



# Nuevos métodos para proteger la salud de los europeos ante potenciales patógenos del agua potable

Una cuarentena de pequeñas y medianas empresas (pymes), otras compañías, universidades e institutos de investigación de Europa han trabajado conjuntamente para mejorar la detección de patógenos en aguas de consumo. Aigües de Barcelona y Cetaqua (Centro Tecnológico del Agua) presentan los resultados del estudio llevado a cabo en Barcelona tras un año de monitorización en la planta potabilizadora de Sant Joan Despí y la red de distribución. Las metodologías desarrolladas mejoran la sensibilidad y reducen el tiempo de detección de patógenos como virus, bacterias y protozoos en aguas de consumo y en el agua utilizada en el procesado de alimentos. Constituyen, además, estrategias de vigilancia de la seguridad del agua que ayudarán adoptar los Planes Sanitarios del Agua que deben implantarse en España de acuerdo con el nuevo RD 902/2018.

### Palabras clave

Patógenos, agua potable, PCR, FISH, ultrafiltración, red de distribución.

### NEW METHODS TO PROTECT DE EUROPEAN CITIZEN'S HEALTH AGAINST POTENTIAL PATHOGENS IN DRINKING WATER

*More than 40 small and medium enterprises (SME), companies, universities and research institutes in Europe have joined together in an initiative to improve the detection of pathogens in drinking water. Aigües de Barcelona and Cetaqua (Water Technology Centre) present the results of a study conducted in Barcelona, after one year of monitoring at the Sant Joan Despí drinking water treatment plant (DWTP) and the distribution network, analyzing viruses, bacteria and protozoa. The developed methodologies improve sensitivity and detection time for these pathogens in drinking water and in water used in food processing. They also constitute strategies for monitoring water safety that will allow adopting Water Safety Plans that must be implemented in Spain according to the new regulation RD 902/2018.*

### Keywords

*Pathogens, drinking water, PCR, FISH, ultrafiltration, distribution network.*

### Clàudia Puigdomènech Serra

project manager en Cetaqua  
(Centro Tecnológico del Agua)

### Susana González Blanco

responsable del Área de Calidad  
de Cetaqua (Centro Tecnológico  
del Agua)

### Gemma Saucedo

técnica del Área de Microbiología  
de Aigües de Barcelona

### Belén Galofré

responsable del Área de Microbiología  
de Aigües de Barcelona

### Albert Bosch

catedrático del Departamento de  
Genética, Microbiología y Estadística,  
Laboratorio de Virus Entéricos  
de la Universitat de Barcelona



## 1. INTRODUCCIÓN: PROBLEMÁTICA

Desde la introducción de la desinfección del agua en Europa a principios del siglo XX, la transmisión de enfermedades a través de este medio se ha reducido considerablemente. Además, las tecnologías de tratamiento de agua destinada al consumo han evolucionado hacia un enfoque de barreras múltiples para una mayor seguridad del agua suministrada a la población. A pesar de todas las medidas aplicadas para proporcionar agua de consumo de calidad apropiada y segura, puntualmente aparecen brotes transmitidos por el agua que causan enfermedades producidas por virus, bacterias y protozoos.

La Directiva 98/83/CE del Consejo, de 3 de noviembre de 1998, sobre la calidad del agua destinada al consumo humano, establecía que el agua de consumo debería estar exenta de microorganismos patógenos y parásitos, en cantidades que puedan poner en peligro la salud humana. El agua, al igual que el resto del ambiente, no es estéril, por lo que su calidad microbiológica debe ser monitoreada y controlada adecuadamente. Esta depende de la calidad del agua de origen, de los procesos de tratamiento y desinfección y de las características del sistema de distribución de agua, que deben ser las adecuadas para evitar rebrotes microbianos.

Por lo tanto, la monitorización microbiológica es importante tanto en el agua producida en la planta de tratamiento y algunos puntos en la red de distribución, así como en puntos críticos de control, ya que son un elemento clave para garantizar la seguridad microbiana.

Las técnicas actuales de monitorización, definidas en la misma directi-

va europea, se basan en técnicas de cultivo para la detección y recuento de únicamente para bacterias (excluyendo virus y protozoos) y fijan un determinado volumen para los diferentes parámetros (1 o 100 mL). Usando estas técnicas puede llegar a obtenerse un resultado entre 18 y 72 horas, con una sensibilidad y una representatividad limitadas debido a los bajos volúmenes de muestra utilizados (máximo de 100 mL).

Teniendo en cuenta estas limitaciones, nació el proyecto europeo FP7-Aquavalens: Proteger la salud

» Los métodos para la detección de patógenos e indicadores transmitidos por el agua desarrollados y validados en el proyecto Aquavalens se basan en técnicas de PCR y en la tecnología FISH

de los europeos mejorando los métodos de detección de patógenos en el agua potable y el agua usada en la preparación de alimentos ([www.aquavalens.org](http://www.aquavalens.org)). El proyecto tuvo una duración de 5 años y estuvo formado por un equipo multidisciplinar de más de 40 socios, entre ellos universidades, pequeñas y medianas empresas, centros tecnológicos y operadoras de agua potable. Aigües de Barcelona y Cetaqua (Centro Tecnológico del Agua, cofundado por esta empresa junto con el CSIC y la Universitat Politècnica de Catalunya) participaron liderando las tareas demostrativas de la aplicación de las técnicas desarrolladas en situaciones reales.

## 2. TÉCNICAS DESARROLLADAS Y APLICADAS

A continuación se detallan las técnicas desarrolladas seleccionadas para la fase demostrativa de implementación sobre el terreno en los casos de estudio y según los criterios elegidos.

### 2.1. TÉCNICAS DE CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA

Para la determinación de patógenos en agua potable o en procesos de potabilización, como son los virus o los protozoos, es necesario el uso de filtros específicos para poder concentrar grandes volúmenes de agua y así tener una muestra más representativa.

Así mismo, la mayoría de las nuevas herramientas analíticas, especialmente las técnicas moleculares como la PCR (*Polymerase Chain Reaction* o reacción en cadena de la polimerasa), tienen límites de detección bastante altos, ya que el volumen analizado es muy pequeño, haciéndose relevante la necesidad de mejora mediante el uso de algún método de preconcentración de la muestra. Las limitaciones principales de dichos filtros concentradores son los siguientes:

- Son necesarios diferentes filtros según reino microbiano (protozoos, virus, bacterias).
- Las recuperaciones suelen ser bajas.
- Coste económico elevado.

El filtro concentrador seleccionado para el proyecto fue el Rexeed de ultrafiltración sin salida, filtro comercial usado en el ámbito clínico para la realización de hemodiálisis. Las principales ventajas de este filtro son:

- Capacidad para concentrar hasta 1.000 L de agua potable.
- Capacidad para concentrar los tres reinos microbianos en un solo filtro (virus, bacterias y protozoos).
- Es comercial, hecho que garantiza una preparación estandarizada.

Dentro del marco del proyecto se desarrolló un protocolo para poder utilizar el filtro Rexeed como primera concentración, pudiendo concentrar hasta 1.000 L, eluidos posteriormente hasta un volumen de entre 400 y 700 mL (**Figura 1**). Esta fase fue seguida de una segunda concentración, utilizando el filtro por centrifugación comercial Centricon, reduciendo el volumen inicial del eluado a unos 5 mL. Finalmente se procedió a la extracción de ácidos nucleídos con el kit Nuclisens de Biomerieux, para la realización de las técnicas moleculares avanzadas.

## 2.2. TÉCNICAS DE DETECCIÓN MOLECULARES

Una de las principales limitaciones de las técnicas de cultivo para la detección de patógenos en agua de consumo es el tiempo necesario para obtener un resultado, que suele oscilar entre 1 y 3 días. Este tiempo puede resultar demasiado largo para una correcta y óptima gestión del riesgo microbiológico en un abastecimiento.

Las técnicas moleculares avanzadas permiten detectar y cuantificar un amplio abanico de patógenos de una manera rápida (4-5 horas para obtener un resultado). Por el contrario, sigue siendo necesaria una etapa de concentración para conseguir una buena sensibilidad y no son técnicas aceptadas por la legislación actual.

Los métodos para la detección de patógenos e indicadores transmitidos por el agua que fueron desarrollados y evaluados en el proyecto

**FIGURA 1.** Elución del filtro Rexeed en los laboratorios de Aigües de Barcelona. Fuente: Aigües de Barcelona.



Aquavalens, se basan en técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y en la tecnología de hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH): GPS (<http://www.geneticpcr.com>) y Ceeram (<http://www.biomerieux-industry.com/food/ceeramtools-virus-pcr-detection-kits>) produjeron kits qPCR, mientras que Vermicon (<https://www.vermicon.com/>) produjo kits para la técnica de FISH.

Los parámetros que se desarrollaron y evaluaron en los casos de estudio fueron los siguientes:

- Bacterias analizadas por qPCR: *Salmonella spp.*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter spp.* (*Campylobacter jejuni*) y *E. coli*.
- Bacterias medidas por FISH: *Campylobacter spp.* (*Campylobac-*

*ter jejuni*) y *E. coli*, recuento total de células (TCC del inglés *Total Cell Counts*) y recuento de microorganismos viables (TVC, del inglés *Total-Viable Counts*).

- Virus medidos por qPCR: Norovirus genogrupo I, Norovirus genogrupo II, virus hepatitis A.

- Protozoos medidos por qPCR: *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Toxoplasma*.

## 3. CASO DE ESTUDIO DE BARCELONA

Para evaluar las diferentes tecnologías descritas anteriormente, se seleccionaron casos de estudio que incluyeron diversos sistemas de tratamiento y distribución de agua en diferentes países europeos (Alemania, Dinamarca, Inglaterra y España), seleccionados por sus diferencias



climáticas, sistemas de desinfección del agua de consumo, tipo de captación, etc.

En cada uno de los casos de estudio se evaluaron los diferentes procesos de las estaciones de tratamiento de agua potable (ETAP) -entrada planta, fases intermedias tratamiento, agua tratada y posibles eventos- y puntos de la red de distribución, poniendo especial énfasis en posibles incidencias, puntos muertos, limpiezas de depósitos o agua comprada a terceros.

En el caso de estudio concreto de Barcelona se tomaron muestras de la ETAP de Sant Joan Despí (ETAP SJD) y de la red de distribución de Barcelona. Sus principales características se describen en la **Tabla 1**.

### 3.1. ETAP

Se realizaron muestreos mensuales en 4 puntos de la ETAP de Sant Joan Despí durante un año: captación, después del filtro de arena, después del filtro de carbón activo granulado y en el depósito de postcloración de salida de la ETAP

TABLA 1	
INFORMACIÓN SOBRE LA ETAP DE SANT JOAN DESPÍ Y LA RED DE DISTRIBUCIÓN.	
<b>ETAP Sant Joan Despí</b>	
Localización	Sant Joan Despí (Barcelona)
Cuenca del río Llobregat (km <sup>2</sup> )	4.948,3
Agua tratada por año (hm <sup>3</sup> /año) según datos de 2017	100
Tipo de captación	Agua superficial y agua subterránea
Tipo de tratamiento	Coagulación floculación, filtro de arena, ozonización con filtro de carbón, ultrafiltración con ósmosis inversa
<b>Red de distribución de Barcelona</b>	
Número de depósitos	69
Longitud (km)	4.624
Desinfección	Hipoclorito de sodio
Capacidad de almacenamiento (m <sup>3</sup> )	248.623

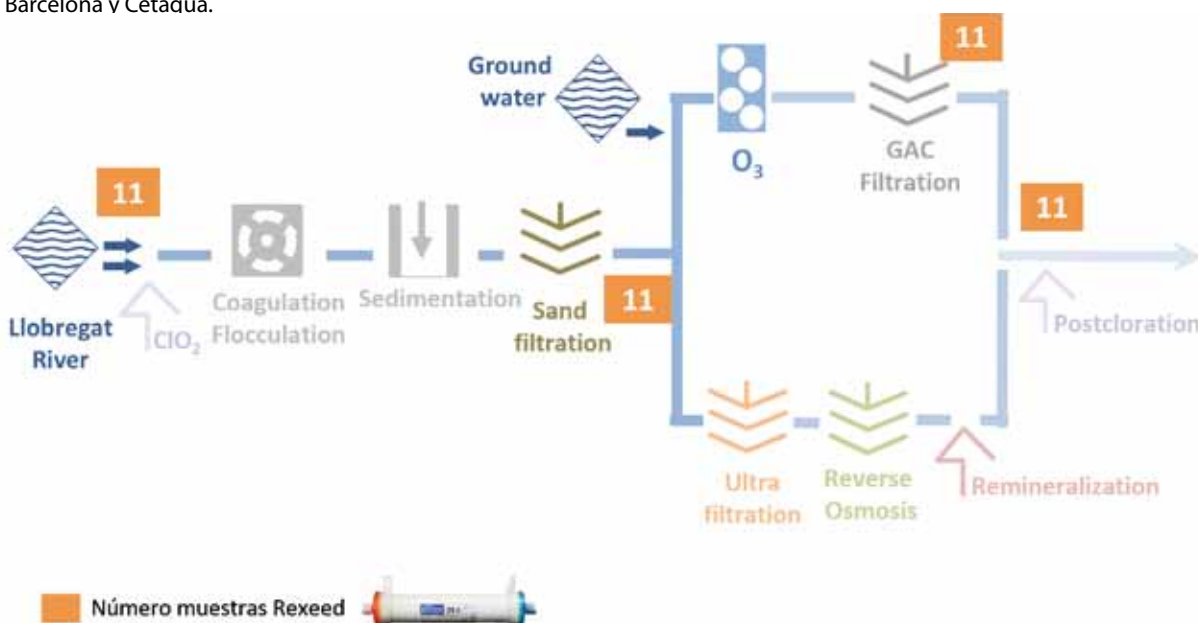
(Figura 2), así como durante varios eventos en el tratamiento como incidencias microbiológicas, puestas en marcha de la captación del agua superficial y diferentes operaciones en planta (limpieza de filtros de carbón, o mantenimiento de la línea de ultrafiltración seguida de ósmosis inversa -UF + OI-).

### 3.2. RED DE DISTRIBUCIÓN

Se muestrearon mensualmente durante un año 4 puntos estratégicos:

- Depósito de Castelldefels: recibe agua únicamente procedente de la salida de la ETAP SJD.
- Depósito de Can Ruti: recibe agua de una ETAP con tratamiento y

**FIGURA 2.** Esquema de la ETAP de Sant Joan Despí, indicando el número de muestreos con Rexeed realizados. Fuente: Aigües de Barcelona y Cetaqua.



**FIGURA 3.** Esquema del protocolo a realizar y patógenos a analizar en una muestra. Fuente: Cetaqua y Aigües de Barcelona. En naranja, métodos de verificación. En verde, métodos desarrollados en el proyecto Aquavalens.



origen de agua diferentes a la ETAP SJD (gestionada por una empresa distinta a Aigües de Barcelona).

- Central de bombeo de Collblanc: punto de muestro que puede recibir agua de los dos orígenes anteriores.
- Depósito de Rellu: puede recibir agua de los dos orígenes (ETAP SJD y ETAP comentada en Depósito de Can Ruti), además de agua precedente de la estación desalinizadora de El Prat.

En cuanto a los eventos, se tomaron muestras durante sucesos tales como positividades microbiológicas en la red de distribución, un intrusismo en un depósito (perteneciente a otro abastecimiento) o limpiezas de depósitos, así como en puntos muertos (zonas de baja renovación de agua).

#### 4. PLAN ANALÍTICO

Se analizaron un total de 110 muestras, siguiendo el esquema que se puede ver en la **Figura 3**. En cada una de las muestras se analizaron los patógenos descritos en el punto 2.2. (técnicas de detección moleculares). Estas mismas muestras se analizaron mediante técnicas tradicionales, con

el objetivo de comparar y evaluar los diferentes métodos, su recuperación, sensibilidad, etc.

Por lo que se refiere a estas muestras de verificación se realizaron, en función del microorganismo:

- Bacterias: muestras de verificación por cultivo.
- Protozoos: muestras de verificación por técnica de separación inmunomagnética (IMS), seguido por microscopía de fluorescencia.
- Virus: muestras de verificación por qPCR, evaluando un filtro concentrador diferente, con la participación de la Universidad de Barcelona.

Todas las verificaciones se realizaron mediante métodos acreditados o verificados por parte de personal altamente cualificado.

#### 5. RESULTADOS

Los principales resultados se describen a continuación. Los datos de PCR se expresan en copias genómicas/L (CG), los datos de FISH en recuento de células/L y los datos de verificación se expresan en número más probable por litro (NMP/L).

#### 5.1. COMPARACIÓN ENTRE MUESTRAS CONCENTRADAS MEDIANTE REXEED Y MUESTRAS DIRECTAS

El uso de muestra concentrada con Rexeed permite aumentar la sensibilidad de cualquier metodología, ya sean técnicas de biología molecular avanzada o técnicas de cultivo tradicional. En la **Tabla 2** se muestran los resultados del ensayo de coliformes totales mediante técnica Colilert, utilizando 100 mL de la muestra directa y utilizando 100 mL de la muestra concentrada. El aumento de la sensibilidad pasa de un 2,5% a un 25% de muestras positivas.

Destacar que todos los resultados están por debajo del valor paramétrico del RD140/2003, pero el incremento de sensibilidad permite conocer a qué puntos, a pesar de cumplir con la legislación, se les tiene que prestar mayor atención por presentar un riesgo de contaminación más elevado.

Por ejemplo, se ha modificado la programación de limpiezas en un depósito tras una serie de positivos únicamente detectados con con-



TABLA 2

**COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS POR DETECCIÓN MEDIANTE CULTIVO DE LAS MUESTRAS CONCENTRADAS CON REXEED Y MUESTRAS DIRECTAS (SIN CONCENTRACIÓN) DE LA RED DE DISTRIBUCIÓN.**

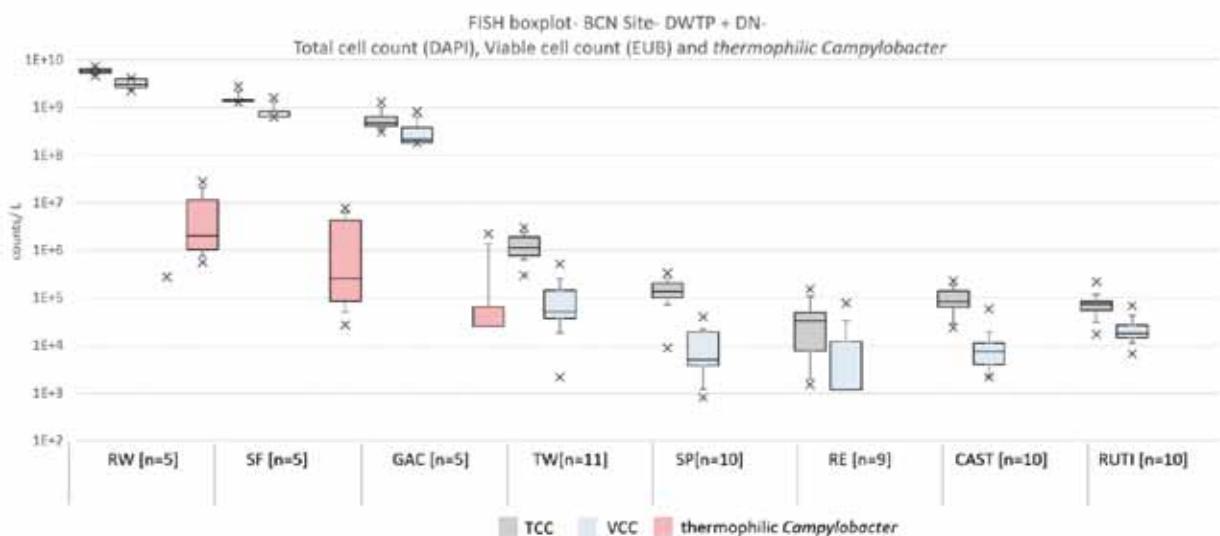
Fecha	Muestra de eluado de Rexeed				Muestra directa			
	Bombeo Collblanc	Depósito Relleu	Depósito Castelldefels	Depósito Can Ruti	Bombeo Collblanc	Depósito Relleu	Depósito Castelldefels	Depósito Can Ruti
08/2016	0	0	0	0	0	0	0	0
09/2016	<b>0,0013</b>	0	<b>0,16</b>	0	0	0	<b>1</b>	0
10/2016	0	0	<b>0,04</b>	0	0	0	0	0
11/2016	<b>0,0007</b>	0	<b>0,005</b>	<b>0,17</b>	0	0	0	0
12/2016	0	0	0	0	0	0	0	0
01/2017	0	0	0	<b>0,002</b>	0	0	0	0
02/2017	-	-	-	-	-	-	-	-
03/2017	0	0	<b>0,06</b>	0	0	0	0	0
04/2017	0	0	0	0	0	0	0	0
05/2017	<b>0,004</b>	0	<b>0,003</b>	-	0	0	0	0
06/2017	0	-	<b>0,5</b>	-	-	-	-	-
07/2017	0	0	0	0	0	0	0	0

TABLA 3

**PORCENTAJES DE POSITIVIDAD DE LAS MUESTRAS REALIZADAS EN LA ETAP Y LA RED DE DISTRIBUCIÓN, CONCENTRADAS MEDIANTE FILTROS REXEED + CENTRICON Y POSTERIOR DETECCIÓN POR PCR.**

Patógenos analizados		Muestras positivas en la ETAP (%)				Muestras positivas en la red de distribución (%)				Número de analíticas (n)
		RW	SF	GAC	TW	SP	RLL	CAS	CNR	
Virus (GC/L)	NoV GI	73	82	27	0	0	9	0	0	88
	NoV GII	73	64	18	0	9	0	9	0	88
	HAV	9	0	0	0	0	0	0	0	88
Bacterias (GC/L)	<i>E.coli</i>	100	91	82	9	0	0	9	0	88
	<i>Campylobacter</i>	89	44	44	0	0	0	0	0	72
	<i>Salmonella</i>	0	0	20	0	0	0	0	0	40
	<i>L.pneumophila</i>	14	14	71	0	0	0	0	0	28
	<i>P.aeruginosa</i>	0	20	40	0	0	0	0	0	40
Protozoos (GC/L)	<i>G.intestinalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	40
	<i>Cryptosporidium</i>	29	14	0	0	0	14	0	0	56
	<i>T.gondii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	16
Número total de analíticas										<b>644</b>

**FIGURA 4.** Boxplot de los resultados obtenidos de las muestras realizadas en la ETAP y la red de distribución, concentradas mediante filtros Rexeed + Centricon y posterior detección por FISH.



centraciones de grandes volúmenes que ha permitido controlar el posible riesgo.

## 5.2. DETECCIÓN POR PCR

Como se ha comentado anteriormente, se realizó un elevado número de analíticas durante un año en la ETAP SJD y la red de distribución de Barcelona. En concreto se llevaron a cabo 696 controles de diferentes patógenos mediante PCR, correspondientes a muestras concentradas con Rexeed y Centricon.

En la **Tabla 3** se puede observar cómo el porcentaje de positivos de los patógenos analizados disminuye a medida que se avanza en la línea de tratamiento de potabilización, evidenciando la eficiencia en el mismo.

El agua cruda y los primeros procesos de la ETAP SJD tienen un porcentaje de positivos elevado comparado con la red de distribución, donde el porcentaje de positivos se sitúa próximo a cero o en cero.

En cuanto a valores numéricos, el rango de valores positivos oscila (en valores promedio) entre -0,83 y

4,01 logs de copias genómicas/L en la ETAP SJD, mientras que en la red de distribución los valores positivos quedaron en un rango de -0,53 a 2,10 logs de copias genómicas/L. Los valores en la red de distribución son muy bajos, demostrando la efectividad de tratamiento por reducción logarítmica.

Cabe destacar que estos resultados corresponden a valores genómicos, por lo que no representan la viabilidad de los patógenos. Además, hay que tener en cuenta que no son analíticas exigidas en la legislación actual, con filtración de grandes volúmenes, pero que esta información acerca de la calidad del agua de consumo y su tratamiento aporta un nuevo conocimiento sobre la efectividad del proceso de tratamiento y de las desinfecciones en la red de distribución.

## 5.3. DETECCIÓN POR FISH

Los resultados de FISH para el recuento total de células (TCC), para el recuento de bacterias viables (TVC) y para el patógeno *Campylobacter* se presentan en la **Figura 4**. Las mues-

tras corresponden a la ETAP SJD y la Red de distribución, concentradas mediante Rexeed y Centricon. Se realizaron 65 análisis, número inferior a las de PCR debido a que para poder obtener un recuento óptimo se debe realizar un ajuste de volumen de muestras.

En la **Figura 4** se puede ver cómo los resultados TVC y TCC permiten observar los logaritmos de eliminación de microorganismos en la ETAP y verificar el mantenimiento en la red de distribución, obteniéndose valores muy bajos y constantes gracias al efecto de los puntos de re-cloración. Además, el efecto de la cloración se muestra al ver que la diferencia entre TCC y TVC es más marcada en el agua de red, siendo las TVC menores a las TCC. En cambio, en las primeras etapas de tratamiento no hay diferencias marcadas entre los valores de TCC y TVC.

Los resultados de microorganismos específicos como el *Campylobacter* se manifiestan en valores elevados en el agua cruda y primeros tratamientos de la ETAP y van disminuyendo a medida que avanza



» En el marco del proyecto Aquavalens, Cetaqua y Aigües de Barcelona han validado protocolos que permiten concentrar *in situ* grandes volúmenes de agua potable, evitando problemas de transporte de la muestra, así como la concentración simultánea de virus, bacterias y protozoos, además de desarrollar nuevas técnicas moleculares para la detección de patógenos. Estas innovaciones permiten un mayor control microbiológico de los procesos de potabilización y sobre el agua potable que se suministra a la población

el proceso de potabilización. Estos desaparecen a partir del tratamiento de filtros de carbón activo granular, no encontrándose en ninguno de los puntos de la red de distribución. Mencionar que la concentración de patógenos específicos es mucho menor que la concentración de recuento tanto de microorganismos totales como de viables.

## 6. CONCLUSIONES

En el marco del proyecto Aquavalens, Cetaqua y Aigües de Barcelona -empresa con experiencia en validación y estandarización de metodologías de control de calidad, así como en implementación de Planes Sanitarios del Agua (PSA o WSP)- han validado protocolos que permiten concentrar *in situ* grandes volúmenes de agua potable, evitando problemas de transporte de la muestra, así como la concentración simultánea de virus, bacterias y protozoos. También se han desarrollado nuevas técnicas moleculares para la detección de patógenos. Estas innovaciones hacen posible reducir el tiempo requerido y mejorar la sensibilidad en la detección de estos patógenos. Por lo tanto, permiten un mayor control microbiológico de los procesos de potabilización y sobre el agua potable que se suministra a la población.

Concretamente, las técnicas descritas en este artículo ofrecen un método de concentración de un

gran volumen de agua con el filtro Rexeed (hasta 1.000 L en agua potable). Esta mejora implica un aumento de sensibilidad de los métodos analíticos, reducción de costes en el material de filtración, tiempo de análisis y huella de carbono.

La combinación de la concentración con el filtro Rexeed más la detección con técnicas moleculares permite a los gestores de agua contar con herramientas más eficaces y rápidas para optimizar los procesos de toma de decisiones de múltiples maneras. Todas las técnicas de concentración y detección evaluadas en el caso de estudio en Barcelona muestran varios beneficios como herramienta para integrarse en un PSA, así como en protocolos de seguridad y emergencia que permitan dar respuesta a posibles contingencias que puedan poner en riesgo la calidad del agua del sistema. Además, estos nuevos métodos pueden utilizarse para reevaluar ciertos protocolos operacionales en el sistema de tratamiento o de distribución para una mejora en la gestión del riesgo microbiológico en el proceso de suministro de agua de consumo.

En un futuro cercano, con las condiciones del cambio climático, los suministros de agua tendrán que enfrentarse a escenarios más extremos, que incluirán sequías e inundaciones severas, que probablemente incrementen los problemas microbiológicos (por ejemplo, patógenos

emergentes). Estas técnicas de concentración y de detección molecular desarrolladas y validadas en el proyecto Aquavalens pueden ayudar a obtener una visión más profunda de la dinámica microbiana en los procesos de producción y distribución de agua.

Este método ha sido implementado con éxito en la rutina sistemática de control de calidad del agua tratada en la ETAP de San Joan Despí y en el sistema de distribución de Aigües de Barcelona. Se ha podido demostrar que el método de concentración utilizado mejora la recuperación de virus, aumenta la sensibilidad para la detección de bacterias en agua de consumo y procesos de la ETAP y permite obtener una recuperación aceptable de protozoos (datos no presentados).

A nivel técnico, es necesario continuar los estudios que permitan utilizar los resultados de técnicas moleculares en el marco de la legislación vigente y optimizar los procesos de concentración secundaria para reducir al máximo el tiempo de análisis.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido subvencionado por la Unión Europea con el proyecto Aquavalens (EU grant number 311846).

### Bibliografía

Para información extendida y bibliografía de referencia, consultar la página web oficial del proyecto: [www.aquavalens.org](http://www.aquavalens.org).