

## **CAPÍTOL 3**

# **AVALUACIÓ DE LA FORMACIÓ DE BIOFILMS EN SISTEMES DE DISTRIBUCIÓ D'AIGUA**



# Capítol 3 | Avaluació de la formació de biofilms en sistemes de distribució d'aigua

<b>3.1.</b>	<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>92</b>
3.1.1.	MICROBIOLOGIA DE LES AIGÜES SUBTERRÀNIES	92
3.1.2.	REUTILITZACIÓ D' AIGÜES FREÀTIQUES PER A LA IRRIGACIÓ I ESTALVI HÍDRIC	97
3.1.3.	REUTILITZACIÓ DE L' AIGUA FREÀTICA PER A LA IRRIGACIÓ DE PARCS I JARDINS A SANT MARTÍ DE PROVENÇALS (BARCELONA)	99
3.1.4.	MICROBIOLOGIA DE LES XARXES D' AIGUA POTABLE	101
<b>3.2.</b>	<b>MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>109</b>
3.2.1.	ZONA DE MOSTREIG I: POU D' ALFONS EL MAGNÀNIM (SANT MARTÍ-BESÓS)	109
3.2.2.	ZONA DE MOSTREIG II: SABADELL	111
3.2.3.	ZONA DE MOSTREIG III: LAB. MICROBIOLOGIA EUOOT	111
3.2.4.	ANALÍTQUES MICROBIOLÒGIQUES DE MOSTRES PLANCTÒNIQUES I DEL BIOFILM	114
3.2.5.	IDENTIFICACIÓ DELS MICROORGANISMES	115
3.2.6.	RECOMPTE DIRECTE: TINCIÓ DE MOSTRES PLANCTÒNIQUES	116
3.2.7.	ESTIMA DE LA TAXA ESPECÍFICA DE CREIXEMENT DEL BIOFILM	118
3.2.8.	ANALÍTQUES QUÍMIQUES	118
<b>3.3.</b>	<b>RESULTATS A LA ZONA DE MOSTREIG I: SANT MARTÍ (BESÓS)</b>	<b>120</b>
3.3.1.	MICROORGANISMES PLANCTÒNICS	120
3.3.2.	DESENVOLUPAMENT DE BIOFILM A PARTIR DEL POU DE CAPTACIÓ	122
3.3.3.	DESENVOLUPAMENT DE BIOFILM A PARTIR DEL DIPÒSIT DE RESERVA	123
3.3.4.	COMPARACIÓ DEL N° DE MICROORGANISMES EN FASE BIOFILM I PLANCTÒNICA	125
3.3.5.	CANVIS EN LA COMPOSICIÓ DE LA COMUNITAT DELS BIOFILMS	128
3.3.6.	ESTIMA DE LA TAXA ESPECÍFICA DE CREIXEMENT	132
<b>3.4.</b>	<b>RESULTATS A LA ZONA DE MOSTREIG II: SABADELL</b>	<b>134</b>
3.4.1.	MICROORGANISMES PLANCTÒNICS	134
3.4.2.	DESENVOLUPAMENT DE BIOFILM	136
3.4.3.	COMPARACIÓ DEL N° DE MICROORGANISMES EN FASE BIOFILM I PLANCTÒNICA	140
3.4.4.	CANVIS EN LA COMPOSICIÓ DE LA COMUNITAT DELS BIOFILMS	141
<b>3.5.</b>	<b>RESULTATS A LA ZONA DE MOSTREIG III: XARXA DE DISTRIBUCIÓ D' AIGUA POTABLE (LAB. MICROBIOLOGIA EUOOT-UPC)</b>	<b>144</b>
3.5.1.	MICROORGANISMES PLANCTÒNICS	144
3.5.2.	DESENVOLUPAMENT DE BIOFILM	146
3.5.3.	COMPARACIÓ DEL N° DE MICROORGANISMES EN FASE BIOFILM I PLANCTÒNICA	149
3.5.4.	CANVIS EN LA COMPOSICIÓ DE LA COMUNITAT DELS BIOFILMS	150
<b>3.6.</b>	<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>152</b>
3.6.1.	MICROORGANISMES PLANCTÒNICS	152
3.6.2.	CINÈTIQUES DE COLONITZACIÓ	157
<b>3.7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>166</b>

### 3.1. Introducció

#### 3.1.1. Microbiologia de les aigües subterrànies

Les aigües subterrànies s'han convertit en una font de proveïment important per al consum domèstic, agrícola i industrial a diferents parts del món. Als EUA aporten aproximadament el 40% de l'aigua utilitzada per al consum públic (Pillai 1998). En altres països aquests percentatges són encara més alts, com a Dinamarca, on el 98% de l'aigua de beguda s'obté d'aigües freàtiques (Czakó 1994). Malgrat la gran importància de l'aigua subterrània existeix una manca de comprensió de molts dels factors que afecten la seva distribució, mobilitat i susceptibilitat a la contaminació. A més, la biologia de les aigües subterrànies i del subsòl es manté com una de les menys conegudes entre els diferents ambients terrestres (Cullimore 1993).

Fins no fa gaire es considerava que les aigües subterrànies presentaven una microbiota pràcticament insignificant. En general, les aigües subterrànies són molt més resistents a la contaminació que les aigües superficials de rius o llacs, degut a la seva capacitat per eliminar total o parcialment els diferents tipus de contaminants. A més, alguns aqüífers estan protegits de la contaminació superficial per la presència de capes impermeables d'argiles o altres materials. No obstant, des dels anys 1970s s'han produït diferents episodis de contaminació agrícola i industrial a partir d'aigües subterrànies, que han afectat la percepció pública de la qualitat dels aqüífers.

La **qualitat de l'aqüífer natural** depèn en gran mesura de la zona no saturada, la regió entre la superfície del terra i el nivell freàtic local i, en concret, de l'ecologia microbiana i la qualitat de l'aigua en aquesta zona. La presència de microorganismes pot modificar gran part dels contaminants que es mouen a través de la zona no saturada dels aqüífers, degradant-los total o parcialment abans d'arribar a la zona saturada. La major part d'aquests microorganismes depenen de la concentració de diferents gasos lliures o dissolts (oxigen, diòxid de carboni o nitrogen), a la zona no saturada. De fet, alguns factors ambientals físics i químics poden influir en el creixement microbià estimulant-lo o, a la inversa, actuant com a inhibidors (tòxics generals o selectius). Diferents factors químics poden provocar l'estrès dels microorganismes presents en aquestes zones, alterant les comunitats dominants i afavorint a certes espècies més ben adaptades per la seva versatilitat. D'aquesta forma es poden arribar a separar diferents comunitats estratificades de microorganismes, segons la seva habilitat per adaptar-se a aquestes condicions ambientals.

A la zona saturada el quimisme de l'aigua evoluciona a mesura que es mou a través del sistema, depenent en gran mesura del temps de residència de l'aigua i de la constitució del sòl i les roques per on passa l'aqüífer. En general, els aqüífers vells tendeixen a presentar uns nivells elevats de minerals dissolts i una salinitat i alcalinitat elevades a més d'una important manca d'oxigen dissolt (Drever 1982). En canvi, la precipitació i infiltració recents presenten, de forma natural, un caràcter àcidic (aproximadament pH=5,5 degut a la presència de CO<sub>2</sub> atmosfèric dissolt, encara que disminueix més en zones amb pluja àcida) i un elevat contingut d'oxigen dissolt (Pillai 1998).

A mesura que es profunditza, factors com l'increment en temperatura, pressió i concentració de sals, i la disminució en la disponibilitat d'oxigen i el potencial redox (Eh) determinen de forma important les espècies microbianes dominants. En general s'ha determinat un increment mig de temperatura de 2,13°C per cada 100 metres de profunditat (Driscoll 1986), mentre que les pressions hidràuliques també exerceixen una major influència a mesura que augmenta la profunditat. Respecte a la disponibilitat d'oxigen, el màxim d'activitat i de colonització microbiana es produeix quan l'ambient comença a ser oxidatiu (potencial Eh, -50 a +150), en la interfase on es produeix el canvi d'ambient reductor a oxidat (Cullimore 1993).

Als ambients descrits, els microorganismes poden ser transportats per les aigües subterrànies o pel fluid intersticial dels medis porosos, o bé es poden adsorbir a les superfícies de les partícules d'aquest medi. El desenvolupament del biofilm en medis porosos és, fonamentalment, el resultat de la biomassa afegida a la superfície en els processos d'adsorció, creixement, adherència i filtració, menys la quantitat de massa que es separa per processos de desorció i separació (Cunningham & Wanner

1993). Sense oblidar que poden produir problemes per a la salut pública, els biofilms presents en aquests ambients actuen com a catalitzadors, entre d'altres, dels següents processos:

- ❑ Obturació induïda per microorganismes (MIF). En aquest procés el creixement dels microorganismes en forma de biofilm genera el recobriment de les superfícies del medi porós. A mesura que el biofilm s'expandeix, la capacitat de transmissió de l'aigua a través del sistema es redueix (obturació).
- ❑ Acumulació induïda per microorganismes (MIA), que pot implicar la bioacumulació de diferents ions, com elements metàl·lics en les seves formes dissoltes o sals insolubles i complexos orgànics.
- ❑ Degradació de contaminants orgànics induïda per microorganismes. Activitat biotransformadora in situ de diferents compostos orgànics.
- ❑ Generació microbiana de gasos (MGG), com diòxid de carboni, metà, sulfur d'hidrogen i nitrogen. Es produeix especialment amb la maduració dels biofilms i l'extensió del creixement anaerobi.
- ❑ Corrosió induïda per microorganismes (MIC), que pot incloure la generació de sulfur d'hidrogen (corrosió electrolítica) i/o àcids orgànics (solubilització de metalls). El risc més gran es produeix quan es desenvolupen biofilms estratificats i quan presenten una capa anaeròbica permanent.

Tot això fa que la biomassa dels ambients d'aigües subterrànies sigui considerablement significativa, arribant a valors de 4,7 Tones per hectàrea. De fet, aigües cristal·lines aparentment sense contaminació microbiana poden arribar a presentar  $4 \times 10^5$  cèl·lules/mL (Allen 1980, Wilson et al. 1983, Jarvis et al. 1985, Buchanon-Mappin et al. 1986, Marxsen 1988, Geldreich 1989). Encara que les taxes metabòliques de les comunitats del subsòl acostumen a ser inferiors a les típiques per ecosistemes aquàtics o pel sòl, s'ha pogut determinar la presència significativa d'activitat microbiana en sistemes d'aigües subterrànies molt profundes (Aelion et al. 1987, Wilson et al. 1985, Chapelle 1993). D'altra banda, s'ha de considerar que l'absència de microorganismes en una mostra particular d'aigua subterrània no es pot interpretar inevitablement com la falta de la seva presència dins del sistema de l'aqüífer.

Respecte als seus requeriments nutritius sembla existir una considerable variació entre els diferents microorganismes. A més, avui en dia encara no està clar el significat de cada un dels grups de microorganismes i quin és el seu paper a les aigües subterrànies. En principi, es diferencien dos grans grups:

- ❑ Organismes indígenes, que es troben de forma habitual en els sistemes d'aigües subterrànies.
- ❑ Organismes oportunistes, que malgrat proliferen en altres zones de la biosfera, poden envair sota determinades condicions els sistemes d'aigües subterrànies.

Els últims anys s'han desenvolupat diferents estudis per augmentar el coneixement sobre la **contaminació dels aqüífers** i el **transport microbià**, especialment per l'interès d'utilitzar la biodegradació microbiana en la neteja de contaminants presents en aqüífers. Els treballs realitzats on s'ha caracteritzat la microbiota del subsòl (Wilson et al. 1983), mostren com aquesta acostuma a presentar la capacitat per adaptar-se a la presència de contaminants i, fins i tot, metabolitzar un gran nombre de xenobiòtics (Aelion et al. 1987).

El flux de l'aigua subterrània és facilitat per les obertures, esclatxes i fractures presents a les diferents formacions geològiques. La lleï de Darcy descriu el flux a través d'un material geològic saturat:

$$q = -K \frac{\Delta h}{\Delta x} \quad (3.1.)$$

on  $q$  és la descàrrega específica o la taxa de flux per unitat d'àrea de material geològic (m/s),  $K$  és la conductivitat hidràulica (m/s) i  $\Delta h/\Delta x$  és el gradient hidràulic, és a dir, una mesura del canvi en el potencial d'energia de l'aigua.

A la zona no saturada el flux d'aigua subterrània també està governat per la llei de Darcy, encara que la conductivitat hidràulica depèn en aquest cas del contingut d'humitat. Quan el sòl està a prop de la plena saturació els valors s'aproximen als de la conductivitat hidràulica saturada. Quan els valors d'humitat disminueixen la conductivitat hidràulica disminueix ràpidament. Això dificulta la predicció de les taxes del flux i dels índexs de transport de contaminants a la zona no saturada.

La majoria dels materials geològics presenten una porositat suficient per permetre el creixement i la mobilitat de gran part dels microorganismes i, especialment, dels bacteris (diàmetres cel·lulars entre 0,5 i 5  $\mu\text{m}$ ). En aquest sentit, el comportament dels contaminants variarà molt en funció del lloc, depenent de la variabilitat geològica-química-biològica natural. Per això, les prediccions del moviment de contaminants, entre ells els microbians, encara presenten un elevat grau d'incertesa i a la pràctica l'estima de les taxes de transport basant-se en les propietats hidràuliques no és del tot fiable (NRC 1994). Tanmateix, la velocitat mitjana de l'aqüífer i d'una substància contaminant es pot determinar coneixent la conductivitat hidràulica i el gradient hidràulic de l'aqüífer:

$$v = \frac{q}{\varepsilon_e} \quad (3.2.)$$

on  $q$  és la descàrrega específica determinada a través de la llei de Darcy i  $\varepsilon_e$  és la porositat efectiva. En aqüífers granulars formats per sorres i graves la porositat efectiva és essencialment igual a la porositat total (Pillai 1998), però en aqüífers fracturats o kàrstics, on la majoria del flux es produeix a través de fractures, acostuma a ser força menor que la porositat total. En el primer cas, en aqüífers de materials granulars no consolidats (sorres no cimentades), els valors de porositat efectiva poden oscil·lar entre 0,2-0,4 mentre que en materials fracturats i kàrstics els valors solen ser bastant inferiors, de 0,01 a 0,00001 (Pillai 1998). Això implica que les velocitats del flux i, per tant, les velocitats de transport dels contaminants seran força més grans en materials fracturats i kàrstics, que en sorres i graves amb les mateixes propietats hidràuliques. En el primer cas i, sota condicions naturals de flux, les taxes de transport poden pujar a valors de desenes de metres per dia, en estudis realitzats amb marcadors microbians com bacteris i bacteriòfags (Keswick et al. 1982a,b). En aqüífers lliures formats per graves i sorres certs microorganismes poden ser transportats a velocitats de l'ordre de desenes de cm per dia (Harvey et al. 1989, Bales et al. 1995).

Al subsòl els contaminants (incloent els microorganismes) poden estar subjectes a diferents processos, que es separen generalment en dues categories:

- **processos d'adhesió**, majoritàriament reversibles, com la sorció, filtració i sedimentació. Retarden el moviment dels contaminants, sense evitar però la dispersió dels microorganismes i el seu establiment en zones no colonitzades. En aquest sentit, forces hidràuliques i processos biològics (Davies et al. 1998) indueixen el desprendiment de parts del biofilm (amb diàmetres de 16-65  $\mu\text{m}$ ) fet que facilita la colonització de nous ambients (Cullimore 1993). Alguns factors ambientals o nutricionals poden provocar l'estrès de les cèl·lules, produint una reducció en la seva grandària normal (cèl·lules amb diàmetre < 0,3  $\mu\text{m}$ ). Es formen els anomenats ultramicrobacteris, que es poden mantenir en fase planctònica no adherits (en suspensió) durant llargs períodes de temps i presenten un elevat potencial per migrar a través dels medis porosos.
- **processos de degradació**, majoritàriament irreversibles, que canvien la naturalesa física i química del contaminant, com la hidròlisi química i la mort bacteriana i poden representar la seva eliminació permanent, encara que el més habitual és la producció de diferents subproductes químics tòxics.

En el transport de microorganismes en aigües subterrànies i al subsòl no es pot oblidar dels efectes de la mobilitat. En aquests ambients i en sistemes estàtics la majoria de bacteris poden desenvolupar respostes en forma de moviments d'atracció o repulsió cap a diferents substàncies, anomenats moviments quimiotàctics (Jenneman et al. 1985). Aquests moviments ajuden a la població microbiana del subsòl en la localització i apropament cap als contaminants químics (Harvey 1991) i acostumen a ser del mateix ordre de magnitud que els estimats per als aqüífers típics (Barton & Ford 1997).

La informació existent és contradictòria respecte de la importància relativa de les característiques cel·lulars, com la grandària, mobilitat, hidrofobicitat i altres, en l'adsorció i transport a través de medis porosos. En general, les cèl·lules altament hidrofòbiques (Mueller et al. 1992) i amb càrrega (Fontes et al. 1991) presenten una major tendència a adherir-se als medis porosos. D'altra banda, l'estrès cel·lular per la privació de nutrients genera la reducció de la grandària cel·lular, afectant el transport cel·lular i disminuint la filtració, perquè un bacteri més petit pot ser transportat de forma més efectiva (MacLeod et al. 1988). Alguns autors suggereixen que la taxa d'adsorció prediu millor els fenòmens de transport a través de medis porosos que les característiques cel·lulars individuals (Camper et al. 1993). Aquest paràmetre seria una mesura quantitativa de la taxa de moviment dels bacteris, del fluid a la superfície del medi porós, així com de l'adherència dels bacteris en aquesta superfície.

Les intrusions microbianes dins dels sistemes d'aigües subterrànies poden presentar un risc per a la pròpia "salut" de l'aqüífer (Jarvis et al. 1985). Segons això, es poden subdividir els microorganismes en dos grups diferents: 1) *microorganismes oclusius*, que creixen dins les estructures poroses dels aquífers en forma de biofilms i poden arribar a bloquejar el moviment de l'aigua i, 2) *microorganismes perjudicials* que interfereixen en la qualitat del sistema d'aigües subterrànies, a vegades en forma de productes de l'activitat microbiana com olors i gustos detectables.

De fet, la principal preocupació en relació a la microbiologia de les aigües subterrànies ha estat, des de sempre, els possibles **efectes adversos per a la salut pública**. Com es veurà més endavant quan es parli del risc sanitari en la reutilització d'aigües subterrànies (veure 6.1.2), la contaminació microbiana de les aigües freàtiques afecta a un nombre significatiu de persones, especialment a les àrees rurals. Els agents etiològics seran generalment organismes patògens, els quals provoquen de forma rutinària –sempre que el seu nombre sigui l'adequat– símptomes clínics de la malaltia en l'hoste infectat, com en el cas del còlera o la febre tifoïda. Apart, els patògens nosocomials (oportunistes), formen part dels ambients naturals però poden entrar en un hoste debilitat –immunològica o físicament– provocant els símptomes clínics d'una infecció. No obstant, aquests patògens nosocomials sovint no provoquen els símptomes clínics de la malaltia, dificultant el seu diagnòstic.

Entre els principals grups de microorganismes, majoritàriament heteròtrofs, presents als sistemes d'aigües subterrànies cal destacar els següents grups:

**Bacteris Entèrics.** Bacils gram-negatius capaços de créixer sota condicions oxidatives o reductores (anaerobis facultatius). La majoria són fermentadors que produeixen àcids orgànics i grans quantitats de gas (normalment CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>). Són habitants del tracte intestinal d'animals de sang calenta i són evacuats de forma significativa en el material fecal. Per aquest motiu, s'han utilitzat com a indicadors de contaminació fecal i del risc sanitari (Geldreich 1986, Caldwell & Morita 1988).

**Cocs Gram-positius.** Existeixen un gran nombre de bacteris esfèrics gram-positius que es poden trobar tant en aigües superficials com subterrànies. En molts casos, formen part dels biofilms que produeixen episodis d'obstruccions (MIF). Entre els cocs aeròbics cal destacar els gèneres *Micrococcus* i *Deinococcus*.

**Grup Pseudomonas.** Bacteris gram-negatius aeròbics que acostumen a créixer en forma de biofilms en associació amb altres grups microbians. Alguns dels membres d'aquest grup són patògens, com *Ps. aeruginosa*, que pot infectar persones poc resistents i provocar infeccions en el tracte urinari, infeccions oculars i envair àrees cremades. En altres casos es poden associar amb bacteris reductors de sulfats (SRB), produint processos de corrosió induïda per microorganismes (MIC).

**Bacteris Esporulats Grampositius.** Els bacteris que produeixen espores presenten un grau molt elevat de resistència enfront de diferents factors ambientals adversos. Això pot ajudar a augmentar la seva supervivència en els sistemes d'aigües subterrànies, on les endospores poden arribar a viatjar distàncies considerables. Entre els diferents grups cal destacar en primer lloc el gènere *Bacillus*, bacteris esporulats aerobis que es troben habitualment en aigües subterrànies amb presència d'oxigen. Exceptuant a *Bacillus anthracis*, que no s'observa als sistemes d'aigües

freàtiques, la resta no són patògens, encara que sovint produeixen fenòmens d'obturació induïda per microorganismes (MIF). En segon lloc, cal parlar dels bacteris esporulats anaerobis del gènere *Clostridium*. La presència d'aquest grup de bacteris ens pot indicar que l'aigua és probablement anòxica (<20 ppb d'oxigen) i que ha passat per una zona amb descomposició intensa de materials orgànics.

**Actinomicets filamentosos.** Gran grup de bacteris gram-positius, aeròbics la majoria, que presenten estructures en forma de filaments que poden ramificar-se. En els sistemes d'aigües subterrànies aquests organismes es localitzen de forma habitual a les interfases entre zones saturades i no saturades amb presència d'oxigen. Això es produeix sobretot a la zona capilar immediatament superior a la zona saturada. El grup més nombrós associat a les aigües subterrànies pertany al gènere *Streptomyces*, productors d'antibiòtics com les tetraciclins i els aminoglucòsids. La proliferació dels *Streptomyces* es pot detectar a l'aigua per la típica olor a terra humit (floridura).

**Bacteris Reductors de Sulfats (SRB).** Són organismes perjudicials pels problemes de gust i olor que provoquen a l'aigua i per estar associats als processos de corrosió induïda per microorganismes (MIC). Prolifereixen especialment en ambients amb absència d'oxigen i amb quantitats suficients de materials orgànics dissolts. Aquests ambients es formen, habitualment, pel desenvolupament de biofilms estratificats. Una vegada establerts, aquests bacteris redueixen grans quantitats de sulfats generant sulfur d'hidrogen ( $H_2S$ ) a mesura que creixen (Hamilton 1985). Aquest gas és el desencadenant d'un procés de corrosió electrofítica que es produeix en certes superfícies metàl·liques. Degut a que habitualment creixen adherits a les superfícies en ambients anaerobis i envoltats per altres tipus de bacteris, la realització de tests a l'aigua pot resultar negativa. Per tant, la identificació de problemes provocats pels bacteris reductors de sulfats és més fàcil d'aconseguir reconeixent les seves manifestacions, com la típica pudor a "ous podrits", producció de tubercles i signes de corrosió a les estructures metàl·liques. La disminució en el potencial redox (Eh) pot utilitzar-se com una bona eina de monitorització, per advertir-nos que les condicions poden tornar-se favorables al seu creixement.

**Bacteris metanògens.** Alguns d'aquests organismes poden arribar a proliferar en ambients d'aigües subterrànies, produint metà a partir de  $CO_2$ ,  $H_2$ , format, acetat o altres en zones anaeròbiques riques en materials orgànics.

**Algues.** La majoria de micro-algues es poden recuperar ocasionalment d'ambients d'aigua subterrània. Tots aquests organismes poden realitzar la fotosíntesi fins i tot sota nivells mínims de llum. Als sòls, alguns tipus d'algues poden créixer fototròficament a profunditats per sota dels 50 mm (Cullimore 1993). Altres poden créixer també de forma heteròtrofa (com els cloròfits i euglenoids), competint amb els bacteris, fongs i altres organismes per l'explotació de nutrients orgànics. No obstant, quan baixen els nivells de nutrients orgànics ( $TOC < 2$  ppm), les algues que es troben als sistemes freàtics acostumen a provenir de la recàrrega d'aigües que provenen del sòl o de reservoris superficials d'aigua que suporten el seu creixement.

**Fongs.** Entre els microorganismes eucariotes els fongs presenten un paper important en la biodegradació en medis porosos no saturats i en superfícies orgàniques sota condicions aeròbiques. Als sòls, els fongs poden arribar a dominar la biomassa microbiana, amb valors estimats de 5 tones/Ha als primers 20 cm.

**Protozous.** Alguns dels protozous són patògens intestinals, i entre ells destaquen *Giardia spp* i *Cryptosporidium spp*.

**Virus.** Els virus entèrics s'excreten a la femta d'individus infectats, en un nombre bastant important ( $10^6$ - $10^9$  per gram de femta), per la qual cosa poden contaminar les aigües, tant superficials com subterrànies.



### 3.1.2. Reutilització d'aigües freàtiques per a la irrigació i estalvi hídric

Actualment quasi el 45% de la població viu en zones urbanes, amb valors que oscil·len del 73% pels països desenvolupats al 30% dels països en vies de desenvolupament d'Àfrica i Àsia (United Nations 1986). A Catalunya, més del 50% de la població es troba a la franja costanera i, més concretament, a la zona propera a Tarragona i sobretot de Barcelona. Això fa que les densitats de població siguin especialment elevades, com ho poden ser els 155 Hab./Ha a Barcelona ciutat (FTN 1996).

El medi ambient urbà i periurbà és, des de fa bastant temps, un mosaic d'hàbitats artificials i naturals amb unes condicions ecològiques que el diferencien de les zones rurals adjacents. A la majoria de les ciutats i d'àrees densament poblades s'intenta generar unes condicions de vida agradables, i una de les formes d'aconseguir-ho és mitjançant l'ús d'una gran diversitat de vegetació. Això explicaria els elevats valors que les àrees verdes ocupen a l'espai de les ciutats (fins a un 40-70% d'ocupació), malgrat que en realitat només un 18% del terreny correspon a espais oberts. Aquesta vegetació que es planta i es gestiona dins de les ciutats compleix múltiples objectius, com poden ser l'ornamental, estètic, sanitari i mediambiental. Tanmateix, és evident que per poder assolir aquests objectius s'haurà d'adaptar a unes condicions molt concretes, en general extremes. En alguns casos, s'haurà de seleccionar al vegetal per la seva resistència enfront de diferents tipus d'estressos, o, en d'altres casos, s'haurà de tractar, cultivar i gestionar amb tècniques i sistemes més o menys complexes.

La major part del nostre país es troba sotmès de ple a unes condicions ambientals especialment dures, fet que es converteix en un dels principals factors crítics per al desenvolupament i creixement de les plantes (Terradas & Savé 1992). Així, caldria destacar a l'estressor hídric com el factor limitant principal, tant de manera directa com indirecta a causa d'una sequera, asfíxia, altes i/o baixes temperatures, salinitat, etc. A més, a l'àrea mediterrània s'han d'afegir unes condicions tèrmiques extremes, amb estius calorosos i hiverns freds. També caldria destacar uns règims pluviomètrics deficitaris i/o irregularment distribuïts respecte de la fenologia dels vegetals, així com una important degradació de la superfície del sòl provocada, la majoria de les vegades, per causes antropogèniques.

Totes aquestes condicions ambientals plantegen problemes importants amb el material vegetal que s'utilitza a la major part de plantacions i revegetacions de la zona mediterrània i, de retruc, en la quantitat d'aigua necessària per assegurar l'èxit d'aquestes plantacions. Respecte al segon punt, és evident que anualment s'utilitzen grans quantitats d'aigua de primera qualitat per a la irrigació de jardins urbans i restauracions paisatgístiques en ambients periurbans (Feldman et al. 1997). Així, el consum d'aigua per a ús públic a Barcelona, o altres ciutats de la zona, es situa al voltant del 5-8% de l'aigua consumida per les mateixes ciutats (Pelegrí 1997). D'aquest percentatge una part important és la que s'utilitza pel reg. En el cas concret de Barcelona, anualment es consumeixen 11,2 Hm<sup>3</sup> d'aigua per a usos públics, el que representa un 7,4% del consum total, del qual l'aigua de reg utilitzada als jardins públics en representa la tercera part (Pelegrí 1997).

Aquests elevats consums es poden reduir utilitzant la xerojardineria amb espècies autòctones, les quals presenten una major resistència a les adverses condicions locals (Savé et al. 1995), adaptant la tècnica del reg mínim (Savé et al. 1993) o aprofitant i/o reutilitzant aigües freàtiques (Pelegrí 1997).

Atenent a aquestes consideracions i tenint en compte que els recursos hídrics són escassos i que, per tant, no es poden malbaratar, és evident que la recerca de nous recursos d'aigua i la reutilització es plantegin com a política prioritària entre les diferents administracions implicades. Fins i tot la Llei 19/1991 del 7 de novembre, de reforma de la Junta de Sanejament (DOGC 1991), defineix com una de les funcions de la Junta la promoció i coordinació dels sistemes de reutilització de les aigües depurades. En aquest sentit, la posada en servei dels tractaments biològics permet entre d'altres, i amb un tractament terciari addicional, el reaprofitament d'aquestes aigües per a usos agrícoles, industrials i de reg de parcs i jardins. Segons dades de la pròpia Junta de Sanejament, quan es finalitzi el Programa de Sanejament d'aigües residuals urbanes se'n reutilitzaran 300 Hm<sup>3</sup>/any a la Catalunya interior i 400 Hm<sup>3</sup>/any a les àrees costaneres (Junta Sanejament 1997).

Per tant, no és estrany que hagin sorgit durant els últims anys diferents projectes de reutilització d'aigües residuals depurades, aigües freàtiques o aigües de drenatge de diferent origen. Respecte al primer cas, actualment s'estan reaprofitant directament 45.000 m<sup>3</sup>/dia, cosa que suposa un 3,75% de l'aigua tractada (Junta de Sanejament 1997). Les perspectives actuals han establert demandes de fins a 777.000 m<sup>3</sup>/dia, que suposarien un 41% del total tractat, tal com s'observa a la Taula 3.1.

Una part important de les instal·lacions que ja funcionen a Catalunya permeten la reutilització d'aigües regenerades a partir d'aigües residuals per a la irrigació de zones enjardinades, camps de golf i cultius agrícoles (Taula 3.1). En general, aquest reaprofitament suposa un increment net de recursos hídrics i una regularitat i disponibilitat local del subministrament, mentre que en els reaprofitaments agrícoles existeix a més un estalvi en l'aportació de nutrients al sòl. Segons la mateixa taula es pot veure com la planificació de la Junta de Sanejament preveu un augment molt important del reg agrícola.

**Taula 3.1.** Reutilització d'aigües residuals a Catalunya (Junta de Sanejament 1997).

Distribució segons abocaments (m <sup>3</sup> /dia)				
	Explotació actual	Reutilització actual	Explotació futura	Reutilització futura
Mar	800.000	28.000 (3,50%)	1.200.000	588.000 (49,0%)
El Prat de Llobregat				325.000 (27,0%)
Consorci Costa Brava		7.700 (0,96%)		175.000 (14,6%)
Port Aventura		16.800 (2,10%)		
Altres		4.500 (0,56%)		94.000 (7,90%)
Interior	400.000	16.000 (4,00%)	700.000	183.000 (26,0%)
TOTAL	1.200.000	45.000 (3,75%)	1.900.000	777.000 (41,0%)

Distribució segons usos (m <sup>3</sup> /dia)				
	Explotació actual	Reutilització actual	Explotació futura	Reutilització futura
Aiguamolls		1.000		13.750
Cabal Ecològic				260.000
Diversos				250.000
Golf		13.000		39.000
Indústria		2.000		20.000
Reg Agrícola		12.200		173.250
Reg Jardins		16.800		21.000
TOTAL		45.000		777.000

El panorama existent en alguns països desenvolupats és força més avançat, pel que fa a la tecnologia i a les instal·lacions existents per a la reutilització d'aigües. Als EUA, on ja fa temps que s'utilitzen les aigües residuals per a la recàrrega d'aqüífers (Mujeriego 1990), existeixen projectes de reutilització de les aigües de drenatge agrícoles, reaprofitant-les per al reg dels propis cultius (Lisk 1998). Algunes tecnologies, com la microfiltració (USFilter Co. California) permeten el tractament d'aquest tipus d'aigua eliminant els compostos químics perillosos com els nitrats o el seleni. D'altra banda, comunitats amb recursos molts escassos d'aigua estan considerant – en alguns casos excepcionals ja s'aplica -, afegir aigua residual regenerada a les seves fonts d'aigua potable (Cole 1998). Tanmateix, el desconeixement de molts dels aspectes relacionats amb la salut pública fa que la majoria d'aquests projectes es plantegin, de forma majoritària, en la reutilització per a usos no potables com la irrigació, refrigeració i altres usos industrials.

En el cas que ens ocupa, la reutilització per a la irrigació de parcs i jardins urbans també presenta certs interrogants sobre la idoneïtat del seu ús i, especialment, pel que fa referència al seu possible risc sanitari. Malgrat tot, aquest tipus de reutilització de les aigües freàtiques suposa un estalvi econòmic molt important, per la racionalització de l'ús d'un bé escàs –especialment en àrees urbanes de la zona mediterrània- com és l'aigua potable, aigua de gran qualitat i d'elevat cost (150 pta/m<sup>3</sup>).

### 3.1.3. Reutilització de l'aigua freàtica per a la irrigació de parcs i jardins a Sant Martí de Provençals (Barcelona)

Tenint en compte les consideracions exposades anteriorment, des de l'any 1993 l'Institut Municipal de Parcs i Jardins de Barcelona va fixar entre els seus objectius el programa de gestió diferenciada dels espais verds públics, aplicant criteris de sostenibilitat d'acord amb les directrius marcades a l'Agenda Local 21 i recollides a la Carta de les ciutats europees (Carta d'Aalborg, maig de 1994). Una de les directrius principals de la gestió diferenciada dels espais verds ha d'ésser la protecció i potenciació de la natura a la ciutat, per contribuir a l'equilibri ambiental del sistema artificial de les grans ciutats. Això inclou una racionalització del consum de recursos i l'establiment de diferents actuacions amb un marcat caràcter ecològic. Entre elles, cal parlar de la utilització d'espècies autòctones, incentivació d'un ús d'arbres i arbusts i planta vivaç en detriment de la planta anual i la gespa, increment de la biodiversitat d'espècies, reciclatge de les restes vegetals que es generen en el manteniment, reducció de l'ús de pesticides i fertilitzants químics solubles i utilització de vehicles menys contaminants. A més, i especialment important pel que ens ocupa, es menciona la racionalització del consum de l'aigua de reg, implantació de sistemes d'irrigació més eficients i aprofitament de les aigües freàtiques per al reg.

Com a resultat de l'aplicació d'aquests criteris, durant els últims anys s'ha reduït el consum d'aigua potable pel reg, passant d'un consum de 1,27 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> l'any 1993 fins els 0,83 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> de l'any 1997. De totes formes, la ciutat de Barcelona presenta en l'actualitat un total de 933 Ha d'espais verds, amb un consum d'aigua de 3,80 Hm<sup>3</sup>/any (Memòria Parcs i Jardins 1997), que representa el 37,50% del consum d'aigua potable que la ciutat destina a l'ús públic.

L'existència d'aigua abundant al subsòl i la problemàtica que planteja arran de l'increment progressiu del seu nivell degut a la reducció de les captacions, especialment en zones industrials, ha originat l'elaboració d'un pla pel seu aprofitament. En aquest sentit, un estudi realitzat l'any 1996 en col·laboració entre l'Ajuntament de Barcelona, la Universitat Politècnica de Catalunya i CLABSA (Clavegueram de Barcelona, SA), demostra com el nivell freàtic actual està a 12 m per sobre del nivell del mar i, en algunes zones de Sant Martí de Provençals i de Gràcia, arriba a situar-se a 3 metres per sota de la superfície (Barrera 1998). De fet, la transformació econòmica de la ciutat amb una progressiva disminució de la indústria en benefici del sector terciari, ha estat determinant per invertir la tendència cap a una progressiva salinització de les aigües freàtiques. Aquest canvi de l'activitat econòmica ha ajudat a disminuir les extraccions d'aigua, permetent la regeneració de l'aqüífer amb aigua dolça. Les estadístiques mostren com a finals dels anys 60 s'extreien del subsòl barceloní més de 50 Hm<sup>3</sup>/any amb 107 pous comptabilitzats, mentre que els anys 1995-96 l'extracció es va reduir als 5 Hm<sup>3</sup>/any (Barrera 1998).

Aquesta disminució en les captacions i la conseqüent pujada del nivell freàtic ha provocat inundacions de soterranis en algunes zones. Com a exemple, quasi la totalitat de la xarxa del metro amb una extensió de 80,53 Km i 111 estacions, presenta un traçat que comporta l'aparició de filtracions d'aigua de diversa procedència (freàtiques, pluvials, residuals, marines, de rentat, etc.). Actualment existeixen al metro 109 pous que recullen aquestes aigües subterrànies d'origen divers i les extreuen amb l'ajuda de 192 bombes, amb un volum aproximat de 12 Hm<sup>3</sup>/any.

En aquest context, l'any 1995 es va iniciar la redacció d'un projecte pilot a partir d'un acord firmat entre Transports Metropolitans de Barcelona (TMB) i l'Institut Municipal de Parcs i Jardins de Barcelona, per a la reutilització d'aigües freàtiques que provenen de la xarxa de túnels del metro. Aquestes aigües es reutilitzarien per a diferents usos urbans, entre els quals cal destacar el reg d'una zona de parcs i jardins de 30 Ha i la neteja de carrers i clavegueram.

En el projecte municipal es planteja la construcció d'un anell de distribució d'aigua al districte de Sant Martí de Provençals, amb un consum de 0,30 Hm<sup>3</sup>/any (2.700 m<sup>3</sup>/dia). La primera fase del projecte, inaugurada el 3 de juliol de 1999 permet el subministrament d'aigua freàtica pel reg a 56 Has (agost 2000) dels parcs del litoral de Barcelona, des d'Alfons el Magnànim fins el Parc de les Cascades, passant pel Parc de Nova Icària i el del Port (veure Figura 3.1). En una segona fase es preveu arribar fins a Gran Via, Glòries, Meridiana i Marina. Per cobrir aquestes necessitats d'aigua s'utilitza un pou d'esgotament de FCMB situat a Alfons el Magnànim, el qual pot aportar un cabal superior a 1 Hm<sup>3</sup>/any.



**Figura 3.1.** Zones de reg a Barcelona: Parcs del Litoral (Vila Olímpica, Sant Martí, Barcelona).

### 3.1.4. Microbiologia de les xarxes d'aigua potable

La presència de desinfectant, les baixes concentracions de carboni orgànic, les baixes temperatures i el règim del flux són només algunes de les característiques que converteixen als sistemes de distribució d'aigua potable en ambients hostils per al creixement microbià. Malgrat aquestes condicions adverses, diferents exemples documenten el creixement i la persistència dels microorganismes i, especialment, dels bacteris a les xarxes de distribució. Gran part de les raons que expliquen aquest èxit es deuen al seu creixement en forma de biofilms a les superfícies de les canonades a la xarxa, i en sediments de tancs i dipòsits. Amb xarxes de distribució que poden tenir extensions de milers de quilòmetres i temps de residència a l'aigua entre 48 h i 1 mes (Block 1992), no és gens estrany que la variació dels diferents paràmetres (veure Taula 3.2) condicioni l'evolució de la qualitat de l'aigua a les zones de mostreig.

**Taula 3.2.** Variacions d'alguns paràmetres al llarg de la xarxa de distribució (Block 1992).

Incrementos	Disminucions
Temperatura	Clor
Conductivitat	pH
Bacteris	AOC/BDOC

Cal insistir en el fet que, avui en dia, la majoria dels procediments utilitzats permeten detectar una fracció força petita de les poblacions presents a l'ecosistema de la xarxa de distribució d'aigua potable. De fet, el manteniment d'un residual de clor limita la proliferació de la microbiota heterotròfica i redueix el risc d'una possible contaminació de l'aigua de la xarxa, encara que augmenta la proporció de cèl·lules lesionades. Aquestes, són incapaces de desenvolupar-se en els medis de cultiu utilitzats de forma rutinària. Habitualment, la seva presència als sistemes de distribució clorats és bastant elevada, doncs entre el 60-99% dels coliformes presenten aquest estat (LeChevallier & McFeters 1985a, McFeters et al. 1986).

**Acumulació de microorganismes a les parets de les canonades.** Quasi el 50% dels microorganismes que són transportats en suspensió a l'aigua - fase planctònica - ho són en forma d'agregats més grans de 5 µm o adherits a partícules superiors a les 5 µm (McFeters et al. 1987). La biomassa adherida comparteix la superfície de les parets de les tuberies del sistema de distribució amb diferents precipitats, partícules inorgàniques, dipòsits, incrustacions i tubercles, en un patró heterogeni (LeChevallier et al. 1987).

Cal insistir que la presència del biofilm no implica l'existència d'una pel·lícula homogènia de gruix regular, més aviat s'ha de considerar com una acumulació més o menys extensa a la superfície de les canonades, formada per microorganismes vius i morts, més polímers i/o macromolècules excretades per la biomassa que faciliten la seva adhesió irreversible (Maul et al. 1991). Així, la presència dels bacteris dins de la xarxa de distribució es produeix, majoritàriament, a la fase sèssil en forma de biofilm i no a l'aigua.

Diferents factors controlen les característiques del biofilm, encara que entre els més importants es poden citar el nombre i la diversitat d'espècies presents a l'aigua, la concentració i naturalesa de la matèria orgànica biodegradable a l'aigua i a les superfícies (Camper et al. 1999), el règim hidràulic del sistema, les variacions estacionals en les temperatures, el tipus de desinfectant, les característiques del material de suport i la presència de productes de corrosió. Ja s'ha comentat anteriorment (veure 1.1) com els nutrients tendeixen a adsorbir-se a les superfícies, fent-los més disponibles a les cèl·lules sèssils adherides (Fletcher & Marshall 1982). En alguns casos, els materials de les canonades poden alliberar compostos tòxics o ions metàl·lics com el coure, que poden inhibir el creixement microbià (Assanta et al. 1998). Altres vegades, els materials alliberats poden ser assimilats pels microorganismes i facilitar el seu creixement (Schoenen 1986).

El creixement bacterià a la fase líquida és pràcticament negligible en els sistemes de distribució d'aigües potables, ja que els bacteris adherits són els únics que es multipliquen (van der Wende et al. 1989, LeChevallier et al. 1987, 1988). Les taxes de creixement varien depenent de les condicions entre  $0,0017 \text{ h}^{-1}$  i  $0,06 \text{ dies}^{-1}$ , per la qual cosa el temps de duplicació o generació de la població bacteriana varia entre 1-17 dies (Maul et al. 1991, Block et al. 1993). Aquests valors de la taxa de creixement disminueixen radicalment a mesura que ens allunyem al llarg de la xarxa, especialment pel consum de la matèria orgànica, arribant a temps de duplicació de 72-288 dies (Block 1992). De fet, al voltant del 82% de la matèria orgànica biodegradable es consumeix després de 40 h (Block 1992).

Conseqüentment, el control de l'acumulació del biofilm requereix diferents tipus d'accions combinades, tant a nivell de la planta de tractament com de la xarxa de distribució, si es volen aconseguir sistemes de distribució estables biològicament (Block 1992). Tradicionalment, el control de l'extensió dels biofilms s'ha realitzat amb l'aplicació de biocides a la columna d'aigua, sense tenir en compte que l'adherència i la formació dels biofilms és un procés fonamental per desenvolupar la resistència a la desinfecció (LeChevallier et al. 1988), protegint a les cèl·lules sèssils de l'atac del clor residual. Els canvis en les condicions ambientals –nutrients, desinfectant o hidrodinàmica del medi– poden afavorir la separació de segments o parts del biofilm, fet que facilitarà l'extensió d'aquestes cèl·lules cap a la resta del sistema de distribució.

**Estructura dels biofilms a les xarxes de distribució.** L'estructura dels biofilms a les xarxes de distribució d'aigua potable acostuma a ser difícil d'estudiar per la gran quantitat de detritus, productes de corrosió i altres formes de matèria inorgànica. Òbviament, la desinfecció té una gran influència en l'estructura general de les poblacions naturals que formen els biofilms (Camper et al. 1999). En presència de clor les cèl·lules dels biofilms acostumen a disposar-se sobre la superfície en agregats, ocupant només determinades àrees i sense colonitzar la resta, on no s'observen organismes individuals. El biofilm acostuma a ser molt espars i les cèl·lules acostumen a ser més petites (50%), produint-se un canvi de morfologia on predominen les cèl·lules més arrodonides (Camper et al. 1999). L'activitat dels biofilms en aquests sistemes clorats acostuma a ser inferior als sistemes no clorats, amb un 5-60% de les cèl·lules actives (Camper et al. 1999, Block et al. 1993).

**Composició de la comunitat de microorganismes.** La superfície interna de les canonades del sistema de distribució d'aigua potable revela l'existència d'un ecosistema complet on predominen els diferents microorganismes, no només bacteris, adaptats als ambients aquàtics amb condicions oligotròfiques. Les diferents classes de microorganismes presents en aquests ambients es poden agrupar en 4 grups diferents (Maul et al. 1991):

- Espècies indígenes, que inclouen bacteris, llevats i fongs.
- Espècies adventícies, que arriben de forma fortuïta, com poden ser protozous i macroinvertebrats. Poden sobreviure i, fins i tot, multiplicar-se.
- Espècies perjudicials, perquè produeixen problemes de corrosió de materials (Lee et al. 1980) o incrementen la presència de partícules de ferro a l'aigua de consum (Victoreen 1974) o alteren les propietats organolèptiques de l'aigua, com el gust i l'olor en el cas dels *Actinomyces* o fongs (Olson 1982).
- Espècies perilloses, que provoquen problemes per a la salut pública quan proliferen els patògens a la xarxa.

Els organismes que colonitzen els materials de les canonades dels sistemes de distribució provenen d'origens diferents, encara que la majoria es poden trobar al proveïment d'aigua del sistema. Els biofilms serveixen de refugi a diferents microorganismes i poden afavorir el recreixement de bacteris heteròtrofs i coliformes, originant violacions de les regulacions existents (Camper et al. 1999). A més, cal tenir en compte la capacitat que presenten diferents patògens i oportunistes per colonitzar les superfícies de les canonades, produint infeccions gastrointestinals i altres infeccions nosocomials (United States Environmental Protection Agency 1992).

En general, la diversitat microbiana és un paràmetre que ens pot indicar la severitat o selectivitat de l'ambient d'una xarxa de distribució (LeChevallier et al. 1987), perquè no és gens estrany que s'observin augments de la diversitat a mesura que l'aigua s'allunya de la planta de tractament. A la Taula 3.3 es recullen alguns dels principals grups de bacteris aïllats a les xarxes de distribució d'aigües potables, així com la possible significació de cada un d'aquests grups.

A la fase planctònica la microbiota present en aquests sistemes varia entre  $10^2$ - $10^5$  cèl·lules/mL (viables i mortes) i entre  $1$ - $10^3$  Ufc/mL (Dollard et al. 1985), predominant els bacteris gram-negatius com els gèneres *Pseudomonas* i *Flavobacterium* (LeChevallier et al. 1987, Block 1992). Altres microorganismes presents en aquests sistemes són els fongs i llevats, en concentracions al voltant de  $1$ - $10^4$  cèl·lules/L i algues entre  $10^4$ - $10^6$  cèl·lules/L (Rizet et al. 1985), i protozous del gènere *Amoeba* i flagel·lats. A més, no és gens estrany detectar organismes patògens com *Legionella* (Hsu et al. 1984, Habicht & Muller, 1988), *Staphylococcus aureus* (LeChevallier et al. 1980), *Yersinia enterocolitica* (Schindler 1984) i altres. La presència d'alguns d'aquests organismes no sempre coincideix amb epidèmies en la població servida. De fet, diferents brots epidèmics que afecten a la població no poden associar-se mai a cap agent etiològic específic (Collin et al. 1981).

La població bacteriana adherida pot arribar a densitats entre  $10$ - $10^8$  Ufc/cm<sup>2</sup> (LeChevallier et al. 1987) malgrat que els valors més normals en presència de  $1$ - $2$  mg/L de clor lliure oscil·len entre  $1$ - $10^4$  Ufc/cm<sup>2</sup> (Nagy & Olson 1985). Les densitats cel·lulars estan normalment al voltant de les  $10^5$  cèl·lules/cm<sup>2</sup>, de les quals entre un 5-60% són viables (Block et al. 1993, Camper et al. 1999). Respecte als fongs els valors estarien entre  $0$ - $550$  Ufc/cm<sup>2</sup> per a la població de llevats i de  $0$ - $25$  Ufc/cm<sup>2</sup> per als fongs filamentosos (Nagy & Olson 1985).

L'heterogeneïtat dels biofilms condueix a la formació de micronínxols amb diferents condicions fisiològiques, químiques i estructurals (veure 1.1.2), fet que facilita la proliferació de tots aquests organismes. En aquest sentit, cal destacar la presència de gradients de Eh, pH, oxigen, nutrients, metabolits, EPS, etc. Així, els biofilms formats per poblacions de bacteris heteròtrofs poden actuar com a reservori enfront de les condicions ambientals per a microorganismes anaerobis o microaeròfils, com en el cas de *Legionella pneumophila* o *Campylobacter jejuni*.

El sistema de distribució es comporta en aquest aspecte com un gran reactor heterogeni amb zones diferents de comportament quasi independent, especialment pel que fa referència a la diversitat de les poblacions bacterianes (Block 1992). De fet, la distribució dels diferents tipus de bacteris al sistema no és homogènia, i certes zones apareixen dominades per determinades espècies. En general, els biofilms en aquests sistemes acostumen a desenvolupar-se com un consorci de microorganismes on s'hi poden refugiar bacteris aerobis i anaerobis, protozous, nemàtodes i fongs. Alguns d'aquests organismes poden sobreviure dins dels biofilms durant varies setmanes mantenint un estat infecció, com en el cas dels cists de *Cryptosporidium parvum* (Keevil et al. 1995).

Generalment, la majoria d'estudis sobre la composició de la comunitat dels biofilms en sistemes clorats han consistit en la monitorització de membres discrets, per determinar respostes específiques a variacions en les condicions ambientals. D'aquesta manera s'ha estudiat la distribució i presència d'indicadors de contaminació fecal i de bacteris patògens. La freqüència d'aïllament dels coliformes fecals (*Escherichia coli*) i dels estreptococs fecals (*Streptococcus faecalis*) acostuma a ser bastant baixa, amb valors del 0,3-2% de les mostres positives (Bourbigot et al. 1984). Els coliformes totals s'acostumen a detectar de forma més habitual (Geldreich 1986). Aquesta situació amb un compliment adequat de les normatives de salut pública es produeix típicament en ambients i zones urbanes, on l'esforç per monitoritzar la qualitat de l'aigua és més gran. Tanmateix, en localitats menys poblades i zones rurals és bastant freqüent l'incompliment de les regulacions sanitàries (Sworobuk et al. 1987).

**Taula 3.3.** Bacteris de les xarxes de distribució d'aigua potable i la seva possible significació (adaptat de diferents autors).

Microorganisme	Efectes potencials
<i>Acinetobacter</i>	Antagonista d'indicadors bacterians. Patogen oportunista
<i>Acromonas</i>	Patogen potencial, oportunista
<i>Actinomycece</i>	
<i>Aeromonas</i>	Patogen potencial, oportunista
<i>Alcaligenes</i>	
<i>Arthrobacter</i>	Antagonista d'indicadors bacterians, color a l'aigua
<i>Bacillus</i>	Antagonista d'indicadors bacterians, corrosió, reducció nitrats.
<i>Beggiatoa</i>	Color de rovell a l'aigua, oxidació de sofre
<i>Chromobacterium</i>	
<i>Citrobacter</i>	
<i>Clostridium</i>	
<i>Corynebacterium</i>	
<i>Crenothrix</i>	Color de rovell a l'aigua (bacteri del ferro)
<i>Desulfovibrio</i>	Aigües negres, producció H <sub>2</sub> S, corrosió
<i>Edwardsiella</i>	Patogen potencial, oportunista
<i>Empedobacter</i>	
<i>Enterobacter</i>	
<i>Escherichia</i>	Indicador de contaminació fecal
<i>Flavobacterium</i>	Patogen oportunista, Antagonista d'indicadors bacterians
<i>Flexibacter</i>	
<i>Gallionella</i>	Color de rovell a l'aigua (bacteri del ferro), corrosió
<i>Hafnia</i>	
<i>Klebsiella</i>	Patogen potencial
<i>Legionella</i>	Patogen potencial
<i>Leptothrix</i>	Color de rovell a l'aigua (bacteri del ferro)
<i>Methanomonas</i>	Oxidació de metà
<i>Micrococcus</i>	Reducció de nitrat, corrosió, Antagonista d'indicadors
<i>Moraxella</i>	Patogen oportunista
<i>Mycobacterium</i>	Patogen potencial
<i>Nitrobacter</i>	Producció de nitrat, corrosió
<i>Nitrosomonas</i>	Producció de nitrat, corrosió
<i>Nocardia</i>	Patogen potencial
<i>Proteus</i>	Antagonista d'indicadors bacterians
<i>Providencia</i>	Patogen oportunista
<i>Pseudomonas</i>	Patogen oportunista, antagonista d'indicadors bacterians
<i>Salmonella</i>	Patogen potencial
<i>Serratia</i>	Patogen oportunista
<i>Sphaerotilus</i>	Color de rovell a l'aigua
<i>Spirillum</i>	
<i>Sporosarcina</i>	
<i>Staphylococcus</i>	Patogen potencial
<i>Streptococcus</i>	Indicador de contaminació fecal
<i>Streptomyces</i>	Problemes d'olors i gust
<i>Yersinia</i>	Patogen potencial

Habitualment els coliformes creixen en forma de microcolònies més que en cèl·lules aïllades (Camper 1996), encara que si es transporten al biofilm en partícules de carbó actiu granular la majoria seguirà en forma de cèl·lules individuals (Morin et al. 1996). D'altra banda, en ambients on els nutrients són limitants alguns dels microorganismes heteròtrofs, els anomenats antagonistes de coliformes, entren en competència amb els coliformes dificultant el seu establiment als biofilms (LeChevallier & McFeters 1985b). Alguns estudis han mostrat la presència d'efectes sobre la salut pública amb la ingestió de només 10-50 mL d'una aigua – no clorada - amb una densitat relativament baixa de *Escherichia coli* (10/100 mL) (Payment et al. 1988).

En quan als patògens oportunistes, representarien al voltant del 30% de la població total, mentre que patògens com *Salmonella* poden adherir-se i persistir als biofilms fins a 50 dies en presència de clor, generalment en forma de cèl·lules individuals, mentre que altres com *Escherichia coli* O157:H7 poden desaparèixer a les 2 setmanes del biofilm (Camper et al. 1998).



**Proliferacions bacterianes a les xarxes de distribució.** El desenvolupament dels biofilms pot provocar tota una sèrie de problemes als sistemes de distribució d'aigua potable:

- Els bacteris poden ser l'inici d'una xarxa tròfica que condueixi a la proliferació d'organismes superiors indesitjables.
- Algunes espècies poden generar problemes de terbolesa, males olors i gustos.
- Recomptes elevats dels bacteris heteròtrofs (HPC) poden interferir amb la detecció dels coliformes o altres indicadors sanitaris
- Els biofilms augmenten la resistència a la fricció, reduint la capacitat de transport dels sistemes de distribució d'aigua
- Fallada del sistema de distribució violant els criteris establerts de qualitat de l'aigua (per coliformes o recomptes de bacteris heteròtrofs).

Diferents factors alguns d'ells encara no del tot ben coneguts poden ocasionar problemes importants, afavorint l'increment de la densitat de microorganismes amb el temps de residència i/o amb la distància de la planta de tractament al punt de distribució al consumidor. Es produeixen els anomenats **episodis o brots** amb la detecció a l'aigua final d'uns nivells de bacteris heteròtrofs i, especialment, de coliformes per sobre dels estàndards de qualitat. Quan es produeix la proliferació d'aquests bacteris –en suspensió o adherits- de forma crònica o periòdica es parla de **recreixement**. Aquestes proliferacions poden ser degudes a avaries del sistema de potabilització, on els bacteris passen a través del tractament i de les barreres de la desinfecció.

Tanmateix, és evident que el tractament potabilitzador més sofisticat no aconsegueix eliminar mai la totalitat dels microorganismes presents al sistema. Sempre roman una població de microorganismes vius ja sigui en estat danyat o intactes, d'aproximadament  $10^3/\text{mL}$ , un 0,1% del total original (Maul et al. 1991). Per tant, el sistema de distribució es contamina de forma permanent amb una microbiota en suspensió que, en una part important, passarà a formar part dels biofilms.

Tradicionalment la presència de coliformes a l'aigua de beguda s'utilitza com a indicador de contaminació fecal provocada per connexions-cruades, tractament inadequat o la impossibilitat de mantenir una concentració residual del desinfectant utilitzat. Avui en dia, la proliferació de coliformes en aigües tractades és una de les raons habituals que condueixen a l'incompliment de les regulacions establertes per aigües potables als diferents països (LeChevallier et al. 1996b). No obstant, alguns casos de recreixements bacterians i de coliformes a l'aigua de beguda poden no estar relacionats amb la presència de contaminació fecal o de patògens (LeChevallier et al. 1996b). Per aquest motiu, algunes agències governamentals han desenvolupat criteris per recollir una certa variança en la normativa que especifica la presència de coliformes a l'aigua de beguda (USEPA 1991).

Per poder créixer en aigües potables els coliformes necessiten, igual que altres bacteris heteròtrofs, tres factors bàsics que afavoreixen la seva proliferació: nutrients, refugi i condicions ambientals favorables. Només la manca d'aquests tres factors de manera simultània pot impedir el creixement d'aquests organismes a les xarxes de distribució (LeChevallier et al. 1996b).

Carboni, nitrogen i fòsfor són els **nutrients** més importants pels bacteris heteròtrofs i els coliformes, en una relació 100:10:1 per a un creixement equilibrat (Camper 1994). Per aquest motiu, el carboni orgànic es converteix sovint en el nutrient limitant i en el responsable del recreixement dels coliformes en plantes reals (Camper 1994). Com a excepció, es coneixen alguns casos on el fòsfor pot arribar a ser limitant, depenent del creixement de la presència de fosfats a la xarxa de distribució d'aigua potable (Miettinen et al. 1997).

La varietat de substàncies orgàniques que es troben a les aigües potables, amb prop de 200 compostos coneguts (Maul et al. 1991), han afavorit l'ús de paràmetres més generals com el carboni orgànic assimilable i el carboni orgànic dissolt biodegradable (a partir d'ara AOC i BDOC respectivament), per a la determinació del nivell de nutrients. Tots dos són indicadors de la bioestabilitat de l'aigua i es poden utilitzar per monitoritzar els processos de tractament. El carboni orgànic assimilable (AOC) és la fracció de la matèria orgànica dissolta (DOC) que és utilitzada pels bacteris i es converteix en biomassa i, per tant, es mesura a partir del creixement bacterià màxim ( $N_{\text{max}}$ ) que cada mostra pot promoure.

El BDOC ens dóna en canvi una mesura del carboni orgànic consumit per les comunitats microbianes, i es mesura per la disminució de DOC a les mostres en un període definit de temps (Joret 1988, Frias et al. 1992). Com a conseqüència directa de la biodegradació-assimilació de la matèria orgànica (disminució BDOC) s'incrementa el nombre de cèl·lules (Servais et al. 1991).

De fet, s'ha senyalat a la fracció assimilable (AOC) com el principal nutrient responsable dels recreixements de coliformes i de bacteris heteròtrofs que es produeixen a la xarxa (LeChevallier et al. 1987, van der Kooij 1992). Teòricament es poden establir uns valors mínims de nutrients per fomentar el desenvolupament de biofilms. En general, els coliformes són organismes força copiotròfics, és a dir, necessiten nivells elevats de nutrients per iniciar el recreixement (LeChevallier & McFeters 1985b). Les concentracions llindar de AOC es situen als 10 µg C/L pels heteròtrofs (van der Kooij 1992) i de 50 µg C/L pels coliformes (LeChevallier et al. 1996a). Respecte al BDOC, diferents autors assenyalen els 0,15 mg/L com a llindar associat a l'estabilitat biològica de l'aigua i per controlar el creixement dels bacteris heteròtrofs (bacteris HPC) en aigües sense clor residual (Servais et al. 1993). De fet, s'han relacionat episodis de coliformes amb l'augment per sobre dels 0,15 mg/L als nivells de BDOC del sistema de distribució (Volk & Joret 1994).

En alguns casos, l'augment microbià associat a nivells elevats de AOC es produeix, fins i tot, en presència d'un residual de clor: sistemes amb valors de AOC elevats necessiten nivells més alts de desinfecció per assegurar la qualitat bacteriològica (LeChevallier et al. 1996a). Això ens suggereix que la reducció en els nivells de AOC del sistema de distribució pot repercutir de manera molt efectiva en la disminució del residual de clor necessari.

S'ha de ressaltar la importància de les partícules inorgàniques que contenen els biofilms dels sistemes de distribució. Els últims estudis realitzats remarquen com algunes partícules de corrosió, per exemple els òxids de ferro, influeixen en el creixement de les poblacions dels biofilms d'ambients oligotròfics (Camper et al. 1999). Altres autors indiquen que són necessaris 20 mg/L d'òxid de ferro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) per estimular el creixement dels coliformes (Victoreen 1984). Aquests productes de corrosió tenen un gran potencial per a l'adsorció de matèria orgànica (NOM) i, especialment, de substàncies húmiques. Aquestes, tant els àcids fúlvics com els húmics, són un dels components majoritaris de la matèria orgànica (50-75% en aigües superficials i valors inferiors en aigües subterrànies), i presenten una gran capacitat per adsorbir-se a la superfície dels productes de la corrosió (Gu et al. 1994). Malgrat que es consideren com a poc biodegradables a la fase líquida, avui en dia existeixen evidències que demostren la utilització biològica de les substàncies húmiques. És probable que alguns mecanismes, no coneguts encara, facilitin la seva biodisponibilitat quan s'adsorbeixen a les superfícies (Camper et al. 1999). De confirmar-se aquesta teoria s'hauria de revisar la metodologia d'anàlisi del AOC/BDOC per mesurar el potencial de recreixement, ja que actualment només es té en compte el carboni orgànic en dissolució.

Alguns dels materials utilitzats en la construcció de les xarxes de distribució poden afavorir el creixement microbià (Schoenen & Scholer 1985). Els problemes més importants de colonització microbiana en canonades de materials plàstics acostumen a presentar-se quan aquestes són exposades a aigües amb presència de productes de corrosió, conseqüència d'un elevat contingut de ferro a l'aigua o de la presència d'altres tuberries d'acer a la xarxa (Camper 1996). Altres partícules, com les de carbó actiu granular poden facilitar la transmissió de coliformes i altres microorganismes de la fase líquida al biofilm (Morin et al. 1996). El control de la corrosió utilitzant inhibidors i reduint la quantitat i extensió de les canonades d'acer aconsegueix, moltes vegades, la reducció dels productes de corrosió i del nombre de microorganismes (LeChevallier et al. 1996a, Camper et al. 1999)

Els microorganismes que creixen a la xarxa de distribució troben **refugi** en els biofilms. En aquest cas, entre els avantatges ecològics del creixement en forma sèssil cal citar l'aprofitament dels nutrients acumulats a la interfase sòlid-líquid, l'increment en el transport de nutrients i la protecció enfront dels depredadors i el desinfectant (Characklis & Marshall 1990). Respecte a aquest últim factor, la majoria de les vegades el simple increment en la concentració de clor no és suficient per controlar la presència dels coliformes o dels bacteris heteròtrofs. Això és perquè els bacteris que creixen a les superfícies de les canonades

poden ser varies vegades (centenars) més resistents a la desinfecció amb clor que les cèl·lules planctòniques (LeChevallier et al. 1987, 1988). Aquest fet sembla ser especialment important en superfícies de canonades d'acer, ja que els materials d'aquestes tuberies incrementen la demanda de clor (LeChevallier et al. 1990).

D'altra banda, la corrosió en canonades d'acer pot produir tubercles que incrementen la superfície de la canonada, augmenten la barreja hidràulica i el transport de nutrients a la superfície (biofilm), produeixen la precipitació de compostos orgànics en forma de dipòsits superficials i proporcionen esclatxes i altres esquerdes on els bacteris es poden protegir de l'acció dels desinfectants (LeChevallier et al. 1996b). Tenint en compte tots aquests fets l'estudi d'algun índex de corrosió es converteix en una eina de diagnòstic important per a les plantes potabilitzadores. En aquest sentit s'ha utilitzat l'índex de Larson, que ens dóna la proporció entre la concentració molar de clorurs i sulfats, i els bicarbonats.

La quantitat de dipòsits i tancs de reserva també és un factor que s'ha relacionat amb els episodis de coliformes. Aquests faciliten la contaminació, el creixement microbià als sediments i la dissipació del clor, incrementant els nivells de AOC degut a la redesinfecció (LeChevallier et al. 1996b). Altres zones que afavoreixen el creixement microbià són els filtres de carbó actiu granular o de sorra de les plantes de tractament potabilitzador. A més, alguna d'aquestes partícules poden passar a la xarxa carregades de microorganismes (Camper et al. 1999).

Tenint en compte que la majoria d'organismes que ocupen els sistemes de distribució ja estan adaptats als ambients pobres en nutrients, la variació de les **condicions ambientals** pot influir de forma decisiva, facilitant en alguns casos l'aparició de recreixements bacterians. La temperatura és probablement el factor que més influència té sobre el creixement microbià, de forma directa o indirecta. Actua sobre paràmetres com la taxa de creixement microbià, l'eficiència de la desinfecció, la dissipació dels residuals del desinfectant, la taxa de corrosió, la hidràulica i la velocitat de l'aigua al sistema de distribució degut a les alternances diàries i estacionals en l'ús. De fet, sembla existir una relació directa entre la temperatura de l'aigua i la densitat de la població bacteriana adherida (Donlan & Pipes 1988). Malgrat que depèn de cada sistema i de la climatologia local, en general s'ha determinat que la possibilitat de recreixement dels coliformes augmenta per sobre dels 15°C (LeChevallier et al. 1996b). Increments de nutrients associats amb el rentat provocat per la precipitació i lixiviació dels materials de les canonades poden ajudar a incrementar el creixement microbià (Camper 1994).

Cal recordar que el manteniment d'una concentració residual de clor al llarg del sistema de distribució s'utilitza per produir unes condicions desfavorables per als microorganismes. En general, es recomana un residual mínim de 0,5 mg/L de clor lliure (AWWA 1990). Òbviament i segons el que s'ha explicat, aquest residual no sempre garanteix l'eliminació dels episodis de coliformes. A part, la cloració de la xarxa pot inactivar –o danyar– la majoria de cèl·lules planctòniques, donant la impressió que el clor està exercint l'efecte buscat, amb un resultat de no detecció de bacteris a l'aigua. Al mateix temps, el clor pot no afectar la formació del biofilm, sense interferir en les causes de proliferacions microbianes. A part, els agents oxidants com el clor trenquen les cadenes d'elevat pes molecular dels compostos orgànics en àcids orgànics simples, augmentant les possibilitats de creixement pels bacteris heteròtrofs (van der Kooij et al. 1989). Per tant, el clor pot emascarar en realitat un problema no resolt, l'acumulació de bacteris en forma de biofilm a la interfase aigua-canonada.

Respecte al tipus de desinfectant la interacció del clor amb la matèria orgànica natural (NOM) resulta en uns subproductes com els trihalometans dels quals es sospita de la seva carcinogenicitat. Tanmateix, el canvi a un altre desinfectant com l'ozó pot augmentar –per la seva reacció amb la matèria orgànica– les possibilitats de creixement dels microorganismes (Clark et al. 1994).

El tipus de règim hidràulic, controlat pel disseny original, depèn en gran part de la demanda d'aigua de l'usuari. Així, són freqüents les fortes oscil·lacions estacionals i diàries entre els màxims periòdics al matí i a les tardes, i el mínim nocturn. Les condicions de flux elevat poden incrementar el transport de nutrients als organismes adherits, encara que també s'incrementa el flux del desinfectant i l'esforç de cisalla a la superfície. Aquest últim, afavoreix el despreniment de capes del biofilm de la

mateixa forma que amb el cop d'ariet, quan s'obre o es tanca una vàlvula de forma brusca. Situacions de flux reduït poden conduir a la disminució en les concentracions del desinfectant i afectar el transport de nutrients.

Un altre factor relacionat que influeix en la distribució dels organismes és el temps de residència de l'aigua al sistema, perquè les concentracions de AOC i BDOC acostumen a disminuir a mesura que l'aigua es mou a través del sistema de distribució (LeChevallier et al. 1987, van der Kooij 1992). Finalment, les pluges també s'han associat als episodis de recreixement bacterià i de coliformes, perquè poden incrementar els nivells de matèria orgànica biodegradable al rentar els nutrients dissolts (LeChevallier et al. 1996b). La falta de pluja en temps de sequera pot repercutir en un augment dels nutrients a l'aigua, fet que pot estimular la corrosió i el creixement bacterià.

Degut a la relativa ineficàcia de molts dels desinfectants l'estratègia de control dels microorganismes adherits i dels episodis de recreixements en xarxa es converteix en un afer complex que requereix una acció continuada, on interaccionen diferents paràmetres físics, químics, biològics, operacionals i d'enginyeria. Especialment, s'ha de procurar mantenir un règim hidràulic adequat i limitar el carboni orgànic biodegradable, així com la concentració de cèl·lules bacterianes en suspensió a l'aigua que entren al sistema. El manteniment d'una concentració residual de clor i el control de la corrosió, el rentat periòdic del sistema de distribució ("flushing"), la utilització de la filtració amb sorra o amb carboni actiu granular (GAC) per augmentar l'activitat microbiana i disminuir alhora els nivells de carboni orgànic (AOC), i el manteniment adequat dels dipòsits i tancs de reserva, són alguns dels factors on es pot actuar per gestionar de forma correcta la xarxa de distribució i reduir al màxim els problemes microbiològics.

### 3.2. Material i Mètodes

Per poder avaluar i aplicar el sistema experimental per a la colonització de superfícies i monitoritzar el desenvolupament de biofilms a partir d'aigües subterrànies, s'han utilitzat dues estacions experimentals: una prop del Besós, a partir del pou d'Alfons el Magnànim al barri de Sant Martí (Barcelona), i l'altre a Sabadell, a Can Oriac. Les dades obtingudes s'han comparat amb un tercer sistema que s'ha utilitzat per determinar la formació de biofilms a partir d'una xarxa de distribució d'aigua potable (Laboratori Microbiologia, EUOOT).

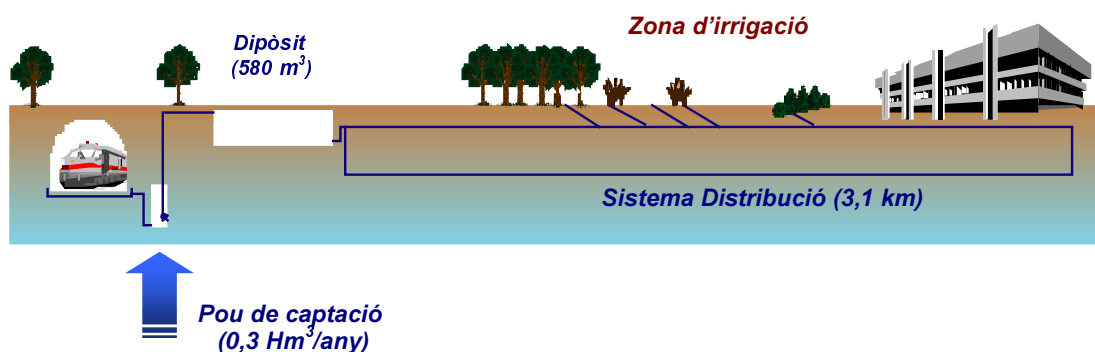
#### 3.2.1. Zona de mostreig I: Pou d'Alfons el Magnànim (Sant Martí-Besós)

Aquesta estació experimental aprofita l'aigua de l'aqüífer al·luvial de la conca del riu Besós, situat al nord de Barcelona. La instal·lació (veure Figura 3.2) capta un cabal de 36 m<sup>3</sup>/h de forma ininterrompuda del pou 4.16.3 de la línia 4 del metro, situat entre les estacions de Besós i Besós Mar, al carrer d'Alfons el Magnànim (districte de Sant Martí, Barcelona).

En aquesta àrea el nivell freàtic es troba situat generalment a 3-6 metres per sota de la superfície, encara que oscil·lacions periòdiques poden jugar un paper important en la dispersió dels contaminants. En aquest sentit, a la zona es trobaven algunes extraccions d'àrids que van ser reomplertes antigament amb residus urbans i industrials.

A part, el pou d'esgotament (pou de captació) recull altres aportats d'aigües d'origen divers, encara que cal destacar els aportats de fuites del sistema de distribució, del sistema de clavegueram, abocaments de residus industrials líquids d'instal·lacions industrials en mal estat i infiltracions de metalls pesants de sòls contaminats prop d'indústries (Navarro et al. 1996).

L'aigua del pou de captació és conduïda (veure Figura 3.2) per una tuberia de polietilè i es trasllada a través de 600 m pel carrer d'Alfons el Magnànim fins al dipòsit acumulador de 580 m<sup>3</sup> de capacitat neta, que es troba a la confluència d'aquest carrer amb el carrer de Llull. En aquest punt es disposa la sala de bombeig amb una potència instal·lada de 50 CV, capaç de bombar fins a 100 m<sup>3</sup>/h a una velocitat de 1,36 m/s a través d'una xarxa de distribució de 16 bar de pressió i una longitud de 3.100 m. Aquesta xarxa de distribució travessa el barri del Poble Nou arribant fins a la Vila Olímpica per l'interior de la galeria de serveis de Rambla Prim i el Passeig de Garcia Faria. En aquesta primera fase es rega una superfície total de 146.000 m<sup>2</sup> de 4 parcs i parterres viaris.



**Figura 3.2.** Esquema del projecte pilot de reutilització d'aigües freàtiques a partir del pou d'Alfons el Magnànim (Sant Martí, Barcelona).

**Esquema del sistema experimental.** A l'estació experimental de Sant Martí s'han disposat dos sistemes per monitoritzar el desenvolupament de biofilms. El primer capta l'aigua directament del pou de captació 4.16.3 de la línia 4 del metro, i el segon s'ha situat a la sala de bombeig a partir de l'aigua del dipòsit (veure Figura 3.3).

Per bombar l'aigua del pou i extreure-la fins a la canonada de servei existeixen dues bombes centrífugues, que poden proporcionar un cabal de 20 m<sup>3</sup>/h. Aquestes bombes es posen en marxa quan el nivell de l'aigua arriba als 3 metres d'alçada, baixant 1,5 metres després d'una hora de funcionament. Per instal·lar el sistema de monitorització del desenvolupament de biofilms s'ha utilitzat una altra bomba auxiliar, que ha permès realitzar l'assaig en continu i estudiar, de forma accelerada, la formació de biofilms en aquest tipus d'aigües (veure Figura 3.3-A).

Per facilitar la recollida de les mostres, el sistema experimental s'ha situat a la superfície del pou (veure Figura 3.3-A), fet que ha condicionat de forma important l'elecció de la bomba. A la Taula 3.4 es detallen algunes de les característiques d'aquest pou de captació. En principi, les bombes de superfície són econòmicament força més assequibles i de manteniment més senzill, però no poden bombar aigua des de qualsevol profunditat, ja que del contrari es produeixen fenòmens de cavitació o formació de vapor a l'interior de la bomba, amb els problemes que això comporta. Les bombes submergides, en canvi, no presenten aquests problemes però el seu preu és força més car que les bombes de superfície, per a les mateixes condicions de cabal i pressió.

**Taula 3.4.** Característiques principals del pou de captació d'Alfons el Magnànim (Sant Martí-Besós).

Pou de captació-Besós (4.16.3)		
Dimensions	Alçada	3 m
	Amplada	5 m
	Llarg	5 m
	Volum	75 m <sup>3</sup>
	Profunditat sota la superfície	15 m
Condicions físiques	Temperatura	19°C

Tenint en compte que s'haurien de bombar aproximadament 16.000 L/h des d'una profunditat de 3 metres, i amb una pressió necessària de 3 m, es va optar per triar una bomba submergida. El model escollit, ESPA Acuaría 40-4 (Espa, Banyoles), relativament sobredimensionat, presenta una corba característica bastant vertical perquè ens interessa controlar el cabal per poder determinar la pèrdua de carrega i tots els paràmetres hidrodinàmics. Per tant, es tracta d'una bomba que a variacions grans d'alçada manomètrica no presentarà variacions brusques de cabal.

L'aigua bombada passava a través de les tuberies fins al sistema experimental sortint per la part superior del mateix de forma que cobria tot el sistema, retornant cap al mateix pou a través d'una altra canonada que disminuïa la formació de turbulències (veure Figura 3.3-A).

El segon sistema experimental es va instal·lar dins de la sala de bombeig situada a costat del dipòsit de reserva de 580 m<sup>3</sup> de capacitat neta, que es troba a la confluència d'Alfons el Magnànim amb el carrer de Llull. En aquest cas es va aprofitar la pressió exercida per l'aigua del dipòsit (3 mca), per impulsar l'aigua del mateix fins al sistema experimental (veure Figura 3.3-B). No va ser possible retornar l'aigua que surt del sistema al dipòsit, per la qual cosa es va dirigir a la canonada secundària de la sortida general del sistema de reg (veure Figura 3.3-B), que es troba al mateix nivell que el sistema experimental. Per aquest motiu, per al bombament de l'aigua de sortida del sistema es va poder utilitzar una bomba de menys capacitat, com el model ESPA Dip 120 (Espa, Banyoles).

### 3.2.2. Zona de mostreig II: Sabadell

L'estació experimental de Sabadell està situada al nord-oest de la ciutat i al final de la mina de Ribatallada, en unes instal·lacions de la Companyia d'Aigües de Sabadell (CASSA) al barri de Can Oriac. La mina de Ribatallada recull les aigües que provenen del torrent de Botelles i del torrent de Casa Font, els quals s'uneixen per formar el torrent de Ribatallada. Malgrat les poques dades existents, és evident que la pròpia naturalesa dels materials que constitueixen el subsòl de la plana vallesana permet la infiltració de les aigües de pluja, afavorint la constitució d'aqüífers importants. La mina s'origina prop de la font de Botelles (cota 291,75 m), segueix pel torrent de Botelles, passa prop de l'ermita de Sant Julià d'Altura (306 m) i després de creuar la carretera de Matadepera arriba fins a Can Oriac (228 m), on s'emmagatzema al dipòsit del carrer Nàpols. En total, la mina realitza un recorregut d'aproximadament 4 km, i va servir per proveir d'aigua potable a la zona alta de Sabadell fins a 1993 (107 milions de litres durant 1993). A partir d'aquest any, problemes microbiològics van obligar a suspendre el seu aprofitament. Probablement, la presència de les urbanitzacions de Can Font i Ca n'Avellaneda han presentat un impacte negatiu sobre la qualitat microbiològica de l'aigua. Actualment les aigües de la mina de Ribatallada s'utilitzen només per a certs usos no potables, com la neteja de carrers i per l'extinció d'incendis.

Tot i que actualment aquesta explotació es troba en desús, presenta unes bones perspectives de cara a la possible reutilització de l'aigua freàtica pel reg de parcs i jardins urbans. En aquest sentit, cal destacar que es troba just al límit entre el barri de Can Oriac i el nou desenvolupament urbà de Can Llong. Can Llong és una de les últimes zones on s'està realitzant un gran projecte d'urbanització a Sabadell. Aprovat al Pla General de 1993, ocupa 642.700 m<sup>2</sup> de superfície i es preveu construir 3.000 habitatges. La presència de zones enjardinades serà bastant important, ja que en la seva fase inicial el projecte preveu la plantació de 1.053 arbres, 3.852 m<sup>2</sup> de gespa i 288 arbustos (Ajuntament de Sabadell 1998). Posteriorment, en una segona fase es realitzarà el Parc de les Aigües amb 64.000 m<sup>2</sup>, gran part d'ells corresponents a zones enjardinades i, com el seu nom indica, amb la presència d'una gran làmina d'aigua que oferirà als visitants l'aspecte d'un llac urbà.

**Esquema del sistema experimental a Sabadell.** El sistema per monitoritzar el desenvolupament de biofilms es va posar a les instal·lacions de CASSA, tal com es mostra a la Figura 3.4. Es va afegir una bomba auxiliar igual que en el cas del pou de captació del Besós, per poder realitzar l'assaig en continu i estudiar de forma accelerada la formació de biofilms en aquest tipus d'aigües. La situació, bona accessibilitat i manca de profunditat de les mines d'aigua dins de la instal·lació de CASSA al dipòsit del carrer Nàpols, van facilitar el mostreig i la recollida de les mostres. El sistema experimental es va instal·lar dins d'una de les mines, en una de les ramificacions finals que arriben al dipòsit (Figura 3.4). Tots aquests factors han ajudat a simplificar l'elecció de la bomba. Es va optar per una bomba de superfície situada molt a prop de la mina, la qual presenta una fondària mitjana de 40 cm. Es va escollir la bomba centrífuga horitzontal ESPA Aspri 20/3 (Espa, Banyoles), amb capacitat per bombar de 30-72 L/min a una alçada de 35-15 m. L'aigua bombada passava a través de les tuberies fins al sistema experimental situat a dins mateix de l'aigua de la mina, i sortia per la part superior del mateix (veure Figura 3.4, part inferior).

### 3.2.3. Zona de Mostreig III: Lab. Microbiologia EUOOT

La tercera estació experimental es va situar al Laboratori de Microbiologia de l'Escola Universitària d'Òptica i Optometria de la UPC a Terrassa, per estudiar la formació de biofilms en una xarxa de distribució d'aigua potable. Les dades obtingudes s'han utilitzat per avaluar el potencial de formació de biofilms en sistemes d'aigua potable i, alhora, comparar les dades obtingudes amb els sistemes d'aigües freàtiques on no es realitza cap tipus de desinfecció. Per això, es va seleccionar una xarxa de distribució interna dins de l'edifici de l'Escola Universitària d'Òptica i Optometria (Lab. Microbiologia, EUOOT, UPC), perquè representa l'últim pas en un sistema de distribució abans d'arribar a l'usuari.

L'aigua potable prové de les instal·lacions de Mina Pública de Terrassa, on es capta l'aigua del riu Llobregat a l'alçada d'Olesa de Montserrat i es tracta en una ETAP. En treballs previs es va estudiar la resistència bacteriana al clor, aïllant una gran varietat de microorganismes de les diferents etapes del tractament potabilitzador d'aquesta planta (Mir et al. 1997).



**Figura 3.3.** Situació dels sistemes experimentals per la monitorització del desenvolupament de biofilms al projecte pilot de reutilització d'aigües freàtiques de Sant Martí, a Barcelona: A) Pou de Captació, imatges a la part inferior, B) Dipòsit de reserva, imatges a la part superior.





**Figura 3.4.** Monitorització del desenvolupament de biofilms a partir de l'aigua subterrània de la mina de Ribatallada, Sabadell. Part superior, final del barri de Can Oriac i part del futur barri de Can Llong. Part inferior, mina de Ribatallada al dipòsit de Nàpols (instal·lacions de CASSA) i detall de la bomba d'impulsió d'aigua i del sistema experimental situat dins d'una de les mines.

**Esquema del sistema experimental a l'EUOOT.** Es va disposar un sistema experimental format per 5 mostrejadors de llit empaquetat, de la forma habitual. Aquest sistema es va connectar a una de les aixetes del laboratori de Microbiologia de l'EUOOT, mitjançant tuberia de nylon (Neoplast Ultravinil transparent). El cabal es va regular amb una clau d'esfera situada prèviament a l'aixeta. L'aigua regulada per la clau d'esfera passava directament a través dels reactors del sistema experimental i sortia per la part superior dels mateixos. El sistema es va deixar dins de la pica, de forma que l'aigua cobria tot el sistema, anant l'excés cap a la canonada de sortida i al clavegueram.

#### 3.2.4. Anàlitzes microbiològiques de mostres planctòniques i del biofilm

**Mostreig i transport de les mostres.** S'ha realitzat un mostreig mensual de l'aigua de les estacions de monitorització, per analitzar les poblacions de microorganismes planctònics (veure PNT-9). Les mostres es transportaven al laboratori de Microbiologia segons les recomanacions de *Standard Methods* (Eaton et al. 1995), en botelles Schott estèrils a la foscor i dins d'una nevera portàtil a 4°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). Les mostres es mantenien dins del laboratori en un refrigerador a 4°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). Les diferents anàlitzes microbiològiques es van realitzar dins de les primeres 8 hores següents al mostreig.

Per a l'anàlisi de les mostres de biofilm adherides al material de suport es retirava cada reactor de llit empaquetat després que l'aigua hagués circulat pel seu interior durant períodes predeterminats de temps. Els reactors s'agafaven amb les màximes condicions d'asèpsia i es posaven dins d'ampolles Schott estèrils plenes amb l'aigua del mateix origen. En el lloc desocupat es situava un altre reactor estèril, per a una anàlisi posterior. El transport de les mostres per a l'estudi de la formació de biofilms es realitzava de la mateixa forma que en les mostres planctòniques, tal com s'ha descrit anteriorment.

**Medis de cultiu, incubació i recompte de viables.** La Taula 3.5 mostra els diferents medis de cultiu utilitzats per a l'estudi de les mostres planctòniques i de biofilm, en les anàlisis rutinàries realitzades cada mes, així com en les anàlitzes completes realitzades una vegada cada dos mesos, seguint recomanacions de *Standard Methods* (Eaton et al. 1995).

Per poder determinar la composició i concentració de microorganismes dins de la fase planctònica i del biofilm, l'aigua de cada estació de mostreig i la mostra sonicada del biofilm respectivament, es van diluir de forma seriada en solució salina estèril (NaCl al 0,9%) i es van inocular en diferents medis selectius i no selectius.

Les mostres s'han analitzat per determinar el recompte de bacteris heteròtrofs totals (HPC, veure PNT-2 a l'annex), utilitzant la tècnica de la filtració per membrana, d'acord amb *Standard Methods* (Eaton et al. 1995), amb filtres de 0,45  $\mu\text{m}$  de grandària de porus i l'agar PCA.

**Taula 3.5.** Medis de cultiu utilitzats per a l'estudi de les mostres planctòniques (A) i de biofilm (B), en anàlisi rutinari (N) i complet (C).

Medi de cultiu	Paràmetre Microbiològic	A	B
R2A	Bacteris heteròtrofs totals	N	N
PCA	Bacteris heteròtrofs totals	N	N
Chromocult Coliform Agar	Coliformes totals, <i>E. coli</i>	N	N
Agar Sabouraud amb gentamicina	Fongs filamentosos	N	N
Agar GSP + Penicilina	<i>Pseudomonas</i> , <i>Aeromonas</i>	N	N
Agar SPS	Clostridis sulfit-reductors	C	C
Agar Middlebrook 7H10 + OADC	<i>Mycobacterium</i>	C	C
Agar GVPC	<i>Legionella</i>	C	C

Degut a l'existència de microorganismes, especialment bacteris, capaços d'escapar a la detecció amb els filtres de 0,45 µm (Shirey & Bissonnette 1991), s'han escollit els filtres de 0,22 µm amb l'agar R2A com a metodologia rutinària, per maximitzar la detecció dels bacteris heteròtrofs totals. Les mostres d'agar PCA s'han incubat a 37°C durant 48, 72 hores i 7 dies, mentre que les mostres d'agar R2A s'han incubat a 22°C durant 7 dies. Es va determinar el total de bacteris heteròtrofs en agar PCA i en R2A comptabilitzant el nombre d'unitats formadores de colònies (Ufc) per volum en el cas de mostres planctòniques, o per unitat d'àrea (cm<sup>2</sup>) en el cas de mostres sèssils de biofilms.

### 3.2.5. Identificació dels microorganismes

**Aïllament i resembra dels microorganismes.** A les diferents estacions mostrejades es van aïllar diferents membres de la microbiota autòctona de l'aigua, tant de la fase planctònica com del biofilm. La diferenciació es va realitzar en base a característiques colonials després de l'aïllament en diferents medis de cultiu sòlids. La Taula 3.5 mostra els principals medis de cultiu utilitzats per a l'estudi de les mostres planctòniques i de biofilm, seguint recomanacions de Standard Methods (Eaton et al. 1995).

Els coliformes totals i *Escherichia coli* es van enumerar i aïllar amb la tècnica de filtració per membrana (veure PNT-3 a l'annex), amb filtres de 0,45 µm i el medi Chromocult Coliform Agar, incubant a 35°C durant 24 h. Les *Escherichia coli* aïllades al medi Chromocult Coliform Agar es van verificar amb la prova de l'indol, utilitzant el reactiu indol de Kovacs o el kit d'identificació ràpida Bactident® E. coli, que detecta alhora l'activitat β-D-glucuronidasa i triptofanasa (producció d'indol).

La detecció i quantificació dels fongs filamentosos s'ha realitzat utilitzant la tècnica de la filtració per membrana amb filtres de 0,45 µm de grandària de porus, utilitzant el medi Agar Sabouraud suplementat amb sulfat de gentamicina com a antibacterià, i incubant a temperatura ambient (22°C) durant 7 dies (veure annex, PNT-4).

Els bacteris del gènere *Pseudomonas* i *Aeromonas* s'han enumerat amb la tècnica de la filtració per membrana amb filtres de 0,22 µm de grandària de porus, utilitzant el medi Agar GSP suplementat amb Penicilina G-Sal sòdica (100.000 UI-0,06 g/L), i incubant a temperatura ambient (22°C) durant 72 hores (veure annex, PNT-5).

Els clostridis sulfit-reductors s'han enumerat amb la tècnica de la filtració per membrana amb filtres de 0,45 µm de grandària de porus, utilitzant el medi Agar SPS, després de realitzar un tractament tèrmic (5 minuts a 80°C) per eliminar les formes vegetatives. Els filtres es dipositaven posant la seva part superior en contacte amb el medi a sobre de plaques estèrils, i es cobrien després amb més medi de cultiu. Les mostres s'incubaven dins de gerres anaeròbiques a 37°C, durant 24-48 h (veure annex, PNT-6).

Els bacteris del grup *Mycobacterium* s'han enumerat amb la tècnica de la filtració per membrana amb filtres de 0,45 µm de grandària de porus, després de descontaminar les mostres amb 30 min d'exposició a 0,005% p/v de clorur de cetil-piridini (Schulze-Röbbbecke et al. 1992, Papapetropoulou et al. 1997). Els filtres de membrana s'han incubat amb el medi Agar Middlebrook 7H10 suplementat amb OADC, a 35°C durant 2 mesos (veure annex, PNT-7). Cada tipus colonial amb una morfologia, pigmentació i taxa de creixement característiques, s'aïllava i es sotmetia a la tinció àcid-alcohol resistent segons el protocol de Ziehl-Neelsen, realitzant el recompte de les colònies de bacils àcid-alcohol resistents. Finalment, *Legionella* s'ha enumerat amb el mètode de la sembra en superfície (Dennis et al. 1984, AFNOR 1993, veure PNT-8 a l'annex). La mostra es concentra amb filtres de 0,22 µm i s'extreu posant el filtre 3 min en un bany d'ultrasons, semblant posteriorment volums coneguts en la superfície de medis selectius, abans i després de sotmetre'ls a tres tractaments diferents per eliminar part de la flora acompanyant: un pre-tractament àcid centrifugant la mostra 20 min a 2.500 rpm i barrejant-la després amb igual volum de tampó HCl-KCl, un tractament tèrmic exposant la mostra a 50°C durant 30 min i un control sense cap pre-tractament. Els filtres de membrana s'incubaven en l'agar GVPC a 37°C durant 3-5-10 dies. Les colònies sospitoses es resembren en l'Agar BCYE-Cys i en agar CASO. S'han considerat com sospitoses de *Legionella pneumophila* qualsevol soca de morfologia sospitosa en GVPC i BCYE-Cys, que no creixi en l'agar CASO.

**Identificació bioquímica de bacteris.** Després del període d'incubació adequat per a cada medi de cultiu es procedia a la selecció de les morfologies colonials predominants per al seu estudi i identificació (LeChevallier et al. 1980). La caracterització sol incloure en el seu ordre d'execució: 1) identificació colonial, 2) aïllament i resembra, 3) tinció de gram i observació microscòpica i, 4) identificació bioquímica.

Després de descriure els tipus colonials (Parker & Dueren 1990), i fer el recompte del total de colònies existent de cada tipus, la colònia bacteriana escollida per a la identificació es resembra en un medi selectiu apropiat. El microorganisme seleccionat es tenyia amb la tinció de Gram utilitzant el mètode de Hucker (Cowen 1974) i es procedia a la seva observació al microscopi a x1000, amb oli d'immersió.

Per a la identificació bioquímica s'han utilitzat bàsicament els kits d'identificació API 10S (Biomerieux 10-100), per a Enterobacteris i altres bacils Gram-negatius, així com el API 20 NE (Biomerieux 20-050) per a la identificació de bacils Gram-negatius no enterobacteris. Les colònies obtingudes a les resembres s'han utilitzat per inocular la tira de reactius en cada cas seguint les instruccions del fabricant, i per fer el test de la oxidasa segons el reactiu Bactident Oxidasa (Merck 1.13300). Les tires de reactius s'han incubat 24 h i s'han anotat els resultats. La identificació dels microorganismes s'ha realitzat utilitzant els perfils analítics API (Phillips & Amsterdam 1977) adequats en cada cas, i comparant els resultats obtinguts amb la base de dades Probabilistic Identification Bacteria (Trevor Bryant, Freeware Version 1.0).

**Identificació morfològica dels fongs filamentosos.** S'ha realitzat una selecció de les morfologies colonials predominants dels fongs filamentosos per al seu estudi i identificació, tant en el cas de mostres planctòniques com de biofilm. S'ha realitzat una identificació temptativa utilitzant "Medically Important Fungi. A guide to identification" (Larone 1993), i "Illustrated genera of imperfect fungus" (Barnett & Hunter 1972).

### 3.2.6. Recompte directe: Tinció de mostres planctòniques

S'han realitzat diferents tipus de tincions utilitzant la microscòpia de fluorescència per determinar el nombre total de cèl·lules de cada mostra. S'han provat diferents fluorocroms comercialitzats recentment, els quals permeten fer alhora el recompte total de cèl·lules i la determinació del nombre de cèl·lules viables d'una mostra. La Taula 3.6 resumeix les principals tècniques utilitzades per a la tinció de mostres planctòniques.

**Taula 3.6.** Principals tincions utilitzades per a la quantificació de mostres planctòniques.

Tinció	Concentració	Màxim Excitació/Emissió	Variable	Referència
<i>Taronja d'acridina</i>	0,04%	503/530-640 nm	Nº cel. total	Hobbie et al. 1977 Eaton et al. 1995
<i>DAPI</i>	1 µg/mL	347/456 nm	Nº cel. total	Kepner & Pratt 1994
<i>CTC</i>	1,28 mM	365/602 nm	Nº cel. viables	Rodriguez et al. 1992 Pyle et al. 1995 McFeters et al. 1995
<i>Live/Dead</i>	6 µM Syto 9	480/500 nm	Nº cel. viables	Korber et al. 1996
	30 µM iodur de propidi	490/635 nm	Nº cel. total	Molecular Probes, 1998

**Recompte total amb taronja d'acridina.** S'ha utilitzat la microscòpia de fluorescència per avaluar de forma rutinària el nombre total de cèl·lules bacterianes de les mostres, tant planctòniques com de biofilm, tenyint amb taronja d'acridina al 0,04% les mostres preservades prèviament amb 2% v/v de formaldehid (Hobbie et al. 1977, Eaton et al. 1995, veure PNT-10 a l'annex).

**Recompte total amb DAPI.** Algunes de les mostres s'han observat amb microscòpia de fluorescència per avaluar de forma rutinària el nombre total de cèl·lules bacterianes de les mostres, tant planctòniques com de biofilm, tenyint amb DAPI (Kepner & Pratt 1994, veure PNT-11 a l'annex). La mostra es filtra i es cobreix durant 5 minuts amb 0,5 mL de DAPI (1 µg/mL). Malgrat que el DAPI presenta millors propietats que el taronja d'acridina, tampoc està exempt de problemes per tinció inespecífica (Zweifel & Hagström 1995, Choi et al. 1996) o per disminució de la fluorescència en mostres clorades (Saby et al. 1997).

**Recompte de viables i totals amb CTC i DAPI.** S'ha utilitzat la tinció amb DAPI de forma simultània amb el compost redox 5-Cyano-2,3-ditolyl clorur de tetrazoli (CTC), un colorant que permet determinar els nombre de bacteris metabòlicament actius (bacteris respirant). Els resultats obtinguts han de preveure els possibles efectes tòxics del compost CTC sobre els propis organismes (Ullrich et al. 1996). S'ha utilitzat el mètode de la filtració per membrana (Pyle et al. 1995, McFeters et al. 1995, veure PNT-12 a l'annex). El filtre es transferia a una placa de Petri estèril, on s'afegien 0,6 mL de CTC 1,28 mM en aigua destil·lada. Després d'incubar 4 h (protegit de la llum), es treia el CTC i s'afegien 0,6 mL de formaldehid 2%, deixant-ho en contacte 5 min. Finalment, es tornava el filtre a la torre de filtració, es tenyia amb 0,5 mL de DAPI (1 µg/mL) durant 5 min, es filtrava i es feia un rentat amb 2-propanol per eliminar tincions inespecífiques.

**Recompte de viables i totals amb tinció Live/Dead.** Algunes de les mostres s'han tenyit utilitzant el kit Live/Dead BacLight per determinar la viabilitat bacteriana (veure PNT-13 a l'annex), format per dos fluorocroms específics pels àcids nucleics: SYTO 9, un colorant fluorescent verd amb un màxim d'excitació/emissió de 480/500 nm, i el iodur de propidi, un colorant fluorescent vermell (490/635 nm). La combinació d'aquest dos colorants permet observar els bacteris amb membranes cel·lulars intactes de color verd fluorescent, mentre que les que presenten alguna alteració a nivell de les membranes es tenyiran de color vermell fluorescent, ja que el iodur de propidi només pot entrar en aquelles cèl·lules que presentin la membrana damnada (Korber et al. 1996).

La mostra escollida es barreja amb igual volum de la solució stock (2x), produint una concentració final de 6 µM de SYTO 9 i 30 µM de iodur de propidi. Després de barrejar adequadament i d'incubar 15 min a temperatura ambient i a la foscor, s'ha filtrat la mostra a través de filtres Nucleopore negres de 0,2 µm. Els filtres s'han posat a sobre de portaobjectes de vidre, afegint 6-10 µL d'oli de muntatge BacLight (Molecular Probes, Component C, índex de refracció a 25°C = 1,517) i amb un cobreobjectes. S'ha realitzat l'observació amb un microscopi Olympus BH-2 equipat amb un filtre tipus B (veure Taula 4.2) i una làmpada de mercuri de 100-w.

## 3.2.7. Estima de la Taxa Específica de Creixement del Biofilm

La caracterització de la taxa específica de creixement del biofilm es pot obtenir a partir del següent model simplificat (van der Wende et al. 1989, Block et al. 1993):

$$\mu = \frac{D \cdot (X_S - X_E) \cdot V}{X_b \cdot A} \quad (3.3)$$

on  $X_S$  i  $X_E$  són la concentració de la biomassa en suspensió (cèl·lules planctòniques, cèl. mL<sup>-1</sup>) a la sortida i a l'entrada del reactor respectivament,  $D$  és la taxa de dilució al reactor (h<sup>-1</sup>),  $X_b$  és la densitat de cèl·lules del biofilm (cèl·lules sèssils, cèl·lules cm<sup>-2</sup>),  $V$  és el volum del reactor i  $A$  és la superfície mullada del reactor (superfície de deposició total). En aquest model s'assumeix que la taxa de mortalitat i el creixement planctònics són negligibles.

## 3.2.8. Anàlitiqes Químiques

**Analítiques rutinàries.** En intervals regulars s'han analitzat certs paràmetres físico-químics de les tres estacions de monitorització, d'acord amb tècniques normalitzades segons Standard Methods (Eaton et al. 1995), tal i com es detalla a la Taula 3.7. Al mateix temps, s'ha intentat disposar d'analítiques realitzades als mateixos llocs i durant les mateixes èpoques, per entitats com l'Inst. Municipal de Parcs i Jardins de l'Ajuntament de Barcelona, en el cas del pou d'Alfons el Magnànim (Besós). En el cas de l'estació experimental ubicada al laboratori de Microbiologia, s'ha mesurat el clor total i lliure de l'aigua de la xarxa, utilitzant el mètode DPD, d'acord també amb Standard Methods (Eaton et al. 1995).

**Taula 3.7.** Tècniques de laboratori utilitzades per determinar els paràmetres físico-químics de les estacions de monitorització.

<i>Paràmetre</i>	<i>Tècnica Utilitzada</i>	<i>Unitats</i>
<i>Caràcters Físico-Químics</i>		
pH	Phmetre potenciomètric	Unitats pH
Conductivitat a 20°C	Electrometria (MA/Q-56)	µs/cm
Clorurs	Volumetria amb Ag <sup>+</sup> (MA/Q-02)	mg Cl/L
Sulfats	Cromatografia iònica (MA/Q-76)	mg SO <sub>4</sub> /L
Calci	Valoració complexomètrica (MA/Q-04)	mg Ca/L
Duresa Total	Valoració complexomètrica (MA/Q-04)	mg CaCO <sub>3</sub> /L
Magnesi	Valoració complexomètrica (MA/Q-04)	mg Mg/L
Sodi	Fotometria de flama (MA/Q-52)	mg Na/L
Potassi	Fotometria de flama (MA/Q-52)	mg K/L
Alcalinitat	Volumetria àcid-base (MA/Q-08)	mg CaCO <sub>3</sub> /L
<i>Substàncies no desitjables</i>		
Nitrats	Cromatografia iònica (MA/Q-76)	mg NO <sub>3</sub> /L
<i>Altres paràmetres</i>		
Bicarbonats	Volumetria àcid-base (MA/Q-08)	mg HCO <sub>3</sub> /L
Carbonats	Volumetria àcid-base (MA/Q-08)	mg CO <sub>3</sub> /L
Bromurs	Cromatografia iònica (MA/Q-76)	mg Br/L

**Mesura del Clor.** Es va mesurar el clor –lliure i total- present a la xarxa de distribució del Lab. de Microbiologia de forma rutinària cada 2 setmanes, i sempre que es realitzava algun mostreig, utilitzant el mètode colorimètric DPD (Eaton et al. 1995). Els reactius pel clor lliure (DPD Free Chlorine Hach, cat. 14077-49 ) i el clor total (DPD Total Chlorine Hach, cat. 14076-49) es dissolen ràpidament en l'aigua i es compara el color obtingut amb una escala estàndard. El clor combinat es va determinar com la diferència entre el clor total i el lliure.

**Analítiques de camp.** S'han mesurat al camp la temperatura, pH, oxigen dissolt i conductivitat utilitzant una sonda multiparamètrica ECM Multi (Neurtek Medio Ambiente, Zarautz).

**Anàlisi del Carboni Orgànic Biodegradable (BDOC).** També s'ha mesurat de forma puntual la concentració de carboni orgànic dissolt biodegradable, utilitzant el mètode dels bacteris adherits en sorra (Joret & Levi 1986, Joret et al. 1988, Volk et al. 1994). En aquest mètode la mostra d'aigua s'incuba a 20°C i a la foscor, amb sorra colonitzada prèviament per bacteris. Prèviament la sorra s'ha de rentar 10 vegades fins que l'alliberament de carboni orgànic dissolt sigui inferior als 0,1 mg/L. El procés s'ha de realitzar en matraus de vidre lliures de contaminació per carboni orgànic (sotmesos a un tractament tèrmic a 525°C durant 6 h, per oxidar qualsevol resta de carboni orgànic), i taps de les mateixes característiques que els matraus (veure Taula 3.8).

**Taula 3.8.** Flascons d'incubació i de control per la determinació del BDOC.

	Mostra d'aigua	Acetat de sodi (200 mg C/L)	Acetat de sodi (2 mg C/L)	Inòcul (sorra)
Flascó incubació	300 mL	0 mL	0 mL	100 g.
Control Activació	0 mL	0 mL	300 mL	100 g.
Control Inhibició	300 mL	3 mL	0 mL	100 g.

Diàriament, i des del principi de l'experiment, es mesurava la concentració de carboni orgànic dissolt (DOC), amb un analitzador de carboni orgànic total Shimadzu-TOC 5000A (Shimadzu Inc.). L'assaig s'atura quan la concentració de carboni arriba a un nivell mínim, que correspon a la fracció de DOC no biodegradable. La concentració de carboni orgànic dissolt biodegradable (BDOC) es defineix com la diferència entre els valors inicial i mínim de DOC.

A més de les mostres analitzades, també es va realitzar un control per avaluar l'activitat de l'inòcul (sorra colonitzada), afegint a aquest últim una solució mineral amb acetat de sodi com a font de carboni (300 mL d'una solució de 2 mg C/L). Finalment, es va realitzar un segon control per detectar la possible inhibició del creixement bacterià per algun component de la mostra, afegint 3 mL d'una solució stock d'acetat de sodi (200 mg C/L), a la mostra i a l'inòcul.

### 3.3. Resultats a la zona de mostreig I: Sant Martí (Besós)

#### 3.3.1. Microorganismes planctònics

Es va analitzar microbiològicament l'aigua de l'estació experimental a Sant Martí de Provençals (Besós), durant el període que va de juliol del 1997 fins a l'agost de 1999. A la Figura 3.5 (part superior) s'observa com el nivell de bacteris heteròtrofs totals determinat en placa amb l'agar R2A, va estar entre  $10^2$  Ufc/mL ( $1,51 \times 10^2$  Ufc/mL, agost 1997) i els  $10^4$  Ufc/mL ( $5,32 \times 10^4$  Ufc/mL, maig 1999).

Les dades obtingudes mostren una lleugera tendència d'empitjorament de la qualitat microbiològica de l'aigua cap al final del període mostrejat, augmentant el nombre de bacteris totals quan aquests es mesuraven amb l'agar R2A i a 22°C, així com amb l'agar PCA recomanat per la normativa d'anàlisi d'aigües potables.

De la mateixa forma que han indicat altres autors en treballs previs (Reasoner & Geldreich 1985), els recomptes del nombre de bacteris totals en placa van ser significativament més alts amb l'agar R2A que amb l'agar PCA, i dins de l'agar PCA, més elevats en els recomptes incubant a 22°C que a 37°C.

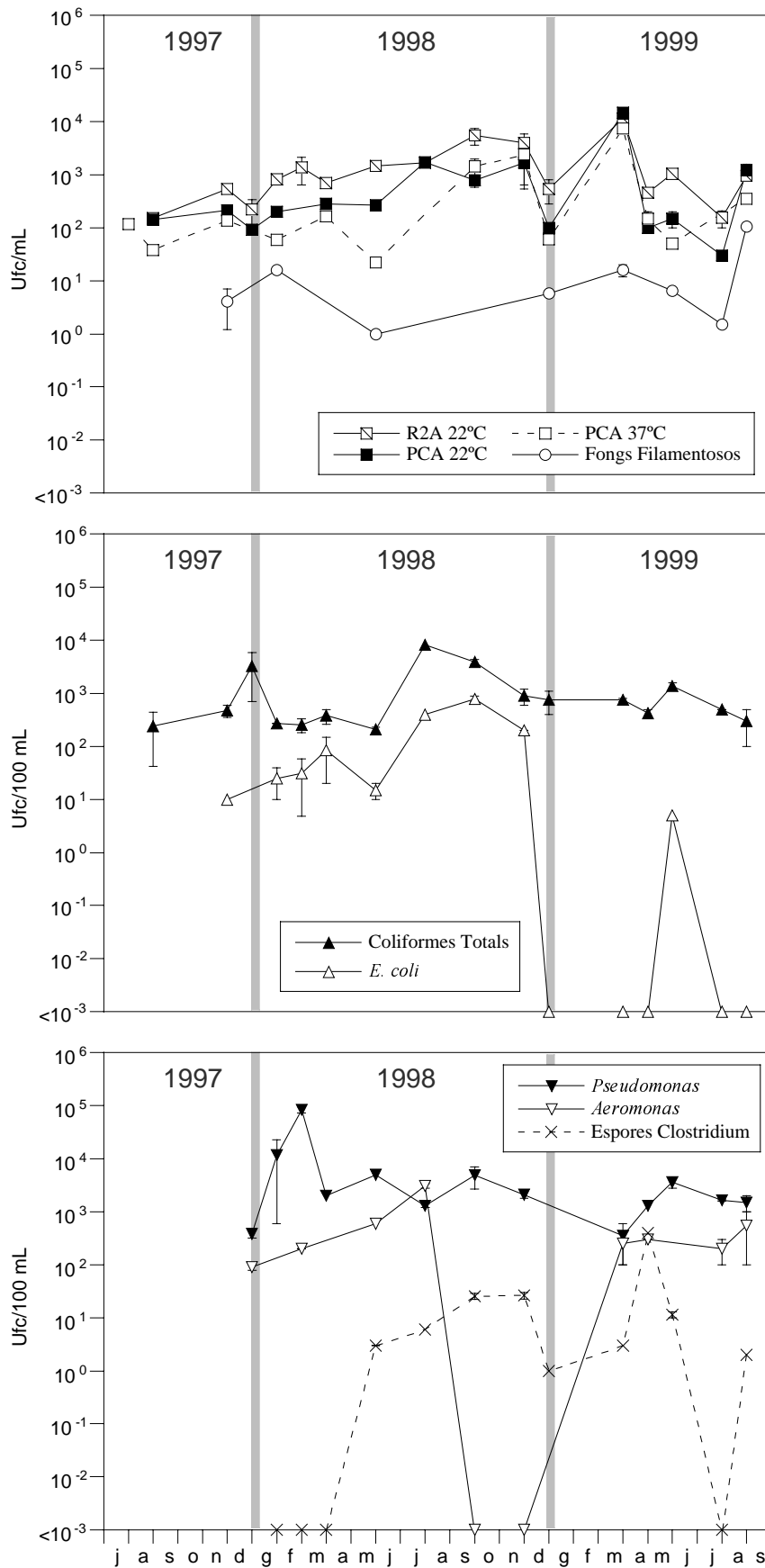
D'altra banda, cal destacar la presència de dos punts on el nombre de microorganismes ha estat màxim, especialment en el cas del nombre de bacteris totals determinats amb l'agar R2A i PCA. Aquests punts extrems, el febrer i maig de 1999, poden haver estat relacionats amb alguna alteració temporal i relativament important de la qualitat de l'aqüífer. Cal recordar que durant aquest mateix període s'han realitzat excavacions per a la realització del complex urbanístic de Diagonal-Mar, amb una extracció important de materials del subsòl que pot haver incidit en la qualitat de l'aigua freàtica de la zona. De fet, els valors han disminuït tornant a valors més habituals després de poc temps.

A la gràfica superior de la Figura 3.5 s'observa com el nivell de fongs filamentosos, determinats amb l'agar sabouraud suplementat amb gentamicina s'ha mantingut entre  $10^0$  i  $10^2$  Ufc/mL. De la mateixa forma que en el nombre de bacteris heteròtrofs, s'han observat unes puntes o valors màxims coincidint amb el mateix període entre febrer i maig de 1999.

A la part central de la mateixa Figura 3.5 es mostra l'evolució al llarg del temps dels coliformes totals, entre  $10^2$  i  $10^4$  Ufc/100 mL i *Escherichia coli* entre  $10^1$  i  $10^3$  Ufc/100 mL. A la part inferior, es detallen els nivells observats per a *Pseudomonas* entre  $10^2$  i  $10^5$  Ufc/100 mL i, finalment, per a les espores de clostridis, amb valors que han oscil·lat entre  $10^{-1}$  i  $10^2$  Ufc/100 mL.

Membres de la microbiota autòctona de l'aigua van ser aïllats de l'aigua subterrània reutilitzada, a partir del pou i del dipòsit de reserva. Després del període d'incubació adequat per a cada medi de cultiu, es van seleccionar a l'atzar les diferents morfologies colonials predominants per al seu estudi i identificació. A la Taula 3.9 es detallen les soques aïllades, on cal destacar la presència de membres de la família *Enterobacteriaceae* com *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.* i *Enterobacter cloacae*, bacteris no fermentadors del grup *Pseudomonas* com *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas putida*, membres del gènere *Acinetobacter*, bacteris gram positius com *Staphylococcus sp.* i fongs com *Cephalosporium sp.* i *Cladosporium sp.*, així com altres soques del grup *Mycobacterium*.





**Figura 3.5.** Anàlisi microbiològica de l'aigua de drenatge reutilitzada a partir del pou d'Alfons el Magnànim, a l'estació experimental de Sant Martí (Besós).

**Taula 3.9.** Microorganismes aïllats i identificats a l'aigua de drenatge reutilitzada del pou d'Alfons el Magnànim a Sant Martí (Besós).

AÏLLAMENT	DATA	ESPÈCIE
AIGUA Pou	14/1/98	<i>Escherichia coli</i>
AIGUA Pou	22/1/98	<i>Escherichia coli</i>
AIGUA Pou	22/1/98	<i>Enterobacter cloacae</i>
AIGUA Pou	22/1/98	<i>Enterobacter cloacae</i>
AIGUA Pou	11/2/98	<i>Escherichia coli</i>
AIGUA Pou	12/3/98	<i>Enterobacter sp.</i>
AIGUA Pou	12/3/98	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
AIGUA Pou	12/3/98	<i>Hafnia alvii</i>
AIGUA Pou	12/3/98	<i>Cephalosporium sp.</i>
AIGUA Pou	12/3/98	<i>Enterobacter cloacae</i>
AIGUA Pou	12/3/98	<i>Enterobacter cloacae</i>
AIGUA Pou	12/3/98	<i>Escherichia coli</i>
AIGUA Pou	5/5/98	<i>Erwinia herbicola</i>
AIGUA Pou	5/5/98	<i>Escherichia coli</i>
AIGUA Pou	26/5/98	<i>Escherichia coli</i>
AIGUA Pou	26/5/98	<i>Staphylococcus sp. (coag. +)</i>
AIGUA dipòsit	30/7/98	<i>Staphylococcus sp.</i>
AIGUA dipòsit	30/7/98	<i>Escherichia coli</i>
AIGUA dipòsit	23/9/98	<i>Escherichia coli</i>
AIGUA dipòsit	5/11/98	<i>Escherichia coli</i>
AIGUA dipòsit	10/2/99	<i>Escherichia coli</i>
AIGUA dipòsit	10/2/99	<i>Mycobacterium sp.</i>
AIGUA dipòsit	11/3/99	<i>Mycobacterium sp.</i>
AIGUA dipòsit	27/4/99	<i>Mycobacterium sp.</i>
AIGUA dipòsit	27/4/99	<i>Bacillus sp.</i>
AIGUA dipòsit	18/5/99	<i>Escherichia coli</i>
AIGUA dipòsit	18/5/99	<i>Mycobacterium sp.</i>
AIGUA dipòsit	6/7/99	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
AIGUA dipòsit	6/7/99	<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>
AIGUA dipòsit	6/7/99	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
AIGUA dipòsit	6/7/99	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
AIGUA dipòsit	6/7/99	<i>Pseudomonas putida</i>
AIGUA dipòsit	6/7/99	<i>Mycobacterium sp.</i>
AIGUA dipòsit	3/8/99	<i>Mycobacterium sp.</i>
AIGUA dipòsit	3/8/99	<i>Enterobacter cloacae</i>
AIGUA dipòsit	3/8/99	<i>Pseudomonas spp.</i>
AIGUA dipòsit	3/5/99	<i>Cladosporium sp.</i>
AIGUA dipòsit	18/5/99	<i>Actinomicets</i>
AIGUA dipòsit	18/5/99	<i>Chryseobacterium multivorum</i>
AIGUA dipòsit	6/7/99	<i>Enterobacter cloacae</i>
AIGUA dipòsit	6/7/99	<i>Enterobacter cloacae</i>
AIGUA dipòsit	6/7/99	<i>Klebsiella sp.</i>
AIGUA dipòsit	6/7/99	<i>Enterobacter cloacae</i>

### 3.3.2. Desenvolupament de biofilm a partir del pou de captació

L'examen dels resultats del desenvolupament de biofilms a partir del pou de captació (veure Figura 3.6, part superior), indica un increment substancial en el nivell de bacteris totals i fongs filamentosos al llarg del temps d'exposició (fins a 120 dies), determinats en placa i amb l'agar R2A (22°C) i Sabouraud suplementat amb gentamicina (22°C) respectivament.

Segons els resultats obtinguts el biofilm arriba a la seva fase de desenvolupament màxim –fase estacionària - després de 80 dies, quan es mesura pel recompte de bacteris heteròtrofs totals en placa (agar R2A, 22°C). En aquest punt, els valors han estat lleugerament superiors a 10<sup>5</sup> Ufc/cm<sup>2</sup>.

La presència dels fongs filamentosos als biofilms també ha mostrat un augment al llarg del temps d'exposició a l'aigua de drenatge del metro de Barcelona. Cal destacar l'increment d'aproximadament 1 log, entre els 80 i els 120 dies, arribant al final del temps d'exposició a valors propers a  $10^4$  Ufc/cm<sup>2</sup>.

El recompte microscòpic realitzat amb taronja d'acridina (veure 3.2.6) ha mostrat valors entre  $10^8$ - $10^9$  Cèl·lules/cm<sup>2</sup> a partir dels 30 dies (Figura 3.6, part superior). A la fase estacionària, a partir dels 80 dies el nombre total de bacteris adherits a la superfície del medi porós dels reactors (esferes de vidre) ha estat aproximadament 3,3 log més gran ( $5,63 \times 10^8$  Cèl./cm<sup>2</sup>) que els recomptes de viables en placa expressats en ufc/cm<sup>2</sup> ( $2,54 \times 10^5$  Cèl./cm<sup>2</sup>). Per tant, els recomptes de Ufc han representat en realitat, menys del 0,1% del total de la població de cèl·lules adherida al medi porós dels reactors (0,045%).

La Figura 3.6 (part inferior) mostra la presència als biofilms desenvolupats, així com l'evolució al llarg del temps d'exposició, dels coliformes totals, *Escherichia coli* i bacteris del grup *Pseudomonas*, determinats tal com s'explica a l'apartat 3.2.4. A diferència del recompte de bacteris heteròtrofs totals en placa (R2A-22°C), el nivell de coliformes totals es va incrementar durant tot el període d'exposició a l'aigua subterrània. L'augment produït ha estat de 1 log des dels 60 dies fins al final del temps d'exposició als 120 dies, amb un valor de  $8,84 \times 10^2$  Ufc/cm<sup>2</sup>. En tot cas, aquest grup de bacteris arribaria al seu màxim dins del biofilm després dels 120 dies d'exposició a l'aigua freàtica.

Aquesta tendència també s'ha observat, encara que menys pronunciada, en l'evolució de *Escherichia coli* al llarg del temps. En aquest cas cal destacar la gran oscil·lació dels valors entre els 20 i els 80 dies, mentre que dels 80 als 120 dies es va produir una certa estabilització vora els  $10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup>.

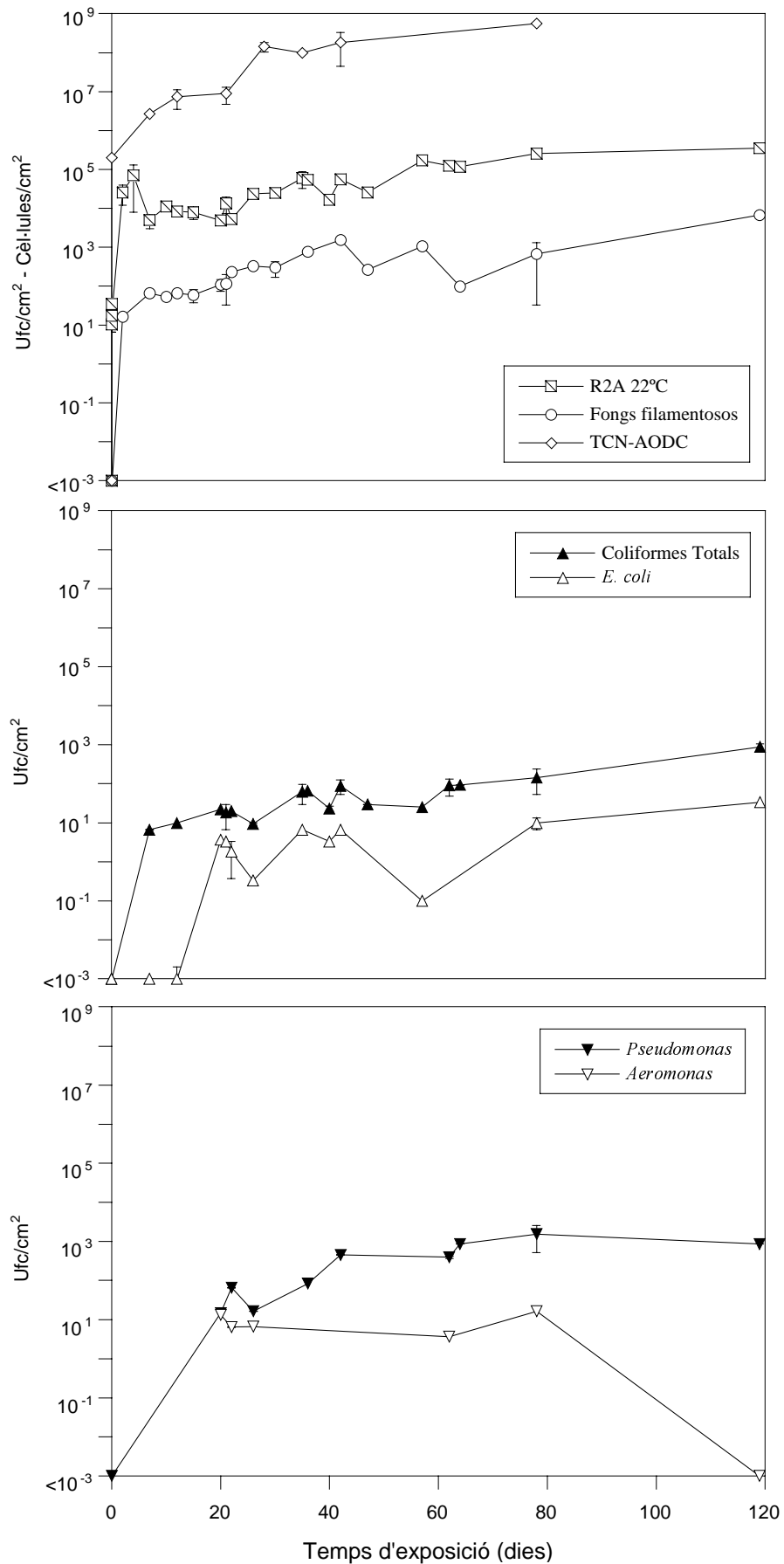
Finalment, a la mateixa figura es mostra l'evolució de *Pseudomonas* al llarg del temps d'exposició, amb una tendència similar a l'observada pels bacteris totals, amb una estabilització a partir dels 65-70 dies a l'entorn de les  $10^3$  Ufc/cm<sup>2</sup>.

D'igual forma que a l'apartat anterior per a l'aigua de la zona de mostreig i tal com s'explica a l'apartat 3.2.5, es van aïllar diferents membres de la microbiota autòctona a partir dels biofilms formats per l'exposició del medi de suport a l'aigua subterrània reutilitzada. Després del període d'incubació adequat per a cada medi de cultiu es van seleccionar a l'atzar les principals morfologies colonials predominants per al seu estudi i identificació. A la Taula 3.10 s'observen les soques aïllades, on cal destacar la presència de membres de la família *Enterobacteriaceae* com *Serratia ficaria*, membres del grup de les *Pseudomonas* com *Pseudomonas vesicularis*, *Ps. cepacia*, *Ps. diminuta*, *Ps. mesophilica*, bacteris gram-positius com *Staphylococcus sp.* i fongs filamentosos com *Penicillium sp.*, *Gliocladium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Phoma sp.* i altres.

### 3.3.3. Desenvolupament de biofilm a partir del dipòsit de reserva

L'examen dels resultats del desenvolupament de biofilms a partir del dipòsit de reserva de l'estació experimental del Besós (veure Figura 3.7, part superior), indica un increment substancial en el nivell de bacteris totals i fongs al llarg del temps d'exposició (fins a 190 dies), determinats respectivament amb agar R2A a 22°C, PCA a 22°C i agar Sabouraud suplementat amb gentamicina a la mateixa temperatura. En aquest cas, el biofilm ha arribat a la seva fase de desenvolupament màxim –fase estacionària– entre els 80-100 dies, quan s'ha mesurat pel recompte de bacteris heteròtrofs totals en placa (agar R2A i agar PCA, a 22°C). Cal destacar però, que els valors obtinguts a la fase estacionària de desenvolupament del biofilm han estat superiors als del pou de captació: 0,7 log de diferència als 120 dies en el recompte amb agar R2A ( $1,07 \times 10^6$  Ufc/cm<sup>2</sup> en el dipòsit de reserva i  $3,56 \times 10^5$  Ufc/cm<sup>2</sup> al pou de captació).

La presència de fongs filamentosos als biofilms desenvolupats a partir de l'aigua del dipòsit de reserva (veure Figura 3.7, part superior), ha augmentat durant els primers 60 dies arribant a un valor màxim de  $4,27 \times 10^3$  Ufc/cm<sup>2</sup>. Posteriorment, dels 60 als 127 dies s'ha observat una disminució assolint un valor mínim de  $4,98 \times 10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup> als 127 dies, mentre que dels 127 fins als 190 dies els valors han tornat a recuperar-se a un nivell semblant a l'observat els 60 dies d'exposició ( $4,65 \times 10^3$  Ufc/cm<sup>2</sup>).



**Figura 3.6.** Desenvolupament de biofilm a partir de l'aigua de drenatge del pou de captació d'Alfons del Magnànim, reutilitzada per al reg a Sant Martí (Vila Olímpica, Barcelona).

En el recompte microscòpic realitzat amb taronja d'acridina (Figura 3.7 part superior) el nombre de cèl·lules totals ha presentat uns valors semblants al pou d'Alfons el Magnànim, assolint un valor proper a les  $10^8$  Cèl./cm<sup>2</sup> després de 30 dies. Després d'una lleugera disminució els valors s'han mantingut entre  $10^8$ - $10^9$  Cèl./cm<sup>2</sup> fins al final del període d'exposició a l'aigua freàtica. En aquest període final el nombre total de bacteris adherits a la superfície del medi porós dels reactors (esferes de vidre) ha estat superior en aproximadament 2 log ( $1,18 \times 10^8$  Cèl./cm<sup>2</sup>) als recomptes d'unitats formadores de colònies (Ufc) determinats en placa amb l'agar R2A ( $1,07 \times 10^6$  Ufc/cm<sup>2</sup>). Així, els recomptes d'Ufc han representat en realitat menys de l'1% del total de la població de cèl·lules adherida al medi porós dels reactors (0,9%).

Els coliformes totals (Figura 3.7, part central) han assolit als biofilms desenvolupats un nivell màxim que no ha superat en cap cas les  $10^3$  Ufc/cm<sup>2</sup> (aproximadament  $3 \times 10^2$  Ufc/cm<sup>2</sup>) entre els 80-100 dies. Posteriorment, i després d'una lleugera disminució, els nivells s'han estabilitzat en valors superiors a  $10^2$  Ufc/cm<sup>2</sup>. A la mateixa figura s'observa com *E. coli* ha seguit una evolució semblant a l'observada en el pou de captació. La presència màxima als biofilms desenvolupats s'ha produït prop dels 100 dies d'exposició ( $3,28 \times 10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup>). A partir d'aquest punt els valors han disminuït de forma apreciable, baixant pràcticament a 0 dels 150 als 200 dies d'exposició.

El nivell de *Pseudomonas* (Figura 3.7, part inferior) ha seguit una evolució semblant a la que han experimentat els fongs filamentosos, arribant al màxim de  $10^3$  Ufc/cm<sup>2</sup> als 75-80 dies (tal com ha passat també al pou de captació), disminuint lleugerament després (0,5 log) per estabilitzar-se finalment a partir dels 127 dies ( $2,7$ - $4,3 \times 10^2$  Ufc/cm<sup>2</sup>). El grup *Aeromonas* només s'ha detectat entre els 75-125 dies.

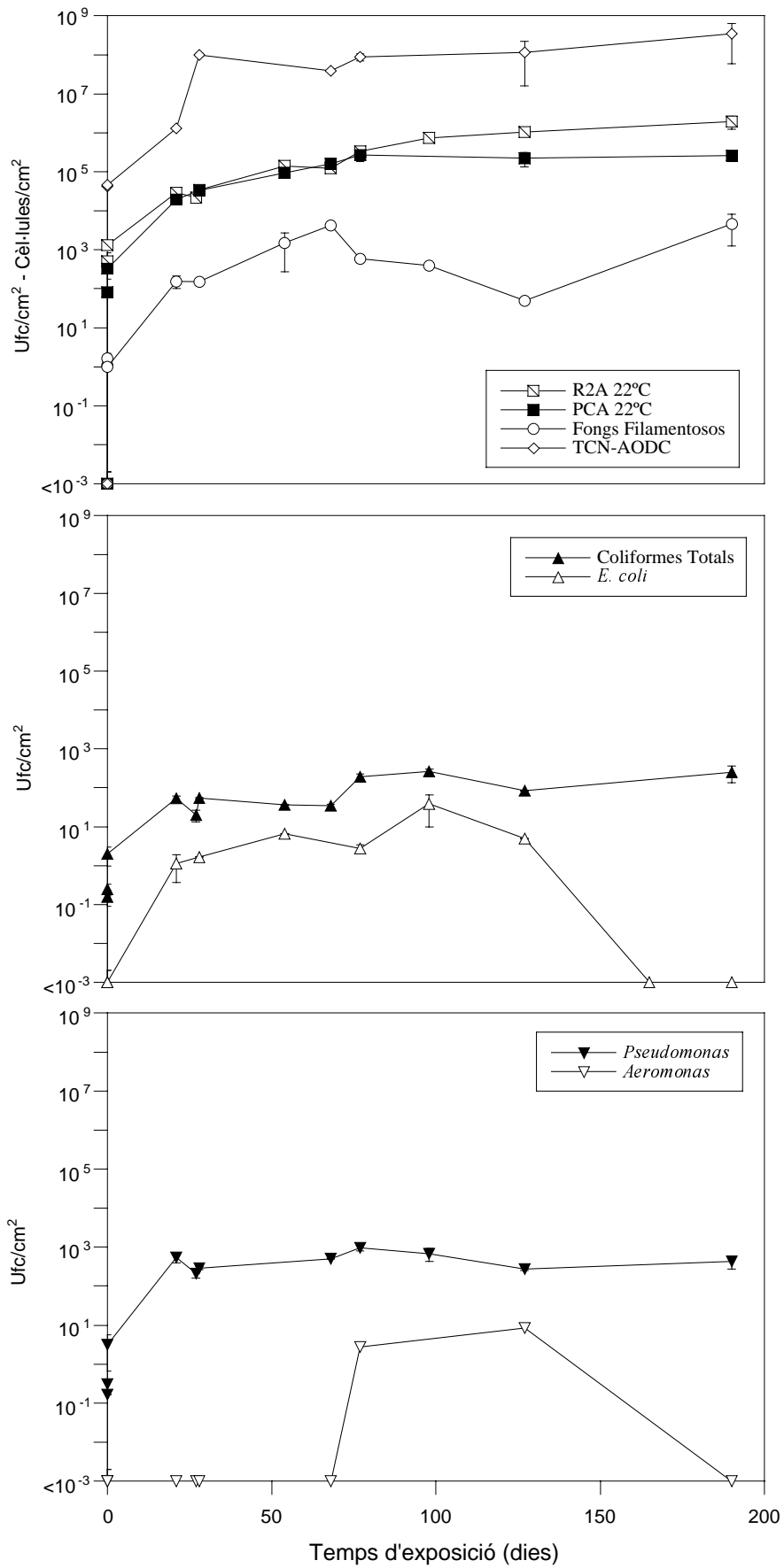
D'igual forma que en els experiments explicats en els apartats anteriors es van aïllar diferents membres de la microbiota autòctona a partir dels biofilms formats per l'exposició del medi porós a l'aigua subterrània reutilitzada del dipòsit de reserva. A la Taula 3.10 s'observen les soques aïllades als biofilms desenvolupats, on cal destacar la gran abundància de fongs, la presència de membres de la família *Enterobacteriaceae* com *Escherichia coli*, així com altres soques del gènere *Pseudomonas* i del grup *Mycobacterium*.

#### 3.3.4. Comparació del nº de microorganismes en fase biofilm i planctònica

S'ha volgut comparar la presència dels diferents microorganismes estudiats als biofilms, amb la que presenten en fase planctònica. En primer lloc, s'ha calculat la mitjana dels microorganismes presents a la fase planctònica al llarg del període analitzat, expressant els resultats per a cada grup estudiat (nombre mL<sup>-1</sup>). L'existència de dos punts amb uns valors microbiològics anormalment alts, comparant-ho amb els obtinguts durant la major part del període estudiat, distorsiona en certa forma la mitjana obtinguda per a la fase planctònica. Per aquest motiu els càlculs s'han realitzat també amb la mediana, un estadístic que ens dóna una mesura de la tendència central d'una mostra i que és més robust a la presència de valors extrems.

D'altra banda, els biofilms han arribat a una estabilització en el nombre de bacteris totals determinats en placa, així com en altres paràmetres com *Pseudomonas*, a partir dels 120 dies d'exposició (veure Figura 3.7). Per obtenir la mitjana dels microorganismes adherits en fase estacionària, s'han seleccionat les dades obtingudes en cada cas a partir dels 120 dies i fins al final del temps d'exposició, perquè alguns dels paràmetres microbiològics estudiats presenten encara una certa oscil·lació dels 120 als 200 dies.

A la Figura 3.8 s'observa la ratio biofilm/fase planctònica pels diferents paràmetres microbiològics estudiats a partir de l'aigua del pou d'esgotament i del dipòsit de reserva. Tenint en compte que al pou d'esgotament no s'han obtingut dades pel recompte de bacteris en placa amb l'agar PCA a 22°C (Figura 3.8-esquerra), l'augment més important a la fase biofilm respecte de la fase planctònica s'ha produït en els fongs filamentosos (ratio = 1040), seguit pels bacteris totals determinats en placa amb l'agar R2A (ratio = 470) i pel nombre de cèl·lules totals (ratio = 402). Cal destacar els valors obtinguts en el cas de *Escherichia coli* (ratio = 300), coliformes totals (ratio 197,5) i *Pseudomonas* (ratio = 47), que mostren com aquests grups s'acumulen de forma preferent a la fase sèssil, on han adquirit uns valors força més elevats si es comparen amb els de la fase planctònica.



**Figura 3.7.** Desenvolupament de biofilm a partir del dipòsit de reserva de l'aigua de drenatge del metro de Barcelona, reutilitzada per al reg a Sant Martí (Vila Olímpica, Barcelona).

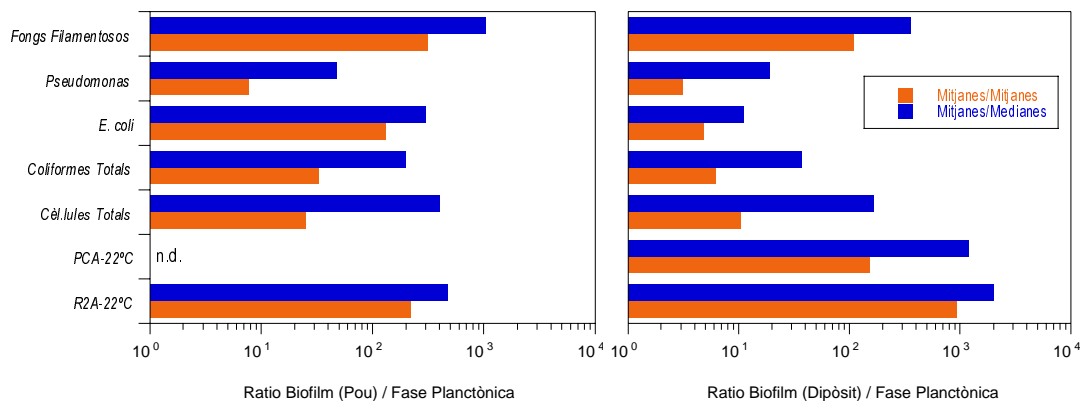
**Taula 3.10.** Microorganismes aïllats i identificats als biofilms formats a partir de l'aigua de drenatge de l'estació experimental del pou d'Alfons el Magnànim (Sant Martí-Besós).

Aïllament	Data	Temps Exp.	Espècie
<i>Pou de Captació</i>			
BESOS 2E	14/1/98	57 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 2D	5/2/98	78 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 2D	5/2/98	78 dies	<i>Enterobacter cloacae</i>
BESOS 2E	5/2/98	22 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 1D	17/2/98	26 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 1E	12/3/98	119 dies	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
BESOS 2D	17/3/98	40 dies	<i>Penicillium sp.</i>
BESOS 2D	17/3/98	40 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 3D	24/3/98	21 dies	<i>Cladosporium sp.</i>
BESOS 1D	24/3/98	35 dies	<i>Phoma sp.</i>
BESOS 3D	24/3/98	21 dies	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
BESOS 1E	24/3/98	12 dies	<i>Penicillium sp.</i>
BESOS 1D	24/3/98	35 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 3D	24/3/98	21 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 2E	28/4/98	35 dies	<i>Gliocladium sp.</i>
BESOS 1D	5/5/98	42 dies	<i>Pseudomonas cepacia</i>
BESOS 3D	5/5/98	42 dies	<i>Serratia ficaria</i>
BESOS 1D	5/5/98	42 dies	<i>Xenorhabdus luminiscens</i>
BESOS	5/5/98	t=0 min.	<i>Pseudomonas diminuta</i>
BESOS	5/5/98	t=5 min.	<i>Pseudomonas maltophila</i>
BESOS	5/5/98	t=5 min.	<i>Pseudomonas mesophilica</i>
BESOS	5/5/98	t=0 min.	<i>Xenorhabdus luminiscens</i>
BESOS	5/5/98	t=0 min.	<i>Pseudomonas vesicularis</i>
BESOS	5/5/98	t=0 min.	<i>Staphylococcus sp. (coa9.+)</i>
BESOS 2E	15/7/98	78 dies	<i>Enterobacter cloacae</i>
BESOS 2E	15/7/98	78 dies	<i>Escherichia coli</i>
<i>Dipòsit de Reserva</i>			
BARBI 1	8/10/98	65 dies	<i>Escherichia coli</i>
BARBI 3	6/11/98	27 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 1	28/12/98	54 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 2	10/2/99	98 dies	<i>Enterobacter cloacae</i>
BESOS 2	10/2/99	98 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 4	10/2/99	190 dies	<i>Mycobacterium sp.</i>
BESOS 2	10/2/99	98 dies	<i>Mycobacterium sp.</i>
BARBI 2	10/2/99	98 dies	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BESOS 3	11/3/99	127 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 3	11/3/99	127 dies	<i>Mycobacterium sp.</i>
BARBI 3	11/3/99	127 dies	<i>Escherichia coli</i>
BARBI 3	11/3/99	127 dies	<i>Enterobacter cloacae</i>
BESOS 2	27/4/99	77 dies	<i>Escherichia coli</i>
BARBI 2	27/4/99	77 dies	<i>Bacillus sp.</i>
BESOS 3	18/5/99	68 dies	<i>Penicillium sp.</i>
BESOS 4	18/5/99	21 dies	<i>Penicillium sp.</i>
BESOS 4	18/5/99	21 dies	<i>Sporotrichum sp.</i>
BESOS 4	18/5/99	21 dies	<i>Heteroaphalum</i>
BESOS 4	18/5/99	21 dies	<i>Sporotrichum sp.</i>
BESOS 2	18/5/99	21 dies	<i>Mucor sp.</i>
BESOS 3	18/5/99	68 dies	<i>Aspergillus flavus</i>
BESOS 2	18/5/99	21 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 4	18/5/99	21 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 4	18/5/99	21 dies	<i>Mycobacterium sp.</i>
BESOS 3	18/5/99	68 dies	<i>Mycobacterium sp.</i>
BARBI 3	18/5/99	68 dies	<i>Cladosporium sp.</i>
BARBI 3	18/5/99	68 dies	<i>Graphium sp.</i>
BARBI 1	6/7/99	190 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 1	6/7/99	190 dies	<i>Mycobacterium sp.</i>
BESOS 1	3/8/99	28 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 2	3/8/99	77 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 3	3/8/99	77 dies	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BESOS 4	3/8/99	77 dies	<i>Escherichia coli</i>
BESOS 4	3/8/99	77 dies	<i>Pseudomonas maltophila</i>

Al dipòsit de reserva (Figura 3.8-dreta), l'augment més important a la fase biofilm respecte de la fase planctònica s'ha produït en el recompte de bacteris totals en placa amb l'agar R2A (ratio = 2005). Cal destacar que aquest augment ha estat especialment considerable si es compara amb el que s'ha obtingut al pou d'esgotament (ratio = 470). Els bacteris totals determinats en placa amb l'agar PCA han presentat uns valors lleugerament inferiors (ratio = 1194), mentre que en el recompte de cèl·lules totals amb taronja d'acridina han predominat també els organismes adherits en fase sèssil (ratio = 167).

La resta de grups estudiats també s'han acumulat de forma preferent a la fase sèssil (biofilm), malgrat que la seva proporció ha disminuït si es compara amb els valors obtinguts al pou. Així ha passat en els fongs filamentosos (ratio = 361), els coliformes totals (ratio = 37), *Pseudomonas* (ratio = 19) i *Escherichia coli* (ratio = 11).

Comparant l'evolució al llarg del temps dels biofilms desenvolupats en els dos casos estudiats al sistema del Besós (dades que no es mostren), tant a partir de l'aigua de drenatge del pou d'esgotament com del dipòsit de reserva, la importància dels microorganismes del biofilm respecte de la fase planctònica s'ha incrementat en la majoria dels casos en augmentar el temps d'exposició.



**Figura 3.8.** Proporción entre els microorganismes presents al biofilm i a la fase planctònica, a partir de l'aigua de drenatge del pou d'esgotament (esq.) i del dipòsit de reserva (dreta), al sistema experimental de Sant Martí.

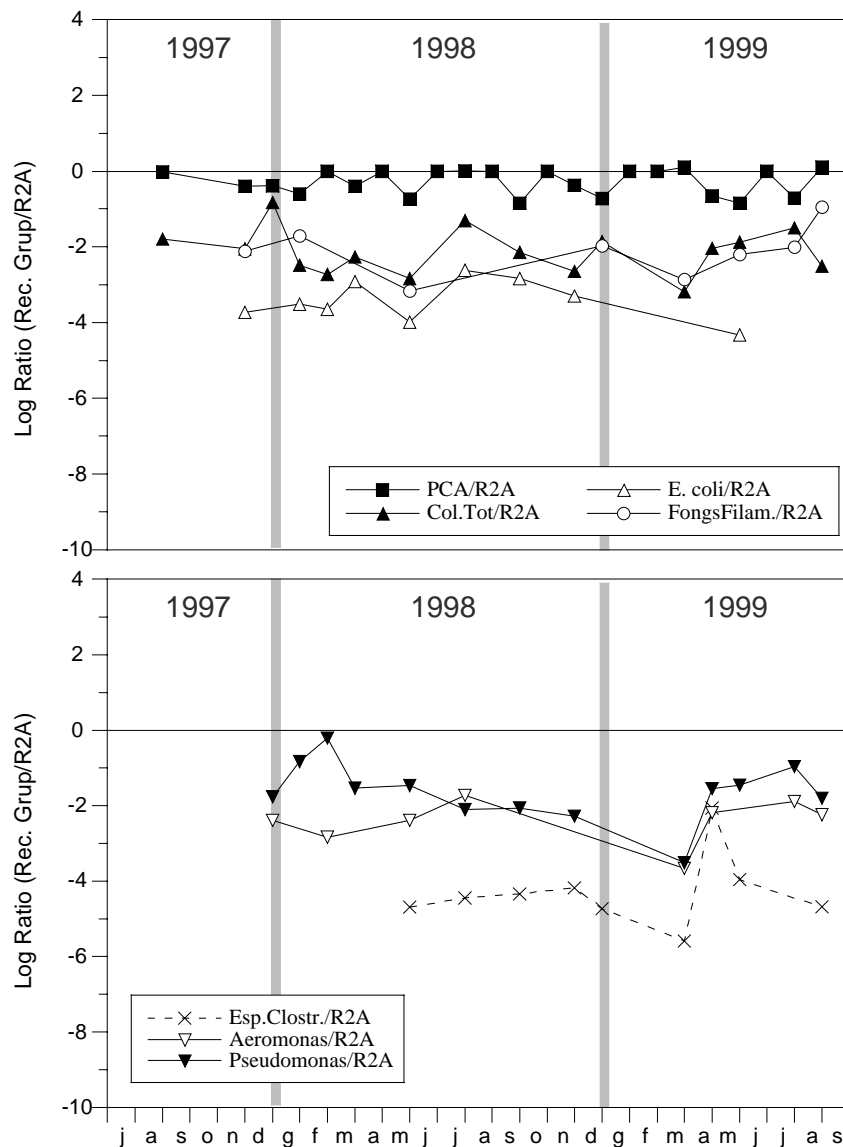
### 3.3.5. Canvis en la composició de la comunitat dels biofilms

Tenint en compte la gran importància dels bacteris heteròtrofs als biofilms desenvolupats –quantificats en placa amb l'agar R2A a 22°C–, s'ha determinat en cada cas la importància dels altres grups microbians respecte dels bacteris totals determinats en placa. Per això, s'ha comparat la variació al llarg del temps de la proporció dels diferents grups microbians en relació als bacteris heteròtrofs quantificats amb l'agar R2A a 22°C, tant en el cas dels bacteris presents a la fase planctònica a l'aigua de drenatge (Figura 3.9) com en els dos casos de biofilms desenvolupats a partir del pou de captació (Figura 3.10) i del dipòsit de reserva (Figura 3.11). Cal insistir en el fet que la presència d'alguns dels grups microbians estudiats a la fase planctònica ha presentat oscil·lacions considerables segons l'època de l'any, fet que pot dificultar la seva comparació amb els experiments de desenvolupament de biofilm.

**Fase Planctònica.** La importància relativa d'alguns dels grups microbians a la fase planctònica respecte dels bacteris heteròtrofs determinats amb R2A ha mantingut valors semblants al llarg del període estudiat. Així s'ha produït en el cas dels bacteris heteròtrofs determinats amb PCA, fongs filamentosos i *Escherichia coli*, on les oscil·lacions han estat menors d'1 log. En canvi, els coliformes totals i *Pseudomonas* han mostrat oscil·lacions més grans (lleugerament inferiors a 2 log) al llarg del període estudiat (veure Figura 3.9).

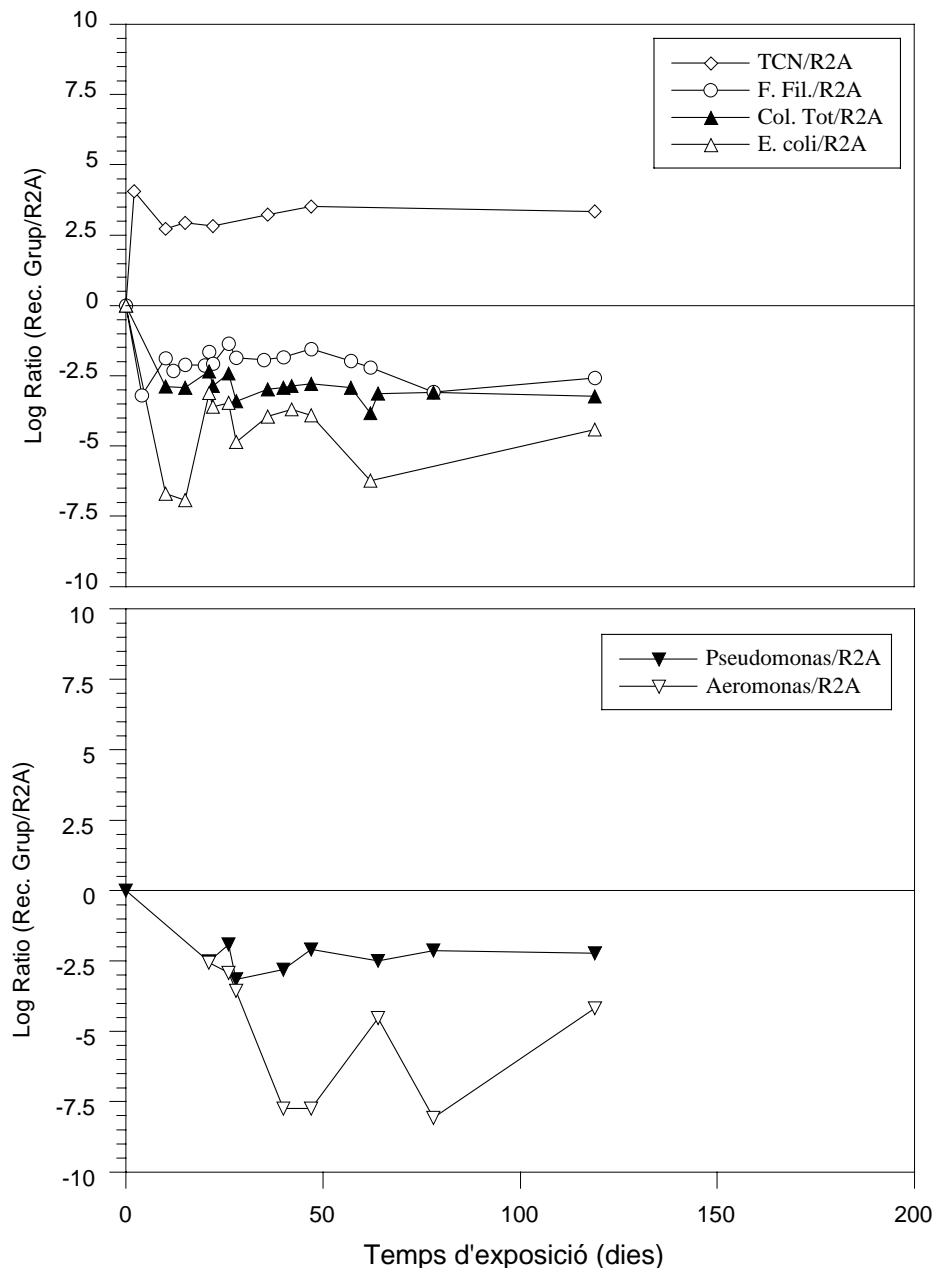


A la mateixa Figura 3.9 s'observa com a la fase planctònica els bacteris totals determinats en placa amb l'agar PCA han presentat valors lleugerament inferiors als obtinguts amb l'agar R2A. Després, el grup que ha presentat una major importància relativa és *Pseudomonas*. Els valors de la ratio *Pseudomonas*/R2A han estat entre 0 i -2 log, exceptuant el març de 1999, on ha assolit un valor mínim en relació als bacteris totals determinats amb l'agar R2A (-3,52 log). El valor màxim s'ha produït al febrer de 1998 (-0,21 log). Després del grup *Pseudomonas*, els coliformes totals i els fongs filamentosos han estat els següents grups en importància relativa. La ratio per als coliformes totals ha oscil·lat entorn de -1 i -3 log durant la major part del període mostrejat. Els fongs filamentosos han mantingut una tendència similar i amb uns valors lleugerament inferiors als coliformes totals (ratio entre -1 i -3 log) durant gran part del període estudiat. *Escherichia coli* ha mostrat uns valors sensiblement inferiors, entre -3 i -4 log, mantenint-se la ratio sempre per sota dels altres paràmetres microbiològics comentats.



**Figura 3.9.** Variació al llarg del temps d'exposició de la proporció dels diferents grups microbians en relació al total de bacteris heteròtrofs quantificats amb R2A a 22°C: bacteris en fase planctònica a l'aigua de drenatge.

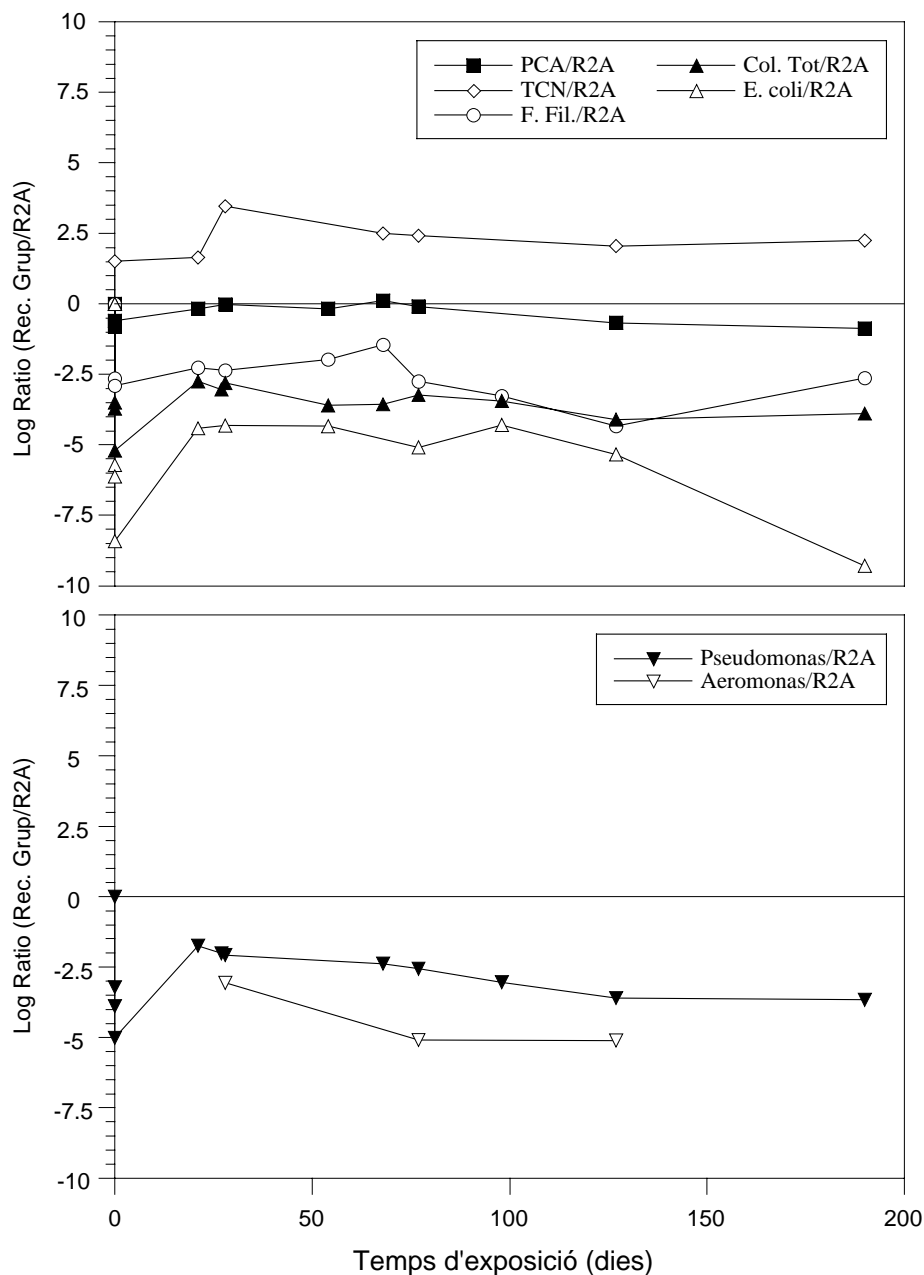
**Fase Sèssil.** Als biofilms formats a partir de l'aigua del pou de captació (Figura 3.10) també s'han observat variacions al llarg del temps d'exposició en la importància relativa de la majoria dels grups microbians respecte dels bacteris heteròtrofs determinats amb R2A. Els fongs filamentosos han presentat una importància relativa als recomptes en R2A lleugerament superior a *Pseudomonas* durant la major part del període estudiat, amb valors de la ratio entorn dels  $-2$  log. La seva importància relativa en els biofilms desenvolupats ha disminuït lleugerament als 80 dies, malgrat que posteriorment s'han recuperat fins a valors semblants als 25 dies, al final del període d'exposició a l'aigua de drenatge. Pel contrari, la importància de *Pseudomonas* enfront de R2A ha disminuït quasi 3 log durant els primers 25 dies d'exposició. A partir d'aquí, els nivells s'han recuperat ràpidament quasi 1,5 log als 40 dies, disminuint molt lleugerament (0,5 log) dels 50 fins als 125 dies.



**Figura 3.10.** Variació al llarg del temps d'exposició de la proporció dels diferents grups microbians en relació al total de bacteris heteròtrofs quantificats amb R2A a 22°C: desenvolupament de biofilm a partir del pou de captació.

A la mateixa Figura 3.10 s'observa com la importància relativa màxima –enfront de R2A– dels coliformes totals s'ha produït als 25 dies, mantenint-se la ratio entre  $-2$  i  $-4$  log al llarg de tot el període d'exposició, sempre per sota dels fongs filamentosos i *Pseudomonas*. Finalment, *Escherichia coli* ha presentat oscil·lacions bastant més importants, quasi 2,5 log dels 25 als 80 dies, disminuint primer la seva presència i recuperant-se més tard. En canvi, dels 80 als 125 dies els nivells s'han mantingut.

L'evolució dels diferents paràmetres en relació al recompte de bacteris totals en placa (agar R2A) als biofilms desenvolupats a partir de l'aigua del dipòsit de reserva ha estat bastant semblant a la produïda en el pou de captació. En el dipòsit de reserva (Figura 3.11), la importància relativa dels bacteris heteròtrofs determinats amb PCA respecte dels bacteris heteròtrofs determinats amb R2A s'ha mantingut durant els primers 80 dies d'exposició, però a partir d'aquest moment i fins al final del temps d'exposició als 190 dies els valors de la ratio han disminuït quasi 1 log. Semblaria com si la presència d'alguns microorganismes, adaptats a l'ambient local que es crea als biofilms del material de suport dels reactors, augmentés de forma considerable a partir dels 80 dies.



**Figura 3.11.** Variació al llarg del temps d'exposició de la proporció dels diferents grups microbians en relació al total de bacteris heteròtrofs quantificats amb R2A a 22°C: desenvolupament de biofilm a partir de l'aigua del dipòsit de reserva.

Després dels bacteris totals en agar PCA el grup que ha donat un recompte més elevat al dipòsit de reserva ha estat *Pseudomonas*, seguit dels fongs filamentosos i els coliformes totals. En el cas de *Pseudomonas*, la seva importància relativa enfront de R2A va augmentar quasi 3,5 log durant els primers 25 dies als biofilms desenvolupats a partir del dipòsit de reserva. Dels 25 als 75 dies s'ha observat un augment de la importància relativa dels fongs filamentosos, mentre que en *Pseudomonas* i els coliformes totals ha disminuït, de -2 a -3 log i de -3 a -4 log respectivament.

Dels 75 als 125 dies tots tres paràmetres han seguit disminuint respecte dels bacteris totals en R2A, arribant a valors propers als -4 log per cada un. Finalment, dels 125 als 200 dies d'exposició els valors de *Pseudomonas* i dels coliformes totals en referència als recomptes en R2A s'han mantingut pràcticament estables, mentre que en els fongs filamentosos la ratio ha augmentat 1,5 log la seva importància relativa, passant de -4 a -2,5 log. Respecte a *Escherichia coli* els seus valors en relació al recompte de R2A s'han mantingut entre -4 i -6 log, als biofilms formats a partir de l'aigua del dipòsit de reserva fins als 130 dies. A partir d'aquest moment i fins al final del període estudiat, no s'ha pogut detectar.

Per tant, la importància relativa dels diferents grups estudiats ha variat de forma significativa al llarg del període d'exposició. Així mateix, s'han observat diferències apreciables entre la composició dels biofilms formats a partir de l'aigua del pou de captació i del dipòsit de reserva. En general, la importància dels diferents grups específics determinats en relació als recomptes de bacteris heteròtrofs en R2A ha estat major en el cas dels biofilms desenvolupats a partir de l'aigua del pou (menor ratio), exceptuant el cas de les *Aeromonas*.

Tanmateix, la major presència de bacteris heteròtrofs a la fase estacionària dels biofilms desenvolupats a partir de l'aigua del dipòsit de reserva, fa disminuir la importància relativa dels altres grups microbians. Igual passa quan es compara la importància relativa de cada grup a la fase planctònica i als biofilms, degut al gran increment en el nombre dels bacteris heteròtrofs presents als biofilms. En canvi, el grup *Pseudomonas* ha mostrat respecte del recompte de bacteris heteròtrofs amb l'agar R2A, una major abundància a la fase planctònica (Figura 3.9).

#### 3.3.6. Estima de la taxa específica de creixement

S'ha caracteritzat la taxa específica de creixement del biofilm (veure 3.2.7, equació 3.3). El model simplificat que s'ha utilitzat (Van der Wende et al. 1989) assumeix que tant la taxa de mortalitat com el creixement planctònic són negligibles. En experiments realitzats a partir de l'aigua freàtica del dipòsit de reserva d'Alfons el Magnànim (estació experimental de Sant Martí, Besós), s'ha observat una gran variabilitat en els resultats obtinguts (veure Taula 3.11).

La taxa de creixement mitjana ha estat relativament bastant elevada,  $1,67 \times 10^{-3} \pm 3,05 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ , amb una mediana de  $1,38 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ . Això significa que el temps de generació o temps de duplicació mitjà del biofilm ha estat al voltant dels 25 dies (23,3 dies), amb una mediana de 21,2 dies, un màxim de 54,7 i un mínim de 7,5 dies.

**Taula 3.11.** Taxa específica de creixement del biofilm segons el model de Van der Wende et al. (1989)

Període	$X_b$ (cel. cm <sup>-2</sup> )	$X_E$ (cel. cm <sup>-3</sup> )	$X_S$ (cel. cm <sup>-3</sup> )	D (h <sup>-1</sup> )	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	T. generació (dies)
mar-99	4,0E+08	3,71E+06	7,68E+06	1775,6	1,20E-03	24,17
mar-99	6,0E+08	3,71E+06	7,68E+06	8560,0	3,86E-03	7,48
mar-99	2,0E+07	1,40E+06	1,86E+06	1775,6	2,76E-03	10,48
abr-99	5,7E+07	3,45E+05	4,43E+05	11566,6	1,36E-03	21,30
abr-99	4,6E+07	7,34E+05	8,34E+05	11566,6	1,72E-03	16,79
abr-99	8,8E+06	7,82E+05	8,00E+05	10061,6	1,40E-03	20,65
mai-99	4,5E+06	8,70E+03	1,80E+04	9740,8	1,37E-03	21,15
jul-99	8,0E+06	9,30E+03	2,00E+04	9740,8	8,84E-04	32,69
jul-99	3,0E+06	1,66E+04	1,90E+04	9740,8	5,28E-04	54,65
ago-99	1,3E+08	1,19E+06	2,15E+06	8280,9	1,67E-03	23,26
Mitjana	<b>1,27E+08</b>	<b>1,19E+06</b>	<b>2,15E+06</b>	<b>8,28E+03</b>	<b>1,67E-03</b>	<b>23,26</b>
Error Std.	6,47E+07	4,47E+05	9,51E+05	1,13E+03	3,05E-04	4,14
Max.	5,97E+08	3,71E+06	7,68E+06	11566,64	3,86E-03	54,65
Min.	3,00E+06	8,70E+03	1,80E+04	1775,57	5,28E-04	7,48

$X_b$ , Biomassa adherida

$X_E$ , Recompte de cèl·lules totals a l'entrada

$X_S$ , Recompte de cèl·lules totals a la sortida

### 3.4. Resultats a la zona de mostreig II: Sabadell

#### 3.4.1. Microorganismes planctònics

Igualment que a la zona de mostreig de Sant Martí (Besós, Barcelona), es va portar a terme un seguiment de la qualitat microbiològica de l'aigua (veure Figura 3.12), de l'estació experimental de Can Oriac (Sabadell) a les instal·lacions de CASSA, durant el període de novembre de 1997 fins al setembre de 1999. El nivell dels bacteris heteròtrofs totals determinats en placa amb l'agar R2A a 22°C va oscil·lar entre  $10^3$  ( $2 \times 10^3$  Ufc/mL, maig 1998) i  $10^2$  Ufc/mL ( $2,15 \times 10^2$  Ufc/mL, agost 1999).

Cal remarcar la presència d'oscil·lacions que semblen haver mostrat una certa periodicitat, malgrat que els increments sobtats (1 log) al llarg del mostreig s'han produït en èpoques diferents de l'any. Caldria estudiar la relació dels diferents factors ambientals importants en aquests augments del nombre de bacteris heteròtrofs (desembre de 1997, febrer i maig de 1998 i juliol del 1999).

La determinació del nombre de bacteris heteròtrofs amb l'agar PCA ha mostrat valors força semblants als obtinguts amb l'agar R2A (entre  $10^2$  i  $10^3$  Ufc/mL), quan s'incuba a 22°C (Figura 3.12, part superior). De la mateixa forma que passava a la zona de mostreig de Sant Martí (Besós), l'agar R2A va donar uns recomptes significativament més alts que l'agar PCA en tots els casos, exceptuant un punt (agost de 1999). Tanmateix, amb l'agar PCA a 22°C els nivells van mostrar menys oscil·lacions, especialment durant la primera part del mostreig, sense apreciar-se els augments experimentats amb l'agar R2A al desembre de 1997 i al febrer de 1998.

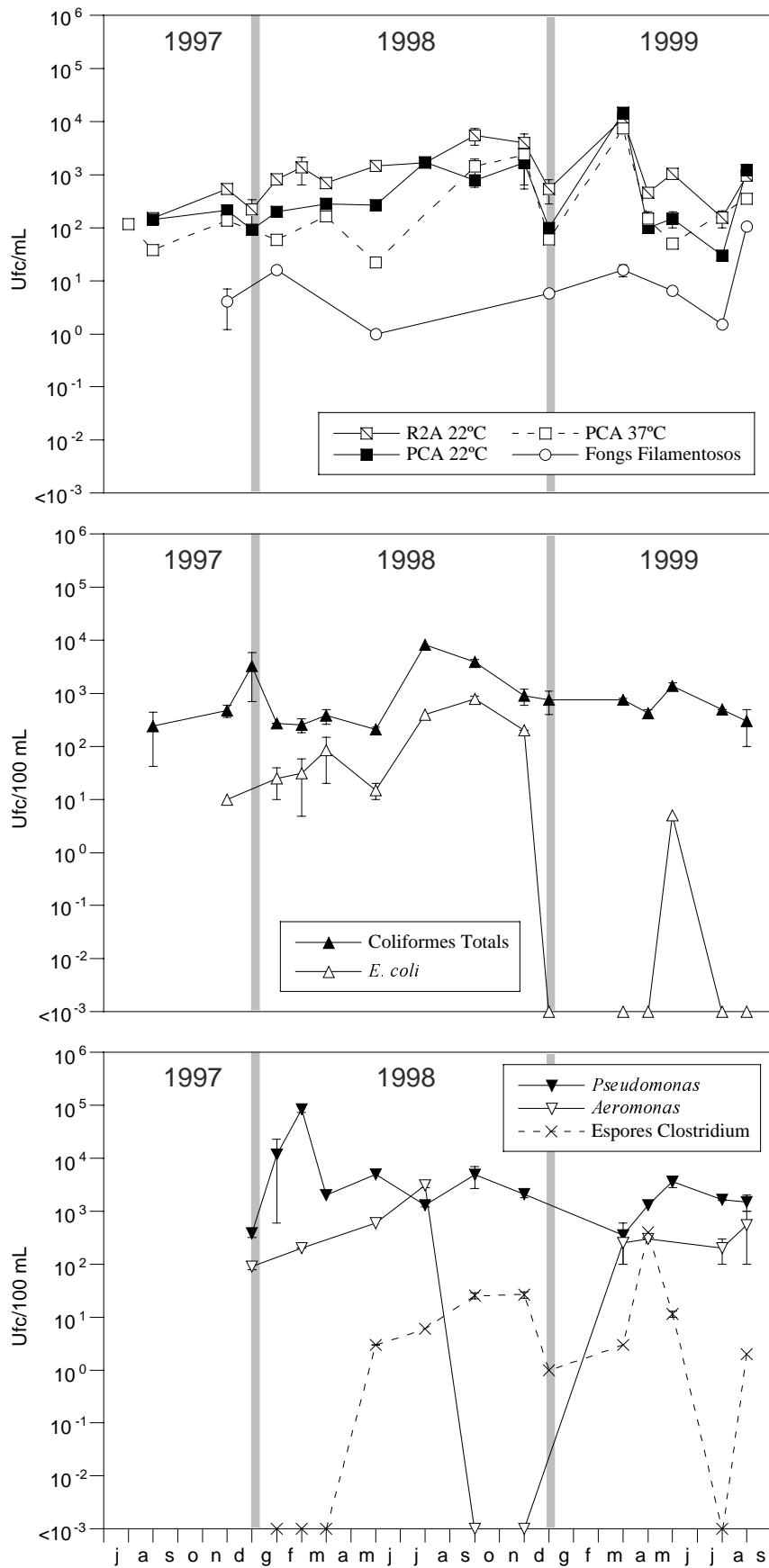
L'oscil·lació a les diferents èpoques de l'any ha estat major quan s'ha incubat l'agar PCA a 37°C (presentant una diferència lleugerament superior a 2 log entre el valor màxim i el mínim), encara que els recomptes han estat majoritàriament inferiors als obtinguts quan s'ha incubat el mateix medi a 22°C. En concret, a partir del juny de 1999 el nombre de bacteris heteròtrofs determinats amb PCA a 37°C ha estat significativament inferior al determinat amb el mateix medi incubant a 22°C, arribant a 1 log de diferència màxima el juliol de 1999.

A la mateixa Figura 3.12 (part superior) s'observa com el nivell de fongs filamentosos determinats amb l'agar sabouraud suplementat amb gentamicina ha oscil·lat de forma considerable entre  $10^0$  i  $10^2$  Ufc/mL. Curiosament, el valor màxim s'ha trobat al juny de 1999 ( $1,5 \times 10^2$  Ufc/mL) coincidint amb un dels períodes de menor presència dels bacteris heteròtrofs determinats en placa. Durant el període analitzat corresponent a 1998 s'ha observat un augment del nombre de fongs filamentosos, que ha coincidit amb la primera part de l'any, fins a l'estiu. Les dades obtingudes l'any 1999 semblen indicar que el nombre de fongs filamentosos disminueix a partir de començaments de l'estiu.

Els coliformes totals i *Escherichia coli* han presentat un comportament similar al llarg del període mostrejat (veure Figura 3.12, part central) entre  $1,03 \times 10^2$  i  $2,34 \times 10^4$  Ufc/100 mL, i entre 0 i  $1,1 \times 10^3$  Ufc/100 mL respectivament. Dos dels punts on la seva presència ha estat màxima (desembre de 1997 i maig de 1998), han coincidit amb els màxims trobats pels bacteris heteròtrofs i per *Pseudomonas*. En canvi, l'increment observat en els heteròtrofs i *Pseudomonas* durant el febrer de 1998 ha estat seguit per una disminució dels coliformes totals i de *Escherichia coli*.

*Pseudomonas* ha seguit un comportament pràcticament idèntic a l'observat anteriorment pels bacteris heteròtrofs determinats amb R2A (Figura 3.12, part inferior). Així s'han observat oscil·lacions de forma coincident (desembre de 1997, febrer i maig de 1998 i juliol del 1999), on els nivells d'aquest grup de bacteris han augmentat de forma significativa. La variació màxima ha estat superior (2 log) a la dels bacteris heteròtrofs, amb un mínim de  $8 \times 10^2$  Ufc/100 mL (gener 1998) i un màxim de  $8,16 \times 10^4$  Ufc/100 mL (desembre 1997).

Finalment, el nombre d'espores de clostridis ha estat nul durant gran part del mostreig realitzat, exceptuant el període que va de maig de 1998 fins al juny de 1999, on els nivells han oscil·lat quasi 1 log entre  $2,45 \times 10^1$  i els  $3,17 \times 10^0$  Ufc/100 mL.



**Figura 3.12.** Anàlisi microbiològica de l'aigua freàtica de l'estació experimental de Can Oriac (Sabadell) a les instal·lacions de CASSA.

A la Taula 3.12 s'observen les soques aïllades de la microbiota autòctona de l'aigua subterrània, on cal destacar la presència de membres de la família *Enterobacteriaceae*, com *Escherichia coli* i *Enterobacter aerogenes*, així com altres soques del gènere *Pseudomonas* i del grup *Mycobacterium*.

**Taula 3.12.** Microorganismes aïllats i identificats a l'aigua de l'estació experimental a Sabadell.

AÏLLAMENT	DATA	ESPÈCIE
SABADELL AIGUA	5/11/97	<i>Escherichia coli</i>
SABADELL AIGUA	17/12/97	<i>Escherichia coli</i>
SABADELL AIGUA	17/12/97	<i>Mycobacterium sp.</i>
SABADELL AIGUA	22/01/98	<i>Escherichia coli</i>
SABADELL AIGUA	4/02/98	<i>Escherichia coli</i>
SABADELL AIGUA	31/03/98	<i>Escherichia coli</i>
SABADELL AIGUA	31/03/98	<i>Pseudomonas cepacia</i>
SABADELL AIGUA	31/03/98	<i>Enterobacter aerogenes</i>
SABADELL AIGUA	31/03/98	<i>Mycobacterium sp.</i>
SABADELL AIGUA	5/05/98	<i>Rhodotorula spp.</i>
SABADELL AIGUA	5/05/98	<i>Penicillium sp.</i>
SABADELL AIGUA	26/05/98	<i>Escherichia coli</i>
SABADELL AIGUA	1/07/98	<i>Stemphillium sp.</i>
SABADELL AIGUA	1/07/98	<i>Cladosporium sp.</i>
SABADELL AIGUA	1/07/98	<i>Escherichia coli</i>
SABADELL AIGUA	1/07/98	<i>Staphylococcus sp.</i>
SABADELL AIGUA	1/07/98	<i>Staphylococcus sp. (coag.+)</i>
SABADELL AIGUA	30/06/99	<i>Bacillus sp.</i>
SABADELL AIGUA	30/06/99	<i>Klebsiella sp.</i>
SABADELL AIGUA	30/06/99	<i>Escherichia coli</i>
SABADELL AIGUA	10/08/99	<i>Escherichia coli</i>

#### 3.4.2. Desenvolupament de biofilm

L'examen dels resultats del desenvolupament de biofilms a partir de l'aigua freàtica de l'estació experimental de CASSA a Can Oriac, Sabadell (veure Figura 3.13) indica el manteniment durant la major part del temps d'exposició del recompte de bacteris heteròtrofs determinats amb agar R2A a 22°C, entre  $10^3$  i  $10^5$  Ufc/cm<sup>2</sup>.

El màxim de desenvolupament del biofilm –quantificat segons els bacteris heteròtrofs– s'ha obtingut al principi del temps d'exposició. Així, als dos dies es va arribar a  $7,03 \times 10^4$  Ufc/cm<sup>2</sup>, mentre que tot just al final del mateix s'ha arribat a un valor de  $2,35 \times 10^5$  Ufc/cm<sup>2</sup>.

En els recomptes de bacteris heteròtrofs amb agar R2A s'ha observat (Figura 3.13, part superior) un elevat grau d'oscil·lació (entre  $10^3$  i  $10^5$  Ufc/cm<sup>2</sup>), especialment des del segon dia d'exposició a l'aigua subterrània fins als 30 dies. Aquesta variació ha disminuït de forma considerable a partir dels 30 dies, mantenint-se els valors prop dels  $10^4$  Ufc/cm<sup>2</sup>.



En el cas dels fongs filamentosos s'ha observat una tendència similar, oscil·lant entre  $10^0$  i  $10^3$  Ufc/cm<sup>2</sup>. La variació observada en els recomptes ha estat especialment important durant el període comprès entre els dies 2 i 35, de la mateixa manera que en el recompte de bacteris heteròtrofs. A partir d'aquest moment, el nivell dels fongs filamentosos als biofilms desenvolupats s'ha mantingut entre  $10^1$  i  $10^2$  Ufc/cm<sup>2</sup>. Al final del temps d'exposició la presència d'aquest grup de microorganismes ha disminuït quasi 1 log, tendència inversa a l'observada en els bacteris heteròtrofs (R2A) durant el mateix període.

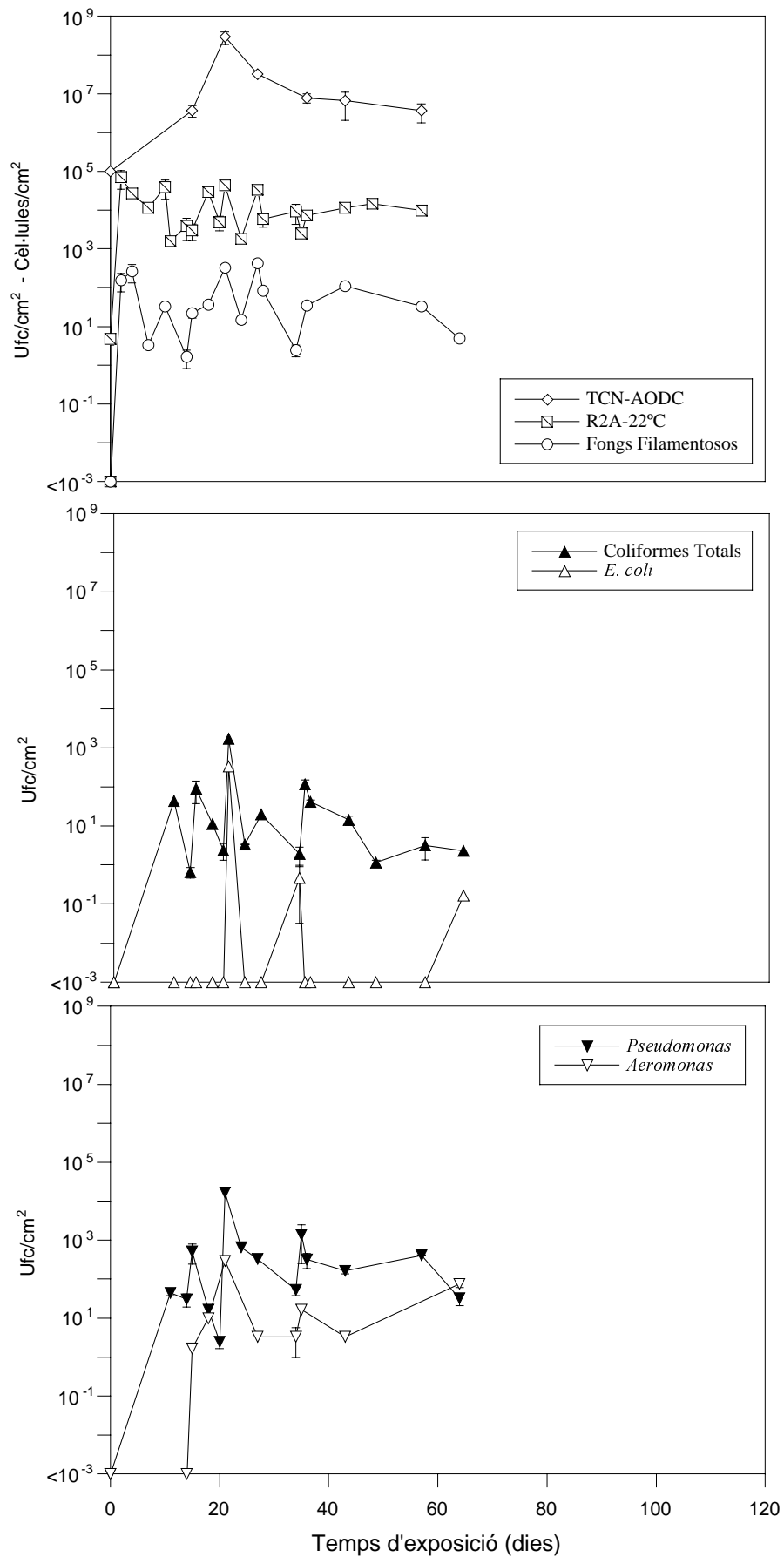
En el recompte microscòpic realitzat amb taronja d'acridina (veure Figura 3.13, part superior) el nombre de cèl·lules totals va augmentar inicialment, arribant a un màxim de colonització del material de suport de  $2,9 \times 10^8$  Cèl./cm<sup>2</sup> als 21 dies. Posteriorment, el recompte de cèl·lules totals adherides al material de suport va disminuir, mantenint-se a la fase estacionària entre  $10^6$ - $10^7$  Cèl./cm<sup>2</sup>. A la mateixa fase estacionària el recompte de viables ha representat, en realitat, entre un 0-1,1% del total de la població de cèl·lules adherida al medi de suport dels reactors.

La presència dels coliformes totals i *Escherichia coli* als biofilms desenvolupats també ha presentat una gran variabilitat al llarg del temps (veure Figura 3.13, part central). Els coliformes totals han oscil·lat entre els  $10^0$  i  $10^3$  Ufc/cm<sup>2</sup>, produint-se el màxim de variació durant els primers 35 dies d'exposició a l'aigua freàtica. També s'han observat dos màxims de colonització, essent el més important als 21 dies d'exposició amb  $1,69 \times 10^3$  Ufc/cm<sup>2</sup> en el cas dels coliformes totals i  $3,22 \times 10^2$  Ufc/cm<sup>2</sup> per *Escherichia coli*.

Després d'una disminució notable a partir dels 21 dies, els coliformes totals han augmentat una altra vegada la seva presència als 35 dies ( $1,18 \times 10^2$  Ufc/cm<sup>2</sup>). A partir d'aquest moment han disminuït quasi 2 log. Per la seva part, la presència de *Escherichia coli* als biofilms desenvolupats ha estat pràcticament nul·la durant la major part del temps d'exposició a l'aigua freàtica. Els seus valors sempre han estat inferiors als  $10^0$  Ufc/cm<sup>2</sup> exceptuant el màxim dels 21 dies, comentat anteriorment.

Els grups *Pseudomonas* i *Aeromonas* han mostrat una evolució semblant al llarg del temps (veure Figura 3.13, part inferior). Així, els recomptes han augmentat en els dos casos de forma considerable, arribant a un màxim de colonització als 21 dies d'exposició a l'aigua freàtica, amb uns valors de  $1,67 \times 10^4$  Ufc/cm<sup>2</sup> i  $2,95 \times 10^2$  Ufc/cm<sup>2</sup> respectivament. A partir dels 22 dies, els nivells dels dos grups han disminuït aproximadament 2 log fins als 35 dies. En aquest punt, s'ha produït un segon increment en la presència de *Pseudomonas* i *Aeromonas* als biofilms desenvolupats, de forma semblant a la que s'ha produït en el cas dels coliformes totals. Posteriorment, i fins al final del període mostrejat, els recomptes de *Pseudomonas* han disminuït més d'un log, mentre que *Aeromonas* ha augmentat de forma lleugerament inferior a 1 log.

A la Taula 3.13 s'observen les soques aïllades de la microbiota autòctona a partir dels biofilms formats per l'exposició del medi porós a l'aigua subterrània. Cal destacar la presència de membres de la família *Enterobacteriaceae*, alguns dels quals s'inclouen dins dels coliformes, com *Escherichia coli* i *Citrobacter freundii*, però sobretot els patògens *Yersinia enterocolitica* i *Salmonella choleraesuis*. També s'han aïllat nombroses espècies del gènere *Pseudomonas* i *Aeromonas*, algunes de les quals poden actuar com a patògens oportunistes. A més, cal destacar la presència de diferents soques dels anomenats antagonistes de coliformes, com *Flavobacterium*, *Pasteurella*, *Acinetobacter*, etc.



**Figura 3.13.** Desenvolupament de biofilm a partir de l'aigua freàtica de l'estació experimental de CASSA a Sabadell.

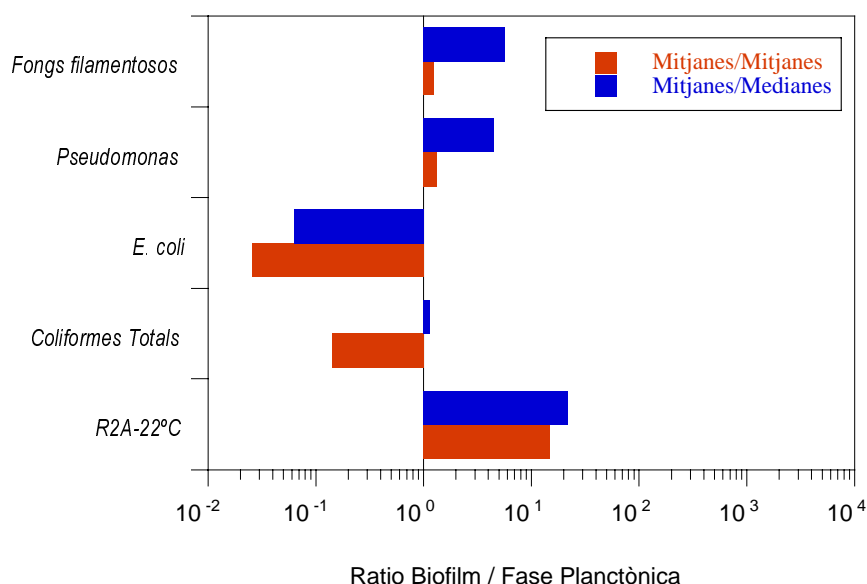
**Taula 3.13.** Microorganismes aïllats i identificats als biofilms formats a partir del sistema experimental dispostat a l'estació experimental de CASSA a Sabadell.

AÏLLAMENT	DATA	TEMPS D'EXPOSICIÓ	ESPÈCIE
SABADELL 2	17/3/98	34 dies	<i>Escherichia coli</i>
SABADELL	5/5/98	5 min.	<i>Salmonella choleraesuis</i>
SABADELL	5/5/98	5 min.	<i>Xenorhabdus luminiscens</i>
SABADELL	5/5/98	5 min.	<i>Pseudomonas vesicularis</i>
SABADELL	5/5/98	0 min.	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>
SABADELL	5/5/98	5 min.	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>
SABADELL	5/5/98	5 min.	<i>Pseudomonas diminuta</i>
SABADELL	5/5/98	5 min.	<i>Bacillus sp.</i>
SABADELL	5/5/98	5 min.	<i>Streptococcus sp.</i>
SABADELL	5/5/98	5 min.	<i>Staphylococcus sp.</i>
SABADELL	5/5/98	0 min.	<i>Staphylococcus sp. (coag.+)</i>
SABADELL	5/5/98	0 min.	<i>Staphylococcus sp.</i>
SABADELL 1	19/5/98	21 dies	<i>Escherichia coli</i>
SABADELL 3	26/5/98	21 dies	<i>Penicillium sp.</i>
SABADELL 3	26/5/98	21 dies	<i>Bacillus sp.</i>
SABADELL 3	1/7/98	0 min.	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>
SABADELL 1	1/7/98	43 dies	<i>Chaetomium sp.</i>
SABADELL 3	1/7/98	0 min.	<i>Bacillus sp.</i>
SABADELL D1	7/7/99	15 dies	<i>Pseudomonas maltophilia</i>
SABADELL D1	7/7/99	15 dies	<i>Rhodotorula spp.</i>
SABADELL D1	7/7/99	15 dies	<i>Bacillus sp.</i>
SABADELL D1	7/7/99	15 dies	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
SABADELL D4	7/7/99	15 dies	<i>Comamonas acidovorans</i>
SABADELL D4	7/7/99	15 dies	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
SABADELL E1	7/7/99	15 dies	<i>Pasteurella spp.</i>
SABADELL D3	16/7/99	24 dies	<i>Escherichia coli</i>
SABADELL D3	16/7/99	24 dies	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
SABADELL D3	16/7/99	24 dies	<i>Pseudomonas mendocina</i>
SABADELL D5	16/7/99	24 dies	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SABADELL D1	27/7/99	20 dies	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
SABADELL D1	27/7/99	20 dies	<i>Comamonas testosteroni</i>
SABADELL D2	27/7/99	20 dies	<i>Comamonas testosteroni</i>
SABADELL D2	27/7/99	20 dies	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
SABADELL D6	27/7/99	20 dies	<i>Citrobacter freundii</i>
SABADELL E2	27/7/99	11 dies	<i>Citrobacter freundii</i>
SABADELL E3	27/7/99	35 dies	<i>Pasteurella spp.</i>
SABADELL E3	27/7/99	35 dies	<i>Aeromonas hydrophila</i>
SABADELL E3	27/7/99	35 dies	<i>Citrobacter braakii</i>
SABADELL E4	27/7/99	35 dies	<i>Sphingobacterium multivorum</i>
SABADELL E4	27/7/99	35 dies	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>
SABADELL E6	27/7/99	20 dies	<i>Pasteurella spp.</i>
SABADELL D1	10/8/99	14 dies	<i>Pseudomonas spp.</i>
SABADELL D4	10/8/99	14 dies	<i>Yersinia enterocolitica</i>
SABADELL E1	10/8/99	14 dies	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
SABADELL E4	10/8/99	14 dies	<i>Escherichia coli</i>
SABADELL D1	30/8/99	34 dies	<i>Escherichia coli</i>
SABADELL D2	30/8/99	34 dies	<i>Klebsiella oxytoca</i>
SABADELL D3	30/8/99	34 dies	<i>Escherichia coli</i>
SABADELL E2	30/8/99	34 dies	<i>Escherichia coli</i>

## 3.4.3. Comparació del nº de microorganismes en fase biofilm i planctònica

S'ha comparat la presència dels grups de microorganismes estudiats tant a la fase planctònica com en fase sèssil, calculant la mitjana dels microorganismes presents a la fase planctònica i expressant els resultats per a cada grup estudiat (nombre mL<sup>-1</sup>). Igual que s'ha fet amb els recomptes obtinguts a Sant Martí (Besós), s'han realitzat alhora els càlculs amb la mediana. Els biofilms desenvolupats han arribat a una fase de cert equilibri a partir dels 40 dies d'exposició, tal com s'ha observat en la majoria dels paràmetres estudiats (veure Figura 3.13). Així, la mitjana de microorganismes adherits s'ha calculat seleccionant les dades obtingudes, en cada cas, a partir dels 40 dies d'exposició. D'aquesta forma es tenen en compte les oscil·lacions produïdes durant aquest últim període d'exposició a l'aigua freàtica.

A la Figura 3.14 s'observa la ratio biofilm/fase planctònica pels diferents paràmetres microbiològics estudiats en el sistema experimental situat a Sabadell. L'augment més important a la fase biofilm respecte de la fase planctònica s'ha produït en els bacteris totals determinats en placa amb l'agar R2A (ratio = 21,78), seguit ja amb una ratio força inferior pels fongs filamentosos (ratio = 5,73) i *Pseudomonas* (ratio = 4,48). D'altra banda, la presència de coliformes totals ha estat lleugerament superior als biofilms que a la fase planctònica (ratio = 1,16), mentre que *Escherichia coli* (ratio = 0,06) pràcticament no s'ha detectat als biofilms, durant les últimes fases del període d'exposició a l'aigua.



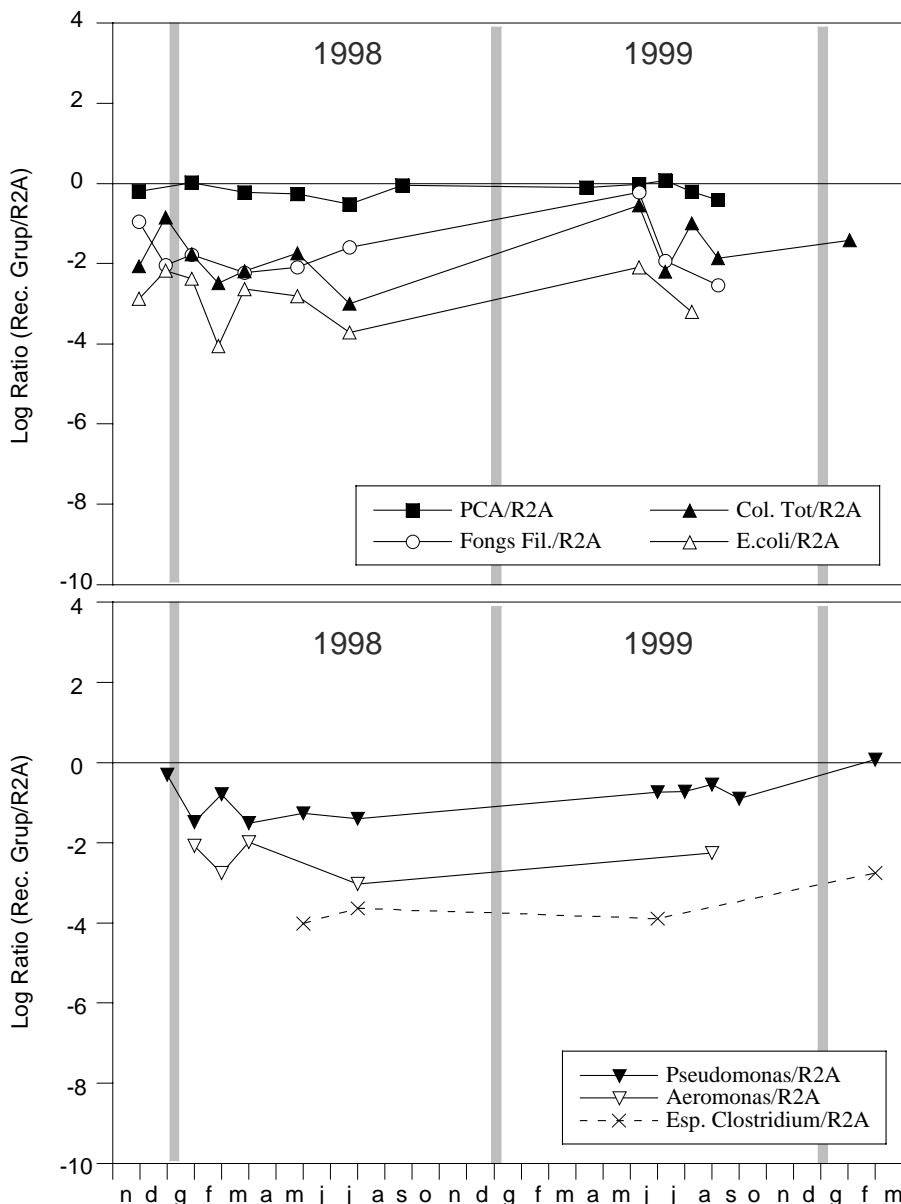
**Figura 3.14.** Proporció entre els microorganismes presents al biofilm i a la fase planctònica, a partir de l'aigua freàtica de l'estació experimental de CASSA a Sabadell.

És evident la importància que poden adquirir els microorganismes del biofilm respecte de la fase planctònica, tal com ho demostren les dades per als bacteris heteròtrofs. Tanmateix, cal considerar que algun factor pot haver dificultat la recuperació de part de la microbiota present als biofilms, disminuint d'aquesta forma la ratio biofilm/fase planctònica. En aquest sentit, les observacions visuals dels biofilms (veure 4.4.1) han permès constatar la presència de precipitats inorgànics a la superfície del material de suport dels reactors. Aquests, s'han pogut observar a simple vista a partir dels 15 dies d'exposició a l'aigua freàtica (veure Figura 4.13), encara que és indubtable que han adquirit més importància a mesura que ha augmentat el temps de contacte. És raonable pensar que la formació d'aquests precipitats inorgànics pot haver dificultat la recuperació de part dels microorganismes que formen part del biofilm. Segurament, el desenvolupament d'aquests precipitats ha dificultat la metodologia de selecció emprada, especialment pel que fa referència a la utilització d'un bany d'ultrasons per separar els microorganismes del material de suport. Caldrà confirmar aquesta hipòtesi amb observacions microscòpiques i altres proves.

3.4.4. Canvis en la composició de la comunitat dels biofilms

Tal i com s'ha fet anteriorment s'ha volgut determinar en cada cas la importància dels diferents grups microbians estudiats respecte dels bacteris heteròtrofs (quantificats en placa amb l'agar R2A a 22°C). A les següents dues figures es compara la variació al llarg del temps de la proporció dels diferents grups microbians en relació als bacteris heteròtrofs quantificats en placa amb l'agar R2A, tant en el cas dels bacteris presents a la fase planctònica (Figura 3.15) com en els biofilms desenvolupats (Figura 3.16).

**Fase Planctònica.** A la fase planctònica (Figura 3.15), la importància relativa d'alguns dels grups microbians respecte dels bacteris heteròtrofs determinats amb R2A ha oscil·lat de forma apreciable, variant la ratio entorn dels 2 log en la majoria dels casos estudiats. El grup més representatiu enfront dels bacteris heteròtrofs ha estat *Pseudomonas* durant la major part del període estudiat, seguit dels fongs filamentosos, els coliformes totals i *Escherichia coli* en l'últim lloc. El primer grup ha estat també el que ha presentat menys oscil·lacions a la fase planctònica, mantenint valors semblants al llarg del temps d'estudi. Això ha fet que la relació *Pseudomonas/R2A* s'hagi mantingut durant la major part del temps al voltant de -1 log.



**Figura 3.15.** Variació al llarg del temps d'exposició de la proporció dels diferents grups microbians, a la fase planctònica de l'aigua subterrània de Sabadell, en relació al total de bacteris heteròtrofs quantificats amb l'agar R2A.

El segon grup en importància han estat els fongs filamentosos, superats únicament en dos moments puntuals pels coliformes totals. La relació *Fongs filamentosos/R2A* s'ha mantingut durant la primera part de l'any 1998 al voltant de -2 log. No obstant, la seva importància relativa ha augmentat de forma considerable a l'estiu, especialment al 1999.

En aquest sentit, cal remarcar l'oscil·lació important que s'ha produït en els diferents grups estudiats durant el període estival de 1999. Concretament al juny de 1999, la importància relativa dels diferents grups en relació als bacteris heteròtrofs ha augmentat de forma considerable, fins arribar la relació a valors propers als 0 Log en el cas dels fongs filamentosos, coliformes totals i *Pseudomonas*. Respecte als coliformes totals, la seva presència a la fase planctònica ha variat de forma considerable (quasi 3 log). El màxim s'ha produït al desembre de 1997 i, com ja s'ha comentat, durant l'estiu de 1999. Curiosament, el mínim de presència en relació als bacteris heteròtrofs s'ha produït durant l'estiu de 1998, concretament al juliol.

*Escherichia coli* ha seguit una tendència molt semblant als coliformes totals en les seves variacions al llarg del període estudiat, encara que respecte del bacteris heteròtrofs determinats amb l'agar R2A ha estat el grup que ha presentat la ratio més baixa, de -2 a -4 Log.

**Fase Sèssil.** Igual que ha passat en el cas del sistema experimental situat a Sant Martí, els grups estudiats que formen part dels biofilms desenvolupats a partir de l'aigua subterrània a Sabadell han variat la seva importància relativa al llarg del període d'exposició. Malgrat la presència d'algunes tendències generals similars, s'han observat diferències apreciables en la presència de la majoria dels grups estudiats al llarg del temps d'exposició (Figura 3.16).

El grup *Pseudomonas* s'ha mantingut als biofilms, igual que a la fase planctònica, com el més important en relació als bacteris heteròtrofs R2A (veure Figura 3.16, part inferior). Això ha estat així durant els primers 35 dies d'exposició, encara que cal constatar la presència d'oscil·lacions importants. Aquestes variacions en el nivell de *Pseudomonas* respecte dels bacteris heteròtrofs s'han produït, especialment, entre els 15 i els 35 dies. Segurament es podria establir una relació amb la formació de precipitats inorgànics al material de suport, perquè aquests dificultarien la recuperació d'una part important dels microorganismes adherits, tal com s'ha comentat anteriorment. A partir dels 35 i fins als 60 dies, la relació *Pseudomonas/R2A* s'ha mantingut a l'entorn o lleugerament per sobre dels -2 log.

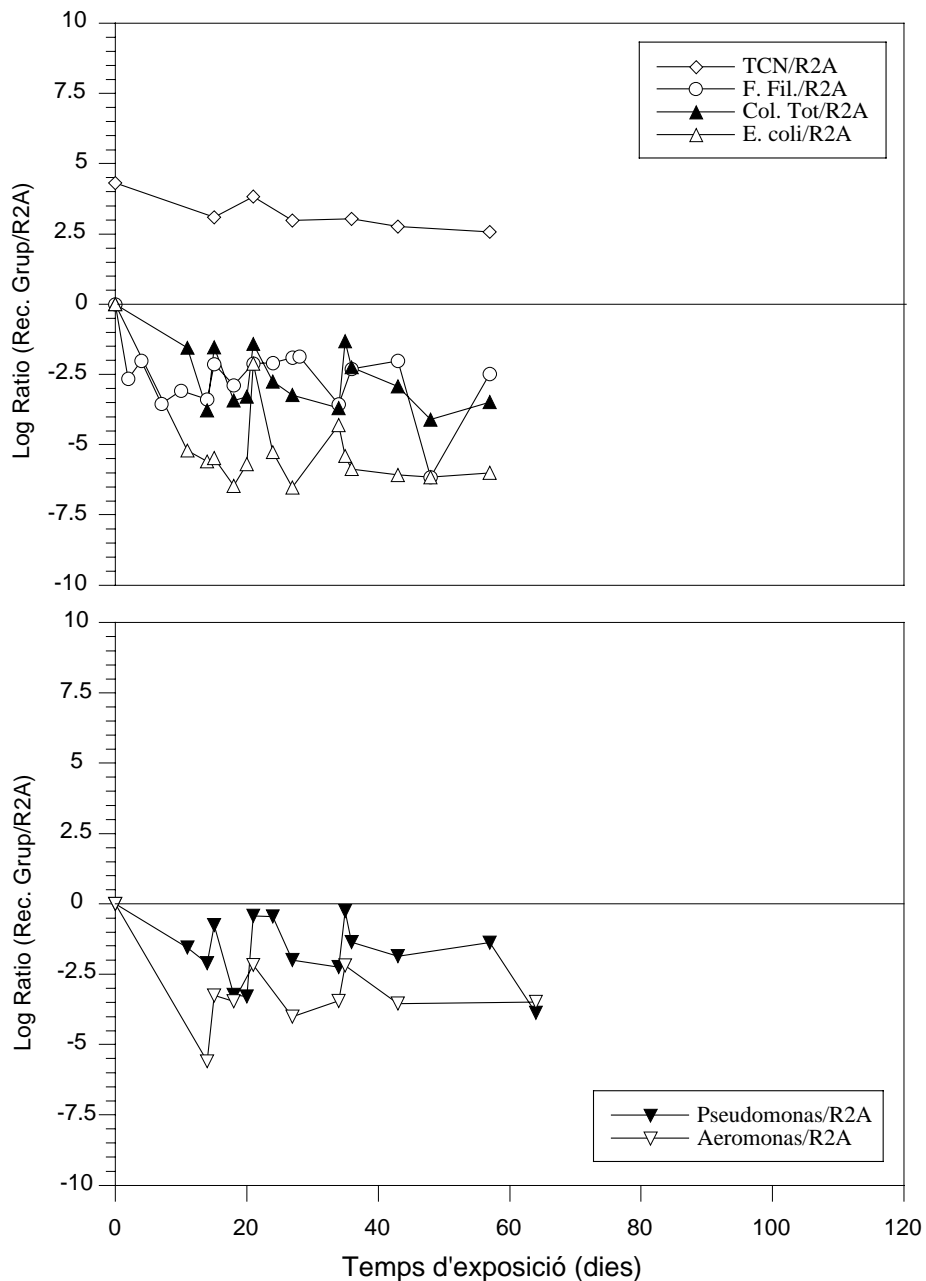
A la mateixa Figura 3.16 cal destacar la presència als biofilms del grup *Aeromonas*, malgrat que no es va poder aïllar en cap cas de la fase planctònica. La relació *Aeromonas/R2A* ha estat entre -2 i -4 log durant la major part del temps d'exposició, amb oscil·lacions importants dels seus nivells durant els primers 35 dies, com ha passat en els altres grups. A partir d'aquest moment, la seva importància relativa respecte dels bacteris heteròtrofs s'ha mantingut lleugerament per sobre dels -4 log.

Els coliformes totals (Figura 3.16, part superior) han mostrat als biofilms unes oscil·lacions (2,5 log) semblants a *Pseudomonas* durant els primers 35 dies d'exposició a l'aigua. La seva importància relativa també ha disminuït de forma apreciable (3 log) a partir dels 40 dies i fins al final del temps d'exposició. Després dels coliformes totals, el tercer grup en importància relativa enfront dels bacteris heteròtrofs han estat els fongs filamentosos, entre -2 i -4 log durant els primers 45 dies d'exposició. No obstant, la seva presència ha estat superior als coliformes totals en algun punt. La importància dels fongs filamentosos en relació als bacteris totals determinats en placa amb l'agar R2A ha disminuït a partir dels 45 dies, de forma semblant als altres grups comentats.

Finalment, la relació *Escherichia coli/R2A* s'ha mantingut al voltant dels -6 log durant la major part del temps d'exposició, exceptuant el període que va dels 20 als 40 dies. Durant aquest temps els nivells de *Escherichia coli* respecte els bacteris heteròtrofs han oscil·lat de forma considerable, arribant en un cas a una importància relativa (-2 log, 21 dies) semblant a la dels fongs filamentosos i només lleugerament inferior a la dels coliformes totals.

En tot cas, els recomptes en R2A han suposat una fracció molt petita de les cèl·lules totals. Tal com es pot apreciar a la Figura 3.16 (part superior) els recomptes de viables han representat a la fase estacionària entre 0,1-1% del total de la població adherida al medi de suport dels reactors.

Malgrat que les oscil·lacions dels nivells poden dificultar les comparacions, sembla evident que la importància relativa dels diferents grups estudiats enfront dels bacteris heteròtrofs ha estat menor als biofilms que a la fase planctònica. Les majors diferències s'han produït en el cas d'*Aeromonas* i *Escherichia coli*, seguits pels fongs filamentosos, els coliformes totals i, en últim lloc, *Pseudomonas*.



**Figura 3.16.** Variació al llarg del temps de la proporció dels diferents grups microbians en relació al total de bacteris heteròtrofs quantificats amb l'agar R2A, als biofilms formats a partir de l'aigua subterrània de Sabadell.

### 3.5. Resultats a la zona de mostreig III: Xarxa de distribució d'aigua potable (Lab. Microbiologia EUOOT-UPC)

#### 3.5.1. Microorganismes planctònics

La Figura 3.17 mostra els resultats de l'anàlisi microbiològic realitzat a la xarxa de distribució d'aigua potable de l'EUOOT (Laboratori de Microbiologia, EUOOT-UPC, Terrassa). El nivell de bacteris heteròtrofs totals determinats en placa amb l'agar R2A es va mantenir al voltant de  $10^0$  Ufc/mL durant la major part del primer període estudiat (març-juliol de 1998), amb un valor màxim de  $4,25 \times 10^0$  (març de 1998). Aquests nivells van disminuir encara més fins a valors pràcticament nuls, al setembre de 1998.

La presència de fongs totals es va mantenir sempre per sota de les  $10^1$  Ufc/mL, arribant a un màxim de  $8,2 \times 10^0$  Ufc/mL el juliol de 1998 (Figura 3.17, part superior), no observant-se fongs filamentosos durant tot el període. Tampoc es van detectar coliformes totals ni *Escherichia coli* al llarg del temps de mostreig (Figura 3.17, part central). Finalment, a la mateixa figura s'observa com el grup *Pseudomonas* va passar dels valors nuls inicials a un màxim de  $2,0 \times 10^0$  Ufc/100 mL al final del període estudiat.

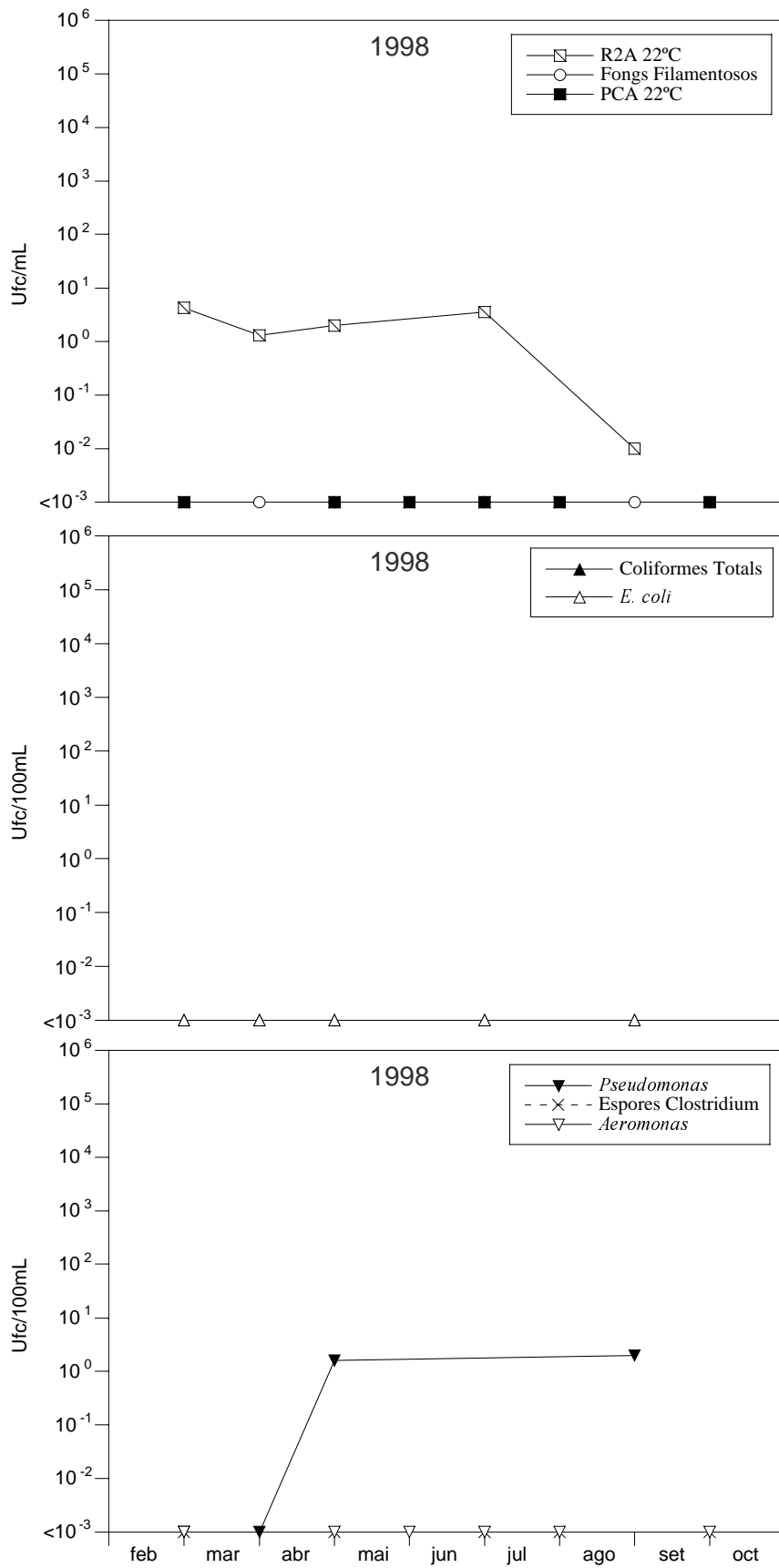
Al mateix temps que es realitzava el mostreig microbiològic es van determinar els nivells de clor total i lliure de la forma descrita a 3.2.8. A la Taula 3.14 s'observa com els nivells no van disminuir mai per sota de 1 mg/L de clor lliure i de 1,25 mg/L de clor total. En general, els nivells més elevats de clor es van presentar als mesos estivals, amb un màxim de 1,8 mg/L de clor lliure i 2,0 mg/L de clor total a finals de juliol de 1998.

**Taula 3.14.** Nivells de clor lliure i total a l'aigua potable de la xarxa de distribució interna del Lab. de Microbiologia de l'EUOOT (UPC, Terrassa).

Mostreig	Clor Lliure (mg/L)	Clor Total (mg/L)
4/2/98	1,1	1,30
17/2/98	1,3	1,50
25/2/98	1,2	1,25
17/3/98	1,1	1,30
31/3/98	1,0	1,25
8/4/98	1,3	1,50
8/5/98	1,5	1,60
12/5/98	1,2	1,35
15/5/98	1,5	1,75
17/7/98	1,3	1,50
29/7/98	1,8	2,00
18/8/98	1,3	1,80
22/9/98	1,5	1,90
16/10/98	1,5	1,80

També es van aïllar diferents membres de la microbiota autòctona de l'aigua potable. La majoria d'aquests acostumen a ser organismes resistents a nivells elevats de clor, com s'ha demostrat en treballs anteriors (Mir et al. 1997). A la Taula 3.15 s'observen les soques aïllades, on cal destacar la presència de bacteris Gram-positius com *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus sp.* i *Bacillus sp.* Altres estudis anteriors ja han destacat la capacitat que presenten alguns d'aquests bacteris Gram-positius per resistir concentracions elevades de clor (LeChevallier et al. 1980, Mir et al. 1997).





**Figura 3.17.** Anàlisi microbiològica de l'aigua potable de la xarxa de distribució interna del Lab. de Microbiologia de l'EUOOT (UPC, Terrassa).

**Taula 3.15.** Microorganismes aïllats i identificats a l'aigua potable de la xarxa de distribució interna del Lab. de Microbiologia de l'EUOOT (UPC, Terrassa).

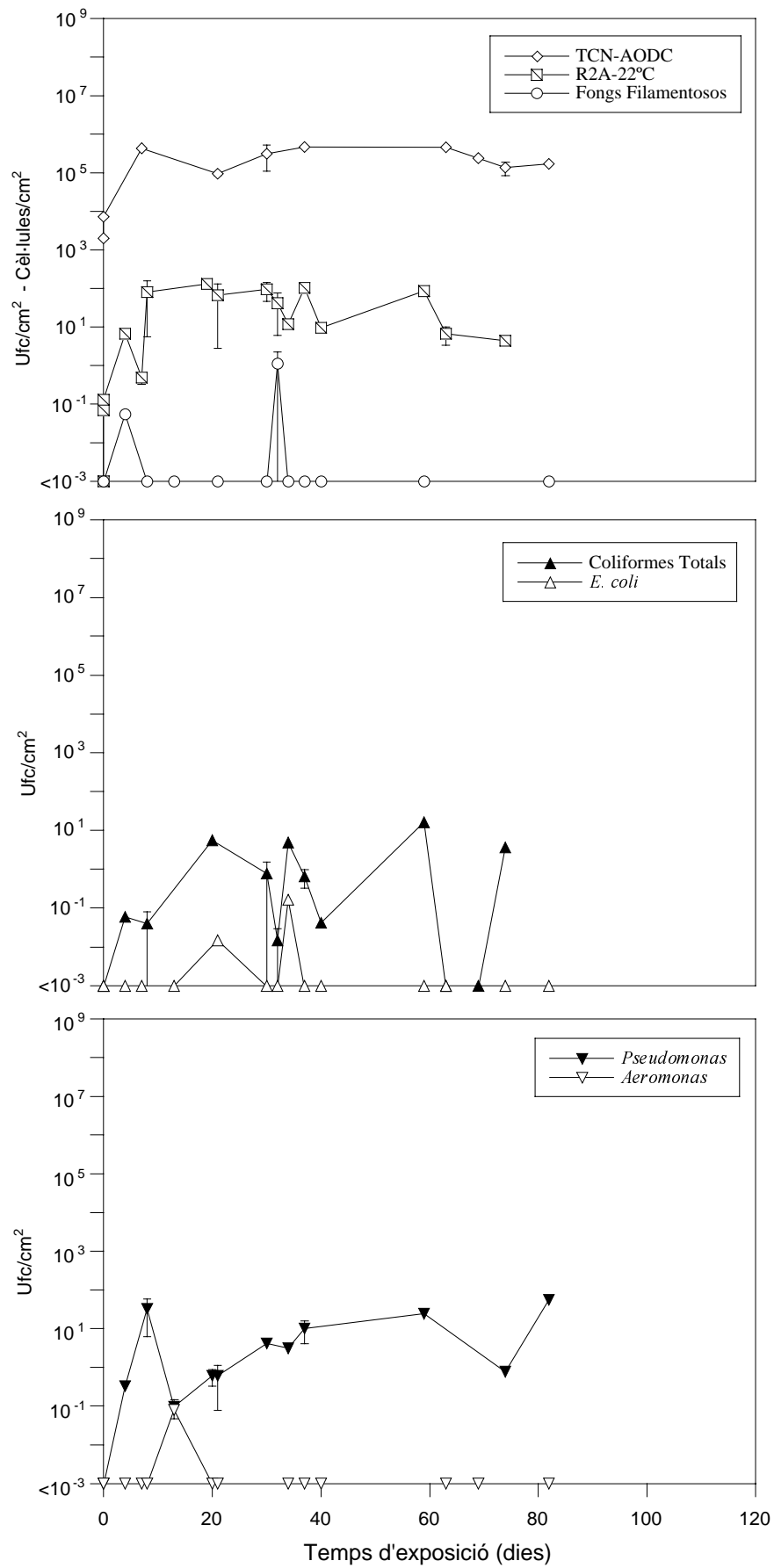
AÏLLAMENT	DATA	ESPÈCIE
EUOOT	4/02/98	<i>Bacillus sp.</i>
EUOOT	4/02/98	<i>Staphylococcus sp.</i>
EUOOT	17/02/98	<i>Staphylococcus sp.</i>
EUOOT	17/02/98	<i>Pseudomonas spp.</i>
EUOOT	25/02/98	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
EUOOT	25/02/98	<i>Staphylococcus sp.</i>
EUOOT	25/02/98	<i>Bacillus mycoides</i>
EUOOT	31/03/98	<i>Staphylococcus sp.</i>
EUOOT	31/03/98	<i>Pseudomonas spp.</i>
EUOOT	31/03/98	<i>Bacillus sp.</i>
EUOOT	8/05/98	<i>Micrococcus luteus</i>
EUOOT	15/05/98	<i>Staphylococcus sp.</i>
EUOOT	15/05/98	<i>Pseudomonas spp.</i>
EUOOT	15/05/98	<i>Bacillus sp.</i>
EUOOT	18/08/98	<i>Micrococcus luteus</i>
EUOOT	18/08/98	<i>Comomonas testosteroni</i>
EUOOT	18/08/98	<i>Staphylococcus sp.</i>
EUOOT	22/09/98	<i>Bacillus sp.</i>

### 3.5.2. Desenvolupament de biofilm

El nivell de bacteris heteròtrofs presents als biofilms desenvolupats a partir de l'aigua de la xarxa de distribució d'aigua potable al Laboratori de Microbiologia de l'EUOOT (UPC, Terrassa) determinat amb l'agar R2A, es va establir en valors propers a  $10^2$  Ufc/cm<sup>2</sup> (veure Figura 3.18, part superior). El biofilm ha assolit valors estables en poc temps malgrat la gran variabilitat existent, necessitant només 8 dies per arribar a  $8,08 \times 10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup>. Aquests valors s'han mantingut estables fins als 30 dies d'exposició a l'aigua potable. A partir d'aquest moment i fins als 60 dies, el recompte de bacteris heteròtrofs ha oscil·lat entre  $10^1$  i  $10^2$  Ufc/cm<sup>2</sup>, amb un màxim de  $1,03 \times 10^2$  Ufc/cm<sup>2</sup> als 37 dies. Durant l'últim període de temps estudiat els nivells han disminuït més de 1 log en el menor cas, oscil·lant entre  $10^{-1}$  i  $10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup> i amb un valor mínim de  $1,1 \times 10^{-1}$  Ufc/cm<sup>2</sup> als 74 dies d'exposició.

En el recompte microscòpic directe realitzat amb taronja d'acridina s'ha observat una estabilització entre les  $10^5$  i  $10^6$  Cèl./cm<sup>2</sup> (Figura 3.18, part superior), arribant en 7 dies a  $4,25 \times 10^5$  Cèl./cm<sup>2</sup>. Aquest valor s'ha mantingut, malgrat alguna lleugera disminució posterior, fins als 60 dies de contacte. Més tard, el nombre de cèl·lules totals presents als biofilms han disminuït lleugerament, per mantenir-se fins al final del temps de contacte prop de les  $10^5$  Cèl./cm<sup>2</sup>. Els recomptes de viables (Ufc/cm<sup>2</sup>) han representat a la fase estacionària, aproximadament el 0,01% del total de la població de cèl·lules adherida al medi porós dels reactors.

Els fongs filamentosos han mostrat als biofilms una presència força reduïda. De fet, només es van poder aïllar en dos punts del mostreig, als 4 i als 32 dies, amb un valor màxim en aquest últim de  $1,11 \times 10^0$  Ufc/cm<sup>2</sup>.



**Figura 3.18.** Desenvolupament de biofilm a partir de l'aigua potable de la xarxa de distribució interna del Lab. de Microbiologia de l'EUOOT (UPC, Terrassa).

La Figura 3.18 també mostra la presència als biofilms dels coliformes totals, *Escherichia coli* i els bacteris del grup *Pseudomonas*. D'aquest tres, l'últim grup és el que ha presentat uns recomptes més elevats al llarg del temps d'exposició. Exceptuant dos punts, als 13 i als 74 dies, *Pseudomonas* ha augmentat la seva presència als biofilms durant tot el període de mostreig (veure Figura 3.18, part inferior). Inicialment, els nivells s'han incrementat de forma ràpida, superant les  $10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup> ( $3,24 \times 10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup>) en només 8 dies. Posteriorment, s'ha produït una disminució força brusca seguida d'una recuperació posterior, augmentant 2 log dels 13 als 60 dies, on s'ha arribat a superar una altra vegada les  $10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup> ( $2,46 \times 10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup>). Després s'ha tornat a produir una disminució al voltant dels 70 dies d'exposició, que ha coincidit amb una reducció semblant en el nombre de bacteris heteròtrofs. Finalment, els nivells han tornat a pujar fins a un valor màxim de  $5,54 \times 10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup> als 82 dies.

A la mateixa figura (part central) s'aprecia com *Escherichia coli* només s'ha pogut aïllar en dos punts, amb nivells sempre inferiors a  $10^0$  Ufc/cm<sup>2</sup>, ( $1,50 \times 10^{-2}$  Ufc/cm<sup>2</sup> als 21 i  $1,66 \times 10^{-1}$  Ufc/cm<sup>2</sup> als 34 dies). Finalment, els coliformes totals han oscil·lat de forma considerable (lleugerament per sobre dels 3 log de diferència) durant la major part del temps d'exposició. Com s'observa a la mateixa Figura 3.18 (part central) els períodes amb una presència pràcticament nul·la han alternat, en diferents ocasions, amb nivells lleugerament inferiors a les  $10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup>. El màxim s'ha produït als 59 dies, amb  $1,63 \times 10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup>.

A la Taula 3.16 es detallen els diferents membres de la microbiota autòctona que s'han aïllat als biofilms desenvolupats després d'exposar els reactors a l'aigua potable. Cal destacar la presència de diferents espècies del grup *Pseudomonas*, com *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* i altres. També s'han aïllat en diferents ocasions cocs Gram-positius del gènere *Staphylococcus* i bacils Gram-positius esporulats, del gènere *Bacillus* sp.

**Taula 3.16.** Microorganismes aïllats i identificats als biofilms formats a partir del sistema experimental situat a la xarxa de distribució del laboratori de Microbiologia de l'EUOOT (UPC).

AÏLLAMENT	DATA	TEMPS D'EXPOSICIÓ	ESPÈCIE
EUOOT 3	25/02/98	8 dies	<i>Comamonas acidovorans</i>
EUOOT 4	25/02/98	8 dies	<i>Xenorhabdus luminiscens</i>
EUOOT 4	25/02/98	8 dies	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
EUOOT 5	25/02/98	40 dies	<i>Providencia pseudomallei</i>
EUOOT 5	25/02/98	40 dies	<i>Staphylococcus</i> sp.
EUOOT 5	25/02/98	40 dies	<i>Staphylococcus</i> sp.
EUOOT 1	10/03/98	13 dies	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
EUOOT 2	10/03/98	13 dies	<i>Comamonas testosteroni</i>
EUOOT 6	31/03/98	74 dies	<i>Comamonas testosteroni</i>
EUOOT 6	31/03/98	74 dies	<i>Trichoderma</i> sp.
EUOOT 5	31/03/98	34 dies	<i>Pseudomonas</i> spp.
EUOOT 5	31/03/98	34 dies	<i>Pseudomonas maltophilia</i>
EUOOT 5	31/03/98	34 dies	<i>Pseudomonas lemoignea</i>
EUOOT 5	31/03/98	34 dies	<i>Kingella denitrificans</i>
EUOOT 6	31/03/98	74 dies	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
EUOOT 6	31/03/98	74 dies	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
EUOOT 3	15/05/98	t=15 min.	<i>Staphylococcus</i> sp.(coag.+)
EUOOT 3	17/07/98	63 dies	<i>Micrococcus</i> sp.
EUOOT 2	29/07/98	82 dies	<i>Staphylococcus</i> sp.
EUOOT 2	29/07/98	82 dies	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
EUOOT 1	18/08/98	20 dies	<i>Micrococcus luteus</i>

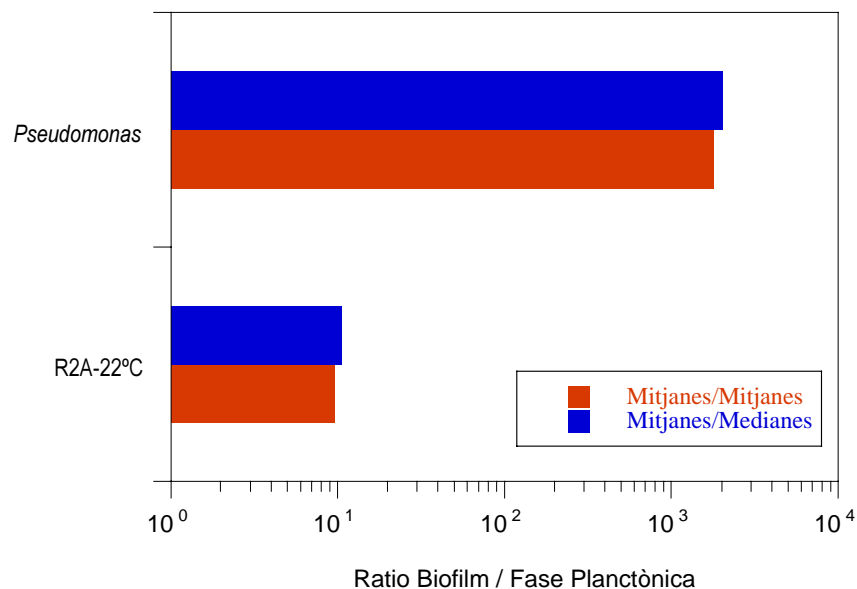
### 3.5.3. Comparació del n<sup>o</sup> de microorganismes en fase biofilm i planctònica

També s'ha comparat la presència dels grups de microorganismes estudiats, tant a la fase planctònica com en fase sèssil, calculant la mitjana i la mediana dels microorganismes presents a la fase planctònica al llarg del període analitzat i expressant els resultats per a cada grup estudiat (nombre mL<sup>-1</sup>). La mitjana de microorganismes adherits s'ha calculat seleccionant les dades obtingudes, en cada cas, a partir dels 40 dies d'exposició. D'aquesta forma, s'han considerat les oscil·lacions produïdes durant aquest últim període d'exposició a l'aigua freàtica.

Cal destacar la importància que els coliformes totals i *Escherichia coli* han assolit als biofilms desenvolupats, especialment si es compara amb la seva nul·la presència a la fase planctònica. El canvi més notable s'ha produït en els coliformes totals, que de no aïllar-se a la fase planctònica, ha passat a valors propers o lleugerament superiors a les 10<sup>1</sup> Ufc/cm<sup>2</sup> en fase sèssil. En *Escherichia coli* en canvi, els nivells han estat nuls a partir dels 40 dies d'exposició a l'aigua potable, tant a la fase planctònica com en fase biofilm. Tanmateix, s'han pogut aïllar al biofilm entre els 20 i els 40 dies d'exposició, encara que amb uns nivells certament reduïts (al voltant de 10<sup>-1</sup> ufc/cm<sup>2</sup>).

A la Figura 3.19 s'observa la ratio biofilm/fase planctònica a partir de l'aigua potable de l'EUOOT. No s'han calculat totes les ratios per a cada grup, perquè alguns dels microorganismes no s'han detectat a la fase planctònica ni durant l'últim període (a partir dels 40 dies) a la fase sèssil. L'augment més important a la fase biofilm respecte de la fase planctònica s'ha produït en el grup *Pseudomonas* (ratio = 2032), seguit amb una ratio força inferior pels bacteris totals determinats en placa amb l'agar R2A (ratio = 10,65).

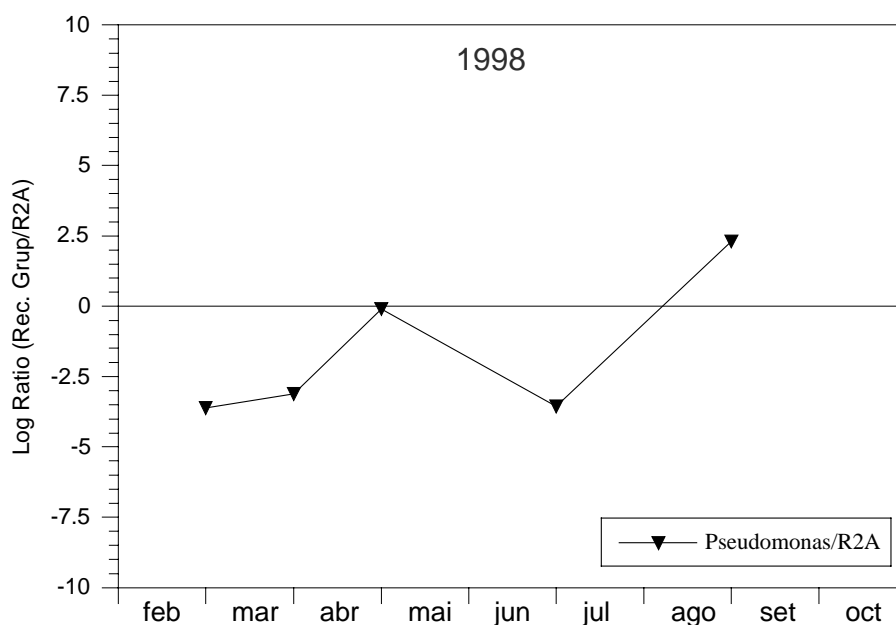
Analitzant la formació de biofilm al sistema del laboratori de Microbiologia (EUOOT-UPC), és evident la importància que poden adquirir alguns dels microorganismes del biofilm respecte de la fase planctònica, tal com ho demostren les dades per a *Pseudomonas*, bacteris heteròtrofs i també pels coliformes totals.



**Figura 3.19.** Proporció entre els microorganismes presents al biofilm i a la fase planctònica, a partir de l'aigua potable de la xarxa de distribució interna del laboratori de Microbiologia de la EUOOT (UPC).

## 3.5.4. Canvis en la composició de la comunitat dels biofilms

**Fase Planctònica.** Com que la major part dels grups estudiats no s'han detectat a l'aigua potable (veure Figura 3.17), només s'ha quantificat la importància relativa del grup *Pseudomonas* respecte dels bacteris heteròtrofs determinats amb R2A. En aquest cas, s'ha observat una oscil·lació important en la ratio obtinguda, variant entorn dels 2 log (veure Figura 3.20). *Pseudomonas* ha estat l'únic grup representatiu enfront dels bacteris heteròtrofs, augmentant el seu nivell relatiu durant tot el període mostrejat, a excepció de la disminució de quasi 2 log obtinguda el juliol de 1998. De fet, al final del període de mostreig (setembre de 1998) la reducció en el nombre de bacteris heteròtrofs ha fet augmentar la relació *Pseudomonas*/R2A fins a valors positius (+2 Log) (Figura 3.20).



**Figura 3.20.** Variació al llarg del temps de la proporció del grup *Pseudomonas* en relació al total de bacteris heteròtrofs quantificats amb l'agar R2A a la fase planctònica, a partir de l'aigua potable de la xarxa de distribució interna del Lab. de Microbiologia de l'EUOOT (UPC, Terrassa).

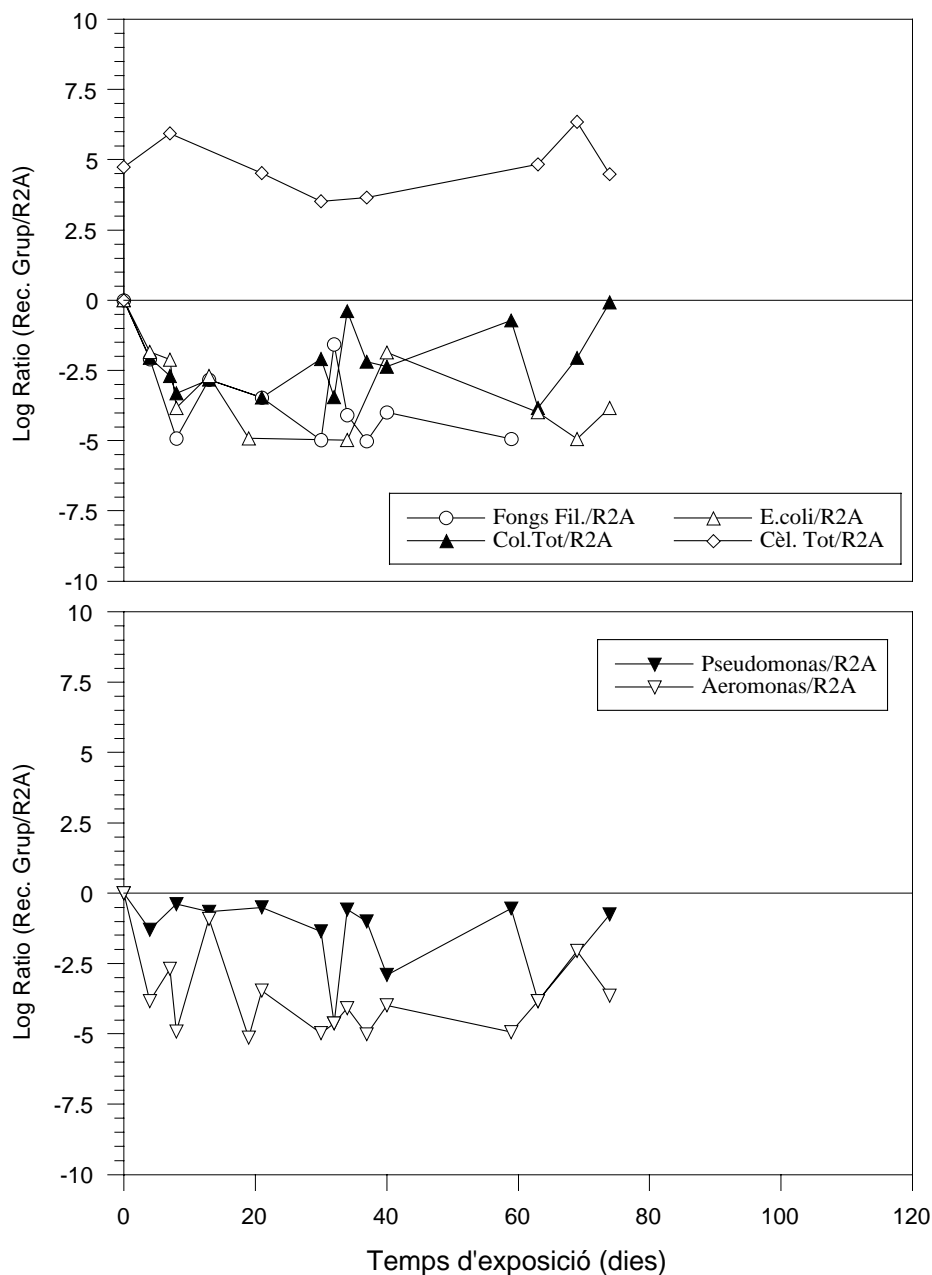
**Fase Sèssil.** Igual que ha passat a les altres estacions de mostreig estudiades (Sant Martí-Besós i Sabadell), els grups microbians estudiats als biofilms han variat la seva importància relativa al llarg del període d'exposició (Figura 3.21). Durant els primers 34 dies el grup *Pseudomonas* s'ha mantingut als biofilms com el més important en relació als bacteris heteròtrofs determinats amb l'agar R2A (veure Figura 3.21). La seva importància relativa ha oscil·lat aproximadament 1 log, de -0,4 a -1,4 log.

Els fongs filamentosos han estat el segon grup en importància relativa respecte dels bacteris heteròtrofs, durant aquest primer període. El seu nivell ha oscil·lat quasi 2 log, entre -0,4 i -2,3 log. Finalment, el tercer grup en importància han estat els coliformes totals, que han oscil·lat 3 log, de -0,4 a -3,4 log. Als 34 dies s'ha observat un augment força considerable en la importància relativa dels tres grups estudiats, respecte dels bacteris heteròtrofs. En aquest sentit, la relació *Coliformes totals*/R2A ha estat la que més ha augmentat, de -3,44 a -0,39, seguida de la relació entre *Fongs filamentosos*/R2A, de -1,57 a -0,44 i, finalment, del grup *Pseudomonas*, que ha augmentat de -1,33 a -0,58. A partir d'aquest moment, la importància relativa dels tres grups ha tornat a disminuir.

En resum, els fongs filamentosos s'han mantingut als biofilms com el grup més important en relació als bacteris heteròtrofs, entre els 35 i els 55 dies d'exposició a l'aigua potable, seguits de forma quasi idèntica pels coliformes totals i *Pseudomonas*. Dels 55 als 75 dies d'exposició, els coliformes totals han passat a ser el grup més important, seguits de *Pseudomonas* i els fongs filamentosos.

Si es comparen les diferències obtingudes durant el primer període d'exposició i fins als 34 dies, cal constatar que la importància relativa dels coliformes totals enfront de R2A ha estat major a la fase planctònica que als biofilms. Això ha canviat a partir dels 35 dies, malgrat que les oscil·lacions dels nivells en cada un dels grups han dificultat la realització de comparacions.

En tot cas, els recomptes en R2A han suposat una fracció molt petita de les cèl·lules totals (Figura 3.21), perquè en realitat els recomptes de viables han representat sempre menys del 0,1% del total de la població adherida al medi de suport dels reactors, arribant en alguns casos a valors inferiors a 0,0001%.



**Figura 3.21.** Variació al llarg del temps de la proporció dels diferents grups microbians, als biofilms formats a partir de l'aigua potable de la xarxa de distribució interna del Lab. de Microbiologia de l'EUOOT (UPC, Terrassa).

### 3.6. Discussió

#### 3.6.1. Microorganismes planctònics

Comparant la qualitat microbiològica de l'aigua en els tres sistemes estudiats s'observa com a les dues zones de mostreig on l'aigua prové d'aportacions del freàtic, els valors han estat força similars. De fet, les úniques diferències importants es trobarien en el nombre de bacteris totals determinats en placa amb R2A i PCA a 22°C (veure Taula 3.17), lleugerament superior a l'estació de Sant Martí (Besós), i el nombre de *Pseudomonas* lleugerament superior a Sabadell en el seu valor mínim. La resta de paràmetres estudiats han presentat valors pràcticament idèntics a les dues zones de mostreig.

Segons la normativa de qualitat exigible per a les aigües superficials quan es destinen a la producció d'aigua potable (Directiva 75/440/CEE 1975, BOE 124/1988), les aigües de Sabadell i Sant Martí correspondrien a les categories A2 o A3 - depenent de l'època de l'any -, especialment degut als elevats recomptes de coliformes totals i *Escherichia coli*.

Malgrat aquesta relativa semblança en la qualitat microbiològica, les dues zones on s'ha mostrejat del freàtic presenten característiques força diferents. L'estació experimental de Sant Martí (Besós) correspondria a una aigua de drenatge d'una zona urbana-periurbana (industrial), on l'aportació fonamental prové de l'aqüífer al·luvial del Besós i, de forma menys important, de fuites del sistema de clavegueram i altres abocaments i infiltracions que acostumen a empitjorar la qualitat de l'aigua. La mina de Ribatallada a Sabadell, en canvi, recull les aportacions del subsòl de la plana vallesana en una zona forestal i les condueix fins a les instal·lacions de CASSA a Can Oriac. Les característiques de la zona permeten la infiltració de les aigües de pluja, fet que afavoreix la constitució d'aquests aquífers. Això, també ha facilitat la seva contaminació a partir d'abocament incontrolats i aigües residuals sense tractar, degut a la presència en aquesta zona de dues urbanitzacions (Can Font i Ca n'Avellaneda). La manca de protecció a l'aqüífer que proveeix la mina de Ribatallada (Sabadell) en plena zona forestal, ha disminuït la seva qualitat microbiològica fins a equiparar-la a la del freàtic de Sant Martí (Besós).

Actualment, a la zona metropolitana de Barcelona s'estan aprofitant aigües freàtiques amb una qualitat semblant a les aquí analitzades per al reg de parcs i jardins urbans, especialment pel que fa al recompte de bacteris heteròtrofs totals. Així, al Parc de Bellvitge, les analítiques microbiològiques realitzades al pou d'abastament mostren valors de bacteris aerobis totals (recomptes a 22°C) entre  $10^2$ - $10^4$  Ufc/mL (dades no publicades). En canvi, en aquest mateix pou els valors per als coliformes totals han oscil·lat entre els 0-25 Ufc/100 mL, clarament inferiors als trobats a Sant Martí i a Sabadell.

De fet, les aigües freàtiques analitzades a Sant Martí i a Sabadell presenten una qualitat microbiològica relativament semblant a la d'algunes aigües superficials, com el riu Llobregat a l'alçada d'Olesa, lloc on es situa l'ETAP de Mina Pública que proveeix Terrassa d'aigua potable. En aquest punt a l'entrada de la planta potabilitzadora, els valors per als bacteris aerobis totals oscil·len entre  $10^2$ - $10^4$  Ufc/mL segons l'època de l'any (Morató 1992).

La qualitat microbiològica de les aigües subterrànies de Sant Martí i de Sabadell ha experimentat fluctuacions remarcables al llarg del temps. A Sant Martí, els màxims recomptes de bacteris heteròtrofs han coincidit sempre en períodes de primavera (març) o tardor (setembre-octubre), mentre que els mínims han estat a l'hivern (desembre-gener) i a l'estiu (juny-juliol). Les fluctuacions en la qualitat microbiològica podrien anar lligades en part al règim pluviomètric, encara que no es pot oblidar que la temperatura afecta de forma important el creixement dels microorganismes aquàtics, existint una relació directa entre la temperatura de l'aigua i la densitat de la població bacteriana (Donlan & Pipes 1988). Així, durant l'any 1998 els recomptes més elevats de bacteris heteròtrofs s'han produït quan han coincidit les precipitacions amb la presència de temperatures elevades (setembre-octubre). En canvi, en altres períodes de precipitació màxima però amb baixes temperatures (gener i desembre), els recomptes han estat mínims.



A Sabadell les oscil·lacions en els recomptes de viables també han estat importants (1 log), al llarg de tot el període estudiat. De totes maneres, en altres aqüífers estudiats s'han observat variacions semblants o fins i tot més grans de la qualitat microbiològica (Ladd et al. 1982). D'altra banda, els recomptes de bacteris totals a Sant Martí (entre  $10^5$  i  $10^7$  Cel./mL) concorden amb valors obtinguts per altres autors a partir d'aqüífers lleugerament o mitjanament contaminades (contaminació orgànica) (Marxsen 1988, King & Parker 1988).

**Taula 3.17.** Qualitat microbiològica de l'aigua a les tres zones de mostreig estudiades. Valors mínim i màxim obtinguts al llarg del període mostrejat.

Zona de Mostreig	Cèl. Totals Cel./mL	R2A-22°C Ufc/mL	PCA-22°C Ufc/mL	Fongs Fil. Ufc/mL	Coliformes Totals Ufc/100 mL	<i>E. coli</i> Ufc/100 mL	<i>Pseudomonas</i> Ufc/100 mL	<i>Aeromonas</i> Ufc/100 mL
Sant Martí	$10^5$ - $10^7$	$10^2$ - $10^4$	$10^1$ - $10^4$	$10^0$ - $10^2$	$10^2$ - $10^4$	0- $10^3$	$10^2$ - $10^5$	0- $10^3$
Sabadell	$10^5$ - $10^6$	$10^2$ - $10^3$	$10^1$ - $10^3$	$10^0$ - $10^2$	$10^2$ - $10^4$	0- $10^3$	$10^3$ - $10^5$	0- $10^3$
EUOOT	$10^2$ - $10^4$	$10^2$ - $10^1$	0	0	0	0	0- $10^0$	0

La qualitat microbiològica de les aigües subterrànies mostrejades ha estat radicalment diferent a la que ha presentat l'aigua potable de l'EUOOT. En aquesta última zona de mostreig no s'han detectat bacteris totals en placa quan s'ha utilitzat l'agar PCA a 22°C, mentre que amb l'agar R2A a 22° C han presentat un nivell màxim lleugerament inferior a  $10^1$  Ufc/mL, de 1 a 3 log inferior a l'obtingut a Sant Martí i a Sabadell (veure Taula 3.17). De fet, aquests valors són freqüents a les xarxes de distribució d'aigua potable (Dollard et al. 1985).

A l'aigua de la xarxa de distribució de l'EUOOT tampoc s'ha detectat la presència de fongs filamentosos, coliformes totals, *Escherichia coli* ni *Aeromonas*, mentre que *Pseudomonas* ha presentat un valor màxim de  $10^0$  Ufc/100 mL, de 2 a 5 log inferiors als observats a Sant Martí i a Sabadell. Es tracta doncs, d'una aigua potable que compleix amb els estàndards de qualitat segons la normativa actual d'aigües potables (RD 1138/1990). Com ja s'ha comentat anteriorment, en sistemes de distribució d'aigües potables la desinfecció provoca que el creixement bacterià a la fase líquida sigui pràcticament negligible, essent els bacteris adherits els únics que es poden arribar a multiplicar (LeChevallier et al. 1987, 1988).

**Comparació de les dades amb la normativa existent.** El marc sanitari de la reutilització d'aigües planteja avui en dia nombrosos interrogants a nivell mundial. No està gens clar encara quina ha de ser la qualitat de les aigües segons alguns dels usos als quals s'han de destinar. Els països desenvolupats amb recursos poden arribar a controlar la qualitat microbiològica de les aigües, especialment gràcies a la generalització del tractament de les aigües residuals. Als països subdesenvolupats en canvi, les mancances econòmiques no permeten portar a terme un control exhaustiu de la qualitat microbiològica, ni estendre el tractament a la majoria de les aigües.

Si ens centrem en la qualitat microbiològica de l'aigua la major part de normativa actual fa referència exclusivament a aigües potables, destacant les referents a aigües superficials per a la producció d'aigua potable (Directiva 75/440 CEE) i la d'aigua de consum públic per xarxa de distribució (Directiva 80/778 CEE, RD 1138/1990). Referent a altres usos que no siguin el consum públic només existeix legislació per a l'aigua de bany (Directiva 76/160/CEE, RD734/1988), que actualment està en revisió.

En canvi, actualment l'aigua destinada per a ús agrícola no ha de complir amb cap requeriment de qualitat microbiològica, ja que no existeix legislació al respecte. En molts països estrangers s'associen els permisos per regar al fet que l'aigua, especialment si es tracta d'aigua residual, hagi sofert un determinat tractament. Segons quin sigui aquest tractament es podrà aplicar l'aigua a un o altre tipus de conreu.

Només quan el reg s'ha de realitzar amb aigua residual és possible trobar legislació, especialment en aquells països amb elevada capacitat tecnològica, escassetat d'aigua i un cert nivell econòmic. Aquestes circumstàncies s'han donat principalment en dos llocs: EUA i Israel. De fet, Califòrnia i altres estats del sud dels EUA com Florida són, junt amb països mediterranis com Israel, els capdavanters en la reutilització d'aigües com una alternativa per a les explotacions agrícoles o els parcs urbans, tant d'ús públic com privat. No es gens estrany que sigui precisament en aquests estats on la normativa sobre reutilització d'aigües estigui més avançada. L'acceptació del reg d'hortalisses de consum cru, tant per les autoritats sanitàries com pels propis consumidors, només es pot basar en base a uns límits de qualitat obtinguts i confirmats en projectes de recerca i de demostració supervisats i coordinats per les autoritats de salut pública i de protecció de la qualitat de l'aigua (D'Angelo 1993).

L'experiència d'aquestes zones ha quedat recollida en diferents documents a l'abast del públic i dels organismes gestors. Cal destacar com a més importants les directrius per afavorir una reutilització planificada en usos urbans no potables, usos industrials i usos agrícoles (USEPA 1992), o el manual pràctic que recull els aspectes tècnics, econòmics i de gestió més importants i relatius a la reutilització d'aigua (Water Pollution Control Federation 1989).

De fet, els països que es plantegen la reutilització d'aigua residual utilitzen com a font de referència aquestes normes de qualitat de Califòrnia o Florida, incorporades essencialment a les directrius de la USEPA (USEPA 1992), o a les directrius de qualitat del reg agrícola proposades per la OMS (OMS 1989). La diferència en el nivell de qualitat de l'aigua entre aquestes dues normatives és relativament important. Bàsicament, les directrius de la USEPA (veure Taula 3.18) estableixen que no es detecti la presència de coliformes fecals en 100 mL d'aigua, mentre que les de la OMS estableixen que l'aigua utilitzada pel reg agrícola no ha de superar els 1000 coliformes fecals per 100 mL d'aigua. Les dues directrius corresponen a la reutilització d'aigües residuals pel reg agrícola i de jardins sense cap restricció d'ús, com poden ser el reg de productes hortícoles de consum cru o el reg per aspersió de jardins públics, sense restriccions d'accés i d'ús per part del públic.

Actualment, al nostre país no existeix una normativa sobre la reutilització d'aigües residuals per a usos urbans no potables. A part de les iniciatives d'algunes comunitats autònomes que han establert recomanacions (Dir. Gen. Salut Pública 1994), una Comissió Interministerial està treballant en l'elaboració d'un text de referència (Mujeriego 1990). Al marge del resultat final d'aquest procés administratiu i reglamentari, és evident que l'aprofitament d'aigües freàtiques amb una baixa qualitat microbiològica s'ha de realitzar tenint en compte l'establiment d'uns límits de qualitat, que haurien d'incloure algun paràmetre microbiològic.

Tenint en compte que diferents factors poden afectar la qualitat de les aigües subterrànies i, especialment, la qualitat microbiològica, en tot moment s'ha d'establir un balanç adequat entre el que es pot considerar seguretat en l'ús o reutilització de l'aigua i el risc que es pot produir per a la salut pública. Això és especialment rellevant en aquells casos on l'aigua subterrània s'ha d'utilitzar en el reg de parcs urbans, sense restricció de contacte o accés del públic.

En el nostre cas, les aigües subterrànies de Sant Martí i de Sabadell no s'ajusten a cap dels estàndards de qualitat microbiològica per al reg en parcs urbans (veure Taula 3.18). Segons els criteris microbiològics (coliformes totals), les aigües freàtiques estudiades superen sempre els valors recomanats a les normatives dels estats de Colorado, Califòrnia i Israel. A més, al tractar-se d'aigües que no han rebut cap tractament tampoc complirien amb els estàndards de França.

Assumint que en el nostre cas s'ha analitzat la presència de *Escherichia coli*, un paràmetre microbiològic més estricte que els coliformes fecals, les aigües estudiades superarien en moments puntuals les normatives de la OMS, de l'estat de Minnesota i, especialment, de la USEPA i de Florida. A l'aigua freàtica del pou d'Alfons el Magnànim (Sant Martí) el percentatge de positivitat per *Escherichia coli* ha estat del 75% l'any 1998 (n=16), baixant al 25% l'any 1999 (n=20). A Sabadell, els percentatges han estat molt semblants, 60% l'any 1998 (n=10) i 25% l'any 1999 (n=12).

**Taula 3.18.** Criteris de qualitat de l'aigua aplicables a l'ús d'aigües residuals regenerades per al reg d'aigua (adaptat de diverses fonts). Dades dels coliformes totals i coliformes fecals en Ufc/100 mL.

	Criteris		Tractament	Tipus de Reg
	Col. Tot	Col. Fec		
<b>OMS</b>	<1000		-	Reg agrícola i urbà sense restriccions
<b>USEPA</b>	0		-	Reg agrícola i urbà sense restriccions
<b>Colorado (EUA)</b>	2,2	-	-	Amb control d'accés a la zona
	23	-	-	Exposició del públic limitada (reg de nit)
<b>Florida (EUA)</b>	0		-	Evitar l'accés del públic. No poden haver-hi connexions amb canonades d'aigua potable. Senyalització de la zona irrigada Reduir la formació d'aerosols
<b>Minnesota (EUA)</b>	200		-	Aplicació 50 mm/setmana Control de les aigües subterrànies
<b>Califòrnia (EUA)</b>	2,2	Tractament secundari i desinfecció		Conreus de consum en cru (reg en superfície)
	23			Camps de golf, cementiris, parcs (sense contacte del públic amb l'aigua)
	2,2	Tractament secundari, coagulació, filtració i desinfecció		Conreus de consum en cru (reg per aspersió)
	23			Parcs, patis d'escola, zones d'esbarjo on hi ha contacte del públic amb l'aigua
<b>Israel</b>	250		-	Vegetals pelats i cuinats Camps de futbol i de golf
	12		-	Tot tipus de conreu Vegetals de consum en cru Parcs
<b>França</b>	$\leq 10^3$		Llacunatge, amb temps de retenció de 20-30 d.	Fruiters, pastura, hortalisses i llegums Aspersió a baixa pressió i solcs
	$\leq 200$		Terciari més desinfecció. Llacunatge, amb temps de retenció de 20-30 d.	Zones verdes d'accés al públic Aspersió a baixa pressió

**Risc d'obtenció del sistema de distribució.** El desenvolupament de biofilms als sistemes de distribució pot provocar, a part de problemes sanitaris, el deteriorament o la corrosió de gran part de les canonades utilitzades, restringint el flux i arribant en alguns casos a obturar les canonades (Costerton 1995). De fet, els biofilms es poden acumular en els capçals dels aspersors, als goters i altres orificis de sortida i als propis tubs de subministrament, arribant en alguns casos a restringir totalment la sortida de l'aigua (Mujeriego 1990).

Aquest problema es pot manifestar de forma greu en sistemes de reg per aspersió i, especialment, en sistemes de reg localitzat. Entre els factors que més poden influir augmentant l'obtenció de les canonades cal destacar la presència de quantitats elevades de microorganismes. A part, també cal destacar la presència de quantitats elevades de ferro, manganès i sulfur d'hidrogen (veure Taula 3.19). Òbviament, l'aparició de problemes d'obtenció per la formació de biofilms també dependrà en gran part d'altres factors importants esmentats en altres apartats, com el cabal utilitzat, el tipus de goters, la temperatura, etc.

L'aigua freàtica de Sant Martí (Besós) presentaria pocs problemes d'obturació, segons el nombre de bacteris heteròtrofs (en placa). No obstant, caldria realitzar un seguiment dels nivells de ferro i manganès (veure Taula 3.19) per determinar si poden afectar negativament al reg localitzat.

Malgrat que la densitat cel·lular ha estat a Sabadell lleugerament inferior que a Sant Martí, sovint s'han produït problemes d'obturació per la formació de precipitats de carbonats. De fet, l'aigua d'aquesta estació de mostreig ha presentat un grau de mineralització força elevat, amb una duresa total que ha superat en moments puntuals els 700 mg CaCO<sub>3</sub>/L.

**Taula 3.19.** Factors que influeixen en l'aparició de problemes d'obturació provocats per l'aigua utilitzada en sistemes de reg localitzat (Mujeriego 1990).

Tipus de Problema	Restriccions a l'ús de l'aigua		
	Escasses	Dèbils a moderades	Severes
pH	<7,0	7,0 - 8,0	>8,0
Manganès (mg/L)	<500	500 - 2.000	>2.000
Ferro (mg/L)	<0,1	0,1 - 1,5	>1,5
Sulfur d'hidrogen (mg/L)	<0,5	0,5 - 2,0	>2,0
Recompte bacteris heteròtrofs en placa (nº max./mL)	<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> - 5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>

**Evolució de la qualitat microbiològica de l'aigua al llarg del temps.** El seguiment dels diferents grups microbians ens ha permès estudiar l'evolució de la qualitat microbiològica al llarg del temps. Les dades de la Figura 3.9, Figura 3.15 i Figura 3.20, on es pot comparar la proporció dels diferents grups microbians en relació al total de bacteris heteròtrofs quantificats amb R2A a 22°C, es mostren de forma resumida a la Taula 3.20.

Si observem l'abundància relativa de cada grup a les aigües freàtiques de Sant Martí (veure Taula 3.20), el més important és el grup *Pseudomonas*, amb una mitjana de -1,7 log, representant una mica menys del 5% respecte del total de bacteris heteròtrofs, encara que en moments puntuals ha representat el total dels bacteris heteròtrofs determinats (ratio = 0). Seguirien en importància els coliformes totals i els fongs filamentosos (ratio = -1 log), que representarien un 1% respecte dels bacteris aerobis totals. Amb percentatges menors, *Aeromonas* amb una mitjana de -2,4 log, *E. coli* amb -3,4 log i, finalment, els clostridis sulfitoreductors, amb -4,3 log.

A Sabadell l'ordre d'importància relativa dels grups ha estat el mateix. Una altra vegada, el grup més abundant ha estat *Pseudomonas* amb -0,9 log, un valor superior al 10% del total de bacteris heteròtrofs. Han seguit els fongs filamentosos (ratio = -1,7) i els coliformes totals (ratio = -1,8), amb valors lleugerament superiors al 1% del total de bacteris heteròtrofs. Amb valors inferiors, *Aeromonas* (ratio = -2,4), *E. coli* (ratio = -2,9) i els clostridis (ratio = -3,6).

Analitzant la diferència entre el màxim i el mínim per a cada grup microbià (veure Taula 3.20) es constata la remarcable variació que la qualitat microbiològica de l'aigua ha patit al llarg del temps. Aquestes fluctuacions han estat més apreciables a Sant Martí, de 1,5 a 4 log de diferència entre el màxim i el mínim segons el grup, mentre que a Sabadell les diferències han oscil·lat entre 1-2 log. Per tant, no es pot oblidar que sistemes d'aigües subterrànies com els estudiats poden patir alteracions importants en la seva qualitat microbiològica.

En aquest sentit, i dins de l'entorn del risc sanitari es constata important mantenir una vigilància al llarg del temps de la qualitat microbiològica de les aigües freàtiques. Del contrari, baixes concentracions en moments puntuals podrien donar una falsa sensació de seguretat. Per tant, nivells relativament baixos en moments puntuals no es poden agafar com a indicadors de seguretat, ja que els sistemes són relativament de fàcil alteració.

A l'aigua potable del Lab. de Microbiologia de l'EUOOT només s'ha pogut detectar al grup *Pseudomonas*, que ha representat de mitjana un valor lleugerament inferior al 5% del total de bacteris heteròtrofs (ratio = -1,6). De totes maneres i, durant moments puntuals, el grup *Pseudomonas* ha arribat a representar la gran majoria dels bacteris aïllats a nivell de la xarxa de distribució d'aigua potable.

**Taula 3.20.** Variació al llarg del temps de la proporció dels diferents grups microbians a l'aigua en relació al total de bacteris heteròtrofs quantificats amb agar R2A a 22°C. Dades en log Ratio (Recompte grup específic/R2A).

	<i>Pseudomonas</i>			Fongs Filam.			Coliformes Totals			<i>Aeromonas</i>			<i>E. coli</i>			Clostridis		
	Min	Max.	Mitj.	Min	Max.	Mitj.	Min	Max.	Mitj.	Min	Max.	Mitj.	Min	Max.	Mitj.	Min	Max.	Mitj.
Sant Martí	0	-3,5	<b>-1,7</b>	-1	-3	<b>-2,1</b>	-1	-3	<b>-2,1</b>	-2	-3,5	<b>-2,4</b>	-2,5	-4,5	<b>-3,4</b>	-2	-6	<b>-4,3</b>
Sabadell	0	-1,75	<b>-0,9</b>	-1	-2,5	<b>-1,7</b>	-1	-3	<b>-1,8</b>	-2	-3	<b>-2,4</b>	-2	-4	<b>-2,9</b>	-3	-4	<b>-3,6</b>
EUOOT	2	-4,0	<b>-1,6</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 3.6.2. Cinètiques de Colonització

Els mostrejadors formats per reactors de llit empaquet han permès seguir el desenvolupament dels biofilms, en tots els sistemes estudiats. A la Taula 3.21 es mostren els principals resultats obtinguts per a la colonització del material de suport dels reactors i, al mateix temps, els nivells d'alguns dels factors que poden afectar la colonització microbiana. Els paràmetres analitzats s'han comparat seleccionant les dades obtingudes a partir del període de estabilització de les cinètiques de colonització microbiana.

**Recomptes de cèl·lules totals.** Segons els recomptes de cèl·lules totals a la fase estacionària (veure Taula 3.21), la zona de mostreig situada a Sant Martí (Besós) ha presentat la densitat cel·lular més elevada amb  $10^8$ - $10^9$  Cèl./cm<sup>2</sup>, lleugerament superior als biofilms desenvolupats a partir de l'aigua del pou. El mostreig a partir de la mina Ribatallada a Sabadell ha obtingut valors 1-2 log inferiors, amb  $10^6$ - $10^7$  Cèl./cm<sup>2</sup>. Òbviament, els nivells més baixos s'han trobat a partir de l'aigua potable de l'EUOOT, amb  $10^5$ - $10^6$  Cèl./cm<sup>2</sup>.

El nombre de cèl·lules totals es troba dins del rang habitual segons la bibliografia existent per ecosistemes aquàtics, on els recomptes més elevats ( $10^9$ - $10^{10}$  Cèl./cm<sup>2</sup>) correspondrien als biofilms presents als sediments de comunitats bentòniques als rius mediterranis (Romaní 1994). Tanmateix, s'han de recordar les condicions de treball dels reactors de llit empaquet, amb un flux considerable i un material de suport poc favorable a la colonització.

A Sabadell s'han obtingut nivells 1 log inferiors als obtinguts a Sant Martí. Segurament, les característiques d'aquest aquífer que s'origina en una zona forestal amb uns aportos importants d'aigua de pluja, explicarien la seva millor qualitat microbiològica.

Finalment, al laboratori de Microbiologia de la EUOOT s'ha obtingut una densitat cel·lular propera o superant lleugerament les  $10^5$  Cèl./cm<sup>2</sup>, dins dels valors obtinguts per altres autors en xarxes de distribució d'aigua potable (Block et al. 1993, Camper et al. 1999).

**Taula 3.21.** Desenvolupament de biofilm als reactors de llit empaquet situats a les diferents zones de mostreig estudiades. Els valors corresponen a la fase de màxim desenvolupament (etapa estacionària d'estabilització).

	Clor Lliure	DOC	BDOC	Aigua Bacteris Aerobis	Biofilm Bacteris Aerobis	Biofilm Cèl·lules Totals	% Viables Cultivables
	(mg/L)	(mgC/L)	(mgC/L)	(Ufc/mL)	(Ufc/cm <sup>2</sup> )	(Cèl./cm <sup>2</sup> )	
Sant Martí Pou	0	1,37	0,05	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>	0,01 a 0,1
Sant Martí Dipòsit	0	1,38	0,12	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	↓ 10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>	0,1 a 1
Sabadell	0	1,29	0,11	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	0,1 a 1
EUOOT	1,3	2,26	0,23	10 <sup>2</sup> -10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup> -10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	0,01 a 0,1

**Recomptes de bacteris viables en placa.** El nombre més elevat de bacteris heteròtrofs en agar R2A (veure Taula 3.21), l'han presentat els biofilms desenvolupats a partir de l'aigua freàtica de Sant Martí (Besós), amb 1 log de diferència entre l'aigua del pou i del dipòsit i valors més elevats al dipòsit (10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> Ufc/cm<sup>2</sup>).

D'altra banda, sembla com si el curt recorregut de l'aigua des del pou d'Alfons el Magnànim fins al dipòsit, situat 500 m enllà al mateix carrer, sigui suficient per augmentar el potencial de formació de biofilms. En general, els dipòsits de reserva tendeixen a augmentar el creixement microbià, perquè faciliten la formació de sediments (LeChevallier et al. 1996b). Alhora, permeten l'augment en la concentració d'oxigen dissolt incrementant el contacte de l'aigua amb l'aire, tal com es pot veure a la Taula 3.22. El nombre de microorganismes planctònics també va ser inferior a l'aigua del pou (veure Figura 3.5 part superior, fins el juliol de 1998). Els recomptes de microorganismes planctònics presents al dipòsit (veure Figura 3.5 part superior, del juliol de 1998 fins a l'agost de 1999) van mostrar un clar augment en la seva variabilitat. Aquest període va coincidir amb l'inici de la construcció del complex Diagonal-Mar, que va remoure una quantitat considerable de terra i sorra en una zona molt propera al pou d'Alfons el Magnànim. Aquesta activitat pot haver alterat la qualitat microbiològica de l'aqüífer, especialment si es considera que en aquesta zona el nivell freàtic es troba generalment de 3 a 6 metres per sota de la superfície.

Malgrat que l'aigua de Sabadell presenta unes característiques relativament semblants a les del pou d'Alfons el Magnànim, els biofilms desenvolupats a partir de la mina Ribatallada han presentat un nombre de bacteris força inferior a l'obtingut a Sant Martí, amb 10<sup>4</sup> Ufc/cm<sup>2</sup> (veure Taula 3.21). D'altra banda l'aigua es pot qualificar de molt dura, amb valors mitjans de clorurs, sodi i salinitat elevats (Taula 3.22). Segurament, l'elevada mineralització de l'aigua ha facilitat en moments puntuals el desenvolupament d'importants quantitats de precipitats (carbonats), els quals han dificultat la separació de part dels microorganismes del material de suport. Així, algunes de les analítiques realitzades ha mostrat uns valors força elevats de duresa total (736 mg/L) i calci (225 mg/L). Per tant, la metodologia utilitzada pot haver infraestimat el nombre real de bacteris heteròtrofs viables.

Finalment, a partir de l'aigua potable del laboratori de Microbiologia de la EUOOT s'han obtingut valors entre 10<sup>1</sup>-10<sup>2</sup> Ufc/cm<sup>2</sup>. Tenint en compte els nivells de clor (1,3 mg/L de clor lliure, veure Taula 3.21), els valors es trobarien dins dels habituals en xarxes de distribució d'aigua potable, que oscil·len entre 1-10<sup>4</sup> Ufc/cm<sup>2</sup> (Nagy & Olson 1985).

Malgrat que encara no existeix un mètode estàndard per determinar la fracció de cèl·lules metabòlicament activa a partir de mostres naturals (Bartscht et al. 1999), les aigües freàtiques analitzades han mostrat percentatges de cèl·lules viables cultivables igual o inferiors a l'1%. Així, el percentatge ha estat entre el 0,1-1% tant al dipòsit de Sant Martí com a Sabadell, mentre que al pou de Sant Martí i l'aigua potable ha estat entre 0,01-0,1% (veure Taula 3.21).

Cal recordar que la presència de clor al sistema de distribució pot inactivar o danyar la majoria de les cèl·lules, reduint la seva capacitat de creixement en els medis de cultiu estàndard. D'altra banda, el percentatge de cèl·lules bacterianes presents als ecosistemes aquàtics que es poden cultivar pels mètodes estàndards de laboratori, acostuma a ser inferior al 1% (Ullrich et al. 1996).

No obstant, la majoria dels bacteris - més del 50%, i a vegades el 90% - són metabòlicament actius quan s'avaluen les mostres d'ambients naturals amb la tècnica adequada (Fry 1990, Karner & Fuhrman 1997). Per complicar-ho més, no totes les cèl·lules detectades amb epifluorescència presenten nucleoids, en el que s'anomenen cèl·lules "fantasma" (Zweifel & Hagström 1995). S'ha suggerit que la majoria dels bacteris no són cultivables en placa degut a que en realitat estan adaptats a baixes concentracions de nutrients, i només poden arribar a baixes taxes de creixement màxim (Schut et al. 1993). Tanmateix, investigacions recents semblen indicar que, almenys en certs ambients, es pot arribar a cultivar més del 70% de les cèl·lules (Schut et al. 1993, Kalmbach et al. 1997).

D'altra banda, el nivell de nutrients disponibles per al creixement microbià a l'aigua del pou d'Alfons el Magnànim és força baix (veure Taula 3.21). Com es veu a la mateixa taula el nivell de DOC és pràcticament idèntic a l'aigua del pou i al dipòsit. En canvi, el nivell de BDOC és significativament inferior a l'aigua del pou. Per tant, el curt recorregut de l'aigua des del pou fins al dipòsit és suficient com per augmentar el BDOC fins a valors propers al llindar d'estabilitat biològica. En aquest sentit, valors inferiors als 0,15 mg/L de BDOC serviren per controlar el creixement biològic dels bacteris heteròtrofs en aigües sense clor residual (Servais et al. 1993). Així, s'han relacionat episodis de coliformes amb augments per sobre dels 0,15 mg/L de BDOC (Volk & Joret 1994). Per la seva part, l'aigua de la mina de Ribatallada presenta valors pràcticament idèntics de BDOC als observats al dipòsit d'Alfons el Magnànim malgrat que el nivell de DOC és lleugerament inferior, mentre que l'aigua potable (EUOOT) presenta els valors més elevats, amb 0,23 mgC/L de BDOC.

Finalment, i respecte a la metodologia utilitzada s'ha de tenir present que pel cultiu dels bacteris heteròtrofs s'ha utilitzat sempre l'agar R2A. Aquest medi complex s'utilitza amb èxit des de fa temps pel cultiu de bacteris d'ambients aquàtics, especialment d'ecosistemes aquàtics, aigües residuals i aigües potables. Investigacions recents però, apunten un cert efecte inhibidor en el creixement bacterià degut a l'elevat contingut en fosfat d'aquest medi (Bartscht et al. 1999).

**Taula 3.22.** Anàlisi físico-química de l'aigua subterrània a Sant Martí i a Sabadell. Les dades són les mitjanes aritmètiques (n.d., no determinat).

Paràmetre	Unitats	Sant Martí-Pou		Sant Martí-Dipòsit		Sabadell	
		Mitj.	n	Mitj.	n	Mitj.	n
pH		7,52	8	7,35	12	7,41	8
O <sub>2</sub>	mg/L	7,75	8	11,3	7	n.d.	n.d.
Conductivitat	µS/cm	1762	8	1925	12	1398	8
Residu Sec	mg/L a 110°C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1299	8
Sodi	mg Na/L	186	8	170	12	165	8
Clorurs	mg Cl/L	177	8	265	12	196	8
Sulfats	mg SO <sub>4</sub> /L	n.d.	n.d.	387	12	210	8
Calci	mg Ca/L	102	8	187	12	130	8
Magnesi	mg Mg/L	48,4	8	53,7	12	33	8
Duresa Total	mg CaCO <sub>3</sub> /L	431	8	n.d.	n.d.	514	8
Bicarbonats	mg CaCO <sub>3</sub> /L	376	8	n.d.	n.d.	516	8
Alcalinitat	mg CaCO <sub>3</sub> /L	n.d.	n.d.	413,6	12	373	8
Nitrats	mg NO <sub>3</sub> /L	21,9	8	n.d.	n.d.	44,3	8

A la Taula 3.23 es comparen els nivells que els principals grups microbians han assolit a la fase estacionària de desenvolupament dels biofilms. Comparant les dues aigües freàtiques, els valors han estat significativament més alts a Sant Martí que a Sabadell. Cal destacar els coliformes totals, de 2 a 3 log més a Sant Martí amb valors entre  $10^2$  i  $10^3$  Ufc/cm<sup>2</sup>. En aquesta estació de mostreig els coliformes totals s'han mantingut a la fase estacionària al llarg del temps de contacte estudiat, fins als 120 dies al pou i fins als 190 dies al dipòsit. Per tant, sembla evident que el material de suport dels reactors ha estat colonitzat pels coliformes totals, els quals s'han mostrat capaços de competir amb èxit amb els bacteris heteròtrofs. En aquesta situació es bastant raonable pensar que aquests microorganismes podrien experimentar episodis periòdics d'alliberament a l'aigua, augmentant temporalment en aquesta fase els coliformes planctònics que es poden aïllar a partir de l'aigua.

Aquests episodis de recreixements dels coliformes acostumen a produir-se quan la temperatura de l'aigua puja per sobre dels 15°C (LeChevallier et al. 1996b), fet bastant probable atesa la temperatura mitjana al llarg del període d'experimentació (dades que no es mostren). Segons les dades pròpies d'aïllaments fets a l'aigua i als biofilms desenvolupats a partir del pou i del dipòsit a Sant Martí (veure Taula 3.9 i Taula 3.10), entre els coliformes ha predominat *Enterobacter cloacae*. Altres autors ja han senyalat que en els episodis de recreixement dels coliformes en xarxes de distribució acostuma a dominar una sola espècie, com *Klebsiella oxytoca* (Geldreich 1996, Ribas com. pers. 2001).

En canvi, *Escherichia coli* acostuma a ser un organisme transitori que desapareix ràpidament de les xarxes de distribució (Geldreich 1996). Això es produeix habitualment en ambients on els nutrients són limitants, perquè els antagonistes de coliformes entren en competència directa amb els coliformes, dificultant el seu establiment als biofilms (LeChevallier & McFeters 1985b). Malgrat tot, *Escherichia coli* ha mantingut valors propers a  $10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup> fins als 120 dies de contacte, tant al pou com al dipòsit d'Alfons el Magnànim (Sant Martí). En canvi, no s'ha pogut detectar la seva presència a partir dels 120 dies d'exposició al dipòsit de l'aigua freàtica (veure Figura 3.7, part central).

A Sabadell els coliformes totals s'han mantingut entre  $10^0$  i  $10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup> a la fase estacionària dels biofilms desenvolupats, mentre que *Escherichia coli* pràcticament no s'ha detectat (veure Figura 3.13, part central). Cal insistir que en aquesta zona de mostreig la important quantitat de precipitats (carbonats) ha dificultat la separació de part dels microorganismes del material de suport.

Finalment, a partir de l'aigua potable de l'EUOOT el nivell dels coliformes totals als biofilms ha oscil·lat a la fase estacionària entre 0 i  $10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup> (veure Figura 3.18 i Taula 3.23), mentre que no s'ha detectat *Escherichia coli* a partir dels 40 dies de contacte. Tanmateix, s'ha de recordar que alguns d'aquests bacteris gram-negatius poden entrar en un estat viable però no cultivable (VBNC) (Byrd et al. 1991, Barcina et al. 1997), on retenen la capacitat de produir malalties i poden actuar com a agents etiològics amb significació per a la salut pública (Grimes & Colwell 1986).

**Taula 3.23.** Presència dels grups microbians estudiats als biofilms desenvolupats, a la fase estacionària (a partir dels 60 dies a Sant Martí, i a partir dels 40 dies a Sabadell i a l'aigua potable de l'EUOOT). Valors mínim i màxim en Ufc/cm<sup>2</sup>.

	<i>Coliformes Totals</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Fongs Filam.</i>
Sant Martí-Pou	$10^2$ - $10^3$	$10^0$ - $10^2$	$10^3$	$10^1$ -0	$10^2$ - $10^4$
Sant Martí-Dipòsit	$10^2$ - $10^3$	$10^2$ -0	$10^2$ - $10^3$	$10^0$ -0	$10^2$ - $10^4$
Sabadell	$10^1$ - $10^0$	0- $10^{-1}$	$10^1$ - $10^3$	$10^0$ - $10^2$	$10^0$ - $10^2$
EUOOT	0- $10^1$	0	$10^0$ - $10^2$	0	0- $10^0$



*Pseudomonas* ha mantingut valors propers a  $10^3$  Ufc/cm<sup>2</sup> als biofilms desenvolupats a partir de l'aigua subterrània de Sant Martí, i entre  $10^2$ - $10^3$  Ufc/cm<sup>2</sup> a Sabadell. D'altra banda, aquest grup ha mantingut a l'aigua potable de l'EUOOT uns nivells força elevats en fase estacionària, entre  $10^0$ - $10^2$  Ufc/cm<sup>2</sup>, arribant a superar la densitat dels bacteris heteròtrofs (veure Figura 3.18).

Mentre que *Aeromonas* no s'ha detectat als biofilms desenvolupats a partir de l'aigua potable, ha mantingut valors propers a  $10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup> a la fase estacionària dels biofilms formats a partir de l'aigua subterrània de Sant Martí i a Sabadell. Tanmateix, a Sant Martí sembla que *Aeromonas* ha deixat de formar part dels biofilms després de 80 dies de contacte amb l'aigua del pou, i després de 125 dies de contacte amb l'aigua del dipòsit. En canvi, a Sabadell ha mantingut una densitat entre  $10^1$ - $10^2$  Ufc/cm<sup>2</sup> fins al final del període de contacte. Finalment, no s'ha detectat *Aeromonas* als biofilms

També s'ha portat a terme un seguiment dels fongs filamentosos als biofilms desenvolupats. Malgrat que com a patògens oportunistes són habitualment poc significatius per a la salut pública, en certes condicions poden arribar a colonitzar el cos humà. Els recomptes de fongs filamentosos més elevats s'han observat a Sant Martí, amb valors propers a  $10^4$  Ufc/cm<sup>2</sup> al final del període de contacte en fase estacionària. Tanmateix, s'ha de remarcar que en plena fase estacionària aquest grup de microorganismes ha experimentat oscil·lacions importants, d'aproximadament 2 log. En canvi, a Sabadell els nivells han disminuït clarament (més de 1 log) durant el període estacionari, assolint al final del temps de contacte valors propers a  $10^1$  Ufc/cm<sup>2</sup>. Finalment, als biofilms desenvolupats a partir de l'aigua potable no s'han detectat fongs filamentosos a la fase estacionària.

**Taula 3.24.** Presència dels grups microbians estudiats als biofilms desenvolupats a les tres zones de mostreig. Valors mitjans (mitjana aritmètica) i màxims al llarg del total del temps d'exposició en Ufc/cm<sup>2</sup>.

		<i>Coliformes Totals</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Fongs Filam.</i>
Sant Martí Pou (11/97-7/98)	Max.	1,18E+03	3,38E+01	2,56E+03	1,66E+01	6,76E+03
	Mitjana	1,44E+02	5,65E+00	5,66E+02	3,54E+00	6,03E+02
Sant Martí Dipòsit (8/98-8/99)	Max.	4,34E+02	6,65E+01	1,54E+03	1,93E+01	1,47E+04
	Mitjana	7,95E+01	2,56E+00	4,13E+02	6,59E-01	1,21E+03
Sabadell	Max.	1,69E+03	3,32E+02	1,67E+04	2,95E+02	4,65E+02
	Mitjana	7,47E+01	9,81E+00	8,18E+02	2,90E+01	6,68E+01
EUOOT	Max.	1,63E+01	1,66E-01	5,86E+01	8,00E-02	2,22E+00
	Mitjana	1,40E+00	9,80E-02	8,41E+00	4,44E-03	1,26E-01

**Comparació del nombre de microorganismes en fase biofilm i planctònica.** S'ha comparat la presència dels diferents grups de microorganismes als biofilms i a la fase planctònica (veure Figura 3.8, Figura 3.14 i Figura 3.19). Comparant la presència dels bacteris heteròtrofs (recompte en R2A a 22°C) a partir de les aigües freàtiques, la proporció ha presentat valors superiors a 100 en tots els casos estudiats, amb els valors més elevats al dipòsit de Sant Martí (ratio=2005), seguit del pou de la mateixa zona (ratio=405), i finalment a Sabadell (ratio=122,53). Les determinacions realitzades amb PCA han donat valors semblants, encara que lleugerament inferiors als obtinguts amb R2A a 22°C. D'altra banda, als biofilms desenvolupats a partir de l'aigua potable els bacteris heteròtrofs han augmentat només 10 vegades respecte dels presents a la fase planctònica.

Els coliformes totals i *Escherichia coli* presents als biofilms han augmentat la seva ratio relativa a Sant Martí per sobre de les 10 vegades respecte dels presents a la fase planctònica. En aquest cas, l'augment ha estat significativament més elevat al pou, amb una ratio de 300 per *Escherichia coli* i de 197,5 pels coliformes totals, mentre que al dipòsit les ratios han estat de 37 pels coliformes totals i de 11 per *Escherichia coli*. Per tant, els coliformes totals i *Escherichia coli* s'han acumulat a Sant Martí de forma preferent als biofilms desenvolupats, malgrat que aquest augment ha estat menor a mesura que ens allunyem de l'origen de l'aigua freàtica. Aquestes dades semblen especialment rellevants per *Escherichia coli*, que d'una ratio de 300 passa a 11 al cap de 500 metres de recorregut per la xarxa de distribució. De fet i tal com ja s'ha comentat anteriorment, s'ha de tenir en compte que l'augment significatiu en el nombre de bacteris heteròtrofs al dipòsit i, de retruc, en els antagonistes de coliformes pot haver dificultat el recompte dels coliformes. A Sabadell l'augment dels coliformes totals i *Escherichia coli* als biofilms ha estat poc important (ratios de 1,16 i 0,06 respectivament).

*Pseudomonas* també s'ha acumulat preferentment als biofilms, amb ratios que han oscil·lat a Sant Martí entre  $10^2$  i  $10^3$  i força menor a Sabadell (ratio = 4,48). Cal destacar la importància del grup *Pseudomonas* als biofilms desenvolupats a partir de l'aigua potable (ratio = 2032), amb una ratio 2 log superior a la dels bacteris heteròtrofs determinats amb R2A a 22°C.

Finalment, els fongs filamentosos s'han acumulat de forma significativament important als biofilms desenvolupats a Sant Martí i a Sabadell. En el primer cas, ha estat el grup amb la ratio més elevada al pou d'Alfons el Magnànim (ratio 1040), superant fins i tot als bacteris heteròtrofs. Al dipòsit, s'han observat valors lleugerament inferiors als bacteris heteròtrofs determinats amb R2A i amb PCA (ratio = 361). A Sabadell l'augment ha estat significativament inferior (ratio = 5,73), lleugerament per sobre del que s'ha produït en *Pseudomonas*.

En resum, les dades indiquen que a Sant Martí els diferents grups microbians estudiats s'han acumulat de forma preferent als biofilms, destacant en primer lloc els bacteris heteròtrofs determinats amb R2A o PCA i els fongs filamentosos, i de forma lleugerament inferior als coliformes totals, *Escherichia coli* i *Pseudomonas*. A Sabadell, s'han acumulat als biofilms de forma preferent els bacteris heteròtrofs determinats amb R2A, i amb una ratio 1 log inferior els fongs filamentosos i *Pseudomonas*. En canvi, els coliformes totals i *Escherichia coli* han presentat valors semblants a la fase planctònica i al biofilm. Finalment, a l'aigua potable les dades semblen indicar clarament que als biofilms es produeix la selecció d'un grup de microorganismes que pertanyen al grup *Pseudomonas*.

**Canvis en la composició de la comunitat dels biofilms.** El seguiment dels diferents grups microbians ens ha permès estudiar l'evolució de la composició dels grups microbians que formen part de la comunitat del biofilm, determinant la importància relativa de cada un dels grups estudiats respecte dels bacteris totals determinats en placa amb l'agar R2A (veure Figura 3.10 i Figura 3.11 per a Sant Martí, Figura 3.16 per a Sabadell i Figura 3.21 per als biofilms formats a partir de l'aigua potable de l'EUOOT). Les dades obtingudes es resumeixen a la Taula 3.25.

Si observem l'abundància relativa de cada grup als biofilms desenvolupats a partir de l'aigua del pou d'Alfons el Magnànim (veure Taula 3.25), els més abundants han estat els fongs filamentosos i *Pseudomonas*, representant un 1% respecte del total de bacteris heteròtrofs, seguits amb una importància relativa força menor pels coliformes totals (-3 log), *Escherichia coli* (-4 log) i

*Aeromonas* (-5 log). En els últims dos casos s'han observat oscil·lacions importants al llarg del temps de contacte, augmentant la seva importància cap al final del mateix, en plena fase estacionària (segons els bacteris heteròtrofs).

Als biofilms desenvolupats a partir del dipòsit de reserva a Sant Martí el grup més important han estat els bacteris totals determinats en placa (heteròtrofs) amb l'agar PCA, amb un valor d'aproximadament -0,5 log durant la fase estacionària. Han seguit en importància els fongs filamentosos, amb una mitjana de -2,7 log, *Pseudomonas*, amb una mitjana de -2,8 log i prop dels -3,5 log en fase estacionària, i els coliformes totals amb -3,3 log de mitjana, però a l'entorn dels -4 log en fase estacionària. Per la seva part, *Escherichia coli* i *Aeromonas* han presentat valors propers a -5 log que han disminuït fins a no detectar-se a partir dels 125 dies d'exposició.

En general doncs, la importància relativa de cada un dels grups respecte dels bacteris heteròtrofs determinats amb R2A ha disminuït clarament en el dipòsit de reserva. Les dades semblarien indicar que el transport de l'aigua a través dels 500 m. de canonada i el seu dipòsit posterior modifica la comunitat de microorganismes. El canvi fonamental ha estat la selecció d'unes poblacions de bacteris heteròtrofs que, com s'ha vist anteriorment, han augmentat de forma significativament més important a les poblacions desenvolupades a partir de l'aigua del dipòsit (veure Figura 3.8).

A Sabadell, l'ordre d'importància relativa dels grups ha disminuït de forma apreciable cap al final del període estacionari. En aquest cas, la important quantitat de precipitats (carbonats) ha dificultat la separació de part dels microorganismes del material de suport. Segurament, els resultats obtinguts han subestimat la importància de cada grup microbià estudiat. De totes formes, *Pseudomonas* ha presentat la mitjana més elevada, amb -1,5 log, mantenint-se a la fase estacionària en valors propers als -1,4 log. Han seguit en importància els fongs filamentosos i els coliformes totals amb una mitjana de -2,6 log però amb menor importància relativa aquest últim i, finalment, *Aeromonas* amb una mitjana de -3,1 log i *Escherichia coli* amb un valor proper als -6 log al final del període de contacte.

A Sabadell cal destacar que la importància relativa de cada grup respecte de la població de bacteris heteròtrofs ha disminuït de forma important a la fase estacionària. Per tant i de manera semblant al dipòsit de Sant Martí, als biofilms desenvolupats a partir de l'aigua de la mina de Ribatallada s'han seleccionat unes poblacions de bacteris heteròtrofs. De fet, tal com s'ha comentat abans (veure Figura 3.14) a Sabadell l'augment més important a la fase biofilm respecte de la fase planctònica s'ha produït en els bacteris heteròtrofs.

**Taula 3.25.** Variació al llarg del temps de la proporció dels diferents grups microbians als biofilms en relació al total de bacteris heteròtrofs quantificats amb l'agar R2A a 22°C. Dades en log Ratio (Recompte grup específic/R2A).

	Pseudomonas		Fongs Filament.		Coliformes Totals		<i>Aeromonas</i>		<i>E. coli</i>	
	Max.	Mitj.	Max.	Mitj.	Max.	Mitj.	Max.	Mitj.	Max.	Mitj.
Sant Martí Pou	-3,2	<b>-2,1</b>	-3,2	<b>-2</b>	-3,8	<b>-2,8</b>	-8,1	<b>-5,2</b>	-6,9	<b>-4,2</b>
Sant Martí Dipòsit	-5,0	<b>-2,8</b>	-5,5	<b>-2,7</b>	-5,2	<b>-3,3</b>	-5,1	<b>-3,4</b>	-9,3	<b>-5,2</b>
Sabadell	-3,3	<b>-1,5</b>	-6,2	<b>-2,6</b>	-4,1	<b>-2,6</b>	-5,6	<b>-3,1</b>	-6,5	<b>-5,1</b>
EUOOT	-4,6	<b>-1,4</b>	-5,0	<b>-3,4</b>	-3,8	<b>-2,1</b>	-5,1	<b>-3,6</b>	-5,0	<b>-3,2</b>

Finalment, als biofilms desenvolupats a partir de l'aigua potable de l'EUOOT cal destacar com a grup més important a *Pseudomonas*, amb una mitjana de -1,4 log. Respecte de la seva presència a la fase planctònica (veure Figura 3.19) el grup *Pseudomonas* ha augmentat a la fase biofilm quasi 2 log més que els bacteris heteròtrofs. Per tant, és indubtable que als biofilms desenvolupats a partir de l'aigua potable de l'EUOOT s'ha seleccionat preferentment una comunitat formada per

bacteris del grup *Pseudomonas*, a més d'altres bacteris heteròtrofs. La importància dels fongs filamentosos (-3,4 log), *Aeromonas* (-3,6 log) i *Escherichia coli* (-3,2 log, però amb valors propers als -4 log a la fase estacionària), ha estat força menor. Finalment, els coliformes totals (-2,1 log de mitjana) han experimentat oscil·lacions importants al final del període de contacte, arribant en algun cas a valors semblants als dels bacteris totals.

**Cinètiques a temps curts.** En experiments de laboratori s'ha comprovat com l'adhesió és un fenomen ràpid que es produeix entre els primers minuts i les 2 hores després de la inoculació (Sommer et al. 1999) i que depèn, entre d'altres, de les propietats del substrat, de les característiques físico-químiques i estructurals del microorganisme, del seu estat fisiològic i del flux que influeix sobre el substrat.

Els recomptes microbians obtinguts a partir de les cinètiques de colonització realitzades han arribat a valors força elevats en poc menys de 2 dies. A l'estació de Sant Martí (Besós) s'han observat valors entre  $10^1$ - $10^2$  Ufc/cm<sup>2</sup> en menys de 1 dia, després d'exposar els reactors a l'aigua del pou d'Alfons el Magnànim, i entre  $10^2$ - $10^3$  Ufc/cm<sup>2</sup> quan s'han exposat a l'aigua del dipòsit durant el mateix període. El nivell de bacteris aerobis en placa ha pujat fins a  $10^4$  Ufc/cm<sup>2</sup> després de només 2 dies d'exposició a la mateixa aigua freàtica. Tanmateix, cal tenir present que el nombre de bacteris adherits abans de les 48 hores als reactors no ha superat en cap cas el 0,01-0,1% del total de bacteris aerobis en placa presents a la fase estacionària del biofilm (a partir dels 80 dies).

A Sabadell s'han observat nivells de colonització encara superiors per a les primeres 24 hores. No obstant, i tal com ja s'ha comentat repetidament, ha existit un problema evident en la recuperació d'una part significativa de les poblacions de microorganismes adherits.

Considerant que la taxa d'adsorció (adhesió) s'incrementa de forma lineal en augmentar la concentració de bacteris aerobis en placa (Ufc/mL) a l'aigua (Characklis & Marshall 1990), els reactors exposats a l'aigua potable han d'haver presentat els valors més baixos. Efectivament, a partir de l'aigua potable de l'EUOOT s'ha observat com l'adherència inicial ha estat clarament menor als dos casos anteriors. Així, al cap de 24 hores s'han obtingut valors inferiors a 1 Ufc/cm<sup>2</sup>, mentre que als 4 dies tot just s'ha arribat a 7 Ufc/cm<sup>2</sup>. Han estat necessaris 8 dies d'exposició a l'aigua potable per obtenir valors superiors a 10 Ufc/cm<sup>2</sup>, en concret 80 Ufc/cm<sup>2</sup>.

**Taxa específica de creixement del biofilm.** Assumint que la taxa de mortalitat és relativament baixa i que el creixement a la fase planctònica és pràcticament negligible degut a l'elevada taxa de dilució del sistema, s'ha pogut determinar la taxa específica de creixement dels biofilms desenvolupats a partir de l'aigua del dipòsit d'Alfons el Magnànim. Utilitzant per al càlcul el nombre de cèl·lules totals determinades amb recomptes microscòpics directes (epifluorescència), s'han obtingut valors entre 0,0005 i 0,003/h, el que significa un temps de generació entre 7 i 55 dies, amb un valor mitjà de  $23,26 \pm 4,14$  dies.

La taxa de creixement obtinguda per aquest sistema indica la presència de nivells relativament baixos de matèria orgànica a l'aigua. De fet, concentracions inferiors als 50 µg/L de AOC o 200 µg/L de BDOC poden arribar a limitar el creixement bacterià (Servais et al. 1991, Block et al. 1993), encara que nivells de BDOC a l'entorn dels 40 µg/L poden arribar a sostenir la producció cel·lular (Block et al. 1993). En mesures realitzades a les xarxes de distribució d'aigua potable els valors de la taxa de creixement disminueixen radicalment a mesura que ens allunyem al llarg de la xarxa, degut al consum de matèria orgànica, augmentant el temps de duplicació fins a valors entre 70-300 dies (Block 1992). Així, el BDOC acostuma a ser ràpidament consumit en absència de clor (Servais et al. 1991). Com a conseqüència d'aquesta biodegradació/assimilació de la matèria orgànica, augmenta el nombre de cèl·lules que formen part del biofilm i de la fase planctònica.

**Presència de patògens.** Tenint en compte que la metodologia realitzada no ha anat encaminada a detectar específicament tots els patògens presents a l'aigua o al biofilm, sinó que més aviat s'han seleccionat les morfologies colonials predominants, la Taula 3.26 mostra els patògens i patògens oportunistes aïllats a les tres zones de mostreig, tant a partir de l'aigua com dels biofilms desenvolupats. Els patògens oportunistes són aquells organismes que poden formar part de la microbiota del cos humà, però que sota determinades condicions poden produir malalties, especialment en individus susceptibles (nens petits, gent gran, malalts de SIDA, malalts de càncer sotmesos a tractaments amb quimioteràpia, cremats, pacients de diàlisi, transplantats, etc.). Entre els microorganismes heteròtrofs que tenen el potencial d'actuar com a patògens oportunistes cal destacar els micobacteris àcid-resistents (no tuberculosos), *Klebsiella* d'origen fecal, *Flavobacterium*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i fongs oportunistes (Geldreich 1996).

En general, la dosi infectiva per patògens oportunistes acostuma a ser bastant elevada, amb valors superiors a  $1 \times 10^{10}$  cèl·lules per a una taxa d'atac del 50% (Geldreich 1996). Malgrat que aquests nombres poden semblar bastant elevats, el volum d'aigua que s'utilitza per una dutxa o un bany poden subministrar fàcilment aquesta densitat durant un període d'exposició determinat.

A les aigües subterrànies de Sant Martí i de Sabadell s'han aïllat diferents membres que pertanyen als patògens oportunistes, i a Sabadell s'han aïllat dos patògens com *Salmonella choleraesuis* i *Yersinia enterocolitica*. A l'aigua potable no s'ha aïllat cap patògen oportunista, mentre que a partir dels biofilms desenvolupats s'han aïllat dos oportunistes.

La presència de bacteris patògens i oportunistes a les aigües freàtiques estudiades pot limitar el seu ús, si es considera la seva reutilització per a la irrigació de parcs i jardins urbans amb una afluència considerable d'usuaris. És evident que la correcta gestió de la reutilització d'aquestes aigües obliga a l'avaluació del risc sanitari que presenten per a la salut pública.

**Taula 3.26.** Patògens i patògens oportunistes aïllats a les tres zones de mostreig, a partir de l'aigua i dels biofilms desenvolupats al medi de suport dels reactors.

	Zona de Mostreig	Patògens oportunistes	Patògens
Sant Martí	Aigua	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Staphylococcus (coag.+)</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
	Biofilm Pou	<i>Staphylococcus (coag.+)</i> <i>Pseudomonas maltophilia</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-
	Biofilm Dipòsit	<i>Staphylococcus (coag.+)</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas maltophilia</i>	-
Sabadell	Aigua	<i>Staphylococcus (coag.+)</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Klebsiella sp.</i>	-
	Biofilm	<i>Staphylococcus (coag.+)</i> <i>Pseudomonas maltophilia</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Flavobacterium meningosepticum</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>
EUOOT	Aigua	-	-
	Biofilm	<i>Staphylococcus (coag.+)</i> <i>Pseudomonas maltophilia</i>	-

### 3.7. Bibliografia

- Aelion, C.M., Swindoll, C.M. & F.K. Pfaender. 1987. Adaptation to and biodegradation of xenobiotic compounds by microbial communities from a pristine aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2212-2217.
- AFNOR. 1993. Essais des eaux: Recherche et denombrement des Legionella et Legionella pneumophila. Methode générale per ensemencement direct et filtration sur membrane. Afnor T-90-431. ISSN 0335-3931.
- Ajuntament de Sabadell. 1998. Can Llong. Ajuntament de Sabadell. B-7365-98.
- Allen, M.J. 1980. Microbiology of groundwater. *J. Water Poll. Control Fed.* 52(6):1804-1807.
- American Water Works Association (AWWA). 1990. Position statement on chlorine residual. In 1993-1994 AWWA Officers and Committee Directory. Denver, Colo.: American Water Works Association.
- Assanta, M.A., Roy, D. & D. Montpetit. 1998. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* to water distribution system pipes after diferent contact times. *J. Food Protection.* 61(10): 1321-1329.
- Bales, R.C., Li, S. & J.T. Maguire. 1995. Virus and bacteria transport in a sandy aquifer, Cape Cod, MA. *Ground Water* 33(4):653-661.
- Barcina, I., Lebaron, P. & J. Vives-Rego. 1997. Survival of allochtonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23:1-9.
- Barnett, H.L. & B.B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company. Third Ed.
- Barrera, J. 1998. L'explotació de l'aquífer desgravarà. *El Periódico*, 12 d'octubre de 1998.
- Barton, J.W. & R.M. Ford. 1997. Mathematical model for characterization of bacterial migration through sand cores. *Biotechnol. Bioeng.* 53:487-496.
- Bartscht, K., Cypionka, H., Overmann, J. 1999. Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community. *Fems Microbiol. Ecol.* 28(3):249-259.
- Block, J.C., Haudidier, K., Paquin, J.L., Miazga, J. & Y. Levi. 1993. Biofilm accumulation in drinking water distribution systems. *Biofouling*, 6:333-343.
- Block, J.C. 1992. Biofilms in drinking water distribution systems. In: *Biofilms –Science and Technology*, Bott, T.R., Melo, L., Fletcher, M. & B. Capdeville, eds., Nato Advanced Study Institute, Portugal, Kluwer Publishers, The Netherlands, 469.
- Block, J.C., Dutang, M., Maillard, J. & D. Reasoner. 1993. Growth of attached bacteria in water distribution systems. In, Special Subject "Biological activity in distribution systems, 19<sup>th</sup>. Int. Water Supply Congress, Budapest.
- Bourbigot, M.M., Dodin, A. & R. L'Heriter. 1984. La flore bactérienne dans un réseau de distribution. *Wat. Res.* 18:589-591.
- Buchanon-Mappin, J.M., Wallis, P.M. & A.G. Buchanan. 1986. Enumeration and identification of heterotrophic bacteria in groundwater and a mountain stream. *Can. J. Microbiol.* 32(9): 93-98.
- Byrd, J.J., Xu, H.S. & R.R. Colwell. 1991. Viable but non culturable bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:875-878.
- Caldwell, B.A. & R.Y. Morita. 1988. Sampling regimes and bacteriological test for coliform detection in groundwater. US EPA/600/S2-87/083 3 pp.
- Camper, A. 1994. Coliform regrowth and biofilm accumulation in drinking water systems: A review. Pp. 91-105. In Geesey, G.G., Lewandowski, Z. & H.C. Flemming (eds.), *Biofouling and Biocorrosion in industrial water systems*. Lewis Publishers, Boca Raton. Fla.
- Camper, A., Burr, M., Ellis, B., Butterfield, P. & C. Abernathy. 1999. Development and structure of drinking water biofilms and techniques for their study. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 85, 1S-12S.
- Camper, A.K, Warnecke, M., Jones, W.L. and G.A. McFeters. 1998. Pathogens in model distribution system biofilms. Denver: American Water Works Association Research Foundation.
- Camper, A.K. 1996. Factors limiting microbial growth in the distribution system: pilot and laboratory studies. Denver: American Water Works Association Research Foundation.
- Camper, A.K., Hayes, J.T., Sturman, P.J., Jones, W.L. & A.B. Cunningham. 1993. Effects of motility and adsorption rate coefficient on transport of bacteria through saturated porous media. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(10): 3455-3462.
- Chapelle, F.H. 1993. *Ground-water microbiology and geochemistry*. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Characklis, W.G. & K.C. Marshall. 1990. *Biofilms*. New York: John Wiley & Sons, Inc.

- Choi, J. W., Sherr, E.B. & B.F. Sherr. 1996. Relation between presence-absence of a visible nucleoid and metabolic activity in bacterioplankton cells. *Limnol. Oceanogr.* 41, 6, 1161-1168.
- Clark, R.M., Lykins, B.W., Block, J.C., Wymer, L.J. & D.J. Reasoner. 1994. Water quality changes in a simulated distribution system. *J. Water SRT-Aqua*, 43(6):263-277.
- Cole, S. 1998. Reclaimed wastewater continues flow toward tap. *Env. Sci. Tech.*, Nov. 1, 496-497.
- Collin, J.F., Melet, J.J., Morlot, M. & J.M. Foliguet. 1981. Eau d'adduction publique et gastro-enterites en Meurthe-et-Moselle. *J. Fr. Hydrol.* 12:155-174.
- Costerton, J.W. 1995. Overview of microbial biofilms. *J. Ind. Microbiol.* 15:137-140.
- Cowen. 1974. Cowen and Steel's manual for identification of medical bacteria. Cambridge University Press.
- Cullimore, D.R. 1993. Practical manual of groundwater microbiology. Lewis Publ. Chelsea, USA.
- Cunningham, A.B. & O. Wanner. 1993. Modeling microbial processes in porous media with application to biotransformation. International Symposium on Hydrological, Chemical and Biological Processes of Transformation and Transport of Contaminants in Aquatic Environments. Rostov-on-Dov, USSR.
- Czakó, T. 1994. Groundwater monitoring network in Denmark: example of results in the Nyborg area. *Hydrol. Sci.* 39(1):1-17.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton J.W. & E.P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280, 295-298.
- D'Angelo, S. 1993. Reusing water in the nineties. *Water Environment and Technology*, vol 5, no. 2.
- Dennis, P.J., Bartlett, C.L.R. & A.E. Wright. 1984. Comparison of isolation methods for *Legionella* spp. In Thornsby, C. et al. (eds.) *Legionella: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium*. Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., pp. 294-296.
- Direcció General de Salut Pública. 1994. Prevenció del risc sanitari derivat de la reutilització d'aigües residuals depurades com a aigües de reg. Generalitat de Catalunya.
- Directiva 75/440 CE, referent a la qualitat requerida per les aigües superficials destinades a la producció d'aigua potable en els estats membres. Ordre de 11 de maig de 1988, característiques bàsiques de qualitat en corrents d'aigües superficials destinades a la producció d'aigua potable (BOE n° 124, de 24.05.88)
- Directiva 76/160 CE, RD 734/1988, de 1 de juliol, de les normes de qualitat de les aigües de bany (BOE n° 167, de 13.07.88), (Correcció d'errades: BOE n° 169, de 15.07.88)
- Directiva 80/778 CE, RD1138/1990, de 14 de setembre, aprovant la Reglamentació Tècnica Sanitària per aprovisionament i control de la qualitat de les aigües potables (BOE n° 226, de 20.09.00).
- Dollard, M.A., Schwartzbrod, J., Maul, A. & J.C. Block. 1985. Diversite des populations bacteriennes d'un reseau de distribution publique. *J. Fr. Hydrol.* 16:287-299.
- Donlan, R.M. & W.O. Pipes. 1988. Selected drinking water characteristics and attached microbial population density. *J. Am. Water Works Assoc.* 80(70): 70-76.
- Drever, J.I. 1982. The geochemistry of natural waters. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc.
- Driscoll, F.G. 1986. Groundwater and wells, Second Ed. Publ. Johnson Division. St. Paul, Minn., USA. 1089 pp.
- Eaton, A.D., Clesceri, L.S. & A.E. Greenberg eds. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19<sup>th</sup> ed. Pp. 4-45. Washington DC: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Feldman, W.R., Carter, S.A. and Stone, K.W. 1997. Water requirements of arid-adapted groundcover and sub-shrub species for landscape use in arizona. *Desert Plants*: 18-24.
- Fletcher, M. & K.C. Marshall. 1982. Are solid surfaces of ecological significance to aquatic bacteria?. *Advanced Microbiological Ecology*, 6: 199-236.
- Foment del Treball Nacional. 1996. Estadístiques de Catalunya. [www.foment.com/esta.htm](http://www.foment.com/esta.htm)
- Fontes, D.E., Mills, A.L., Hornberger, G.M. & J.S. Herman. 1991. Physical and chemical factors influencing transport of microorganisms through porous media. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2473-2481.
- Frias, J., Ribas, F. & F. Lucena. 1992. A method for the measurement of biodegradable organic carbon in waters. *Water Res.*, 26(2): 255-258.
- Fry, J.C. 1990. Direct methods and biomass estimation. *Methods Microbiol.* 22:41-85.

- Geldreich, E.E. 1986. Control of microorganisms of Public Health Concern in Water. *J. Environ. Sci.* 29:34-37.
- Geldreich, E.E. 1989. Drinking water microbiology. New directions toward water quality enhancement. *Int. J. Food Micro.* 9:295-312.
- Geldreich, E.E. 1996. Microbial quality of water supply in distribution systems. CRC Press. Lewis Publishers.
- Grimes, D.J. & R.R. Colwell. 1986. Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FEMS Microbiol. Lett.* 34:161-165.
- Gu, B., Schmitt, J., Chen, Z., Liang, L. & J.F. McCarthy. 1994. Adsorption and desorption of natural organic matter on iron oxide: mechanisms and models. *Environmental Science and Technology*, 28:38-46.
- Habicht, W. & H.E. Mueller. 1988. Occurrence and parameters of frequency of *Legionella* in warm water systems of hospitals and hotels in lower Saxony. *Zbl. Bakt. Hyg., B186*: 79-88.
- Hamilton, W.A. 1985. Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:195-217.
- Harvey, R.W. 1991. Parameters involved in modeling movement of bacteria in groundwater, pp. 89-114. In: C.J. Hurst eds., *Modeling the environmental fate of microorganisms*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Harvey, R.W., George, F.H. & R.L. Smith. 1989. Transport of microspheres and indigenous bacteria through a sandy aquifer: results of natural and forced-gradient tracer experiments. *Environ. Sci. Technol.* 23(1): 51-56.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J. & S. Jasper. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 5, 1225-1228.
- Hsu, S.C., Martin, R. & B.B. Wentworth. 1984. Isolation of *Legionella* species from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:830-832.
- Jarvis, W.R., White, J.W., Munn, Van P., Mosser, J.L., Emori, T.G., Culver, D.H., Thornsberry, C. & J. Hughes. 1985. Nosocomial infection surveillance, 1983. US, CDC Surveillance summaries 33 (#2SS): 9SS-21SS.
- Jenneman, G.E., McInerney, M.J. & R.M. Knapp. 1985. Microbial penetration through nutrient-saturated Berea sand-stone. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:383-391.
- Joret, J.C. & Y. Levi. 1986. Methode rapide d'evaluation du carbone eliminable des eaux par voie biologique. *Trib. Cebedeau.* 39:3-9.
- Joret, J.C. 1988. Rapid methods for estimating bioeliminable organic carbon in water. In Proc. Annual Conference. Denver, Colo.: American Water Works Association.
- Joret, J.C., Levi, Y., Dupin, T. & M. Gibert. 1988. Rapid method for estimating bioeliminable organic carbon in water. Proc. AWWA annual Conf., Orlando, FL, June 19-23.
- Junta de Sanejament. 1991. Llei 19/1991, de 7 de novembre, de reforma de la Junta de Sanejament. DOGC, 19/1991, 7-11-1991.
- Junta de Sanejament. 1997. Informe 1997. [www.gencat.es/mediamb/aigua](http://www.gencat.es/mediamb/aigua)
- Kalmbach, S., Manz, W. & U. Szewzyk. 1997. Isolation of new bacterial species from drinking-water biofilms and proof of their in-situ dominance with highly specific 16S ribosomal-RNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(11):4164-4170.
- Karner, M. & J.A. Fuhrman. 1997. Determination of active marine bacterioplankton: a comparison of universal 16S rRNA probes, autoradiography and nucleoid staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1208-1213.
- Keevil, C.W., Rogers, J. & J.T. Walker. 1995. Potable-water biofilms. *Microbiol. Eur.* 3(6):10-14.
- Kepner, R.L. & J. R. Pratt. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews*, 58, 4, 603-615.
- Keswick, B.H., Gerba, C.P. & S.L. Secor. 1982a. Survival of enteric viruses and indicator bacteria in groundwater. *J. Environ. Sci Health-Part A*, 17:903-912.
- Keswick, B.H., Wang, D.S. & C.P. Gerba. 1982b. The use of microorganisms as groundwater tracers: a review. *Ground Water* 20 (2): 142-149.
- King, L. & B.C. Parker. 1988. A simple, rapid method for enumerating total viable and metabolically active bacteria in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(6): 1630-1631.
- Korber, D.R., Choi, A., Wolfaardt, G.M. & D.E. Caldwell. 1996. Plasmolysis as a physical indicator of bacterial viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3939-3947.



- Ladd, T.I., Ventullo, R.M., Wallis, P.M. & J.W. Costerton. 1982. Heterotrophic activity and biodegradation of labile and refractory compounds by groundwater and stream microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(2):321-329.
- Larone, D.H. 1993. Medically important fungi. A guide to identification. American Society for Microbiology. 2<sup>nd</sup>. Ed.
- LeChevallier, M.W. & G.A. McFeters. 1985a. Enumerating injured coliforms in drinking water. *J. Am. Water Works Assoc.* 77(6):81-87.
- LeChevallier, M.W. & G.A. McFeters. 1985b. Interaction between heterotrophic plate count bacteria and coliform organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1338-1341.
- LeChevallier, M.W., Babcock, T.M. & R.G. Lee. 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(12):2714-2724.
- LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D. & R.G. Lee. 1988. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:649-654.
- LeChevallier, M.W., Lowry, C.D. & R.G. Lee. 1990. Disinfection biofilms in a model distribution system biofilm. *J. Am. Water Works Assoc.* 82:87-99.
- LeChevallier, M.W., Seidler, R.J. & T.M. Evans. 1980. Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 40(5):922-930.
- LeChevallier, M.W., Shaw, N.J. & D.B. Smith. 1996a. Factors limiting microbial growth in distribution systems: full-scale experiments. AWWA Research Foundation, American Water Works Association.
- LeChevallier, M.W., Welch, N.J. & D.B. Smith. 1996b. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7):2201-2211.
- Lee, S.H., O'Connor, S. & B.K. Banerji. 1980. Biologically mediated corrosion and its effects on water quality in distribution systems. *J. Am. Water Works Ass.*, 72:636-645.
- Levy, Y. c/o Chairman. 1997. Standard method to evaluate aquatic biofilms. *In International Conference on Biofilms in Aquatic Systems*, 1997, Warwick, UK.
- Lisk, I. 1998. Advanced technology pilot facility treats agricultural runoff water for reuse. *Water Online, Industry News*, 23/11/1998.
- MacLeod, F.A., Lappin-Scott, H.M. & J.W. Costerton. 1988. Plugging of a model rock system by using starved bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1365-1372.
- Marxsen, J. 1988. Investigations into the number of respiring bacteria in groundwater from sandy and gravelly deposits. *Microbial Ecology*, 16:65-72.
- Maul, A., Vagost, D. & J.C. Block. 1991. Microbiological analysis in water distribution networks. Sampling strategies, methods and computer programs. Ellis Horwood series in water and wastewater technology.
- McFeters, G.A., Camper, A., LeChevallier, M.W., Broadway, S. & D.G. Davies. 1987. Bacteria attached to granular activated carbon in drinking water. *Environmental Res. Brief*, June 1-5, USEPA Cincinnati.
- McFeters, G.A., Kippin, J.S. & M.W. LeChevallier. 1986. Injured coliforms in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1-5.
- McFeters, G.A., Yu, F.P., Pyle, B.H. & P.S. Stewart. 1995. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. *J. Microbiol. Meth.* 21, 1-13.
- Miettinen, I.T., Vartiainen, T. & P.J. Martikainen. 1997. Phosphorus and bacterial growth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(8): 3242-3245.
- Mir, J., Morató, J. & F. Ribas. 1997. Resistance to chlorine of freshwater bacterial strains. *J. Appl. Microbiol.* 82:7-18.
- Molecular Probes. 1998. Live BacLight Bacterial Gram Stain kits Product Information Sheet, 7008. Molecular Probes Europe BV, Leiden.
- Molecular Probes. 1998. Live/Dead BacLight Bacterial Viability kits Product Information Sheet, 7007. Molecular Probes Europe BV, Leiden.
- Morató, J. 1992. Resistència bacteriana a la cloració en soques bacterianes aeròbies del riu Llobregat. Treball experimental del Màster de Microbiologia. Departament de Genètica i Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Morin, P., Camper, A., Jones, W., Gatel, D. & J.C. Goldman. 1996. Colonization and disinfection of biofilms hosting coliform-colonized carbon fines. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4428-4432.

- Mueller, R.F., Characklis, W.G., Jones, W.L. & J.T. Sears. 1992. Characterization of initial events in bacterial surface colonization by two *Pseudomonas* species using image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 39:1161-1170.
- Mujeriego, R. 1990. Manual práctico de riego con agua residual municipal regenerada. Universitat Politècnica de Catalunya y Generalitat de Catalunya. Ed. UPC.
- Nagy, L.A. & B.H. Olson. 1985. Occurrence and significance of bacteria, fungi and yeasts associated with distribution pipe surfaces. Proceedings of the Water Quality Technical Conference, Houston, Tex. American Water Works Association, Denver.
- National Research Council. 1994. Alternatives for Ground Water Cleanup. Washington: National Academy Press.
- Navarro, A., Soler, M.A., Morató, J. & D. Collado. 1996. Characterization and remediation of contaminated aquifers by numerical analysis of geochemical data. 2nd. European Meeting on Chemical Industry and Environment. Alghero, Italia. Vol. 3:1055-1065.
- Olson, B.H. 1982. Assessment and implications of bacterial regrowth in water distribution systems: EPA-600/152-82-072. Cincinnati:US Environmental Protection Agency.
- Organización Mundial de la Salud. 1989. Directrices Sanitarias sobre el Uso de Aguas Residuales en Agricultura y Acuicultura. Serie de informes técnicos 778. Ginebra, Suiza.
- Papapetropoulou, M, Tsintzou, A. & A. Vantarakis. 1997. Environmental mycobacteria in bottled table waters in Greece. *Can. J. Microbiol.* 43, 499-502.
- Parcs i Jardins. 1997. Memòria d'Activitats. 1997. Institut Municipal de Parcs i Jardins. [www.bcn.es/parcsijardins](http://www.bcn.es/parcsijardins)
- Parker, M.T. & B.I. Dueren. 1990. Isolation, description and identification of bacteria, p. 2-17. In M.T. Parker & L.H. Collins (ed.), Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity. Systematic bacteriology Vol 2. Edward Arnold, London.
- Payment, P., Gamache, F. & G. Paquette. 1988. Microbiological and virological analysis of water from two water filtration plants and their distribution system. *Can. J. Microbiol.* 34:1304-1309.
- Pelegri, J. 1997. Aprovechamiento de aguas freáticas para el riego. La experiencia de Barcelona. Proc. 3<sup>er</sup> Simposium Hispano Portugués de Relaciones Hídricas en las Plantas. Sitges (Barcelona).
- Phillips, S.B. & D. Amsterdam. 1977. API computer profiles: correlation of API 20E with API 10S. *J. Clin. Microbiol.*, 6, 6, 645-646.
- Pillai, S.D. (ed.). 1998. Microbial Pathogens within Aquifers: Principles and Protocols. Springer-Verlag, Berlin.
- Pyle, B.H., Broadaway, S.C. & G.A. McFeters. 1995. Factors affecting the determination of respiratory activity on the basis of cyanoditolyl tetrazolium chloride reduction with membrane filtration. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 12, 4304-4309.
- Reasoner, D.J. & E.E. Geldreich. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(1): 1-7.
- Rizet, M., Depardieux, J., Gognet, M. & F. Lorentz. 1985. Populations microscopiques des reseaux de distribution d'eau potable: effet d'un nettoyage mecanique. *J. Fr. Hydrol.* 16:269-286.
- Rodriguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K. & H.F. Ridgway. 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 6, 1801-1808.
- Romaní, A. Heterotrophic and autotrophic metabolism in mediterranean streams. Ph. D. Thesis. Departament d'Ecologia. Universitat de Barcelona.
- Saby, S., Sibille, I., Mathieu, L., Paquin, J.L. & J.C. Block. 1997. Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole). *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4, 1564-1569.
- Savé, R., Peñuelas, J., Filella, I. and Olivella, C. 1995. Water relations, hormonal level and spectral reflectance of *Gerbera jamesonii* Bolus submitted to chilling stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120 (3): 515-519.
- Savé, R., Peñuelas, J., Marfà, O. and Serrano, L. 1993. Changes in tissue osmotic and elastic properties and canopy structure of strawberries under mild water stress. *HortScience* 28(9): 925-927.
- Schindler, P.R.G. 1984. Nachweis von *Yersinia enterocolitica* aus Trinkwasser-er-sorgungsanlagen in Sudbayern. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.*, B180, 76-84.
- Schoenen, D. & H.F. Scholer 1985. Drinking water materials: field observations and methods of investigation. New York: Chichester and Halsted Press.

- Schoenen, D. 1986. Microbial growth due to materials used in drinking water systems. In: Biotechnology, Rehm, H.J. & G. Reed (eds.), VCH Publishers, Weinheim, chap. 20, 627-647.
- Schulze-Röbbecke, R., Janning, B. & R. Fischeder. 1992. Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. *Tubercle and Lung Disease*. 73, 141-144.
- Schut, F., Devries, E.J., Gottschal, J.C., Robertson, B.R., Harder, W., Prins, R.A. & D.K. Button. 1993. Isolation of typical marine-bacteria by dilution culture - growth, maintenance and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(7):2150-2160.
- Servais, P., Billen, G., Laurent, P., Levi, Y. & G. Randon. 1991. Studies of BDOC and bacterial dynamics in the drinking water distribution system of the northern parisian suburbs. *Seminaire International "Matiere organique et reseaux de distribution"*, Nancy.
- Servais, P., Laurent, P. & G. Randon. 1993. Impact of biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) on bacterial dynamics in distribution systems. In *Proc. Water Quality Technology Conference*, Denver, Colo.: American Water Works Association.
- Shirey, J.J., & G.K. Bissonnette. 1991. Detection and identification of groundwater bacteria capable of escaping entrapment on 0.45 µm-pore-size membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2250-2254.
- Sommer, P., Martin-Rouas, C. & E. Mettler. 1999. Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. *Food Microbiol.* 16: 503-515.
- Sworobuk, J.E., Law, C.B. & G.K. Bissonnette. 1987. Assessment of the bacteriological quality of rural groundwater supplies in northern West Virginia. *Water Air and Soil Pollution*, 36:136-170.
- Terradas, J. and Savé, R. 1992. The influence of summer and winter stress and water relationships on the distribution of *Quercus ilex* L. *Vegetatio*, 99-100: 137-145.
- Ullrich, S., Karrasch, B., Hoppe, H.G., Jeskulke, K. & M. Mehrens. 1996. Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 12, 4587-4593.
- United Nations. 1986. *Urban and Rural Population. Projections 1950-2025: The 1985 Assessment*. New York.
- US Environmental Protection Agency. 1991. *National Primary Drinking Water Regulations: Total Coliforms*. Fed. Reg., 56(10):1556-1557.
- US Environmental Protection Agency. 1992. *Seminar Publication: Control of biofilm growth in drinking water distribution systems*. EPA/625/R-92/001. Washington, D.C.: Office of Research and Development.
- US Environmental Protection Agency and United States Agency for International Development. 1992. *Manual on Guidelines for Water Reuse*. EPA/625/R-92/004, September 1992. Center for Environmental Research Information, Cincinnati, Ohio.
- Van der Kooij, D. 1992. Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *J. Am. Water Works Assoc.* 84:57-66.
- Van der Kooij, D., Hijnen, W.A.M. & J.C. Kruithof. 1989. The effect of ozonation, biological filtration and distribution on the concentration of easilyassimilable organic carbon (AOC) in drinking water. *Ozone Sci. Eng.* 11:297-311.
- Van der Wende, E., Characklis, W.G. & D.B. Smith. 1989. Biofilms and bacterial drinking water quality. *Wat. Res.* 23: 1313-1322.
- Victoreen, H.T. 1974. Control of water quality in transmission and distribution mains. *J. Am. Water Works Ass.*, 66:369-370.
- Victoreen, H.T. 1984. The role of rust in coliform regrowth. *Proceedings of the American Water Works Association Water Quality Technical Conference*, Denver, Colo. American Water Works Assoc., Denver.
- Volk, C. & J.C. Joret. 1994. Paramètres predictifs de l'apparition des coliformes dans les réseaux de distribution d'eau d'alimentation. *Revue des Sciences de l'Eau*, 7:131-152.
- Volk, C., Renner, C., Robert, C. & J.C. Joret. 1994. Comparison of two techniques for measuring biodegradable dissolved organic carbon in water. *Environ. Technol.* 15:545-556.
- Water Pollution Control Federation. 1989. *Water Reuse (Second Edition). Manual of Practice SM-13*. Virginia, Estados Unidos.
- Wilson, J.T., MacNabb, J.F., Balkwill, D.L & W.C. Ghiorse. 1983. Enumeration and characterization of bacteria indigenous to a shallow water-table aquifer. *Ground Water* 21(2): 134-142.
- Wilson, J.T., MacNabb, J.F., Cochran, J.W., Wang, T.H., Tomson, M.B. & P.B. Bedient. 1985. Influence of microbial adaptation on the fate of organic pollutants in groundwater. *Environ. Toxicol. Chem.* 4: 721-726.
- Zweifel, U.L. & A. Hagström. 1995. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts). *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 6, 2180-218