

RESUM

Malgrat la gran quantitat de tècniques existents per a l'estudi de mostres de biofilms, avui en dia encara no es disposa d'un mètode estandaritzat i àmpliament acceptat per avaluar el desenvolupament de biofilms en sistemes de distribució d'aigua. En el treball presentat en aquesta memòria s'ha desenvolupat un sistema experimental per analitzar la colonització microbiana de superfícies, especialment a partir de sistemes de distribució d'aigua. Aquest sistema presenta unes característiques adequades per la seva facilitat d'operació i el baix manteniment, convertint-lo en aplicable tant per mostrejos de camp com al laboratori. El sistema experimental consta de diversos reactors de llit empaquetat, plens d'esferes de vidre de 5 mm de diàmetre com a medi de suport, per on es fa circular l'aigua que es vol estudiar. La configuració en forma de llit empaquetat fix permet la producció de biofilms controlant el gradient de velocitats, alhora que s'obté el màxim de superfície en el mínim espai possible.

Inicialment es va realitzar l'optimització del mètode experimental, especialment pel que fa referència al processament previ de les mostres de biofilm – rentat i separació –, al material de suport i a les condicions hidrodinàmiques utilitzades de forma rutinària. Així mateix, es van seleccionar les anàlisis microbiològiques que van permetre quantificar alhora les mostres planctòniques i de biofilm. Després de provar diferents mètodes de tinció directa dels biofilms es van escollir les tincions amb taronja d'acridina i amb Live/Dead BacLight[®], aplicades alhora en els recomptes totals de les mostres disgregades. Es va aplicar i optimitzar la tècnica de la crioinclusió, tinció amb DAPI i CTC i criosecció als biofilms desenvolupats al material de suport (esferes de vidre). També es va optimitzar la microscòpia electrònica de rastreig ambiental (ESEM) i la microscòpia confocal. Finalment, les mostres es van observar igualment amb un perfilòmetre òptic confocal que utilitza un patró d'esclatxes per al rastreig.

A continuació, les tècniques descrites es van aplicar en l'avaluació de la formació de biofilms a partir d'aigües subterrànies sense tractar. Es va realitzar un seguiment del desenvolupament de biofilms a partir de l'aigua de drenatge reutilitzada per al reg de parcs urbans a Sant Martí (pou d'Alfons el Magnànim, Besòs, Barcelona) i de la mina de Ribatallada (CASSA, Sabadell). En els dos casos s'han pogut aïllar del biofilm diferents membres de la microbiota autòctona. A més, la presència d'indicadors de contaminació fecal com els coliformes totals o *Escherichia coli* així com oportunistes o patògens, indicaria la potencialitat d'aquests biofilms com a refugi per a tot tipus de microorganismes.

A part del seguiment per recompte de viables i recompte directe microscòpic després de disgregar les mostres, també s'ha monitoritzat el desenvolupament dels biofilms a través de la microscòpia confocal. Aquesta tècnica ha permès seguir la colonització dels reactors al llarg del temps. A l'estació experimental ubicada a Sant Martí, la formació de biofilms ha arribat a la fase de desenvolupament màxim entre els 80-100 dies d'exposició a l'aigua freàtica. En aquest cas, a mesura que el biofilm madura ha estat possible diferenciar més agregats cel·lulars, i a partir dels 65 dies de contacte amb l'aigua el biofilm ha recobert la majoria de les àrees prèviament no colonitzades. Després dels 80-90 dies i fins al final de temps d'exposició s'ha observat la presència de biofilms plenament desenvolupats i altament estructurats, amb presència d'una capa basal de 5-10 µm, zones on el biofilm sobresurt d'aquesta capa basal i zones plenes de canals d'aigua sense cèl·lules.

Les mostres de biofilm obtingudes a partir d'aigües subterrànies s'han comparat amb una tercera estació de mostreig, on s'ha utilitzat aigua d'una xarxa de distribució d'aigua potable. En aquest cas, els biofilms no han arribat a formar estructures complexes com les observades a les altres dues zones de mostreig, mostrant una baixa densitat cel·lular.

El control de la formació dels biofilms pot incloure tractaments alternatius a la desinfecció. En aquest sentit, l'ús de condicionadors catalítics ha demostrat presentar un efecte positiu reduint la formació del biofilm de forma significativa, alhora que no afegeix cap producte químic a l'aigua. Aquest efecte s'ha presentat en la majoria de grups bacterians estudiats, reduint la presència dels bacteris totals en placa, coliformes totals i *Pseudomonas*.

Finalment, s'ha desenvolupat l'esquema metodològic per avaluar el risc microbiològic per a la salut pública de la reutilització d'aigües subterrànies en la irrigació de parcs i jardins urbans. S'ha adaptat la metodologia de l'avaluació del risc microbiològic per a l'estudi de sistemes de distribució d'aigua, on el desenvolupament dels biofilms pot fomentar la presència d'agregats a la fase líquida. En aquest sentit, el potencial de formació de biofilm – paràmetre determinat a partir de les dades obtingudes amb el sistema experimental –, es configura com un paràmetre bàsic i que no es pot negligir de cara a l'avaluació del risc sanitari per a la salut pública.

RESUMEN

A pesar de la gran cantidad de técnicas existentes para el estudio de muestras de biofilms, hoy en día todavía no se dispone de un método estandarizado y ampliamente aceptado para evaluar el desarrollo de biofilms en sistemas de distribución de agua. En el trabajo presentado en esta memoria se ha desarrollado un sistema experimental para analizar la colonización microbiana de superficies, especialmente a partir de sistemas de distribución de agua.

Este sistema presenta unas características adecuadas por su facilidad de operación y bajo mantenimiento, convirtiéndolo en aplicable tanto en muestreos de campo como de laboratorio. El sistema experimental consta de varios reactores de lecho empacado, llenos de esferas de vidrio de 5 mm de diámetro como medio de soporte, por donde circula el agua que se quiere estudiar. La configuración en forma de lecho empacado fijo permite la producción de biofilms controlando el gradiente de velocidades, a la vez que se obtiene el máximo de superficie en el mínimo espacio posible.

Inicialmente se realizó la optimización del método experimental, especialmente en lo que se refiere al procesado previo de las muestras del biofilm -lavado y separación-, al material de soporte y a las condiciones hidrodinámicas utilizadas de forma rutinaria. Así mismo, se seleccionaron las analíticas microbiológicas que permitieron cuantificar a la vez las muestras planctónicas y del biofilm. Después de probar diferentes métodos de tinción directa de los biofilms, se escogieron las tinciones con naranja de acridina y con Live/Dead BacLight[®], aplicadas a la vez en los recuentos totales de las muestras disgregadas. Se aplicó y optimizó la técnica de la crioinclusión, tinción con DAPI y CTC y criosección a los biofilms desarrollados en el material de soporte. También se optimizó la microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) y la microscopía confocal. Finalmente, las muestras se observaron con un perfilómetro confocal.

A continuación, las técnicas descritas se aplicaron en la evaluación de la formación de biofilms a partir de aguas subterráneas sin tratar. Se realizó un seguimiento del desarrollo de biofilms a partir del agua de drenaje utilizada para el riego de parques urbanos en Sant Martí (pozo de Alfons el Magnànim, Besós, Barcelona) y de la mina de Ribatallada (CASSA, Sabadell). En los dos casos se han podido aislar del biofilm diferentes miembros de la microbiota autóctona. Además, la presencia de indicadores de contaminación fecal como los coliformes totales o *Escherichia coli*, así como oportunistas o patógenos, indicaría la potencialidad de estos biofilms como refugio para todo tipo de microorganismos. Aparte del seguimiento del recuento de viables y recuento microscópico directo después de disgregar las muestras, también se ha monitorizado el desarrollo de biofilms a través de la microscopía confocal. Esta técnica ha permitido seguir la colonización de los reactores a lo largo del tiempo. En la estación experimental ubicada en Sant Martí, la formación de biofilms ha llegado a la fase de desarrollo máximo entre los 80-100 días de exposición al agua freática. En este caso, a medida que el biofilm madura ha sido posible diferenciar más agregados celulares, y a partir de los 65 días de contacto con el agua el biofilm ha recubierto la mayoría de las áreas previamente no colonizadas. Después de 80-90 días y hasta el final del tiempo de exposición se ha observado la presencia de biofilms plenamente desarrollados y altamente estructurados, con presencia de una capa basal de 5-10 μm , zonas donde el biofilm sobresale de esta capa basal y zonas llenas de canales de agua sin células.

Las muestras de biofilm obtenidas a partir de aguas subterráneas se han comparado con una tercera estación de muestreo, donde se ha utilizado agua de la red de distribución de agua potable. En este caso, los biofilms no han llegado a formar estructuras complejas, como las observadas en las otras dos zonas de muestreo, mostrando una baja densidad celular.

El control de la formación de biofilms puede incluir tratamientos alternativos a la desinfección. En este sentido, el uso de acondicionadores catalíticos ha demostrado presentar un efecto positivo reduciendo la formación del biofilm de forma significativa, a la vez que no se añade ningún producto químico al agua. Este efecto se ha presentado en la mayoría de grupos bacterianos estudiados, reduciendo los recuentos de bacterias totales en placa, coliformes totales y *Pseudomonas*.

Finalmente, se ha desarrollado el esquema metodológico para evaluar el riesgo microbiológico para la Salud Pública de la reutilización de aguas subterráneas en la irrigación de parques y jardines urbanos. Se ha adaptado la metodología de la evaluación del riesgo microbiano para el estudio de los sistemas de distribución de agua, donde el desarrollo de los biofilms puede fomentar la presencia de agregados en la fase líquida. En este sentido, el potencial de formación de biofilms se configura como un parámetro básico para poder evaluar el riesgo sanitario para la Salud Pública.

ABSTRACT

Up to now, there are no general standardized and widely accepted methods for removal of attached microorganisms in water distribution systems. Our study addressed the design, development and application of an experimental system to measure directly the extent of biofilm formation in water systems.

Because of its compactness, ruggedness, low cost and versatility, this is a suitable system for field and laboratory experiments. We have developed it using packed bed reactors full of 5 mm glass beads as standard attachment media, tightly packed in cylindrical tubes and sterilized prior to startup. The experimental system was fed with water pumped from the source used, depending on the experimental conditions. The reactors were operated in an upward-flow mode allowing the control of velocity gradient, and water exited at the top of the reactors, covering the entire system in order to attain a better regulation of the temperature. At the same time, packed bed reactors increase the ratio of surface area to volume, permitting intimate contact of fluid elements and biomass. Water was allowed to flow through the bed of glass spheres during a certain period of time after which the reactor was removed and the beads treated to analyze their content of attached microorganisms.

First, we addressed the optimization of experimental system, in order to improve the preliminary processing of biofilm samples -rinsing and removing -, the use of different attachment material and the hydrodynamic conditions. We select the different techniques for microbial analyses, for quantifying the sessile (biofilm) and planktonic populations at the same time. Samples were also examined using acridine orange and Live/Dead BacLight staining and epifluorescence microscopy, and with a cryoembedding technique and staining with DAPI-CTC. Furthermore, biofilm samples were examined using confocal microscopy and environmental scanning electronic microscopy (ESEM). Finally, we applied a newly developed confocal profilometer for the same purpose.

The different techniques were applied in order to assess in situ the biofilm development from groundwater. The experimental system has been used to assess the biofilm formation from two different groundwater systems: a groundwater well used for urban parks irrigation, in the Besós river basin, located north of Barcelona (Spain) and the Ribatallada groundwater in Sabadell. Members of the autochthonous water microbiota were isolated from two reclaimed groundwater examined. Among them we could identify *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Enterobacter agglomerans* and other members of the *Enterobacteriaceae*, and different *Pseudomonas* and *Mycobacterium* strains. The biofilms were also examined in field experiments using the confocal scanning microscope. With the aid of a polycarbonate cell, images of each individual glass spheres could be obtained. At Besós groundwater well, the glass spheres were rapidly colonized and appeared to form biofilm, which was initially localized, with large areas uncolonized. As the biofilm matured it was possible to differentiate some cell clusters, and bacterial growth infilled the previously uncolonized zones after 65 days. Biofilms reached their maximum level of development after 80-90 days, where a low basal layer of cells could be distinguished, which was 5-10 μm in height, with stacks of biofilm coming up from the surface.

Biofilm samples obtained from groundwater supplies were compared with biofilms from a potable water distribution system. In this case, biofilms presented a low cell densities and had not reached to form complex structures like we observed from groundwater supplies.

Control of biofilm formation can include alternative treatments to disinfection. In this sense, use of catalytic conditioners presented a significantly positive effect reducing biofilm formation, without adding any chemical to water. This positive effect of catalytic conditioners has been observed in the majority of microbial groups studied, reducing bacterial counts, *Pseudomonas* and coliform presence.

Finally, we develop the schematic methodology to establish the Public Health risks in groundwater reclamation for irrigation of urban parks. We adapted the general Risk Assessment methodology in order to assess the biofilm effect to increase bacterial aggregates in liquid phase. In this sense, the potential of biofilm formation could be used as a basic parameter to assess the Public Health risks.