

**Caracterització de la diversitat de poblacions
microbianes associades als tractaments de la planta de
regeneració d'aigües de Castell-Platja d'Aro**

Informe final



Departament de Microbiologia

Dr. Anicet R. Blanch

Juliol 2009

Coautors de l'estudi: Anicet R. Blanch i Arnau Casanovas
Estudi realitzat segons s'estableix en el conveni entre el Consorci de la Costa Brava, la Universitat de Barcelona y la Fundació Bosch i Gimpera. Projecte n. 304838

Contingut

1. Resum	5
2. Antecedents.....	6
3. Objectius.....	7
4. Pla de treball i procediments realitzats.	8
4.1. 1. Presa de mostres, mesocosmos en les llacunes i enumeració de poblacions microbianes	8
4.2. 2. Anàlisi de l'estructura i composició de les poblacions de coliforms fecals i d'enterococs	10
4.2. 3. Identificació de les soques de coliforms fecals i d'enterococs.....	11
4.2. 4. Càlcul de la inactivació i anàlisi dels valors de persistència.....	11
5. Resultats i discussió.	12
5.1. Anàlisi de la diversitat fenotípica mitjançant el sistema Phene Plate	12
5.2. Persistència de les poblacions microbianes en l'aigua residual en el mesocosmos <i>in situ</i> en la llacuna del Club de Golf d'Aro.....	22
6. Conclusions.	27
7. Annex 1. Enumeracions de les poblacions microbianes estudiades durant els diferents assaigs de persistència en el mesocosmos realitzat <i>in situ</i> en la llacuna.	28
8. Annex 2. Referències.	31

1. Resum

S'ha valorat si la detecció i/o increment dels indicadors microbians de contaminació fecal en les llacunes del Club de Golf d'Aro és deguda a un creixement de poblacions d'aquests indicadors que procedeixen de l'estació depuradora d'aigües residuals (EDAR) de Castell-Platja d'Aro, que és qui subministra les aigües regenerades emprades per al reg, o bé tenen un altre origen (humà o animal) relacionat amb les activitats desenvolupades en el club de golf, o són degudes a la dinàmica natural de funcionament d'unes llacunes. També s'ha estimat la persistència de diferents indicadors de qualitat microbiana mitjançant assaigs en un mesocosmos aplicat "*in situ*" en una llacuna del Club de Golf i utilitzant aigua residual de l'EDAR. Aquests assaigs han permès estimar el temps d'inactivació d'aquests indicadors i, per tant, de disposar de dades per a fer una aproximació de quant de temps hauria de passar perquè la majoria de poblacions microbianes d'origen fecal s'inactivessin si es produís una entrada d'aigües insuficientment desinfectades de l'estació de regeneració d'aigües (ERA) en les llacunes del Club de Golf.

S'ha caracteritzat i comparat la diversitat de les poblacions microbianes de coliforms fecals i enterococs associades als tractaments de l'EDAR-ERA i aquelles de les dues llacunes del Club de Golf d'Aro, per tal d'esbrinar el possible origen de la contaminació fecal que apareix en les llacunes. Les estructures i composicions d'ambdues poblacions bacterianes de les aigües residuals depurades (tractament secundari) de l'EDAR són diferents de les de les aigües de les dues llacunes. Per tant, cal associar l'increment observat de les concentracions de coliforms fecals i enterococs en les llacunes, sobretot durant els mesos d'estiu, a aportacions fecals pròpies de les activitats que es desenvolupin al voltant de les llacunes i no com a aportacions de les poblacions bacterianes de les aigües de l'EDAR.

La persistència dels diferents indicadors microbians de contaminació fecal en el mesocosmos assajat en les llacunes ens permet estimar que el temps necessari que caldria esperar per a la seva inactivació, en el cas que es donés una entrada d'aigua regenerada defectuosa (aigua de sortida del tractament secundari de la EDAR). S'ha valorat que durant l'hivern es donaria una disminució d'entre 1,0 i 1,5 unitats logarítmiques per cada 7 dies de temps de residència per a les poblacions bacterianes i de més de 10 dies pels bacteriòfags estudiats. En canvi, a l'estiu la disminució seria d'entre 1,0 i 1,5 unitats logarítmiques per cada 3 dies de temps de residència per a les poblacions bacterianes i de més de 5 dies pels bacteriòfags estudiats.

2. Antecedents

La composició i l'estructura de les poblacions bacterianes de coliforms fecals i enterococs en aigües residuals poden variar significativament depenent de l'origen fecal de les aigües i dels tractaments que reben. S'han observat diferències en la diversitat i en els clons poblacionals d'enterococs i coliforms fecals quan s'han avaluat aquestes poblacions en aigües residuals humanes (urbanes i d'hospitals) i en aigües residuals animals (escorxadors i granges). L'enumeració dels bacteriòfags de *Bacteroides* spp. utilitzant soques hoste associades específicament a un origen fecal humà o animal també han permès recentment determinar l'origen d'una contaminació com a contribucions fecals humanes o animals, mitjançant la seva proporció relativa respecte la concentració de bacteriòfags somàtics.

El Reial Decret 1620/2007 sobre la reutilització d'aigües indica en el seu article 5 (criteris de qualitat, annex I: característiques de qualitat exigides) que el responsable fins al punt de lliurament de l'aigua regenerada és el titular de la concessió que la proveeix. Ara bé, a partir del punt de lliurament el responsable del "no deteriorament" de la qualitat de l'aigua regenerada en la zona o instal·lacions d'ús, és l'usuari de l'aigua regenerada.

L'aigua regenerada obtinguda en l'estació de regeneració d'aigua (ERA) de Castell Platja d'Aro es subministrada al Club de Golf d'Aro per a alimentar les llacunes del golf que també fan de reservori d'aigua per al reg per aspersió dels camps. La qualitat de l'aigua regenerada subministrada es controlada durant tot l'any pel personal de l'EDAR-ERA de Castell Platja d'Aro i s'ha observat la presència d'una lleugera càrrega fecal en l'aigua regenerada una vegada lliurada a les llacunes del Golf. Es planteja si la detecció i/o increment dels indicadors microbians tradicionals de contaminació fecal és deguda a un recreixement de poblacions d'aquests indicadors que procedeixen de l'EDAR, o bé tenen un altre origen (humà o animal) relacionat amb les activitats desenvolupades en el club de golf o bé en la dinàmica natural de funcionament d'unes llacunes.

Es considera oportú caracteritzar i comparar la diversitat de les poblacions microbianes de coliforms fecals i enterococs associades als tractaments de la EDAR-ERA i aquelles de les dues llacunes del Club de Golf d'Aro per tal d'esbrinar el possible origen de la contaminació fecal que hi apareix. També es valorarà la persistència de diferents indicadors microbians de contaminació fecal en les llacunes, per tal de estimar el temps necessari que caldria esperar per a la seva inactivació, en el cas que es donés una entrada d'aigua regenerada defectuosa (aigua de sortida del tractament secundari de la EDAR).

3. Objectius

Objectiu general

Determinar l'origen de la càrrega fecal existent en les llacunes del Club de Golf d'Aro, avaluant si procedeixen de les aigües regenerades de la planta de Castell-Platja.

Objectius específics

1. Caracteritzar la composició de la microbiota bacteriana (enterococs i coliforms fecals) i analitzar la seva diversitat en tres punts del procés d'utilització de l'aigua regenerada: efluent secundari de la planta de tractament i aigua de les dues llacunes del golf.
2. Avaluar la persistència que presentarien les poblacions de coliforms fecals i enterococs de les aigües de sortida del secundari de la planta de tractament en cas que es produís una errada en el tractament de regeneració i arribessin a les llacunes del golf unes concentracions de microorganismes indicadors de contaminació fecal per sobre dels límits normatius.

4. Pla de treball i procediments realitzats

4.1. 1. Presa de mostres, mesocosmos en les llacunes i enumeració de poblacions microbianes

S'han realitzat un total de 6 campanyes de mostreig (3 al juliol de 2008 i 3 al gener-febrer de 2009) per a l'estudi de la diversitat de les poblacions de coliforms fecals i enterococs (2 al juliol de 2008, i 1 a l'agost del 2008), i 7 assaigs independents per a valorar la persistència dels microorganismes de l'efluent secundari en cas de què arribessin a les llacunes. El primer assaig de persistència fou de caràcter preliminar per a determinar les condicions adients de mostreig (juliol de 2007). Posteriorment es realitzaren els 6 assaigs independents distribuïts de la següent manera: 2 assaigs els mesos de gener i febrer de 2008, 2 assaigs durant el juliol de 2008 i 2 assaigs més d'hivern durant els mesos de gener i febrer de 2009.

Per a l'estudi de la diversitat es varen establir tres punts de presa de mostres tant per les mostres d'estiu com per les d'hivern: l'efluent secundari (SEC) i un punt de mostreig en cadascuna de les llacunes del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2). Les mostres van ser recollides i emmagatzemades a 4°C seguint els protocols estàndard (Anonymous, 1994). Es van realitzar dilucions decimals de les mostres amb PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4). Els coliforms fecals i els enterococs van ser enumerats per la tècnica de filtració de membrana mitjançant medis selectius. El medi m-FC es va utilitzar per a les enumeracions de coliforms fecals incubant-ho a 44°C durant 24 h (Anonymous 2000), i l'agar m-*Enterococcus* Agar (MEA) per a l'enumeració de enterococs incubant-ho a 37°C durant 48h. Les membranes incubades per a l'enumeració de enterococs van ser transferides al medi "Bilis Esculine Agar" (BEA) durant 1h a 37°C per a la confirmació de les colònies crescudes en el medi MEA (Anonymous 1998).

Els assaigs de persistència (inactivació) de les poblacions microbianes en les aigües residuals en el cas d'una entrada en les llacunes d'aigua insuficientment desinfectada es varen realitzar mitjançant un estudi "in situ" (mesocosmos). Aquest mesocosmos es va generar utilitzant aigua residual crua de l'entrada de l'EDAR que es va diluir 1:50 amb l'aigua de les llacunes. Aquesta dilució es distribuïa en diferents unitats (bosses) preparades amb tubs de diàlisi (Medicell Dialysis Tubing Visking, London, Regne Unit) per cada dia de mostreig i per cadascun dels assaigs, de manera que cada dia de mostreig s'agafaven les unitats de bosses de diàlisi necessàries per a poder fer el seguiment quantitatiu de les poblacions microbianes estudiades. Les membranes de diàlisi són tubs elàstics fets de

cel·lulosa formant una malla semipermeable amb un porus d'entre 12 i 14 KDa. Per tant, permeten que els soluts i l'aigua difonguin a través de la membrana sempre a favor d'un gradient de concentració, de manera que la concentració de sals de dins les bosses serà la mateixa que la de les llacunes, però no hi entraran ni sortiran cèl·lules microbianes.

Figura 1. Material utilitzat per a la preparació i la col·locació dels assaigs "in situ" en les llacunes (mesocosmos).



Foto: Carles Borrego. UdG



Foto: Carles Borrego. UdG

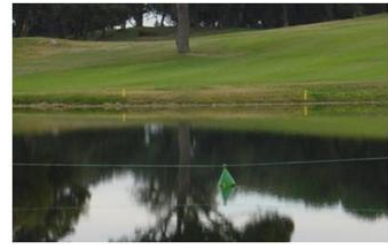
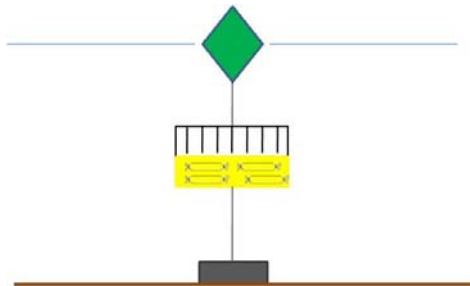


Foto: Anicet Blanch. UB

Les bosses de diàlisi plenes de la dilució d'aigua residual, es varen dipositar en una gàbia per tal d'evitar agressions de partícules grolleres que poguessin malmetre les membranes. La gàbia es va submergir en una de les llacunes del Club de Golf d'Aro a una fondària d'uns 20 cm, tal i com es pot veure en les figures 1 i 2. La llacuna triada va ser l'anomenada GdA2, per l'absència de clor residual que presenten les seves aigües, en comparació amb les de la llacuna GdA1, on la influència de l'aigua regenerada que hi arriba directament de l'ERA és notable en algunes èpoques de l'any.

Figura 2. Disposició de les bosses de diàlisi en la gàbia i en la llacuna



Durant un període màxim de dues setmanes es va recollir periòdicament una bossa de diàlisi per a mesurar la concentració de les diferents poblacions microbianes. En tots els assaigs s'han analitzat coliforms fecals (CF), bifidobactèries totals (TBIF), bifidobactèries fermentadores de sorbitol (SFB), bacteriòfags somàtics (SOM) i bacteriòfags de *Bacteroides* de soques hoste-específiques d'humans (BACT). A més, en les mostres de l'hivern de 2009 es varen valorar també les concentracions d'*E. coli* i d'enterococs fecals. L'enumeració d'aquestes poblacions microbianes es va realitzar tal i com està descrit en treballs anteriors del grup de recerca (Blanch et al. 2006).

4.2. 2. Anàlisi de l'estructura i composició de les poblacions de coliforms fecals i d'enterococs

A partir de les plaques de m-*Enterococcus* i m-FC agars utilitzades per a l'enumeració dels enterococs i coliforms fecals respectivament s'han obtingut les soques d'aquests grups bacterians per a procedir a l'estudi de la seva biodiversitat. S'han valorat 75 soques en total per a cadascun dels dos grups microbians estudiats (enterococs i coliforms fecals) i per a les 3 mostres independents de l'estiu de cada punt de mostreig (25 soques per mostra independent). El nombre total de soques caracteritzades durant els mostrejos d'hivern ha estat de 90 pels coliforms fecals (45 de SEC, 9 de GDA1 i 36 de GDA2) i de 83 pels enterococs (32 de SEC, 11 de GDA1 i 40 de GDA2). El nombre menor de soques en les mostres de l'hivern està relacionat amb la menor concentració trobada per a totes dues poblacions en qualsevol dels punts de mostreig. Totes aquestes soques s'han seleccionat a l'atzar entre les colònies crescudes en cadascuna de les plaques de cultiu de les mostres processades, per tal de que la seva representativitat fos significativa, tal i com han establert prèviament altres autors (Bianchi and Bianchi, 1982).

S'han preparat cultius purs per a cadascuna d'aquestes soques aïllades, i cultius frescos a partir d'aquests, per a procedir a l'estudi del fenotipatge bioquímic. La caracterització fenotípica de les soques aïllades s'ha realitzat mitjançant el sistema miniaturitzat Phene Plate System utilitzant les microplaques Ph-P-RF i Ph-P-RE (PhP-Plate System, Bactus AB, Estocolm, Suècia) per a l'anàlisi de les poblacions de coliforms fecals i enterococs respectivament. El procediment i els fonaments d'aquest fenotipatge bioquímic s'ha descrit detalladament en estudis anteriors (Kühn, 1985; Kühn et al., 1997). S'han mesurat els valors numèrics d'absorcions de les cinètiques de creixement i s'han determinat els índexs de correlació, de diversitat i de similitud poblacional. L'índex de diversitat de Simpson (Di) i l'índex de la similitud poblacional (Sp) han estat calculats tal i com s'ha descrit en estudis anteriors (Kühn et al., 1991) mitjançant el programa informàtic PhpWin® (PhP-Plate System, Bactus AB, Estocolm, Suècia). Els índexs de diversitat s'han calculat utilitzant els coeficients de correlació per a les proves analitzades, prenent en consideració les soques aïllades de coliforms fecals i d'enterococs en cada punt mostrejat. La comparació de l'estructura i la composició d'aquestes poblacions bacterianes entre els diferents llocs del mostreig s'ha realitzat mitjançant el mètode UPGM (unweighted-pair groups method). S'han identificat els diferents grups fenotípics en cadascuna de les mostres i per a cada població bacteriana. Els grups fenotípics han estat constituïts per aquelles soques que presenten uns coeficients de correlació respecte els perfils bioquímics de PhP-Plate més grans de 0,975.

4.2. 3. Identificació de les soques de coliforms fecals i d'enterococs

La identificació de totes les soques bacterianes aïllades s'ha realitzat mitjançant la selecció d'una soca representant de cada grup fenotípic obtingut amb els perfils bioquímics PhP-Plate. Aquestes soques representants han estat seleccionades perquè presenten la menor similitud amb la resta de soques incloses en els altres grups fenotípics, i la major similitud amb totes les soques del propi grup fenotípic (Vilanova et al., 2004). Posteriorment, les soques representants pels diferents grups fenotípics s'han identificat comparant els seus perfils bioquímics amb aquells obtinguts en anteriors treballs amb soques taxonòmicament identificades i incloses en col·leccions de referència pels perfils bioquímics de PhP-Plate, tant pels coliforms fecals (Vilanova et al., 2004) com pels enterococs (Blanch et al., 2003). S'ha acceptat la identificació de les soques representants d'aquest estudi si existeix un coeficient de correlació superior a 0,95 dels perfils bioquímics de PhP-Plate amb aquells de les soques de les col·leccions de referència. Finalment, s'han calculat els percentatges per gèneres o espècies de les soques classificades dels dos grups bacterians estudiats.

4.2. 4. Càlcul de la inactivació i anàlisi dels valors de persistència

La inactivació de les poblacions microbianes s'ha valorat mitjançant el càlcul de la constant d'inactivació K_s i la T_{90} . La K_s indica la taxa de disminució de la població al llarg del temps. La T_{90} indica el temps necessari perquè es produeixi la inactivació del 90% de la població inicial, o dit d'una altra manera, que hi hagi una disminució d'una unitat logarítmica de la població.

Per a valorar la dinàmica d'inactivació de les poblacions microbianes estudiades s'ha analitzat la seva supervivència en el temps mitjançant l'enumeració en els diferents medis. Una vegada obtinguts els recomptes s'han efectuat models lineals de cadascuna de les poblacions microbianes estudiades. S'ha fet el seguiment de la disminució de la població fins que hi ha hagut una caiguda d'uns 2 logaritmes o com a mínim fins a unes 96 h. Aquests criteris s'han seguit sobretot a l'estiu, ja que a causade l'elevada temperatura de l'aigua, les membranes comencen a danyar-se a partir de les 72-96 h, la qual cosa podria afectar la seva permeabilitat i per tant interferir en els resultats de l'experiment.

Tot i que la dinàmica d'inactivació de les poblacions no ha de seguir necessàriament un model lineal, s'ha triat aquest model per poder simplificar i unificar la inactivació de les diferents poblacions. Si s'utilitza el mateix model es poden comparar les diferents taxes d'inactivació entre les diferents poblacions estudiades i les metodologies analitzades. Els models lineals s'han calculat mitjançant la valoració de la reducció logarítmica de les

poblacions respecte el temps de l'inici de l'experiment. A partir de la relació s'ha obtingut una recta de regressió amb un valor inicial igual a zero, ja que la inactivació és nul·la a l'inici de l'experiment.

5. Resultats i discussió

Els resultats i la seva discussió es presenten en dos apartats que recullen la informació i les dades obtingudes en cadascun dels dos estudis realitzats: l'anàlisi de la diversitat bacteriana i la persistència de les poblacions, tant dels coliforms fecals com dels enterococs.

5.1. Anàlisi de la diversitat fenotípica mitjançant el sistema Phene Plate

Els resultats obtinguts per les enumeracions de les poblacions de coliforms fecals i dels enterococs es presenten en les taules 1 i 2 per a les mostres d'estiu, i en les taules 3 i 4 per a les mostres d'hivern. Com es pot observar, la major concentració es produeix en l'efluent secundari. Tal i com consta en els registres històrics de l'EDAR, hi ha una continuada i significativa disminució d'aquestes concentracions a la sortida del tractament terciari (dades disponibles només pels coliforms fecals fins el 2006 i *Escherichia coli* a partir del 2007). La detecció de concentracions superiors en les dues llacunes per a totes dues poblacions respecte a les concentracions que habitualment es registren en les aigües regenerades produïdes pel tractament terciari, ens indica una possible entrada de nou material fecal en les llacunes, o bé un possible procés de recreixement durant els mesos d'estiu. Aquesta darrera situació serà confirmada o descartada pel resultat de l'estudi de la diversitat de les dues poblacions bacterianes, en el qual es compararà la seva estructura i composició a partir de la caracterització fenotípica dels aïllaments realitzats.

Taula 1. Concentració dels **coliforms fecals** (CFU/100mL) en l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro i en l'aigua de les llacunes del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2). Els valors del terciari han estat aportats pel laboratori de l'EDAR. **Estiu 2008.** Nd: no dades

Data	Secundari	GDA1	GDA2	Terciari
11-jul-08	9,90E+05	1,00E+03	4,00E+02	1,00E+00
30-jul-08	9,25E+05	2,50E+02	7,75E+02	Nd
01-ago-08	7,00E+05	6,40E+02	7,30E+02	Nd

En les mostres d'hivern s'observa una menor concentració de les dues poblacions en les llacunes. També hi ha una disminució en la concentració d'ambdues poblacions d'indicadors en l'efluent secundari de l'EDAR, molt probablement associat a la càrrega d'entrada que es rep en la planta.

Taula 2. Concentració dels **enterococs** (CFU/100mL) en l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro i en l'aigua de les llacunes del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2). No hi ha dades disponibles per l'aigua sortint del tractament terciari. **Estiu 2008.**

Data	Secundari	GDA1	GDA2
10-jul-08	1,86E+04	1,35E+03	8,75E+02
30-jul-08	3,10E+04	1,00E+04	1,38E+02
01-ago-08	3,56E+04	4,75E+02	5,25E+01

Taula 3. Concentració dels **coliforms fecals** (CFU/100mL) en l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro i en l'aigua de les llacunes del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2). No hi ha dades disponibles per l'aigua sortint del tractament terciari. **Hivern 2009.**

Data	Secundari	GDA1	GDA2
14-gen-09	1,15E+04	<1	1,50E+00
16-gen-09	1,18E+04	<1	<1
22-gen-09	1,20E+04	<1	<1

Taula 4. Concentració dels **enterococs** (CFU/100mL) en l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro i en l'aigua de les llacunes del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2). No hi ha dades disponibles per l'aigua sortint del tractament terciari. **Hivern 2009.**

Data	Secundari	GDA1	GDA2
14-gen-09	1,15E+03	<1	2,00E+00
16-gen-09	1,10E+03	<1	<1
22-gen-09	1,19E+03	<1	<1

S'han caracteritzat fenotípicament un total de 315 soques (225 dels mostrejors de l'estiu del 2008 i 90 dels de l'hivern de 2009) de coliforms fecals aïllats en els creixements dels recomptes realitzats en les plaques mFC. Tots tres punts de mostreig presenten una elevada diversitat en les mostres de l'estiu (Taula 5) i en les mostres SEC i GDA1 de l'hivern (Taula 6) independentment de la concentració mesurada per a totes dues poblacions bacterianes. No obstant, s'observa una diversitat lleugerament més gran en les aigües procedents del tractament secundari durant l'estiu i una menor diversitat durant l'hivern per a

les aigües de la llacuna GDA2. Per tal de poder disposar d'un nombre mínimament significatiu de soques de coliforms fecals i fer-ne els corresponents aïllaments, durant les mostres d'hivern (baixa concentració en les llacunes, Taula 3), es varen filtrar volums superiors als 100 ml utilitzats en les enumeracions.

Taula 5. Índex de diversitat i de similitud poblacional (comparat dos a dos) en l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro (SEC) i en l'aigua de les llacunes del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2) durant l'**estiu de 2008 pels coliforms fecals**. Valors superiors a 0,2 són estadísticament significatius pel que fa a considerar semblants dues poblacions.

Població	Soques	Diversitat (Di)
SEC	75	0,963
GDA1	75	0,888
GDA2	75	0,884

Similitud (Sp)		
SEC	GDA2	0,215
SEC	GDA1	0,122
GDA2	GDA1	0,452

Taula 6. Índex de diversitat i de similitud poblacional (comparat dos a dos) en l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro (SEC) i en l'aigua de les llacunes del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2) durant l'**hivern de 2009 pels coliforms fecals**. Valors superiors a 0,2 són estadísticament significatius pel que fa a considerar semblants dues poblacions.

Població	Soques	Diversitat (Di)
SEC	45	0,989
GDA1	9	0,944
GDA2	36	0,53

Similitud (Sp)		
SEC	GDA2	0,000
SEC	GDA1	0,076
GDA2	GDA1	0,000

Els índexs de similitud ens indiquen (taula 5) que hi ha una estructura i una composició poblacional molt semblants entre les dues llacunes a l'estiu de 2008 ($Sp = 0,452$). Per altra banda, les poblacions de coliforms fecals presents en l'efluent secundari són diferents d'aquelles de la llacuna GDA1, però tenen una certa similitud amb les de la llacuna GDA2 ($Sp = 0,215$). Les anàlisis de les mostres d'hivern ens mostren que no existeix similitud

entre les poblacions de coliforms fecals de cap dels tres orígens. Aquestes relacions poden veure's en la Figura 3 i 4, on s'observa la distància diferencial de les poblacions de coliforms fecals de l'efluent secundari.

Figura 3. Dendrograma obtingut a partir de l'estudi de similitud poblacional de l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro i en l'aigua de les llacunes (1 i 2) del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2, respectivament) durant **l'estiu de 2008 pels coliforms fecals**. Valors superiors a 0,2 són estadísticament significatius pel que fa a considerar semblants dues poblacions (s'indica aquest llindar amb una línia vermella).

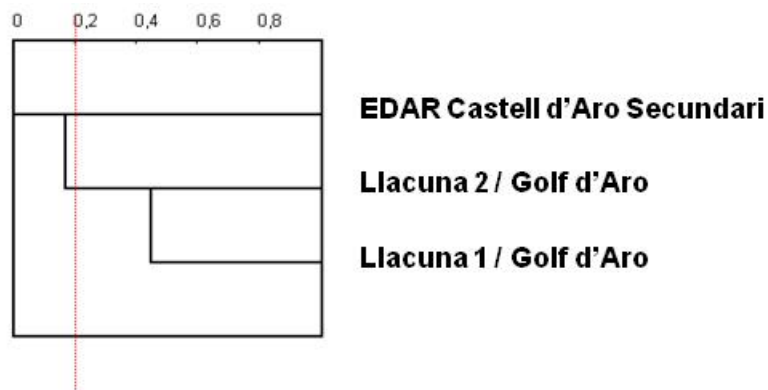
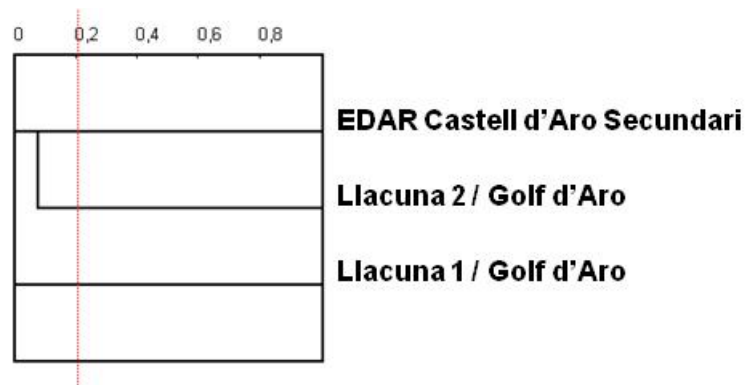


Figura 4. Dendrograma obtingut a partir de l'estudi de similitud poblacional de l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro i en l'aigua de les llacunes (1 i 2) del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2, respectivament) durant **l'hivern de 2009 pels coliforms fecals**. Valors superiors a 0,2 són estadísticament significatius pel que fa a considerar semblants dues poblacions (s'indica aquest llindar amb una línia vermella).



També s'han caracteritzat fenotípicament un total de 308 soques (225 dels mostrejors de l'estiu del 2008 i 83 dels de l'hivern de 2009) d'enterococs aïllats en els creixements dels recomptes realitzats en les plaques *m-Enterococcus* agar. Igualment com ha succeït en el cas de les baixes enumeracions pels coliforms fecals, també es varen filtrar volums superiors als 100 ml utilitzats en les enumeracions per tal de poder disposar d'un nombre mínimament significatiu de soques d'enterococs durant les mostres d'hivern (baixa

concentració en les llacunes, Taula 4),.

La diferenciació entre les poblacions dels tres orígens de mostres és molt més marcada quan es valoren els enterococs amb les mostres de l'estiu de 2008 i l'hivern de 2009 (Taulas 7 i 8). Hi ha una elevada diversitat per les mostres SEC i GDA2 i molt baixa en la llacuna GDA1. Aquesta baixa diversitat observada en la llacuna caldria associar-la a una aportació molt puntual d'un origen diferencial respecte les altres dos punts de mostreig (SEC i GDA2). La diversitat és elevada en totes tres punts de mostreig durant les mostres d'hivern independentment de la concentració de les poblacions bacterianes.

Taula 7. Índex de diversitat i de similitud poblacional (comparat dos a dos) en l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro (SEC) i en l'aigua de les llacunes del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2) durant **l'estiu de 2008 pels enterococs**. Valors superiors a 0,2 són estadísticament significatius pel que fa a considerar semblants dues poblacions.

Població	Soques	Diversitat (Di)
SEC	75	0,975
GDA1	75	0,406
GDA2	75	0,907

Similitud (Sp)		
SEC	GDA1	0,087
SEC	GDA2	0,208
GDA1	GDA2	0,204

Taula 8. Índex de diversitat i de similitud poblacional (comparat dos a dos) en l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro (SEC) i en l'aigua de les llacunes del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2) durant **l'hivern de 2009 pels enterococs**. Valors superiors a 0,2 són estadísticament significatius pel que fa a considerar semblants dues poblacions.

Població	Soques	Diversitat (Di)
SEC	32	0,944
GDA1	11	0,945
GDA2	40	0,827

Similitud (Sp)		
SEC	GDA2	0
SEC	GDA1	0
GDA2	GDA1	0,014

Els índexs de similitud poblacional (Sp) ens indiquen una similar estructura poblacional pels enterococs entre les mostres de les dues llacunes i entre l'efluent secundari

i les aigües de la llacuna GDA2. Les poblacions d'enterococs de la llacuna GDA1 tenen una composició i estructura completament diferent d'aquelles presents en l'efluent secundari. De nou, per tant, cal considerar una entrada de contaminació fecal d'origen diferent a les aigües residuals de l'EDAR en la llacuna GDA1. També a l'hivern s'observa que no hi ha cap similitud entre les poblacions d'enterococs entre els tres punts mostrejats. Aquestes relacions de similitud poden observar-se millor en els dendrogrames d'agrupament en les figures 5 i 6.

Figura 5. Dendrograma obtingut a partir de l'estudi de similitud poblacional de l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro i en l'aigua de les llacunes (1 i 2) del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2, respectivament) durant l'estiu de 2008 pels enterococs. Valors superiors a 0,2 són estadísticament significatius pel que fa a considerar semblants dues poblacions (s'indica aquest llindar amb una línia vermella).

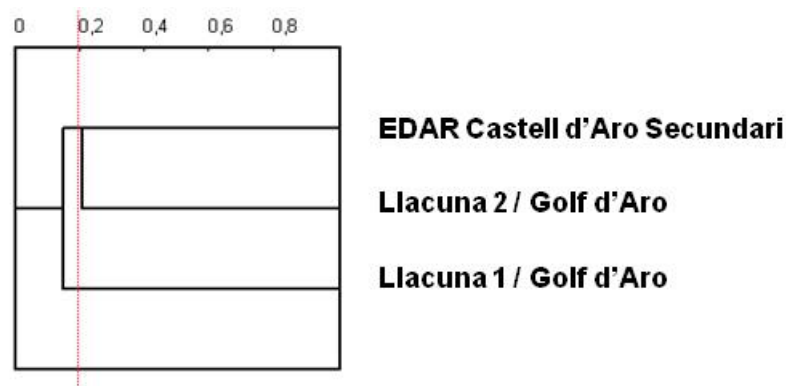
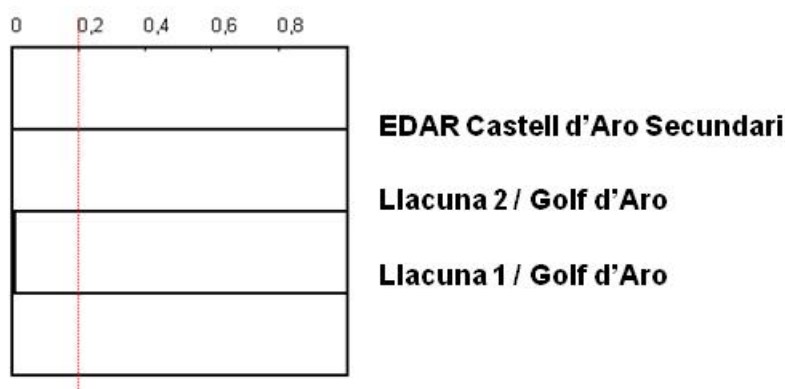


Figura 6. Dendrograma obtingut a partir de l'estudi de similitud poblacional de l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro i en l'aigua de les llacunes (1 i 2) del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2, respectivament) durant l'hivern de 2009 pels enterococs. Valors superiors a 0,2 són estadísticament significatius pel que fa a considerar semblants dues poblacions (s'indica aquest llindar amb una línia vermella).



Hem de tenir en compte que el grup "coliforms fecals" és en la seva pròpia definició molt divers, ja que inclou un nombre molt elevat de gèneres i espècies. Per altra banda,

quan valorem la diversitat dels enterococs ens situem taxonòmicament dintre d'un gènere i per tant la diversitat com a grup estudiat és menor en relació a la que ens podem trobar en el grup de coliforms fecals. Si dues aigües analitzades en la seva composició de poblacions d'enterococs es mostren diferents, aquesta distància resulta molt més sòlida que quan valorem la similitud de poblacions de coliforms fecals. Per tant, en la comparació de les poblacions de coliforms fecals, punts de mostreig diferents poden compartir algunes poblacions i això fa que podem trobar alguna similitud per a aquest grup bacterià, mentre que la comparació dels enterococs ens separa més marcadament dos punts de mostreig. Aquesta diferenciació ens facilita identificar diferents orígens de les aportacions fecals en una aigua.

L'estudi de diversitat de totes dues poblacions entre l'aigua residual i les aigües de les dues llacunes ens indica que l'origen de la càrrega fecal de l'aigua residual de l'EDAR és diferent de l'origen fecal de les aigües de totes dues llacunes. Ara bé, hi ha alguna població compartida tant d'enterococs com de coliforms fecals entre les aigües de la llacuna GDA2 i l'aigua residual. Aquest resultat no és sorprenent ja que diferents espècies animals poden compartir algunes de les poblacions d'aquests indicadors microbians en les seves femtes. Tot i que existeix aquesta possibilitat, l'estudi de similitud poblacional ens separa clarament l'aigua residual de les aigües de les llacunes.

Per tal de poder confirmar que la contaminació fecal de l'aigua residual de l'EDAR de Castell Platja d'Aro és diferent de la que tenen les aigües de les llacunes, s'han comparat totes dues poblacions dels tres punts de mostreig amb un conjunt de poblacions de coliforms fecals i enterococs associades a aigües residuals d'escorxadors (contaminació fecal d'origen animal) i d'altres associades a aigües residuals urbanes (altres EDARs de Catalunya, i per tant contaminació majoritàriament humana).

En les figures 7 i 8 (coliforms fecals i enterococs, respectivament) es pot observar que les aigües residuals de l'EDAR de Castell Platja d'Aro estan associades de manera significativa amb les aigües residuals humanes d'altres EDARs. En canvi, les aigües de les llacunes queden clarament separades de les totes les aigües residuals urbanes, i fins i tot en el cas dels coliforms fecals no s'associen amb aigües residuals d'origen porcí, boví o de pollastre. Si observem la similitud de les poblacions d'enterococs (Figura 8) veurem que les aigües de les llacunes estarien relacionades més significativament amb totes les altres aigües residuals que tenen un origen animal.

Per tant, la contaminació fecal present en les aigües de les llacunes cal relacionar-la probablement amb aportacions d'origen animal, i no tant amb les poblacions de coliforms fecals i d'enterococs que poguessin aportar les aigües regenerades.

Figura 7. Comparació de la similitud poblacional de les poblacions de **coliforms fecals** de l'efluent

secundari de l'EDAR de Castell d'Aro i de les aigües de les llacunes (1 i 2) del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2, respectivament) amb altres poblacions de coliforms fecals associades a **aigües residuals d'escorxadors** de diferents espècies animals o a **d'altres EDARS** d'aigües residuals urbanes de diferents indrets de Catalunya. Valors superiors a 0,2 són estadísticament significatius pel que fa a considerar semblants dues poblacions (s'indica aquest llindar amb una línia vermella). El nombre total de soques fenotipades en aquesta valoració comparativa fou 3.781, de les quals 225 corresponen al present estudi (aïllaments de l'estiu 2008).

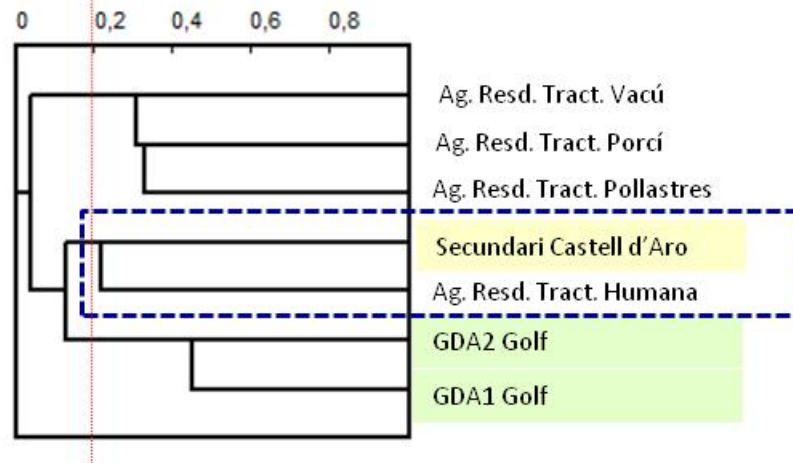
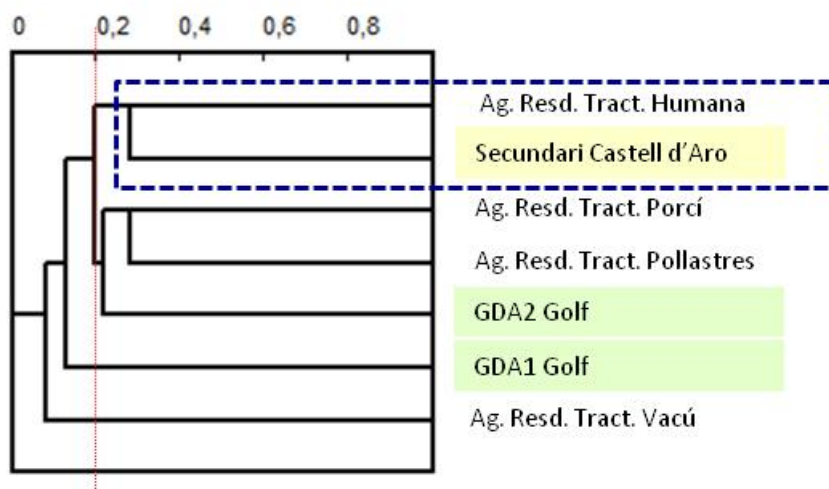


Figura 8. Comparació de la similitud poblacional de les poblacions d'**enterococs** de l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro i de les aigües de les llacunes (1 i 2) del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2, respectivament) amb altres poblacions d'enterococs associades a **aigües residuals d'escorxadors** de diferents espècies animals o a **d'altres EDARS** d'aigües residuals urbanes de diferents indrets de Catalunya. Valors superiors a 0,2 són estadísticament significatius pel que fa a considerar semblants dues poblacions (s'indica aquest llindar amb una línia vermella). El nombre total de soques fenotipades en aquesta valoració comparativa fou 3.483, de les quals 225 corresponen al present estudi (aïllaments de l'estiu 2008).



Aquesta diferència d'origen en l'aportació de la càrrega fecal també queda reflectida en part quan analitzem el percentatge de les diferents espècies o gèneres en cadascuna de les soques aïllades dels dos grups microbians valorats. Tot i que una classificació taxonòmica no resulta tan robusta per a diferenciar l'estructura i composició poblacional dels

dos grups microbians (i especialment pel cas dels coliforms fecals, tal i com hem comentat abans), a més de la limitació de no poder classificar tots els aïllaments amb el mètode comparatiu de perfils bioquímics de les microplaques de Phene Plate System, sí que es poden observar diferències entre l'aigua residual de l'EDAR i les aigües de les llacunes (Taula 9 i 10).

Taula 9. Distribució percentual de les **espècies de coliforms fecals** identificades entre les soques aïllades i utilitzades en l'estudi de la diversitat, tant en l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro (SEC) com en l'aigua de les llacunes del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2) durant **l'estiu de 2008 (A) i l'hivern de 2009 (B)**.

A)

	SEC	GDA1	GDA2
<i>E.coli</i>	40,0%	8,0%	17,3%
<i>Citrobacter</i>	30,7%	30,7%	17,3%
<i>Klebsiella</i>	1,3%	2,7%	1,3%
<i>Enterobacter</i>	0,0%	0,0%	1,3%
No identificats	28,0%	58,7%	62,7%

B)

	SEC	GDA1	GDA2
<i>E.coli</i>	60,0%	11,1%	100,0%
<i>Citrobacter</i>	17,8%	44,4%	0,0%
<i>Klebsiella</i>	8,9%	0,0%	0,0%
<i>Enterobacter</i>	0,0%	0,0%	0,0%
No identificats	13,3%	44,4%	0,0%

En les aigües residuals de l'EDAR (Taula 9A i 9B), les soques de coliforms fecals més freqüentment aïllades pertanyen als perfils bioquímics corresponents a *E. coli*, seguits per *Citrobacter* spp. . En les aigües de les llacunes s'observa que el percentatge més freqüent és per a *Citrobacter* spp. en la llacuna GDA1 (estiu i hivern), i per a *E. coli* i *Citrobacter* spp. amb un mateix percentatge en la llacuna GDA2 (estiu, Figura 9A). Aquest darrer resultat està en concordança en la més propera relació que tindria l'aigua residual amb l'aigua de GDA2 indicat anteriorment pels estudis de similitud poblacional (Taula 5 i Figura 3). També s'observa un percentatge major de soques no identificades en les aigües de les llacunes. Aquesta menor identificació pel mètode utilitzat cal relacionar-la amb el fet que la base de dades de classificació per Phene Plate System està principalment constituïda per perfils bioquímics de soques de coliforms fecals d'origen humà. Per tant, aquesta

observació de la menor proporció d'identificacions en les llacunes també ens recolzaria que les aportacions fecals en elles són d'origen no-humà.

Les espècies d'enterococs més abundants de totes les mostres estudiades foren *Ent faecalis*, *Ent. faecium* i *Ent. hirae*. Ara bé, de nou s'observa que la distribució de percentatges de les espècies d'enterococs resulta diferent entre les aigües residuals de l'EDAR i les de les aigües de les llacunes. *Ent faecalis* i *Ent. faecium* són les espècies més abundants en l'aigua residual seguit de *Ent. hirae*, mentre que en les aigües de les llacunes domina *Ent. faecalis* molt marcadament en la llacuna GDA1 a l'estiu i *Ent. faecium* a l'hivern. De nou aquí també s'observa que hi ha una major similitud entre GDA2 i l'aigua residual que respecte GDA1 i l'aigua residual sobretot a l'estiu. El nombre de soques no identificades pel mètode comparatiu de perfils bioquímics de Phene Plate System és menor en el cas dels enterococs que pels coliforms fecals sobre tot en les aigües de les llacunes. Això és degut a que la biblioteca de perfils de referència fou desenvolupada amb soques d'enterococs aïllades tant d'origen humà com animal, i per tant facilitaria disposar d'un fons de referència més representatiu dels possibles orígens fecals de les soques.

Taula 10. Distribució percentual de les **espècies d'enterococs** identificades entre les soques aïllades i utilitzades en l'estudi de la diversitat, tant en l'efluent secundari de l'EDAR de Castell d'Aro (SEC) com en les aigües de les llacunes del Club de Golf d'Aro (GDA1 i GDA2) durant l'estiu de 2008 (A) i l'hivern de 2009 (B).

A)

	SEC	GDA1	GDA2
<i>E. faecalis</i>	30,7%	81,3%	36,0%
<i>E. faecium</i>	32,0%	6,7%	25,3%
<i>E. hirae</i>	12,0%	4,0%	12,0%
<i>E. casseliflavus</i>	5,3%	0,0%	4,0%
<i>E. gallinarum</i>	0,0%	0,0%	2,7%
<i>E. pseudoavium</i>	1,3%	1,3%	0,0%
<i>E. mundtii</i>	2,7%	2,7%	6,7%
<i>E. flavescens</i>	1,3%	0,0%	8,0%
No identificats	14,7%	4,0%	5,3%

B)

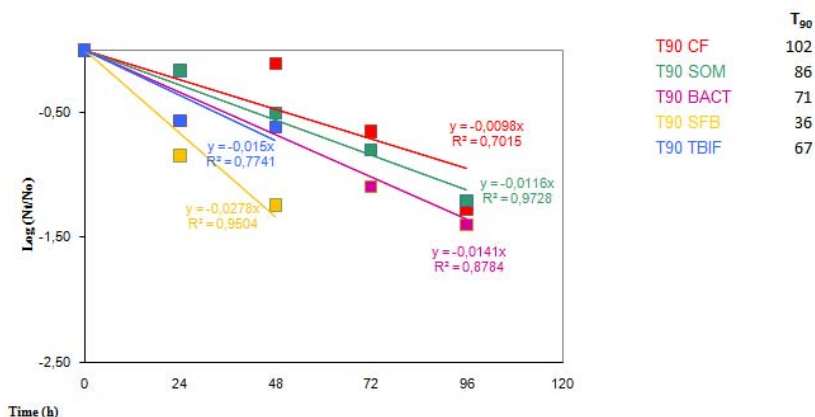
	SEC	GDA1	GDA2
<i>E. faecalis</i>	64,0%	0,0%	96,0%
<i>E. faecium</i>	12,0%	24,0%	28,0%
<i>E. hirae</i>	20,0%	12,0%	0,0%
<i>E. casseliflavus</i>	4,0%	0,0%	20,0%
<i>E. gallinarum</i>	0,0%	0,0%	0,0%
<i>E. pseudoavium</i>	0,0%	0,0%	0,0%
<i>E. mundii</i>	0,0%	0,0%	0,0%
<i>E. flaves</i>	0,0%	0,0%	0,0%
No identificats	28,0%	8,0%	16,0%

5.2. Persistència de les poblacions microbianes en l'aigua residual en el mesocosmos *in situ* en la llacuna del Club de Golf d'Aro

La metodologia utilitzada per tal de valorar la persistència de les poblacions microbianes de l'aigua residual *in situ* en les llacunes va resultar factible, útil i pràctica en la seva execució. El primer assaig (estiu 2007) va realitzar-se per duplicat, de manera que en un d'ells es feia la dilució en l'aigua de la pròpia llacuna, i en l'altre amb aigua de sortida del tractament terciari (aigua regenerada). Aquesta darrera aproximació experimental (dilució amb aigua del terciari) va ser descartada perquè distava de l'escenari que ens trobaríem en el cas suposat d'una entrada d'una aigua insuficientment desinfectada en les llacunes, i perquè es va detectar clor residuals en la dilució feta amb l'aigua regenerada. Aquests valors podien ser suficients per a modificar (inactivar) més ràpidament les poblacions microbianes. Per tant, l'aproximació experimental definitiva fou la dilució 1:50 de l'aigua residual crua en l'aigua de la llacuna GdA2. Per aquest motiu només es presenta aquest duplicat de l'estiu de 2007 (Figura 9).

La resta d'anàlisis de la persistència es feren seguint el protocol establert, amb l'única diferència que un duplicat es feia diluint amb l'aigua de fons de les llacunes (pou d'emmagatzament) i l'altre duplicat amb aigua de superfície de la llacuna. Les poblacions microbianes estudiades en tots els assaigs foren les següents: coliforms fecals, colifags somàtics, bacteriòfags que infecten la soca GA17 de *Bacteroides thetaiotaomicron* (hoste específic d'origen humà), bifidobactèries fermentadores de sorbitol (associades majoritàriament a contaminació fecal d'origen humà) i bifidobactèries totals. A més, en els assaigs de l'hivern de 2009 (Figura 12) també es va estudiar la persistència d'*Escherichia coli* i dels enterococs.

Figura 9. Rectes de persistència (Ks) de les poblacions microbianes en les aigües residuals de l'EDAR de Castell d'Aro en els estudis de mesocosmos (*in situ*) realitzats durant l'estiu de 2007 en la llacuna del Club de Golf d'Aro. CF: coliforms fecals. SOM: colifags somàtics. BACT: bacteriòfags que infecten la soca GA17 de *Bacteroides thetaiotaomicron* (hoste específic d'origen humà). SFB: bifidobactèries fermentadores de sorbitol. TBIF: bifidobactèries totals. S'indica la T₉₀ per a cada grup microbià.



S'indica la T₉₀ per a cada grup microbià. En tots els assaigs es calcularen les rectes de persistència (Ks) per les diferents poblacions microbianes i a partir d'aquestes la T₉₀ tal i com es pot observar en les figures 9 a la 12. En l'annex 1 s'hi troben els valors de les enumeracions de les diferents poblacions microbianes en cada un dels assaigs utilitzats posteriorment pel càlcul de les rectes de persistència.

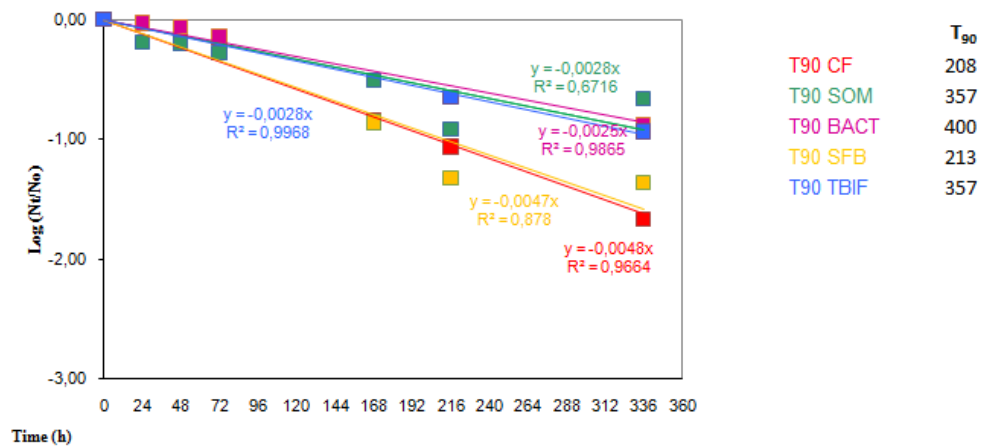
S'observa una major persistència de totes les poblacions en els assaigs d'hivern que en els d'estiu. Tal i com ja s'ha descrit en diferents treballs previs del grup de recerca i també per altres autors, les menors temperatura i irradiació solar d'aquesta època, conjuntament amb una menor activitat dels depredadors, fan que moltes de les poblacions dels indicadors microbians persisteixin millor durant l'hivern.

Les dues poblacions de bacteriòfags són les que persisteixen millor, seguides per les poblacions d'enterococs, coliforms fecals i *E. coli*, i finalment les poblacions de bifidobacteris. Aquesta proporció es compleix tant a l'hivern com a l'estiu i està d'acord amb estudis anteriors realitzats pel grup de recerca. Cal afegir que les enumeracions de les poblacions de coliforms fecals poden veure's modificades en la seva cinètica, sobretot a l'estiu, ja que el medi m-FC agar utilitzat per a la seva enumeració no té una selectivitat suficient i permet el creixement d'altres poblacions no fecals que hi poden ser presents. Aquesta circumstància distorsiona la quantificació d'aquest paràmetre i podria explicar les

variacions en alguns dels assaigs. Similarment, cal indicar que també és conegut que la concentració d'oxigen en l'aigua (major a baixes temperatures) pot facilitar la inactivació de les poblacions anaeròbiques com és el cas de les bifidobactèries i, per tant, ens pot modificar aquest paràmetre en alguns dels assaigs.

Figura 10. Rectes de persistència (Ks) de les poblacions microbianes en les aigües residuals de l'EDAR de Castell d'Aro en els estudis de mesocosmos (in situ) realitzats durant l'hivern de 2008 en la llacuna del Club de Golf d'Aro. A) dilució realitzada amb aigua del pou de captació que alimenta les llacunes. B) dilució realitzada amb aigua de superfície de la llacuna GDA2. CF: coliforms fecals. SOM: colifags somàtics. BACT: bacteriòfags que infecten la soca GA17 de *Bacteroides thetaiotaomicron* (hoste específic d'origen humà). SFB: bifidobactèries fermentadores de sorbitol. TBIF: bifidobactèries totals. S'indica la T_{90} per a cada grup microbià.

A)



B)

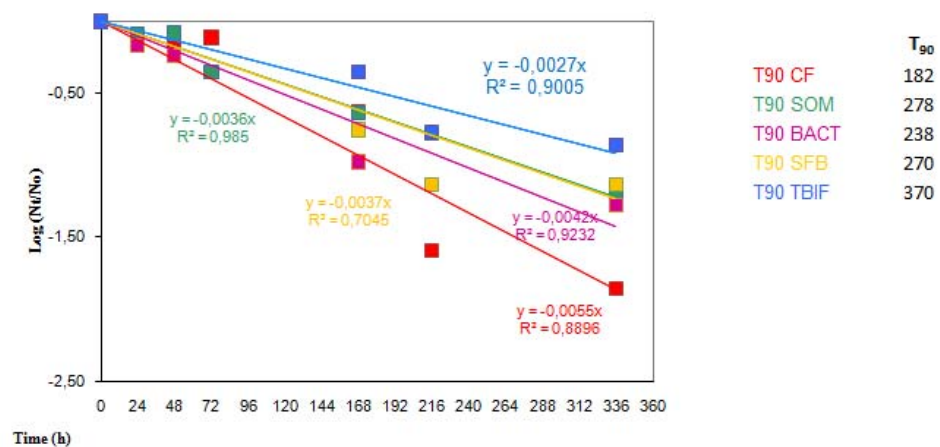
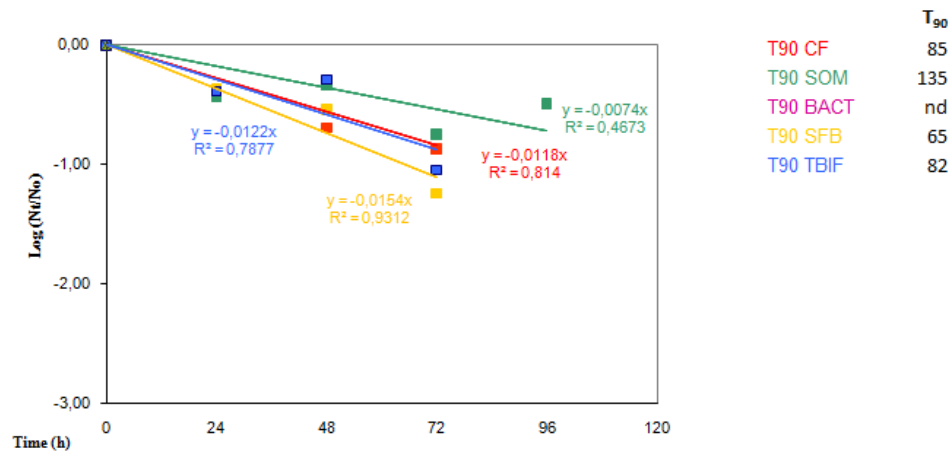


Figura 11. Rectes de persistència (Ks) de les poblacions microbianes en les aigües residuals de l'EDAR de Castell d'Aro en els estudis de mesocosmos (in situ) realitzats durant l'estiu de 2008 en la llacuna del Club de Golf d'Aro. A) dilució realitzada amb aigua del pou de captació que alimenta les llacunes. B) dilució realitzada amb aigua de superfície de la llacuna GDA2. CF: coliforms fecals. SOM: colífags somàtics. BACT: bacteriòfags que infecten la soca GA17 de *Bacteroides thetaiotaomicron* (hoste específic d'origen humà). SFB: bifidobactèries fermentadores de sorbitol. TBIF: bifidobactèries totals. S'indica la T_{90} per a cada grup microbià.

A)



B)

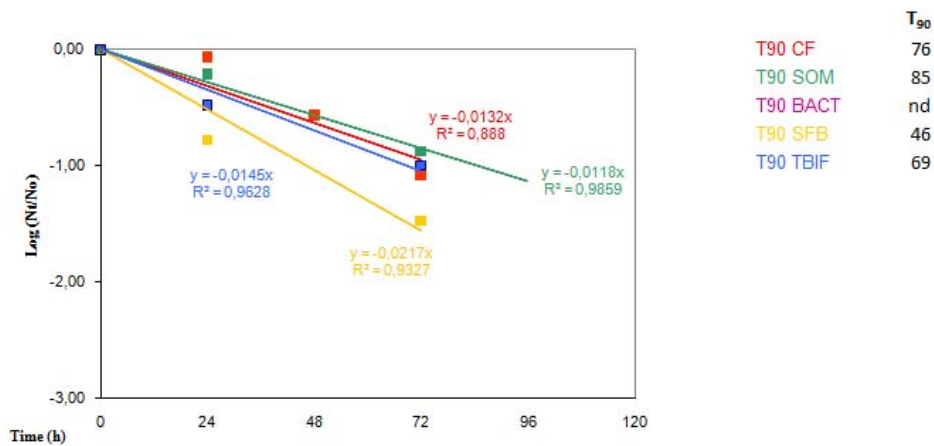
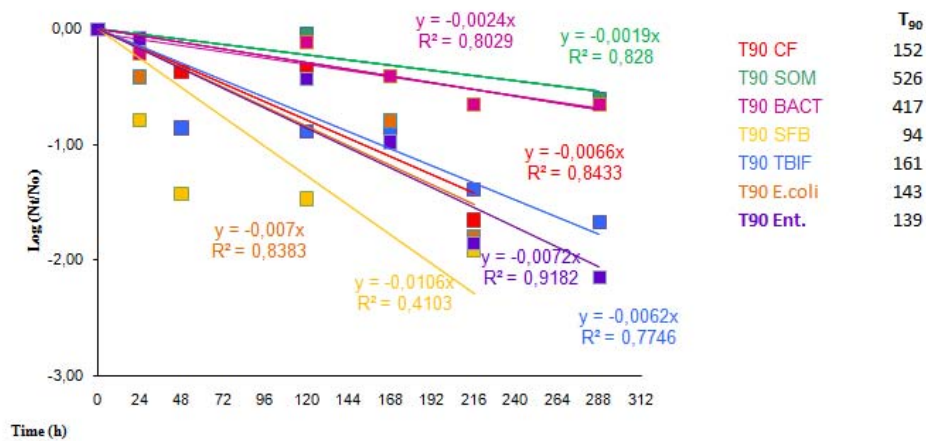
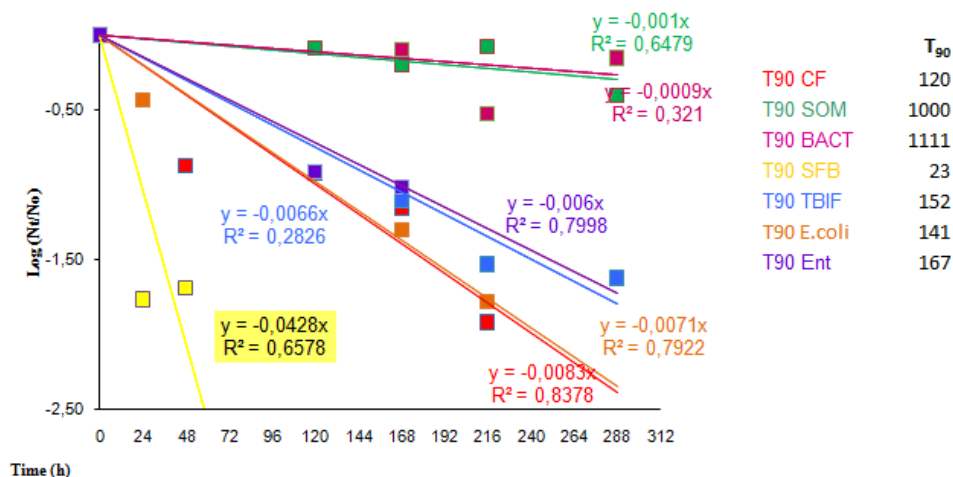


Figura 12. Rectes de persistència (Ks) de les poblacions microbianes en les aigües residuals de l'EDAR de Castell d'Aro en els estudis de mesocosmos (in situ) realitzats durant l'hivern de 2009 en la llacuna del Club de Golf d'Aro. A) dilució realitzada amb aigua del pou de captació que alimenta les llacunes. B) dilució realitzada amb aigua de superfície de la llacuna GDA2. CF: coliforms fecals. SOM: colífags somàtics. BACT: bacteriòfags que infecten la soca GA17 de *Bacteroides thetaiotaomicron* (hoste específic d'origen humà). SFB: bifidobactèries fermentadores de sorbitol. TBIF: bifidobactèries totals. E.coli: *Escherichia coli*. Ent: Enterococs. S'indica la T_{90} per a cada grup microbià.

A)



B)



6. Conclusions

S'han caracteritzat fenotípicament un total de 623 soques de coliforms fecals i enterococs procedents de l'efluent secundari de l'EDAR de Castell Platja d'Aro i de les dues llacunes del Club de Golf d'Aro. S'han valorat les similituds poblacionals entre totes les aigües i per a ambdues poblacions bacterianes, considerant l'estacionalitat. També s'ha estudiat la persistència de poblacions microbianes utilitzades com a indicadors de qualitat microbiana en l'aigua a partir d'una aproximació experimental adaptada per aquest estudi.

Aquestes anàlisis ens permeten concloure que:

3.1. L'estructura i la composició de les poblacions de coliforms fecals i d'enterococs són diferents en els tres orígens d'aigua analitzats, essent les més semblants les de les dues llacunes, tal i com ens indica l'estudi de diversitat i similitud poblacional.

3.2. La contaminació fecal present en les aigües de les llacunes cal relacionar-la probablement amb aportacions d'origen animal, i no amb les poblacions de coliforms fecals i d'enterococs que poguessin aportar les aigües regenerades. Aquesta observació es recolza per l'estudi de similitud poblacional realitzat.

3.3. La persistència de totes les poblacions microbianes analitzades és major a l'hivern que a l'estiu.

3.4. En el cas que hi hagués una aportació d'aigua regenerada insuficientment desinfectada per part de l'EDAR de Castell Platja d'Aro a les llacunes del Club de Golf d'Aro durant l'hivern, s'estima que la inactivació seria d'entre 1,0 i 1,5 unitats logarítmiques cada 7 dies per a les poblacions bacterianes i cada 10 dies per a les poblacions de bacteriòfags.

3.5. En el cas de que hi hagués una aportació d'aigua regenerada insuficientment desinfectada per part de l'EDAR de Castell Platja d'Aro a les llacunes del Club de Golf d'Aro durant l'estiu, s'estima que la inactivació seria d'entre 1,0 i 1,5 unitats logarítmiques cada 3 dies per a les poblacions bacterianes i cada 5 dies per a les poblacions de bacteriòfags.

7. Annex 1. Enumeracions de les poblacions microbianes estudiades durant els diferents assaigs de persistència en el mesocosmos realitzat *in situ* en la llacuna.

S'indiquen els valors en unitats logarítmiques de CFU per 100 ml. CF: coliforms fecals. SOM: colífags somàtics. BACT: bacteriòfags que infecten la soca GA17 de *Bacteroides thetaiotaomicron* (hoste específic d'origen humà). SFB: bifidobactèries fermentadores de sorbitol. TBIF: bifidobactèries totals. E.COLI: *Escherichia coli*. Ent: Enterococs. nd: no determinat.

Dades d'enumeració de l'assaig realitzat durant l'estiu del 2007.

Temps (h)	CF	SOM	BACT	SFB	TBIF
0	5,75	4,51	2,00	4,54	3,52
24	5,93	4,34	2,11	3,70	2,95
48	5,64	4,00	0,60	3,30	2,90
72	5,10	3,71	0,90	nd	nd
96	4,47	3,30	0,60	nd	nd

Dades d'enumeració de l'assaig realitzat durant l'hivern del 2008. A) dilució realitzada amb aigua del pou de captació que alimenta les llacunes. B) dilució realitzada amb aigua de superfície de la llacuna GDA2.

A)

Temps (h)	CF	SOM	BACT	SFB	TBIF
0	6,70	6,24	4,18	5,64	6,56
24	6,78	6,05	4,15	5,60	6,26
48	6,57	6,03	4,11	5,65	6,64
72	6,54	5,96	4,04	5,75	6,75
168	5,86	5,73	nd	4,78	6,40
216	5,64	5,32	nd	4,31	5,91
336	5,03	5,57	3,30	4,27	5,62

B)

Temps (h)	CF	SOM	BACT	SFB	TBIF
0	6,69	6,19	4,28	5,61	6,63
24	6,86	6,11	4,11	5,99	6,75
48	6,53	6,11	4,04	5,68	6,81
72	6,58	5,84	nd	5,96	6,90
168	6,07	5,56	3,30	4,86	6,28
216	5,10	5,41	nd	4,48	5,86
336	4,83	4,98	3,00	4,48	5,76

Dades d'enumeració de l'assaig realitzat durant estiu del 2008. A) dilució realitzada amb aigua del pou de captació que alimenta les llacunes. B) dilució realitzada amb aigua de superfície de la llacuna GDA2.

A)

Temps (h)	CF	SOM	BACT	SFB	TBIF
0	6,55	5,24	<1	4,24	4,99
24	6,60	4,81	<1	3,88	4,60
48	5,86	4,91	<1	3,70	4,70
72	5,69	4,49	<1	3,00	3,94
96	nd	4,75	<1	nd	nd

B)

Temps (h)	CF	SOM	BACT	SFB	TBIF
0	6,31	5,29	<1	4,18	4,88
24	6,24	5,08	<1	3,40	4,40
48	5,74	4,02	<1	3,40	4,65
72	5,23	4,41	<1	2,70	3,88
96	nd	3,74	<1	nd	nd

Dades d'enumeració de l'assaig realitzat durant l'hivern del 2009. A) dilució realitzada amb aigua del pou de captació que alimenta les llacunes. B) dilució realitzada amb aigua de superfície de la llacuna GDA2.

A)

Temps (h)	CF	SOM	BACT	SFB	TBIF	E.COLI	ENT
0	6,13	5,75	3,95	6,22	6,30	5,89	5,15
24	6,43	5,93	3,74	5,44	6,35	5,48	5,07
48	5,76	6,03	4,31	4,80	5,44	5,70	5,32
120	5,78	5,71	3,85	4,75	5,41	5,74	4,72
168	5,79	5,79	3,54	4,78	5,40	5,10	4,18
216	4,48	5,77	3,30	4,31	4,91	4,10	3,30
288	nd	5,14	3,30	nd	4,62	nd	3,00

B)

Temps (h)	CF	SOM	BACT	SFB	TBIF	E.COLI	ENT
0	6,39	5,64	3,70	6,16	6,38	5,88	5,24
24		5,91	3,74	4,40	5,35	5,44	5,43
48	5,52	5,92	4,30	4,48	5,48	5,63	5,30
120	5,48	5,56	3,81	4,96	5,48	5,63	4,33
168	5,24	5,45	3,60	4,86	5,28	4,57	4,23
216	4,48	5,57	3,18	4,48	4,86	4,10	nd
288	nd	5,24	3,54	nd	4,76	nd	nd

8. Annex 2. Referències.

- Anonymous 1994. Guidance on the preservation and handling of samples. I.S.O. 5667/3.
- Anonymous 2000. International Standardisation Organisation. Detection and enumeration of *E. coli* and coliform bacteria. 2000. Part 1. Membrane filtration method. International Standardisation Organisation, Geneva, Switzerland. 28, .ISO 9308-1.
- Anonymous. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition. American Public Health Association, American Works Association and Water Environment Federation, Washington, D.C. 1220 pp. 1998.
- Bianchi, M.A.G.; Bianchi, A.J.M. 1982. Statistical sampling of bacterial strains and its use in bacterial diversity measurement. *Microbial Ecology*, 8: 61-69.
- Blanch, A. R., Belanche-Munoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kuhn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skrabber, S., Papageorgiou, G. T., Taylor, H., Wallis, J., i Jofre, J. 2006. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5915-5926.
- Blanch, A.R.; Caplin, J.L.; Iversen, A.; Kühn, I.; Manero, A.; Taylor, H.D.; Vilanova, X. 2003. Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *Journal of Applied Microbiology* 94: 994-1002.
- Kühn, I. 1985. Biochemical fingerprinting of *Escherichia coli*: a simple method for epidemiological investigations. *Journal of Microbiological Methods* 3: 159-170.
- Kühn, I., Allestam, G., Huys, G., Janssen, P.; Kersters, K., Krovacek, K.; Stenström, A.T. 1997. Diversity, persistence, and virulence of *Aeromonas* strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2708-2715.
- Kühn, I., Allestam, G., Stenström, A.T.; Möllby, R. 1991. Biochemical fingerprinting of water coliform bacteria, a new method for measuring phenotypic diversity and for comparing different bacterial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3171-3177.
- Vilanova, X.; Manero, A.; Cerdà-Cuéllar, M.; Blanch, A.R. 2004. The composition and persistence of faecal coliforms and enterococcal populations in sewage treatment plants. *Journal of Applied Microbiology* 96: 279-288.