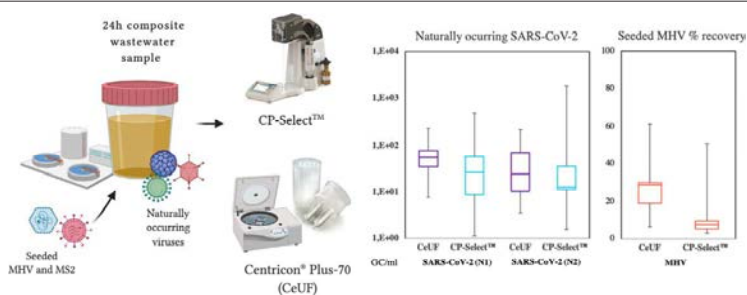
<sup>f</sup> University of Girona, E-17003 Girona, Spain

<sup>g</sup> Institute of Environmental Assessment & Water Research (IDAEA), CSIC, Barcelona, Spain

### HIGHLIGHTS

- Centricron® and CP-Select™ performed equally for naturally occurring SARS-CoV-2
- Higher MHV recoveries were calculated using centrifugal ultrafiltration devices.
- Naturally occurring viruses complement concentration methods comparison.
- A 23% of detected SARS-CoV-2 adsorb to the solid fraction of wastewater.
- CP-Select™ fits into a BSL-2 cabinet enabling to work under biosafety containment.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 November 2020

Received in revised form 21 December 2020

Accepted 21 December 2020

Available online xxx

Editor: Damia Barcelo

#### Keywords:

SARS-CoV-2

Wastewater

Viral concentration method

Ultrafiltration

Viral recovery

### ABSTRACT

Quantitative measurements of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in raw wastewater have been implemented worldwide since the beginning of the pandemic. Recent efforts are being made to evaluate different viral concentration methodologies to overcome supplier shortages during lockdowns. A set of 22-wastewater samples seeded with murine hepatitis virus (MHV), a member of the *Coronaviridae* family, and the bacteriophage MS2, were used to characterize and compare two ultrafiltration-based methods: a centrifugal ultrafiltration device (Centricron® Plus-70) and the automated concentrating pipette CP-Select™. Based on the recovery efficiencies, significant differences were observed for MHV, with Centricron® Plus-70 (24%) being the most efficient method. Nevertheless, concentrations of naturally occurring SARS-CoV-2, Human adenoviruses and JC polyomaviruses in these samples did not result in significant differences between methods suggesting that testing naturally occurring viruses may complement the evaluation of viral concentration methodologies. Based on the virus adsorption to solids and the necessity of a pre-centrifugation step to remove larger particles and avoid clogging when using ultrafiltration methods, we assessed the percentage of viruses not quantified after ultrafiltration. Around 23% of the detected SARS-CoV-2 would be discarded during the debris removal step. The CP-Select™ provided the highest concentration factor (up to 333×) and the lowest LoD ( $6.19 \times 10^3$  GC/l) for MHV and proved to be fast, automatic, highly reproducible and suitable to work under BSL-2 measures.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author.

E-mail address: [marta.rosinol@idaea.csic.es](mailto:marta.rosinol@idaea.csic.es) (M. Rusiñol).

## 1. Introduction

There is increasing evidence that untreated wastewater is a promising unbiased indicator of the presence of SARS-CoV-2 virus in the population as it has been reported by different research groups as a possible way to monitor trends and the approximate overall prevalence of COVID-19 in the population (Kitajima et al., 2020; Medema et al., 2020a).

Given the coronavirus pandemic impacts, the method to detect SARS-CoV-2 RNA in wastewater had, by necessity, to be developed and implemented at warp-speed. One of the major challenges in SARS-CoV-2 research in wastewater has been the lack of standardized protocols for its detection. The way the virus is concentrated seems to be crucial in order to avoid false negative results or inaccurate reported concentrations.

On the lack of much data regarding coronavirus recovery efficiency when using common methods for viral concentration, we should rely on what it is known for other enveloped viruses considering that every single virus will have a different behaviour during viral concentration. Alone or combined, electropositive and electronegative filtration, centrifugal ultrafiltration, organic flocculation and PEG/Al(OH)<sub>3</sub> precipitation methods have been used in different studies targeting enveloped viruses' in environmental waters as recently reviewed (Rusiñol et al., 2020).

Preliminary data obtained by our research group in a study evaluating different concentration methods for the detection of SARS-CoV-2 in wastewater showed no significant differences between skimmed milk organic flocculation and Centricron® Plus-70 and CP-Select™ ultrafiltration devices (Rusiñol et al., 2020). Centricron® Plus-70 ultrafilters have been described as a useful method for SARS-CoV-2 concentration from wastewater. Ultrafiltration is an interesting method since: i) samples do not need preacidification, ii) nor a long time of precipitation, which could not favour the stability of enveloped viruses, and iii) their concentration relies mainly on their size. However, and due to COVID-19 pandemic, there has been a shortage of these ultrafiltration devices. For this reason, this study was focused on the evaluation of two ultrafiltration methods described as useful for SARS-CoV-2 concentration from wastewater. Centricron® Plus-70 30 kDa devices and the Concentrator Pipette CP-Select™ from Innovaprep were tested to concentrate raw wastewater samples artificially spiked with MS2 bacteriophage and Murine Hepatitis Coronavirus (MHV) and presenting also naturally occurring SARS-CoV-2, Human adenoviruses (HAdV) and JC polyomaviruses (JCPyV). Centricron® of different cut-off size (10, 30 and 100 kDa) have been applied to concentrate SARS-CoV-2 (Medema et al., 2020a; Rusiñol et al., 2020). In this issue 30 kDa were the filters of election, trying to favour viral retention while avoiding the retention of smaller molecules that could act as enzymatic inhibitors. Regarding filter tips to be coupled to CP-Select™, the smallest available pore size tips (150 kDa) were used. The novelty of this method resides in the use of a pressurized eluent in the form of wet foam.

## 2. Material and methods

### 2.1. Viruses and cell lines

Bacteriophage MS2 (ATCC 23631), a model for non-enveloped RNA viruses and Murine Hepatitis Virus-A59 (MHV-A59), a model for enveloped

betacoronaviruses (like SARS-CoV-2), were propagated using the following protocols. Bacteriophage MS2 was cultured in *Salmonella typhimurium* strain WG49 (NCTC 12484) following ISO 10705-1 indications. MHV-A59 and DBT murine cell line were kindly provided by Wigginton Group Research, Michigan University, Michigan. MHV were propagated by infecting confluent monolayers of DBT cells following previously described instructions (Leibowitz et al., 2011). Viruses were clarified from the supernatant by centrifugation at 3,000 ×g for 15 min and the supernatants were kept at −80 °C.

### 2.2. Sample collection

A total of 22 24-h-composite raw wastewater samples (500 ml) were collected between March and September 2020 from 6 WWTPs, located in Catalonia (Spain) (Table 1). The selected WWTPs treat urban and industrial wastewater from approximately 20% of the Catalan population. Samples were either shipped to the laboratory under cool conditions or alternatively stored after collection at −20 °C.

Additionally, to determine the relation between the viral recovery and wastewater physicochemical characteristics, the turbidity was measured using a turbidimeter HI98703 (Hanna Instruments Inc.), the pH was measured using a pHmeter 902/4 (Nahita Inc.) and the BOD<sub>5</sub> values were provided by WWTP managers.

### 2.3. Viral concentration methods

An aliquot of 200 ml of each wastewater sample was seeded with 10<sup>7</sup> GC/ml of MS2 and MHV (1:100, v/v). Samples were centrifuged at 4,750 ×g for 30 min in order to remove suspended solids that may interfere with the ultrafiltration. The resulting supernatant was divided into two aliquots of 100 ml and subjected to two different viral concentration methods:

1) Concentration Pipette CP-Select™ using Hollow Fiber Polysulfone PVP high-flow pipette ultrafilter tips (CPT) with a cut-off of 150 kDa (InnovaPrep) and 2) Centricron® Plus-70 centrifugal ultrafiltration (CeUF) devices, with a cut-off of 30 kDa (Millipore). CP-Select™ method began with filtration of 80 ml of supernatant through single-use CPT. Viral particles were eluted with 0.075% Tween-20/Tris using *Wet Foam Elution™* cans (Innovaprep) into a final volume of between 240 µl and 600 µl.

The CeUF devices were pre-rinsed before use, following manufacturer instructions, and then 70 ml of supernatant was centrifuged at 3,000 ×g for 30 min. Viruses were eluted inverting the CeUF device and centrifuged at 1,000 ×g for 3 min to obtain the final concentrate of approximately 280–900 µl.

### 2.4. Nucleic acid extraction and q(RT)PCR quantification

Viral nucleic acids (NA) were extracted using the QIAmp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) according to the manufacturer's protocol in an automated QIAcube platform (Qiagen, Inc., Valencia, CA). The volume of the concentrates used for the extraction were 140 µl and the elution volumes were 60–80 µl. A negative control of the viral nucleic acid extraction was added per batch of samples.

**Table 1**

Characteristics of the selected wastewater treatment plants (WWTP). Mean values and standard deviations. BOD<sub>5</sub>: biological organic demand.

WWTP	Number of samples	Design capacity (Hab. Eq.)	Turbidity (NTU)	pH	BOD <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /l)
1	10	2,843,750	816 ± 17	7.39 ± 0.13	364 ± 72
2	2	451,250	218 ± 2.31	7.54 ± 0.15	390 ± 72
3	2	285,666	113 ± 8.14	8.17 ± 0.21	69 ± 30
4	3	196,167	165 ± 4.36	7.62 ± 0.10	217 ± 63
5	2	165,450	106 ± 1.15	7.55 ± 0.20	316 ± 126
6	3	99,166	222 ± 5.86	7.80 ± 0.15	191 ± 47

Specific real-time qPCR and RT-qPCR assays previously described were used to quantify SARS-CoV-2 N1 and N2 (probes, primers and cycling conditions described in the CDC-006-00019 CDC/DDID/NCIRD/Division of Viral Diseases protocol), MS2 bacteriophage (Pecson et al., 2009), MHV (Ahmed et al., 2020), HAdV (Hernroth et al., 2002) and JCPyV (Pal et al., 2006) by using TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0 and RNA UltraSense™ One-Step RT-qPCR System (Invitrogen) for DNA and RNA viruses respectively. Quantification was performed in a StepOne plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Undiluted and 10-fold dilutions of the nucleic acid extracts were analyzed in duplicate. All the qPCR and RT-qPCR assays included non-template controls to demonstrate that the mix did not produce fluorescence and bovine serum albumina (BSA) (1 mg/ml), was added to RT-qPCR assays to reduce PCR inhibitors. The standards for viruses were prepared using synthetic gBlocks® Gene Fragments (IDT) and quantified with a Qubit® fluorometer (Thermo Fisher Scientific) except for SARS-CoV-2 standard which was constructed using the EURM-019 single stranded RNA fragments of SARS-CoV-2, provided by the European Commission Joint Research Centre. For all the standards, ten-fold dilutions were prepared from 10<sup>9</sup> to 10<sup>7</sup> copies per reaction.

As for enzymatic inhibition we performed previous tests, when setting up qPCR for N1 and N2 assays for SARS-CoV-2 detection, by adding known amounts of target RNA into wastewater. Inhibition was reduced when including BSA to the qPCR master mix. Every tested sample was previously spiked with MS2 bacteriophages that were used as a process control as well as for controlling inhibition by analysing tenfold dilutions of every nucleic acid extraction.

### 2.5. LOD/LOQ determination

The limit of detection (LoD) of the whole method (including ultrafiltration, extraction and RT-qPCR detection) was calculated by running six replicate tenfold dilutions of target DNA/RNA suspensions around the detection end point (2.5, 5, 25 and 50 GC/reaction), for each analyzed virus. The concentration that produced at least 95% positive replicates was assumed to be the LoD of the qPCR assay, which was transformed to LoD of the entire method using the sample volume tested in each of the methodologies. The limit of quantification (LoQ) was estimated using the procedure described by Foorotan and colleagues (Foorotan et al., 2017).

### 2.6. Evaluation of viral recovery

Viral recovery percentage was calculated according to experimental values obtained by spiking samples with MS2 and MHV viral stocks, shaking for 10 min and using as input viral concentration the direct quantification of the viral stock added:

$$\text{Virus recovery (\%)} = \frac{\text{Concentrate Titer (GC/ml)} \times \text{Sample Volume (ml)}}{\text{Inoculum Titer (GC/ml)} \times \text{Sample Volume (ml)/100}} \times 100$$

To shed some light into the role that the matrix into which viral stock is embedded may play when calculating viral recoveries, four different quantification strategies were conducted: 1) direct quantification of the viral stocks; 2) quantification of raw wastewater spiked with known concentrations of the viral stocks; 3) same as 2 but after debris removal, and 4) quantification of the viral stocks in a concentrated wastewater sample. All these quantifications were assayed in triplicate.

### 2.7. Virus attachment to suspended solids

To investigate the percentage of coronaviruses which could remain attached to suspended material and not be properly quantified using ultrafiltration methods, viruses present in pellets obtained after centrifugation of 9 raw wastewater samples were further eluted in 3.5 ml of

glycine buffer pH 9.5 for 30 min and after the addition of 3.5 ml of 2xPBS centrifuged at 3000 ×g for 20 min. The resulting supernatant (6.5–7.5 ml) was filtered using Amicon® Ultra-15 Centrifuge Filters Ultracell® 50KDa (Merck Millipore) and eluted for further viral quantification. Simultaneously supernatants obtained after first centrifugation were further concentrated as described in section 2.3 using Centricon® Plus-70 devices.

### 2.8. Tween-20 addition in the pre-concentration step before ultrafiltration with CP-Select™

CP-Select™ manufacturer recommends the addition of Tween-20 before ultrafiltration in order to increase viral recovery. The appropriateness of including this step to the CP-Select™ concentration protocol step was evaluated in 3 selected wastewater samples (100 ml). Prior to ultrafiltration, 5% Tween 20 (1:100, v/v) was added to raw wastewater and processed as described above.

### 2.9. Data visualization and statistical analysis

Data visualization, plotting and statistical test was done using R version 4.0.2. For each virus, Wilcoxon signed rank tests for paired data were used to evaluate whether there were statistically significant differences between both ultrafiltration methods. To evaluate potential associations between viral recovery and raw wastewater turbidity we run Pearson's correlation coefficient tests.

## 3. Results

### 3.1. Comparison between CP-Select™ and Centricon® Plus-70 devices

The MS2 phage, a non-enveloped RNA virus frequently used as a process control in environmental studies (Coulliette et al., 2014; Ikner et al., 2011; Ye et al., 2016) and the MHV, an enveloped RNA surrogate for human coronavirus (Ahmed et al., 2020; Casanova et al., 2009; Ye et al., 2016), were seeded to calculate viral concentration methods recovery efficiencies.

Mean recovery values for MS2 and MHV in wastewater are represented in Fig. 1. No statistically significant differences were observed between concentration methods regarding MS2 recovery ( $p$ -value = 0.75) but CeUF provided significant highest mean recoveries for MHV ( $p$ -value = 0.004). However, no statistical differences were observed between the two methods when naturally occurring viruses were quantified (Fig. 2): SARS-CoV-2 ( $p$ -value of 0.27 and 0.73 for N1 and N2, respectively), HAdV, JCPyV ( $p$ -values >0.05). CeUF provided higher mean recovery percentages for MHV whereas CP-Select™ provided higher recovery rates for MS2.

Table 2 summarizes equivalent sample volumes analyzed and the resulting concentration factors by using CP-Select™ or CeUF methods as well as the limits of detection and quantification (LoD<sub>95%</sub> and LoQ), calculated mean recoveries, standard deviations and coefficients of variation of the compared concentration methods based on MS2 and MHV quantifications. By using the concentrating pipette, a higher concentration factor was obtained, and a larger sample volume was analyzed in each RT-qPCR reaction.

After addition of Tween-20 into wastewater previously to concentration with CP-Select™, no statistical differences were observed when adding Tween-20 ( $p$ -value = 0.105), obtaining mean values of 50.7 and 20.9 GC/ml SARS-CoV-2 with and without Tween-20 addition respectively. However, the ultrafiltration time when adding Tween-20 was reduced.

### 3.2. Viral stock quantification

When evaluating if calculation of viral recoveries could be biased by the effect of the matrix in which viral stocks were embedded, no

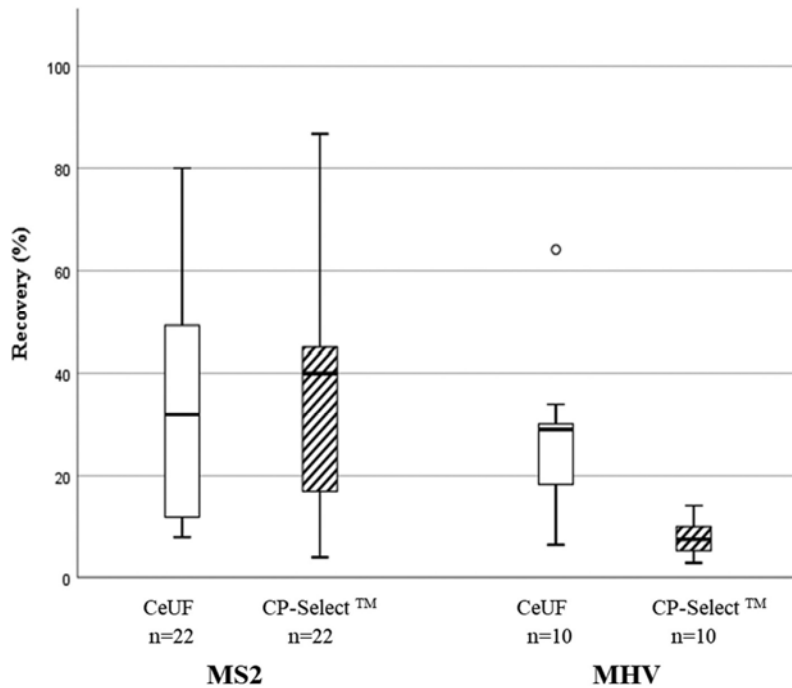


Fig. 1. Barplots of the mean recovery values (%) of MS2 and MHV by using two different ultrafiltration methods: InnovaPrep concentrating pipette with single-use ultrafiltration tips 150KDa (CP Select™) and centrifugal ultrafiltration with Centricon® Plus-70 30KDa (CeUF).

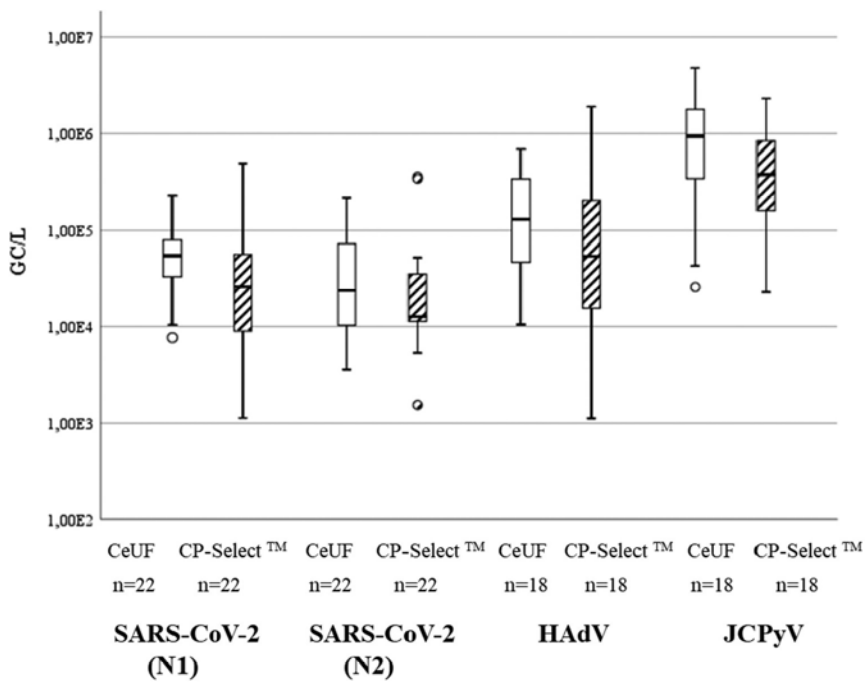


Fig. 2. Barplots of the concentrations of naturally occurring SARS-CoV-2 (N1 and N2 assays), HAdV and JCPyV (expressed in genome copies per liter) by using two different ultrafiltration methods: InnovaPrep concentrating pipette with single-use ultrafiltration tips 150KDa (CP Select™) and centrifugal ultrafiltration with Centricon® Plus-70 30KDa (CeUF).

**Table 2**

Characterization of the concentration methods: volume of wastewater sample analyzed in each reaction, mean concentration factor, estimated 95% limit of detection (LoD<sub>95%</sub>) and limit of quantification (LoQ) and mean recovery values for each of the seeded viruses.

	CP-Select™	CeUF
Sample volume analyzed per reaction	1,56–2,92 ml	0,91–2,19 ml
Concentration factor	133–333×	77–250×
LoD <sub>95%</sub> (CI) <sup>a</sup>	MS2: $5,14 \times 10^3$ ( $3,02 \times 10^3$ – $9,40 \times 10^3$ ) MHV: $6,19 \times 10^3$ ( $2,43 \times 10^3$ – $1,58 \times 10^4$ )	MS2: $5,67 \times 10^3$ ( $3,22 \times 10^3$ – $1,03 \times 10^4$ ) MHV: $6,61 \times 10^3$ ( $2,59 \times 10^3$ – $1,68 \times 10^4$ )
LoQ <sup>a</sup>	MS2: $2,32 \times 10^3$ MHV: $2,35 \times 10^4$	MS2: $3,56 \times 10^3$ MHV: $2,51 \times 10^4$
Mean recovery ± SD (CV)	MS2: 27,72 ± 24,46% (0,65) MHV: 7,51 ± 6,14% (0,68)	MS2: 26,34 ± 22,71% (0,66) MHV: 24,07 ± 14,48% (0,58)

<sup>a</sup> LoD<sub>95%</sub> and LoQ values are given in genome copies detected per liter of the original wastewater sample. CI: confidence interval; SD: Standard deviation; CV: coefficient of variation.

significant differences were observed when quantifying MS2 stocks directly or within different wastewater matrices (*p*-values >0.05) (Fig. 3). On the other hand, MHV stock quantification showed a matrix effect suggesting that the way the viral stock, used for spiking recovery assays, is quantified may influence recovery values obtained. In this study, the recoveries represented in Fig. 1 were calculated according to the direct quantification of the MHV used for spiking whereas MHV stock quantification in wastewater matrices would have showed higher viral recoveries (data not shown).

### 3.3. Virus attachment to suspended solids

Seeded MS2 and naturally occurring SARS-CoV-2 (N1 gene) were quantified from sample concentrates and in the generated pellets at the debris removal step (Fig. 4). For MS2, similar fractions were measured from the pellet (49%) and the supernatant (51%). For the naturally occurring SARS-CoV-2 (N1 assay), those samples that could be quantified showed more variability. In samples 1–9, most of the detectable SARS-CoV-2 fraction (mean values of 77%) was measured in the supernatant whereas the remaining 23% was detected in the pellets.

The turbidity of the wastewater samples was highly variable, ranging from 106 to 830 NTU (Nephelometric Turbidity Units). Weak correlations were observed between sample turbidity and

viral quantifications obtained by using the CP-Select™ method (Pearson's correlation coefficients of 0.2 and 0.4 for MS2 and MHV, respectively) and inverse relation with sample turbidity was observed when using CeUF (Pearson's correlation coefficients of 0.2 and 0.1 for MS2 and MHV, respectively). No correlations between viral concentrations and pH and BOD<sub>5</sub> were observed (<0.3).

## 4. Discussion

In the actual pandemic scenario, viral concentration methods showing acceptable performance for both enveloped and non-enveloped viruses have received increased attention. As recently reviewed, a wide variety of strategies are being used to study viral presence in wastewater (Corpuz et al., 2020) but few of those concentration methodologies has been implemented for SARS-CoV-2 surveillance (Rusiñol et al., 2020). When comparing methodologies, ultrafiltration achieves higher MHV recoveries (25%) than PEG precipitation (5%), but the ultrafiltration devices are less used than flocculation/precipitation methods (Ye et al., 2016). This has been mainly caused by the shortage of supplies and the lack of readily material in many countries during lockdowns. Nevertheless, the one-step centrifugal ultrafiltration techniques enable the detection of viruses from relatively small sample volumes (70–80 ml).

Three ultrafiltration devices: the Centricron® Plus-70 (Medema et al., 2020b), the Amicon® Ultra-15 (Ahmed et al., 2020) and the new automatic Concentrating Pipette (CP-Select™) from Innovaprep (Gonzalez et al., 2020; Rusiñol et al., 2020) have been successfully used to detect SARS-CoV-2 from wastewater. The first two devices have also been used to concentrate other human enteric viruses from water (Qiu et al., 2016; Sidhu et al., 2018). Viruses are retained based on size exclusion and backwashed from the ultrafilters. Both CeUF devices (Centricron® and Amicon®) contain an Ultracell® regenerated cellulose membrane that results in 19 cm<sup>2</sup> and 7.6 cm<sup>2</sup> respectively, whereas the CP-Select™ with Hollow Fiber Polysulfone ultrafiltration tips has a surface area of 98 cm<sup>2</sup>, which is 5 to 13 times larger than those of the other CeUF devices. To our knowledge this is the first study that compares the performance of the CP-Select™ with Centricron® Plus-70 to concentrate SARS-CoV-2 and other viruses from wastewater samples. It should be noticed that this system includes a wet foam elution step which according to the manufacturer's improves viral elution from filter cells.

When applying ultrafiltration to wastewater, samples need to be pre-centrifuged to remove larger particles and avoid clogging. The resulting supernatant (70 - 80 ml) is then passed in a single-step through the ultrafilter. Viruses have been reported to adsorb to the

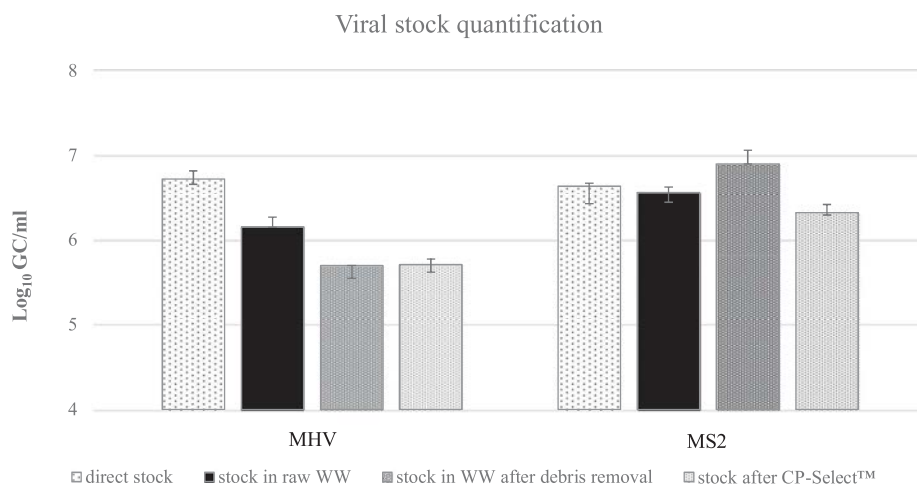
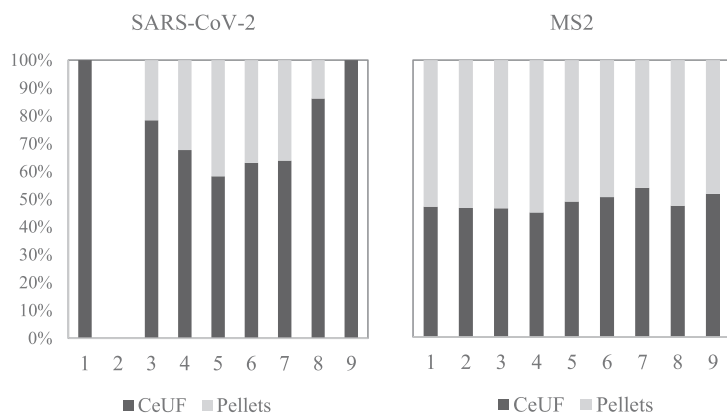


Fig. 3. Mean concentration values of the viral stocks, using 4 different quantification strategies.



**Fig. 4.** Detection of naturally occurring SARS-CoV-2 (N1 assay) and seeded MS2 in the pellet or supernatant fractions of nine wastewater samples after 4700  $\times$ g 30 min centrifugation expressed as the percentage of total viruses detected.

solid fraction of wastewater (Ye et al., 2016). According to our results, 23% of total detected SARS-CoV-2 would be discarded during the debris removal step while higher percentage of the detectable MS2 (49%) would be retained in the pellet. Ye et al. (2016) reported MHV to adsorb to the solid fraction of wastewater samples in higher percentages (26%) than MS2 (6%) while Ahmed et al., reported similar loss for seeded MHV (30%) at the pre-filtration step (Ahmed et al., 2020). According to our results and considering the need of easy and fast method for SARS-CoV-2 detection in wastewater as an early warning tool, a straightforward and routinely adopted method shouldn't consider including viruses attached to the debris. This would imply an extra elution step, from the debris, and addition to the wastewater sample, which would suppose an addition of only a percentage of viruses attached to solid material. Thus, in our opinion, this step is not worth doing for routine testing and only when very high sensitivities and accurate quantifications are needed. Regarding the two ultrafiltration methods evaluated in this study, significant differences were only observed for MHV for which CeUF devices performed better than CP-Select™. In contrast, for naturally occurring SARS-CoV-2 both methods provided similar results showing that, as expected, each single virus behave differently under the same concentration procedure. Despite MHV is also a member of the Genus *Betacoronavirus* (as SARS-CoV-2), it did not show equivalent recovery rates to CeUF. Interestingly, however, the concentration of naturally occurring SARS-CoV-2 from wastewater using both concentration methods resulted in equivalent outcomes. This suggest that the best way to compare concentration methods for SARS-CoV-2 could be testing real environmental samples since, as observed for other viruses and other concentration methods, each virus has a particular behaviour for each of the methodologies applied. The way the MHV stock was quantified seemed to affect the recovery value obtained thus pointing at a clear effect of the matrix into which the viral stock is suspended. This could be probably due to different RNA protection/degradation phenomena or to the presence/absence of enzymatic inhibition in the different matrices assayed. This is another reason to consider when evaluating viral concentration methods and another argument in favour of using naturally occurring virus to complement concentration methods comparison studies, although this strategy does not allow the estimation of recovery rates.

Overall, CeUF devices were confirmed as an efficient ultrafiltration procedure for SARS-CoV-2 as it has been previously reported by others (Ahmed et al., 2020; Medema et al., 2020b). Moreover, CP-Select™ with Hollow Fiber Polysulfone tips showed to be useful for SARS-CoV-2 concentration from wastewater as well as for the concentration of other wastewater occurring viruses independently of the turbidity of the samples. It is worth mentioning that equipment fits into a BSL-2

cabinet which makes this procedure strongly recommended for viruses requiring biosafety containment. In turn, CeUF devices should be used in a superspeed centrifuge that is difficult to fit into BSL-2 facility especially in routine laboratories that require extreme security measures to avoid spill overs.

Also, CP-Select™ provides with good concentration factor and equivalent LoD, LoQ and variance than CeUF devices. The use of Tween-20, as it has been recommended by manufacturers, has not proven to increase SARS-CoV-2 recovery although it has been observed it may help to filtrate samples reducing the time required for ultrafiltration.

CP-Select™ is a handy equipment that can be applied without previous debris elimination or by only using syringe filters or vacuum filtration devices. This device allows concentration at the point-of-use by simply connecting the CP-Select™ equipment to a power supply. The number of methods available for SARS-CoV-2 concentration from wastewater is increasing, as well as data on their performance, which will be relevant for researchers and routine laboratories in order to make a good election on their SARS-CoV-2 testing strategies. Detection of other potential pandemic enveloped viruses, that could emerge soon, would require optimized and well characterized viral concentration methods.

## 5. Conclusions

- Ultrafiltration devices (Centricon® and CP-Select™) performed equally for different naturally occurring viruses, including SARS-CoV-2, whereas for the spiked MHV, used as a model of enveloped viruses of the genus betacoronavirus, the CeUF achieved higher recoveries.
- The way the viral stock is quantified may influence recovery values calculations.
- Up to 23% of detected SARS-CoV-2 adsorb to the solid fraction and is not considered in the further detection by quantitative PCR.
- The CP-Select™ fits into a BSL-2 cabinet enabling to work under biosafety containment

## CRedit authorship contribution statement

**E. Forés:** Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing – original draft. **S. Bofill-Mas:** Methodology, Formal analysis, Writing – original draft, Conceptualization, Writing – review & editing. **M. Itarte:** Methodology, Formal analysis. **S. Martínez-Puchol:** Methodology. **A. Hundesa:** Methodology. **M. Calvo:** Formal analysis. **C.M. Borrego:** Investigation, Writing – review & editing. **L.L. Corominas:** Investigation, Writing – review & editing. **R. Girones:** Writing – review & editing. **M.**



**Rusiñol:** Methodology, Formal analysis, Conceptualization, Writing – original draft, Supervision.

### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Acknowledgements

This work was partially funded by the projects PCI2019-103643, RTI2018-097346-B-I00, and AGL2017-86797-C2-1-R projects, all funded by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities. S. Bofill-Mas is a Serra-Hunter fellow at the University of Barcelona. This study is performed with partial support from the Water Research Institute of the University of Barcelona. Graphical abstract was created with [Biorender.com](https://biorender.com). ICRA authors acknowledge the support from the Economy and Knowledge Department of the Catalan Government through Consolidated Research Group (ICRA-ENV 2017 SGR 1124). ICRA is part of the CERCA program. We would like to thank Dr. Zammit for his critical revision of the manuscript.

### References

- Ahmed, W., Bertsch, P., Bivins, A., Bibby, K., Farkas, K., Gathercole, A., Haramoto, E., Gyawali, P., Korajkic, A., McMinn, B.R., Mueller, J., Simpson, S., Smith, W.J.M., Symonds, E.M., Thomas, K.V., Verhagen, R., Kitajima, M., 2020. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Sci. Total Environ.* doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139960>.
- Casanova, L., Rutala, W., Weber, D., Sobsey, M., 2009. Survival of surrogate coronaviruses in water. *Water Res.* 43. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.002>.
- Corpuz, M.V.A., Buonerba, A., Vigliotta, G., Zarra, T., Ballesteros, F., Campiglia, P., Belgioro, V., Korshin, G., Naddeo, V., 2020. Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. *Sci. Total Environ.* 745, 140910. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140910>.
- Coulliette, A.D., Perry, K.A., Fisher, E.M., Edwards, J.R., Shaffer, R.E., Noble-Wang, J., 2014. MS2 Coliphage as a surrogate for 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus (pH1N1) in surface survival studies on N95 filtering Facepiece respirators. *J. Int. Soc. Respir. Prot.* 21, 12–22.
- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., Kubista, M., 2017. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol. Detect. Quantif.* 12, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001>.
- Gonzalez, R., Curtis, K., Bivins, A., Bibby, K., Weir, M.H., Yetka, K., Thompson, H., Keeling, D., Mitchell, J., Gonzalez, D., 2020. COVID-19 surveillance in southeastern Virginia using wastewater-based epidemiology. *Water Res.* 186. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116296>.
- Herrroth, B.B.E., Conden-Hansson, A.-C., Rehnstam-Holm, A.-S., Girones, R., Allard, A.K., 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4523–4533. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4523>.
- Iknor, L.A., Soto-Beltran, M., Bright, K.R., 2011. New method using a positively charged micro-porous filter and ultrafiltration for concentration of viruses from tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3500–3506. <https://doi.org/10.1128/AEM.02705-10>.
- Kitajima, M., Ahmed, W., Bibby, K., Carducci, A., Gerba, C.P., Hamilton, K.A., Haramoto, E., Rose, J.B., 2020. SARS-CoV-2 in wastewater: state of the knowledge and research needs. *Sci. Total Environ.* 739. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076>.
- Leibowitz, J., Kaufman, G., Liu, P., 2011. Coronaviruses: propagation, quantification, storage, and construction of recombinant mouse hepatitis virus. *Curr. Protoc. Microbiol.* <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc15e01s21>.
- Medema, G., Been, F., Heijnen, L., Petterson, S., 2020a. Implementation of Environmental Surveillance for SARS-CoV-2 Virus to Support Public Health Decisions: Opportunities and Challenges. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.*
- Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., Brouwer, A., 2020b. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in the Netherlands. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 7, 511–516. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>.
- Pal, A., Sirota, L., Maudru, T., Peden, K., Lewis, A.M., 2006. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J. Virol. Methods* 135, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.01.018>.
- Pecson, B.M., Martin, L.V., Kohn, T., 2009. Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5544–5554. <https://doi.org/10.1128/AEM.00425-09>.
- Qiu, Y., Lee, B.E., Ruecker, N.J., Neumann, N., Ashbolt, N., Pang, X., 2016. A one-step centrifugal ultrafiltration method to concentrate enteric viruses from wastewater. *J. Virol. Methods* 237, 150–153. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.09.010>.
- Rusiñol, M., Martínez-Puchol, S., Forés, E., Itarte, M., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2020. Concentration methods for the quantification of coronavirus and other potentially pandemic enveloped virus from wastewater. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* 17, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.08.002>.
- Sidhu, J.P.S., Sena, K., Hodgers, L., Palmer, A., Toze, S., 2018. Comparative enteric viruses and coliphage removal during wastewater treatment processes in a subtropical environment. *Sci. Total Environ.* 616–617, 669–677. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.265>.
- Ye, Y., Ellenberg, R.M., Graham, K.E., Wigginton, K.R., 2016. Survivability, partitioning, and recovery of enveloped viruses in untreated municipal wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5077–5085. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00876>.



#### 4.4. AVALUACIÓ DE L'EFICIÈNCIA DE DESINFECCIÓ DE PATÒGENS DE L'OXIDACIÓ ELECTROQUÍMICA AVANÇADA PER CONVERTIR-SE EN UNA TECNOLOGIA SOSTENIBLE PER A LA REUTILITZACIÓ DE L'AIGUA

*“Evaluation of pathogen disinfection efficiency of electrochemical advanced oxidation to become a sustainable technology for water reuse”*

Forés, E., Mejías-Molina, C., Ramos, A., Itarte, M., Hundesa, A., Rusiñol, M., Martínez-Puchol, S., Esteve-Bricullé, P., Espejo-Valverde, A., Sirés, I., Calvo, M., Araujo, R.M., Girones, R.

*Manuscript en procés de revisió a la revista Chemosphere.*

La reutilització de l'aigua contribueix a la preservació dels recursos hídrics i a reduir l'estrès hídric de les masses d'aigua, encara que requereix de tractaments complexos per la producció d'aigua segura. Els processos electroquímics avançats (EOAP) han sorgit com a alternativa sostenible per a la reutilització de l'aigua, on l'eficiència d'aquests sistemes per degradar compostos orgànics persistents i alguns patògens en diferents matrius ha estat demostrada.

Tanmateix, els assajos de desinfecció s'han centrat en la inactivació bacteriana i, en general, mitjançant l'ús de solucions sintètiques. A més a més, existeixen gran diversitat de sistemes electroquímics, que sumat als nombrosos paràmetres a mantenir sota control, condueix a dades i conclusions contradictòries de complexa interpretació, limitant l'aplicabilitat real d'aquests sistemes avançats. Per la qual cosa, l'objectiu principal d'aquest estudi ha sigut demostrar a escala de laboratori la viabilitat d'un sistema electroquímic per inactivar la diversitat de microorganismes que poden representar diferents nivells de risc com a contaminants d'aigua. En aquest estudi s'han analitzat bacteris, espores bacterianes, protozous, bacteriòfags i virus en una solució d'aigua sintètica NaCl 7 mM utilitzada com a aigua de referència i matrius d'aigua provinents d'un efluent d'EDAR tractada mitjançant un sistema de llacunatge com a tractament terciari, i l'estudi es complementa amb l'estudi preliminar de mostres d'aigua de riu i aigua mineral.

Els dos tipus d'elèctrodes estudiats van ser una ànode de DSA de Ti|RuO<sub>2</sub> i un ànode de Si|BDD, utilitzant com a càtode un elèctrode d'acer inoxidable a un voltatge de 12 V. Malgrat la baixa densitat de corrent a què operaven els sistemes, ambdós ànodes han demostrat la producció d'espècies oxidants en aigües naturals com és l'aigua d'aiguamoll.

Arrel dels resultats obtinguts dels assajos de desinfecció, s'han modelitzat les cinètiques d'inactivació dels microorganismes testats mitjançant models logístics de regressió. L'eficàcia de desinfecció dels tractaments aplicats als efluentes d'aiguamoll va ser alta per al bacteriòfag MS2 ( $T_{90} \leq 0,9$  min;  $T_{99} \leq 1,4$  min), i per als bacteris assajats ( $T_{90} \leq 26,5$  min;  $T_{99} \leq 32,4$ ), però limitada per a CBV5, tot i que es va assolir una eliminació d'un logaritme en un temps breu ( $T_{90} \leq 7,8$  min;  $T_{99} > 300$  min) i TuV ( $T_{90} > 300$  min), espores ( $T_{90} \leq 156$  min;  $T_{99} > 300$  min) i amebes ( $T_{90} > 300$  min).

Amb tot, el tractament aplicat ha reduït la concentració de patògens a l'aigua a diferents nivells, mostrant diferents cinètiques de desinfecció. Per a tots dos ànodes provats, el MS2 va presentar una ràpida inactivació mostrant una cinètica exponencial. Els bacteris van presentar corbes sigmoïdals similars als de MS2, mentre que els virus humans, les espores i les amebes van resultar en corbes cinètiques lineals. Així doncs, donada la diferent susceptibilitat dels diferents microorganismes front a un mateix tractament, s'han de considerar diferents models per tal de predir les cinètiques d'inactivació amb precisió. A més a més, els resultats d'aquest estudi demostren que l'ús de certs indicadors com són els bacteriòfags o bacteris per avaluar la inactivació viral no són models adequats per la desinfecció de virus.

D'altra banda, malgrat que les densitats de corrent aplicades no han estat suficients per a modificar les propietats fisicoquímiques de les matrius estudiades, les concentracions de subproductes tòxics com són els trihalometans (THM) després dels tractaments d'electrooxidació en ambdós ànodes, van ser superiors als permesos per les directrius d'aigua potable de l'OMS, establertes en 100 ppb, per la qual cosa, la producció de subproductes ha de ser controlada quan s'apliquen aquest tipus de sistemes per tal d'evitar la seva acumulació.

Tot i això, l'addició com a pas final de desinfecció en efluentes d'aiguamolls pot contribuir a una reducció significativa dels patògens bacterians i a la reducció d'un logaritme de la concentració viral facilitant la seva reutilització per al reg. A més, tenint en compte el baix consum d'energia requerit, es poden desenvolupar unitats descentralitzades de tractament d'aigua alimentades per plafons fotovoltaics per tractar les aigües residuals a petites comunitats.

1 **Evaluation of pathogen disinfection efficiency of electrochemical**  
2 **advanced oxidation to become a sustainable technology for water reuse**

3 Eva Forés<sup>a,b</sup>, Cristina Mejías-Molina<sup>a,b</sup>, Arantxa Ramos<sup>c</sup>, Marta Itarte<sup>a,b</sup>, Ayalkibet  
4 Hundesa<sup>a,b</sup>, Marta Rusiñol<sup>a,b</sup>, Sandra Martínez-Puchol<sup>a,b</sup>, Pau Esteve-Bricullé<sup>c</sup>,  
5 Alejandro Espejo-Valverde<sup>c</sup>, Ignasi Sirés<sup>d</sup>, Miquel Calvo<sup>e</sup>, Rosa M. Araujo<sup>c</sup>,  
6 Rosina Girones<sup>a,b,\*</sup>

7 *<sup>a</sup> Laboratory of Viruses Contaminants of Water and Food, Departament de Genètica,*  
8 *Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona,*  
9 *Spain*

10 *<sup>b</sup> Institut de Recerca de l'Aigua (IdRA), Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain*

11 *<sup>c</sup> Secció de Microbiologia, Virologia i Biotecnologia, Departament de Genètica, Microbiologia i*  
12 *Estadística, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain*

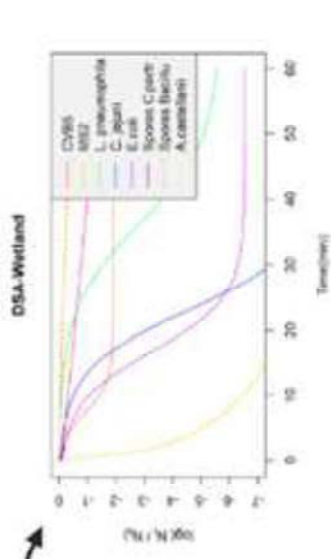
13 *<sup>d</sup> Laboratori d'Electroquímica dels Materials i del Medi Ambient, Departament de Ciència de*  
14 *Materials i Química Física, Secció de Química Física, Facultat de Química, Universitat de*  
15 *Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain*

16 *<sup>e</sup> Secció d'Estadística, Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de*  
17 *Biologia, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain*

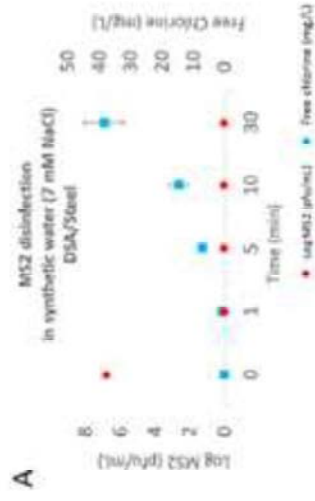
18 \* Corresponding author: *E-mail address: rgirones@ub.edu (R. Girones)*

## HIGHLIGHTS

- Electrochemical disinfection for safe water production with low energy consumption.
- Disinfection of bacteria, bacteria spores, bacteriophages, virus, and protozoa.
- Description of inactivation kinetics using logistic, exponential, and linear models.
- Disinfection efficiency is limited for virus, spores and amoebas.
- Bacteria and bacteriophages are not a suitable model for viral disinfection.



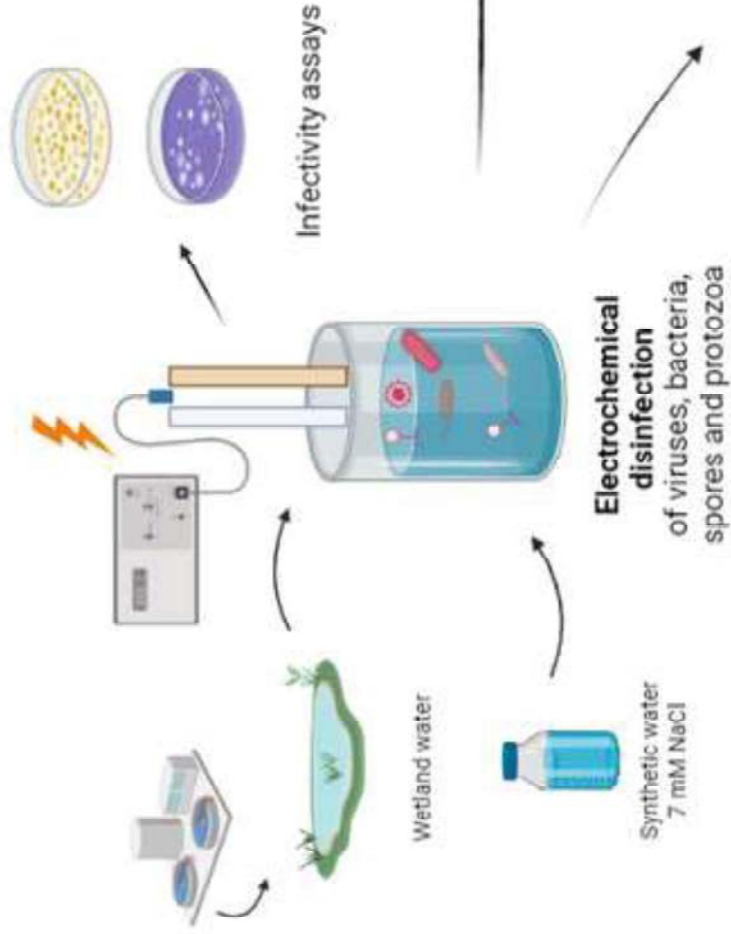
### Modeling of inactivation kinetics



### Free Chlorine production and viral inactivation



### By-products determination



## Abstract

19 Water treatment and reuse is gaining acceptance as a strategy to fight against water contamination  
20 and scarcity, but it usually requires complex treatments to ensure safety. Consequently, the  
21 electrochemical advanced processes have emerged as an effective alternative for water  
22 remediation. The main objective here is to perform a systematic study that quantifies the  
23 efficiency of a laboratory-scale electrochemical system to inactivate bacteria, bacterial spores,  
24 protozoa, bacteriophages and viruses in synthetic water, as well as in urban wastewater once  
25 treated in a wetland for reuse in irrigation. A Ti|RuO<sub>2</sub>-based plate and Si|BDD thin-film were  
26 comparatively employed as the anode, which was combined with a stainless-steel cathode in an  
27 undivided cell operating at 12 V. Despite the low resulting current density (< 15 mA/cm<sup>2</sup>), both  
28 anodes demonstrated the production of oxidants in wetland effluent water. The disinfection  
29 efficiency was high for the bacteriophage MS2 (T99 in less than 7.1 min) and bacteria (T99 in  
30 about 30 min as maximum), but limited for CBV5 and TuV, spores and amoebas (T99 in more  
31 than 300 min). MS2 presented a rapid exponential inactivation regardless of the anode and  
32 bacteria showed similar sigmoidal curves, whereas human viruses, spores and amoebas resulted  
33 in linear profiles. Due the different sensitivity of microorganisms, different models must be  
34 considered to predict their inactivation kinetics. On this basis, it can be concluded that evaluating  
35 the viral inactivation from inactivation profiles determined for bacteria or some bacteriophages  
36 may be misleading. Therefore, neither bacteria nor bacteriophages are suitable models for the  
37 disinfection of water containing enteric viruses. The electrochemical treatment added as a final  
38 disinfection step enhances the inactivation of microorganisms, which could contribute to safe  
39 water reuse for irrigation. Considering the calculated low energy consumption, decentralized  
40 water treatment units powered by photovoltaic modules might be a near reality.

*Keywords:* Electrochemical disinfection, microbial pathogens, microbial indicators, inactivation kinetics, viruses, water reuse



## 41 **1. Introduction**

42 There is general consensus on the unceasing pressure undergone by natural water resources  
43 worldwide. Freshwater, representing only a 3% of the total water on Earth, is threatened by  
44 several menaces such as uncontrolled development or unpredictable weather patterns caused by  
45 global warming and other phenomena (UN 2020). This situation is particularly critical for food  
46 production, which is one of the most water-consuming sectors nowadays (Food and Agriculture  
47 Organization (FAO), 2018). To decrease current water stress with the aim of preserving resources  
48 for future generations, water reuse has been adopted as a potential strategy to follow.

49 Water reuse for irrigation requires safe water production, understood as water free of pollutants,  
50 both chemical and microbiological that could represent a public health risk. Nevertheless,  
51 commonly applied wastewater treatment technologies do not remove all pollutants and thus,  
52 improved and/or additional treatments are needed before reuse of treated wastewater is allowed  
53 for all potable water uses (Aquino De Carvalho et al., 2017; Soller et al., 2018). Focusing on  
54 microbiological contaminants, it has been described that wastewater effluents may contain a  
55 significant concentration of several pathogens, including bacteria, viruses, protozoa, and  
56 helminths (Gunnarsdottir et al., 2020; Qiu et al., 2015; Rusiñol et al., 2015; Sassi et al., 2018).  
57 Among them, viruses and protozoa tend to be highly resistant to conventional disinfection  
58 treatments employed in wastewater treatment plants (WWTPs) (US EPA, 2018). These  
59 microorganisms are responsible for waterborne diseases, associated to the faecal-oral route,  
60 mainly causing gastroenteritis alongside other pathologies depending on the etiological agent  
61 (Cook 2013, Cabral 2010). Therefore, if WWTPs are not efficient in removing these  
62 contaminants, water reuse for irrigation may compromise water bodies and human health. Fresh  
63 vegetables are often eaten raw or minimally processed, being the irrigation water the most  
64 probable source of contamination (Balali et al., 2020; Callejón et al., 2015; Fernandez-Cassi et  
65 al., 2017; Itarte et al., 2021). To mitigate these events, it is crucial to develop simple and green  
66 technologies capable of producing safe water for irrigation, eventually diminishing the pressure  
67 on water bodies.

68 In recent years, the electrochemical advanced oxidation processes (EAOPs) have emerged as an  
69 effective alternative for remediation of water containing persistent organic pollutants, being also  
70 proposed as water disinfection technologies (Anfruns-Estrada et al., 2017; Gassie and Englehardt,  
71 2017; Moreira et al., 2017; Rajasekhar et al., 2020). For example, recent studies are focused on  
72 improving the antimicrobial activity of electrode surfaces at low cell voltage for effective  
73 biofouling control using chelators (Lin et al., 2020). Others authors have designed new reactor  
74 configurations such as tubular coaxial-electrode copper ionization cells or nanowire-based  
75 technologies for harnessing the electric field; the resulting electroporation mechanisms yielded  
76 the complete inactivation of microorganisms at low voltages (Huo et al., 2022; Zhou et al 2019),  
77 An additional strength of these methods is the low energy consumption required, which opens the  
78 door to sustainable water treatment with renewable energy-powered devices (Ganiyu et al., 2020).  
79 In this context, decentralized water treatment units may be developed for treating wastewater of  
80 small communities or for applying a final disinfection treatment for irrigation purposes (Huang  
81 et al., 2016; Mosquera-Romero et al., 2022; Mousset et al., 2021; Sirés et al., 2014).

82 Electrooxidation (EO) is the simplest EAOP because of the minimal experimental restrictions and  
83 high versatility to treat effluents with very different characteristics (Martínez-Huitle et al., 2015,  
84 2018). In EO process, anodes with a large oxygen evolution overpotential are employed for in-  
85 situ generation of reactive oxygen species (ROS). Hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) predominates as main  
86 ROS, but it is accompanied by peroxides, superoxide radical and singlet oxygen, all of them  
87 possessing a high oxidation power. During the application of EO, decontamination mechanisms  
88 can occur through direct anodic oxidation and different types of mediated oxidation reactions,  
89 such as those that involve chloride as precursor of effective oxidants against pollutants. When the  
90 aqueous solution contains chloride ions, reactive chlorine species (RCS) or active chlorine (i.e.,  
91  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{HClO}$  and  $\text{ClO}^-$ ) is generated through the combination with ROS generated on the anode  
92 surface (Sirés et al., 2014). In addition to the electrolyte composition, the anode material is another  
93 key factor to consider in EO because it determines the type, amount and activity of the oxidizing  
94 species generated during the treatment. Anodes are typically classified as active or non-active, on

95 the basis of the behaviour of the  $\cdot\text{OH}$  produced as intermediate from water oxidation on the anode  
96 surface. Active anodes, such as  $\text{IrO}_2$ - and  $\text{RuO}_2$ -based dimensionally stable anodes (DSA), show  
97 a poor mineralization ability because the  $\cdot\text{OH}$  is readily converted into a chemisorbed higher metal  
98 oxide (MO) with relatively low oxidation power (Dbira et al., 2019; Lanzalaco et al., 2018;  
99 Moreira et al., 2017; Rajasekhar et al., 2020). Conversely, the non-active anodes like boron-doped  
100 diamond (BDD) allow generating physisorbed  $\cdot\text{OH}$  (Bruguera-Casamada et al., 2016), whose  
101 weak bond with the anode surface confers a high reactivity with pollutants (Dbira et al., 2019;  
102 Martínez-Huitle et al., 2015). Conversely, active chlorine is expected to be produced in a larger  
103 amount using DSA as compared to BDD, as the greater adsorption of the anion on the former  
104 anode surface promotes its conversion to  $\text{Cl}_2$  (Sirés et al., 2014).

105 The technical feasibility of EAOPs to degrade various classes of persistent organic compounds  
106 and some pathogens in different matrices has been proven, usually reporting high  
107 decontamination rates and quantitative pollutant removals (Kokkinos et al., 2021; Li et al., 2021;  
108 Mousset et al., 2021; Sanchis et al., 2021; Sirés et al., 2014). Nevertheless, microbial disinfection  
109 trials have been mostly focused on bacterial inactivation and, to a lesser extent, bacteriophages  
110 (Huo et al., 2022), assuming same susceptibilities to disinfection treatments for these  
111 microorganisms and for others such as human viruses, amoebas or resistant forms such as spores.  
112 Furthermore, in general, the use of synthetic solutions does not allow accounting for relevant  
113 physicochemical properties of actual matrices, such as irrigation water characterized for  
114 presenting high contents of organic matter and presence of pathogen mixtures (Gonzales-  
115 Gustavson et al., 2019). This fact, added to the wide range of EAOPs and the numerous  
116 parameters to keep under control, leads to contradictory data and conclusions that are complex to  
117 interpret, thus limiting the actual applicability of these advanced systems (Anfruns-Estrada et al.,  
118 2017; Huang et al., 2016; Rajasekhar et al., 2020; Valero et al., 2017). Consequently, to our  
119 understanding, more systematic research has to be carried out with different microorganisms,  
120 aiming to demonstrate the disinfection efficiency of EO. At the moment, published studies on  
121 water disinfection seem to establish that bacteria are highly sensitive, whereas viruses or protozoa

122 present much higher resistance, but these ideas are extrapolated from a limited number of  
123 inactivation trials with single microorganisms (Chen et al., 2021, Ghernaout et al., 2019, Cossali  
124 et al., 2016). Indeed, the performance of EO with DSA and BDD has been investigated elsewhere;  
125 for example, DSA anodes have been applied to disinfect effluents of constructed wetland, but  
126 only focusing on bacterial indicators (Mosquera-Romero et al., 2022). The novelty of the present  
127 work arises from the large set of microorganisms representing the main microbial structures, such  
128 as microorganism with cellular membranes like bacteria, protein structures like viruses and  
129 resistance forms with several layers such as spores or amoebas. A systematic study has been  
130 planned and, moreover, actual natural water used for irrigation purposes has been included, which  
131 becomes relevant because its characteristics can interfere in the EO disinfection efficiency.

132 Given the importance and necessity of water reuse and the public health risks that it may pose, a  
133 multi-barrier approach to water purification is key to ensuring safe water production. In this study,  
134 an electrochemical system that could potentially be applied as a final disinfection step has been  
135 evaluated, providing greater assurance of safe water production. In particular, the aim of this work  
136 was to assess the disinfection potential of two different anodes, a RuO<sub>2</sub>-based DSA and BDD,  
137 under different electrolytic conditions. A range of model microorganisms including bacteria,  
138 bacteria spores, protozoa, bacteriophages, and viruses has been selected to compare the  
139 inactivation kinetics when they are embedded in either a synthetic solution or actual surface water  
140 from a wetland, at laboratory scale.

## 141 **2. Experimental**

### 142 *2.1 Water matrices*

143 First trials were designed to define conditions and to assess the feasibility of the system in diverse  
144 types of water. Several water samples were tested, including river water collected from Besòs  
145 river, which shows high consistent presence of faecal contamination (Jurado et al., 2019) and  
146 commercial mineral water purchased from a grocery store, belonging to mountain spring water  
147 located in Sant Hilari Sacalm (Girona). Synthetic water prepared with a 7 mM NaCl solution and  
148 the effluent from wetlands analysed in previous studies (Gonzales-Gustavson et al., 2019) were

149 selected to conduct the electrochemical disinfection experiments. Wetland water, part of tertiary  
150 wastewater treatment, belongs to a lagooning system located in Granollers (Barcelona) composed  
151 by shallow planted areas (*Phragmites australis* and *Typha latifolia*) with a water depth between  
152 0.3 and 0.4 m, and deep unplanted areas with a water depth of 1.5 m. The constructed wetland  
153 treats a 10% of the discharges of the secondary treatment of a WWTP with a flow capacity of  
154 30,000 m<sup>3</sup>/day. The reclaimed water produced is used by locals for irrigation and farming  
155 proposes.

156 Samples were collected in sterile glass bottles and transported to the laboratory under cold  
157 conditions (4 °C) until performing the experiments. Samples of 2 L of wetland water were  
158 homogenized and aliquoted to develop triplicate experiments. Aliquots of 250 mL were used for  
159 each trial.

## 160 2.2 Microorganisms production and quantification

### 161 (i) Bacteriophages: PhiX174 and MS2

162 Two bacteriophages, PhiX174 (ATCC13706-B1) with DNA genome and MS2 (ATCC 23631)  
163 with RNA genome, widely used as a viral enteric surrogates of inactivation studies (Casteel, 2008,  
164 Kokkinos, 2021), were cultured and quantified in *Escherichia coli* (*E. coli*) WG5 (ATCC 13706),  
165 following ISO 10705-2:2000 protocol, and in *Salmonella typhimurium* WG49 (NCTC 12484),  
166 following ISO 10705-1:1995 protocol, respectively.

### 167 (ii) Viruses: CVB5 and TuV

168 Coxsackie virus B5 (CVB5) was selected as representative of a human enteric virus highly  
169 resistant to inactivation, and Tulane virus has been used as a calicivirus surrogate for human  
170 norovirus. CVB5 (ATCC® VR-185™) and Tulane virus (TuV) (kindly donated by VISAFELAB)  
171 were produced by infecting BGM (ECACC 90092601) cells and LLC-MK2 cells (ATCC CCL-  
172 7), respectively. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco,  
173 Life Technologies) containing 2×(maintenance medium) or 5×(growth medium) of heat-

174 inactivated fetal bovine serum (FBS) for BGM cells and 2×(maintenance medium) or 10×(growth  
175 medium) for LLC-MK2. DMEM was supplemented with 2% glutamine and 1% penicillin-  
176 streptomycin (Gibco, Life Technologies). All viruses were released from cells by freezing and  
177 thawing the cultures three times. To eliminate cell debris, a centrifugation step at 3000 ×g for 10  
178 min was applied. The supernatant obtained was ultracentrifuged for 1 h at 34,500 ×g and  
179 resuspended in PBS and stored in 1.5 mL aliquots at -80 °C until use.

180 Infectious CVB5 and TuV viral particles were quantified by plaque assays after inoculating 1 mL  
181 of 10-fold dilutions of the concentrates to cell monolayers in 90-mm<sup>2</sup> Falcon™ standard tissue  
182 culture dishes (Thermo Fisher Scientific). After 1 h of adsorption at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, the  
183 infected cells were overlaid with 12 mL of DMEM 2×containing 2% of Oxoid™ Purified Agar  
184 (Thermo Fisher Scientific). Following a 48 h incubation for CVB5 and 96 h for TuV at 37 °C and  
185 5% CO<sub>2</sub>, the agar was removed, and the attached cells were fixed and stained for 45 min with 6  
186 mL of 1% crystal violet (Merck) in 11.4% formaldehyde (Panreac) and 2%-propanol (Panreac).

187 (iii) Bacteria: *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Campylobacter jejuni*

188 Three bacteria were selected as representatives of faecal indicators. *E. coli* and two representative  
189 pathogens with different ecological characteristics, *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*)  
190 and *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*). The production of the bacteria consisted of obtaining a  
191 culture of each bacterium. *E. coli* (ATCC 23725) in TSA at 37 °C for 24 h, *L. pneumophila* sg1  
192 (ATTC 33152), in BCYE at 37 °C for 72 h and *C. jejuni* (DSMZ 4688) in CCDA at 42 °C with  
193 microaerophilia for 48 h. Subsequently, each bacterial growth was resuspended in ¼ Ringer's  
194 solution, and the dilution was measured by spectrophotometer and adjusted to an optical density  
195 equivalent to a bacterial concentration of 10<sup>8</sup> CFU/mL.

196 *E. coli* counts were performed according to ISO 9308-1:2014, on Endo Agar at 37 °C for 24 h.  
197 Endo Agar is a chromogenic medium in which *E. coli* can be distinguished from other coliforms.  
198 *C. jejuni* enumeration was performed based on ISO 17995:2019, using the most probable number  
199 technique with Preston Campylobacter Selective Enrichment Broth and Campylobacter Blood-

200 free Agar Base (CCDA) media, both at 42 °C for 48 h and with microaerophilia. *L. pneumophila*  
201 counts were performed according to ISO 11731:2017 with GVPC medium at 37 °C for 72h.

202 (iv) Bacteria endospores: *Clostridium perfringens* spores, *Bacillus cereus* spores

203 *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) spores were analysed for being an indicator of faecal  
204 pollution and for being a surrogate of *Cryptosporidium* cyst, a protozoan parasite (Brendan  
205 Headd, Scott A. Bradford 2016). *Bacillus cereus* (*B. cereus*), was chosen for causing foodborne  
206 illnesses and for creating resistance spores. *B. cereus* spores were analysed for being a high  
207 resistance structures that persist in water, food, and in the environment. For the spores production,  
208 *B. cereus* (ATCC 27348) was grown on TSA plate at 37 °C for 24 h and *C. perfringens* (CECT  
209 136) was grown on SPS plate at 37 °C and anaerobiosis for 48h. These cultures were left for two  
210 weeks at room temperature (20 - 25 °C) instead of 37 °C to allow the culture to age and be in  
211 unfavourable conditions, which favours spore formation. The spores were then resuspended in ¼  
212 Ringer's solution and were counted as 10<sup>7</sup> spores/mL of *B. cereus* and 10<sup>6</sup> spores/mL of *C.*  
213 *perfringens* by malachite green staining.

214 Bacterial spores of *B. cereus* and *C. perfringens* were quantified after a pretreatment, the samples  
215 were heat shocked to activate the spores and form CFU. The heat shock was performed in a water  
216 bath at 80 °C for 10 min. To count *B. cereus* spores, *B. cereus* spores were seeded in 1/10 serial  
217 dilution in TSA at 37 °C for 24 h and counted CFU/mL between 30 and 300. *C. perfringens* spores  
218 enumeration was performed according to ISO 7937:2004. In a 10 mL tube, 200 µL of the 1/10  
219 serial dilution of the sample was placed in 4.8 mL of sterile Milli-Q water. To this mixture, 5 mL  
220 of 2X SPS agar was added and allowed to solidify, thus providing anaerobiosis. The tubes were  
221 incubated at 42 °C for 24 h and the CFU/mL were counted in tubes containing between 15 and  
222 150 CFU.

223 (v) Protozoa: *Acanthamoeba castellanii*

224 *Acanthamoeba castellanii* (*A. castellanii*) (CCAP 1534/2) was cultured with PYG (Peptone-  
225 Yeast-Glucose Medium) at 37 °C for 72h. The culture medium was then changed from PYG to

226 PAS (Page Amoeba Saline Solution) and resuspended and counted with a Neubauer chamber to  
227 determine the concentration, adjusted to  $10^6$  cells/mL. *Acanthamoeba spp.* are distributed in  
228 aqueous environments worldwide, and some of them can be opportunistic pathogens, causing  
229 keratitis infections and other types of infections, whereas others can host pathogenic bacteria like  
230 *Legionella* or *Chlamydia*.

231 *A. castellanii* concentration was determinate using a Neubauer chamber. After the treatment only  
232 the cells with a similar morphology to the inoculated were counted. Moreover, to validate that  
233 counts in some experiments the cells were counted at the beginning and the end of the treatment  
234 by culturing the diluted samples in PYG by triplicate and quantified by the MPN (Most Probable  
235 Number).

### 236 2.3 Electrolytic system and disinfection assays

237 Electrochemical disinfection experiments were carried out by EO process at bench scale in  
238 triplicate, employing a working volume of 250 mL of different types of aqueous solutions  
239 thermostated at room temperature (25 °C). The two types of anodes investigated in the study  
240 were a Ti|RuO<sub>2</sub>-based DSA plate supplied by NMT Electrodes (Pinetown, South Africa) and a  
241 Si|BDD thin-film anode purchased from NeoCoat (La-Chaux-de-Fonds, Switzerland). In all the  
242 assays, a single anode/cathode pair was employed, with an AISI 304 stainless-steel plate used as  
243 the cathode. The electrode area exposed to the electrolyte was always 3 cm<sup>2</sup> and the interelectrode  
244 gap was 1 cm. The trials were performed under potentiostatic conditions, at a cell voltage of 12  
245 V supplied by a DC PowerPac™ HC Power Supply (Bio-Rad). Single model microorganisms at  
246 known concentrations were spiked into each water matrix under study. The target microorganisms  
247 included bacteriophages and viruses, bacteria, bacteria spores and protozoa. The first disinfection  
248 trials were planned to assess the inactivation of the MS2 and PhiX174 bacteriophages in a 7 mM  
249 NaCl solution and in wetland water. Promptly, the same tests were carried out with bottled mineral  
250 water and river water in order to assess the feasibility of the system in other types of water. Once  
251 optimized the experimental conditions, disinfection trials were performed with the other  
252 microorganisms.



253 The electrolyses were carried out under constant magnetic stirring at 800 rpm, and 10 mL of  
254 sample were withdrawn at different times for active chlorine and pathogen quantification. In the  
255 aliquots for microbial analysis, 100  $\mu\text{L}$  of 10 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  solution were immediately added to  
256 neutralize the residual active chlorine, thus stopping the action of the oxidants.

257 The specific energy consumption (EC) per unit of treated volume ( $V$ , in  $\text{m}^3$ ) was calculated as  
258 follows:

$$259 \quad \text{EC (kWh/m}^3\text{)} = \frac{E_{\text{cell}}It}{1000V} \quad (1)$$

260 where  $E_{\text{cell}}$  is the applied cell voltage (in V),  $I$  the resulting current (in A), and  $t$  is the time (in h)  
261 needed for reaching 0.5, 1 and 2 log reduction (i.e., T50, T90 and T99) (Murrieta et al 2020).  
262 These calculations have allowed the determination of EC values at each of these times ( $\text{EC}_{\text{T50}}$ ,  
263  $\text{EC}_{\text{T90}}$  and  $\text{EC}_{\text{T99}}$ ).

#### 264 2.4 Instruments and analytical methods

265 Active chlorine production was assessed using the N, N'-diethyl-*p*-phenylenediamine (DPD)  
266 method, employing a HI97734 auto-diagnostic portable photometer and reagents from Hanna  
267 Instruments. Turbidity and pH were measured at 0 and 60 min with a Hanna Instruments  
268 turbidimeter (HI 98703) and a Crison 2000 pH-meter, respectively. By-products formation was  
269 evaluated at different times by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Ion  
270 concentrations were analysed by ion chromatography (IC). Total organic carbon (TOC)  
271 measurements were obtained by injecting 50  $\mu\text{L}$  aliquots into a Shimadzu TOC-VCSN analyser  
272 operated in non-purgeable organic carbon (NPOC) mode.

#### 273 2.5 Modelling inactivation kinetics

274 Inactivation kinetics were calculated from the logarithmic inactivation data for each  
275 microorganism and were adjusted to a modified logistic regression model based on Bruguera-  
276 Casamada et al., 2016 expressed as follows:  $\log(N_t/N_0) = k/(1 + a \exp(it))$ , where  $k$  denotes the  
277 theoretical maximum log reduction achieved upon the EO treatment,  $a$  is a parameter of

278 adjustment related to the shape of the first shoulder,  $i$  is the inactivation rate (in  $\text{min}^{-1}$ ) and  $t$  is the  
279 electrolysis time (in min). In those cases where the model did not fit, an exponential regression  
280 model or a linear regression model have been applied to depict all the data in a descriptive way.  
281 Note that, although the electrochemical disinfection experiments were made in triplicate, only  
282 replicates with enough reliable data have been considered for the kinetic study.

### 283 **3. Results and discussion**

284 The disinfection of water by means of the EO process has reduced the concentration of pathogens  
285 in water at different levels and it is remarkable the resistance observed of some viruses and  
286 bacterial spores. Changes in general water parameters, active chlorine accumulation and evolution  
287 of DBPs have been evaluated during the electrochemical trials performed with each anode. To  
288 sum up, the feasibility of a decentralized water disinfection system is briefly discussed  
289 considering the energy needs.

#### 290 *3.1 Relation between virus inactivation and changes in physicochemical parameters of water*

291 In Figure 1, the time course of active chlorine concentration upon EO treatment of synthetic water  
292 and wetland water containing MS2 with DSA or BDD anode is depicted, whereas Table 1  
293 summarizes the values of pH, electric conductivity, and turbidity for the two main solutions under  
294 study. The treatment of the 7 mM NaCl synthetic solution used as a model water with DSA at 12  
295 V (i.e., 40 mA and  $13.3 \text{ mA/cm}^2$ ) yielded the highest active chlorine accumulation, reaching 40  
296 mg/L at 60 min. This led to a fast total inactivation of MS2 (7 log decay) within just 1 min of  
297 electrolysis. Note that at that time, less than 1 mg/L chlorine was accumulated in solution (Figure  
298 1A). In contrast, when analogous conditions were applied to the wetland water, with a chloride  
299 ion content of 8.3 mM that is similar to that of the synthetic solution, only 1.1 mg/L chlorine were  
300 accumulated at 30 min, achieving 7 log decay of MS2 after 5 min, when the chlorine concentration  
301 was 0.1 mg/L (Figure 1B). Promptly, the same trials were performed with bottled mineral water  
302 and river water (data not shown). The former had a very low conductivity ( $141.9 \text{ }\mu\text{S/cm}^2$ ) and  
303 hence, the cell voltage had to be increased to 15 V to achieve the minimum current density

304 provided by the power source (10 mA). Despite this greater voltage, the current density was as  
305 low as 3.3 mA/cm<sup>2</sup>, giving rise to a poor accumulation of active chlorine at 30 min (0.02 mg/L)  
306 and, consequently, to a weak inactivation of MS2 in mineral water (0.93 log decay). In the case  
307 of river water, at 12 V the current density was 10 mA/cm<sup>2</sup>, accumulating up to 1.8 mg/L active  
308 chlorine at 30 min and achieving the total inactivation of MS2 after 10 min (0.7 mg/L chlorine).

309 Using the BDD anode at same applied voltage (12 V), the same current density was found  
310 regardless of the water matrix (i.e., 6.7 mA/cm<sup>2</sup> using either the synthetic solution or wetland  
311 water). For both matrices, the active chlorine accumulation was lower than that found in trials  
312 with DSA. Figure 1C and 1D depict the chlorine concentration profiles over time, as well as the  
313 MS2 inactivation in the synthetic solution and wetland water, respectively. In the synthetic  
314 solution, 0.4 mg/L chlorine were attained at 30 min, reaching 5.9 log decay for MS2. In order to  
315 compare with another viral surrogate, a single experiment was performed using synthetic water  
316 spiked with PhiX174. An electrolysis under the same conditions allowed achieving 4.8 log decay  
317 at 30 min (not depicted). Despite the 1-log difference between both disinfection trials, the  
318 inactivation kinetics (see section b) revealed the same susceptibility of bacteriophages to EO. For  
319 this reason, the following experiments were performed with MS2 for process control. Regarding  
320 the wetland water, only 0.1 mg/L chlorine were accumulated after 30 min, achieving 8 log decay  
321 of MS2 after only 10 min.

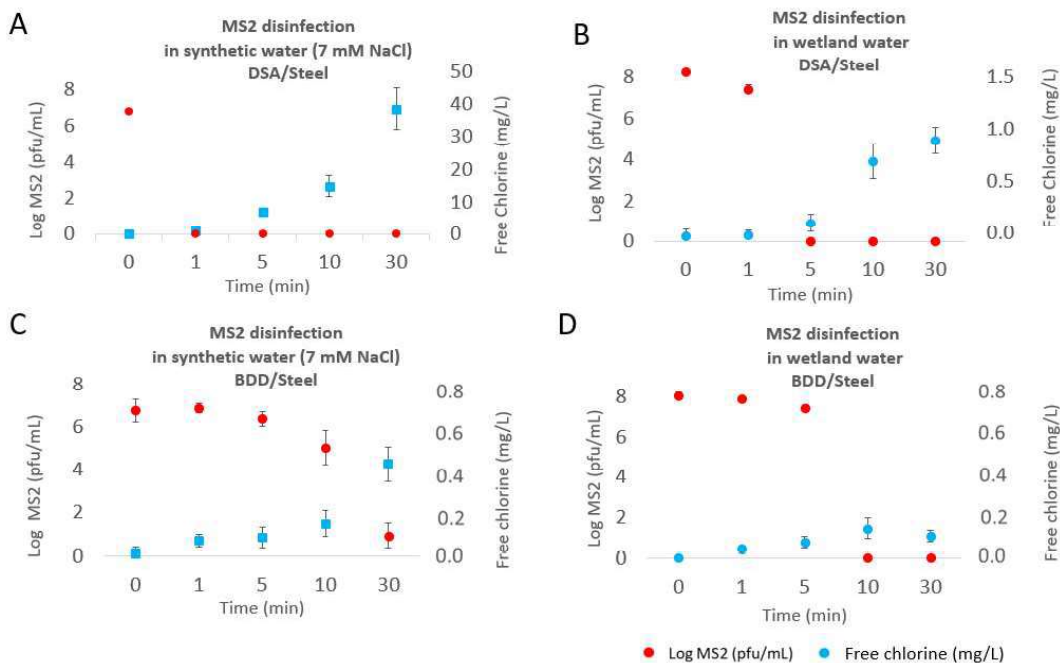
322 The lower accumulation of active chlorine in wetland water as compared to that attained in the  
323 synthetic solution is mainly attributed to its partial destruction upon reaction with the natural  
324 organic matter (NOM), since the other relevant component (i.e., chloride ion) had a similar  
325 concentration (8.3 and 7.0 mM, see above) in both matrices. Worth noting, once generated at the  
326 anode, free chlorine (Cl<sub>2</sub>) diffuses into the bulk solution and depending on the solution pH  
327 (between 6.7 and 8.3), it becomes hydrolysed, yielding hypochlorite (ClO<sup>-</sup>) or hypochlorous acid  
328 (HClO). Additionally, HClO thus formed participates in oxidation reactions that include dissolved  
329 organic nitrogen and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, giving rise to secondary chlorine species such as organic chloramines  
330 (How et al., 2017). However, considering the low concentration of ammonia (see discussion

331 below about Table 2) during the treatment and the comparatively mild oxidizing power of  
 332 chloramines (Huang et al., 2016), their virucidal effect can be considered as negligible in the  
 333 present study. Furthermore, note that other authors have assessed that a high concentration of  
 334 chloramines is needed to inactivate viruses; for example, the contact times (i.e., CT values) of  
 335 monochloramine range from 430 to 1240 mg×min/L for a 2 logarithm reduction of virus at a pH  
 336 of 6–9 and a temperature of 1 and 15 °C, respectively (Rachmadi et al., 2020). The presence of  
 337 NOM in wetland water did not impede to obtain a greater inactivation of MS2 in that matrix when  
 338 BDD was used, as compared to the profile in synthetic water (Figure 1D vs 1C); this can be  
 339 accounted for by the action of  $\cdot\text{OH}$  on both NOM and active chlorine to generate highly reactive  
 340 organic and chlorine radicals (e.g.,  $\text{Cl}\cdot$ ,  $\text{Cl}_2\cdot$ ) (Bruguera-Casamada et al., 2016; Luna-Trujillo et  
 341 al., 2020; Sirés et al., 2014). Conversely, in the case of DSA, the inactivation was slower in  
 342 wetland water, which is attributed to the partial consumption of chlorine (the main oxidant in  
 343 systems with DSA) with NOM, yielding weaker oxidants. Our data confirm, as expected, the  
 344 different disinfection efficiency of EO depending on the matrix to be treated and the anode  
 345 employed.

346 **Table 1.** Changes in quality parameters of synthetic water and wetland water upon EO treatment  
 347 with DSA and BDD anodes at 12 V. CE: electric conductivity; NTU: nephelometric units.

DSA						
	pH		CE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )		NTU	
	t0	t30	t0	t30	t0	t30
Synthetic water (7 mM NaCl)	6.84	6.70	746	712	0.60	0.40
Wetland	8.08	7.88	979	582	5.77	5.18
BDD						
	pH		CE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )		NTU	
	t0	t60	t0	t60	t0	t60
Synthetic water (7 mM NaCl)	6.90	6.85	746	730	0.60	0.55
Wetland	7.25	7.67	970	803	3.48	10.2

348



3

350 **Figure 1.** Free chlorine production and MS2 inactivation data obtained during the EO treatment  
 351 of MS2 suspensions in synthetic water and wetland water using DSA and BDD anodes at 12 V.  
 352 Changes in the ionic composition of water were monitored before and after each EO treatment.  
 353 Table 2 shows the changes in concentration of chloride ion ( $\text{Cl}^-$ ), nitrogenated anions ( $\text{NO}_2^-$  and  
 354  $\text{NO}_3^-$ ), bromide ion ( $\text{Br}^-$ ) and sulphate ion ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Although it is described that changes in the  
 355 physicochemical properties of an aqueous matrix during EO treatment depend largely on the type  
 356 of anode material, small changes are evidenced in this study, which can be explained by the low  
 357 current density at which the systems operated (Bruguera-Casamada et al., 2016; Dbira et al.,  
 358 2019). TOC content was also analysed during the trials, revealing that the low current densities  
 359 were unable to cause mineralization (data not shown).

360 **Table 2.** Changes in wetland water ion concentration upon EO treatment with DSA and BDD  
 361 anodes at 12 V.  
 362

		$\text{Cl}^-$ (mg/L)	$\text{NO}_2^-$ (mg/L)	$\text{Br}^-$ (mg/L)	$\text{NO}_3^-$ (mg/L)	$\text{NH}_4^+$ (mg/L)	$\text{SO}_4^{2-}$ (mg/L)
	t0	294.83	< 0.4	< 1	< 0.4	1.6	115.60
DSA	t30	282.42	< 0.4	< 1	< 0.4	< 0.4	144.66
BDD	t60	279.23	< 0.4	< 1	1.93	< 0.4	122.12

363 Regarding the ion conversion (Table 2), for chlorine ion ( $\text{Cl}^-$ ) in wetland water, the initial  
364 concentration of 294.83 mg/L (i.e., 8.3 mM) decayed down to 282.42 mg/L at 30 min using DSA,  
365 in good agreement with the active chlorine accumulation commented above. Using BDD anode,  
366 the chloride concentration decreased to 279.23 mg/L in 60 min. Worth mentioning, the decay of  
367 chloride concentration was not accompanied by the accumulation of chlorate or perchlorate,  
368 which is expected due to the low output current that impedes a substantial conversion of  
369 hypochlorous acid mediated by hydroxyl radicals (Bruguera-Casamada et al., 2017). The  
370 concentrations of other ions such as  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{Br}^-$  were below 1 mg/L, except for  $\text{NO}_3^-$  after  
371 EO with BDD, which attained a concentration of up to 1.93 mg/L. Finally, regarding the increase  
372 of sulfate concentration regardless of the anode used, it must be considered that sulfur occurs in  
373 all living matter as a component of certain aminoacids. In natural water such as wetlands, sulfur-  
374 containing proteins have been shown to be degraded into their constituent aminoacids and, in the  
375 presence of oxygen, sulfur is accumulated as sulfate ion, process further enhanced by EO  
376 processes (Chen et al., 2018; Editors of Britannica, The, 2022).

377 The operation at high cell voltage and long reaction may generate disinfection by-products  
378 (DBPs) that could have relevant toxic properties (Ghernaout and Elboughdiri, 2020; Jasper et al.,  
379 2017) and hence, their monitoring is essential. It is well known that the formation and distribution  
380 of DBPs during chlorine-mediated oxidation is strongly dependent on the chlorination dose, the  
381 water composition (levels of organic precursors), contact time, pH and bromide concentration. In  
382 the present study, trihalomethanes (THMs) formation was evaluated after EO experiments of the  
383 wetland water with each anode studied. Using DSA at output current of 16.7 mA/cm<sup>2</sup> for 30 min  
384 or BDD anode at 6.7 mA/cm<sup>2</sup> for 60 min, total THMs increased rapidly, being chloroform the  
385 most abundant DBP that arises from chlorine attack on organic matter, with only minor  
386 accumulation of brominated DBPs. With DSA, 1860.4 µg/L  $\text{CHCl}_3$  and 9.5 µg/L of brominated  
387 species were detected at the end of the electrolysis. Meanwhile, with BDD, being the treatment  
388 conducted at a lower current density but with a longer duration, 571.3 µg/L  $\text{CHCl}_3$  and 5.5 µg/L  
389 of brominated species were detected at 60 min. These differences can be attributed to the greater

390 production of active chlorine (and, plausibly, bromine) using DSA, in agreement with the analysis  
391 of active chlorine discussed above (Figure 1).

392 Despite the fact that the current densities applied were not high enough to modify the  
393 physicochemical properties of the matrices under study, the concentrations of DBPs with both  
394 anodes were above the WHO drinking water guidelines, establishing 100 µg/L as maximum  
395 (WHO 1997). In contrast, currently there are no guidelines establishing limits for DBPs to allow  
396 wastewater reuse, but ever higher concerns are arising from the presence of these by-products in  
397 treated water. The monitoring of DBPs is thus important because of their potential role as hazards  
398 for ecosystems (EPA, 2006; The European Parliament and the Council of the European Union,  
399 2020; USEPA, 2018; USEPA Office of Water, 2010; WHO and WHO, 1997). The mitigation of  
400 DBPs accumulation during EO treatment is difficult due to the presence of both, inorganic and  
401 organic reactive species. Nevertheless, some strategies can be followed to reduce their  
402 concentration. The simplest strategy proposed by some researchers (Huang et al., 2016; Jasper et  
403 al., 2017) consists in ensuring sufficient dilution of the treated water before discharge in  
404 freshwater reservoirs (i.e., more than 1000-fold dilution), thereby containing DBPs below the  
405 threshold limits. Another strategy consists in pre-treating the contaminated matrix to remove  
406 organic by-product precursors, for example by applying adsorption with powered activated  
407 carbon (Huang et al., 2021). A third possibility consists in optimizing the electrochemical setup  
408 (i.e., anode composition) and electrolysis conditions to minimize the formation of DBPs.

### 409 *3.2 Inactivation kinetics of microorganisms*

410 Disinfection kinetics obtained with the modified logistic model from the logarithmic inactivation  
411 data confirmed the different susceptibility of each microorganism during the EO treatment.  
412 Besides, our data shows different variability at different levels. Therefore, a deep analysis of the  
413 electrochemical disinfection variability has been conducted.

414 Traditionally, inactivation kinetics developed for water disinfection are modelled from  
415 microorganism inactivation as a function of disinfectant concentration and time, or *Ct* values, to

416 obtain mathematical models that can predict the survival rates. Nevertheless, construct robust  
417 predictive models for water-related pathogens is difficult due to the variety of pathogen types and  
418 the complexity of natural water composition, which impedes to elaborate simple mathematical  
419 models (Kadoya et al., 2019; Peleg, 2021). Moreover, in the case of electrochemical disinfection  
420 by EAOPs the situation is even more complex since the disinfectant concentration generally  
421 increases over time (Figure 1). Therefore, modelling the inactivation kinetics is complicated  
422 because initial concentrations of disinfectant are generally employed for calculations.

423 Pathogen inactivation kinetics usually do not follow an ideal first-order kinetics, especially in  
424 natural matrices where other variables become equally or even more relevant. As a general rule,  
425 the inactivation kinetics present two stages (so-called biphasic kinetics): (i) an initial rapid  
426 inactivation stage or induction period, followed by (ii) a tailing stage or decrease in inactivation  
427 rate as time is extended. Depending on different microbial resistances these curves can present  
428 different shapes such as sigmoidal, linear, linear with tail, etc. (Coroller et al., 2006). Changes in  
429 the slope are attributed to many factors such as the presence of viral aggregates, the occurrence  
430 of adsorption onto organic matter (i.e., matrix heterogeneity) or the influence of physicochemical  
431 properties of the matrix where these pathogens are suspended (i.e., temperature, pH or dissolved  
432 organic matter, which can change the availability of certain species) (Ge et al., 2021; HIATT,  
433 1964). On the other hand, different inactivation kinetics curves can appear for the same  
434 microorganism when the same treatment is applied. This could be explained by the production of  
435 different types and concentration of oxidants during the treatment, showing discontinuous  
436 disinfection efficiency (HIATT, 1964; Bruguera-Casamada et al., 2017). The appearance of an  
437 initial shoulder has been related to an activation period needed to produce the disinfectants from  
438 the anodic oxidation of the solvent and/or the redox active ions, thus being the inactivation poor  
439 until a certain concentration of oxidants has been generated. The duration of each stage can be  
440 observed from the modelled kinetics for each microorganism.

441 As commented above, different inactivation kinetics curves appear during the EO treatments  
442 analysed. For this reason, a study of the repeatability of the applied process has been conducted



443 through the analysis of the variability between the different replicates assayed. For an in-depth  
 444 analysis of the variability between replicates, an ANOVA analysis has been carried out for each  
 445 microorganism separately, in order to know whether the different replicates fit in the logistic  
 446 model for all the trials conducted. This ANOVA compares two logistic models: a *full* model  
 447 including the replicate information and a *reduced* model without the replicate labels. Thus, the  
 448 full model associates a different logistic curve to each replicate while the reduced one fits a single  
 449 logistic curve. To assess the degree of the variability of replicates, the residual variabilities have  
 450 also been calculated considering these two models. Table 3 shows the different p-values for each  
 451 microorganism upon treatment by EO with DSA or BDD anode in both matrices, for cases in  
 452 which a mathematical solution could be found, alongside the calculated residues (i.e., residual  
 453 variances) accompanied by their percent differences (*inc values*) between the two models, which  
 454 informs about the degree of variability. Values close to zero suggest a low variability between  
 455 replicates, whereas values close to 100 are typical of highly different replicates.

456 **Table 3.** Summary of residual variances of the inactivation models calculated for each  
 457 microorganism. v\_Seg, residual variance for the logistic model with replicate and time terms;  
 458 v\_noSeg, residual variance for the logistic model with no replicate term; inc, percentual difference  
 459 between v\_Seg and v\_noSeg; (-) indicate that the model can not be solved with the data obtained;  
 460 NT: non-tested.

	DSA						BDD					
	rep	v_Seg	v_noSeg	inc	pval		rep	v_Seg	v_noSeg	inc	pval	
	<i>Wetland</i>											
Bacteria	<i>E. coli</i>	3	0.029	0.618	95.3	0.000	2	0.022	0.331	93.2	0.000	
	<i>C. jejuni</i>	3	0.235	1.121	79.0	0.010	3	0.066	1.488	95.6	0.000	
	<i>L. pneumophila</i>	3	0.015	0.062	76.2	0.000	3	0.235	0.062	88.5	0.000	
Spores	<i>C.perfringens</i>	2	-	-	-	-	2	0.055	0.113	50.8	0.060	
	<i>B. cereus</i>	3	-	-	-	-	3	0.052	0.059	11.7	0.580	
Amoeba	<i>A. castellanii</i>	2	0.027	0.030	9.4	0.253	1	-	0.026	.	-	
	MS2	2	-	-	-	-	1	-	0.005	-	-	
	CVB5	3	0.012	0.012	3.5	0.978	3	-	-	-	-	
Viruses and phages	TuV			NT			1	-	0.068	-	-	
	<i>Synthetic water (7 mM NaCl)</i>											
	MS2	3	-	-	-	-	3	0.019	0.718	97.4	0.000	
	PhiX174			NT			2	0.107	0.308	65.2	0.000	

461

462 The matrix heterogeneity, combined with the presence of oxidizing species with different  
 463 reactivity and concentration and the fact that the microorganisms can form aggregates or be

464 adsorbed onto organic matter, resulted in a lack of consistency in some of the inactivation kinetics.  
465 Those microorganisms that presented a larger resistance, such as CVB5, spores and amoebas,  
466 especially in EO treatment with DSA, showed the greatest consistency, supported by p-values >  
467 0.050 and *inc* values lower than 12%. Conversely, the rest of microorganisms, especially bacteria,  
468 showed high differences between replicates, with *inc* values higher than 90%, evidencing the  
469 large variability of the disinfection system for these microorganisms.

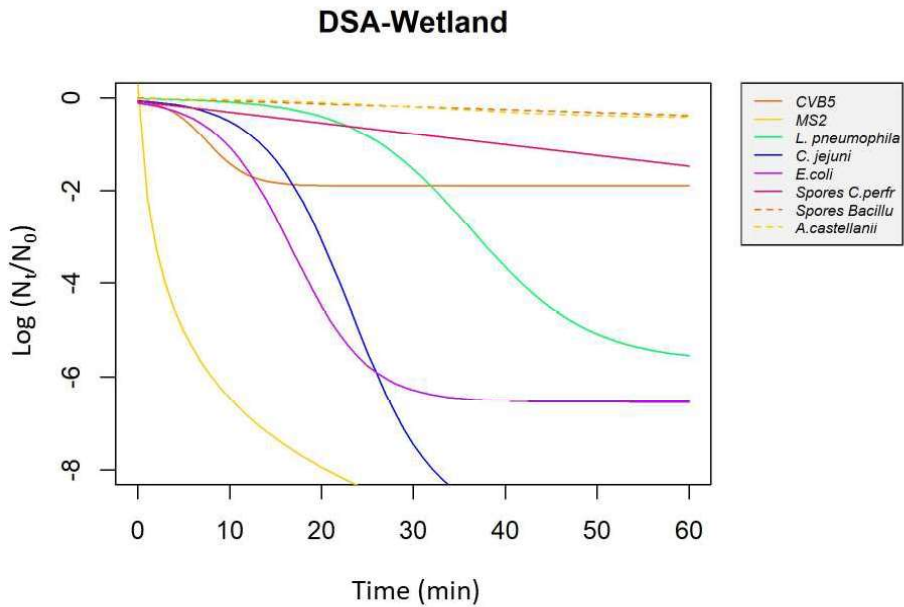
470 Modelling the different kinetics allowed predicting T50, T90 and T99 (time required to inactivate  
471 0.5 log, 1 log and 2 logs respectively) reductions (Table 4). In those cases where the model did  
472 not fit, neither model coefficients nor T50, T90 and T99 could be calculated. When the  
473 inactivation rates were too fast, as occurred for MS2 bacteriophage, an exponential model was  
474 applied. When the microorganisms presented high resistance to disinfection treatment, as found  
475 for human viruses, spores or amoebas, a linear model was applied to depict all the data together  
476 in a descriptive way, corresponding to those cases where the logistic model cannot be calculated  
477 (Figure 2 and 3, see description below). Hence, modelling the inactivation kinetics for a wide  
478 spectrum of microorganisms, especially for this type of disinfection system in which the  
479 disinfectants are not present from the beginning, but they are gradually generated during the  
480 electrolysis, is rather complex and far from the simplistic approaches typically reported for  
481 chemical disinfection of common indicators in model solutions. This means that different models  
482 must be considered to predict the inactivation kinetics under realistic conditions with accuracy.

483

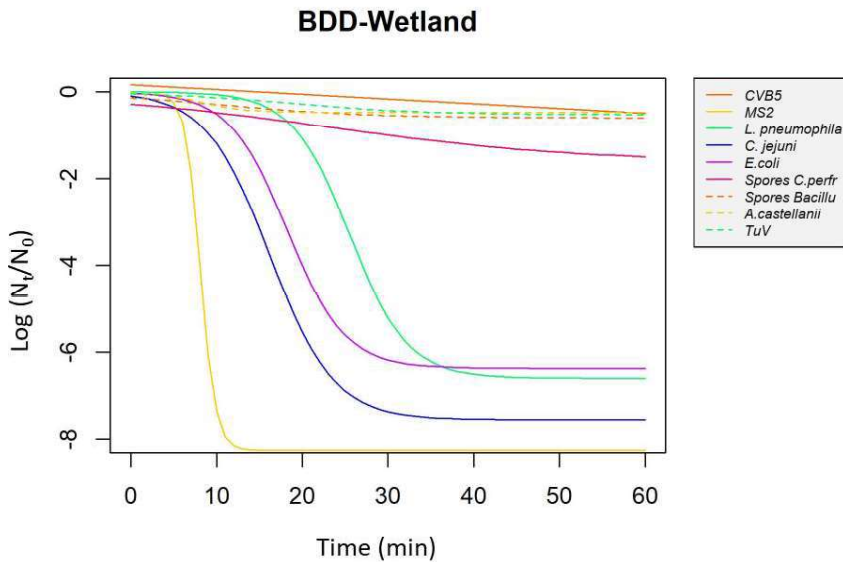
**Table 4.** Estimated T50, T90 and T99 expressed in minutes for each microorganism and the specific energy consumption (EC, in kWh/m<sup>3</sup>), calculated at each time. NT: non-tested.

	DSA					BDD									
	Model	T50	EC <sub>T50</sub>	T90	EC <sub>T90</sub>	T99	EC <sub>T99</sub>	Model	T50	EC <sub>T50</sub>	T90	EC <sub>T90</sub>	T99	EC <sub>T99</sub>	
Bacteria	<i>Wetland</i>														
	<i>E. coli</i>	logis	4.3	0.17	9.7	0.39	13.4	0.54	logis	8.0	0.13	12.5	0.20	15.6	0.25
	<i>C. jejuni</i>	logis	7.5	0.30	13.5	0.54	17.3	0.69	logis	4.3	0.07	9.2	0.14	12.4	0.20
	<i>L. pneumophila</i>	logis	18.0	0.72	26.5	1.06	32.4	1.29	logis	15.2	0.24	19.7	0.31	22.7	0.36
	<i>C. perfringens</i>	linear	9.5	0.38	39.6	1.58	82.7	3.31	logis	0.9	0.01	29.8	0.47	> 300	> 4.8
Spores	<i>B. cereus</i>	linear	47.4	1.89	156	6.24	311.3	12.45	logis	10.4	0.16	> 300	> 4.80	> 300	> 4.80
					>										
Amoeba	<i>A. castellanii</i>	logis	39.7	1.58	300	> 12.00	> 300	> 12.00	logis	9.4	0.15	> 300	> 4.80	> 300	> 4.80
	MS2	expntl	0.7	0.03	0.9	0.04	1.4	0.06	logis	5.2	0.08	6.3	0.10	7.1	0.11
	CVB5	logis	3.9	0.16	7.8	0.31	> 300	> 12.00	linear	42.3	0.67	106	1.69	196.7	3.15
Viruses and phages	TuV				NT				logis	20.6	0.32	> 300	> 4.80	> 300	> 4.80
									<i>Synthetic water</i> (7 mM NaCl)						
	MS2	expntl	0.1	0.002	0.2	0.005	0.4	0.01	logis	4.2	0.06	8.1	0.13	10.8	0.17
	PhiX174				NT				logis	2.6	0.04	8.4	0.13	12.6	0.20

486 Regarding the calculated T50, T90 and T99 reductions for a given microorganism (Table 4), the  
487 differences obtained depending on the applied model are worth mentioning. For example, in the  
488 case of the studied bacteria, all of them were correctly fitted to the same logistic model presenting  
489 well-defined sigmoidal shape, thus yielding calculated inactivation times that did not differ  
490 substantially when comparing the EO process with each anode. This suggests similar sensitivities  
491 for both electrochemical systems. On the other hand, depending on the anode used, a linear or a  
492 logistic model had to be applied to calculate the spore reduction times, always showing large  
493 resistance to inactivation, as expected for such protected structures. Amoebas were revealed as  
494 the most resistant microorganisms studied, since in none of the treatments a 1-log reduction could  
495 be achieved. Regarding the viruses, a greater variety of inactivation models and inactivation times  
496 can be observed. Human viruses were more resistant than bacteria, as expected, also confirming  
497 their different susceptibility to disinfectants. However, the bacteriophage MS2 demonstrated to  
498 be highly sensitive to chlorine disinfection, presenting the shortest inactivation times calculated  
499 through an exponential model. Meanwhile for human viruses such as CVB5, it seems that EO  
500 process with DSA could reduce around one logarithm.



501  
 502 **Figure 2.** Inactivation kinetics for each microorganism upon EO treatment of wetland water using  
 503 DSA anode at 12 V. Logistic, linear, and exponential models are plotted together.



504  
 505 **Figure 3.** Inactivation kinetics for each microorganism upon EO treatment of wetland water using  
 506 BDD anode at 12 V. Logistic, linear, and exponential models are plotted together.

507 The inactivation profiles of Figure 2 and 3 (the corresponding raw experimental data obtained for  
 508 different replicates can be found in Supplementary Material, Fig. SM-1) can be associated to the

509 reactive species produced during the electrochemical treatment, which oxidize the molecular  
510 structures of the microorganisms. As a result, some essential functions are disrupted, eventually  
511 leading to microorganism inactivation. Disinfection mechanisms described for bacteria  
512 inactivation are generally explained by two types of damages: (i) disinfectants can react with the  
513 cell surface components (i.e., oxidizing the lipids and proteins), increasing the cell membrane  
514 permeability that changes or causes malfunctioning of the enzymatic transport system; (ii)  
515 genome can be damaged, especially referred to loss of genome integrity that can occur with or  
516 without obvious surface damage (Chen et al., 2021; Huang et al., 2016). In contrast, proposed  
517 viral inactivation mechanisms by disinfectants vary widely and tend to be contradictory  
518 (Wigginton and Kohn, 2012), although they can be summarized as damage in viral proteins or  
519 damage in the genome. For a virus to be infectious, it must have its basic functions intact: binding  
520 to its host cell, genome injection into the host cell, replication, and translation. If one of these  
521 functions are compromised, viral inactivation is promoted. Nevertheless, due to the different  
522 composition and three-dimensional structure of proteins and nucleic acids, the virucidal  
523 mechanism of disinfectants is usually dissimilar for different types of viruses (Ge et al., 2021).  
524 Moreover, the disinfectant efficacy varies largely depending on the type and strain of viruses and  
525 their physical condition (Meister et al., 2018). Thus, it has been reported that closely related  
526 viruses can exhibit different disinfection kinetics when treated with the same biocide (Battigelli  
527 et al., 1991; Ge et al., 2021; Gerba et al., 2018).

528 Spores have large resistance to disinfection treatments, as corroborated in the present study, due  
529 to their structure composed by several layers, especially a hydrophobic protein coating and a  
530 cortex made of a thick peptidoglycan, which protect the cell membrane and the DNA genome.  
531 Moreover, DNA and ribosomes are in a dehydrated protoplast protected with small acid soluble  
532 proteins, dipicolinic acid and calcium. Other studies have shown large resistance to the oxidizing  
533 agents generated by the types of electrodes investigated here (Silvia et al., 2013).

534 Acanthamoeba has two life cycle stages: trophozoite and cyst. In this work, trophozoites have  
535 been analysed, since these are the active forms. The results, confirmed by MPN, have shown that

536 the Acanthamoeba is more resistant than the rest of the microorganisms tested by EO. Previous  
537 disinfection studies (Cervero-Arago et al., 2015; Canals et al., 2015) showed that this protozoan  
538 is more resistant to the oxidation by chlorine than bacteria. However, the application of other  
539 electrochemical methods, such as electrocoagulation or Fenton-based EAOPs like electro-Fenton,  
540 to raw sewage showed that the amoeba can be eliminated more quickly than Clostridium spores  
541 (Anfruns-Estrada et al., 2017).

542 When comparing anode materials, DSA seems to present a greater disinfection efficiency,  
543 achieving higher log reductions, although the variability of kinetic curves was also more  
544 pronounced as compared of those obtained using BDD anode. In EO with BDD, three distinct  
545 inactivation profiles can be clearly evidenced: one for MS2, another for bacteria, and last one that  
546 is valid for human viruses, spores, and amoebas (Figure 2 and 3). As described above, active, and  
547 non-active anode materials produce different oxidizing species, all of them usually acting in a  
548 nonselective manner.

549 Regarding bacteria inactivation, *E. coli* has been chosen as indicator of human faecal  
550 contamination, whereas *C. jejuni* and *L. pneumophila* have been chosen by their pathogenicity.  
551 Despite presenting similar structures (i.e., Gram-negative), their inactivation rates were quite  
552 different, with *L. pneumophila* presenting greater resistance. Dependence with the anode material  
553 is evidenced by the higher resistance of *E. coli* when it was treated by EO with BDD anodes  
554 instead of DSA. These results are consistent with those presented by Cossali (2017), which  
555 showed that although *E. coli* and *Legionella* could be inactivated by electrochemical disinfection  
556 using a Pt anode (similar to DSA in terms of activity), *Legionella* was more resistant to  
557 disinfection. Concerning those microorganisms that typically present higher resistance, like  
558 spores or amoebas, Figures 2 and 3 show a similar kinetics regardless of the anode, always with  
559 limited inactivation. *C. perfringens*, proposed as an indicator of water pollution and a model of  
560 protozoa cyst, presents major susceptibility to inactivation than spores of *B. cereus*, characterized  
561 by being an etiologic agent of food disease, and *A. castellanii*. Finally, regarding viral inactivation  
562 and its proposed indicators, our data reveal large differences between bacteriophages and viruses.

563 Human viruses (CVB5) and surrogates (TuV) presented high resistance, whereas MS2 as a  
564 proposed indicator showed the greatest susceptibility to the electrochemical disinfection  
565 treatment. These findings suggest that viral indicators should be revised, since current disinfection  
566 treatments could be overestimating their viral inactivation efficiencies, as they are restricted to  
567 some indicator organisms, thus posing a risk to human health.

568 The use of effluents of wetlands as a source of irrigation has shown limitations. Even though  
569 constructed wetlands as a tertiary treatment of WWTP have demonstrated higher viral reductions  
570 than those yielded by conventional treatments, recent studies in microbial risk assessment  
571 recommend additional reductions to achieve the WHO Guidelines of  $10^{-6}$  Disability Adjusted Life  
572 Years per patient per year (DALYs pppy) to assume an acceptable risk level at least for irrigation  
573 proposes (Gonzales-Gustavson et al., 2019; WHO, 2006). Therefore, sustainable nature-based  
574 water treatment processes could be complemented by additional disinfection treatments in the  
575 field, such as an EO treatment powered by renewable energy.

### 576 *3.3 Energy consumption*

577 In order to discern whether the implementation of the selected electrochemical technology for  
578 water disinfection is potentially viable or not, the energy consumption (EC) of each system for  
579 the treatment of each microorganism has been calculated. The energy requirements considering  
580 the electricity consumed by the power supply can be calculated from the applied cell voltage, the  
581 output current, the disinfection time and the treated volume (Murrieta et al., 2020, Thiam et al.,  
582 2015). The resulting value may be highly dependent on the anode nature, since large oxygen  
583 overpotential anodes like BDD give rise to greater cell voltages, usually ending in more costly  
584 systems. However, this general trend may differ depending on the specific inactivation kinetics.

585 For the disinfection trials performed in this study, the estimated EC after 30 min of electrolysis  
586 was 0.48 Wh/L in the treatments with BDD (i.e., current output of 20 mA in both synthetic water  
587 and wetland water) and about 1.0 Wh/L when using DSA (i.e., 45 mA), thus accounting for an  
588 average electrical consumption of 0.5-1.0 kWh/m<sup>3</sup> to attain different inactivation percentages.



589 Nevertheless, taking into account the significantly different resistance shown by each  
590 microorganism under study, it can be concluded that the energy requirements will vary  
591 considerably to achieve removal efficiencies sufficiently high to ensure the production of safe  
592 water. Table 4 summarizes the energy consumption values needed to inactivate 50% ( $EC_{T50}$ ), 90%  
593 ( $EC_{T90}$ ) and 99% ( $EC_{T99}$ ) of each microorganism. The low energy requirements of both systems  
594 to inactivate up to 99% of bacteriophages and bacteria are evidenced, ranging from 0.06 kWh/m<sup>3</sup>  
595 to inactivate the 99% of MS2 to 1.29 kWh/m<sup>3</sup> to inactivate *L. pneumophila* as the most resistant  
596 bacteria. This is in good agreement with the results obtained by Mosquera-Romero et al., 2022,  
597 when treating wetland water, achieving 5 log reduction of bacterial indicators with less than 0.1  
598 kWh/m<sup>3</sup>. Regarding the most resistant microorganisms, bacteria spores can be inactivated up to  
599 99% using DSA anode with an  $EC_{T99}$  between 3.31 and 12.45 kWh/m<sup>3</sup>, whereas to inactivate 2  
600 log of amoebas or viruses the  $EC_{T99}$  increased to more than 12 kWh/m<sup>3</sup> using DSA and more than  
601 4.8 kWh/m<sup>3</sup> using BDD.

602 This are quite positive results, since despite the small volume treated in a non-optimized  
603 electrochemical cell (more inefficient than optimized flow reactors operated in recirculation or  
604 continuous mode) and the low conductivity of the matrices, the EC values are of the same order  
605 of magnitude of those determined for degradation of organic pollutants by EAOPs. For example,  
606 an organic dye in highly conducting electrolyte (i.e., 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) was treated by a Fenton-  
607 based EAOPs in a 2.5-L pre-pilot plant equipped with a filter-press reactor, requiring 6-7 kWh/m<sup>3</sup>.  
608 In another study dealing with the EO treatment of a 3 L solution of 80 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> using a DSA  
609 plate of 40 cm<sup>2</sup>, T50 of 60 min was needed for inactivating *E. coli* at 25 mA/cm<sup>2</sup>, with an  $EC_{T50}$   
610 of 1.27 kWh/m<sup>3</sup> (Gusmao et al., 2010). In our current study, the  $EC_{T50}$  for *E. coli* was as low as  
611 0.17 and 0.13 kWh/m<sup>3</sup> using DSA and BDD anode, respectively.

612 The obtained results suggest that the energy requirements for this type of electrolytic cell can be  
613 fulfilled by powering with photovoltaic panels in series or parallel (Ganiyu et al., 2020),  
614 considering that panels of 300 W can produce 1.5 kWh per day (NREL's, 2018). This approach

615 would allow developing a decentralized water disinfection based on EO process (Norra et al.,  
616 2022, Huang et al., 2016).

#### 617 **4. Conclusions**

- 618 • EO treatments based on DSA and BDD anodes are efficient for wetland water  
619 disinfection, achieving more than 6 log removal for all bacteria and bacteriophages  
620 studied; conversely, they seem much less effective against viruses and spores, achieving  
621 1 log reduction, and are ineffective for amoebas. Therefore, adding an optimized EO  
622 treatment to treat wetland effluents may facilitate water reuse for irrigation.
- 623 • Evaluating viral inactivation based on results determined from bacteria or model viruses  
624 such as MS2 is not appropriate. Therefore, neither bacteria nor bacteriophages can be  
625 established as a suitable model for the disinfection of enteric viruses.
- 626 • The investigated EO process should be optimized and combined with a pre- or post-  
627 treatment for better control of DBP accumulation when treating natural water.
- 628 • The energy consumption of EO treatments varies depending on target microorganisms to  
629 inactivate, ranging from 0.5 to 1.0 kWh/m<sup>3</sup> to achieve complete inactivation of bacteria  
630 and bacteriophages, and ranging from 4.8 to more than 12 kWh/m<sup>3</sup> to achieve 2 log of  
631 reduction for spores, amoebas or viruses.
- 632 • Considering the preliminary calculations of energy requirements, the electrolytic cell for  
633 EO treatment could be powered by solar panels, thus opening the door to devising  
634 decentralized water disinfection systems.

#### 635 **Declaration of competing interest**

636 The authors declare that they have no known competing financial interest or personal relationships  
637 that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### 638 **Acknowledgements**

639 This study was partly supported by grant AGL2017-86797-C2-1-R AGL funded by MCIN/AEI/

640 10.13039/501100011033/FEDER “A way of making Europe”, by the European Union. I.S. is  
641 grateful to project PID2019-109291RB-I00 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033, Spain). E.F.is  
642 an APIF fellow at the University of Barcelona. M.I. is a fellow of the Catalan Government  
643 “AGAUR” (FI).

644 **List of references**

- 645 Anfruns-Estrada, E., Bruguera-Casamada, C., Salvadó, H., Brillas, E., Sirés, I., Araujo, R.M.,  
646 2017. Inactivation of microbiota from urban wastewater by single and sequential  
647 electrocoagulation and electro-Fenton treatments. *Water Res.* 126, 450–459.  
648 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.09.056>
- 649 Aquino De Carvalho, N., Stachler, E.N., Cimabue, N., Bibby, K., 2017. Evaluation of phi6  
650 persistence and suitability as an enveloped virus surrogate. *Environ. Sci. Technol.* 51, 8692–8700.  
651 <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01296>
- 652 Balali, G.I., Yar, D.D., Afua Dela, V.G., Adjei-Kusi, P., 2020. Microbial contamination, an  
653 increasing treat to the consumption of fresh fruits and vegetables in today’s world. *Int. J.*  
654 *Microbiol.* 2020,3029295. <https://doi.org/10.1155/2020/3029295>
- 655 Battigelli, D., Hall, H., Sobsey, M.D., 1991. Reduction of norwalk virus, poliovirus 1, and  
656 coliphage ms2 by free chlorine, chlorine dioxide, and ozone disinfection of water. *Appl Env.*  
657 *Microbiol* 69, 3975–3978. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3975>
- 658 Bruguera-Casamada, C., Sirés, I., Brillas, E., Araujo, R.M., 2017. Effect of electrogenerated  
659 hydroxyl radicals, active chlorine and organic matter on the electrochemical inactivation of  
660 *Pseudomonas aeruginosa* using BDD and dimensionally stable anodes. *Sep. Purif. Technol.* 178,  
661 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.042>
- 662 Bruguera-Casamada, C., Sirés, I., Prieto, M.J., Brillas, E., Araujo, R.M., 2016. The ability of  
663 electrochemical oxidation with a BDD anode to inactivate Gram-negative and Gram-positive  
664 bacteria in low conductivity sulfate medium. *Chemosphere* 163, 516–524.  
665 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.042>
- 666 Cabral, J., P., S., 2010. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int. J. Environ. Res.*  
667 *Public Health.* 7, 3657-3703; <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>

668 Callejón, R.M., Rodríguez-Naranjo, M.I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M.C.,  
669 Troncoso, A.M., 2015. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States  
670 and European Union: Trends and causes. *Foodborne Pathog. Dis.* 12, 32–38.  
671 <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1821>

672 Canals, O., Serrano-Suárez, A., Salvadó, H., Méndez, J., Cervero-Aragó, S., Ruiz de Porras, V.,  
673 Araujo, R.M., 2015. Effect of chlorine and temperature on free-living protozoa in operational  
674 man-made water systems (cooling towers and hot sanitary water systems) in Catalonia. *Environ.*  
675 *Sci. Pollut. Res.* 22(9), 6610-6618. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3839-y>

676 Cervero Cervero-Aragó, S., Rodríguez-Martínez, S., Puertas-Bennasar, A., Araujo, R. M., 2015.  
677 Effect of common drinking water disinfectants, chlorine and heat, on free Legionella and  
678 amoebae-associated Legionella. *PloS One* 10(8), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134726>

679 Chen, L., Lei, C., Li, Z., Yang, B., Zhang, X., Lei, L., 2018. Electrochemical activation of sulfate  
680 by BDD anode in basic medium for efficient removal of organic pollutants. *Chemosphere* 210,  
681 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.043>

682 Chen, M., Lei, Q., Ren, L., Li, J., Li, X., Wang, Z., 2021. Efficacy of electrochemical membrane  
683 bioreactor for virus removal from wastewater: Performance and mechanisms. *Bioresour. Technol.*  
684 330, 124946. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124946>

685 Cook, N., 2013. *Viruses in Food and Water: Risks, Surveillance and Control*. Elsevier Ltd., 1–  
686 523 <https://doi.org/10.1533/9780857098870>.

687 Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N., Mafart, P., 2006. General model, based on two  
688 mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation  
689 curves. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 6493–6502, <https://doi.org/10.1128/AEM.00876-06>

690 Cossali, G., Routledge, E.J., Ratcliffe, M.S., Blakes, H., Fielder, J.E., Karayiannis, T.G., 2016.  
691 Inactivation of *E. coli*, *Legionella* and *Pseudomonas* in tap water using electrochemical

692 disinfection. *Amer. Soc. Civil Eng.* 142,04016063 [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-)  
693 7870.0001134

694 Dbira, S., Bensalah, N., Ahmad, M.I., Bedoui, A., 2019. Electrochemical oxidation/disinfection  
695 of urine wastewaters with different anode materials. *Materials (Basel)*. 12.  
696 <https://doi.org/10.3390/ma12081254>

697 Editors of Britannica, The, 2022. *Encyclopedia Britannica*. Sulfuric acid. September 3.  
698 <https://www.britannica.com/science/sulfuric-acid>

699 Environmental Protection Agency (EPA), 2006. National Primary Drinking Water Regulations:  
700 Stage 2 Disinfectants and Disinfection Byproducts Rule. U.S. Environmental Protection Agency.  
701 *Fed. Regist.* 71, 388–493.

702 Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Gonzales-Gustavson, E., Abril, J.F., Bofill-Mas, S., Girones,  
703 R., 2017. A metagenomic assessment of viral contamination on fresh parsley plants irrigated with  
704 fecally tainted river water. *Int. J. Food Microbiol.* 257, 80–90.  
705 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.001>

706 Food and Agriculture Organization (FAO), 2018. *The Global Framework on Water Scarcity in*  
707 *Agriculture* 4.

708 Ganiyu, S.O., Martínez-Huitle, C.A., Rodrigo, M.A., 2020. Renewable energies driven  
709 electrochemical wastewater/soil decontamination technologies: A critical review of fundamental  
710 concepts and applications. *Appl. Catal. B: Environ.* 270, 118857.  
711 <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2020.118857>

712 Gassie, L.W., Englehardt, J.D., 2017. Advanced oxidation and disinfection processes for onsite  
713 net-zero greywater reuse: A review. *Water Res.* 125, 384–399.  
714 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.062>

715 Ge, Y., Zhang, X., Shu, L., Yang, X., 2021. Kinetics and mechanisms of virus inactivation by  
716 chlorine Dioxide in water treatment: A review. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 106, 560–567.  
717 <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03137-3>

718 Gerba, C.P., Betancourt, W.Q., Kitajima, M., Rock, C.M., 2018. Reducing uncertainty in  
719 estimating virus reduction by advanced water treatment processes. *Water Res.* 133, 282–288.  
720 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.044>

721 Ghernaout, D., Elboughdiri, N., 2020. Disinfection By-Products (DBPs) Control Strategies in  
722 Electrodisinfection. *OALib* 07, 1–14. <https://doi.org/10.4236/oalib.1106396>

723 Ghernaout, D., Alghamdi, A., Ghernaout, B., 2019. Microorganisms' killing: Chemical  
724 disinfection vs. electrodisinfection. *Appl. Eng.* 3(1), 13-19.  
725 <https://doi.org/10.11648/j.ae.20190301.12>

726 Gonzales-Gustavson, E., Rusiñol, M., Medema, G., Calvo, M., Girones, R., 2019. Quantitative  
727 risk assessment of norovirus and adenovirus for the use of reclaimed water to irrigate lettuce in  
728 Catalonia. *Wat Res.* 153, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.070>

729 Gunnarsdottir, M.J., Gardarsson, S.M., Figueras, M.J., Puigdomènech, C., Juárez, R., Saucedo,  
730 G., Arnedo, M.J., Santos, R., Monteiro, S., Avery, L., Pagaling, E., Allan, R., Abel, C., Eglitis,  
731 J., Hamsch, B., Hügler, M., Rajkovic, A., Smigic, N., Udovicki, B., Albrechtsen, H.J., López-  
732 Avilés, A., Hunter, P., 2020. Water safety plan enhancements with improved drinking water  
733 quality detection techniques. *Sci. Total Environ.* 698, 134185.  
734 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134185>

735 Gusmão, I.C.C.P., Moraes, P.B. and Bidoia, E.D., 2010 Studies on the electro-chemical  
736 disinfection of water containing *Escherichia coli* using a dimensionally stable anode. *Braz. Arch.*  
737 *Biol. Technol.* 53, 1235-1244. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000500029>

738 HIATT, C.W., 1964. Kinetics of the inactivation of viruses. *Bacteriol. Rev.* 28, 150–163.  
739 <https://doi.org/10.1128/mnbr.28.2.150-163.1964>

740 How, Z.T., Kristiana, I., Busetti, F., Linge, K.L., Joll, C.A., 2017. Organic chloramines in  
741 chlorine-based disinfected water systems: A critical review. *J. Environ. Sci.* 58, 2–18.  
742 <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.025>

743 Huang, X., Qu, Y., Cid, C.A., Finke, C., Hoffmann, M.R., Lim, K., Jiang, S.C., 2016.  
744 Electrochemical disinfection of toilet wastewater using wastewater electrolysis cell. *Water Res.*  
745 92, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.040>

746 Huang, X., Yu, Y., Chen, H., Liang, H., Geng, M., Shi, B., 2021. Disinfection by-product  
747 formation and toxicity evaluation for chlorination with powered activated carbon. *Water Res.* 205,  
748 117660. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117660>

749 Huo, Z.Y., Winter, L.R., Wang, X.X., Du, Y., Wu, Y.H., Hübner, U., Hu, H.Y., Elimelech, M.,  
750 2022. Synergistic nanowire-enhanced electroporation and electrochlorination for highly efficient  
751 water disinfection. *Environ. Sci. Technol.* 56, 10925–10934.  
752 <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c01793>

753 ISO 10705-1, 1995. Water Quality—Detection and Enumeration of Bacteriophages—Part 1:  
754 Enumeration of F-specific RNA Bacteriophages.

755 ISO 10705-2, 2000. Water Quality—Detection and Enumeration of Bacteriophages—Part 2:  
756 Enumeration of Somatic Coliphages.

757 ISO 11731 – 2017. Water quality – Enumeration of Legionella

758 ISO 17995 – 2019. Water quality – Detection and enumeration of thermotolerant Campylobacter  
759 spp

760 ISO 7937 – 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the  
761 enumeration of *Clostridium perfringens* – Colony-count technique

762 ISO 9308-1 – 2014. Water quality - Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part  
763 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora



764 Itarte, M., Martínez-Puchol, S., Forés, E., Hundesa, A., Timoneda, N., Bofill-Mas, S., Girones,  
765 R., Rusiñol, M., 2021. Ngs techniques reveal a high diversity of rna viral pathogens and  
766 papillomaviruses in fresh produce and irrigation water. *Foods* 10.  
767 <https://doi.org/10.3390/foods10081820>

768 Jasper, J.T., Yang, Y., Hoffmann, M.R., 2017. Toxic byproduct formation during electrochemical  
769 treatment of latrine wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 51, 7111–7119.  
770 <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01002>

771 Jurado, A., Bofill-Mas, S., Vázquez-Suñé, E., Pujades, E., Girones, R., Rusiñol, M., 2019.  
772 Occurrence of pathogens in the river–groundwater interface in a losing river stretch (Besòs River  
773 Delta, Spain). *Sci. Total Environ.* 696, 134028. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134028>

774 Kadoya, S. suke, Nishimura, O., Kato, H., Sano, D., 2019. Predictive water virology: Hierarchical  
775 bayesian modeling for estimating virus inactivation curve. *Water (Switzerland)* 11(10):2187.  
776 <https://doi.org/10.3390/w11102187>

777 Kokkinos, P., Venieri, D., Mantzavinos, D., 2021. Advanced oxidation processes for water and  
778 wastewater viral disinfection. A Systematic Review. *Food Environ. Virol.* 13, 283–302.  
779 <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09481-1>

780 Lanzalaco, S., Sirés, I., Galia, A., Sabatino, M.A., Dispenza, C., Scialdone, O., 2018. Facile  
781 crosslinking of poly (vinylpyrrolidone) by electro-oxidation with IrO<sub>2</sub>-based anode under  
782 potentiostatic conditions. *J. Appl. Electrochem.* 48, 1343–1352. [https://doi.org/10.1007/s10800-](https://doi.org/10.1007/s10800-018-1237-8)  
783 [018-1237-8](https://doi.org/10.1007/s10800-018-1237-8)

784 Li, Y., Dong, H., Li, L., Tang, L., Tian, R., Li, R., Chen, J., Xie, Q., Jin, Z., Xiao, J., Xiao, S.,  
785 Zeng, G., 2021. Recent advances in wastewater treatment through transition metal sulfides-based  
786 advanced oxidation processes. *Water Res.* 192, 116850.  
787 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116850>

788 Lin, M.H., Mehraeen, S., Cheng, G., Rusinek, C., Chaplin, B.P., 2020. Bacteria poration on  
789 modified boron-doped diamond electrode surfaces induced by divalent cation chelation. *Environ.*  
790 *Sci. Water Res. Technol.* 6, 1576–1587. <https://doi.org/10.1039/c9ew01108k>

791 Luna-Trujillo, M., Palma-Goyes, R., Vazquez-Arenas, J., Manzo-Robledo, A., 2020. Formation  
792 of active chlorine species involving the higher oxide MO<sub>x</sub>+1 on active Ti/RuO<sub>2</sub>-IrO<sub>2</sub> anodes: A  
793 DEMS analysis. *J. Electroanal. Chem.* 878. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114661>

794 Martínez-Huitle, C.A., Rodrigo, M.A., Scialdone, O. (Eds.). *Electrochemical Water and*  
795 *Wastewater Treatment*, Elsevier, 2018. ISBN: 978-0-12-813160-2.

796 Martínez-Huitle, C.A., Rodrigo, M.A., Sirés, I., Sciadone, O., 2015. Single and coupled  
797 electrochemical processes and reactors for the abatement of organic water pollutants: A critical  
798 review. *Chem. Rev.* 115, 13362–13407. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00361>

799 Meister, S., Verbyla, M., Klinger, M., and Kohn, T., 2018. Variability in disinfection resistance  
800 between currently circulating Enterovirus B Serotypes and strains. *Environ. Sci. Technol.*, 52(6),  
801 3696-3705. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00851>

802 Moreira, F.C., Boaventura, R.A.R., Brillas, E., Vilar, V.J.P., 2017. Electrochemical advanced  
803 oxidation processes: A review on their application to synthetic and real wastewaters. *Appl. Catal.*  
804 *B: Environ.* 202, 217–261. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.08.037>

805 Mosquera-Romero, S., PrévotEAU, A., Arends, J.B.A., Rousseau, D.P.L., Dominguez-Granda, L.,  
806 Rabaey, K., 2022. Disinfection of constructed wetland effluent by in situ electrochemical chlorine  
807 production for water reuse. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 8, 98–107.  
808 <https://doi.org/10.1039/d1ew00708d>

809 Mousset, E., Loh, W.H., Lim, W.S., Jarry, L., Wang, Z., Lefebvre, O., 2021. Cost comparison of  
810 advanced oxidation processes for wastewater treatment using accumulated oxygen-equivalent  
811 criteria. *Water Res.* 200, 117234. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117234>

812 Murrieta, M.F., Brillas, E., Nava, J.L., Sirés, I., 2020. Photo-assisted electrochemical production  
813 of HClO and Fe<sup>2+</sup> as Fenton-like reagents in chloride media for sulfamethoxazole degradation.  
814 Sep. Purif. Technol. 250, 117236. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117236>

815 National Renewable Energy Laboratory, PVWatts Calculator - Version 5, Lab. Natl. Renew.  
816 Energy. (2018) 1. [http://pvwatts.nrel.gov/version\\_5.php](http://pvwatts.nrel.gov/version_5.php).

817 Norra, G., Baptista-Pires, L., Cuervo-Lumbaque, E., Borrego, C., Radjenovic, J., 2022. Chlorine-  
818 free electrochemical disinfection using graphene sponge electrodes. Chem. Eng. J 430, 132772.  
819 <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.132772>

820 Peleg, M., 2021. Modeling the dynamic kinetics of microbial disinfection with dissipating  
821 chemical agents—a theoretical investigation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 105, 539–549.  
822 <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11042-8>

823 Qiu, Y., Lee, B.E., Neumann, N., Ashbolt, N., Craik, S., Maal-Bared, R., Pang, X., 2015.  
824 Assessment of human virus removal during municipal wastewater treatment in Edmonton,  
825 Canada. J. Appl. Microbiol. n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/jam.12971>

826 Rachmadi, A.T., Kitajima, M., Kato, T., Kato, H., Okabe, S., Sano, D., 2020. Required  
827 chlorination doses to fulfill the credit value for disinfection of enteric viruses in water: A critical  
828 review. Environ. Sci. Technol. 54, 2068–2077. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01685>

829 Rajasekhar, B., Venkateshwaran, U., Durairaj, N., Divyapriya, G., Nambi, I.M., Joseph, A., 2020.  
830 Comprehensive treatment of urban wastewaters using electrochemical advanced oxidation  
831 process. J. Environ. Manage. 266, 110469. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110469>

832 Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Carratalà, A., Abril, J.F., Silvera, C., Figueras,  
833 M.J., Gelati, E., Rodó, X., Kay, D., Wyn-Jones, P., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2015. Evidence  
834 of viral dissemination and seasonality in a Mediterranean river catchment: Implications for water  
835 pollution management. J. Environ. Manage. 159, 58–67.  
836 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.05.019>

837 Sanchis, S., Gali, D., Sala, V., Gomez, P., Pinedo, J., Donato, J., Berlanga, J.G., Garcia-Montaño,  
838 J., 2021. Advanced hybrid electro-oxidation & O<sub>3</sub> technology for water reuse in the fruit and  
839 vegetable process industry. *Water Sci. Technol.* 84, 1159–1169.  
840 <https://doi.org/10.2166/wst.2021.297>

841 Sassi, H.P., Tuttle, K.D., Betancourt, W.Q., Kitajima, M., Gerba, C.P., 2018. Persistence of  
842 viruses by qPCR downstream of three effluent-dominated rivers in the western United States.  
843 *Food Environ. Virol.* 10, 297–304. <https://doi.org/10.1007/s12560-018-9343-7>

844 Silva, M.P., Pereira, C.A., Junqueira, J.C., Jorge, A.O.C., 2013. Methods of destroying bacterial  
845 spores. *Microbial pathogens and strategies for combating them. Sci. Technol. Educ.*, 1, 490-496.

846 Sirés, I., Brillas, E., Oturan, M.A., Rodrigo, M.A., Panizza, M., 2014. Electrochemical advanced  
847 oxidation processes: Today and tomorrow. A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 8336–8367.  
848 <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2783-1>

849 Soller, J.A., Eftim, S.E., Nappier, S.P., 2018. Direct potable reuse microbial risk assessment  
850 methodology: Sensitivity analysis and application to State log credit allocations. *Water Res.* 128,  
851 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.034>

852 The European Parliament and the Council of the European Union, 2020. Directive (EU)  
853 2020/2184, EU (revised) Drinking Water Directive. Annex 1. Part B. *Off. J. Eur. Communities*  
854 2019, 35.

855 Thiam, A., Sirés, I., Centellas, F., Cabot, P.L., Brillas, E., 2015. Decolorization and mineralization  
856 of Allura Red AC azo dye by solar photoelectro-Fenton: Identification of intermediates.  
857 *Chemosphere* 136, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.047>

858 UNESCO, UN-Water, 2020: United Nations World Water Development Report 2020: Water and  
859 Climate Change, Paris, UNESCO

860 US EPA Office of Water, 2010. EPA 816-F-10-080 Comprehensive Disinfectants and  
861 Disinfection Byproducts Rules (Stage 1 and Stage 2): Quick Reference Guide. U. S. Environ.  
862 Prot. Agency 816-F, 4. [https://doi.org/EPA 816-F-10-080](https://doi.org/EPA%20816-F-10-080)

863 US EPA, 2018. Potable Reuse Compendium 203.

864 Valero, P., Verbel, M., Silva-Agredo, J., Mosteo, R., Ormad, M.P., Torres-Palma, R.A., 2017.  
865 Electrochemical advanced oxidation processes for *Staphylococcus aureus* disinfection in  
866 municipal WWTP effluents. *J. Environ. Manage.* 198, 256–265.  
867 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.070>

868 WHO, 2006. WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater: Wastewater  
869 use in agriculture II, 204. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>.

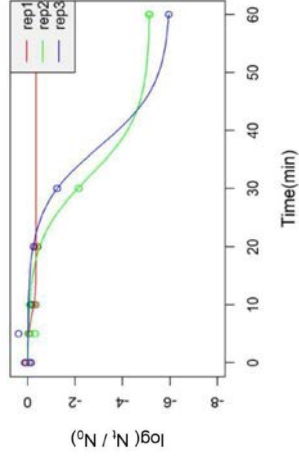
870 WHO, WHO, 1997. Guidelines for drinking-water quality.

871 Wigginton, K.R., Kohn, T., 2012. Virus disinfection mechanisms: The role of virus composition,  
872 structure, and function. *Curr. Opin. Virol.* 2, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.11.003>

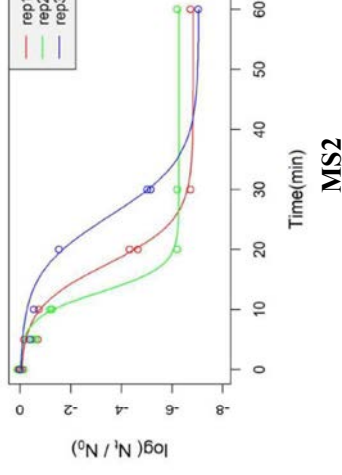
873 Zhou, J., Wang, T., Xie, X., 2019. Rationally designed tubular coaxial-electrode copper ionization  
874 cells (CECICs) harnessing non-uniform electric field for efficient water disinfection. *Environ. Int.*  
875 128, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.072>

(A)

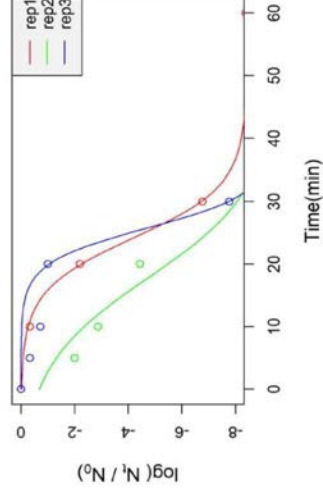
*L. pneumophila*



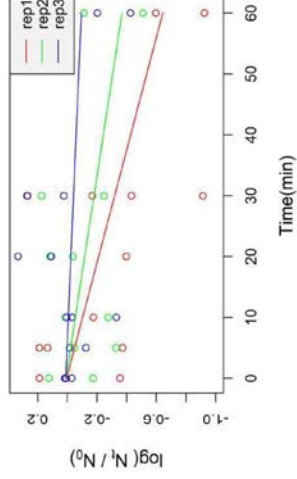
*E. coli*



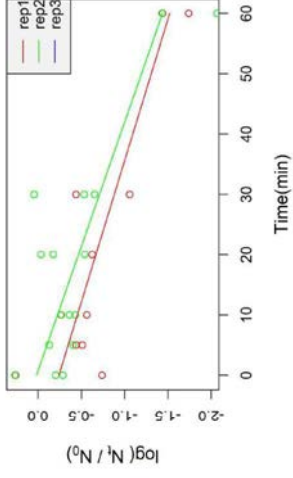
*C. jejuni*



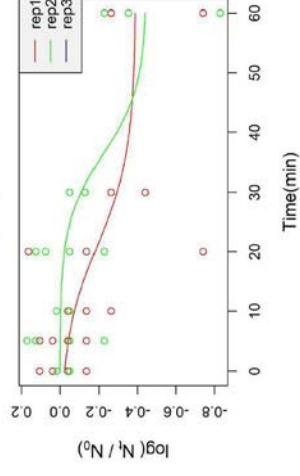
*B. cereus* spores



*C. perfringens* spores

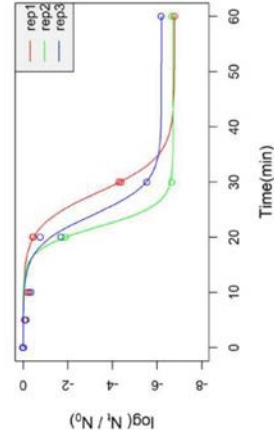


*Amoeba A. castellanii*

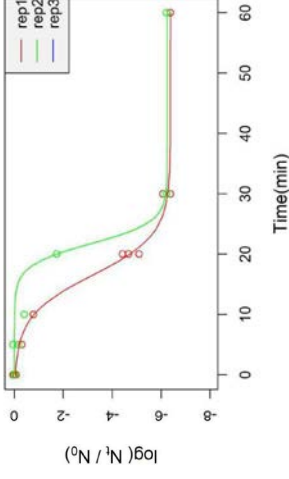


(B)

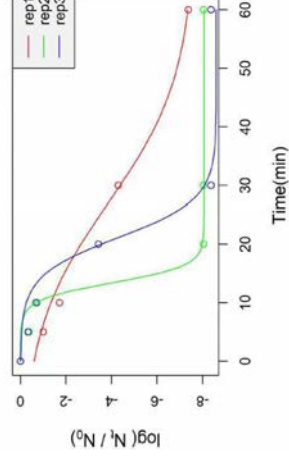
*L. pneumophila*



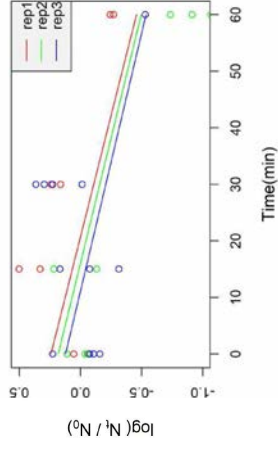
*E. coli*



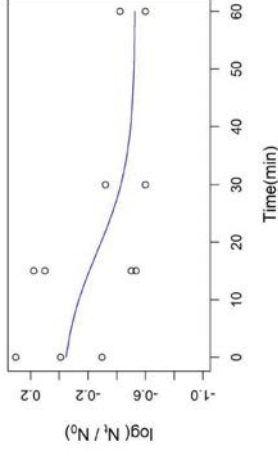
*C. jejuni*



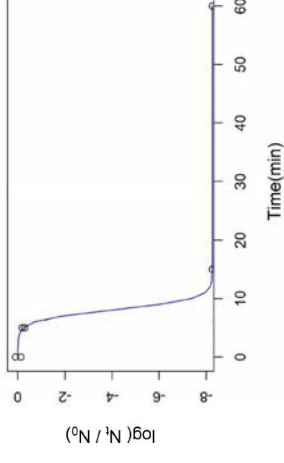
CVB5



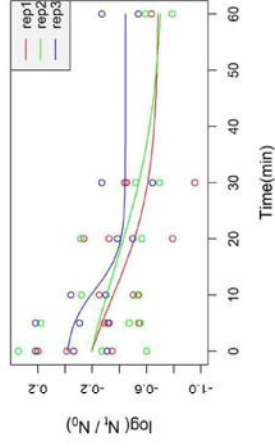
TuV



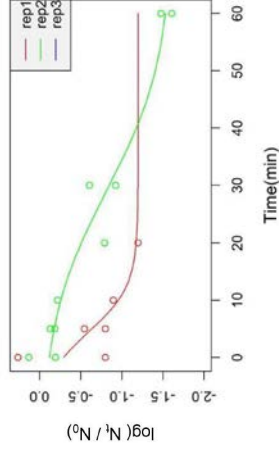
MS2



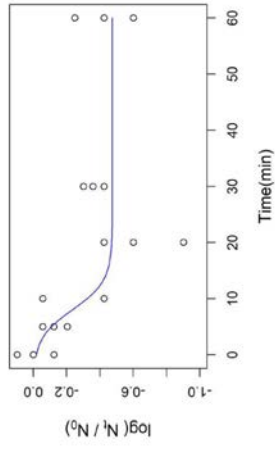
*B. cereus* spores



*C. perfringens* spores



*Amoeba A. castellanii*



**Fig. SM-1.** Experimental data and curve fittings to study the inactivation kinetics of each microorganism upon EO treatment of wetland water using (A) DSA or (B) BDD anode at 12 V. This information completes the one provided in Fig. 2 and 3.







**DISCUSSIÓ**



## 5. DISCUSSIÓ

La contaminació fecal de les masses d'aigua és un problema que incideix directament en la salut humana atesa la transmissió de microorganismes patògens com virus, bacteris, protozous i altres paràsits. Per la qual cosa, l'estudi de la contaminació microbiana de l'aigua i el seu control és un tema fonamental de salut pública, inclòs en els objectius de desenvolupament sostenible per a l'any 2030 de les Nacions Unides (United Nations Development Group, 2017).

Així doncs, el desenvolupament i millora continua de tècniques per a la detecció de virus en aigües, esdevé clau per conèixer l'estat microbiològic de les masses d'aigua, així com per a fer una detecció primerenca de possibles brots vírics. Concretament, donada l'heterogeneïtat de les diverses matrius d'aigua i dels diferents tipus estructurals de virus, els mètodes de concentració d'aigües esdevenen un punt crític per a la seva detecció.

D'altra banda, els virus són microorganismes difícils d'eliminar en els tractaments d'aigua comunament utilitzats, per la qual cosa, noves tecnologies com els processos electroquímics avançats (EOAP) estan sorgint com a alternativa sostenible per complementar tractaments de depuració d'aigües. Tot i que aquests sistemes s'utilitzen per la desinfecció d'aigües de piscina i spas, i s'han proposat com a mètodes de desinfecció d'efluents de plantes de tractament d'aigües urbanes com potables, manquen estudis més complets sobre la seva eficiència d'inactivació per tractar aigües naturals.

Emmarcat dintre d'aquest context, l'objectiu de la tesi va ser el d'avançar en el control de la contaminació viral a l'aigua, optimitzant, desenvolupant i caracteritzant, per una banda, diferents mètodes per a la concentració de virus presents en diferents tipus d'aigua i, per l'altra, estudiant l'eficiència de desinfecció de diferents patògens en sistemes electroquímics com a tecnologia sostenible per a la reutilització d'aigües.

### *Consideracions al caracteritzar mètodes mitjançant virus model*

En aplicar qualsevol mètode de concentració, és necessari conèixer l'eficiència de recuperació del mètode pel virus diana a detectar, donat que els virus tenen taxes de recuperació molt diferents depenent del mètode aplicat o del tipus d'aigua analitzat.

## Discussió

Sovint no és possible treballar al laboratori amb els virus patògens d'interès. Conseqüentment, per a dur a terme l'avaluació de l'eficiència de diferents mètodes de concentració cal utilitzar virus model o *surrogates*.

Per tal d'avaluar l'eficiència i aplicabilitat del mètode d'ultrafiltració per a concentrar grans volums d'aigua, es va estimar la recuperació de diversos virus i *E. coli* com a indicador clàssic de contaminació fecal en dues matrius diferents, aigua de pou i aigua de mar, representatives de matrius de baixa i alta terbolesa i conductivitat respectivament. Els virus model van ser escollits segons les seves característiques estructurals, així doncs, com a representants dels virus amb genoma d'ADN es va escollir el bacteriòfag  $\Phi$ X174, i el virus humà HAdV, mentre que per als virus d'ARN es va optar pel bacteriòfag MS2 i el virus humà CVB5.

Per a l'estudi d'avaluació de dos mètodes de concentració de virus en aigua residual es van escollir com a virus model el bacteriòfag MS2 i el coronavirus MHV.

Donat que el mètode de floculació amb llet descremada ha sigut àmpliament utilitzat, la recuperació del mètode VirWaTest, incloent concentració i extracció basada en l'ús de partícules magnètiques, només va ser caracteritzada en aigua subterrània per a MS2, utilitzat com a control de procés, i per al HAdV com a indicador de contaminació fecal humana. On les percentatges de recuperació van ser el 3,01% al 18,02% i del 17,52% al 44,22% respectivament, en concordança amb estudis previs (Calgua et al., 2013, 2008; Gonzales-Gustavson et al., 2017).

D'altra banda, per als mètodes d'ultrafiltració, al ser aplicats a diferents matrius i ser avaluats per diferents microorganismes, els resultats obtinguts van ser analitzats estadísticament, revelant diferències significatives entre aigües i virus. És a dir, un mateix virus presentava percentatges de recuperació diferents depenent de la matriu d'aigua analitzada, encara que s'utilitzi el mateix mètode de concentració. A més, per a una mateixa matriu, els virus estudiats presentaven percentatges de recuperació estadísticament diferents tot i ser virus estructuralment semblants. Aquest fet, observat tant en l'estudi del mètode de concentració per grans volums d'aigua com en l'avaluació de dos mètodes de concentració d'aigua residual, és àmpliament descrit en la bibliografia, on degut a les diferències estructurals dels virus i les diferències físicoquímiques de les aigües analitzades que influencien l'adsorció dels virus a la matèria en suspensió de les matrius, fa que els mètodes de concentració presentin recuperacions molt variables i dependents de la matriu d'estudi

(Bofill-Mas and Rusiñol, 2020; Gerba and Betancourt, 2017; Haramoto et al., 2018; Ikner et al., 2012; Michen and Graule, 2010).

En contraposició a això, en l'estudi de dos mètodes ràpids basats en ultrafiltració per a la concentració de virus a partir d'aigües residuals, es va observar que no hi havia diferències estadísticament significatives entre les concentracions obtingudes per al SARS-CoV-2 i altres virus naturalment presents en les mostres, com són els HAdV i els JCPyV utilitzats com a indicadors de contaminació fecal humana.

Per això, una alternativa seria analitzar els virus que estan presents en aigües residuals de forma natural a concentracions relativament constants, com són els HAdV i els JCPyV. Els mètodes estudiats van ser caracteritzats per la detecció del SARS-CoV-2 en aigües residuals, però donat que la concentració del SARS-CoV-2 depèn dels individus infectats en un moment donat, les concentracions en aigua residual són molt variables, des de concentracions per sota del límit de detecció (LOD) fins a  $10^5$  CG/L (Barrios et al., 2020). Per la qual cosa, si els virus model utilitzats no són adequats, per tal de discernir si una mostra és realment negativa perquè el virus no hi és present o és negativa perquè el mètode no ha funcionat, quantificar altres virus naturalment presents en aigües residuals també poden servir com a indicadors del funcionament correcte del mètode, tot i que no es podrien utilitzar per calcular la seva recuperació (Rusiñol et al., 2021).

El mateix podria considerar-se quan s'avaluen mètodes de concentració de virus en altres tipus d'aigua i cercar aquell virus amb més probabilitat de ser presents de forma natural en les mostres avaluades. Podrien servir per aquest propòsit virus persistentment excretats pels humans com els HAdV, o bacteriòfags com Crassphage o inclús virus de plantes com el Pepper Mild Mottle Virus (PPMV).

D'altra banda, els estudis realitzats posen de manifest la importància de com es quantifiquen els estoc virals i com es calculen les recuperacions virals. Per al mètode de concentració de grans volums d'aigua, tot i que les recuperacions mitjanes obtingudes per a tots els microorganismes estudiats van ser superiors al 20%, en alguns casos es van assolir recuperacions majors al 100%. Aquest fet, descrit en estudis anteriors (Smith and Hill, 2009), és degut a que la tècnica utilitzada per quantificar les taxes de recuperació, també esbiaixa els resultats finals. Ja que, si les recuperacions són calculades mitjançant tècniques d'infectivitat, com és el cas del mètode de concentració de grans volums, cal tenir present que els virus tendeixen a l'agregació (Gerba and Betancourt, 2017), i donat que els eluents utilitzats per recuperar el contingut

## Discussió

del filtre contenen solucions surfactants que provoquen la desagregació dels virus, es poden obtenir quantificacions majors en la mostra que no en l'estoc inicial, donant recuperacions majors al 100%.

Pel contrari, els resultats derivats de l'estudi d'avaluació dels dos mètodes de concentració d'aigües residuals, revelen que es poden obtenir diferents valors quan la quantificació es fa directament a partir dels estocs virals o quan es quantifiquen després d'afegir-los a la mostra d'aigua a analitzar, ja que existeix un efecte clar de la matriu sobre les recuperacions (Lambertini et al., 2008). En aquest estudi per exemple, per tal d'analitzar l'aigua residual mitjançant processos d'ultrafiltració, s'ha aplicat un pas previ de centrifugació de la mostra per eliminar matèria orgànica. Per tal d'avaluar la càrrega viral retinguda en la fracció sòlida descartada, es va analitzar el pellet resultant de centrifugar les mostres, on es va concloure que el 49% de MS2 i el 23% del SARS-CoV-2 detectat, quedarien retinguts. Altres estudis en aigua residual, reporten percentatges de fins al 30% per a MHV i del 6% de MS2 retinguts a la fracció sòlida descartada (Ahmed et al., 2020a; Ye et al., 2016).

Amb tot, donat que no existeixen procediments estandarditzats per a la caracterització de mètodes, és important tenir en consideració la matriu, el virus diana, el virus model utilitzat i en quin moment és quantificat, i la tècnica utilitzada de manera que la caracterització de mètodes sigui el més acurada possible.

### *Mètodes ràpids, sensibles i metodològicament senzills*

La detecció i quantificació de virus contaminants a l'aigua és un procés complex necessari per identificar brots d'origen hídric, monitoritzar el risc d'infecció i protegir la salut de la població. L'elecció del mètode de concentració dependrà del tipus d'aigua a analitzar, de la concentració esperada del virus diana, dels mitjans dels que es disposi, tant materials com econòmics, i de la formació del personal involucrat. Avaluar la presència de virus en mostres d'aigua implica generalment l'aplicació de mètodes complexes que requereixen de personal altament qualificat, instal·lacions especialitzades i temps llargs de processament de les mostres.

En aquesta tesi, es va avaluar un mètode de concentració de grans volums d'aigua per a la detecció de virus com a un procediment ràpid i sensible. El mètode, anomenat protocol LVC per les seves sigles en anglès (*Large Volume Concentration kit*), està basat en una ultrafiltració amb flux de corrent sense sortida o DEUF (*dead-end UF*) seguit d'una elució d'escuma humida (*Wet Foam*

*Elution™*). Els filtres utilitzats són ultrafiltres de fibres de polisulfona amb una superfície efectiva de 2,5 m<sup>2</sup>. Inicialment creat per a ultrafiltrar sang en processos de diàlisi, pel que són capaços de retenir partícules de mida més petita que els virus (Gallardo et al., 2019; Hill et al., 2005).

Tot i ser una metodologia senzilla, basada en passar l'aigua a analitzar a través del filtre i fer-ne una posterior elució, el principal inconvenient d'aquests filtres és el pas final d'elució, el qual es realitza mitjançant el rentat del filtre amb solucions surfactants i una posterior recuperació de l'eluent *back-flush*, és a dir recuperar el contingut retingut al filtre fent passar l'eluent en sentit invers al de filtració mitjançant una bomba peristàltica, obtenint volums finals de concentrat d'aproximadament 500 mL (Hill et al., 2005; Ikner et al., 2012).

En aquesta tesi, s'ha avaluat la nova tecnologia d'escuma humida (*Wet Foam Elution™*) per eluir els ultrafiltres en segons i en un volum reduït d'entre 20 i 75 mL depenent de la terbolesa de la mostra, sense necessitat de realitzar un segon pas de concentració si no es precisa major sensibilitat. Concentrant 10 L d'aigua s'assoleix un factor de concentració de la mateixa de fins a 500x ordres de magnitud, analitzant un volum de mostra inicial a la qPCR d'entre 1,17 mL fins a 8,75 mL. Tanmateix, si es realitza un segon pas de concentració, en aquest cas mitjançant dispositius Centricon® (CeUF), el factor de concentració de la mostra incrementa fins a 20.000x, analitzant fins a 175 mL de mostra inicial per reacció de qPCR. D'altra banda, si s'analitzen mostres de gran volum, amb aquesta metodologia, el factor de concentració augmenta 250.000x vegades, sent capaços d'analitzar fins a 4,37 L de mostra inicial de 100 L per reacció de qPCR.

A efectes pràctics, aquests valors es tradueixen en què el mètode mostra una gran sensibilitat per detectar virus en aigües tot i que s'hi trobin a baixes concentracions. Així doncs, a banda de detectar diferents virus patògens en diferents matrius d'aigua, a les concentracions esperables segons la bibliografia existent (Haramoto et al., 2018), s'han aconseguit detectar HAdV en mostres d'aigua subterrània de Barcelona a concentracions de 1,1 CG/100 L. Aquest fet que posa de manifest la necessitat d'analitzar grans volums d'aigua per tal de detectar concentracions baixes de virus.

Tanmateix, quan s'incrementa el factor de concentració també s'incrementa la presència d'inhibidors a la qPCR, mostrant correlacions negatives de -0.66 per al coeficient de correlació de Pearson en la recuperació de MS2 amb la presència d'inhibidors. La presència d'inhibidors (és a dir, àcids húmics, restes bacterianes, polisacàrids complexos i ions metàl·lics) en assajos de qPCR augmenta la dificultat d'amplificar els àcids nucleics diana i potencialment

conduex a falsos negatius (Gibson and Schwab, 2011). Així docs, per evitar l'efecte dels inhibidors a la qPCR es poden utilitzar mètodes d'extracció d'àcids nucleics especialment dissenyats per mostres amb alt contingut d'inhibidors, realitzar dilucions seriades d'un o dos ordres de magnitud per diluir la presència d'inhibidor a l'extracció d'àcids nucleics i/o afegir albúmina de sèrum boví capaç d'eliminar les substàncies inhibidores a la barreja de PCR (Plante et al., 2011; Scipioni et al., 2008).

La tècnica de l'elució amb escuma humida s'ha aplicat també a l'elució de virus dels ultrafiltres utilitzats en la filtració de volums més petits mitjançant la pipeta automàtica CP-Select. Tot i que en aquesta tesi aquest mètode ha estat aplicat a l'anàlisi d'aigua residual, pot ser aplicat a altres tipus de matrius més netes i també a la concentració d'estocs virals a partir de cultius cel·lulars. A banda de la senzillesa metodològica, que redueix el protocol a prémer un botó, la pipeta automatitzada CP-Select™ pot ser instal·lada a qualsevol lloc amb un endoll disponible incloent l'interior d'una cabina de bioseguretat permetent així el treball amb mostres que així ho requereixin.

En la Taula 7 es mostra una comparativa de les principals característiques dels mètodes desenvolupats per la detecció de virus en mostres d'aigua.

### *Mètodes adaptables al terreny*

Finalment, un dels majors reptes en mètodes per a l'anàlisi de virus en aigua, és la seva adaptabilitat al terreny o que siguin realitzables *in situ*, és a dir, en el mateix punt de presa de la mostra. De vegades el gran volum que ha de ser analitzat i depenent de la localització del punt del mostreig, impossibilita el transport de la mateixa. Altres vegades no hi ha un laboratori proper on traslladar l'aigua per a ser concentrada. El desenvolupament de mètodes *in situ* suposa doncs un gran avenç amb múltiples possibilitats d'aplicació.

Tan el mètode de concentració VirWaTest basat en l'ús de llet descremada com el mètode LVC kit han estat adaptats per a la seva aplicació *in situ*.

El mètode VirWaTest, va ser adaptat arrel de la necessitat de desenvolupar un mètode senzill i econòmic per a la seva aplicació en un context d'escassetat de recursos o països de baixa renda. El mètode complert, concentració, extracció i detecció, va ser adaptat per a que fos realitzable sense necessitat de disposar d'un laboratori equipat i, si la situació ho requereix, ser dut a terme sense necessitat de cap font elèctrica, ja que tot l'equipament no té grans requeriments energètics pel que pot alimentar-se a base de bateries.



Tanmateix, és un mètode fàcil per personal no especialitzat. La concentració de virus VirWaTest es basa en l'ús de llet descremada com a floculant, requerint un ajust del pH de la mostra i addició de la llet on els virus seran adsorbits. Per poder adaptar aquest mètode com a un mètode portàtil, els reactius es presenten empaquetats perquè siguin d'un sol ús i en les quantitats necessàries sense haver de pesar-los ni mesurar-los.

De forma resumida, el protocol de concentració es basa en ajustar el pH de mostres de 10 L d'aigua, confirmar la baixada de pH mitjançant tires de pH, afegir la llet descremada en pols com a floculant i deixar en agitació durant unes hores mitjançant l'ús de bateries portàtils. Un cop aturada l'agitació i deixar sedimentar els flòculs, es pot retirar el volum sobrant mitjançant una pipeta serològica i recollir una part del flòcul resultant. Finalment, al concentrat final se li afegeix una solució que lisa les partícules virals i un reactiu conservant del material genètic (DNA/RNA Shield) per poder enviar el concentrat a un laboratori de referència. A banda, el kit inclou un estoc de MS2 liofilitzat que s'utilitza com a control de procés.

Aquesta metodologia ha estat testada per personal no científic en dos contextos diferents, un campament de refugiats situat a Banghi (RCA), i l'altre a una zona afectada per un terratrèmol a Pedernales (Equador). Els concentrats van ser enviats i analitzats al laboratori mitjançant l'extracció d'àcids nucleics VirWaTest, detectant MS2 en totes les mostres analitzades. Finalment, l'HAdV utilitzat com a indicador fecal de contaminació humana, va ser detectat en una de les cinc mostres de Banghi, i en la totalitat de les mostres concentrades a l'Equador. Demostrant així, la viabilitat del mètode per detectar la presència de contaminació viral en situacions d'emergència humanitària o escassetat de recursos.

Tot i que el mètode d'extracció i detecció VirWaTest no va poder ser validat *in situ* per personal no expert durant el transcurs del projecte, sí que es va dur a terme en un context on no es disposava d'un laboratori equipat. Durant l'estada realitzada per la doctoranda a Chillán (Xile), es van realitzar concentracions de 100 L d'aigua corresponents a aigua de rentat de fruita mitjançant el mètode de concentració de grans volums LVC kit seguit de l'extracció d'àcids nucleics VirWaTest amb la posterior detecció mitjançant un termociclador portàtil, detectant en totes les mostres analitzades ΦX174 utilitzat com a control de procés. Aquesta experiència, tot i no formar part dels articles publicats en aquesta tesi, reforça l'eficiència i versatilitat dels mètodes desenvolupats. Obrint la porta a la detecció de virus en una gran diversitat de contextos, posant a disposició mètodes senzills, sensibles, ràpids

## Discussió

i econòmics perquè la detecció de virus no quedi relegada a àmbits científics donada la importància que tenen les malalties de transmissió hídrica.

La concentració VirWaTest podria ser també substituïda si els recursos ho permeten per la concentració LVC. Donada la senzillesa dels mètodes de filtració, per tal de concentrar una mostra de gran volum en el mateix punt d'ús només es requereix una bomba peristàltica i un generador de corrent suficientment potent per a dur a terme una ultrafiltració. Així doncs, per tal de comprovar la viabilitat de la concentració in situ de mostres de gran volum, es van realitzar assajos de concentració de virus utilitzant l'equip descrit, aconseguint concentrar i eluir mostres de 50 L en la mateixa llera del riu, detectant concentracions de NoV-GII de  $1.34 \times 10^1$  CG/L. A més, els eluïts van ser analitzats mitjançant tècniques de seqüenciació de nova demostrant així que el mètode LVC kit permet analitzar una mateixa mostra mitjançant diferents tècniques moleculars.

Tot i això, si el volum filtrat no és excessivament gran, existeix la possibilitat de realitzar la ultrafiltració amb una bomba manual. Tal com es va dur a terme en el camp de refugiats de Guara Guara localitzat a Moçambic on personal no científic va concentrar aigua de pou amb el LVC kit mitjançant una bomba manual i després va enviar l'ultrafiltre al laboratori on es van detectar concentracions d'HAdV de  $3,01 \times 10^3$  CG/L, demostrant així la senzillesa metodològica i adaptabilitat del mètode..

Taula 2. Comparativa de mètodes de concentració d'aigua per la detecció de virus caracteritzats en aquesta tesi.

	<b>VirWaTest</b>	<b>LVC kit</b>	<b>Concentration Pipette CP-Select™</b>	<b>Centricon® Plus-70</b>	<b>LVC kit + Centricon® Plus-70</b>
<b>Fonament</b>	Floculació orgànica amb llet descremada	Ultrafiltració 185 µm de diàmetre la fibra de polisulfona	Ultrafiltració 150 kDa	Ultrafiltració centrífuga 30 kDa	Ultrafiltració + CeUF
<b>Matriu i virus caracteritzats (mitjana i SD)</b>	Aigua subterrànea MS2 (14,23±2,92%) HAadV (18,90±14,42%)	Aigua subterrànea PhiX174 (88,60±100,78%) MS2 (158,12±93,18%) CVB5 (45,72±49,88%) Aigua de mar PhiX174 (27,91±12,33%) MS2 (91,14±112,32%) CVB5 (175,64±143,16%)	Aigua residual MS2 (27,72 ± 24,46%) MHV (7,51 ± 6,14%)	Aigua residual MS2 (26,34 ± 22,71%) MHV (24,07 ± 14,48%)	Aigua subterrànea (100L) MS2 (55,12 ± 42,93%) Aigua de mar (50L) MS2 (4,72 ± 1,27%) Aigua de riu (10L) MS2 (20,99 ± 12,70%)
<b>Volum de mostra</b>	10 L	10 L	80 mL	80 mL	de 10 a 100 L
<b>Volum (ml) de mostra analitzat a qPCR</b>	3,63-7,27	1,17-8,7	1,56-2,92	0,91-2,19	fins a 4375
<b>Factor de concentració</b>	200X	133-550X	133-333X	77-250X	fins a 250.000X
<b>Temps de processat</b>	5 - 8 hores	1 L/min aproximadament	10 - 20 minuts	45 minuts	1 L/min aproximadament
<b>Cost (€)</b>	10	70	20	28,15	100
<b>Possibilitat de concentració in situ</b>	Sí	Sí	No	No	No
<b>Mètodes de detecció aplicats</b>	qPCR	infectivitat/qPCR/NGS	qPCR	qPCR	qPCR/NGS

\*El cost no inclou preu d'equipament

### **Tècniques sostenibles de desinfecció per oxidació electroquímica avançada**

La creixent pressió sobre el subministrament global d'aigua requereix del desenvolupament de solucions eficients i sostenibles capaces de produir aigua regenerada de forma ràpida i segura. A més, s'han d'incloure estratègies d'avaluació i gestió de riscos, on la seguretat microbiana juga un paper fonamental en el benestar de la salut pública, ja que els patògens poden romandre en l'aigua tractada si aquesta no és depurada adequadament. Per la qual cosa, quan s'implanten sistemes de depuració i desinfecció d'aigües és important conèixer l'eficiència de cadascun dels passos implantats (Gunnarsdottir et al., 2020; Soller et al., 2018).

Els processos electroquímics avançats (EOAP), sorgits com a alternativa sostenible per a la depuració i reutilització de l'aigua, han demostrat ser eficients per degradar compostos orgànics persistents i alguns patògens en diferents matrius d'aigua (Sirés et al., 2014). Tanmateix, donada la multiplicitat de configuracions disponibles i de la diversitat de processos electroquímics, fa difícil conèixer l'eficiència real de desinfecció quan es tracten aigües naturals.

En aquest estudi, s'han avaluat dos tipus de materials utilitzats àmpliament en sistemes electroquímics per la seva eficiència en la producció de radicals hidroxil, com són els ànodes de DSA i BDD, aplicats a una configuració el més senzilla possible, la qual es tracta d'electro-oxidar l'aigua directament sense cap pas previ de pre-tractament de la mateixa. Els assajos s'han realitzat a densitats de corrent baixes per tal de produir el mínim impacte en el medi ambient i explorar la possibilitat de què siguin sistemes alimentats per energies renovables.

Primerament, s'ha avaluat la capacitat de cadascun dels ànodes per produir espècies oxidants, i donat que l'objectiu principal ha sigut avaluar l'eficiència de desinfecció de sistemes electroquímics en aigües naturals, les quals estan caracteritzades per la presència de clorurs, s'ha utilitzat com a aigua model una solució sintètica composta per NaCl 7mM, comparada amb matrius d'aigua provinents d'un efluent d'EDAR tractada mitjançant un sistema de llacunatge com a tractament terciari i mostres d'aigua de riu i aigua mineral.

En tots els tipus d'aigua testats, s'ha aconseguit produir clor lliure tot i treballar a potencials baixos (12V). Confirmant la major producció en aigua sintètica amb l'ànode de DSA tal com s'esperava degut a les propietats intrínseques de l'ànode. Pel que fa als assajos amb aigua d'aiguamoll duts a terme amb MS2 com a indicador, l'eficiència de desinfecció va ser menor amb

l'ànode de DSA degut a l'elevada presència de matèria orgànica, ja que les espècies de clor produïdes es combinen amb la matèria orgànica, produint oxidants més febles. Pel contrari, amb l'ànode de BDD es va obtenir una major inactivació de MS2 en l'aigua d'aiguamoll, fet que es pot explicar per l'acció dels  $\bullet\text{OH}$  tant sobre la matèria orgànica com sobre el clor actiu per generar radicals orgànics i de clor altament reactius (per exemple,  $\text{Cl}^\cdot$ ,  $\text{Cl}_2$ ) (Bruguera-Casamada et al., 2016; Luna-Trujillo et al., 2020; Sirés et al., 2014). En referència als estudis preliminars amb altres matrius, l'aigua de riu va mostrar una elevada eficiència en la producció de clor, assolint una inactivació total de MS2 als 10 minuts. Mentre que l'aigua mineral, va mostrar una baixa producció de clor donada la seva baixa conductivitat i conseqüentment una reduïda inactivació de MS2. Tot i això, el sistema electroquímic aplicat mostra potencial per ser aplicat en matrius netes tal com s'ha proposat per tractar aigües potables o per prevenir la proliferació de *Legionella* en torres de refrigeració i circuits d'aigua calenta sanitària (De Battisti et al., 2018; de Sousa Filho et al., 2022). Així doncs, aquests resultats confirmen, la diferent eficiència de desinfecció de l'EO en funció de la matriu a tractar i de l'ànode emprat (Llanos et al., 2017).

Un altre dels objectius proposats, va ser la determinació de les cinètiques d'inactivació de diversos microorganismes front a la desinfecció electroquímica d'aigües naturals i avaluar la idoneïtat dels indicadors microbians actuals. Per la qual cosa, es va avaluar l'eficiència de desinfecció sobre els principals grups etiològics responsables de malalties de transmissió hídrica: bacteris, (*E. coli*, *C. jejuni*, *L. pneumophila*), espores de bacteris (*C. perfringens* i *B. cereus*), bacteriòfags, (MS2 i  $\Phi\text{X174}$ ), altres virus (CVB5 i TuV), i protozous (*A. castellanii*).

L'aplicació d'un model logístic modificat d'altres estudis (Bruguera-Casamada et al., 2016) a partir de les dades logarítmiques obtingudes de cada microorganisme, va permetre conèixer els valors de T90 i T99. Seguit de l'anàlisi estadístic de les dades, va revelar que donada la heterogeneïtat de la matriu d'estudi com és l'aigua d'aiguamoll, les espècies oxidants generades són diverses i a diferents concentracions, mostrant eficàcies de desinfecció diferents entre rèpliques. A més, sumat al fet que els microorganismes puguin formar agregats o adsorbir-se sobre matèria orgànica, provoca una falta de consistència en algunes de les cinètiques obtingudes. Aquests resultats es troben en concordança amb els estudi de Llanos (2017), on concloïa que l'eficiència dels tractaments electroquímics per desinfectar aigües naturals presentaven diferents eficàcies depenent de la naturalesa de les matèries orgàniques naturalment presents a les mostres.

## Discussió

Pel que fa a la inactivació de bacteris, tot i presentar estructures similars (gramnegatives), les seves taxes d'inactivació van resultar diferents, presentant una major resistència *L. pneumophila* en ambdós ànodes estudiats. Pel que fa a la inactivació de *E. coli*, va presentar major resistència quan va ser tractada amb l'ànode de BDD, evidenciant les diferents eficiències dels diferents materials testats. Aquests resultats són coherents amb els presentats per Cossali (2017), que va demostrar que, tot i que *E. coli* i *Legionella* es podien inactivar mitjançant una desinfecció electroquímica mitjançant un ànode de Pt (similar al DSA pel que fa a l'activitat), la *Legionella* era més resistent a la desinfecció, indicant que *E. coli* no seria un bon indicador de procés apropiat pels processos d'electro-oxidació, a l'igual que proposen altres estudis tot i realitzar-se en altres condicions (Bruguera-Casamada et al., 2016). Pel que fa als microorganismes que solen presentar una resistència més elevada deguda a la seva estructura formada per diverses capes, com les espores o les amebes, mostren una cinètica similar independentment de l'ànode, sempre amb una inactivació limitada. Existeixen estudis que descriuen eliminacions eficients d'espores utilitzant sistemes electroquímics per tractar aigües potables, encara que a concentracions molt elevades de ions clorur, de fins a 35 mg/L (Giovannozzi et al., 2011) o per a la desinfecció d'aigües residuals, mitjançant l'aplicació seqüencial d'electrocoagulació seguit d'electro-Fenton (Anfruns-Estrada et al., 2017), encara que en aquest últim cas, l'eliminació és atribuïda al fet de què els microorganismes quedarien retinguts en els floculs generats (Gheraout et al., 2019).

Finalment, pel que fa a la inactivació viral i els seus indicadors proposats, les dades obtingudes revelen grans diferències entre bacteriòfags i virus. Mentre que MS2 àmpliament utilitzat com a microorganisme índex en processos de desinfecció (Kokkinos et al., 2021b) va mostrar la major susceptibilitat al tractament de desinfecció electroquímica, inclús major que els bacteris, fet anteriorment descrit en la bibliografia (Vecitis et al., 2011), el virus humà (CVB5) i el TuV utilitzat com a virus model de NoV, van presentar una elevada resistència. Només amb l'ànode de DSA es va assolir un logaritme de reducció per a CVB5, en un temps assumible (T90 7.8), inclús més ràpid que els bacteris estudiats, fet explicat per la menor concentració de microorganismes tractada.

Així doncs, aquest estudi a banda de descriure les eficiències d'inactivació d'aquest tipus de sistemes per tractar aigua real amb propòsits de reutilització front a diversos microorganismes estructuralment diferents, revelant diferent susceptibilitats, posa de manifest la necessitat de revisar els microorganismes indicadors de processos de desinfecció, com indicadors bacterians o

bacteriòfags, ja que segons les dades obtingudes no serien bon microorganismes models dels virus, com sí ho seria el TuV, mostrant una elevada resistència als processos de desinfecció. Així doncs, els tractaments de desinfecció actuals podrien estar sobreestimant les seves eficiències d'inactivació viral, ja que estan restringits a alguns organismes indicadors, la qual cosa suposa un risc per a la salut humana.

D'alta banda, a l'involucrar espècies clorades i la presència de precursors orgànics, s'ha avaluat la producció de subproductes tòxics de desinfecció com són els trihalometans (THM). Malgrat que les densitats de corrent aplicades no eren prou elevades per modificar les propietats fisicoquímiques de les matrius en estudi, les concentracions de subproductes tòxics en ambdós ànodes estaven per sobre de les directrius d'aigua potable de l'OMS, establerts en 100 ppb ( $\mu\text{g/L}$ ) com a màxim (WHO, 1997). Fet que posa de palès la necessitat d'adaptar aquest tipus de sistemes quan es tracten aigües naturals, bé mitjançant l'optimització de la composició de l'ànode, la configuració del sistema, realitzar un pretractament de la mostra amb carbó activat per tal de reduir la presència de precursors orgànics o en el pitjor dels casos, assegurar-se de què l'aigua tractada quan sigui abocada es dilueixi suficient (més de 1000 vegades) (Huang et al., 2021, 2016a; Jasper et al., 2017).

Finalment, per tal de discernir si la implementació de la tecnologia electroquímica seleccionada per a la desinfecció de l'aigua és potencialment viable o no, es va calcular el consum d'energia (CE) de cada sistema. El consum energètic depèn molt de la naturalesa de l'ànode, ja que els grans ànodes amb sobrepotencial d'oxigen com el BDD donen lloc a majors voltatges, que normalment acaben en sistemes més costosos. Tanmateix, aquesta tendència general pot diferir segons la cinètica d'inactivació específica de cada microorganisme. El CE estimat després de 30 min d'electròlisi va ser de 0,48 Wh/L en els tractaments amb BDD i aproximadament 1,0 Wh/L amb els de DSA, suposant així un consum elèctric mitjà de 0,5-1,0 kWh/m<sup>3</sup>. No obstant això, tenint en compte les resistències significativament diferents de cada microorganisme en estudi, els requeriments energètics variaran considerablement per aconseguir eficiències d'eliminació prou elevades per garantir la producció d'aigua segura.

A partir dels valors de T50, T90 i T99 derivats de l'aplicació del model logístic, s'han calculat els consums energètics necessaris per assolir aquestes inactivacions. Evidenciant així, els baixos requeriments energètics d'ambdós sistemes per inactivar fins al 99% de bacteriòfags i bacteris, que van des de 0,06 kWh/m<sup>3</sup> per inactivar el 99% de MS2 fins a 1,29 kWh/m<sup>3</sup> per inactivar *L.*

*pneumophila* com a bacteri més resistent. Estant en concordança amb els resultats obtinguts per Mosquera-Romero et al., 2022, en tractar l'aigua dels aiguamolls, aconseguint una reducció de 5 logaritmes d'indicadors bacterians amb menys de 0,1 kWh/m<sup>3</sup>. Pel que fa als microorganismes més resistents, les espores de bacteris es poden inactivar fins a un 99% mitjançant l'ànode DSA amb un CE d'entre 3,31 i 12,45 kWh/m<sup>3</sup>, mentre que per inactivar 2 logaritmes d'amebes o virus augmenta a més de 12 kWh/m<sup>3</sup> mitjançant DSA i més de 4,8 kWh/m<sup>3</sup> amb BDD.

Malgrat el petit volum tractat de la cèl·lula electroquímica no optimitzada, més ineficient que els reactors de flux optimitzat que funcionen en recirculació o en mode continu, i la baixa conductivitat de les matrius, el consum energètic és semblant als descrits en estudis previs (Gusmao et al., 2010). Encara que s'ha de tenir en compte que depenent del tipus d'aigua, el tipus d'ànode utilitzat i depenent de l'agent etiològic a inactivar, els requeriments energètics variaran considerablement.

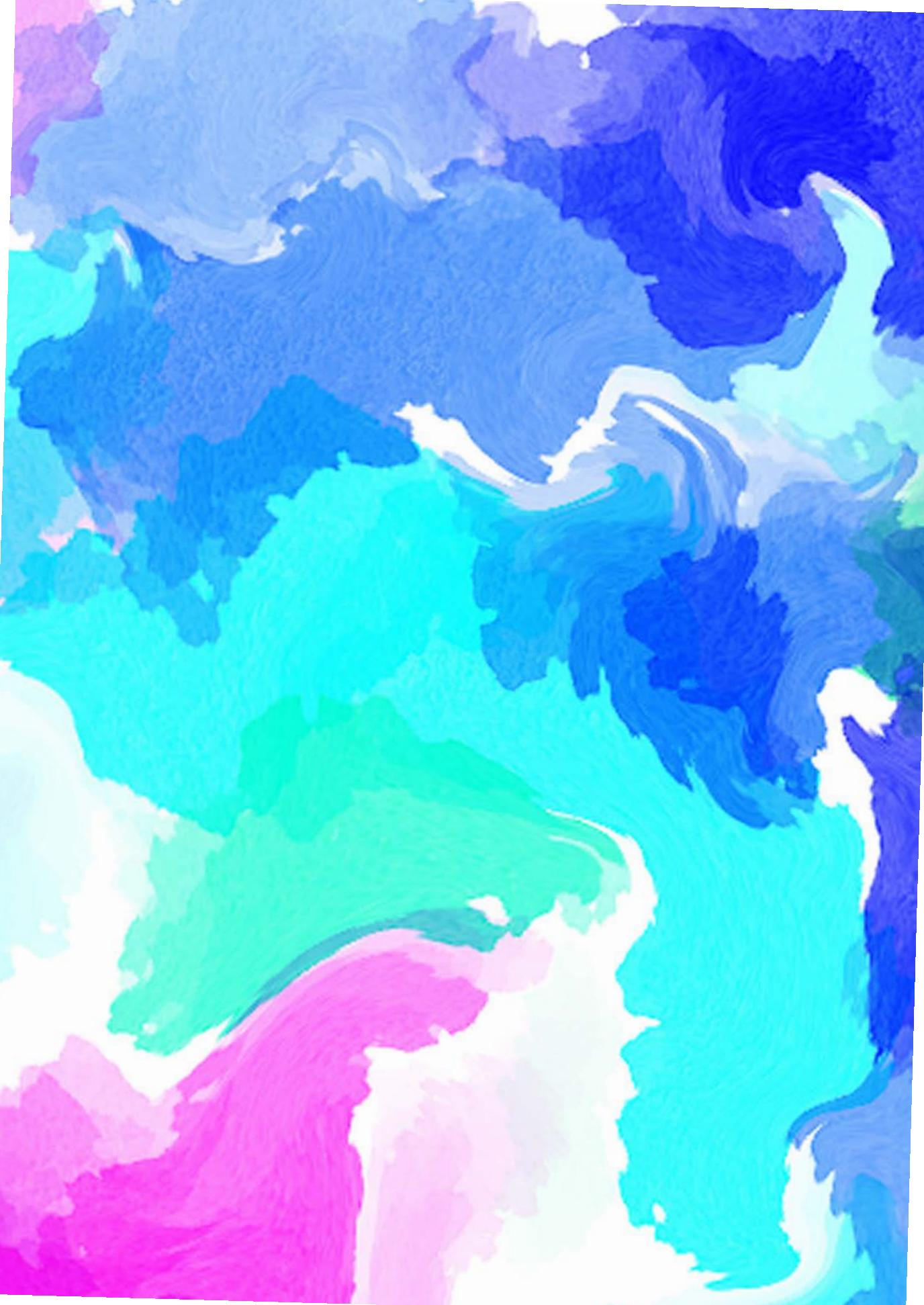
Tot i això, els resultats obtinguts suggereixen que els requeriments energètics d'aquest tipus de cèl·lules electrolítiques poden ser alimentades amb plaques fotovoltaïques en sèrie o en paral·lel (Ganiyu et al., 2020), tenint en compte que els panells de 300 W poden produir 1,5 kWh al dia (NREL's, 2018), fent que es puguin implementar com a sistemes descentralitzats de desinfecció d'aigua (Norra et al., 2022, Huang et al., 2016a).

Amb tot, l'addició d'un tractament electroquímic optimitzat per tractar els efluents dels aiguamolls pot contribuir a la reducció significativa dels patògens bacterians i una reducció aproximadament d'un logaritme dels patògens virals, facilitant així la reutilització de l'aigua per al reg.





**CONCLUSIONS**



## 6. CONCLUSIONS

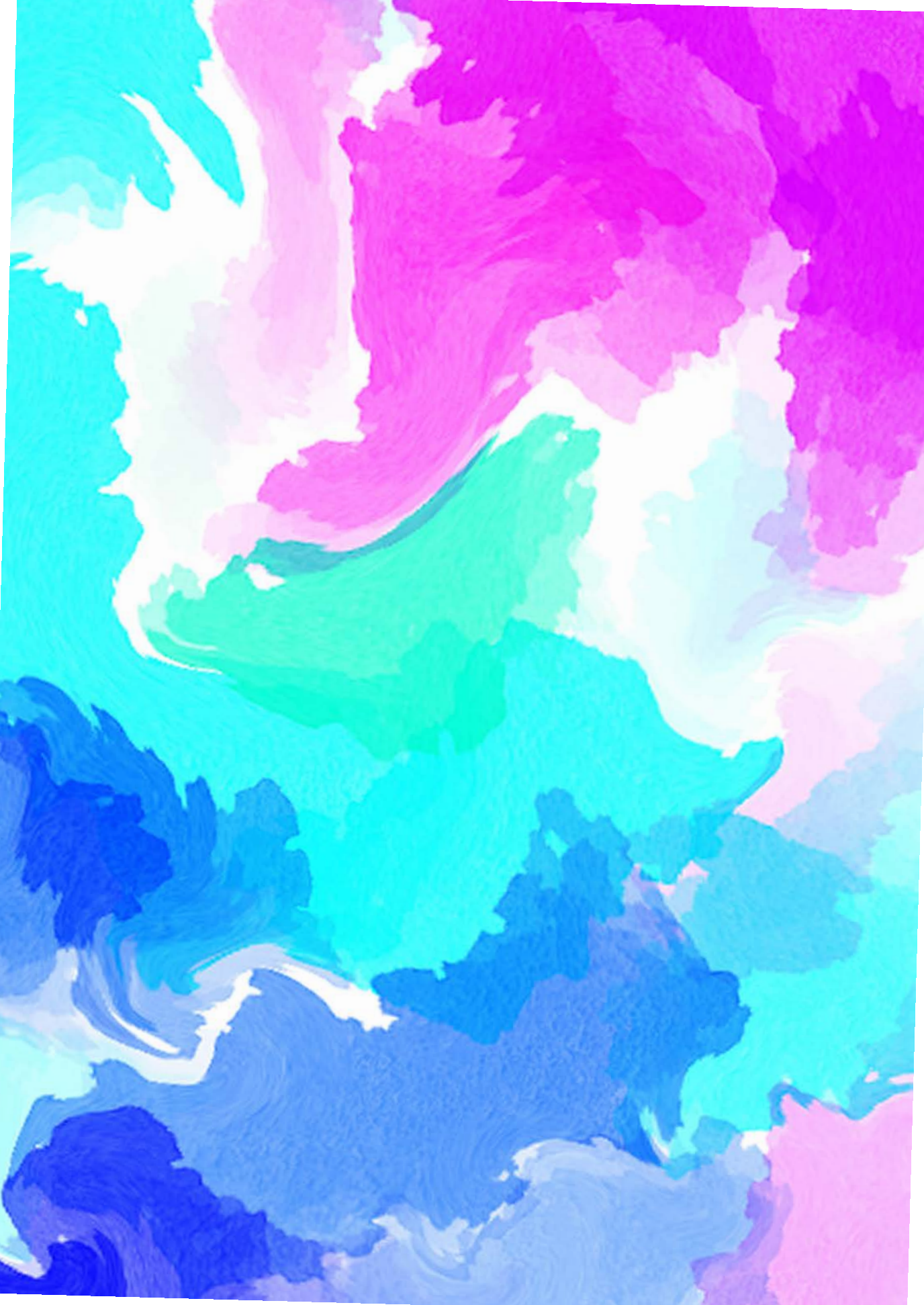
1. VirWaTest és un equipament i un protocol de detecció i quantificació de virus basat en la floculació orgànica i extracció magnètica de genomes virals de baix cost econòmic, aplicable a estudis al terreny i a àrees de baixa renda.
2. VirWaTest ha demostrat ser una eina sensible per la quantificació de virus obtenint 14,23 i 18,90 % de recuperació viral per MS2 i Adenovirus humans (HAdV), respectivament.
3. S'ha validat el mètode de concentració VirWatest en dos contextos de crisi humanitària, Equador i RCA, amb personal no científic. En tots els casos el control de procés, MS2, s'ha detectat juntament amb HAdV en un gran número de mostres.
4. El mètode d'ultrafiltració per a mostres de gran volum d'aigua, LVC kit, utilitzant l'elució amb escuma humida Innovaprep®, ha demostrat ser eficient com a mètode de concentració d'un sol pas per a totes les matrius d'aigua i virus estudiats, sent un assaig ràpid i permetent analitzar un elevat número de mostres simultàniament.
5. El volum que el mètode LVC kit pot processar depèn de la naturalesa de la mostra, podent filtrar fàcilment fins a 100L d'aigua subterrània, assolint un factor de concentració de 500x que, quan s'aplica un segon pas de concentració, pot assolir 250.000x.
6. S'ha adaptat i validat el mètode LVC kit per a la seva aplicació *in situ*, realitzant concentracions al terreny en diferents contextos. El mètode ha permès detectar virus en aigua de riu mitjançant q(RT)PCR, així com per tècniques de seqüenciació massiva de nova generació.
7. S'han avaluat mètodes ràpids d'ultrafiltració per a la detecció de virus embolcallats en aigües residuals, amb el focus en la detecció ràpida de SARS-CoV-2. S'ha caracteritzat la seva recuperació emprant dos virus model: MS2 i MHV, sent de 27,72 i 7,51% per al mètode CP-Select™ i 26,43 i 24,07% per al mètode Centricon® Plus-70.

## Conclusions

8. Els tractaments d'electro-oxidació (EO), basats en ànodes de DSA i BDD, són eficients per a la desinfecció d'aigua d'aiguamolls construïts, aconseguint una eliminació de més de 6 logaritmes per a tots els bacteris i bacteriòfags estudiats i la reducció d'un logaritme per a CVB5. Per tant, afegir un tractament d'EO optimitzat per tractar els efluent dels aiguamolls pot contribuir a la reutilització de l'aigua per al reg.
9. La inactivació de virus patògens humans no es correlaciona amb els resultats obtinguts de bacteris i bacteriòfags utilitzats com a model, per tant ni bacteris ni bacteriòfags són models adequats per a la desinfecció de virus entèrics.
10. El procés d'EO investigat s'ha d'optimitzar i combinar amb un pre- o post-tractament per evitar l'acumulació de subproductes tòxics quan es tracta aigua natural.
11. El consum energètic dels tractaments amb EO varia en funció dels microorganismes objectiu a inactivar, oscil·lant entre 0,5 i 1,0 kWh/m<sup>3</sup> per aconseguir la inactivació completa de bacteris i bacteriòfags, i entre 4,8 i més de 12 kWh/m<sup>3</sup> per aconseguir 2 logaritmes de reducció d'espores, amebes o virus.
12. Els sistemes electroquímics d'oxidació avançada podrien ser alimentats per panells fotovoltaics i funcionar com a sistemes descentralitzats de purificació d'aigües donat els baixos requeriments energètics del sistema.

The background is an abstract composition of thick, expressive brushstrokes in a variety of colors. The palette includes bright cyan, magenta, lime green, and deep blue, all set against a white background. The strokes are layered and textured, creating a sense of movement and depth. The word 'REFERÈNCIES' is centered in the lower half of the image.

# REFERÈNCIES



## 7. REFERÈNCIES

Ahmed, W., Bertsch, P.M., Bivins, A., Bibby, K., Farkas, K., Gathercole, A., Haramoto, E., Gyawali, P., Korajkic, A., McMinn, B.R., Mueller, J.F., Simpson, S.L., Smith, W.J.M., Symonds, E.M., Thomas, K. V, Verhagen, R., Kitajima, M., 2020a. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus , a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater.

Ahmed, W., Kitajima, M., Tandukar, S., Haramoto, E., 2020b. Recycled water safety: Current status of traditional and emerging viral indicators. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* 16, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.02.009>

Albrich, J.M., Hurst, J.K., 1982. Oxidative inactivation of *Escherichia coli* by hypochlorous acid . *FEBS Lett.* 144, 157–161. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)80591-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80591-7)

Anfruns-Estrada, E., Bruguera-Casamada, C., Salvadó, H., Brillas, E., Sirés, I., Araujo, R.M., 2017. Inactivation of microbiota from urban wastewater by single and sequential electrocoagulation and electro-Fenton treatments. *Water Res.* 126, 450–459. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.09.056>

Anttila, J., Kaitala, V., Laakso, J., Ruokolainen, L., 2015. Environmental variation generates environmental opportunist pathogen outbreaks. *PLoS One* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145511>

Arena, C., Amoros, J.P., Vaillant, V., Balay, K., Chikhi-Brachet, R., Varesi, L., Arrighi, J., Blanchon, T., Carrat, F., Hanslik, T., Falchi, A., 2012. Simultaneous investigation of influenza and enteric viruses in the stools of adult patients consulting in general practice for acute diarrhea. *Virology* 9, 9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-116>

Barrios, R.E., Lim, C., Kelley, M.S., Li, X., 2020. SARS-CoV-2 concentrations in a wastewater collection system indicated potential COVID-19 hotspots at the zip code level.

Battigelli, D., Hall, H., Sobsey, M.D., 1991. Reduction of norwalk virus, poliovirus 1, and coliphage ms2 by free chlorine, chlorine dioxide, and ozone disinfection of water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3975–3978. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3975>

Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodriguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M., Girones, R., 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater

## Referències

matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7894–7896.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00965-06>

Bofill-Mas, S., Pina, S., Girones, R., 2000. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 238–245.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.238-245.2000>

Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., 2020. Recent trends on methods for the concentration of viruses from water samples. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* 16, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.01.006>

Bruguera-Casamada, C., Sirés, I., Prieto, M.J., Brillas, E., Araujo, R.M., 2016. The ability of electrochemical oxidation with a BDD anode to inactivate Gram-negative and Gram-positive bacteria in low conductivity sulfate medium. *Chemosphere* 163, 516–524.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.042>

Cabral, J.P.S., 2010. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 3657–3703.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>

Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Wyn-Jones, A.P., López-Pila, J.M., Girones, R., 2008. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J. Virol. Methods* 153, 79–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.003>

Calgua, B., Rodriguez-Manzano, J., Hundesa, A., Suñen, E., Calvo, M., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2013. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J. Virol. Methods* 187, 215–221.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.10.012>

Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M.C.W., Daugherty, M.D., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R., Ehlers, B., 2016. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* 161, 1739–1750.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-016-2794-y>

Canavan, B.C., 2019. Opening Pandora's Box at the roof of the world: Landscape, climate and avian influenza (H5N1). *Acta Trop.* 196, 93–101.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.04.021>

Carratalà, A., Rusiñol, M., Rodriguez-Manzano, J., Guerrero-Latorre, L., Sommer, R., Girones, R., 2013. Environmental Effectors on the Inactivation of



Human Adenoviruses in Water. *Food Environ. Virol.* 5, 203–214. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9123-3>

Centers for Disease Control and Prevention, 2019. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008; Miscellaneous Inactivating Agents. CDC website 9–13. <https://doi.org/1>

Centers for Disease Control and Prevention, 2021. Norovirus worldwide. <https://www.cdc.gov/norovirus/trends-outbreaks/worldwide.html>

Cheremisinoff, N.P., 2002. Handbook of Water and Wastewater Treatment Technologies P-E I N E M a N N.

Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardí, R., Martín, M., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 448–454. <https://doi.org/10.3201/eid0904.020351>

Collivignarelli, M.C., Abbà, A., Benigna, I., Sorlini, S., Torretta, V., 2018. Overview of the main disinfection processes for wastewater and drinking water treatment plants. *Sustain.* 10, 1–21. <https://doi.org/10.3390/su10010086>

Coromines, L., Collado, N., Guerrero-Latorre, L., Abasolo-Zabalo, N., Anfruns-Estrada, E., Anzaldi-Varas, G., Bofill-Mas, S., Bosch, A., Bosch-Lladó, L., Caimari-Palou, A., Canela-Canela, N., Chavarria-Miró, G., Bas-Prior, J.M. del, Espiñeira-Robaina, Y., Forés-Gil, E., Fuentes, C., Gironés, R., Guix, S., Hundesa, A., Itarte, M., Mariné-Casadó, R., Martínez-Puchol, S., Martínez-Velázquez, A., Pintó, R.M., Rusiñol, M., Teichenne-Jané, J., Torrell-Galceran, H., Vázquez-Portero, M., Borrego, C., 2020. Catalan Surveillance Network of SARS-CoV-2 in Sewage. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.4244774>

Cromeans, T.L., Kahler, A.M., Hill, V.R., 2010. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1028–1033. <https://doi.org/10.1128/AEM.01342-09>

Dbira, S., Bensalah, N., Ahmad, M.I., Bedoui, A., 2019. Electrochemical oxidation/disinfection of urine wastewaters with different anode materials. *Materials (Basel)*. 12. <https://doi.org/10.3390/ma12081254>

De Battisti, A., Formaglio, P., Ferro, S., Al Aukidy, M., Verlicchi, P., 2018. Electrochemical disinfection of groundwater for civil use – An example of an effective endogenous advanced oxidation process. *Chemosphere* 207, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.062>

## Referències

de Sousa Filho, J.W., Lenza, G.A., Tonhela, M.A., de Araújo, K.S., Fernandes, D.M., Malpass, G.R.P., 2022. Full-scale application of an electrochemical disinfection solution in a municipal drinking water treatment plant. *Water Environ. J.* 36, 86–95. <https://doi.org/10.1111/wej.12763>

Deborde, M., von Gunten, U., 2008. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-Kinetics and mechanisms: A critical review. *Water Res.* 42, 13–51. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.025>

Drees, K.P., Abbaszadegan, M., Maier, R.M., 2003. Comparative electrochemical inactivation of bacteria and bacteriophage. *Water Res.* 37, 2291–2300. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00009-5)

Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., Groot, A. de, Twisk, F., Koopmans, M., 2004. Inactivation of caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4538–4543. <https://doi.org/10.3390/ph6030358>

Dutilh, B.E., Cassman, N., McNair, K., Sanchez, S.E., Silva, G.G.Z., Boling, L., Barr, J.J., Speth, D.R., Seguritan, V., Aziz, R.K., Felts, B., Dinsdale, E.A., Mokili, J.L., Edwards, R.A., 2014. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat. Commun.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5498>

EPA, 1999. EPA Alternative disinfection and oxidant Guide manual.pdf.

Farkas, K., Cooper, D.M., McDonald, J.E., Malham, S.K., de Rougemont, A., Jones, D.L., 2018. Seasonal and spatial dynamics of enteric viruses in wastewater and in riverine and estuarine receiving waters. *Sci. Total Environ.* 634, 1174–1183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.038>

Farkas, K., Walker, D.I., Adriaenssens, E.M., McDonald, J.E., Hillary, L.S., Malham, S.K., Jones, D.L., 2020. Viral indicators for tracking domestic wastewater contamination in the aquatic environment. *Water Res.* 181, 115926. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115926>

Farkas, T., 2015. Rhesus enteric calicivirus surrogate model for human norovirus gastroenteritis. *J. Gen. Virol.* 96, 1504–1514. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000020>

Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., 2013. *Fields Virology*.

Fong, T.T., Phanikumar, M.S., Xagorarakis, I., Rose, J.B., 2010. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer

overflows influencing a Michigan river. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 715–723. <https://doi.org/10.1128/AEM.01316-09>

Forchette, L., Sebastian, W., Liu, T., 2021. A Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics. *Curr. Med. Sci.* 41, 1037–1051. <https://doi.org/10.1007/s11596-021-2395-1>

Fraser-Bell, C., 2019. Watching brief. *Health Serv. J. Suppl*, 36–39. <https://doi.org/10.4324/9780203963173-23>

Frolich H, Villian L, Melzner D, Strube J (2012) Membrane technology in bioprocess science. *Chem Ing Tech* 84:905–917

Gallardo, V.J., Morris, B.J., Rhodes, E.R., 2019. The use of hollow fiber dialysis filters operated in axial flow mode for recovery of microorganisms in large volume water samples with high loadings of particulate matter. *J. Microbiol. Methods* 160, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.04.005>

Ganiyu, S.O., Martínez-Huitle, C.A., Rodrigo, M.A., 2020. Renewable energies driven electrochemical wastewater/soil decontamination technologies: A critical review of fundamental concepts and applications. *Appl. Catal. B Environ.* 270, 118857. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2020.118857>

García-Aljaro, C., Ballesté, E., Muniesa, M., Jofre, J., 2017. Determination of crAssphage in water samples and applicability for tracking human faecal pollution. *Microb. Biotechnol.* 10, 1775–1780. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12841>

Gassie, L.W., Englehardt, J.D., 2017. Advanced oxidation and disinfection processes for onsite net-zero greywater reuse: A review. *Water Res.* 125, 384–399. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.062>

Ge, Y., Zhang, X., Shu, L., Yang, X., 2021. Kinetics and Mechanisms of Virus Inactivation by Chlorine Dioxide in Water Treatment: A Review. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 106, 560–567. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03137-3>

Gerba, C.P., Betancourt, W.Q., 2017. Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* 51, 7318–7325. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05835>

Gerba, C.P., Betancourt, W.Q., Kitajima, M., Rock, C.M., 2018. Reducing uncertainty in estimating virus reduction by advanced water treatment processes. *Water Res.* 133, 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.044>

## Referències

Gheraout, D., Elboughdiri, N., 2020. Disinfection By-Products (DBPs) Control Strategies in Electrodisinfection. *OALib* 07, 1–14. <https://doi.org/10.4236/oalib.1106396>

Gheraout, D., Touahmia, M., Aichouni, M., 2019. Disinfecting Water: Electrocoagulation as an Efficient Process. *Appl. Eng.* 3, 1–12. <https://doi.org/10.11648/j.ae.20190301.11>

Gibson, K.E., Schwab, K.J., 2011. Tangential-flow ultrafiltration with integrated inhibition detection for recovery of surrogates and human pathogens from large-volume source water and finished drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 385–391. <https://doi.org/10.1128/AEM.01164-10>

Giovannozzi, A.M., Reipa, V., Almeida, J.L., Cole, K.D., 2011. Electrochemical inactivation of *Bacillus* spores in drinking water using a quaternary oxide electrode. *Water Sci. Technol. Water Supply* 11, 719–725. <https://doi.org/10.2166/ws.2011.103>

Glass, R.I., Parashar, U.D., Estes, M.K., 2009. Norovirus Gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 361, 1776–1785. <https://doi.org/10.1056/nejmra0804575>

Gonzales-Gustavso, E., Rusiñol, M., Medema, G., Calvo, M., Girones, R., 2019. Quantitative risk assessment of norovirus and adenovirus for the use of reclaimed water to irrigate lettuce in Catalonia 153, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.070>

Gonzales-Gustavson, E., Cárdenas-Youngs, Y., Calvo, M., da Silva, M.F.M., Hundesa, A., Amorós, I., Moreno, Y., Moreno-Mesonero, L., Rosell, R., Ganges, L., Araujo, R., Girones, R., 2017. Corrigendum to “Characterization of the efficiency and uncertainty of skimmed milk flocculation for the simultaneous concentration and quantification of water-borne viruses, bacteria and protozoa” [*J. Microbiol. Methods* 134 (2017) 46–53] (S016770121730006. *J. Microbiol. Methods* 142, 96. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.07.016>

Gorbalenya, A.E., Baker, S.C., Baric, R.S., de Groot, R.J., Drosten, C., Gulyaeva, A.A., Haagmans, B.L., Lauber, C., Leontovich, A.M., Neuman, B.W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L.L.M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I.A., Sola, I., Ziebuhr, J., 2020. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 5, 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>

Guerrero-Latorre, L., Collado, N., Abasolo, N., Anzaldi, G., Mas, S.B., Bosch, A., Bosch, L., Busquets, S., Caimari, A., Canela, N., Carcereny, A., Chacón, C., Ciruela, P., Corbella, I., Domingo, X., Escoté, X., Espiñeira, Y., Forés, E., Sarró,

- I.G., Pedemonte, D.G., Girones, R., Guix, S., Hundesa, A., Itarte, M., Casadó, R.M., Martínez, A., Puchol, S.M., Capdevila, A.M., Molina, C.M., Moliner, M., Munné, A., 2022. The Catalan Surveillance Network of SARS - CoV - 2 in Sewage: design , implementation , and performance. *Sci. Rep.* 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20957-3>
- Gullón, P., Varela, C., Martínez, E.V., Gómez-Barroso, D., 2017. Association between meteorological factors and hepatitis A in Spain 2010–2014. *Environ. Int.* 102, 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.03.008>
- Gunnarsdottir, M.J., Gardarsson, S.M., Figueras, M.J., Puigdomènech, C., Juárez, R., Saucedo, G., Arnedo, M.J., Santos, R., Monteiro, S., Avery, L., Pagaling, E., Allan, R., Abel, C., Eglitis, J., Hamsch, B., Hügler, M., Rajkovic, A., Smigic, N., Udovicki, B., Albrechtsen, H.J., López-Avilés, A., Hunter, P., 2020. Water safety plan enhancements with improved drinking water quality detection techniques. *Sci. Total Environ.* 698, 134185. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134185>
- Gusmão, I.C.C.P., Moraes, P.B. and Bidoia, E.D., 2010 Studies on the electro-chemical disinfection of water containing *Escherichia coli* using a dimensionally stable anode. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53, 1235-1244. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000500029>
- Hamza, I.A., Jurzik, L., Überla, K., Wilhelm, M., 2011. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 424–436. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.07.014>
- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S., 2007. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2153–2159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03453.x>
- Haramoto, E., Kitajima, M., Hata, A., Torrey, J.R., Masago, Y., Sano, D., Katayama, H., 2018. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Res.* 135, 168–186. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.004>
- Hata, A., Katayama, H., Kitajima, M., Visvanathan, C., Nol, C., Furumai, H., 2011. Validation of internal controls for extraction and amplification of nucleic acids from enteric viruses in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4336–4343. <https://doi.org/10.1128/AEM.00077-11>
- Hata, A., Katayama, H., Kojima, K., Sano, S., Kasuga, I., Kitajima, M., Furumai, H., 2014. Effects of rainfall events on the occurrence and detection efficiency

## Referències

of viruses in river water impacted by combined sewer overflows. *Sci. Total Environ.* 468–469, 757–763. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.093>

Hennechart-Collette, C., Martin-Latil, S., Guillier, L., Perelle, S., 2015. Determination of which virus to use as a process control when testing for the presence of hepatitis A virus and norovirus in food and water. *Int. J. Food Microbiol.* 202, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.029>

Hill, V.R., Polaczyk, A.L., Hahn, D., Narayanan, J., Cromeans, T.L., Roberts, J.M., Amburgey, J.E., 2005. Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6878–6884. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6878-6884.2005>

Huang, X., Qu, Y., Cid, C.A., Finke, C., Hoffmann, M.R., Lim, K., Jiang, S.C., 2016a. Electrochemical disinfection of toilet wastewater using wastewater electrolysis cell. *Water Res.* 92, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.040>

Huang, X., Qu, Y., Cid, C.A., Finke, C., Hoffmann, M.R., Lim, K., Jiang, S.C., 2016b. Electrochemical disinfection of toilet wastewater using wastewater electrolysis cell. *Water Res.* 92, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.040>

Huang, X., Yu, Y., Chen, H., Liang, H., Geng, M., Shi, B., 2021. Disinfection by-product formation and toxicity evaluation for chlorination with powered activated carbon. *Water Res.* 205, 117660. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117660>

Hundesá, A., Maluquer De Motes, C., Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Girones, R., 2006. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7886–7893. <https://doi.org/10.1128/AEM.01090-06>

Ikner, L.A., Gerba, C.P., Bright, K.R., 2012. Concentration and Recovery of Viruses from Water: A Comprehensive Review. *Food Environ. Virol.* <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9080-2>

Itarte, M., Bofill-Mas, S., Martínez-Puchol, S., Torrell, H., Ceretó, A., Carrasco, M., Forés, E., Canela, N., Girones, R., Rusiñol, M., 2021. Looking for a needle in a haystack. SARS-CoV-2 variant characterization in sewage. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* 24, 100308. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2021.100308>

- Jasper, J.T., Yang, Y., Hoffmann, M.R., 2017. Toxic Byproduct Formation during Electrochemical Treatment of Latrine Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 51, 7111–7119. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01002>
- Jurado, A., Bofill-Mas, S., Vázquez-Suñé, E., Pujades, E., Girones, R., Rusiñol, M., 2019. Occurrence of pathogens in the river–groundwater interface in a losing river stretch (Besòs River Delta, Spain). *Sci. Total Environ.* 696, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134028>
- Kimmiss, B.D., Downing, C., Tying, S., 2018. Hand-foot-and-mouth disease caused by coxsackievirus A6 on the rise. *Cutis* 102, 353–356.
- Kokkinos, P., Venieri, D., Mantzavinos, D., 2021a. Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Viral Disinfection. A Systematic Review. *Food Environ. Virol.* 13, 283–302. <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09481-1>
- Kokkinos, P., Venieri, D., Mantzavinos, D., 2021b. Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Viral Disinfection. A Systematic Review. *Food Environ. Virol.* 13, 283–302. <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09481-1>
- Kong, J., Lu, Y., Ren, Y., Chen, Z., Chen, M., 2021. The virus removal in UV irradiation, ozonation and chlorination. *Water cycle*.
- Koopmans, M., Duizer, E., 2004. Foodborne viruses: An emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 23–41. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00169-7)
- Kouadio, I.K., Aljunid, S., Kamigaki, T., Hammad, K., Oshitani, H., 2012. Infectious diseases following natural disasters: Prevention and control measures. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 10, 95–104. <https://doi.org/10.1586/eri.11.155>
- Krasner, S.W., Weinberg, H.S., Richardson, S.D., Pastor, S.J., Chinn, R., Scrimanti, M.J., Onstad, G.D., Thruston, A.D., 2006. Occurrence of a new generation of disinfection byproducts. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7175–7185. <https://doi.org/10.1021/es060353j>
- Kundu, A., McBride, G., Wuertz, S., 2013. Adenovirus-associated health risks for recreational activities in a multi-use coastal watershed based on site-specific quantitative microbial risk assessment. *Water Res.* 47, 6309–6325. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.002>

## Referències

Kuo, D.H.W., Simmons, F.J., Blair, S., Hart, E., Rose, J.B., Xagorarakis, I., 2010. Assessment of human adenovirus removal in a full-scale membrane bioreactor treating municipal wastewater. *Water Res.* 44, 1520–1530. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.10.039>

Lambertini, E., Spencer, S.K., Bertz, P.D., Loge, F.J., Kieke, B.A., Borchardt, M.A., 2008. Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2990–2996. <https://doi.org/10.1128/AEM.02246-07>

Langenfeld, K., Chin, K., Roy, A., Wigginton, K., Duhaime, M.B., 2021. Comparison of ultrafiltration and iron chloride flocculation in the preparation of aquatic viromes from contrasting sample types. *PeerJ* 9, 1–32. <https://doi.org/10.7717/peerj.11111>

Li, Y., Dong, H., Li, L., Tang, L., Tian, R., Li, R., Chen, J., Xie, Q., Jin, Z., Xiao, J., Xiao, S., Zeng, G., 2021. Recent advances in waste water treatment through transition metal sulfides-based advanced oxidation processes. *Water Res.* 192, 116850. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116850>

Llanos, J., Cotillas, S., Cañizares, P., Rodrigo, M.A., 2017. Electrocoagulation as a key technique in the integrated urban water cycle—A case study in the centre of Spain. *Urban Water J.* 14, 650–654. <https://doi.org/10.1080/1573062X.2016.1223322>

Lowther, J.A., Gustar, N.E., Powell, A.L., Hartnell, R.E., Lees, D.N., 2012. Two-year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5812–5817. <https://doi.org/10.1128/AEM.01046-12>

Luna-Trujillo, M., Palma-Goyes, R., Vazquez-Arenas, J., Manzo-Robledo, A., 2020. Formation of active chlorine species involving the higher oxide MO<sub>x</sub>+1 on active Ti/RuO<sub>2</sub>-IrO<sub>2</sub> anodes: A DEMS analysis. *J. Electroanal. Chem.* 878. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114661>

Lynch, J.P., Kajon, A.E., 2016. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 37, 586–602. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584923>

Mackay, A., 2016. Internally-Calibrated Passive Samplers for Water Quality Assessment of Pharmaceuticals and Other Organic Compounds of Wastewater Origin.



- Martínez-Huitle, C.A., Rodrigo, M.A., Sirés, I., Scialdone, O., 2015. Single and Coupled Electrochemical Processes and Reactors for the Abatement of Organic Water Pollutants: A Critical Review. *Chem. Rev.* 115, 13362–13407. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00361>
- Matthijnsens, J., Van Ranst, M., 2012. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* 2, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.04.007>
- Mbaeyi, C., Moran, T., Wadood, Z., Ather, F., Sykes, E., Nikulin, J., Al Safadi, M., Stehling-Ariza, T., Zomahoun, L., Ismaili, A., Abourshaid, N., Asghar, H., Korukluoglu, G., Duizer, E., Ehrhardt, D., Burns, C.C., Sharaf, M., 2021. Stopping a polio outbreak in the midst of war: Lessons from Syria. *Vaccine* 39, 3717–3723. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.05.045>
- Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., Brouwer, A., 2020. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in the Netherlands. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>
- Michen, B., Graule, T., 2010. Isoelectric points of viruses 109, 388–397. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04663.x>
- MINISTERIO PARA LA TRANSICIÓN ECOLÓGICA Y EL RETO DEMOGRÁFICO, 2020. Fomento De La Reutilización Delas Aguas Residuales.
- Mirsaeidi, M., Motahari, H., Khamesi, M.T., Sharifi, A., Campos, M., Schraufnagel, D.E., 2016. Climate change and respiratory infections. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 13, 1223–1230. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201511-729PS>
- Moens, U., Calvignac-Spencer, S., Lauber, C., Ramqvist, T., Feltkamp, M.C.W., Daugherty, M.D., Verschoor, E.J., Ehlers, B., 2017. ICTV virus taxonomy profile: Polyomaviridae. *J. Gen. Virol.* 98, 1159–1160. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000839>
- Mohamed, H., Clasen, T., Njee, R.M., Malebo, H.M., Mbuligwe, S., Brown, J., 2016. Microbiological effectiveness of household water treatment technologies under field use conditions in rural Tanzania. *Trop. Med. Int. Heal.* 21, 33–40. <https://doi.org/10.1111/tmi.12628>
- Momba, M., Ebdon, J., Kamika, I., Verbyla, M., 2019. Using indicators to assess microbial treatment and disinfection efficacy. *Water Sanit. 21st Century Heal.*

## Referències

Microbiol. Asp. Excreta Wastewater Manag. (Global Water Pathog. Proj. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.9>

Moreira, F.C., Boaventura, R.A.R., Brillas, E., Vilar, V.J.P., 2017. Electrochemical advanced oxidation processes: A review on their application to synthetic and real wastewaters. *Appl. Catal. B Environ.* 202, 217–261. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.08.037>

Mousset, E., Loh, W.H., Lim, W.S., Jarry, L., Wang, Z., Lefebvre, O., 2021. Cost comparison of advanced oxidation processes for wastewater treatment using accumulated oxygen-equivalent criteria. *Water Res.* 200, 117234. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117234>

Murray, B.K., Ohmine, S., Tomer, D.P., Jensen, K.J., Johnson, F.B., Kirsi, J.J., Robison, R.A., O'Neill, K.L., 2008. Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *J. Virol. Methods* 153, 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.06.004>

Nelson, B., 2022. What poo tells us: Wastewater surveillance comes of age amid covid, monkeypox, and polio. *BMJ.* <https://doi.org/10.1136/bmj.o1869>

Ni, X.Y., Liu, H., Xin, L., Xu, Z. Bin, Wang, Y.H., Peng, L., Chen, Z., Wu, Y.H., Hu, H.Y., 2020. Disinfection performance and mechanism of the carbon fiber-based flow-through electrode system (FES) towards Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Electrochim. Acta* 341, 135993. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.135993>

Norra, G.F., Baptista-Pires, L., Cuervo Lumbaqué, E., Borrego, C.M., Radjenovic, J., 2022. Chlorine-free electrochemical disinfection using graphene sponge electrodes. *Chem. Eng. J.* 430, 132772. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.132772>

Odonkor, S.T., Ampofo, J.K., 2013. *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiol. Res. (Pavia)*. 4, 2. <https://doi.org/10.4081/mr.2013.e2>

Ogorzaly, L., Bertrand, I., Paris, M., Maul, A., Gantzer, C., 2010. Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 8019–8025. <https://doi.org/10.1128/AEM.00917-10>

Petterson, S., Grøndahl-Rosado, R., Nilsen, V., Myrmel, M., Robertson, L.J., 2015. Variability in the recovery of a virus concentration procedure in water:

- Implications for QMRA. *Water Res.* 87, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.006>
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R., 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3376–3382. <https://doi.org/10.1128/aem.64.9.3376-3382.1998>
- Pintó, R.M., Alegre, D., Domínguez, A., El-Senousy, W.M., Sánchez, G., Villena, C., Costafreda, M.I., Aragonès, L., Bosch, A., 2007. Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiol. Infect.* 135, 270–273. <https://doi.org/10.1017/S0950268806006753>
- Plante, D., Bélanger, G., Leblanc, D., Ward, P., Houde, A., Trottier, Y.L., 2011. The use of bovine serum albumin to improve the RT-qPCR detection of foodborne viruses rinsed from vegetable surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 239–244. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02989.x>
- Rachmadi, A.T., Kitajima, M., Kato, T., Kato, H., Okabe, S., Sano, D., 2020a. Required chlorination doses to fulfill the credit value for disinfection of enteric viruses in water: A critical review. *Environ. Sci. Technol.* 54, 2068–2077. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01685>
- Rachmadi, A.T., Kitajima, M., Kato, T., Kato, H., Okabe, S., Sano, D., 2020b. Required Chlorination Doses to Fulfill the Credit Value for Disinfection of Enteric Viruses in Water: A Critical Review. *Environ. Sci. Technol.* 54, 2068–2077. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01685>
- Rajasekhar, B., Venkateshwaran, U., Durairaj, N., Divyapriya, G., Nambi, I.M., Joseph, A., 2020. Comprehensive treatment of urban wastewaters using electrochemical advanced oxidation process. *J. Environ. Manage.* 266, 110469. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110469>
- Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A., Sánchez, G., 2020. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res.* 181. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>
- Rhodes, E.R., Huff, E.M., Hamilton, D.W., Jones, J.L., 2016. The evaluation of hollow-fiber ultrafiltration and celite concentration of enteroviruses, adenoviruses and bacteriophage from different water matrices. *J. Virol. Methods* 228, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.11.003>

## Referències

- Rossati, A., 2017. Global warming and its health impact. *Int. J. Occup. Environ. Med.* 8, 7–20. <https://doi.org/10.15171/ijoen.2017.963>
- Rusiñol, M. 2014. Disseminació i traçabilitat de la contaminació viral en conques fluvials. Universitat de Barcelona, Barcelona.
- Rusiñol, M., Zammit, I., Itarte, M., Forés, E., Martínez-Puchol, S., Girones, R., Borrego, C., Corominas, L., Bofill-Mas, S., 2021. Monitoring waves of the COVID-19 pandemic: Inferences from WWTPs of different sizes. *Sci. Total Environ.* 787. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147463>
- Rzezutka, A., Cook, N., 2004. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 441–453. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.02.001>
- Sanchis, S., Gali, D., Sala, V., Gomez, P., Pinedo, J., Donato, J., Berlanga, J.G., Garcia-Montaño, J., 2021. Advanced hybrid electro-oxidation & O<sub>3</sub> technology for water reuse in the fruit and vegetable process industry. *Water Sci. Technol.* 84, 1159–1169. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.297>
- Sano, D., Amarasiri, M., Hata, A., Watanabe, T., Katayama, H., 2016. Risk management of viral infectious diseases in wastewater reclamation and reuse: Review. *Environ. Int.* 91, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.001>
- Schang, C., Crosbie, N.D., Nolan, M., Poon, R., Wang, M., Jex, A., John, N., Baker, L., Scales, P., Schmidt, J., Thorley, B.R., Hill, K., Zamyadi, A., Tseng, C.W., Henry, R., Kolotelo, P., Langeveld, J., Schilperoort, R., Shi, B., Einsiedel, S., Thomas, M., Black, J., Wilson, S., McCarthy, D.T., 2021. Passive Sampling of SARS-CoV-2 for Wastewater Surveillance. *Environ. Sci. Technol.* 55, 10432–10441. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01530>
- Scipioni, A., Mauroy, A., Ziant, D., Saegerman, C., Thiry, E., 2008. A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition. *Viol. J.* 5, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-94>
- Shamkhali Chenar, S., Deng, Z., 2017. Environmental indicators for human norovirus outbreaks. *Int. J. Environ. Health Res.* 27, 40–51. <https://doi.org/10.1080/09603123.2016.1257705>
- Sharma, A., Farouk, I.A., Lal, S.K., 2021. COVID-19 : A Review on the Novel Coronavirus Disease. *Viruses* 13, 1–25.
- Sidstedt, M., Jansson, L., Nilsson, E., Noppa, L., Forsman, M., Rådström, P., Hedman, J., 2015. Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time

- polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 487, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.07.002>
- Sinclair, R.G., Jones, E.L., Gerba, C.P., 2009. Viruses in recreational waterborne disease outbreaks: A review. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1769–1780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04367.x>
- Sirés, I., Brillas, E., Oturan, M.A., Rodrigo, M.A., Panizza, M., 2014. Electrochemical advanced oxidation processes: Today and tomorrow. A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 8336–8367. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2783-1>
- Smith, C., 2014. Neuse River Water Quality Sampling.
- Smith, C.M., Hill, V.R., 2009. Dead-end hollow-fiber ultrafiltration for recovery of diverse microbes from water. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5284–5289. <https://doi.org/10.1128/AEM.00456-09>
- Soller, J.A., Eftim, S.E., Nappier, S.P., 2018. Direct potable reuse microbial risk assessment methodology: Sensitivity analysis and application to State log credit allocations. *Water Res.* 128, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.034>
- Teunis, P.F.M., Moe, C.L., Liu, P., Miller, S.E., Lindesmith, L., Baric, R.S., Le Pendu, J., Calderon, R.L., 2008. Norwalk virus: How infectious is it? *J. Med. Virol.* 80, 1468–1476. <https://doi.org/10.1002/jmv.21237>
- The European Parliament and the Council, 2020. Regulation (EU) 2020/741, Minimum requirements for water reuse. *Off. J. Eur. Union* 177/33, 32–55.
- Thebault, A., Teunis, P.F.M., Le Pendu, J., Le Guyader, F.S., Denis, J.B., 2013. Infectivity of GI and GII noroviruses established from oyster related outbreaks. *Epidemics* 5, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2012.12.004>
- Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Gerba, C.P., 2005. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water Res.* 39, 3650–3656. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.06.006>
- Torii, S., Corre, M.-H., Miura, F., Itamochi, M., Haga, K., Katayama, K., Katayama, H., Kohn, T., 2022. Genotype-dependent kinetics of enterovirus inactivation by free chlorine and ultraviolet (UV) irradiation. *Water Res.* 220, 118712. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118712>
- United Nations Development Group, 2017. Mainstreaming the 2030 Agenda for Sustainable Development Reference Guide to UN Country Teams 1–137.

## Referències

US EPA, 2018. Potable Reuse Compendium 203.

US EPA Office of Water, 2010. EPA 816-F-10-080 Comprehensive Disinfectants and Disinfection Byproducts Rules (Stage 1 and Stage 2): Quick Reference Guide. U. S. Environ. Prot. Agency 816-F, 4. [https://doi.org/EPA 816-F-10-080](https://doi.org/EPA%20816-F-10-080)

Valero, P., Verbel, M., Silva-Agredo, J., Mosteo, R., Ormad, M.P., Torres-Palma, R.A., 2017. Electrochemical advanced oxidation processes for *Staphylococcus aureus* disinfection in municipal WWTP effluents. *J. Environ. Manage.* 198, 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.070>

Vecitis, C.D., Schnoor, M.H., Rahaman, M.S., Schiffman, J.D., Elimelech, M., 2011. Electrochemical multiwalled carbon nanotube filter for viral and bacterial removal and inactivation. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3672–3679. <https://doi.org/10.1021/es2000062>

WHO, 2011a. Water quality for drinking: WHO guidelines. *En cycl. Earth Sci. Ser.* 876–883. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4410-6\\_184](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4410-6_184)

WHO, 2011b. WHO guidelines for drinking-water quality. *WHO Bull.* 38, 104–108. [https://doi.org/10.1016/S1462-0758\(00\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S1462-0758(00)00006-6)

WHO, 1997. Guidelines for drinking-water quality.

WHO, UNICEF, 2019. Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2017 Special focus on inequalities, Launch version July 12 Main report Progress on Drinking Water , Sanitation and Hygiene.

World Health Organisation. 2017. Guidance for Producing Safe Drinking-Water. World Health Organization. . Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Geneva, Switzerland. [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/potable-reuse-guidelines/en/](https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/potable-reuse-guidelines/en/).

World health organization (21 de marzo de 2022). Agua para el consumo humano. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>

World Health Organization (November 2022). WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/>

Wigginton, K.R., Kohn, T., 2012. Virus disinfection mechanisms: The role of virus composition, structure, and function. *Curr. Opin. Virol.* 2, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.11.003>

- Wigginton, K.R., Pecson, B.M., Sigstam, T., Bosshard, F., Kohn, T., 2012. Virus inactivation mechanisms: Impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ. Sci. Technol.* 46, 12069–12078. <https://doi.org/10.1021/es3029473>
- Wigginton, K.R., Ye, Y., Ellenberg, R.M., 2015. Environmental Science Water Research & Technology of pandemic viruses in the urban water cycle. <https://doi.org/10.1039/C5EW00125K>
- Wilson, M., Qiu, Y., Yu, J., Lee, B.E., McCarthy, D.T., Pang, X., 2022. Comparison of Auto Sampling and Passive Sampling Methods for SARS-CoV-2 Detection in Wastewater. *Pathogens* 11. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030359>
- Wobus, C.E., Thackray, L.B., Virgin, H.W., 2006. Murine Norovirus: a Model System To Study Norovirus Biology and Pathogenesis. *J. Virol.* 80, 5104–5112. <https://doi.org/10.1128/jvi.02346-05>
- Wu, J., Long, S.C., Das, D., Dorner, S.M., 2011. Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. *J. Water Health* 9, 265–278. <https://doi.org/10.2166/wh.2011.117>
- Ye, Y., Ellenberg, R.M., Graham, K.E., Wigginton, K.R., 2016. Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5077–5085. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00876>
- Zhang, W., Du, R.H., Li, B., Zheng, X.S., Yang, X. Lou, Hu, B., Wang, Y.Y., Xiao, G.F., Yan, B., Shi, Z.L., Zhou, P., 2020. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 386–389. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1729071>
- Zheng, D.P., Widdowson, M.A., Glass, R.I., Vinjé, J., 2010. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J. Clin. Microbiol.* 48, 168–177. <https://doi.org/10.1128/JCM.01622-09>
- Zhou, S., Liu, B., Han, Y., Wang, Y., Chen, L., Wu, Z., Yang, J., 2022. ZOVER: The database of zoonotic and vector-borne viruses. *Nucleic Acids Res.* 50, D943–D949. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab862>





The background is a vibrant, abstract composition of thick, expressive brushstrokes. The color palette is diverse, featuring shades of magenta, pink, light blue, cyan, green, and dark blue. The strokes are layered and textured, creating a sense of movement and depth. The overall effect is reminiscent of a modern, expressive painting or digital art style.

**ANNEXOS**  
**Protocols**  
**desenvolupats**



**virwatest**  
Concentration

## Concentration of Viruses

The VirWaTest Concentration Method allows to concentrate the viruses present in a 10 L water sample into a small volume suitable to perform techniques such as nucleic acid extraction and detection.
















After a water sample is collected a conditioning step must be performed to adjust the water conductivity and pH. The water is then combined with a Pre-Flocculated Skimmed Milk solution containing floccs the viruses adsorb to, by a process known as flocculation. The conditioning is required for the flocculation to take place. The water is stirred for 8 hours to facilitate the adsorption of the viruses to the floccs and then it is left still for 5 hours to allow the floccs to settle. The water supernatant is extracted while the floccs (approximate 500 mL) are collected into a 500 mL container. The floccs are allowed to settle once more and they are finally collected in a water concentrate of 20-30 mL. One milliliter of this concentrate is added to a tube containing a lysis solution which allows to release the nucleic acids. Follow the next steps to collect, prepare and flocculate each water sample.

A video showing the complete concentration process is available at [www.virwatetest.org](http://www.virwatetest.org).

## Kit Contents

This kit contains equipment and reagents to concentrate 6 water samples (2 in parallel).

### Equipment

	Bucket and Lid, 9 Units		Bucket Support, 2 Units		Battery-Powered Magnetic Stirrer, 2 Units		Battery, 2 Units		Power Cable, 2 Units
	Power Adapter, 2 Units		Stirring Magnet, 12 Units		Laboratory Tweezers, 1 Unit		Pipette Controller, 1 Unit		Open-Tip Pipette (10 mL), 9 Units
	Tape-End Pipette (10 mL), 9 Units		Tape-End Pipette (50 mL), 9 Units		Silicon Tube, 1 Unit		Stand-Up Bag, 7 Units		Pasteur Pipette, 10 Units

## Reagents

				
pH Indicator Strips, 50 Strips	Aquagenx Kit for the Detection of <i>E.coli</i> , 1 Unit	Process Control, 7 Tubes	Sample Conditioning, 9 Sachets	Sea Salts, 7 Sachets
				
Neutralizing Agent, 7 Sachets	Skimmed Milk, 2 Tubes	Citric Acid, 2 Tubes	Sodium Hydroxide, 2 Tubes	Distilled Water for Skimmed Milk Solution, 1 Bottle
				
Distilled Water for Citric Acid Solution, 2 Containers	Distilled Water for Sodium Hydroxide Solution, 2 Containers	Collection Tube, 12 Units	Lysis Solution, 10 Tubes	Gloves, S, M and L, 6 Pairs of Each Size
				
Marker, 1 Unit				

## Materials Not Included

Both distilled water and a bucket to collect the discarded water are not provided with the kit.

## Collection of the Water Sample

**1** Use a clear graduated bucket of 10 liters to collect the water sample from the water point-of-use. Do not collect the water straightaway from a faucet. Instead, let the water run for a few seconds before collecting it. When collecting an environmental water sample (e.g. from a river, a lake...) tying a rope to the bucket may help to recover it.



**2** Seal the bucket with the lid and label it with a marker indicating the sample name, date and volume of water collected.

**3** If the water contains suspended material (e.g. sand, algae...), let it settle and then pour the water supernatant into a new bucket and label it properly.

**4** Place a bucket support on a lifted surface (e.g. a table) and a magnetic stirrer underneath the support. The magnetic stirrer can be plugged to a battery using a power cable.



**5** Place the bucket containing the water sample on the support.

**!** Avoid the manipulation of the water sample, the equipment and the reagents with bare hands. Use clean gloves instead.

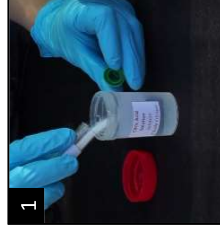
## Preparation of the Reagents

Prepare the Citric Acid solution and the Sodium Hydroxide solution, which will be used to adjust the pH of both the Pre-Flocculated Skimmed Milk solution and the water sample. Prepare also the Pre-Flocculated Skimmed Milk solution.

### Citric Acid Solution

**1** Pour the Citric Acid powder into the Citric Acid Solution container.

**2** Mix the solution until the Citric Acid powder is completely dissolved in the water.



### Sodium Hydroxide Solution

**1** Pour the Sodium Hydroxide pellets into the Sodium Hydroxide Solution container.

**2** Mix the solution until the Sodium Hydroxide pellets are completely dissolved in the water.



### Skimmed Milk Solution

**1** Fill a stand-up plastic bag with 500 mL of distilled water, place it on the magnetic stirrer and drop a stirring magnet over the water.

**2** Pour the contents of a Sea Salts sachet and a Skimmed Milk tube over the water and stir for 5 minutes at medium speed to dissolve them.

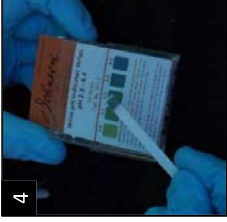


**3** Fill a stand-up plastic bag with 500 mL of distilled water, place it on the magnetic stirrer and drop a stirring magnet over the water.



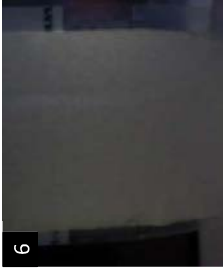
**!** The Pre-Flocculated Skimmed Milk has a pH around 7. This pH must be dropped to a pH between 3.4 and 3.6 for the flocculation to take place.

**4** Briefly dip a pH indicator strip into the Skimmed Milk solution to measure its pH and observe the color the strip turns to. If the strip turned blue, add a few drops of Citric Acid solution; if the strip turned yellow, add a few drops of Sodium hydroxide solution. Then measure the pH again using a new pH indicator strip.



**i** The pH indicator strips will turn yellow if the pH is below 3.4, green if the pH is between 3.4 and 3.6 and blue if the pH is above 3.6.

**5** Repeat step 5 until the strip turns green, indicating that the pH is between 3.4 and 3.6.



**6** Turn off the magnetic stirrer and make sure the floccs are visible.

## Conditioning of the Water

The water sample must be conditioned, by adjusting its conductivity and pH, for the flocculation to take place. Use the contents of the Sample Conditioning sachet, the Citric Acid solution and the Sodium Hydroxide solution to adjust these parameters.

**1** Set the magnetic stirrer at maximum speed and turn it on, making sure the stirring magnet starts spinning.

**2** Pour the contents of one Sample Conditioning sachet over the water and let them to dissolve completely for 5 minutes.



**3** Briefly dip a pH indicator strip into the water to measure its pH and observe the color the strip turns to.

**4** If the strip turned blue, add a few drops of Citric Acid solution; if the strip turned yellow, add a few drops of Sodium hydroxide solution. Then measure the pH again using a new pH indicator strip.

**5** Repeat step 6 until the strip turns green.



## Flocculation

**1** Pour the distilled water in a Distilled Water green-capped tube to a Process Control tube.



**2** Flip the Process Control tube up and down 10 times and pour its contents over the water.



**3** Measure 100 mL of Skimmed Milk solution using a graduated container and pour them over the water sample.



**4** Seal the bucket with the lid, set the magnetic stirrer at minimum speed and leave the water stirring for 8 hours.

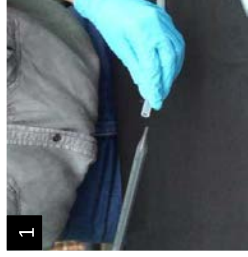
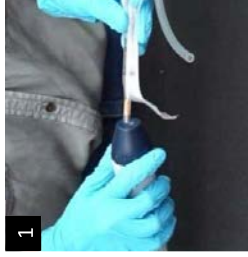
**5** Turn off the magnetic stirrer and leave the water still for 5 hours to allow the floccs to settle to the bottom of the bucket.



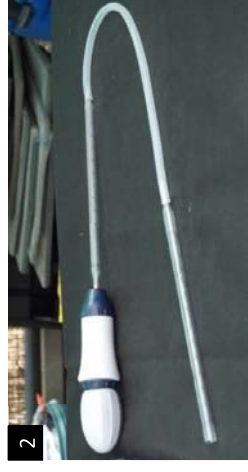
## Collection of the Flocks

Once the flocculation is done and the flocks are settled, the water supernatant can be discarded allowing to recover the flocks in a smaller volume of water.

**1** Attach a tape-end pipette to the pipette controller. Then attach one end of the plastic tube to the tip of the pipette.



**2** Remove the filter of an open-tip pipette using tweezers and attach the top of the pipette to the other end of the tube.



**3** Immerse the tip of the open-tip pipette into the water and aspirate it. Squeeze the tube by the tape-end attached to the pipette when the water reaches it.

**4** Detach the tube from the tape-end pipette and put it inside an empty bucket placed on the floor. Then release the tube to let the water run. Keep the tip of the open-tip pipette close to the water surface at all times to prevent disturbing the flocks.



**5** When the water surface is about to reach the top of the stirring magnet squeeze the tube to stop the water flow and withdraw the pipette from the bucket.

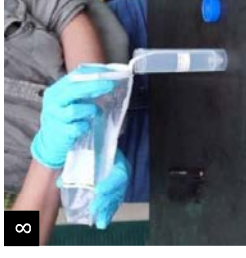


**6** Shake the bucket to resuspend the flocks and pour them into a 500 mL stand-up plastic bag.

**7** Leave the water still for 1 hour to let the flocks to settle. Then use a 50 mL pipette and the pipette controller to aspirate the water. Keep the tip of the pipette close to the water surface to prevent disturbing the flocks.



**8** When the water surface is about to reach the flocks withdraw the pipette from the stand-up plastic bag. Shake the bag to resuspend the flocks and pour them into a 50 mL Collection Tube. Label the tube indicating the sample name and the volume collected.



## Storage of the Concentrates

**1** Use a Pasteur pipette to transfer 1 mL of the solution from the Collection Tube to the Lysis Solution tube and label it indicating the sample name. Repeat this step to get a total of 3 replicates.

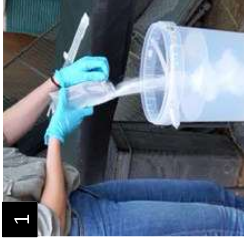


**2** The lysis of the viruses adsorbed to the flocks results in a Sample Lysate, containing free nucleic acids which stable for up to 15 days when stored between 20 °C and 30 °C. The Sample Lysate can be used to perform the nucleic acid purification in the field or alternatively it can be shipped to a reference laboratory to perform the nucleic acid purification there.

## Waste Disposal

The water discarded while collecting the flocks must be treated before disposing it.

**1** Pour the contents of a Neutralizing Sachet over the discarded water and leave it still for 30 minutes.



**2** Dispose the treated water, together with the bucket, as a general waste.

**virwatest**  
Extraction

## Extraction of Nucleic Acids







The VirWaTest Extraction Method allows to separate the nucleic acids from all the contaminant elements present in a sample concentrate.

The nucleic acid extraction or nucleic acid purification is carried out using magnetic particles, which the nucleic acids adsorb to, that are added to the sample concentrate. The washes allow removing the remaining contaminants before recovering the nucleic acids in the elution solution before they are further processed. Follow the steps for each sample that is going to be processed. Note that several samples may be processed at the same time.







You can visualize how to perform this protocol at [www.virwatest.org](http://www.virwatest.org).

### Kit Contents

#### Small Equipment and Disposables

		
Magnetic Pipette, 1 Unit	Magnetic Pipette Tips, 30 Units	Disposable Pasteur Pipette, 15 Unit
		
2 mL Tube Without Cap, 30 Units	Tube Rack, 1 Unit	Timer, 2 Units

#### Materials and Reagents

		
Gloves, S, M and L, 3 Pairs of Each Size	Ethanol and Magnetic Particles Solution, 15 Units	First Washing Solution, 15 Units
		
Second Washing Solution, 15 Units	Third Washing Solution, 15 Units	Elution Solution, 15 Units

	
Solar-Powered Orbital, 1 Unit	Marker, 1 Unit

## Extraction Setup

Set up the extraction system before proceeding with the nucleic acid adsorption as shown below (2 samples and a negative control).

For each batch of samples include a negative control tube.



## Magnetic Pipette Operation

The magnetic particles can be transferred between the different solutions using a magnetic pipette. Follow the procedures described in this section when collecting or releasing the magnetic particles.

### Collecting the Magnetic Particles

- A. Place a pipette tip at the end of the magnetic pipette. Don't touch the tip with the hands.



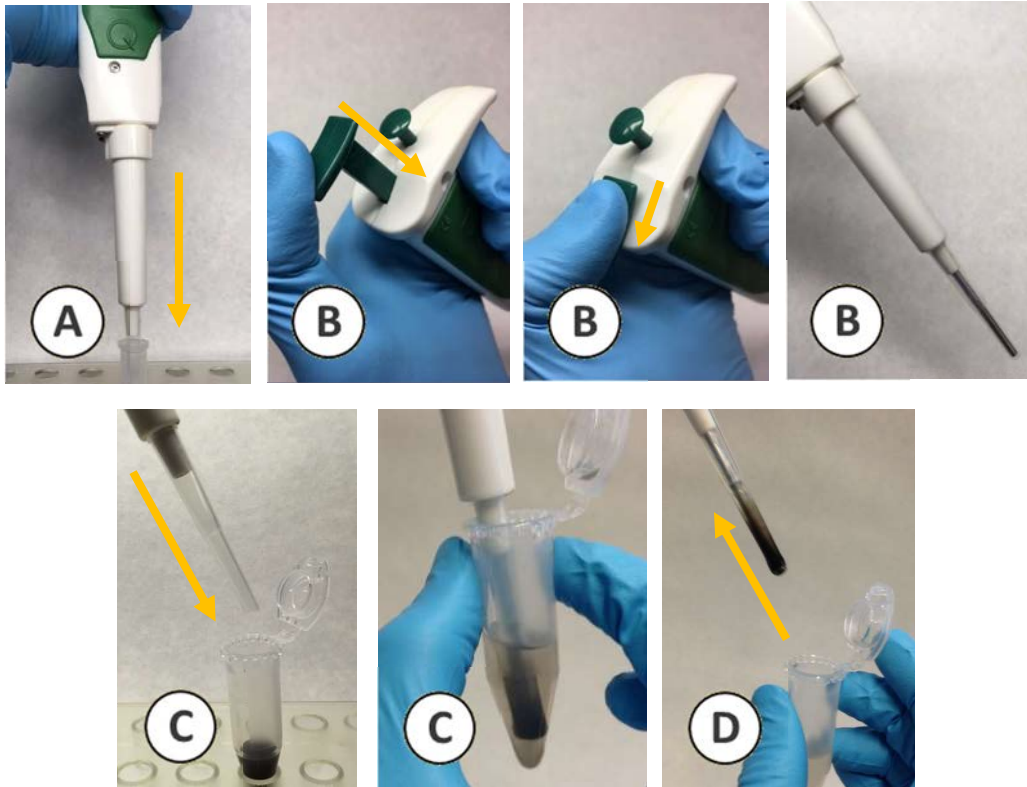
**The same tip can be used during the washing steps and when releasing the magnetic particles into the blue-labelled tube. Use a new tip when collecting the magnetic particles from the blue-labelled tube.**

- B. Push down the plunger of the magnetic pipette to deploy the magnet. Pulling back the plunger will automatically lock it to maintain the magnet deployed.
- C. Immerse the pipette tip into the solution to capture the magnetic particles.



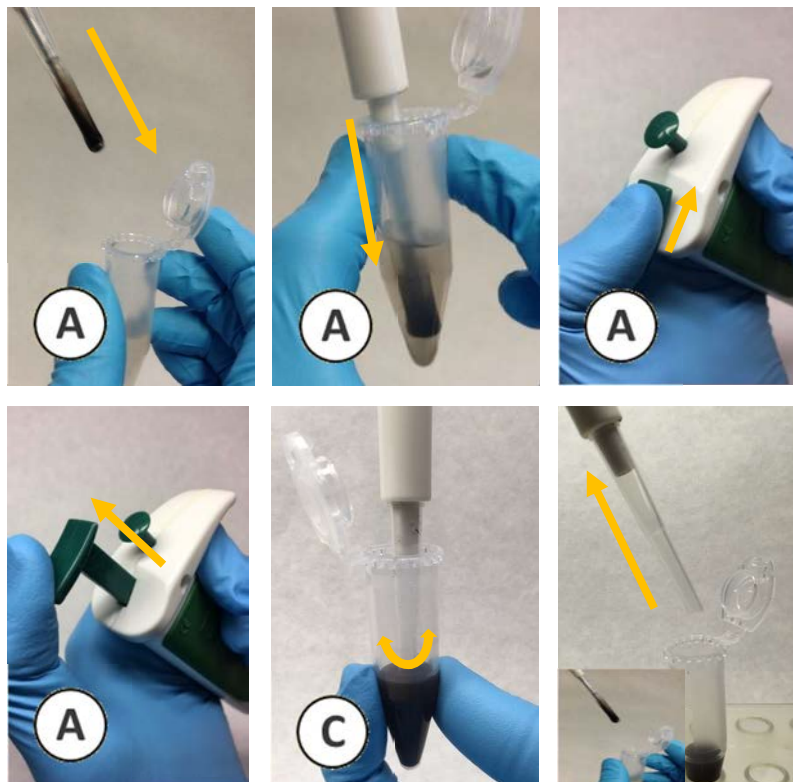
**Sink the tip gently in such a way that the magnetic particles gather around the end of the tip. If they are scattered all over the tip they could be lost during the washes.**

- D. Once the magnetic particles have gathered around the end of the tip remove the pipette from the tube.



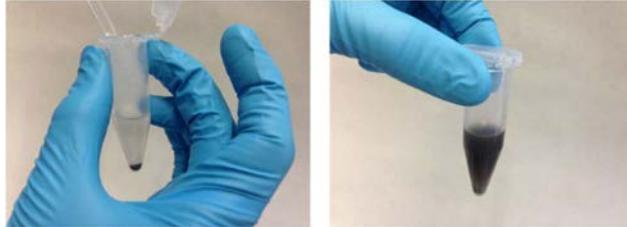
### Releasing the Magnetic Particles

- A. Gently sink the pipette tip carrying the magnetic particles into the solution.
- B. Unlock the plunger by pushing it forward and pulling it up thus retracting the magnet.
- C. Shake the tip gently to release the magnetic particles.
- D. Remove the tip from the tube.



## Nucleic Acid Extraction

1. Transfer 1 mL of sample concentrate to the tube containing the ethanol by using a disposable Pasteur pipette. Then gently mix the solution by pipetting up and down with the same pipette.



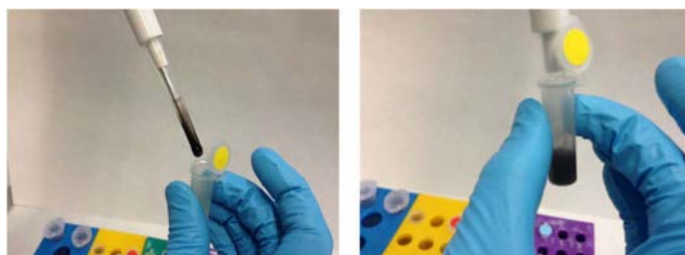
2. Transfer the contents of the previous tube to the tube containing the magnetic particles by using the same disposable Pasteur pipette.
3. Incubate the tube at room temperature for 10 minutes continuously mixing the solution by using the solar-powered orbital.



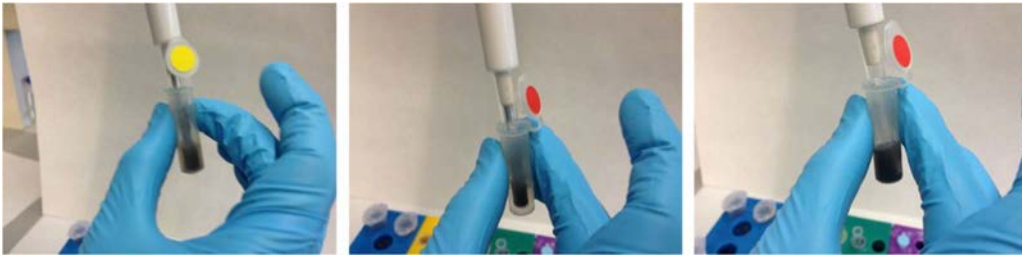
4. Place a plastic tip at the end of the magnetic pipette and collect the magnetic particles from the previous solution. See how to use the magnetic pipette at the **Magnetic Pipette Operation** section.



5. Release the magnetic particles into the washing solution of the **yellow-labelled tube**. Then mix the solution for 30 seconds by gently shaking the tip with the magnetic pipette.



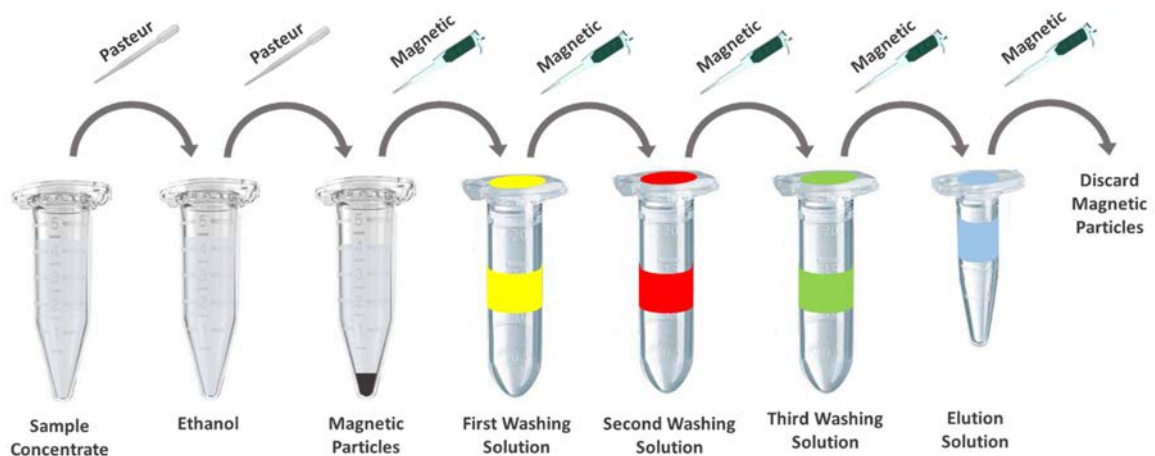
6. Collect the magnetic particles from the **yellow-labelled tube** and release them into the washing solution of the **red-labelled tube**. Then mix the solution for 30 seconds by gently shaking the tip with the magnetic pipette.



7. Collect the magnetic particles from the **red-labelled tube** and release them into the washing solution of the **green-labelled tube**. Then mix the solution for 30 seconds by gently shaking the tip with the magnetic pipette.



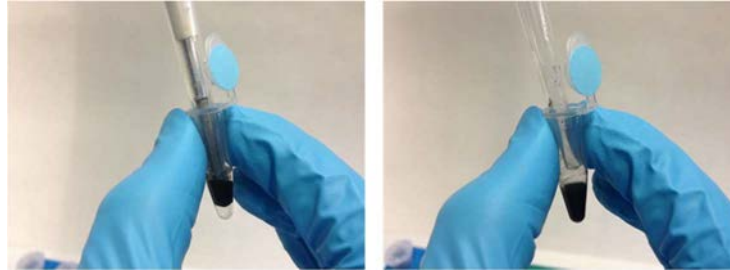
8. Collect the magnetic particles from the **green-labelled tube**.





## Elution

1. Release the magnetic particles into the **blue-labelled tube**, containing the elution solution, by gently shaking the pipette. Then move away the tip and discard it by pushing the small green tip-eject button.



2. Incubate the solution at room temperature continuously homogenizing by using the solar-powered orbital.
3. Place a new tip at the end of the magnetic pipette and collect the magnetic particles from the **blue-labelled tube**.



**Avoid leaving magnetic particles in the solution since they can interfere with the detection method.**

4. Remove away the tip from the tube and discard the tip with the magnetic particles adsorbed.



5. The solution remaining in the **blue-labelled tube** contains the nucleic acids. This extraction product will be used for the VirWaTest Detection Method.



**virwatest**  
Detection

## Detection of Viruses

The VirWaTest Detection Method allows for the detection of Human Adenovirus and Hepatitis E Virus present in water samples through a Quantitative PCR assay.

The detection is carried out by adding a certain amount of the eluate resulting from the VirWaTest Extraction Method into microtubes containing a small white bead composed of the components needed for the assay, which is performed by using a thermocycler connected to a computer. When the assay is finished the software provided with the thermocycler allows to determine if the water sample was positive for the presence of these viruses.




The reagents may be used with any Quantitative PCR equipment. In this protocol, the procedure described uses a Mini8 Plus Real-Time PCR from Coyote Biosciences that is a thermocycler coupled to a battery. You may contact us at [www.virwatest.org](http://www.virwatest.org) for further assistance.

## Kit Contents





### Reagents

		
Microtubes for Human Adenovirus Detection, 4 Eight-Tube Strip Units	Microtubes for Hepatitis E Virus Detection, 4 Eight-Tube Strip Units	Water, 2 mL x 1 Unit

### Equipment and Reagents

	
Micropipette, 1 Unit	Micropipette Tips, 1 Box
	
Marker, 1 Unit	

### Materials Not Included

	
Quantitative PCR Thermocycler	Power Adapter
	
External Battery	Windows-Based Computer

## Micropipette Operation

The micropipette supplied with the kit allows you to pipette volumes from X microlitres to X microlitres. Follow this procedure to pipette the required volumes:

- A. Hold the micropipette horizontally and locate the plastic window where the numbers are displayed.



- B. Make sure the lock lever is in the unlocked position. While the lock lever is in the unlocked position you should be able to roll the plunger easily. If it is not, turn it to the unlocked position.



- C. Roll the plunger to adjust the volume indicator to the desired volume. Never take the numbers out of the volume range the micropipette is able to handle.



- D. Turn the lock lever to the *Locked* position to prevent the plunger from rolling inadvertently.

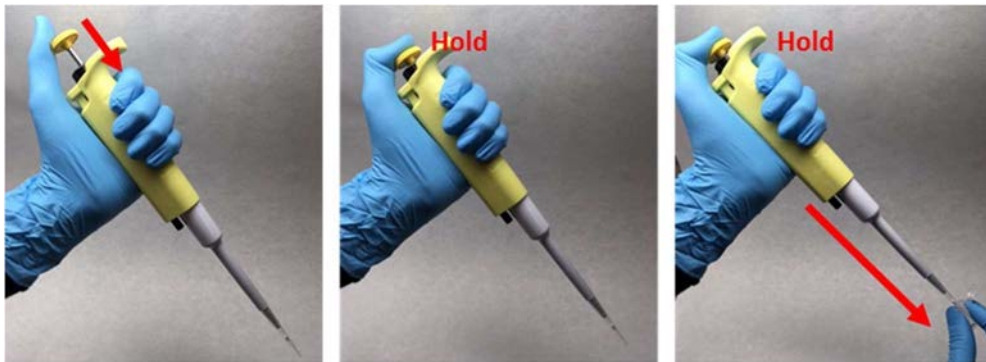


- E. Place a tip at the end of the micropipette. Don't use your hands. Push the micropipette against the tip instead.



- F. Before immersing the tip into the solution push the plunger and hold it down. Then immerse the tip into the solution.

**i** Micropipette plungers have two pushing-positions in form of two points of resistance. Before loading the pertinent volume push until the first point of resistance. When delivering the loaded volume push all the way to the bottom.



- G. While the tip is sunken into the solution release the plunger gently to draw up the volume.



H. Move the micropipette to the tube you want the volume to be dispensed.



I. Push the plunger down to dispense the volume.



J. Push down the tip-eject button to discard the tip.

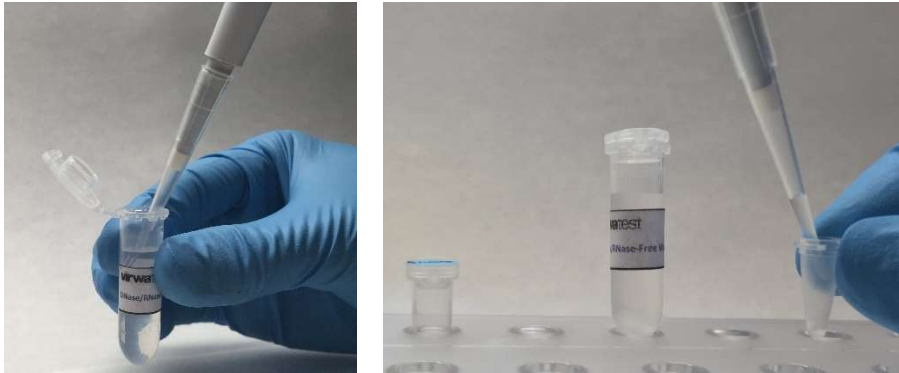


### Assay Preparation

1. The microtubes specific for the detection of Human Adenovirus and Hepatitis E Virus are provided stored in two separate boxes. Use the appropriate microtube strip depending on the virus that is aimed to be detected.
2. Be sure that the white beads are at the bottom of the tubes. If they are not, gently tap the tube with the finger until the bead goes to the bottom.

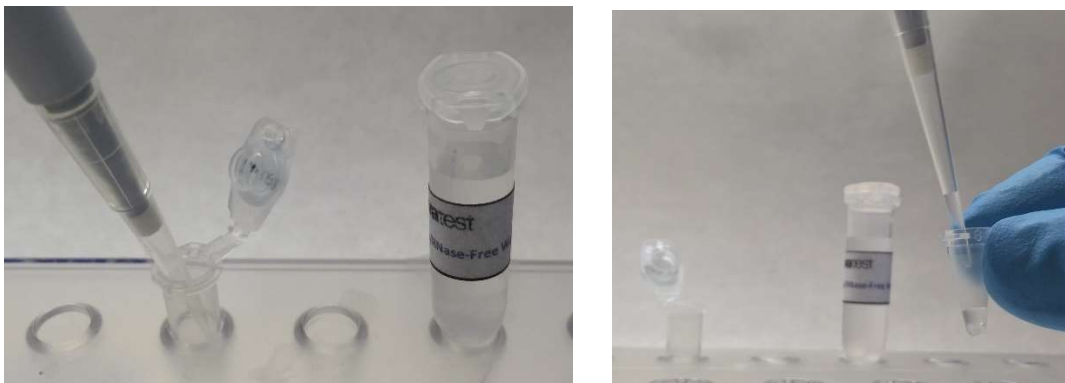


3. Add 17.5 microlitres of water to the microtube by using the micropipette.

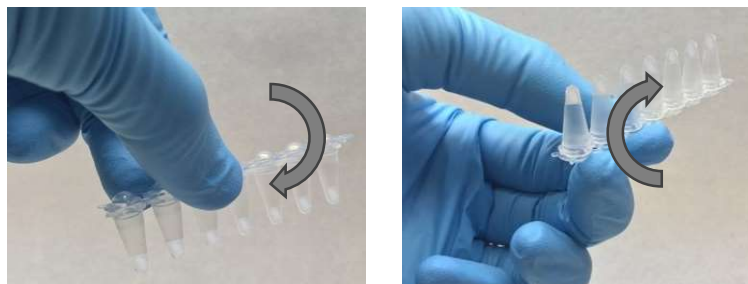


4. Add the sample to the microtube by using the micropipette. Also add water to one tube as a negative control. The corresponding volumes to be added are the following:

- **10 microlitres** of the extraction product for **Adenovirus detection assays**.
- **5 microlitres** of the extraction product for **Hepatitis E Virus detection assays**.
- Nuclease-free water as a negative control:
  - **10 microlitres** for **Adenovirus detection assays**.
  - **5 microlitres** for **Hepatitis E detection assays**.



5. Mix the solution by inverting the microtube until the bead gets dissolved. The reaction is now ready for the detection step.



- Place the tube-strip in the thermal plate of the thermocycler.

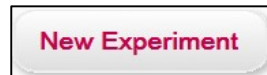


## Quantitative PCR Assay Setup

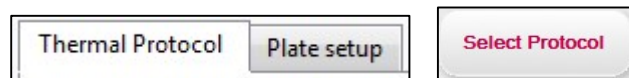
- Plug the Mini8 Plus Real-Time PCR cycler both to the power and to the computer by using the power adapter and the USB cable supplied with the device.
- Turn on the computer and run the Mini8 Plus Real-Time PCR System software. When asked about allowing the application to make changes on the computer, click on Yes.
- Go to the **Setup** section to set up the PCR thermal profile and the plate layout.



- Click on the **New Experiment** button. Fill the gaps with the experiment name and the sample type and click OK.

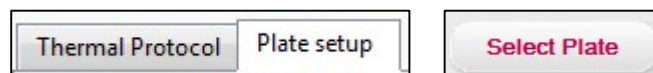


- To set up the thermal profile corresponding to the virus that is aiming to be detected select the **Thermal Protocol** tab and click on **Select Protocol**. Then select the file (Thermal Profile.pdt) and click on **Open File**.



Thermal Profile for Human Adenovirus		
Temperature	Time	Cycles
95°C	10 minutes	1
95°C	15 seconds	40
60°C	1 minute	

- To set up the reaction plate select the **Plate Setup** tab and click on **Select Plate**. Then select the plate configuration file (Plate Configuration.pse) and click **Open File**.







**Note:** By default, the plate configuration file is set up according to the following tube distribution:

Microtube							
1	2	3	4	5	6	7	8
Sample A	Sample A 1:10 Dilution	Sample B	Sample B 1:10 Dilution	Extraction Negative Control	PCR Negative Control	Standard A	Standard B

Sample Well	1	2	3	4	5	6	7	8
Sample Name	Smpl. A	Smpl. A Dil	Smpl. B	Smpl. B Dil	Extr. Negat.	PCR Negat.	Standard A	Standard B
Sample Type	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Neg	Std	Std
Fluorophore CH1	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM
Fluorophore CH2	ROX	ROX	ROX	ROX	ROX	ROX	ROX	ROX
Concentration CH1	?	?	?	?	?	?	100,00E+0	100,00E+3
Concentration CH2	?	?	?	?	?	?	?	?

Sample Name:

Sample Type:

Fluorophore CH1:

Fluorophore CH2:

CH1 Unit:  CH2 Unit:

This configuration can be changed by selecting the desired well and changing its content from the **Sample Type** drop-down menu. For a sample, select **Unknown**.

Sample Type

Unknown

- Unknown
- Standard
- Positive Control
- Negative Control

- Set up the name of each well by clicking over it and writing down the name in the appropriate field in the right side of the screen.
- Click on the **Save Protocol** button to save the file to the computer.



- Go to the **Run** section to see an overview of the assay setup.



- If everything is correct, click on the **Start** button to begin the run, which will take between 90 and 210 minutes depending on the virus that is aimed to be detected.



Adenovirus: 90 minutes  
Hepatitis E: 210 minutes

## Analysis of the Results

Once the run is finished, click on the **Export Data** button to automatically export the results to a Microsoft Excel spreadsheet.



## SOP for virus concentration of fruit irrigation/production/washing-water

The aim of the protocol is to concentrate viruses present in 20-100L of water with a Large Volume Concentration (LVC) Kit (Innovaprep) using a **Rexeed-25A** filter into a final volume of 50 ml.

### **Equipment & material and reagents:**

Rexeed 25A, Single-Use filters

Innovaprep® Wet Foam Elution Fluid Can (0.075% Tween 20-Tris)

Plastic bucket

Innovaprep® LVC Kit components (see figure 1)

Filter holder

Feed line tube (plastic tube)

100ml plastic containers

MS2 liophilized phage ( $10^7$ GC/ml per tube)

Tiosulphate  $5H_2O$

Peristaltic pump

Balance

#### LVC Kit Components

- A. Filter Cell
- B. High Volume Elution Can
- C. LVC Can Interface
- D. Feed Tube
- E. Drain Tube with Clamp
- F. Permeate Tube with Clamp

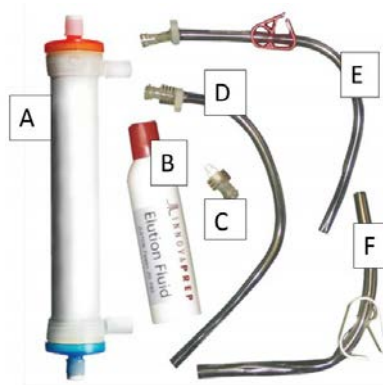


Figure 1: Large Volume concentration Kit components

### **Rexeed-25S Filter Setup:**



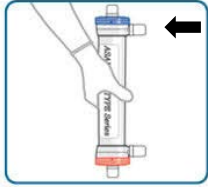
1. Place the Filter cell (A) vertically in the holder with the BLUE header facing upward.
2. Remove the cap and attach the **Feed tube** (D) to the **BLUE header** of the filter cell.



3. Put a waste container to collect the priming volume and remove the cap of the RED bottom.

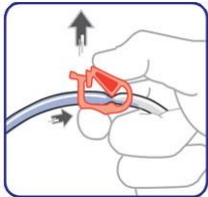
4. Collect and discard the residual liquid that pours from the Filter Cell.

5. Attach the **Drain tube with clamp (E)** to the **RED bottom** of the Filter Cell.



6. Attach the **Permeate tube with clamp (F)** to the top side port, near the BLUE header.

7. Attach Feed Tube (D) to the feed line tube connected to the peristaltic pump and face permeate tube (F) and the drain tube (E) to the waste container.



8. Ensure that clamps are open on both the **Permeate (F)** and the **Drain tube (E)**.

9. Connect the pump and the stirrer to a battery.

### **Filtering the sample**

1. Water samples should be firstly pumped to a 50L bucket for preconditioning before filtered.

2. Add thiosulphate (45mg/L of water).

3. Let the water to stand for 10 minutes to neutralize the chlorine.

4. Take a MS2 lyophilized tube, add some of the water from the bucket, mix well and put the full content of the tube into the water container again.

5. Start the feed pump.

6. When a steady stream of water comes out of the bottom **Drain Tube**, close the clamp or remove the tube and attach the cap.

7. The filtered liquid will continue to flow out of the **Permeate tube** until you have processed the entire sample. Safety Precaution: Do not exceed 10 psi.

8. When liquid stops, allow the pump to continue running for 5 seconds and turn off pump.

9. Allow Filter cell to rest for 10 seconds before continuing to the next step.

### **Collecting the sample eluate**

1. Keep the Filter cell vertical with the **Feed tube** on top, grasp the **Feed tube** fitting firmly and slowly disconnect it from the Filter cell (pressure will vent as you remove the fitting).

2. Pinch the **Permeate tube** clamp closed.

3. Screw the **LVC Can Interface (C)** tightly into the **BLUE** top of the Filter Cell.

4. Remove the **Drain tube (E)** and place the filter cell down near a 100ml plastic container to catch the concentrated sample.

5. To Elute, firmly press the **Elution Fluid Can (B)** down into the **LVC Interface**. Apply constant firm pressure until all foam and all the CO<sub>2</sub> has been expelled out. Sample eluate will have between 30-50ml.

6. Keep the container at 4°C until sent to the laboratory for further concentration.

## SARS-CoV-2 concentration from sewage using an automatic ultrafiltration device Innovaprep concentrating pipette

### Standard Operational Procedure

The aim of the protocol is to concentrate SARS-CoV-2 present in 50-500mL of wastewater, into a final volume of 250-300 $\mu$ l, using a Hollow fiber Polysulfone (PVP) filter tips.

Note: This protocol should be conducted under biosecurity 2 conditions: into a BSL2 cabinet by wearing appropriate individual protection including protection glasses. Rotors preferably opened into the cabinet and always disinfected after each use.

#### 1) Equipment & reagents/sample:

- Innovaprep Concentrating pipette
- PBS Elution Fluid cans (HC08000)
- Concentrating Pipette ultrafiltration tips (CPT): Hollow fiber polysulfone PVP (CC08020).
- Permeate Line (HC08006)
- Storage fluid (HC08558-5) and storage fluid adaptor (ref: HC08560)
- Maintenance Tip with silicone inside (Reusable up to 50 cycles) (HC08005)
- Maintenance fluid kit (HC08004) including Rinse Can and Decon Fluid Can for one decontamination cycle.
- Liquid waste container.
- Alcohol pads, for cleaning around the elution fluid can interface and Concentrating Pipette Tip interface ports. Can be purchased (HC08529) or prepared in advance with 70% isopropyl alcohol.
- Sterile distilled water (50-500 ml per batch of samples as a negative control)
- Balance
- Sterile distilled water (70 ml per sample plus 2x70ml per batch of samples as a negative control)
- High speed centrifuge (4750xg) with a fixed rotor (70 ml per samples should be centrifuged)
- Sterile High-speed centrifuge bottles
- For complex matrices: Use a 1 Micron Prefilter Bag (ref: HC08528), a 10" glazed polypropylene felt bag rated for 1 micron filtration.
- Process control:
  - Non-enveloped MS2 bacteriophage ATCC 15597-B1 strain ( $10^8$ GC/ml; 1 ml per sample): preparation and enumeration according to UNI EN ISO 10705-1 (2001) using the host *Salmonella typhimurium* strain WG49
  - or
  - Enveloped bacteriophage Phi6 DSM21518 strain (DSMZ Collection) ( $10^8$ GC/ml; 1 ml per sample): preparation and enumeration according to Pinheiro, *et al.* 2019

## 2) Controls:

Internal control process (suggested): Add  $10^7$  PFU of the MS2/Phi6 phage suspension (1:100 v/v) as a process control to each water sample and the negative control before concentration.

## 3) Procedure

- DEBRIS REMOVAL.** Previously to ultrafiltration, **spike** 100ml of sample and **centrifuge at 4750xg for 30 min** to remove debris. Proceed to ultrafiltration of the sample supernatant or keep the supernatant in ice.
- Plug the power supply. Flip the Power Switch to turn the instrument on, it will take approximately 5 seconds for the unit to power up.
- Attach the permeate tube to the Permeate Port and Insert the other end in a waste container. Fix it using a tubing Clip.
- START UP.** Prior to processing the first sample of the day, it is important to have the elution fluid can (with **green squared label**) installed
- PRIME.** Select **Main menu >Maintenance> Prime**. A small amount of foam will come out the fluidics head.

### *Innovaprep Concentrating Pipette components and Concentrating Pipette Tip (CPT)*



- CONCENTRATING A SAMPLE.** Install a CPT, place your sample container on the sample platform, then lower the fluidics head so that the CPT is at the bottom of the sample container.
  - Go to the **Main menu** and press **Start run**. The vacuum pump will immediately start to draw the sample through the CPT.
  - After several seconds you will see fluid flowing from the permeate line into your waste container. **The instrument will conclude the run automatically and display the Run complete screen**, show the processing time, and the option to extract or return to the main menu. When sample flow does not reach the sensor within the

- default 20 seconds, the device stops automatically. Move/hit the CPT and let the bubbles move away. Go back to main manu and press **Start run** again.
- iii. Raise the fluidics head out of the sample container and hold the desired final sample container under the CPT.
  - iv. Select **Extract** on the screen and press **enter**, the concentrated sample will be dispensed from the CPT into an eppendorf. If the elution volume is lower than 240ul, return back and extract again.
  - v. Wait until the progress bar on the screen has filled up before removing the epp.
  - vi. Additional extractions may be performed by selecting "**Extract again**".
- g. **SHUT DOWN:** If the device will be used the following day the fluid line should be filled with Storage fluid. If not, the fluid line should be empty.

#### 4) Other procedures:

**WHEN A NEW CAN IS INSTALLED:** Prime the elution fluid lines to ensure that there is no air in the fluid path from the extraction fluid line and **prime the fluidics** as follows:

- Select **Main menu >Maintenance> Prime**. A small amount of foam will come out the fluidics head.

- Select **Return** to go back to the options menu, select **Ext. size** and choose the desired final extraction volume. Elution volumes of **Small**, **Med.**, and **Large** correlate to roughly 320  $\mu\text{L}$ , 380  $\mu\text{L}$ , and 430  $\mu\text{L}$ . Further control of the extraction volume is found under the **Adv. Options** menu

**DECONTAMINATION OF THE FLUID LINE**, requires Maintenance kit (P/N HC08004):

- Go to **Main menu > Options > Procedures** and select Decon Cycle.
- Install the Decon Tip and Decon Fluid Can into instrument and place the Permeate Line into an appropriate container.
- Select **Start**. The unit will automatically perform a flush of the system counting down from 10 minutes. When the flushing cycle is complete, the instrument will beep and advance to the "Rinse" screen.
- Remove and discard **the Decon Fluid can**, then install the **Rinse Fluid can**.
- Press Start. When the 1:30 minute rinse cycle is complete, the instrument will advance to the "Procedures" menu.
- Remove and **discard the Rinse Can** and replace it with an **Elution Fluid can**.

For complex matrices: Use a 1 Micron Prefilter Bag (ref: HC08528), a 10" glazed polypropylene felt bag rated for 1 micron filtration. Makes an effective prefilter for very difficult sample matrices prior to concentration with the Concentrating Pipette.



## SARS-CoV-2 concentration from sewage using ultrafiltration devices Standard Operational Procedure

The aim of the protocol is to concentrate SARS-CoV-2 present in 70mL of wastewater, into a final volume of 200-300µl, using a Centrifugal-ultrafiltration (CeUF) filter Centricon® Plus-70.

Note: This protocol should be conducted under biosecurity 2 conditions: into a BSL2 cabinet by wearing appropriate individual protection including protection glasses. Rotors preferably opened into the cabinet and always disinfected after each use.

### 1) Equipment & reagents/sample:

- Balance
- Sterile distilled water (70 ml per sample plus 2x70ml per batch of samples as a negative control)
- Sterile pipettes and automatic volume dispenser
- Filter tips and micropipettes (100-1000µl)
- Process control:  
Non-enveloped MS2 bacteriophage ATCC 15597-B1 strain ( $10^8$ GC/ml; 1 ml per sample): preparation and enumeration according to UNI EN ISO 10705-1 (2001) using the host *Salmonella typhimurium* strain WG49

or

Enveloped bacteriophage Phi6 DSM21518 strain (DSMZ Collection) ( $10^8$ GC/ml; 1 ml per sample): preparation and enumeration according to Daugelavicius, et al. 2005 (Penetration of enveloped double-stranded RNA bacteriophages phi13 and phi6 into *Pseudomonas syringae* cells)

For pre-treatment of the samples:

- High speed centrifuge (4750xg) with a fixed rotor (70 ml per samples should be centrifuged)
- Sterile High-speed centrifuge bottles

For ultrafiltration of the samples:

- Centrifuge (3000xg) with swinging-bucket with capacity for 250ml bottles
- Centricon® Plus-70 Centrifugal Filter 30KDa Cutoff

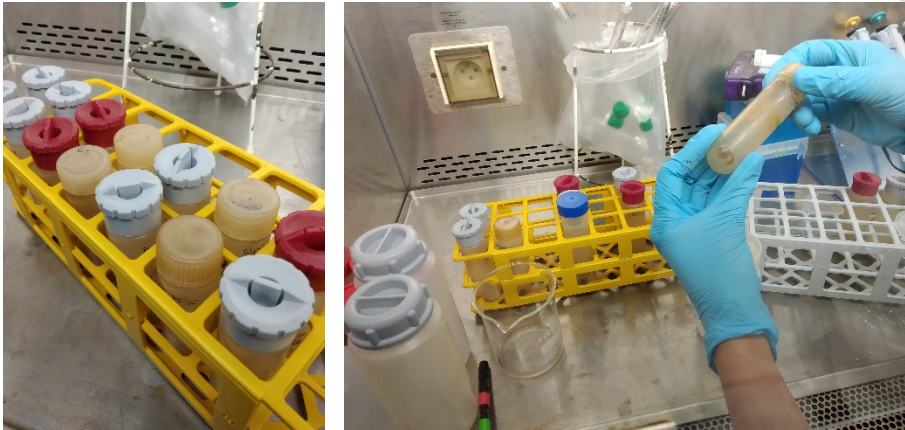
### 2) Controls:

Negative control (suggested): sterile distilled water

Internal control process (suggested): Add  $10^7$  PFU of the MS2/Phi6 phage suspension as a process control to each water sample and the negative control before concentration

### 3) Procedure

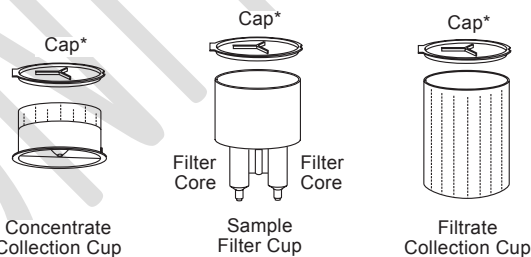
**Debris removal:** Previously to ultrafiltration, centrifuge 70ml sample 4750xg for 30 min to remove debris. Proceed to ultrafiltration of the sample supernatant or keep the supernatant in ice until the centricon filter is prepared.



*Tubes used for debris removal and debris appearance*

**Ultrafiltration:** Use one centricon unit per 70ml sample plus one for negative control.

#### Centricon® Plus-70 components



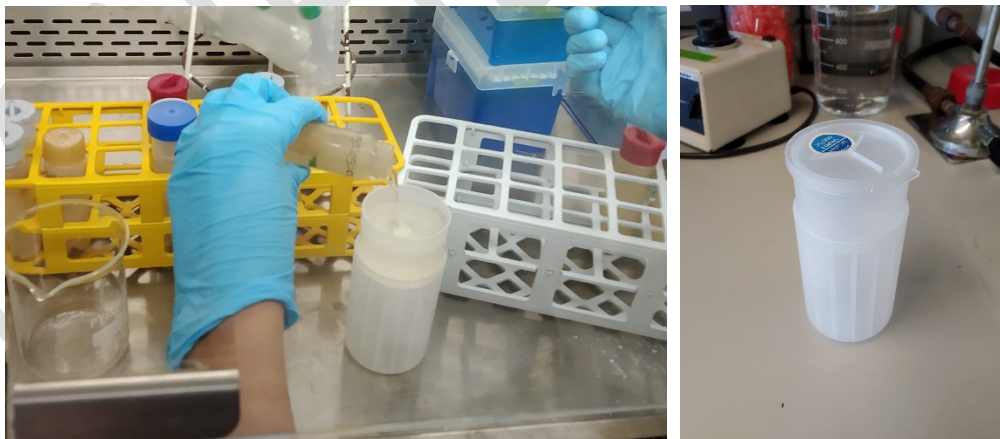
\* Cap fits Concentrate Collection Cup, Sample Filter Cup and Filtrate Collection Cup, as shown.



- Add one cap to a filter cup attached to a collection cup.
- Pre-rinsing: Centricon® Plus-70 membranes contain trace amounts of glycerine, used as a humectant. To remove glycerine, fill the filter part with 70 mL of Milli-Q® water and spin up to 3,000g for 15min and attach the filter and the collection cup again.

**ATTENTION:** Do not allow the membrane in the filter device to dry out once wet. If the device is not being used immediately after pre-rinsing, leave fluid on the membrane until the device is used.

- Sample concentration: Add the sample supernatant to *the filter cup* and seal with the cap.

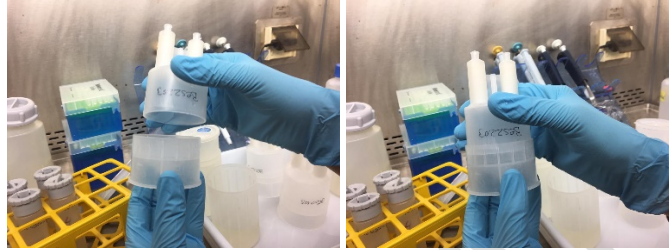
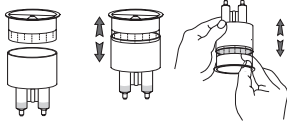


- Spin up to 3000xg for 30 min. In case there some sample unfiltered sample remain in the filter cup, discharge it with a (micro)pipette.

**CAUTION:** Always counterbalance centrifuge with a second bucket containing a second Centricon® Plus-70 device and an equal volume of sample or water. If the amount of

concentrate remaining in the *sample filter cup* is above the top of the filter cores, decant to a suitable container before proceeding.

- Concentrate recovery: Turn the *concentrate cup* upside down and place on top of the *sample filter cup*. Carefully invert device, place in centrifuge. Spin at 1000g for 3min.



- Remove the *concentrate cup* containing the concentrated sample from the *sample filter cup*. Keep the *filter cup* inverted during this process. Remove the sample with a pipette and store sample (approximately 200µl) in a 1,5ml plastic tube at -80°C.



*Collection cup with filtered sample*



**ANNEXOS**  
Altres  
publicacions



# Concentration methods for the quantification of coronavirus and other potentially pandemic enveloped virus from wastewater

Marta Rusiñol<sup>1,2</sup>, Sandra Martínez-Puchol<sup>1,3</sup>, Eva Forés<sup>1,3</sup>,  
Marta Itarte<sup>1,3</sup>, Rosina Girones<sup>1,3</sup> and Sílvia Bofill-Mas<sup>1,3</sup>

## Abstract

As the novel SARS-CoV-2 was detected in faeces, environmental researchers have been using centrifugal ultrafiltration, polyethylene glycol precipitation and aluminium hydroxide flocculation to describe its presence in wastewater samples. High recoveries (up to 65%) are described with electronegative filtration when using surrogate viruses, but few literature reports recovery efficiencies using accurate quantification of enveloped viruses. Considering that every single virus will have a different behaviour during viral concentration, it is recommended to use an enveloped virus, and if possible, a betacoronavirus as murine hepatitis virus, as a surrogate. In this review, we show new data from a newly available technology that provides a quick ultrafiltration protocol for SARS-CoV-2. Wastewater surveillance is an efficient system for the evaluation of the relative prevalence of SARS-CoV-2 infections in a community, and there is the need of using reliable concentration methods for an accurate and sensitive quantification of the virus in water.

## Addresses

<sup>1</sup> Section of Microbiology, Virology and Biotechnology, Department of Genetics, Microbiology and Statistics. Faculty of Biology, University of Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>2</sup> GHS, Institute of Environmental Assessment & Water Research (IDAEA), CSIC, Barcelona, Spain

<sup>3</sup> The Water Institute of the University of Barcelona, Spain

Corresponding author: Rusiñol, Marta ([martarusinol@gmail.com](mailto:martarusinol@gmail.com))

Current Opinion in Environmental Science & Health 2020, 17:21–28

This review comes from a themed issue on COVID19

Edited by Avelino Núñez-Delgado

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

<https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.08.002>

2468-5844/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Keywords

Concentration methods, Enveloped virus, SARS-CoV-2, Recovery efficiency, Surrogate virus.

## Introduction

Many viruses that infect humans are excreted in large amounts through faeces, urine or skin desquamation, contributing to wastewater virome. Wastewater is a complex matrix that comprises a large variety of pathogenic and commensal viruses and provides important information about virus circulation, the introduction of emergent viruses and how they are transmitted among the population [1]. Waterborne viruses are generally nonenveloped and excreted in high numbers by infected individuals with or without disease, and in some cases long after the resolution of symptoms [2]. The study of excreted viruses is a very useful tool known as wastewater-based epidemiology, which has the potential to act as a complementary approach for current infectious disease surveillance systems and an early warning system for disease outbreaks [3].

The incidence of emerging microbes is a serious health concern worldwide. The increase of human–livestock contacts [4], population mobility and trade networks [5,6], climate change [7] or the wild meat trade and loss of animal habitats [8] has raised the risk of a global pandemics. Since 1980, nearly 90 novel human pathogen species have been discovered, more than 70 of those corresponded to novel human viruses, that compared to other pathogens have the potential to evolve more rapidly, being 80 of these associated with nonhuman reservoirs [9,10]. Influenza viruses (H1N1, H7N1 and H7N9), human immunodeficiency virus, Ebola virus, coronaviruses as SARS-CoV, MERS and the SARS-CoV-2 causing the COVID-19 pandemic have been the most significant.

SARS-CoV-2 was identified in China at the end of 2019 [11] and has become the first pandemic coronavirus (CoV). After the first case report of the presence of SARS-CoV-2 RNA in faeces [12], and because of the presence in the past of SARS-CoV-1 in faeces and sewage [13–15], the scientific community started to investigate if this virus could spread into the environment. Specific stability of SARS-CoV-2 has only been tested in aerosols and surfaces [16], but it is known that enveloped viruses are capable of retaining infectivity for days to months in aqueous environments [17–19]. On

## Article

# NGS Techniques Reveal a High Diversity of RNA Viral Pathogens and Papillomaviruses in Fresh Produce and Irrigation Water

Marta Itarte <sup>1,2</sup>, Sandra Martínez-Puchol <sup>1,2</sup>, Eva Forés <sup>1,2</sup>, Ayalkibet Hundesa <sup>1,2</sup>, Natàlia Timoneda <sup>3</sup>,  
Sílvia Bofill-Mas <sup>1,2</sup>, Rosina Girones <sup>1,2,\*</sup> and Marta Rusiñol <sup>4</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Viruses Contaminants of Water and Food, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; mitarte@ub.edu (M.I.); smartinezpuchol@ub.edu (S.M.-P.); efores@ub.edu (E.F.); ahundesa@ub.edu (A.H.); sbofill@ub.edu (S.B.-M.)
  - <sup>2</sup> The Water Research Institute (IdRA), University of Barcelona, 08001 Barcelona, Spain
  - <sup>3</sup> Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Science, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 08003 Barcelona, Spain; timoneda@icm.csic.es
  - <sup>4</sup> Institute of Environmental Assessment & Water Research (IDAEA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 08034 Barcelona, Spain; marta.rosinol@idaea.csic.es
- \* Correspondence: rgirones@ub.edu

**Abstract:** Fresh fruits and vegetables are susceptible to microbial contamination at every stage of the food production chain, and as a potential source of pathogens, irrigation water quality is a critical factor. Next-generation sequencing (NGS) techniques have been flourishing and expanding to a wide variety of fields. However, their application in food safety remains insufficiently explored, and their sensitivity requires improvement. In this study, quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assays showed low but frequent contamination of common circulating viral pathogens, which were found in 46.9% of samples of fresh produce: 6/12 lettuce samples, 4/12 strawberries samples, and 5/8 parsley samples. Furthermore, the application of two different NGS approaches, target enrichment sequencing (TES) for detecting viruses that infect vertebrates and amplicon deep sequencing (ADS), revealed a high diversity of viral pathogens, especially Norovirus (NoV) and Human Papillomavirus (HPV), in fresh produce and irrigation water. All NoV and HPV types found in fresh fruit and vegetable samples were also detected in irrigation water sources, indicating that these viruses are common circulating pathogens in the population and that irrigation water may be the most probable source of viral pathogens in food samples.

**Keywords:** organic food; irrigation water; viral pathogens; food safety; next-generation sequencing; target enrichment sequencing; amplicon deep sequencing; human papillomavirus; norovirus; vertebrate viruses



**Citation:** Itarte, M.; Martínez-Puchol, S.; Forés, E.; Hundesa, A.; Timoneda, N.; Bofill-Mas, S.; Girones, R.; Rusiñol, M. NGS Techniques Reveal a High Diversity of RNA Viral Pathogens and Papillomaviruses in Fresh Produce and Irrigation Water. *Foods* **2021**, *10*, 1820. <https://doi.org/10.3390/foods10081820>

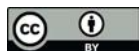
Academic Editor: Dario De Medici

Received: 4 May 2021

Accepted: 31 July 2021

Published: 6 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Consumption and production of fresh fruits and vegetables have increased over the last few years [1] due to population growth, changes in human lifestyles and growing awareness of the benefits of these foods as important sources of nutritional compounds in a healthy and balanced diet [2–4]. This increase in fresh food consumption, often eaten raw or minimally processed, has also been associated with an increase in foodborne infections and disease outbreaks, most of which have been linked to viral origins [2,5,6]. Pathogen contamination can occur at any stage of the food production process, from farm to fork, and irrigation water quality is a critical factor, since it is a potential source of foodborne pathogens [7–10], especially if it comes in direct contact with the edible portion [11]. The microbial quality of irrigation water is affected by a wide range of agricultural, wildlife, and human factors, including: growing season, geographical location, land use, surrounding activities, and environmental conditions [12–14]. Agricultural farms obtain irrigation





## Monitoring waves of the COVID-19 pandemic: Inferences from WWTPs of different sizes



M. Rusiñol<sup>a,1</sup>, I. Zammit<sup>b,c,1</sup>, M. Itarte<sup>d</sup>, E. Forés<sup>d,e</sup>, S. Martínez-Puchol<sup>d,e</sup>, R. Girones<sup>d,e</sup>, C. Borrego<sup>b,c</sup>, I. Corominas<sup>b,c,\*</sup>, S. Bofill-Mas<sup>d,e,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Environmental Assessment & Water Research (IDAEA), CSIC, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Catalan Institute for Water Research (ICRA), Emili Grahit 101, 17003 Girona, Spain

<sup>c</sup> Universitat de Girona, Plaça de Sant Domènec 3, 17004 Girona, Spain

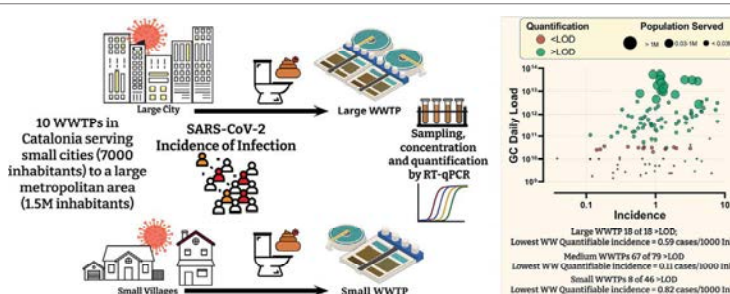
<sup>d</sup> University of Barcelona, Section of Microbiology, Virology and Biotechnology, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> The Water Institute of the University of Barcelona, Spain

### HIGHLIGHTS

- SARS-CoV-2 loads correlate much better than concentrations with infection incidence.
- Higher SARS-CoV-2 loads were measured during the first wave than the second wave.
- Large WWTPs have quantifiable levels at lower infection incidence than small WWTPs.
- Monitoring of small WWTPs is challenging and depends on high COVID-19 incidence.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 March 2021

Received in revised form 27 April 2021

Accepted 27 April 2021

Available online 7 May 2021

Editor: Damia Barcelo

#### Keywords:

Wastewater-based epidemiology

SARS-CoV-2

Pandemic surveillance

Small large WWTPs

Human adenoviruses

JC polyomavirus

### ABSTRACT

Wastewater based epidemiology was employed to track the spread of SARS-CoV-2 within the sewershed areas of 10 wastewater treatment plants (WWTPs) in Catalonia, Spain. A total of 185 WWTPs inflow samples were collected over the period consisting of both the first wave (mid-March to June) and the second wave (July to November). Concentrations of SARS-CoV-2 RNA (N1 and N2 assays) were quantified in these wastewaters as well as those of Human adenoviruses (HAdV) and JC polyomavirus (JCPyV), as indicators of human faecal contamination. SARS-CoV-2 N gene daily loads strongly correlated with the number of cases diagnosed one week after sampling i.e. wastewater levels were a good predictor of cases to be diagnosed in the immediate future. The conditions present at small WWTPs relative to larger WWTPs influence the ability to follow the pandemic. Small WWTPs (<24,000 inhabitants) had lower median loads of SARS-CoV-2 despite similar incidence of infection within the municipalities served by the different WWTP (but not lower loads of HAdV and JCPyV). The lowest incidence resulting in quantifiable SARS-CoV-2 concentration in wastewater differed between WWTP sizes, being 0.11 and 0.82 cases/1000 inhabitants for the large and small sized WWTP respectively.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Correspondence to: L. Corominas, Universitat de Girona, Plaça de Sant Domènec 3, 17004 Girona, Spain.

\*\* Correspondence to: S. Bofill-Mas, The Water Institute of the University of Barcelona, Spain.

E-mail addresses: [lcorminas@icra.cat](mailto:lcorminas@icra.cat) (L. Corominas), [sbofill@ub.edu](mailto:sbofill@ub.edu) (S. Bofill-Mas).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work and share first authorship.

### 1. Introduction

The COVID-19 pandemic, caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), went from a local issue in China to a truly global threat to human health, wellbeing and the



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv)

## Exploring the diversity of coronavirus in sewage during COVID-19 pandemic: Don't miss the forest for the trees



Sandra Martínez-Puchol<sup>a,b,\*</sup>, Marta Itarte<sup>a,b</sup>, Marta Rusiñol<sup>c</sup>, Eva Forés<sup>a,b</sup>, Cristina Mejías-Molina<sup>a</sup>, Cristina Andrés<sup>d</sup>, Andrés Antón<sup>d</sup>, Josep Quer<sup>e</sup>, Josep F. Abril<sup>f</sup>, Rosina Girones<sup>a,b</sup>, Sílvia Bofill-Mas<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Viruses Contaminants of Water and Food, Genetics, Microbiology & Statistics Dept., Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>b</sup> The Water Research Institute (IdRA), Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>c</sup> Institute of Environmental Assessment & Water Research (IDAEA), CSIC, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>d</sup> Respiratory Viruses Unit, Virology Section, Microbiology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

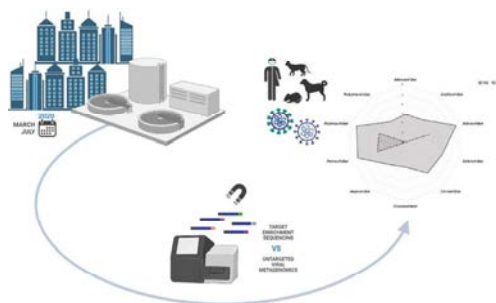
<sup>e</sup> Liver Unit, Liver Diseases - Viral Hepatitis, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

<sup>f</sup> Computational Genomics Lab, Genetics, Microbiology & Statistics Dept., Universitat de Barcelona; Institut de Biomedicina (IBUB), Barcelona, Catalonia, Spain

### HIGHLIGHTS

- NGS methods have been applied to study the sewage virome during COVID-19 pandemic.
- *Coronaviridae* sequences were not detected in sewage using untargeted metagenomics.
- Target Enrichment provided with SARS-CoV-2 sequences as part of the sewage virome.
- Human and animal CoV co-circulation in sewage only detected with Target Enrichment.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 June 2021

Received in revised form 5 August 2021

Accepted 6 August 2021

Available online 9 August 2021

#### Keywords:

Next generation sequencing

Viral metagenomics

Coronavirus

Sewage virome

Target enrichment sequencing

### ABSTRACT

In the wake of the COVID-19 pandemic, the use of next generation sequencing (NGS) has proved to be an important tool for the genetic characterization of SARS-CoV-2 from clinical samples. The use of different available NGS tools applied to wastewater samples could be the key for an in-depth study of the excreted virome, not only focusing on SARS-CoV-2 circulation and typing, but also to detect other potentially pandemic viruses within the same family. With this aim, 24-hours composite wastewater samples from March and July 2020 were sequenced by applying specific viral NGS as well as target enrichment NGS. The full virome of the analyzed samples was obtained, with human *Coronaviridae* members (CoV) present in one of those samples after applying the enrichment. One contig was identified as HCoV-OC43 and 8 contigs as SARS-CoV-2. CoVs from other animal hosts were also detected when applying this technique. These contigs were compared with those obtained from contemporary clinical specimens by applying the same target enrichment approach. The results showed that there is a co-circulation in urban areas of human and animal coronaviruses infecting domestic animals and rodents. NGS enrichment-based protocols might be crucial to describe the occurrence and genetic characteristics of SARS-CoV-2 and other *Coronaviridae* family members within the excreted virome present in wastewater.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Corresponding author at: Laboratory of Viruses Contaminants of Water and Food, Genetics, Microbiology & Statistics Dept., Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain.  
E-mail address: [smartinezpuchol@ub.edu](mailto:smartinezpuchol@ub.edu) (S. Martínez-Puchol).

## Looking for a needle in a haystack. SARS-CoV-2 variant characterization in sewage

Marta Itarte<sup>1,2</sup>, Sílvia Bofill-Mas<sup>1,2</sup>, Sandra Martínez-Puchol<sup>1,2</sup>, Helena Torrell<sup>3</sup>, Adrià Ceretó<sup>3</sup>, Marina Carrasco<sup>1</sup>, Eva Forés<sup>1,2</sup>, Núria Canela<sup>3</sup>, Rosina Girones<sup>1,2</sup> and Marta Rusiñol<sup>4</sup>

### Abstract

SARS-CoV-2 variants are emerging worldwide, and monitoring them is key in providing early warnings. Here, we summarize the different analytical approaches currently used to study the dissemination of SARS-CoV-2 variants in wastewater and discuss their advantages and disadvantages. We also provide preliminary results of two sensitive and cost-effective approaches: variant-specific reverse transcription-nested PCR assays and a nonvariant-specific amplicon deep sequencing strategy that targets three key regions of the viral spike protein. Next-generation sequencing approaches enable the simultaneous detection of signature mutations of different variants of concern in a single assay and may be the best option to explore the real picture at a particular time. Targeted PCR approaches focused on specific signature mutations will need continuous updating but are sensitive and cost-effective.

### Addresses

<sup>1</sup> Laboratory of Viruses Contaminants of Water and Food, Genetics, Microbiology & Statistics Department at the University of Barcelona (UB), Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>2</sup> The Water Research Institute (IdRA), Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>3</sup> Eurecat, Centre Tecnològic de Catalunya, Centre for Omic Sciences (COS), Joint Unit Universitat Rovira i Virgili-EURECAT, Unique Scientific and Technical Infrastructures (ICTS), Reus, Spain

<sup>4</sup> Institute of Environmental Assessment & Water Research (IDAEA), CSIC, Barcelona, Catalonia, Spain

Corresponding author: Rusiñol, Marta ([marta.rosinol@idaea.csic.es](mailto:marta.rosinol@idaea.csic.es))

Current Opinion in Environmental Science & Health 2021, 24:100308

This review comes from a themed issue on **COVID-19 in environment: Treatment, Infectivity, Monitoring, Estimation**

Edited by **Manish Kumar, Ryo Honda, Prosun Bhattacharya, Dan Snow** and **Payal Mazumder**

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

<https://doi.org/10.1016/j.coesh.2021.100308>

2468-5844/© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### Keywords

SARS-CoV-2, Variants of concern (VOCs), Variants of interest (VOIs), Signature mutations, Wastewater-based epidemiology (WBE), Next-generation sequencing (NGS).

### Introduction

Wastewater surveillance for SARS-CoV-2 has proved to be useful in monitoring the evolution of the COVID-19 pandemic. However, new emerging variants are posing new challenges. The SARS-CoV-2 variants  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  (also known as lineages B.1.1.7, B.1.351, P.1 and B.1.617.2, respectively) were first detected in the United Kingdom, South Africa, Brazil and India, respectively, and were immediately considered to be variants of concern (VOCs). Such variants, which have been associated with the fluctuations seen with the pandemic waves, possess mutations that affect viral infectivity and antigenicity. These mutations are mainly located in the gene encoding the viral spike (S) protein. In particular, mutations leading to the E484K and N501Y substitutions within the receptor-binding domain of the S protein have been demonstrated to give the S protein a greater affinity for the human ACE2 receptor [13]. The commonly applied PCR methods used to quantify the concentration of the virus in environmental samples use specific primers and probes targeting the nucleocapsid (N), envelope (E) or RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) regions. However, as stated above, the VOCs and the new variants of interest (VOIs) have most of their signature mutations within the S gene. [Figure 1](#) summarizes the signature mutations identified in each VOC and VOI.

Although the combination of genome sequence analysis of samples from COVID-19 patients with epidemiological datasets has produced reliable assessments of the extent of SARS-CoV-2 transmission in the community [22], the time lag between infection and symptoms and the future decrease in sequencing will add further delays compared to the expected immediacy of the results from wastewater surveillance. At the beginning of October 2020, several new SARS-CoV-2 variants started to circulate globally [7]. At that moment, the minimum number of clinical samples that had to be sequenced to find the  $\alpha$  variant was 400, assuming that only 5% of the positive clinical samples had been sequenced and that the prevalence of this VOC in the population was 5% [20]. Thus, the analysis of SARS-CoV-2 genomes sequenced from clinical



OPEN

# The Catalan Surveillance Network of SARS-CoV-2 in Sewage: design, implementation, and performance

Laura Guerrero-Latorre<sup>1,2,14</sup>, Neus Collado<sup>1,2,14</sup>, Nerea Abasolo<sup>3</sup>, Gabriel Anzaldí<sup>4</sup>, Sílvia Bofill-Mas<sup>5</sup>, Albert Bosch<sup>6,7</sup>, Lluís Bosch<sup>1,2</sup>, Sílvia Busquets<sup>1,2</sup>, Antoni Caimari<sup>8</sup>, Núria Canela<sup>3</sup>, Albert Carcereny<sup>6,7</sup>, Carme Chacón<sup>9</sup>, Pilar Ciruela<sup>9</sup>, Irene Corbella<sup>9</sup>, Xavier Domingo<sup>4</sup>, Xavier Escoté<sup>10</sup>, Yaimara Espiñeira<sup>4</sup>, Eva Forés<sup>5</sup>, Isabel Gandullo-Sarró<sup>11</sup>, David García-Pedemonte<sup>6,7</sup>, Rosina Girones<sup>5</sup>, Susana Guix<sup>6,7</sup>, Ayalkibet Hundesa<sup>5</sup>, Marta Itarte<sup>5</sup>, Roger Mariné-Casadó<sup>10</sup>, Anna Martínez<sup>9</sup>, Sandra Martínez-Puchol<sup>5</sup>, Anna Mas-Capdevila<sup>10</sup>, Cristina Mejías-Molina<sup>5</sup>, Marc Moliner i Rafa<sup>11</sup>, Antoni Munné<sup>11</sup>, Rosa Maria Pintó<sup>6,7</sup>, Josep Pueyo-Ros<sup>1,2</sup>, Jordi Robusté-Cartró<sup>11</sup>, Marta Rusiñol<sup>12</sup>, Robert Sanfeliu<sup>4</sup>, Joan Teichenné<sup>10</sup>, Helena Torrell<sup>3</sup>, Lluís Corominas<sup>1,2</sup> & Carles M. Borrego<sup>1,13</sup>✉

Wastewater-based epidemiology has shown to be an efficient tool to track the circulation of SARS-CoV-2 in communities assisted by wastewater treatment plants (WWTPs). The challenge comes when this approach is employed to help Health authorities in their decision-making. Here, we describe the roadmap for the design and deployment of SARSIGUA, the Catalan Surveillance Network of SARS-CoV-2 in Sewage. The network monitors, weekly or biweekly, 56 WWTPs evenly distributed across the territory and serving 6 M inhabitants (80% of the Catalan population). Each week, samples from 45 WWTPs are collected, analyzed, results reported to Health authorities, and finally published within less than 72 h in an online dashboard (<https://sarsaigua.icra.cat>). After 20 months of monitoring (July 20–March 22), the standardized viral load (gene copies/day) in all the WWTPs monitored fairly matched the cumulative number of COVID-19 cases along the successive pandemic waves, showing a good fit with the diagnosed cases in the served municipalities (Spearman Rho = 0.69). Here we describe the roadmap of the design and deployment of SARSIGUA while providing several open-access tools for the management and visualization of the surveillance data.

Shortly after the onset of the outbreak of the current COVID-19 pandemic, scientists renewed their interest in the application of wastewater-based epidemiology (WBE)<sup>1</sup> to track the communal circulation of SARS-CoV-2 through the quantification of its genetic traces in sewage<sup>2</sup>. This resulted in an overwhelming number of

<sup>1</sup>Catalan Institute for Water Research (ICRA), Emili Grahit 101, 17003 Girona, Catalonia, Spain. <sup>2</sup>Universitat de Girona, 17003 Girona, Catalonia, Spain. <sup>3</sup>Centre for Omic Sciences (COS), Joint Unit Universitat Rovira i Virgili-EURECAT, Unique Scientific and Technical Infrastructures (ICTS), Eurecat, Centre Tecnològic de Catalunya, Avinguda Universitat 1, 43204 Reus, Catalonia, Spain. <sup>4</sup>Applied Artificial Intelligence Technological Unit, Eurecat, Centre Tecnològic de Catalunya, Science and Technology Park, H3, 25003 Lleida, Catalonia, Spain. <sup>5</sup>Laboratory of Viruses Contaminants of Water and Food, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, School of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain. <sup>6</sup>Enteric Virus Laboratory, Section of Microbiology, Virology and Biotechnology, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, School of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain. <sup>7</sup>Research Institute of Nutrition and Food Safety (INSA), University of Barcelona, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Catalonia, Spain. <sup>8</sup>Biotechnology Area, Eurecat, Centre Tecnològic de Catalunya, Avinguda Universitat 1, 43204 Reus, Catalonia, Spain. <sup>9</sup>Public Health Agency of Catalonia (ASPCAT), Roc Boronat 81-95, 08005 Barcelona, Catalonia, Spain. <sup>10</sup>Technological Unit of Nutrition and Health, Eurecat, Centre Tecnològic de Catalunya, Avinguda Universitat 1, 43204 Reus, Catalonia, Spain. <sup>11</sup>Catalan Water Agency (ACA), Provença, 260, 08008 Barcelona, Catalonia, Spain. <sup>12</sup>Institute of Environmental Assessment & Water Research (IDAEA), CSIC, Barcelona, Catalonia, Spain. <sup>13</sup>Group of Molecular Microbial Ecology, Institute of Aquatic Ecology, University of Girona, 17003 Girona, Catalonia, Spain. <sup>14</sup>These authors contributed equally: Laura Guerrero-Latorre and Neus Collado. ✉email: cborrego@icra.cat

