



Caracterització i diversitat de poblacions microbianes en aigües minerals naturals, recreatives i regenerades

Arnau Casanovas i Massana

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Departament de Microbiologia

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

**CARACTERITZACIÓ I DIVERSITAT DE POBLACIONS MICROBIANES
EN AIGÜES MINERALS NATURALS, RECREATIVES I REGENERADES**

Memòria presentada per Arnau Casanovas i Massana
per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Programa de doctorat: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Anicet R. Blanch i Gisbert, al departament
de Microbiologia de la Universitat de Barcelona.

El director,

El doctorand,

Dr. Anicet R. Blanch i Gisbert

Arnau Casanovas i Massana

Barcelona, abril de 2012

« Le savant n'étudie pas la nature parce que cela est utile; il l'étudie parce qu'il y prend plaisir et il y prend plaisir parce qu'elle est belle. Si la nature n'était pas belle, elle ne vaudrait pas la peine d'être connue, la vie ne vaudrait pas la peine d'être vécue. Je ne parle pas ici, bien entendu, de cette beauté qui frappe les sens, de la beauté des qualités et des apparences; non que j'en fasse fi, loin de là, mais elle n'a rien à faire avec la science; je veux parler de cette beauté plus intime qui vient de l'ordre harmonieux des parties, et qu'une intelligence pure peut saisir. »

Héni Poincare. Science et méthode (1908).

Als meus avis

Agraïments

I per fi començo a escriure els agraïments. Són les últimes pàgines que redacto i són altes hores de la matinada, així que no seran les més lluides, malgrat que estic segur que són les que més persones llegireu. Per tant, us demano que sigueu indulgents: creieu-me, la resta és força millor.

Trec les mans del teclat per un moment i intento mirar enrere i pensar en el dia que vaig posar els peus per primera vegada al departament. Jo era un pobre ambientòleg desencantat d'una carrera dispersa i em va passar pel cap la idea de fer recerca. I després de picar algunes portes vaig acabar parlant amb l'Anicet, qui en aquell moment buscava algú per incorporar al seu grup. I des de llavors, han volat més de cinc anys! I pensant en tot aquest temps, crec que és just fer alguns agraïments.

En primer lloc a l'Anicet, qui ha estat el meu mentor durant tot aquest temps, i de qui destacaria el criteri científic, el rigor i la capacitat de treball. Gràcies Anicet per la confiança rebuda des del primer moment i per les nostres discussions científiques, i també sobre la societat, la universitat, la política i el país. Ja saps que m'agrada punxar-te.

També voldria donar gràcies a la resta de professors del grup de recerca. En Francisco, amb qui tantes llargues converses hem compartit, des de com preparar una crema de carbassó, fins als detalls més foscos de la prehistòria del departament. En Joan, pels seus consells en els recuperats seminaris de grup i el seu fi sentit de l'humor. I la Maite, amb qui hem compartit esmorzars, dinars i sopars, i que més d'una vegada m'ha donat llum amb problemes que semblaven irresolubles.

Penso ara en aquelles persones que van patir-me durant els meus primers passos al laboratori: en Xavi Bonjoch, qui va iniciar-me en el món del Phene-System, i l'Eli, qui em va enredar amb la DGGE, les PCRs, les bossetes de diàlisi, els mostres d'escorxadors... en fi, que ha estat la meva mestra. Moltes gràcies per haver tingut tanta paciència!

I també gràcies a tots els companys del departament. Començant per la llunyana secretaria on han hagut de suportar el meu odi a la burocràcia. Espero haver-vos compensat amb la meua entrega als Carnestoltes del departament. Tota la gent de fase I, amb qui hem compartit alguna que altra festa, llargues i útils reunions de responsables de laboratori, i filosofades i riures a l'hora del cafè, que han fet la tornada a la feina molt més suportable. I la gent de fase II: l'hiperocupat i calorós laboratori 7, els sempre apretats i viatgers Rosinots, les nenes de ca l'Araujo (Sílvia, ja saps que et considerem del lab 9!), i les veïnes del laboratori 10: l'Anna, l'Aiora, la Marta C, la Lejla, la Marta G (sempre ens quedaran els nostres viatges romàntics al pontet miserable!), i l'Andreu i l'Àlex que intenten posar pau... Sense tots vosaltres, aquesta història seria molt diferent.

Arribo als habitants del laboratori 9, els qui realment heu hagut de suportar-me tot aquest temps. Els antics lucenos Michel, Ana i Sergi, i les noves incorporacions: Julia, Míriam i Mateu. En Jordi, que em va salvar de la solitud i el desendreç. La Laura, el meu relleu dins del grup: molts ànims! La Cristina (i el petit/a científic que porta a la panxa) que m'ha ajudat tant i tant, que no ho puc escriure en aquestes pàgines. Gràcies a totes dues. I, especialment, a tres persones que per mi són imprescindibles. Tres amigues que han fet aquest camí amb mi. La Raquel, la millor tècnica del món, friky entre els frikys (¿Dónde està la lista...?); la Maru, científica colombiano-catalana, que m'ha ajudat a obrir els ulls al món; i la Míriam, a qui dec tantes coses: sense ella no seria com sóc. Gràcies infinites a totes tres. Sou espectaculars. La nostra llibreta n'és el testimoni.

Ja fora del departament, també vull donar les gràcies a tots els amics que han estat amb mi durant aquest temps i que han hagut d'aguantar les meves rallades sobre la ciència, el doctorat i la vida en general. El Txere, el Funta, la Marta, l'Albert, l'Imma, i la Laura, per ser-hi sempre i des de sempre. Els companys de la demarcació del Baix Llobregat/Garraf/Alt Penedès: la Gemma, la Dúnia, en Dani, en Xavi i en Manel. Vaig disfrutar molt durant aquells tres anys. I els senyors Minyons, que són els que han hagut de patir la meva absència darrerament: l'Arnau, la Mònica, la Cèlia, en Jordi Escoda, la Trini, la Laia i en Jordi Font. És un plaer poder treballar per l'escoltisme i el país amb tots vosaltres. Aterrant al món santfeliuenc, no em vull descuidar la gent del Consell Rector de *Fet a Sant Feliu*, el darrer projecte amb què em vaig deixar enredar. Construir ciutat amb vosaltres és engrescador! I també tots els companys del món del teatre amb qui durant aquest temps he compartit algun projecte: *Els Pastorets* sonats del 2008, *La Importància de ser Frank*, *El Conte d'Hivern...* Posar-me sobre l'escenari és fantàstic i més fer-ho amb vosaltres.

I per acabar, donar les gràcies a tota la meva família. Als meus avis, a qui sé que els hauria fet molta il·lusió poder ser avui aquí. A l'avi Llorenç, a les tietes, tiet, oncle, cosines i cosí. Al Sergi i al Bernat, perquè som un trio espectacular. I sobretot, als meus pares. Si fa molts anys ells no haguessin decidit (conjuntament amb els Reis de l'Orient) portar-me un microscopi de joguina, probablement ara no seria aquí. La meitat d'aquesta tesi és vostra.

I l'altra meitat és de la Núria, que ha estat la meva companya de viatge tot aquest temps. Qui ha sofert totes i cadascuna de les meves neures i rallades, les meves teories pseudocientífiques sobre les bandes de DGGE i la importància de la contaminació fecal, els meus horaris estrambòtics, i els meus canvis d'humor. Espero que l'aventura plegats ens duri per unes quantes tesis més.

Continguts

1. Introducció i objectius	15
1.1 L'aigua i la microbiologia	15
1.2 Aigües minerals naturals	16
1.2.1 Context històric	16
1.2.2 Situació actual	17
1.2.3 Marc normatiu europeu	18
1.2.4 Riscos microbiològics i estandardització	19
1.2.5 Limitacions de la norma ISO 16266:2006	20
1.2.6 Diversitat microbiana	21
1.2.7 Objectius	23
1.3 Aigües recreatives	24
1.3.1 Piscines naturalitzades	24
1.3.2 Riscos microbiològics de les aigües recreatives	25
1.3.3 Marc normatiu	26
1.3.4 Objectius	28
1.4 Aigües regenerades	29
1.4.1 Usos de l'aigua regenerada	29
1.4.2 Marc normatiu i riscos microbiològics	30
1.4.3 Objectius	32
1.5 El Phene-Plate System™	33
1.5.1 Procediment de fenotipatge	34
1.5.2 Càlculs dels perfils bioquímics	35
1.5.3 Anàlisi estadística	36
2. Publicacions	39
2.1 Article 1: Identification of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in water-bottling plants on the basis of procedures included in ISO 16266:2006	41
2.2 Article 2: Diversity of the heterotrophic microbial populations For distinguishing natural mineral waters	49

2.3 Article 3: Characterization of microbial populations associated with natural swimming pools	59
2.4 Article 4: Determination of the fecal contamination origin in reclaimed water open-air reservoirs using biochemical fingerprinting of enterococci and fecal coliforms	67
3. Discussió i conclusions	83
3.1 Article 1	85
3.2 Article 2	89
3.3 Article 3	95
3.4 Article 4	100
4. Bibliografia	105
5. Informes	117
5.1 Informe sobre l'índex d'impacte	119
5.2 Informe de coautoria	121

Llista d'abreviacions

a.C.: abans de Crist

ADN: àcid desoxiribonucleic

ARNr: àcid ribonucleic ribosomal

°C : grau Celsius

Di: índex de diversitat de Simpson

FC/E: ràtio coliforms fecals/enterocs

h: hora

hm³: hectòmetre cúbic

ISO: Organització Internacional d'Estandardització

L: litre

m³: metre cúbic

mg: mil·ligram

ml: mil·lilitre

n.d.: no determinat

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

PhP: Phene-Plate System™

PhP-48: microplaques Phene-Plate System™ per a bacteris metabòlicament actius

PhP-RE: microplaques Phene-Plate System™ per a coliforms fecals

PhP-RF: microplaques Phene-Plate System™ per a enterococs

Sp: coeficient de similitud poblacional

T₉₀: Temps d'inactivació del 90% de la població inicial

TSA: Agar de Triptona i Soja

UFC: unitat formadora de colònia

μl: microlitre

μm: micrometre

UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

1.Introducció i objectius

1. Introducció i objectius

1.1 L'aigua i la microbiologia

L'aigua és un element indispensable per al desenvolupament de les societats humanes, essent necessària per a l'agricultura, la indústria, la producció d'energia, l'ús de boca, el sanejament, els usos recreatius, etc. De fet, l'increment de la qualitat de vida a tots els països ha anat sempre acompanyat d'un augment del consum d'aigua. Tanmateix, l'aigua és un recurs finit, i diversos factors com ara l'augment de la població, la contaminació química i microbiològica de les aigües superficials, la sobreexplotació i salinització dels aqüífers, l'expansió de les activitats industrials, la implantació d'agricultura intensiva i també el canvi climàtic, comencen a provocar escassetat d'aigua en condicions adequades per al seu ús en moltes zones geogràfiques (80, 115). En aquesta situació és indispensable que es treballi per aconseguir un ús sostenible i més racional dels recursos hídrics.

La microbiologia de l'aigua és un dels camps científics que ha contribuït més intensament a la millora de la qualitat i el control dels d'aquests recursos. De fet, des que l'any 1854 John Snow va demostrar que les epidèmies de còlera que assolaven la ciutat de Londres estaven relacionades amb el consum d'aigua contaminada amb material fecal, el trinomi aigua, salut i microbiologia ha estat present constantment en la recerca bàsica i avançada arreu del món. Els avenços i aplicacions que se n'han derivat, com per exemple la cloració de l'aigua, han estat fonamentals en la millora de l'estat sanitari de la població i la disminució de les malalties de transmissió hídrica.

En aquest sentit, la caracterització i estudi de la diversitat microbiana a l'aigua és cabdal per tal de garantir la seva seguretat, més quan els estàndards de qualitat són cada cop més exigents. La gran heterogeneïtat dels ambients aquàtics i els seus diferents usos, fa necessari l'estudi individualitzat de les poblacions microbianes segons els seus reptes i necessitats. El propòsit d'aquesta tesi doctoral és estudiar diferents poblacions microbianes d'interès (indicadors de la contaminació fecal, patògens i poblacions autòctones) relacionades amb diferents tipus d'ambients aquàtics: aigües minerals naturals, aigües recreatives i aigües regenerades.

1.2 Aigües minerals naturals

1.2.1 Context històric

La utilització d'aigües minerals amb funció terapèutica en forma de banys o per via oral es remunta als orígens de la història humana. Es té constància de l'ús dels banys termals i les aigües minerals des de temps immemorial a l'Extrem Orient (Índia i Xina) i a les civilitzacions mesopotàmiques, des d'on va passar a l'antiga Grècia i a la cultura romana. De fet, durant l'edat antiga, la relació entre aigua, salut i religió és freqüent. Fins i tot, alguns grans santuaris, com per exemple Epidaure i Delfos, estan situats en deus a les quals eren atribuïdes propietats curatives. Hipòcrates (460-377 a.C.), considerat pare de la medicina occidental, és el primer en descriure l'ús de certes aigües minerals com a cura per a certes afeccions. Posteriorment, grans escriptors i filòsofs grecs com Sòcrates, Plató i Aristòtil, i romans com Vitruvi, Sèneca i Plini donen testimoni de l'efecte curatiu de les aigües minerals i els banys termals (33).

La civilització àrab va continuar utilitzant les aigües minerals amb finalitats mèdiques i curatives. De fet, molts metges i estudiosos àrabs il·lustres com Avicena i Averroes les recomanaven per diferents malalties. També els metges jueus les incloïen en els seus tractaments (109). Durant el segle XIII metges i pensadors cristians famosos com Arnau de Vilanova i Ramon Llull van escriure sobre les aigües minerals i els banys en sengles obres.

Els descobridors d'Amèrica van observar que les civilitzacions precolombines feien ús de les aigües minerals per recuperar la salut, i existeixen força dades que suggereixen que els maies i també els pobladors de la conca de l'Orinoco ja les utilitzaven cinc segles a.C. (11). Durant els segles XVI i XVII la noblesa va adquirir un gran interès per les aigües minerals i escriptors castellans il·lustres com Santa Teresa de Jesús, Francisco de Quevedo i, fins i tot, Cervantes, hi fan referència i les elogien. A finals del segle XVII, Alfonso Limón Montero, catedràtic de medicina de la Universitat d'Alcalá de Henares, publica "Espejo cristalino de las aguas minerales de España", considerat el primer tractat d'hidrologia peninsular. En aquesta obra es descriu la situació geogràfica, les característiques físiques i químiques i els efectes sobre la salut de diferents aigües minerals. De fet és durant els segles XVII i XVIII en què es comencen i es sistematitzen els estudis sobre la composició de les aigües minerals (45, 104).

Durant el segle XIX l'empirisme esdevé ciència, gràcies als avenços en la química analítica. És durant aquesta època en què comença el gran auge de l'activitat dels centres termals i quan les aigües minerals envasades comencen a comercialitzar-se i a arribar a casa dels consumidors per tal de poder prolongar els seus beneficis més enllà de les estades als balnearis. A finals del segle XIX hi havia actius més de 300 balnearis a

l'estat espanyol i més de 1693 deus formaven part del "Censo General de las Aguas de España", on es detallava les seves composicions químiques i propietats.

En aquesta època, i lligat al desenvolupament de la microbiologia, es demostra l'existència d'una gran varietat de microorganismes en les aigües minerals i es comencen a realitzar estudis microbiològics de diferents aigües, que inclouen observacions microscòpiques, enumeracions i identificació de bacteris, algues i fongs. També sorgeix el debat mèdic al voltant de si les aigües minerals podien ser l'origen o facilitar el contagi de certes malalties com el còlera, la tuberculosi, la febre tifoide o el paludisme. En aquest sentit és interessant la contribució del doctor Santiago García que escriu sobre la necessitat de realitzar anàlisis microbiològiques d'aquestes aigües per comprovar l'absència de microorganismes patògens (101).

A principis del segle XX, amb l'aparició dels fàrmacs de síntesi, l'ús de les aigües minerals pateix un decreixement important, malgrat el suport actiu a les seves propietats terapèutiques per part de Santiago Ramón y Cajal, i Gregorio Marañón. La situació política i econòmica europea arran de les dues guerres mundials, també va afavorir la disminució del seu ús (33). A partir dels anys 60, però, l'aparició d'un sector industrial envasador potent que va implantar noves estratègies comercials, així com la valorització del concepte "natural" pel que fa a l'alimentació i a l'estil de vida, va comportar un canvi d'ubicació de les aigües minerals, que van passar de ser venudes exclusivament en farmàcies amb la denominació d'aigües mineromedicinales, a trobar-se en botigues d'alimentació i supermercats, comercialitzades com a aliments amb beneficis per a la salut (12). Com a conseqüència, les aigües minerals envasades van passar a ser un producte d'àmplia distribució i de consum habitual per al gran públic.

1.2.2 Situació actual

El consum d'aigües envasades ha anat augmentant progressivament en les darreres dècades a la Unió Europea. L'any 2009 el consum mitjà per càpita es va estimar en uns 105 litres. A l'estat espanyol el consum fou de 123 litres, essent el tercer consumidor per càpita per darrere d'Itàlia i Alemanya, contrastant amb països amb consums molt menors, com ara Finlàndia, els Països Baixos o el Regne Unit (Figura 1).

Globalment les aigües envasades suposen a l'estat espanyol la meitat del mercat de begudes no alcohòliques, malgrat que el seu valor econòmic representa un percentatge menor, pel fet que el preu d'una ampolla d'aigua és més baix que el d'altres tipus de begudes no alcohòliques envasades. En concordança amb l'augment de la demanda, la producció d'aigües embotellades s'ha anat incrementant gradualment. Actualment, l'estat espanyol és el quart productor europeu per darrere d'Alemanya i Itàlia, amb un total de 5.165 milions de litres el 2010 destinats majoritàriament al consum intern. El 96% de la producció correspon a aigües minerals naturals, el 2% a les aigües de deu, i la

resta a aigües potables preparades. D'altra banda, les aigües sense gas representen el 96% del volum de ventes, mentre que les aigües amb gas són només el 4% restant. Aquesta proporció preponderant de les aigües sense gas, contrasta amb el conjunt de la Unió Europea, on les ventes dels dos tipus d'aigua són pràcticament equilibrades (12, 39).

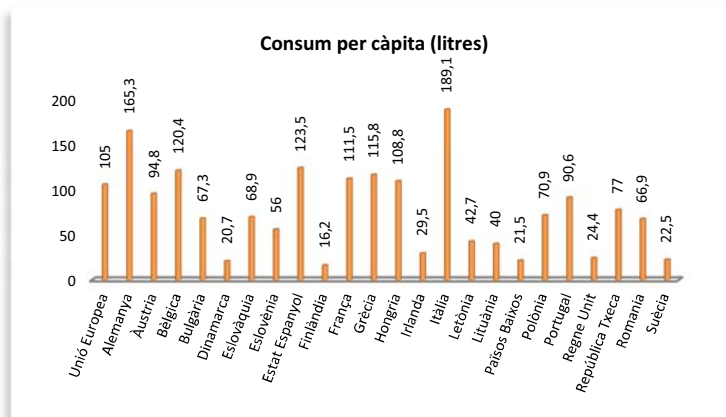


Figura 1. Consum mitjà per càpita d'aigua envasada a la Unió Europea l'any 2009.

Aquest augment generalitzat del consum d'aigües envasades està relacionat amb diversos factors que inclouen d'una banda la seva promoció exitosa per part dels productors com a lliures d'impureses, segures, netes, i que provenen de fonts escrupolosament protegides i no alterades per l'home. A més, a les campanyes publicitàries l'aigua envasada es proposa com una alternativa saludable a les begudes ensucrades, amb cafeïna o alcoholiques (118). D'altra banda, diversos estudis apunten també que les millors característiques organolèptiques de l'aigua envasada respecte l'aigua de l'aixeta, així com una percepció creixent que l'aigua envasada és més segura des del punt de vista sanitari, són factors claus per explicar aquest augment (1, 35).

1.2.3 Marc normatiu europeu

Les aigües minerals naturals, els seus processos d'embotellament i el seu mercat s'han anat regulant mitjançant diverses normatives en l'àmbit europeu. La Directiva 777/80/CE (3), de 15 de juliol de 1980 sobre l'aproximació de les legislacions dels estats membres relatives a l'explotació i comercialització d'aigües minerals naturals, va iniciar la regulació comunitària d'aquest sector. Les Directives 70/96/CE (4) i 83/98/CE (5), aprovades posteriorment, van modificar alguns dels seus articles i annexos. La Directiva 54/2009/CE (10), de 18 de juny de 2009 sobre explotació i comercialització d'aigües minerals naturals, va refundre les anteriors normatives i va actualitzar-ne el contingut, essent la única normativa comunitària vigent actualment en aquest àmbit. Aquesta directiva determina que el concepte "aigua mineral natural" fa referència a aquelles aigües microbiològicament completes originades en aqüífers subterranis que brollen de

manera natural en un o diversos punts. En el seu punt de surgència, les aigües minerals naturals han de contenir menys de 100 UFC a 20°C en 72 hores i menys de 20 UFC a 37°C en 24 hores. La Directiva 54/2009/CE també estipula que les aigües minerals naturals no poden ser sotmeses a cap tipus de tractament que modifiqui o alteri les propietats originals de l'aigua en el seu punt de surgència, llevat d'algunes excepcions particulars com la separació de compostos sulfurosos, ferro, manganès o arseni, o la introducció o reintroducció de manera controlada de diòxid de carboni. En qualsevol cas, els tractaments de desinfecció, l'addició d'agents bacteriostàtics o qualsevol altre tractament que pugui modificar la composició microbiològica de l'aigua queden totalment prohibits. Així, a la Unió Europea, les aigües minerals naturals han de contenir la microbiota original de la font, i per aquest motiu els aqüífers i les zones de captació han d'estar estrictament controlats, a fi d'evitar que cap tipus de contaminació pugui arribar a l'aigua i esdevenir un risc sanitari. Les aigües minerals naturals posseeixen, per tant, una elevada puresa microbiològica intrínseca, i han d'estar lliures de:

- paràsits i d'altres microorganismes patògens;
- *Escherichia coli* i d'altres coliforms i estreptococs fecals en 250 ml de mostra examinada;
- microorganismes anaerobis esporulats reductors del sulfit en 50 ml de mostra examinada;
- *Pseudomonas aeruginosa* en 250 ml de mostra examinada.

1.2.4 Riscos microbiològics i estandardització

Malgrat les mesures higièniques i de seguretat que es prenen en les plantes envasadores, alguns estudis han posat de manifest diversos casos de contaminacions amb paràsits, patògens o indicadors de contaminació fecal com ara coliforms fecals, *E. coli*, protozous, virus entèrics, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter spp.*, *Vibrio cholerae*, i *P. aeruginosa* (14, 15, 17, 40, 48, 79, 92, 107, 110). Per tant, la presència d'aquests microorganismes és un risc real i les conseqüències sanitàries derivades de la seva arribada al consumidor no s'han de menystenir. Generalment, aquests casos de contaminació haurien pogut ser detectats i pal·liats, si s'hagués procedit a una detecció acurada dels paràmetres anteriors.

En aquest sentit, és essencial disposar de protocols solvents per poder dur a terme la detecció i enumeració dels diferents microorganismes establerts per Directiva 54/2009/CE. La Organització Internacional de Normalització (ISO) ha desenvolupat un seguit de normes de per tal d'estandarditzar i harmonitzar els diferents protocols existents per aquests microorganismes:

- ISO 6461-1:1986 Detecció i recompte de les espores de microorganismes anaerobis sulfit-reductors (clostridis) — Part 1: Mètode d'enriquiment en medi líquid.
- ISO 6461-2:1986 Detecció i recompte de les espores de microorganismes anaerobis sulfit-reductors (clostridis) — Part 2: Mètode de filtració per membrana.
- ISO 7899-2:2000 Detecció i enumeració d'estreptococs intestinals — Part 2: Mètode de filtració per membrana.
- ISO 9308-1:2001 Detecció i enumeració de coliforms termotolerants i presumptes *E. coli* — Part 1: Mètode de filtració per membrana.
- ISO 9308-2:1990 Detecció i enumeració de coliforms termotolerants i presumptes *E. coli* — Part 2: Mètode del número més probable.
- ISO 16266:2006 Detecció i enumeració de *Pseudomonas aeruginosa* — Mètode de filtració per membrana.

Tots aquests mètodes han estat àmpliament utilitzats, no només amb aigües minerals, sinó també en altres tipus de matrius, i s'han anat actualitzant periòdicament per incorporar les noves tècniques disponibles, atès que tota millora en el sistema de detecció d'aquests microorganismes patògens i/o indicadors de contaminació, reverteix directament en una major qualitat i seguretat de les aigües envasades. Tanmateix, aquests protocols presenten encara certes limitacions, i, per tant, són susceptibles de ser millorats.

1.2.5 Limitacions de la norma ISO 16266:2006

La norma ISO 16266:2006 detalla un procediment de detecció i identificació per a *P. aeruginosa* basat fonamentalment en l'aïllament del bacteri a través de la filtració per membrana, el seu creixement en un medi altament selectiu (agar de cetrimida suplementat amb àcid nalidíxic) i la seva identificació a partir de l'afavoriment de la producció de pigments característics com són la piocinanina, la pioverdina i la piorubina amb diferents medis de cultiu (22, 69, 81, 84). Diversos estudis revelen l'existència de soques ambientals de *P. aeruginosa* no productores d'algun o de cap d'aquests pigments (55), i també que certes espècies bacterianes de la família de les Pseudomonadàcies poden créixer en agar de cetrimida amb característiques molt similars a les de *P. aeruginosa* (38, 94). Com a resultat, l'aïllament de soques amb identifications confuses se succeeix habitualment quan es duen a terme les anàlisis rutinàries d'aigües minerals naturals en plantes envasadores. Les repercussions que se'n deriven són importants des d'un punt de vista sanitari i econòmic. En el primer cas, els falsos negatius del procediment estandarditzat podrien suposar que aigües minerals naturals que superin els límits de *P. aeruginosa* establerts a la Directiva 54/2009/CE, fossin autoritzades per al seu envasat, esdevenint un risc per als consumidors. D'altra banda, els falsos positius comportarien procediments de neteja i desinfecció de les

plantes envasadores, o, fins i tot, obligarien a descartar completament una font per a la seva explotació comercial, amb els conseqüents perjudicis econòmics. Per tant, la confirmació dels resultats obtinguts és essencial per tal de millorar la presa de decisions en relació a la gestió de les aigües minerals naturals.

1.2.6 Diversitat microbiana

Les aigües minerals naturals són ecosistemes molt complexos que contenen una gran diversitat de microorganismes autòctons, malgrat que en concentracions, que solen ser molt baixes en els punts de surgència (105). Diversos autors han estudiat abastament la microbiota de diferents aigües minerals naturals, posant de manifest la presència d'un gran nombre de gèneres bacterians. Els microorganismes aïllats més habitualment es descriuen a la Taula 1.

Les dades epidemiològiques i experimentals demostren que les poblacions microbianes autòctones de les aigües minerals naturals no han estat mai la causa de cap patologia detectable en humans ni animals, i que en cultius *in vitro* no produeixen danys als teixits humans (77, 100). De fet, des de l'entrada en vigor de la primera directiva europea sobre aigües minerals naturals (3), no s'ha detectat cap cas de malaltia relacionada amb una aigua que complís els criteris normatius.

Taula 1: Grups majoritaris de bacteris aïllats d'aigües minerals naturals. +, menys del 10% dels aïllats; ++, entre el 10% i el 50%. Adaptació de Leclerc i Moureau, 2002 (77).

Classificació	Schwaller <i>et al.</i> (111)	Bischofberger <i>et al.</i> (16)	Manaia <i>et al.</i> (87)	Leclerc <i>et al.</i> (54, 116)
γ-Proteobacteris				
<i>Pseudomonas fluorescents</i>	++	++	++	++
<i>Pseudomonas no fluorescents</i>	++	+	++	+
<i>Acinetobacter</i>	++	+	+	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	+	+	+
β-Proteobacteris				
<i>Alcaligenes</i>	+	+	++	+
<i>Comamonas</i>	+	+	++	+
<i>Adidovorax</i>	+	+	-	-
<i>Paucimonas</i>	-	++	-	-
α-Proteobacteris				
<i>Brevundimonas</i>	-	-	-	+
<i>Cytophaga-Flavobacterium</i>	++	++	++	+
<i>Arthrobacter, Corynebacterium</i>	+	++	-	+

L'augment del coneixement sobre la microbiota autòctona de les aigües minerals naturals utilitzades comercialment pot ser d'utilitat de cara a detectar canvis que poguessin ocórrer en les fonts i els aquífers, durant els processos d'embotellament, el

transport i l'emmagatzematge, de manera que es puguin prendre mesures preventives abans que l'aigua arribi als consumidors. A més, el coneixement de les poblacions microbianes de l'aigua mineral natural abans del seu envasat pot ser utilitzat com a base per al seguiment de l'aigua després de l'envasat.

1.2.7 Objectius

En conseqüència, els objectius que es van plantejar per a l'àmbit de les aigües minerals naturals van ser d'una banda:

- Avaluar el procediment descrit a la ISO 16266:2006 per confirmar soques presumptament aïllades i identificades com a *Pseudomonas aeruginosa* durant anàlisis rutinàries en diferents plantes embotelladores d'aigües minerals naturals.
- Determinar les proves no incloses en el protocol estandarditzat que poden proveir informació útil en la identificació de les soques presumptament aïllades com a *P. aeruginosa*

Aquests objectius constitueixen el punt de partida de l'article 1: "Identificació de *Pseudomonas aeruginosa* en plantes embotelladores d'aigua en base als procediments inclosos a la ISO 16266:2006".

D'altra banda, es van plantejar els següents objectius:

- Aïllar les poblacions bacterianes heteròtrofes aeròbies de tres aigües minerals naturals a 22 °C i a 37 °C durant l'estiu i l'hivern, i caracteritzar-les fenotípicament mitjançant el sistema miniaturitzat "Phene-Plate System-48".
- Calcular i comparar els índexs de diversitat i similitud poblacional per cada població aïllada i per cadascuna de les subpoblacions (22 °C, 37 °C, estiu i hivern).
- Identificar les soques majoritàries i representatives a cadascuna de les tres aigües minerals naturals seqüenciant-ne el gen del 16S ARNr.
- Determinar si les poblacions de cada aigua mineral natural són prou específiques per poder ser discriminades entre sí a partir de la comparació dels seus índexs de similitud poblacional.

Aquests objectius constitueixen el punt de partida de l'article 2: "Diversitat de les poblacions microbianes heteròtrofes per a la diferenciació d'aigües minerals naturals"

1.3 Aigües recreatives

1.3.1 Les piscines naturalitzades

Les piscines naturalitzades són basses d'aigua construïdes artificialment, separades d'altres aigües superficials o subterrànies i destinades al bany humà. En aquests sistemes no hi ha cap tipus de desinfecció de l'aigua per procediments químics o per



llum ultraviolada, sinó que el tractament es basa en l'autodepuració biològica, emulant d'aquesta manera, els sistemes aquàtics naturals (114). La construcció de piscines naturalitzades va començar als anys 80 a Àustria, concebudes des d'un punt de vista paisatgístic, per tal d'integrar estèticament les basses d'aigua en jardins privats. Paulatinament van començar a utilitzar-se també com una

alternativa a les piscines convencionals com a resultat de la preocupació pels efectes nocius del clor i de la resta de productes químics utilitzats per a la desinfecció de les piscines i dels productes derivats de la seva aplicació, que poden provocar irritació als ulls, a la pell i a les mucoses. Els relativament baixos costos de construcció i manteniment, així com una major sensibilitat ambiental de la població, expliquen també el creixement d'aquest mercat. De fet, es calcula que a Europa s'han dissenyat i construït més de 20.000 piscines naturalitzades (82), la major part als països centreeuropeus. Majoritàriament, aquests sistemes són de dimensions petites o mitjanes i destinats a habitatges particulars, tot i que es calcula que existeixen unes 100 piscines naturalitzades obertes al públic. Darrerament, la demanda de construcció de piscines naturalitzades ha augmentat considerablement a l'estat espanyol i també a tota l'àrea mediterrània.

Pel que fa als seu tractament, les piscines naturalitzades estan dividides en dues zones: la zona de bany i la zona de regeneració. La zona de bany pot tenir mides, profunditats i formes molt variades, i és on es desenvolupa l'activitat de bany humà i, per tant, pot assemblar-se més o menys a una piscina convencional o a un sistema aquàtic natural, en funció del seu disseny. La zona de regeneració, en canvi, consisteix en un espai que conté un substrat porós sobre el qual s'hi fan créixer plantes destinades a la regeneració de l'aigua com ara *Nymphaea alba*, *Phragmites australis*, *Sparganium erectum*, *Iris pseudacorus*, *Schoenoplectus lacustris*, *Carex acutiformis* o *Stratiotes aloides*. Aquestes plantes consumeixen els nutrients dissolts a l'aigua, especialment els

nitrats i el fòsfor i ajuden a oxigenar-la. D'altra banda, els microorganismes que colonitzen el substrat utilitzen i transformen les substàncies orgàniques dissoltes a l'aigua.

Generalment l'aigua de la zona de bany circula per gravetat cap a un colador de flotants o "skimmer", que elimina físicament els compostos orgànics suspesos i de mida gran. Després, és dirigida cap a la zona de regeneració on es realitza el procés de depuració natural a través de l'acció conjunta de les plantes i els microorganismes. Finalment, l'aigua retorna cap a la zona de bany.

1.3.2 Riscos microbiològics de les aigües recreatives

A les aigües de les piscines convencionals i, en general, a totes les aigües recreatives s'hi poden trobar un gran nombre i varietat de microorganismes que hi arriben per diferents vies. D'una banda, la contaminació fecal és una de les fonts més importants de microorganismes i té una gran importància des del punt de vista sanitari. Aquesta contaminació pot ser deguda a material fecal directament introduït pels banyistes ja sigui per deposicions involuntàries de femtes, o pel rentat de les restes de material fecal dels cossos dels usuaris. L'origen de la contaminació fecal pot estar també relacionat amb una aigua contaminada utilitzada per emplenar la piscina, o, en el cas de les piscines situades a l'exterior, amb l'entrada de material fecal animal (ocells, rosegadors, animals domèstics, etc.). D'altra banda, molts microorganismes arriben a l'aigua a través de vies humanes no fecals, com ara vòmits, mocs, saliva, o pell, i poden acumular-se formant biofilms en diferents superfícies. Finalment, en aquests sistemes també s'hi poden trobar alguns microorganismes de vida lliure propis de l'aigua (120).

A la bibliografia es recullen molts casos de brots originats en diferents tipus de piscines i aigües recreatives relacionats amb diversos patògens:

- Origen fecal:
 - Virus: norovirus (122), adenovirus (99), enterovirus (68) i Hepatitis A (86).
 - Bacteris: *Shigella spp.*, (25) i *E. coli* O157 (57).
 - Protozous: *Giardia lamblia* (53) i *Cryptosporidium spp.* (47).

- Origen no fecal:
 - Virus: mulluscipoxvirus (24) i papillomavirus (64).
 - Bacteris: *Legionella spp.* (21), *Pseudomonas aeruginosa* (44), *Mycobacterium spp.*(85) i *Staphylococcus aureus* (103).
 - Protozous: *Naegleria fowleri* (26) i *Acanthamoeba spp.* (108).
 - Fongs: *Trychophyton spp.* i *Epidermophyton floccosum* (66).

En molts dels casos anteriors es va poder determinar que el brot estava relacionat d'alguna manera amb un tractament inadequat de l'aigua de bany. Així doncs, el control de la qualitat microbiològica de les aigües recreatives és un factor clau per garantir la seguretat dels usuaris.

1.3.3 Marc normatiu

En l'actualitat no existeix cap normativa vigent que reguli ni la construcció ni els paràmetres de control microbiològic de les piscines naturalitzades. En aquest context, hom pot prendre com a referència, d'una banda, les normatives referents a les piscines convencionals, i de l'altra, les referents a les aigües de bany.

Les piscines convencionals estan regulades arreu de la Unió Europea per normatives nacionals. En el cas de Catalunya, és el Decret 95/2000 (6), de 22 de febrer de 2000, el que estableix les normes sanitàries per a les piscines d'ús públic. D'acord amb el decret, les piscines han d'estar absents de coliforms fecals, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*, en 250 ml de mostra analitzada. Alguns països inclouen altres paràmetres microbiològics en les seves respectives normatives, com ara el recompte d'heteròtrofs totals, la presència de *Legionella pneumophila* o d'enterococs fecals, entre d'altres (Taula 2).

Taula 2. Requeriments microbiològics en piscines convencionals en diferents països europeus.

	Alemanya (34)	Regne Unit (23)	Grècia (50)
Heteròtrofs totals a 22°C	<100 ufc/ml	-	500 ufc/ml
Heteròtrofs totals a 37°C	<100 ufc/ml	<10 ufc/ml	<200 ufc/ml
<i>Escherichia coli</i>	Absència en 100 ml	Absència en 100 ml	-
Coliforms totals	Absència en 100 ml	≤10 ufc/ml	<15 ufc/100 ml
Coliforms fecals	-	-	Absència en 100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absència en 100 ml	Absència en 100 ml	Absència en 100 ml
<i>Legionella pneumophila</i>	Absència en 100 ml	Absència en 100 ml	-
Enterococs fecals	-	-	Absència en 100 ml
<i>Staphylococcus spp.</i>	-	-	Absència en 100 ml
<i>Mycobacterium spp.</i>	-	-	Absència en 1000 ml
Fongs patògens	-	-	Absència en 100 ml

Les piscines convencionals inclouen tractaments de desinfecció, generalment cloració, que virtualment asseguren l'eliminació d'aquests microorganismes indicadors i/o patògens i, per tant, asseguren la seguretat i la qualitat de l'aigua. Tanmateix, les piscines convencionals són sistemes totalment diferents de les piscines naturalitzades, que per definició no poden ser sotmeses a processos de desinfecció química. Per això, també es pot pensar en utilitzar com a referència la Directiva 7/2006/CE (8), de 15 de febrer de 2006, relativa a la gestió de la qualitat de les aigües de bany costeres i

continentals. Aquest tipus d'aigües són molt més similars a les piscines naturalitzades des d'un punt de vista microbiològic i ecològic i, per tant, poden proveir paràmetres més adequats que la normativa de piscines convencionals. Segons aquesta directiva les aigües continentals destinades al bany humà poden classificar-se en tres categories de qualitat en funció de les seves concentracions d'*E. coli* i d'enterococs fecals (Taula 3). No obstant això, el text de la Directiva 7/2006/CE exclou explícitament els cossos d'aigua artificialment construïts i aïllats de les aigües superficials o subterrànies, i, per tant, no és aplicable formalment a les piscines naturalitzades.

Taula 3: Paràmetres per a la classificació de les aigües de bany continentals segons la Directiva 7/2006/CE. Valors en UFC per 100 ml.

	Qualitat excel·lent	Qualitat bona	Qualitat suficient
<i>Escherichia coli</i>	200*	400*	330**
Enterococs fecals	500*	1000*	900**

* Conforme a l'avaluació del percentil 95.

** Conforme a l'avaluació del percentil 90.

En aquest context de manca de regulació, alguns països (Àustria, França, Suïssa i Alemanya) han publicat algunes recomanacions sobre la construcció i el manteniment de les piscines naturalitzades que adapten els paràmetres de la Directiva 7/2006/CE a les característiques d'un sistema tancat i aïllat (13, 46, 96, 114) (Taula 4). Tal com es pot observar, aquests paràmetres són més restrictius pel que fa a l'*E. coli* i als enterococs fecals que els de la directiva, ja que els sistemes tancats poden presentar uns riscos més elevats atenent a la menor renovació de l'aigua. Addicionalment, tots aquests documents incorporen *P. aeruginosa* com un paràmetre important a valorar.

Taula 4. Valors líndar en UFC per 100 ml.

	Valors líndar
<i>Escherichia coli</i>	100
Enterococs fecals	40-50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10

Segons aquestes recomanacions, aquelles piscines naturalitzades que compleixin aquests paràmetres es poden considerar segures des d'un punt de vista microbiològic i, per tant, són aptes per al bany humà.

1.3.4 Objectius

L'augment en la construcció de piscines naturalitzades destinades a l'ús públic suposa alguns dubtes sobre la capacitat d'aquests sistemes de mantenir una qualitat microbiològica adequada quan el nombre de banyistes s'incrementa, tenint en compte que, per definició, no tenen cap tipus de tractament de desinfecció. En conseqüència, els objectius que es van plantejar per a l'àmbit de les aigües recreatives van ser:

- Enumerar les poblacions de coliforms fecals, *E. coli*, enterococs fecals i bacteris aerobis heterotròfics, i determinar la presència de *Pseudomonas aeruginosa* en quatre piscines naturalitzades privades en períodes d'alta activitat de bany (estiu) i de baixa activitat (hivern).
- Identificar l'origen de la contaminació fecal en l'aigua de les quatre piscines naturalitzades a partir del fenotipatge bioquímic d'aïllats de coliforms fecals i enterococs fecals amb les microplaques "Phene-Plate System-RE" i "Phene-Plate System-RF", respectivament.
- Augmentar el coneixement sobre aquests sistemes per poder ajudar a establir els paràmetres que assegurin un ús segur en piscines naturalitzades privades i públiques.

Aquests objectius constitueixen el punt de partida de l'article 3: "Caracterització de les poblacions microbianes associades a piscines naturalitzades"

1.4 Aigües regenerades

1.4.1 Usos de l'aigua regenerada

Les aigües regenerades són aigües residuals depurades que se sotmeten a tractaments addicionals i complementaris per tal que assoleixin una qualitat adequada que permeti la seva reutilització en usos per als quals no és estrictament necessària l'aigua potable. Així, mitjançant els tractaments de regeneració, les aigües residuals depurades deixen de ser un residu i esdevenen un nou recurs que contribueix a una gestió més racional i integrada de l'aigua. En general, la regeneració de les aigües residuals depurades ha augmentat en els darrers anys com a conseqüència de diversos factors:

- L'increment de la demanda d'aigua, especialment en períodes d'estiu
- L'increment del nombre de depuradores d'aigua residual
- Les noves polítiques ambientals
- El deteriorament de la qualitat de les aigües superficials i subterrànies
- La preocupació per reduir els riscos sanitaris i ambientals associats als abocaments d'aigües residuals depurades

Ja l'any 1958, el Consell Econòmic i Social de les Nacions Unides va propugnar la política de no utilització de recursos de alta qualitat per als usos que puguin tolerar qualitats més baixes. Aquesta política implicava el desenvolupament del concepte de reutilització de l'aigua. Des de llavors, cada cop són més els països que consideren l'aigua regenerada com un element bàsic en les seves polítiques hídriques. Els Estats Units, Austràlia, el Japó o Israel són exemples d'avantguarda en l'aprofitament i gestió de l'aigua regenerada.

A Catalunya, l'any 2008 es tractava anualment un volum de 665 hm³ a les estacions depuradores d'aigües residuals urbanes, dels quals només un 7,6%, és a dir, uns 51 hm³ eren reutilitzats de forma planificada. La resta de l'aigua era retornada a la llera pública. Aquestes dades posen de manifest que la reutilització presenta encara un gran potencial de creixement. En aquest sentit, l'any 2009 l'Agència Catalana de l'Aigua va desenvolupar el Programa de Reutilització d'Aigua a Catalunya, que preveia una sèrie d'actuacions per tal que l'any 2015 s'arribés a tractar un 31% de les aigües residuals depurades, tot generant un cabal aprofitable de 204 hm³ d'aigua regenerada.

L'ús principal de l'aigua regenerada ha estat, tradicionalment, la irrigació de camps de conreu, tot i que progressivament, s'han anat desenvolupant altres usos (Taula 5). Darrerament, un dels usos que està tenint més creixement és el rec de camps de golf. Aquestes instal·lacions esportives tenen necessitats mínimes de rec força constants al llarg de l'any, les quals s'incrementen especialment en temporada d'estiu o de sequera, justament quan les restriccions d'aigua potable sovintegen més. L'aigua regenerada pot

ser, per tant, una alternativa interessant, tenint en compte que els camps de golf no necessiten la qualitat d'una aigua potable per al rec de la gespa. A més a més, l'aigua regenerada pot aportar un benefici addicional en forma de nutrients dissolts, sobretot nitrogen, que poden arribar a cobrir el 30% de les necessitats (95) i, per tant, representar un estalvi important en fertilitzants.

Taula 5. Principals usos de l'aigua regenerada

	Aplicacions
Ús urbà	Neteja de carrers, rentat de vehicles, cisternes de lavabos, i extinció d'incendis
Ús agrícola i forestal	Rec de productes destinats al consum humà, pastures, i silvicultura
Usos recreatius	Rec de zones verdes (parcs, camps de golf, camps esportius, jardins), fonts i llacs ornamentals, i producció de neu artificial
Usos ambientals	Recàrrega d'aqüífers, recuperació d'aiguamolls, cabals ecològics de rius i rieres, i barrera contra la intrusió salina
Usos industrials	Processos de refrigeració, aigües de procés i aigües de rentat
Ús potable	Utilització com a aigua potable

1.4.2 Marc normatiu i riscos microbiològics

A l'estat espanyol els processos de regeneració de l'aigua estan regulats pel Reial Decret 1620/2007 (9), de 7 de desembre, que determina els criteris de qualitat per a la reutilització de l'aigua en funció dels seus usos. Des del punt de vista microbiològic, el paràmetre de control utilitzat és *Escherichia coli* per al qual es determina que les seves concentracions en l'aigua regenerada poden situar-se entre 0 UFC/100 ml fins a 10⁴ UFC/100 ml. En el rang restrictiu hi trobaríem usos com ara el rec de jardins privats, l'ús en torres de refrigeració o la recàrrega d'aqüífer per injecció directa. En canvi, l'ús en masses d'aigua ornamental amb accés restringit al públic o el rec de cultius llenyosos sense contacte amb fruits serien exemples del rang menys restrictiu. En aquells casos en què l'ús de l'aigua regenerada pot implicar la formació d'aerosols, s'estableix també un límit de 100 UFC/L de *Legionella spp.*

En qualsevol cas, es considera que l'aigua regenerada que compleix els criteris especificats a la normativa presenta uns riscos acceptables des del punt de vista sanitari i, per tant, pot ser utilitzada per a l'ús concret. Tanmateix, els processos de regeneració i reutilització de l'aigua segueixen generant certa inquietud pel fet que determinats microorganismes patògens presents a les aigües residuals són capaços de resistir alguns dels tractaments i, fins i tot, créixer en els sistemes de distribució i emmagatzematge de l'aigua regenerada (29, 43, 63, 106). Aquest fenomen de deteriorament de la qualitat de l'aigua un cop finalitzat el procés de regeneració no està contemplat a la normativa, però suposa un risc que no s'ha de menystenir.

En aquest sentit, és interessant augmentar el coneixement sobre els microorganismes patògens i els indicadors de contaminació fecal presents en els sistemes d'aigües regenerades. D'altra banda, disposar d'eines que ajudin a determinar l'origen d'aquests microorganismes, ha de permetre assegurar la qualitat i seguretat de les aigües regenerades, així com determinar les mesures correctores que, si s'escau, calgui aplicar.

En els darrers anys, s'han desenvolupat un gran nombre de mètodes per discriminar l'origen de la contaminació fecal a l'ambient (42). Això no obstant, molts d'aquests mètodes han demostrat ser poc aplicables en aquells casos en què les concentracions d'indicadors de la contaminació fecal són baixos. Per tant, es fa necessari desenvolupar noves eines que puguin ser útils en aquests casos.

1.4.3 Objectius

Recentment, els responsables del control microbiològic de l'aigua de rec d'un camp de golf van detectar nivells elevats de coliforms fecals i enterococs fecals en l'aigua de dues basses naturalitzades d'aigua utilitzades com a reservori. Les dues basses, connectades en sèrie, s'emplenaven amb aigua regenerada que provenia d'una estació depuradora d'aigües residuals urbanes. En conseqüència, els objectius que es van plantejar per a l'àmbit de les aigües regenerades van ser:

- Avaluar si el fenotipatge bioquímic de coliforms fecals i enterococs amb les microplaques "Phene-Plate System-RE" i "Phene-Plate System-RF" era una eina útil per determinar l'origen de la contaminació fecal en ambients amb baixes concentracions d'indicadors, com ara les basses d'aigua regenerada.
- Determinar si la presència d'indicadors de la contaminació fecal en basses d'aigua regenerada era deguda al recreixement de les poblacions romanents en l'aigua després de la desinfecció o tenien un altre origen (humà o animal) relacionat amb les activitats del propi camp de golf.

Aquests objectius constitueixen el punt de partida de l'article 4: "Determinació de l'origen de la contaminació fecal en reservoris a l'aire lliure d'aigua regenerada mitjançant el fenotipatge bioquímic d'enterococs i coliforms fecals".

1.5 El Phene-Plate System™

El Phene-Plate System™ és un sistema miniaturitzat que permet fer fenotipatges bioquímics d'una manera simple i ràpida a un nombre elevat de soques bacterianes en estudis epidemiològics, nosocomials o ecològics. El sistema es fonamenta en l'avaluació de la cinètica de diferents reaccions bioquímiques realitzades en microplaques de 96 pouets, a partir de la lectura dels resultats de cadascuna de les proves en diferents moments. Aquestes microplaques (plaques PhP) contenen de 2 a 8 sets de reactius deshidratats, seleccionats en funció del grup de microorganismes objectiu. Les plaques PhP-RE (per a coliforms fecals) i PhP-RF (per a enterococs) són plaques de cribratge ràpid on cada aïllat se sotmet a 11 proves bioquímiques. Aquestes plaques són especialment indicades per a estudis ecològics on es treballa amb un gran nombre d'aïllats i on la informació de la població global és més important que no pas la de cada aïllat individual. A la taula 6a hi ha la relació de substrats inclosos en cadascuna de les plaques.

Taula 6a. Reactius deshidratats a les plaques PhP-RE i PhP-RF.

Pouet	PhP-RE	PhP-RF
1	Pou d'inoculació	Pou d'inoculació
2	Cel-lobiosa	L-Arabinosa
3	Lactosa	Lactosa
4	Ramnosa	Melibiosa
5	Desoxiribosa	Melicitosa
6	Sacarosa	Rafinosa
7	Sorbosa	Inositol
8	Tagatosa	Sorbitol
9	D-Arabitol	Manitol
10	Rafinosa	Àcid D-galacturònic
11	Àcid D-galacturònic	Amigdalina
12	Ortintina*	Gluconat

*Pouets que presenten un pH inicial àcid, i on la reacció positiva implica l'alcalinització del medi.

D'altra banda, les plaques PhP-48 són plaques d'alta resolució, on cada aïllat se sotmet a 48 proves bioquímiques, obtenint un fenotipat molt acurat. Aquestes plaques es poden utilitzar amb qualsevol bacteri metabòlicament actiu. La taula 6b conté la relació de tots els reactius de les plaques PhP-48.

Taula 6b. Reactius deshidratats a les plaques PhP-48.

Pouet	Substrat	Pouet	Substrat
1	Àcid manònic- γ -lactona	25	Sorbosa
2	L-arabinosa	26	Deoxiglucosa
3	D-xilosa	27	Deoxiribosa
4	Galactosa	28	Ramnosa
5	Maltosa	29	D-fucosa
6	Cel·lobiosa	30	L-fucosa
7	Trehalosa	31	Tagatosa
8	Palatinosa	32	Amigdalina
9	Sacarosa	33	Arbutina
10	Lactosa	34	b-metil-glucòsid
11	Melibiosa	35	5-ceto-gluconat
12	Lactulosa	36	Gluconat
13	Gentobiosa	37	Melbionat
14	Melicitosa	38	Àcid D-galacturònic
15	Rafinosa	39	Salicina
16	Inosina	40	Control de pH 5,5*
17	Adonitol	41	Citrat*
18	Inositol	42	Fumarat*
19	D-arabitol	43	Malinat*
20	Glicerol	44	Malonat*
21	Maltitol	45	Piruvat*
22	Sorbitol	46	L-tartrat*
23	Galactitol	47	Urea*
24	Control de pH 7,4	48	Ornitina*

*Pouets que presenten un pH inicial àcid, i on la reacció positiva implica l'alcalinització del medi.

1.5.1 Procediment de fenotipatge

Els bacteris que han de ser fenotipats es cultiven en plaques d'un medi adequat per al seu creixement (TSA per als coliforms fecals, enterococs o *P. aeruginosa*, i R2A per als bacteris autòctons de l'aigua mineral natural, per exemple). És important utilitzar les mateixes condicions de creixement (temperatura i temps d'incubació) per a totes les soques d'un mateix estudi, per tal de poder comparar els resultats obtinguts.

Abans de començar els assaigs, es prepara el medi de resuspensió normal (0,2% de peptona i 0,011% de blau de bromotimol) per a les plaques PhP-RE i PhP-48; i el medi de resuspensió ric (0,2% de peptona; 0,05% d'extracte de llevat; 0,5 de clorur de sodi i 0,011% de blau de bromotimol).

En el cas de les microplaques PhP-RE i PhP-RF, es dispensen 375 μ l del medi de suspensió corresponent als pouets d'inoculació (primera columna), i 150 μ l a la resta de pouets, mitjançant una pipeta multicanal. Un cop les microplaques estan emplenades,

es pren una mica de creixement de les plaques amb el cultiu i es resuspèn al primer pouet d'inoculació. Amb un altre hisop estèril es pren creixement d'un altre aïllat i es resuspèn al pouet d'inoculació següent, i així es procedeix fins que tots els pouets hagin estat inoculats amb els diferents aïllats. Seguidament, es continua amb la resta de microplaques de l'assaig. La quantitat de bacteri inoculada ha de ser sempre similar (normalment entre 0,1 mg i 1 mg). Les microplaques es deixen una hora a temperatura ambient i després, a partir de la suspensió cel·lular dels pouets d'inoculació, es dispensen alíquotes de 25 µl a tots els pouets de la mateixa fila. Les microplaques s'incuben a la temperatura adient (generalment 37°C). El creixement als diferents pouets es mesura utilitzant un lector de microplaques que mesura l'absorbància a 620 nm a diferents temps (7h, 24h i 48 h pels coliforms fecals, i 16h, 40h i 64h pels enterococs).

Per a les plaques PhP-48, es preparen vials amb 12 mL de medi de suspensió, als quals s'hi va inoculant una mica de creixement de les plaques amb el cultiu, amb hisops estèrils. Les suspensions es deixen entre 30 minuts i 1 hora a temperatura ambient, i després s'inoculen les microplaques dispensant 150 µl a cada pouet mitjançant una pipeta multicanal. Les microplaques s'incuben a la temperatura adient (22°C o 37°C), i es mesura el creixement de la mateixa manera que per a les microplaques PhP-RE i PhP-RF a temps variables en funció del tipus de bacteris estudiats.

1.5.2 Càlculs dels perfils bioquímics

Els valors de les lectures d'absorbància obtingudes a cada pouet es multipliquen per 10, donant valors d'entre 0 i 30 per a cada reacció. Després de la darrera lectura, es calcula per a cada soca la mitjana de les lectures de cada pouet, donant lloc a un perfil bioquímic que consisteix en 11 valors, en el cas de les plaques PhP-RE i PhP-RF, o en 48 valors, en el cas de les plaques PhP-48. Cadascun d'aquests valors oscil·la entre 0 (color groc, reacció àcida) i 30 (color blau, reacció alcalina) (72).

Els perfils bioquímics de cada soca es comparen dos a dos, i la seva similitud es calcula com el coeficient de correlació (r). A partir dels coeficients de correlació de totes les soques, s'obté una matriu de similitud a partir del qual es construeix el dendrograma més ajustat als coeficients de correlació mitjançant el mètode UPGMA amb relacions de mitjanes seguits de l'agrupació de correlacions i coeficients Sp. El dendrograma agrupa primerament les soques amb els coeficients Sp més elevats, i, posteriorment, construeix una nova matriu de similitud, en què les soques agrupades en el primer pas, es consideren com una sola. Aquest procediment es va repetint fins que totes les soques estan agrupades. El coeficient de correlació a partir del qual es considera que dues soques presenten el mateix perfil bioquímic és variable, tot i que se sol situar a 0,975 (71, 75).

1.5.3 Anàlisi estadística

La diversitat fenotípica d'una població bacteriana es mesura amb l'índex de diversitat de Simpson (Di) segons la fórmula:

$$D_i = 1 - \sum \frac{[N_i \times (N_i - 1)]}{[N \times (N - 1)]}$$

on N_i és el nombre d'aïllats del grup fenotípic i , i N és el nombre total de soques assajades. Aquest índex depèn de la distribució dels aïllats en els diferents grups fenotípics. Si una població està formada per aïllats distribuïts en molts grups fenotípics, la D_i serà elevada, amb un màxim de 1,0, en el cas que tots els aïllats siguin diferents entre sí. En canvi, si la població presenta alguns grups dominants, la D_i serà baixa, amb un mínim de 0, si tots els aïllats presenten el mateix perfil bioquímic.

La similitud fenotípica entre poblacions bacterianes es mesura amb el coeficient de similitud poblacional (S_p) segons la fórmula:

$$S_p = \frac{S_x + S_y}{2}$$

on S_x és la similitud de la població x a la població y , i S_y és la similitud de la població y a la població x .

S_x es calcula segons les fórmules:

$$S_x = \sum \frac{q_{ix}}{N_x} \quad q_{xi} = p_{xi}/p_{yi}$$

on N_x és el nombre total d'aïllats de la població x ; i és l'ordinal de la soca dins la població x (de 1 fins a N_x); p_{xi} és la proporció d'aïllats pertanyents al mateix grup fenotípic que la soca i (incloent la soca i) a la població x ; i p_{yi} és la proporció d'aïllats pertanyents al mateix grup fenotípic que la soca i (incloent la soca i) a la població y . El coeficient q_{xi} ha de ser sempre inferior a 1, en cas contrari $q_{xi} = 1/q_{xi}$. S_y es calcula de la mateixa manera.

Per tant S_p , depèn de la proporció d'aïllats que siguin iguals entre les dues poblacions comparades. Quan dues poblacions no comparteixen grups fenotípics, la S_p presentarà valors baixos (el valor mínim és 0). En canvi, quan es comparen poblacions que comparteixen alguns grups fenotípics el valor serà major, amb un màxim de 1,0.

És important comentar que per interpretar els valors de S_p , cal tenir en compte la diversitat i el nombre de soques analitzades. Quan l'índex D_i és proper a 0,9 i s'analitzen poblacions de més de 20 soques, la S_p no superarà mai 0,5, ja que en

rèpliques d'una mateixa mostra s'obtenen valors de S_p propers a 0,5. De fet, es considera que dues poblacions són idèntiques des d'un punt de vista fenotípic, quan s'obtenen coeficients S_p iguals o superiors a 0,2, quan es treballa amb un gran nombre d'aïllats.

A partir de la matriu de coeficients de similitud entre poblacions es pot representar gràficament la seva relació seguint el mètode UPGMA descrit anteriorment obtenint dendrogrames que millor representin la similitud entre totes les poblacions seleccionades.

2.Publicacions

2. Publicacions

2.1 Article 1

Identificació de *Pseudomonas aeruginosa* en plantes embotelladores d'aigua en base als procediments inclosos a la ISO 16266:2006

Journal of Microbiological Methods, 81 (2010) 1-5

Arnau Casanovas-Massana, Francisco Lucena i Anicet R. Blanch

La norma ISO 16266:2006 descriu un procediment estandarditzat per a l'aïllament i la identificació de *Pseudomonas aeruginosa* en diferents tipus d'aigües, entre d'altres, les aigües embotellades. En alguns casos el procediment descrit no és prou conclusiu per confirmar o descartar la presència d'aquest patogen oportunista humà, fet que pot representar un problema atès que la normativa actual determina que les aigües embotellades han d'estar lliures d'aquest microorganisme en 250ml de mostra. En aquest estudi es va avaluar la capacitat del procediment descrit a la ISO 16266:2006 per identificar confirmativament presumptes aïllats de *P. aeruginosa*.

Un total de 41 soques prèviament aïllades en plantes embotelladores d'aigua i presumptament identificades com a *P. aeruginosa* seguint la ISO 16266:2006, van ser sotmeses una altra vegada a totes les proves incloses a la norma internacional (agar de cetrimida suplementat amb àcid nalidíxic, agar King B, brou d'acetamida i test de la oxidasa). Addicionalment es van assajar altres proves que han estat tradicionalment utilitzades per a la identificació de *P. aeruginosa* (brou d'asparagina i agar King A). També es van dur a terme les proves no obligatòries incloses a la ISO 16266:2006 per comprovar el creixement de les soques a 4 °C i a 42 °C. Finalment, es va realitzar un fenotipatge bioquímic a totes les soques utilitzant les microplaques PhP-48 (Bactus AB, Suècia) i les galeries API® 20NE (Biomérieux, França). A partir dels grups fenotípics obtinguts amb les microplaques PhP-48, es van seleccionar les soques més representatives de cada grup i es va procedir a seqüenciar el gen del 16S ARNr.

El procediment de la ISO 16266:2006 va permetre identificar correctament 27 de les 29 soques confirmades genotípicament i, per tant, es van obtenir dos falsos negatius. El creixement en brou d'asparagina ha de descartar-se com a test confirmatiu perquè va mostrar falsos positius i falsos negatius. Contràriament, les galeries API® 20NE van identificar correctament tots els aïllats. L'agar King A i la prova de creixement a 4 °C i a

42 °C va discriminar correctament totes les soques estudiades, incloent les dues que no es van poder identificar amb les proves bàsiques de la ISO 16266:2006.

Atès que l'agar King A i el test de creixement a 4 °C i a 42 °C són proves senzilles, ràpides i econòmiques es recomana el seu ús en la confirmació rutinària de *P. aeruginosa* seguint la norma ISO 16266:2006.



Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in water-bottling plants on the basis of procedures included in ISO 16266:2006

Arnau Casanovas-Massana*, Francisco Lucena, Anicet R. Blanch

Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2009

Received in revised form 23 December 2009

Accepted 27 December 2009

Available online 14 January 2010

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa

Bottling plant

ISO 16266:2006

Water

Identification

ABSTRACT

ISO 16266:2006 provides a standardized procedure for the isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in waters. In some cases the method described in this ISO is not conclusive enough to confirm or discard the presence of this opportunistic human pathogen. In this study the capacity of the procedure described in ISO 16266:2006 to identify presumptive *P. aeruginosa* isolates was evaluated.

Forty-one presumptive *P. aeruginosa* strains, previously isolated from water-bottling plants following ISO 16266:2006, were submitted to all the tests recommended by ISO 16266:2006 (Cetrimide agar with nalidixic acid, King B agar, Acetamide broth and Oxidase test). Additional tests that have been widely used for the identification of *P. aeruginosa* were also performed (Asparagine broth and King A agar). Furthermore, we also conducted the non-compulsory ISO 16266:2006 assay to study the capacity of the strains to grow at 4 °C and 42 °C. Finally, all the strains were biochemically phenotyped with PhP-48 plates (Bactus AB, Sweden) and API 20NE galleries (Biomérieux, France), and their 16 rRNA gene was sequenced.

ISO 16266:2006 correctly identified 27 out of 29 genotypically confirmed *P. aeruginosa* isolates, although two false negative identifications were obtained.

Growth in Asparagine broth should be discarded as a confirmative test as it showed false negatives and false positives. In contrast, API 20NE galleries correctly identified all the confirmed isolates.

King A medium and growth tests at 4 °C and 42 °C correctly discriminated all the studied strains, even the two that were not identified with the basic ISO 16266:2006 tests.

Given that King A medium and growth tests at 4 °C and 42 °C are straightforward, rapid, and inexpensive, it is strongly recommended that they be used for routine confirmation of *P. aeruginosa* when applying ISO 16266:2006.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen that is associated with food- and water-borne diseases (Warburton, 1993; Römling et al., 1994). This species can grow in low-nutrient water (González et al., 1987; Moreira et al., 1994) and survive for long starvation periods (Van Der Kooij et al., 1982; Legnani et al., 1999), which are often related to biofilm formation (Boyle et al., 1991). In addition to being a primary infectious agent, *P. aeruginosa* is an indicator of other opportunistic pathogens (Geldreich, 1992; Clesceri et al., 1998) and also even promotes these microorganisms (Hunter, 1993). Therefore, bottled mineral waters must be free from *P. aeruginosa* as its presence constitutes a health risk to the general public.

Natural mineral waters and bottling procedures in the European Union are governed by Council Directives 80/777/EC, 96/70/EC and 98/83/EC. Under the above directives natural mineral water must be free of parasites, pathogenic organisms and indicator organisms. In particular, water for human consumption must be free of *P. aeruginosa* in any 250 ml sample.

ISO 16266:2006 provides a standardized procedure to isolate and quantify *P. aeruginosa* in water. This procedure is performed by membrane filtration on Cetrimide agar medium with nalidixic acid, a highly selective medium which enhances the production of pyocyanin and pyoverdin, two characteristic pigments of *P. aeruginosa* (Brown and Lowbury, 1965). After this presumptive identification, the isolates are tested on two media: acetamide broth, to evaluate its capacity to produce ammonium from acetamide; and King B agar, which improves the production of pyoverdin. Moreover, the Oxidase test is also performed. In addition, ISO 16266:2006 recommends complementary assays at distinct growing temperatures (4 °C and 42 °C) in order to confirm presumptive *P. aeruginosa* isolates.

The presence of presumptive *P. aeruginosa* strains in water-bottling plants might be observed when performing routine analysis.

* Corresponding author. Mailing address: Departament de Microbiologia, Avinguda Diagonal, 645. 08028. Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: +34 934039044; fax: +34 934039047.

E-mail address: arnaucasanovas@ub.edu (A. Casanovas-Massana).

The basic tests recommended in ISO 16266:2006 might not be conclusive enough to confirm the presence of this pathogen. Some environmental *P. aeruginosa* strains may produce non-pigmented colonies (Havelaar et al., 1985) and several Pseudomonadaceae may grow on Cetrimide agar with nalidixic acid with similar characteristics to those of *P. aeruginosa* (Elomari et al., 1995; Morais et al., 1997). Thus, it is essential to confirm the results in order to facilitate decisions regarding water quality management.

Here we evaluated the procedure described in ISO 16266:2006 to confirm presumptive *P. aeruginosa* strains isolated in routine microbial analysis in water-bottling plants.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Water samples (250 ml) were taken at several points in a water-bottling plant by laboratory staff of the factory itself. Samples were filtered through 0.44 µm nitrocellulose membranes (Millipore, USA). Filters were incubated on Cetrimide agar plates supplemented with 15 mg/l of nalidixic acid at (36 ± 2) °C for (44 ± 2) h. Colonies that showed a bluish/greenish pigmentation or that were fluorescent when examined under (360 ± 20) nm ultraviolet radiation were selected as presumptive *P. aeruginosa* strains. Pure cultures were obtained on Nutrient agar plates at (36 ± 2) °C for (22 ± 2) h of incubation.

Fresh cultures of each strain were sent to our laboratory on Nutrient agar plates. Pure culture was confirmed by subculturing them on Nutrient agar plates at (36 ± 2) °C for (22 ± 2) h (Oxoid, England) and Gram staining. *P. aeruginosa* NCTC 10332T was used as a reference control in all the assays performed in this study.

2.2. Assays performed and included in ISO 16266:2006

2.2.1. Cetrimide agar

All the strains were cultured on Cetrimide agar plates (Scharlau, Spain) supplemented with 15 mg/l of nalidixic acid (Sigma, Germany) and incubated at (36 ± 2) °C for (44 ± 2) h in humid containers to prevent drying. After (22 ± 2) h and (44 ± 2) h, the plates were examined. Strains showing either bluish/greenish or reddish brown pigmentation, caused by pyocyanin or pyorubin production respectively, were considered positive for this assay. In addition, the plates were examined under (360 ± 20) nm ultraviolet radiation and all the strains showing fluorescence as the result of the production of pyoverdine were also considered positive for the assay.

2.2.2. Acetamide broth

All the strains were inoculated in Acetamide broth tubes (Scharlau, Spain) and incubated at (36 ± 2) °C for (22 ± 2) h. Then, 1 or 2 drops of Nessler Reagent (Hech, USA) was added and all the tubes showing a yellow to brick red color, caused by ammonium production, were considered positive for the assay.

2.2.3. King B agar

Strains were subcultured on King B plates (Scharlau, Spain) at (36 ± 2) °C for five days in humid containers to prevent drying. The plates were examined daily under (360 ± 20) nm ultraviolet radiation. The presence of fluorescence during the five days of observation was considered a positive reaction.

2.2.4. Oxidase test

Two or three drops of Oxidase reagent (Scharlau, Spain) was added to some colonies of each isolated strain. The reaction was considered positive when an intense purple developed after 10 s.

2.3. Additional assays

Furthermore, additional assays which have been widely used for the detection of *P. aeruginosa* (growth on King A plates (King et al., 1954) and in Asparagine broth (Anonymous, 1975)) were also performed for all the strains. Two growing temperatures, 4 °C and 42 °C, were tested on Nutrient agar for all the strains, following recommendations in complementary information in ISO 16266:2006.

2.3.1. Asparagine broth

All the strains were inoculated in Asparagine broth tubes (Scharlau, Spain) and incubated at (36 ± 2) °C for (44 ± 2) h. Growth with or without fluorescent pigmentation was estimated as presumptive evidence of the presence of *P. aeruginosa*.

2.3.2. King A agar

All the strains were subcultured on King A plates (Scharlau, Spain) at (36 ± 2) °C for five days in humid containers to prevent drying. Observation of bluish/greenish pigmentation, caused by pyocyanin production, was considered presumptive evidence of the presence of *P. aeruginosa*.

2.3.3. Growth at 4 °C and 42 °C

As stated in a complementary information included in ISO 16266:2006, most *P. aeruginosa* strains can grow at 42 °C but not at 4 °C (Palleroni, 2005). To test growth at these temperatures, all the strains were subcultured on Nutrient agar plates (Oxoid, England) at 42 °C and 4 °C and incubated for (22 ± 2) h and 5 days respectively in humid containers to prevent drying.

2.4. Biochemical characterization

Two commercial biochemical characterization kits were used for the phenotypic identification of isolated strains.

2.4.1. API 20 NE

The API 20 NE system (Biomérieux, France) was applied following the manufacturer's instructions. The API 20 NE profiles obtained were identified with the APIWEB™ database.

2.4.2. Phene-Plate 48

All isolates were also biochemically phenotyped using PhP-48 microplates of the Phene-Plate System (Bactus AB, Sweden), following the manufacturer's instructions. The PhP-48 plates consist of 96-well microplates with dehydrated reagents, which have been selected to provide a high level of discrimination among species. Each plate allows the biochemical fingerprinting of two distinct isolates (48 biochemical tests per isolate). The biochemical fingerprinting procedure has been previously described (Kühn, 1985). Overnight cultures on Nutrient agar (Oxoid, England) were prepared at 37 °C. Cell suspensions were prepared by harvesting overnight cultures in a solution of distilled water at 0.1% w/v proteose peptone (Difco, France) and 0.011% w/v bromothymol blue (Merck, Germany). Aliquots of 150 µl of bacterial suspension were added to all the wells. The inoculated microplates were incubated at 37 °C. Growth in the wells was measured in a spectrophotometer at 620 nm with the iEMS Reader MF (Labsystems, Finland) at 16 h, 40 h and 64 h. The biochemical profiles were calculated as described previously (Kühn et al., 1991). Simpson's diversity index (Di) of each population was calculated, as previously described (Hunter and Gaston, 1988; Kühn et al., 1991). On the basis of the results of the biochemical tests, isolates for each population were pooled to determine the main biochemical PhP phenotypes (main clusters) of bacterial populations. Clusters were defined by isolates showing a similarity index equal to or higher than 0.975. Isolates showing the highest minimum and the highest mean similarity to all other isolates belonging to the same PhP phenotype were selected as

Table 1
Results of the biochemical and genotypical assays for all the isolates. Strains are grouped on the basis of the phenotypical groups obtained by PhPWin®. Strains marked with an asterisk were the most representative strains of each group and therefore those which were sequenced. The first column shows when the strains are identified as *P. aeruginosa* by the tests included in ISO 16266:2006 (Cetrimide agar, Oxidase test, King B agar and Acetamide broth).

Strain	Identification by ISO 16266:2006	Gram staining	Oxidase test	Cetrimide agar	King B agar	Acetamide broth	King A agar	Asparagine broth	Growth at 4 °C	Growth at 42 °C	Profile API	Identification ^a APWEEB™	Phenotypical group ^b	IS5 rRNA identification ^c
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10322 T	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	13S4577	<i>P. aeruginosa</i> 98.1%	D	<i>P. aeruginosa</i> 99% EF527425.1
1	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	1574475	<i>P. aeruginosa</i> 99.9%	A	
5	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	1554475	<i>P. aeruginosa</i> 99.9%	A	
6	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
11	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
13	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
14	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
15	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
16	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
17	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
18	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
19	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
20	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
21	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
22	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
23*	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
24	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
25	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
26	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	A	
33	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	13S4575	<i>P. aeruginosa</i> 99.9%	A	
34	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 98.1%	A	
36	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	13S4575	<i>P. aeruginosa</i> 99.9%	A	
12	No	Bacillus-	-	-	-	-	-	-	+	-	1004476	<i>Deftia acidovorans</i> 99.9%	C	<i>Deftia</i> sp. 99% EF426439.1
32	No	Bacillus-	-	-	-	-	-	-	+	-	1014476	<i>Deftia acidovorans</i> 99.9%	C	<i>P. aeruginosa</i> 99% EF527425.1
35*	No	Bacillus-	-	-	-	-	-	-	+	-	1014476	<i>Deftia acidovorans</i> 99.9%	C	<i>P. aeruginosa</i> 99% EF527425.1
30*	No	Bacillus-	+	-	-	-	+	-	-	+	13S4575	<i>P. aeruginosa</i> 99.9%	B	
31	No	Bacillus-	+	-	-	-	+	-	-	+	13S4575	<i>P. aeruginosa</i> 99.9%	B	
38	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%	D	
39	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	1474575	<i>P. aeruginosa</i> 67.9%	D	
40*	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	1474575	<i>P. aeruginosa</i> 67.9%	D	<i>P. aeruginosa</i> 99% EF527425.1
41	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	1474575	<i>P. aeruginosa</i> 67.9%	D	
2	No	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	0342477	<i>P. putida</i> 93.6%	Single	<i>P. putida</i> 100% CP000926.1
3	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	13S4555	<i>P. aeruginosa</i> 99.9%	Single	<i>P. aeruginosa</i> 99% EU381200.1
4	No	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	0142457	<i>P. putida</i> 99.7%	Single	<i>P. putida</i> 100% CP000926.1
7	No	Bacillus-	+	-	-	-	-	-	+	+	150655	<i>Pseudomonas</i> spp. -	Single	<i>P. alcaligenes</i> 99% EU240201.1
8	No	Bacillus-	-	-	-	-	-	-	+	+	1040651	<i>P. stutzeri</i> 96.5%	Single	<i>P. stutzeri</i> 100% AF094748.1
9	No	Bacillus-	-	-	-	-	-	-	+	+	1040651	<i>P. stutzeri</i> 96.5%	Single	<i>P. stutzeri</i> 100% EU636773.1
10	No	Bacillus-	-	-	-	-	-	-	+	+	0450300	<i>B. vesicularis</i> 89.6%	Single	<i>Pseudomonas mexicana</i> 99% AV124875.1
27	No	Bacillus-	-	-	-	-	-	-	+	+	1140637	Unacceptable profile	Single	<i>Pseudomonas</i> sp. 99% DQ416805.1
28	No	Bacillus-	-	-	-	-	-	-	+	+	1667740	<i>Rhizobium radiobacter</i> 99.9%	Single	<i>Rhizobium</i> sp. 100% DQ879665.1
29	No	Bacillus-	-	-	-	-	-	-	+	+	5041473	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> 98.5%	Single	<i>Acinetobacter</i> sp. 100% EU427315.1
37	Yes	Bacillus-	+	+	+	+	+	+	-	+	13S4575	<i>P. aeruginosa</i> 98.1%	Single	<i>P. aeruginosa</i> 99% EU583722.1

^a Identification and percentage of identification according to APWEEB™ database.

^b Phenotypical group defined by PhPWin®. Single means unique strain in a cluster.

^c Identification and percentage of similarity to the indicated sequence at NCBI database.

representative strains (Kühn et al., 1991) of phenotypic clusters for further identification by sequencing the gene of 16S rRNA.

2.5. Genotypic identification based on 16S rRNA

Representative strains of each defined phenotypic group were selected on the basis of the previous results and using the PhPWin® program (Bactus AB, Sweden). DNA extraction of each representative strain was performed by suspending several colonies in 200 µl of Tris-EDTA buffer (Tris 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM) and centrifuging at 14,000 rpm for 5 min. Two washing steps with Tris-EDTA buffer were then carried out. Finally, the cell suspension was boiled for 10 min and centrifuged for 5 min.

Next, an amplification PCR for the coding gene for 16S rRNA was performed using the universal 16S rRNA primers 27f (5'-AGAGTTT-GATCMTGGCTCAG-3') and 1492r (5'-TACGGYTACCTGTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991). PCR reactions were performed in a total volume of 50 µl using a final concentration of 1× PCR Buffer, 2.5 U Taq polymerase, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 0.4 µM of universal bacterial primers, and 2 µl of template DNA. PCR conditions were: 94 °C for 5 min, 35 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1.5 min. A final extension phase of 72 °C for 7 min was used. The products of these amplifications were purified with the QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen Inc, USA) and 2 µl of the purified DNA was used as a template for the sequencing reaction with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1 (Applied Biosystems, USA) and an ABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA), following the manufacturer's instructions. The sequences obtained were aligned and corrected with the BioEdit® program and compared to the sequences available in the international databases such as Blast (NCBI, USA) and the Ribosomal Database Project (Michigan State University, USA).

3. Results and discussion

Forty-one presumptive *P. aeruginosa* strains were isolated from water-bottling plants during this study. Twenty-seven of the 41 strains were identified as *P. aeruginosa* by the following assays, which are included in the ISO 16266:2006: production of pyocyanin, pyoverdine or pyorubin on Cetrimide agar–nalidixic acid, production of ammonium from acetamide, production of pyoverdine on King B agar and positive Oxidase reaction. In addition, the strains presented growth in Asparagine broth (apart from strain 24) and on Nutrient agar at 42 °C, and absence of growth on Nutrient agar at 4 °C. They also produced pyocyanin on King A plates. The rest of the strains were not identified as *P. aeruginosa* by the ISO 16266:2006 procedure (Table 1).

The API 20NE system identified 29 of the 41 strains as *P. aeruginosa* with a percentage of identification between 67.9 and 99.9%. Twenty-seven of these 29 strains were also identified by the procedures included in ISO 16266:2006. However, 2 strains identified as *P. aeruginosa* by the API 20NE system (strains 30 and 31) were not so classified by ISO 16266:2006 (Table 1).

Four phenotypic groups (A, B, C and D) and 11 single strains (not grouped) were obtained after the analysis of the PhP-48 microplates with the PhPWin® program. Groups A and D included 21 and 4 strains respectively, all of them identified as *P. aeruginosa* by the ISO assays and API 20NE system. Two strains (3 and 37), which were phenotypically close to group A, were also identified as *P. aeruginosa* by these two methods (Fig. 1). Group B (strains 30 and 31), which had been identified as *P. aeruginosa* by API 20NE system, but not by ISO criteria, was phenotypically related to group A.

The 16S rRNA sequencing analysis of representative strains for each population defined by PhPWin® confirmed populations A, B and D as *P. aeruginosa*. Strains 3 and 37 were also identified as *P. aeruginosa*. Consequently, 29 isolates were confirmed as *P. aeruginosa* by their 16S rRNA gene sequence. The other strains were identified as

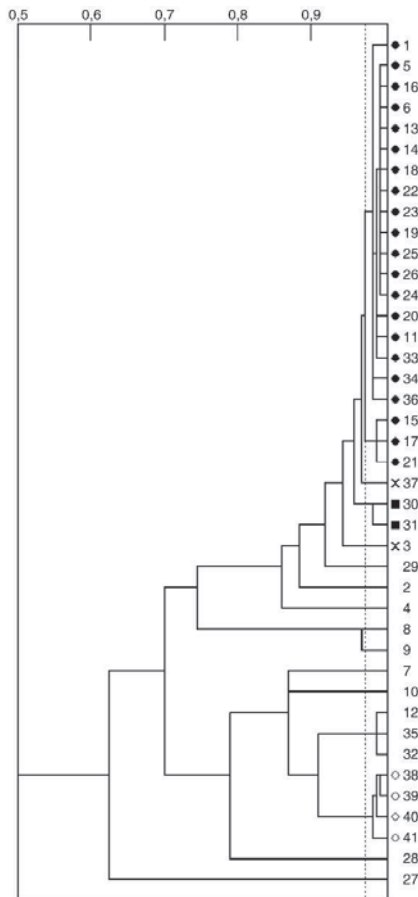


Fig. 1. Three phenotypic groups were identified as *P. aeruginosa* by the 16S rRNA sequence of their representative strain: group A (black circles), group B (black squares) and group D (white circles). Strains 3 and 37 (black X-shapes), which were also identified as *P. aeruginosa*, are close to groups A and B.

belonging to other species or genera such as *Pseudomonas*, *Delftia*, *Acinetobacter*, *Rhizobium* and *Pseudoxanthomonas* (Table 1).

Consequently, the tests proposed in ISO 16266:2006 provided adequate identification of 27 out of 29 genotypically confirmed *P. aeruginosa* isolates. However, two false negative identifications were detected, strains 30 and 31. ISO tests are mainly based on the ability of *P. aeruginosa* to produce certain pigments. Atypical non-pigmented strains have been isolated in other studies (Havelaar et al., 1985). The use of pigmentation for the identification of this organism can therefore be erroneous in some cases.

Concerning the additional assays tested, growth in Asparagine broth showed false negatives and false positives. Consequently, this procedure should be discarded as a confirmative test.

In contrast, the API 20NE system proved a powerful tool as it correctly identified all the confirmed isolates. This commercial system could be used by qualified laboratories when dealing with isolates of dubious identification.

King A medium and growth tests at 4 °C/42 °C can provide useful information, as they correctly discriminated all the strains studied, even strains 30 and 31, which were not identified with some of the basic and routine identification tests (Cetrimide agar with nalidixic acid, King B agar and Acetamide broth). Although King A medium and growth assays at 4 °C/42 °C are not considered essential tests in ISO 16266:2006, they could be highly appropriate for confirmative identification in some cases. Given that these tests are straightforward, rapid, and inexpensive, we recommend they be used for routine confirmation of *P. aeruginosa* when applying ISO 16266:2006.

Acknowledgements

This study was supported by the Spanish Government (research project CGL2007-65980-C02-01). Arnau Casanovas-Massana was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education.

References

- Anonymous, 1975. APHA. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 14th ed.
- Boyle, M., Ford, T., Maki, J.S., Mitchell, R., 1991. Biofilms and the survival of opportunistic pathogens in recycled water. *Waste Manag. Res.* 9, 465–470.
- Brown, V.I., Lowbury, E.J.L., 1965. Use of an improved cetrimide agar medium and of culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Pathol.* 18, 752.
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D., 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington, DC.
- Elomari, M., Coroler, L., Izard, D., Leclerc, H., 1995. A numerical taxonomic study of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 71–81.
- Geldreich, E.E., 1992. Visions of the Future in Drinking Water Microbiology. *J. NEWWA*. CVI, 1–8.
- González, C., Gutiérrez, C., Grande, T., 1987. Bacterial flora in bottled uncarbonated mineral drinking water. *Can. J. Microbiol.* 33, 1120–1125.
- Havelaar, A.H., During, M., Delfgou-Van Asch, E.H.M., 1985. Comparative study of membrane filtration and enrichment media for the isolation and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* from sewage, surface water, and swimming pools. *Can. J. Microbiol.* 31, 686–692.
- Hunter, P.R., 1993. The microbiology of bottled mineral waters. *J. Appl. Microbiol.* 74, 345–352.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numeric index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–2466.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301.
- Kühn, I., 1985. Biochemical fingerprinting of *Escherichia coli*: a simple method for epidemiological investigations. *J. Microbiol. Meth.* 3, 159–170.
- Kühn, I., Allestam, G., Stenström, A., Möllby, R., 1991. Biochemical fingerprinting of water coliform bacteria, a new method for measuring phenotypic diversity and for comparing different bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3171–3177.
- Legnani, P., Leoni, E., Rapuano, S., Turin, D., Valenti, C., 1999. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 153–158.
- Morais, P.V., Mesquita, C., Andrade, J.L., da Costa, M.S., 1997. Investigation of persistent colonization by *Pseudomonas aeruginosa*-like strains in a spring water bottling plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 851–856.
- Moreira, L., Agostinho, P., Morais, P.V., da Costa, M.S., 1994. Survival of allochthonous bacteria in a still mineral water bottled in polyvinyl chloride (PVC) and glass. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 334–339.
- Palleroni, N.J., 2005. Genus I: pseudomonads, 2nd edition. In: Benner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Springer, USA, p. 355. Part B.
- Römling, U., Wingender, J., Müller, H., Tümmler, B., 1994. A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1734–1738.
- Van Der Kooij, D., Oranje, J.P., Hijnen, W.A., 1982. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in tap water in relation to utilization of substrates at concentration of a few micrograms per liter. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1086–1095.
- Warburton, D.W., 1993. A review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada. Part 2. The need for more stringent standards and regulations. *Can. J. Microbiol.* 39, 158–168.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.

2.2 Article 2

Diversitat de les poblacions microbianes heteròtrofes per a la diferenciació d'aigües minerals naturals

International Journal of Food Microbiology, 153 (2012) 38-44

Arnau Casanovas-Massana i Anicet R. Blanch

Les aigües minerals naturals són ecosistemes molt complexos des d'un punt de vista fenotípic i genotípic i contenen una elevada diversitat de bacteris autòctons. La caracterització d'aquestes poblacions autòctones pot ser útil per tal de detectar alteracions en el procés d'embotellament i permetre prendre les mesures correctives adequades abans que l'aigua embotellada arribi al consumidor. Els objectius d'aquest estudi van ser: (1) descriure les poblacions bacterianes heteròtrofes aeròbies en diferents aigües minerals naturals mitjançant mètodes dependents del cultiu, i (2) determinar si aquestes poblacions eren prou específiques per ser discriminades de les d'altres aigües minerals naturals, mitjançant un mètode de caracterització fenotípica.

Per això es van seleccionar tres fonts (A, B i C) situades en diferents zones de l'estat espanyol. Es van prendre vuit mostres de cada font just abans de l'entrada a la planta embotelladora, quatre a l'estiu i quatre a l'hivern, i es va procedir a l'aïllament de soques bacterianes heteròtrofes aeròbies en dues temperatures diferents (22 ± 2 °C i 36 ± 2 °C). Els aïllats es van fenotipar bioquímicament amb les microplaques PhP-48 (Bactus AB, Suècia), i es van calcular els índexs de diversitat de Simpson (Di) i de similitud entre poblacions (Sp). Posteriorment, es va procedir a la seqüenciació del gen del 16S ARNr de les soques més representatives de cadascun dels clústers bioquímics calculats per tal de ser identificades. Finalment, es va assajar un mètode "ten-fold cross-validation" per a la identificació de l'origen d'una aigua mineral natural a partir del fenotipatge bioquímic d'un determinat nombre de soques aïllades.

Les fonts A i B presentaven diversitats poblacionals elevades, mentre que a la font C era menor, a causa d'una contaminació confirmada de *Pseudomonas aeruginosa*. L'estudi de les similituds va indicar que la composició de les poblacions bacterianes heteròtrofes eren significativament diferents entre les aigües. A més, la temperatura de creixement, així com l'estació de mostreig modificaven l'estructura i composició de les fonts A i B. Es van poder aïllar un total de 517 soques i es van identificar diversos gèneres bacterians, alguns rarament aïllats en aquests ecosistemes.

En conseqüència, la metodologia fenotípica aplicada va demostrar ser vàlida per a la identificació diferencial de la microbiota en aquests ambients. A més, el model experimental assajat va ser prou robust per permetre identificar l'origen d'una aigua mineral natural. Per tant, l'avaluació de la diversitat de bacteris heteròtrofs aerobis pot ser útil com a base per al seguiment de les aigües minerals naturals durant la seva vida.



Diversity of the heterotrophic microbial populations for distinguishing natural mineral waters

Arnau Casanovas-Massana*, Anicet R. Blanch

Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2011
Received in revised form 28 July 2011
Accepted 23 October 2011
Available online 29 October 2011

Keywords:

Natural mineral water
Diversity
Heterotrophic bacteria
Autochthonous microbiota
Microbial water quality

ABSTRACT

In the recent years the consumption of natural mineral waters has risen all over the world, becoming a usual alternative for tap water and other beverages. Natural mineral waters are complex environments containing a high diversity of autochthonous microbiota. The identification and characterization of this indigenous microbiota may help to detect changes occurring in the different steps of the bottling process and take preventive measures before the bottled water arrives to the consumer.

The aims of this study were to describe the bacterial heterotrophic populations in natural mineral waters with a cultivation-dependent method and determine whether their autochthonous microbiota were specific enough to be clearly distinguished from that of other natural mineral waters with a phenotypic-based method. For this purpose, water from three independent Spanish springs was sampled in two seasons (winter and summer) and heterotrophic aerobic bacterial strains were isolated at two temperatures (22 ± 2 °C and 36 ± 2 °C) on R2A agar. Isolates were phenotyped biochemically with Php-48 plates (Bactus AB, Sweden), and the indexes of diversity and similarity between populations were calculated. The 16S rRNA gene of the most representative strains of each biochemical cluster was sequenced for its identification. Finally, a ten-fold cross-validation method was assayed for the identification of the origin of a natural mineral water when phenotyping a set of isolates. High levels of diversity were found at all sites. One of the sources was found to present less diversity due to a confirmed contamination with *Pseudomonas aeruginosa*. The study of the similarities showed that growing temperatures and seasons caused significant differences in structures and composition at the sources. In addition, several bacterial species were isolated and identified, some of them rarely isolated in natural mineral waters, revealing the complexity and lack of knowledge of these ecosystems.

Consequently, the applied phenotypic methodology was found to be feasible for differential identification of microbiota in these environments. Moreover, the experimental model assayed was strong enough to identify the origin of a natural mineral water. It may thus be possible to confirm that the evaluation of diversity of heterotrophic aerobic bacterial populations could be applied to identify bottled water sources.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The estimated *per capita* consumption of bottled water in the European Union rose from 43 l in 2003 to 105 l in 2008 (European Federation of Bottled Water (EFBW), 2010; Venieri et al., 2006). Various factors may have contributed to this increase: dissatisfaction with the odor and taste of tap water due to chlorine, greater consumer concern about the safety of tap water, or the use of bottled water as a substitute for other beverages (Abrahams et al., 2000; Doria, 2006; Papapetropoulou, 1998; Warburton, 2000). In addition, the successful promotion of bottled water as clean, pure, safe and especially suitable for infants may also have increased its consumption (Bharath et al., 2003; Misund et al., 1999).

Most bottled waters are taken from springs or ground waters. Natural mineral waters are not sterile environments, but complex ecosystems with a high phenotypic and genetic diversity of autochthonous bacteria (Rosenberg, 2003). The number of bacteria at the source point is generally low, although a wide range of genera have been reported, such as fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Acidovorax*, *Paucimonas*, *Brevundimonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Arthrobacter* and *Corynebacterium*, among others (Bischofberger et al., 1990; Guillot and Leclerc, 1993; Manaia et al., 1990; Mavridou, 1992; Shwaller and Schmidt-Lorenz, 1980; Vachee et al., 1997).

The European Union directive states that natural mineral waters cannot be subjected to any disinfection treatment, including sterilization, pasteurization, or any other procedure to remove or destroy microorganisms. Therefore, natural mineral waters contain the original microbiota of the source (Anonymous, 2009). Furthermore, experimental and epidemiological data show that the indigenous bacteria found in natural mineral waters according to European standards have not been

* Corresponding author at: Departament de Microbiologia, Avinguda Diagonal, 645, E-08028, Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: +34 934039044; fax: +34 934039047.
E-mail address: arnaucasanovas@ub.edu (A. Casanovas-Massana).

associated with any detectable human disease (Bohmer and Resch, 2000; Leclerc and Moreau, 2002; Payment et al., 1997).

Natural mineral waters complying with the European directive must not be contaminated with allochthonous organisms such as parasites, pathogens or indicators of fecal pollution. However, several studies have reported the occurrence of *E. coli*, protozoa, enteric viruses, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* and even *Vibrio cholerae* in bottled natural mineral waters (Beuret et al., 2002; Bharath et al., 2003; Blake et al., 1977; Evans et al., 2003; Gassilloud et al., 2003; Legnani et al., 1999; Mavridou et al., 1994; Obiri-Danso et al., 2003; Salazar et al., 1982; Schindler et al., 1995). In most cases, the source of these contaminants has been attributed to the bottling plant: pumps, pipes, caps and bottles (Warburton et al., 1986; Warburton, 1993). Nevertheless, the potential contamination of the sources with pathogenic microorganisms should not be underestimated. As a result, both water bottling plants and natural mineral waters have to be strictly controlled and monitored to prevent any contamination that may result in a health risk (Hrudey et al., 2006).

The identification and characterization of the indigenous microbiota may help operators to detect changes occurring in the source, during the bottling process, or in transportation or storage. They could then take preventive measures before the bottled water is released to sale. Moreover, the knowledge of the microbial composition and structure of the water before bottling could be used as a basis to track the water after bottling.

Various research groups have characterized the autochthonous microbiota of natural mineral waters under different approaches (Bischofberger et al., 1990; Gonzalez et al., 1987; Guillot and Leclerc, 1993; Guyard et al., 1999; Loy et al., 2005; Mavridou, 1992; Papapetropoulou, 1998; Shwaller and Schmidt-Lorenz, 1980; Venieri et al., 2006). It is widely known that cultivation-dependent methods recover only a fraction of the total heterotrophic bacteria present in a sample (Allen et al., 2004; Loy et al., 2005; Wang et al., 2009). Nevertheless, as new molecular methods are expensive, complex and they also suffer from certain biases (Jofre and Blanch, 2010), this study was based on an usual cultivation method using R2A agar, a specifically designed medium to isolate water-based bacteria (Reasoner and Geldreich, 1985) which is routinely used in water-bottling plants. This medium provides higher productivity and diversity than other media when using low incubation temperatures (20–28 °C) and long incubation times (5–7 days) (Massa et al., 1998).

Therefore, the aims of this study were to describe the bacterial heterotrophic populations in natural mineral waters with a cultivation-dependent method and determine whether their autochthonous microbiota were specific enough to be clearly distinguished from that of other natural mineral waters with a phenotypic-based method.

For this purpose, natural mineral waters from three Spanish springs used in different water-bottling plants were examined using five approaches: (1) the heterotrophic bacteria were isolated at two temperatures (22 ± 2 °C and 36 ± 2 °C) and seasons (winter and summer) and characterized phenotypically; (2) phenotypic groups of isolates were identified genetically, (3) phenotypical comparisons among populations and subpopulations were carried out; (4) when *P. aeruginosa* isolates were found, they were confirmed following standard procedures (Anonymous, 2006); and (5) a ten-fold cross-validation model was assayed to track the origin of the water.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Three geographically and climatically independent Spanish springs (sources A, B and C) were selected for this study. Eight water samples were taken at each source just before its entry into the bottling plant, four of them in summer and the other four in winter. The recorded

temperatures in the spring waters differed less than 1 °C between seasons. All samples were collected with aseptic techniques, kept at 4 °C, and analyzed within 24 h.

Volumes of water between 20 mL and 100 mL were filtered through 0.44 µm nitrocellulose membranes (Millipore, USA). Half the filters were incubated on R2A plates (Oxoid, CM0906, England) at 22 ± 2 °C for 144 ± 2 h. The other half were incubated on R2A plates (Oxoid, CM0906, England) at 36 ± 2 °C for 144 ± 2 h. After incubation, a maximum of 50 strains from each spring and growing temperature were randomly isolated from the plates and subcultured on R2A plates (Oxoid, CM0906, England). This procedure was performed for each source and growing temperature in two seasons: winter and summer. Pure culture was confirmed by streak-plate technique on R2A plates (Oxoid, CM0906, England) at 22 ± 2 °C or 36 ± 2 °C for 144 ± 2 h and Gram staining. The number of strains isolated was assumed to be representative of the natural heterotrophic bacterial populations isolated (Bianchi and Bianchi, 1982). In parallel, all samples were tested for the presence of parasites, *Escherichia coli* and other coliforms, fecal streptococci, sporulated sulphite-reducing anaerobes and *Pseudomonas aeruginosa* as stated in the European Union directive (Anonymous, 2009).

2.2. Biochemical characterization

All isolates were phenotyped biochemically using PhP-48 microplates of the Phene-Plate System (Bactus AB, Sweden), following the manufacturer's instructions. The PhP-48 plates consist of 96-well microplates with dehydrated reagents, which were chosen to provide a high level of discrimination among species. Each plate allows the biochemical fingerprinting of two distinct isolates (48 biochemical tests per isolate). The biochemical fingerprinting procedure is described elsewhere (Kühn, 1985).

Cultures were prepared on R2A plates (Oxoid, CM0906, England) for 96 ± 2 h at 22 ± 2 °C or 36 ± 2 °C depending on the isolation temperature. Cell suspensions were prepared by harvesting the cultures in a solution of distilled water at 0.1% w/v proteose peptone (Difco, 211677, France) and 0.011% w/v bromothymol blue (Merck, 1030260005, Germany). Aliquots of 150 µl of bacterial suspension were added to each well. The inoculated microplates were incubated at 22 ± 2 °C or 36 ± 2 °C respectively. *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10332T was used as an internal control in all the experiments to confirm reproducibility. Growth in the wells was measured in a spectrophotometer at 620 nm with the iEMS Reader MF (Labsystems, Finland) at 16 h, 40 h and 64 h for the strains growing at 36 ± 2 °C, and at 16 h, 40 h, 64 h, 88 h and 122 h for the strains growing at 22 ± 2 °C. The biochemical profiles were calculated as described elsewhere (Kühn et al., 1991) using the software PhPWin® (Bactus AB, Sweden).

2.3. Phenotypic characterization and indexes of population diversity and similarity

The structure and composition of the populations were analyzed for each sample by cluster analysis on the basis of the biochemical PhP phenotypes of the isolates using the unweighted pair group method analysis (UPGMA). Isolates for each population were pooled to determine the main biochemical PhP phenotypes (main clusters) of bacterial populations. Clusters were defined by isolates showing a similarity index equal to or higher than 0.965. Isolates showing the highest minimum and the highest mean similarity to all other isolates belonging to the same PhP phenotype were selected as representative strains (Kühn et al., 1991) of phenotypic clusters for further identification by sequencing the gene of 16S rRNA.

Simpson's diversity index (Di) was used to calculate the diversity of bacterial populations and subpopulations (Hunter and Gaston, 1988). The Sp, a similarity population coefficient that measures the proportion of isolates that are identical in two samples was also calculated for each

natural mineral water and its subpopulations, as previously described (Hunter and Gaston, 1988; Kühn et al., 1991).

2.4. Genotypic characterization

Representative strains of each defined phenotypic group were selected using the PhPWin® program (Bactus AB, Sweden). DNA extraction, amplification and 16S rRNA sequencing of each representative strain was performed as previously described (Casanovas-Massana et al., 2010). Sequences were submitted for homology searches to the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) and deposited in GenBank under the accession numbers reported in Table 3.

2.5. *Pseudomonas aeruginosa* confirmation

Representative isolates identified as *P. aeruginosa* by their 16S rRNA sequence were subjected to the tests recommended by ISO 16266:2006 for the identification of *P. aeruginosa* in water samples: Cetrimide agar-nalidixic acid, King B agar, Acetamide broth and Oxidase test. Additional tests (King A agar and growing at 4 °C/42 °C) were also performed (Casanovas-Massana et al., 2010).

2.6. Ten-fold cross-validation modeling

Training an algorithm and evaluating its statistical performance on the same data yields an overoptimistic result. However, testing the algorithm on new data can yield a good estimate of its performance. In our case, only a limited amount of data was available, so we split the data: part of it (the training sample) was used to train the algorithm, and the rest (the validation sample) was used to evaluate the performance of the algorithm. The validation sample can be considered “new data” as long as the data are independent and identically distributed. A single data split yields a validation estimate of the risk, and averaging over several splits yields a cross-validation estimate (Geisser, 1975).

Therefore, for each source, ten independent sets of 25 isolates were randomly selected within all strains (including summer, winter, 22 °C and 37 °C isolates). Then, each set was compared to the rest of the isolates from the source, calculating the Simpson similarity index (Sp) between populations. The arithmetic mean and standard deviation of Sp values were calculated for the ten-fold cross-validation sets assayed.

3. Results

Water coming from sources A and B fulfilled the European health criteria for microbiological analysis at source and were appropriate for human consumption (Anonymous, 2009). However, a contamination with *Pseudomonas aeruginosa* was detected when analyzing water samples from source C showing that it could not be considered a natural mineral water, and thus be suitable for bottling.

The counts of aerobic heterotrophic bacteria on R2A in all sources were lower than 100 CFU per ml at 22 ± 2 °C or 20 CFU per ml at 36 ± 2 °C in all cases (data not shown). In total 517 strains were isolated and subjected to biochemical fingerprinting: 161 from source A, 159 from source B, and 197 from source C (Table 1). The correlations between the biochemical profiles of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10332T used as internal control were always higher than 0.975, proving that the method and its application was reproducible.

Sources A and B showed high levels of diversity ($Di \geq 0.92$), for the whole population and its subpopulations (summer/winter and 22 °C/36 °C). Consequently, in sources A and B there was no dominant phenotype among the isolated strains, but a range of different biochemical profiles. In contrast, source C showed slightly lower diversity indexes, particularly at 36 ± 2 °C and in winter subpopulations ($Di < 0.8$),

Table 1

Number of strains isolated from each source, diversity indexes for each population and similarity between populations.

Population	Number of isolates	Diversity (Di)	Similarity between populations (Sp)	
			Source B	Source C
Source A	161	0.970	0.016	0.002
Source B	159	0.971	–	0.014
Source C	197	0.879	–	–

showing that a few prevailing phenotypes accounted for the majority of the population (Tables 1 and 2).

Growing temperatures and seasons were responsible for differences in the structures and composition of populations in sources A and B, as the Sp between subpopulations were found to be low (Table 2). Source C showed different behavior, as all its subpopulations were similar. Almost half of the isolated strains at source C were identified as *Pseudomonas aeruginosa*, as discussed above and below.

Considering the three sources overall, the extremely low levels of pairwise Sp values between the three populations studied ($Sp < 0.02$) (Table 1 and Fig. 1) showed that the structure and composition of the heterotrophic bacterial populations were significantly different. Furthermore, the ten-fold cross-validation model assayed showed high levels of similarity between each set of strains and its original source (A: 0.27 ± 0.06 ; B: 0.23 ± 0.04 ; C: 0.46 ± 0.05) (Fig. 2).

Ten strains from source A, eight strains from source B and nine strains from source C—which were representative of 100, 58 and 162 isolates (62%, 36% and 82% of the whole population, respectively)—were selected and identified by their 16S rRNA gene sequencing. Table 3 shows the identification of each strain based on the closest relative strain at the NCBI database.

The genus *Pseudomonas* was found to be the main group in all sources, representing up to 56% of all isolates in source C. Different species of this genus were identified, such as *P. alcaligenes*, *P. mandelii*/*P. fluorescens* in source A, and both *P. putida* and *P. aeruginosa* in source C, although other *Pseudomonas* remained unidentified, especially in sources B and C. In source C, 90 isolates belonging to 3 phenotypic clusters were identified as *P. aeruginosa* by the sequencing of their most representative strain. These representative strains were confirmed as *P. aeruginosa* by all the assays included in ISO 16266:2006: production of pyocyanin, pyoverdinin or pyorubin on Cetrimide agar-nalidixic acid, production of ammonium from acetamide, production of pyoverdinin on King B agar and positive Oxidase reaction. In addition, the strains

Table 2

Number of strains isolated from each source and subpopulation; diversity indexes (Di) for each subpopulation; and similarity between subpopulations (Sp).

Subpopulation	Number of isolates	Diversity (Di)	Similarity (Sp)
Source A			
Winter	72	0.936	0
Summer	89	0.943	
22 °C	91	0.935	
37 °C	70	0.950	
Source B			
Winter	64	0.945	0.006
Summer	95	0.944	
22 °C	94	0.920	
37 °C	65	0.996	
Source C			
Winter	99	0.867	0.286
Summer	98	0.810	
22 °C	98	0.908	
37 °C	98	0.732	

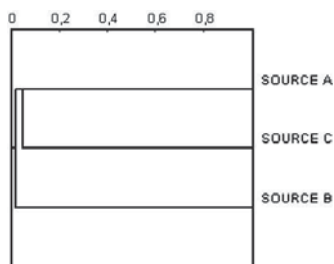


Fig. 1. Clustering of the population similarity indexes (Sp) between the three sources by the UPGMA method.

presented growth on Nutrient agar at 42 °C, absence of growth on Nutrient agar at 4 °C and produced pyocyanin on King A plates.

In source A, *Pseudomonas* spp. accounted for 20% of all the isolates. Moreover, three betaproteobacteria (*Acidovorax* spp., *Delftia* spp. and *Hermiimonas* spp.) genera represented together a third of the total isolates. *Sphingomonas* spp. and *Rhizobium* spp., two alphaproteobacteria, formed around 25% of the population.

In source B, *Pseudomonas* spp. represented 15% of all the isolates. Remarkably, strains of the genus *Mycobacterium* accounted for almost 25% of the population. Moreover, three more isolates were found to be *Janthinobacterium lividum*.

In source C, besides *Pseudomonas* spp., 25 strains were identified as *Delftia* spp., and 16 as *Stenotrophomonas* spp. Five strains isolated in source C were identified as *Aeromonas hydrophila*. Finally, a cluster represented by strain C18 might be considered new bacterial species as its sequence similarity to its closest relative is 93%. This is below the cut-off of 97%, which is recommended to delineate new bacterial species (Stackebrandt and Goebel, 1994).

4. Discussion

High diversity levels were found in all natural mineral waters and a high number of genera were identified confirming the complexity of these ecosystems.

Pseudomonas spp. was found to be the main group at all sources. Several studies have reported the species of this genus as being the most commonly isolated in natural mineral waters (Bischofberger et al., 1990; Guillot and Leclerc, 1993; Morais et al., 1997; Shwaller and Schmidt-Lorenz, 1980; Vachee et al., 1997). Their ability to grow supported by a wide range of organic substrates without any specific nutritional requirements, explain their ubiquity and the high number of strains isolated. However, the presence of 90 *P. aeruginosa* isolates in source C revealed that this natural mineral water was contaminated.

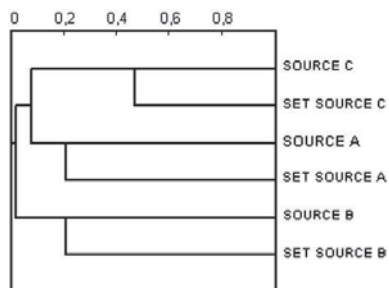


Fig. 2. Clustering of the arithmetic mean of similarity values calculated for the ten-fold cross-validation model by the UPGMA method.

Table 3

Identification of most representative strains and percentage of similarity to the closest relative strain at the NCBI database.

Strain	Accession no.	Closest relative and its accession no.	Number of strains in the cluster
A11	HQ332147	<i>Acidovorax facilis</i> 99% EU730927.1	19
A13	HQ332148	<i>Hermiimonas glaciei</i> 100% EU489741.1	7
A66	HQ332149	<i>Pseudomonas</i> sp. 100% AY689025.1	10
A80	HQ332152	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> 100% EU240201.1	16
A115	HQ332150	<i>Pseudomonas mandelii</i> 100% FN811901.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i> 100% AY538263.1	7
A119	HQ332151	<i>Pseudomonas</i> sp. 100% AY689025.1	6
A134	HQ849070	<i>Delftia</i> sp. 100% GQ375787.1	10
A159	HQ332157	<i>Sphingomonas</i> sp. 100% EU828524.1	8
A163	HQ332156	<i>Sphingomonas</i> sp. 100% EU828524.1	7
A182	HQ332154	<i>Rhizobium</i> sp. 99% HM486521.1	10
B22	HQ674991	<i>Mycobacterium</i> sp. 99% HM107174.1	18
B87	HQ674994	<i>Pseudomonas</i> sp. 100% GU979228.1	4
B104	HQ674995	<i>Mycobacterium sacrum</i> 99% AY235429.1	3
B133	HQ674996	<i>Mycobacterium</i> sp. 99% EU167967.1	3
B144	HQ674997	<i>Mycobacterium</i> sp. 99% HM107174.1	2
B148	HQ674998	<i>Mycobacterium</i> sp. 99% FJ172310.1	2
B186	HQ675000	<i>Janthinobacterium lividum</i> 100% NR_026365.1	3
B198	HQ675001	<i>Pseudomonas</i> sp. 99% AM913961.1	23
C3	HQ674983	<i>Pseudomonas putida</i> 99% HQ259593.1	10
C11	HQ849069	<i>Aeromonas hydrophila</i> 99% HQ259695.1	5
C18	HQ674984	<i>Ochrobactrum intermedium</i> 93% FJ887929.1	5
C30	HQ674986	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 99% HQ283487.1	23
C69	HQ674988	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 99% FJ972538.1	62
C111	HQ674985	<i>Pseudomonas</i> sp. 100% EU043321.1	11
C129	HQ674987	<i>Delftia</i> sp. 100% GQ375787.1	25
C175	HQ674989	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 99% HQ283487.1	5
C198	HQ674990	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 100% FJ405363.1	16

According to European regulations (Anonymous, 2009), *P. aeruginosa* is a human opportunistic pathogen which should not be present in 250 ml drinking water. Consequently, our data revealed that water from source C was contaminated and could not be considered a natural mineral water. The bottling plant was advised to detect the origin of the contamination and properly disinfect the bottling plant to prevent any further health risks.

Two Comamonadaceae genera, *Delftia* spp. and *Acidovorax* spp., were isolated in sources A and C, and formed around 15% of the total isolates from each source. Some authors have pointed out the presence of *Acidovorax* spp. in natural mineral water and other drinking water, accounting for up to 10% of the populations (Bischofberger et al., 1990; Lee et al., 2010; Shwaller and Schmidt-Lorenz, 1980;

Zheng and Kellogg, 1994). However, to our knowledge no paper has reported the presence of *Deftia* spp. in natural mineral waters, although it has been detected in soils and other aquatic systems such as wastewater, snow, lake water and tap water (De Gussemé et al., 2011; Humrighouse et al., 2006; Jorgensen et al., 2009; Mayer et al., 2006; Willems et al., 1991; Zhang et al., 2010). Therefore, these species are well adapted to various aquatic environments and then potentially to groundwaters.

Remarkably, strains of the genus *Mycobacterium* genus in source B accounted for almost 25% of the total isolates. Environmental nontuberculous mycobacteria have been isolated from samples from various sources, including water distribution systems and bottled water (Le Dantec et al., 2002; Papapetropoulou et al., 1997). Many environmental mycobacteria are considered nonpathogenic, but others have been proposed as human opportunistic pathogens (Primm et al., 2004). Because of the low infectivity of environmental mycobacteria and the uncertainty surrounding their epidemiological status, no measures should yet be implemented to remove them from drinking-water (Szewzyk et al., 2000).

Stenotrophomonas spp. was isolated in source C. This genus has been isolated from drinking water in many studies (Guillot and Leclerc, 1993; Vachee et al., 1997; Wilkinson and Kerr, 1998). As well as the genera reported above, some species are considered opportunistic pathogens. However, many of the species described have been recovered from natural environments, especially from soil (Heylen et al., 2007; Wolf et al., 2002; Yoon et al., 2006) and may be autochthonous in natural mineral waters.

Moreover, *Aeromonas hydrophila* was isolated in source C. *A. hydrophila* has been related to human diseases (Merino et al., 1995) and it has been suggested as an indicator of hygienic quality of water (Massa et al., 2001). Nevertheless, some studies pointed out that it may occur naturally in natural mineral waters (Crocì et al., 2001; Gonzalez et al., 1987; Quevedo-Sarmiento et al., 1986). Further research on the ecology of *A. hydrophila* is needed as the epidemiological significance of its presence in natural environments remains to be established.

An isolate representing 15 strains in source A were identified as *Sphingomonas* spp. *Sphingomonas* species are widely distributed in nature. They have been recovered from river water (Tabata et al., 1999), natural mineral water (Ferreira et al., 1996; Vachee et al., 1997) and drinking water (Gauthier et al., 1999). The presence of *Sphingomonas* spp. in drinking water may be much more common than has been reported so far, as they grow slowly and are easily masked by other bacteria in routine microbiological analysis: this deserves further study (Koskinen et al., 2000).

Ten isolates at source A belonged to *Rhizobium* spp. To our knowledge this genus has not previously been isolated from natural mineral waters, and it is mainly found in root and soil samples. However, some molecular-based studies in aquatic environments have pointed out the presence of significant fractions of genes and proteins that are highly similar to known proteins observed in *Rhizobium* spp. (Schmeisser et al., 2003; Takai and Sako, 1999). As a result, we cannot rule out the presence of this genus in natural mineral waters, and this should be examined in further studies.

Two Oxalobacteraceae species were isolated in sources A and B. In source A, a cluster of seven isolates were identified as *Heminiimonas glaciei*. This species, isolated from Greenland glacial ice, was recently proposed as a new species (Loveland-Curtze et al., 2009). The genus contains other species isolated from mineral and spring waters (Fernandes et al., 2005; Kämpfer et al., 2006). More complete knowledge of the distribution and ecology of this genus is required to assess its presence in drinking water. In source B, a cluster of three isolates was found to be *Janthinobacterium lividum*, another oxalobacteraceae species which has been widely isolated from soil and aquatic environments (Pantarella et al., 2007).

This extensive characterization reveals that many isolated genera had already been described in natural mineral waters and, therefore,

are widely accepted as part of the indigenous microbiota. However, others have been detected for the first time in our study. We could even detect the presence of a potential new species in source C, confirming that there is still a lack of knowledge about the composition of the indigenous microbiota of natural mineral waters and their dynamics. Although culture-dependent methods can only retrieve a part of the total taxa present in an environment, they have the potential to retrieve rare taxa as well as abundant ones, instead of PCR-dependent techniques which focus only in the abundant taxa (Casamayor et al., 2000; Muyzer et al., 1993; Pedrós-Alió, 2006). As a result, both culture-dependent and molecular-based methods may help to improve our understanding of the diversity and ecological and epidemiological significance of the autochthonous microbiota in natural mineral waters.

The results obtained with the similarity indexes revealed, as expected, that the structure and composition of populations isolated at different temperatures were different, since temperature plays a major role in the selection of microbiota. On the other hand, the differences observed between seasons were surprisingly high, as natural mineral waters are believed to be conservative ecosystems, with little variation in their physical and chemical properties. As a result, the associated microbial populations were assumed to be relatively constant. However, studies performed in other aquatic environments indicate that slight changes in water temperature could alter the composition and prevalence of the microbial populations (Skirmisdottir et al., 2000). This is because temperature is one of the environmental factors involved in the induction of viable but nonculturable states of bacteria (Oliver, 1993). Therefore, a first hypothesis would be that the slight temperature variations due to the season may affect the structure and diversity of the heterotrophic microbial populations. Another would be that the variable suction force by the bottling plant mobilizes different environments within the aquifer.

To our knowledge no study has compared natural mineral water bacterial populations isolated in different seasons. Further efforts involving a large number of springs are required to confirm these results. Nevertheless, some isolates occurred in both seasons, which indicate that the autochthonous population structure varies depending on the temperature and other characteristics of the water.

The differences observed in the structure and composition of the three sources overall were strong enough to be clearly distinguished by the phenotypical-based system showing that the biochemical fingerprinting applied is a feasible methodology for differential identification of microbiota in these environments. These differences are especially interesting in sources A and B, which are natural mineral waters valid for bottling and human consumption. No conclusions regarding similarities to the other sources can be drawn in source C, due to the contamination detected. Notwithstanding, this contamination could explain the low diversity observed in source C, considering that *P. aeruginosa* would compete with autochthonous bacteria and hide the natural diversity. Moreover, the strong similarities between subpopulations, unlike sources A and B, are reasonable as *P. aeruginosa* phenotype is clearly dominant over the others.

Furthermore, the experimental ten-fold cross-validation model was strong enough to identify the origin of a natural mineral water performing the biochemical fingerprinting of 25 representative strains.

Concluding, the findings of the current study highlight the need for further efforts to analyze a greater number of natural mineral waters. It may thus be possible to confirm that the evaluation of diversity of heterotrophic aerobic bacterial populations could be applied to identify bottled water sources and as a basis for tracking natural mineral waters during their lifetime.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Lluís Belanche from the Polytechnic University of Catalonia for his support in the statistical analysis. This study was

supported by the *Generalitat de Catalunya* (grant 2009SGR1043) and by the *Xarxa de Referència en Biotecnologia* (XRB). Arnau Casanovas-Massana was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education.

References

- Abrahams, N.A., Hubbell, B.J., Jordan, J.L., 2000. Joint production and averting expenditure measures of willingness to pay: do water expenditures really measure avoidance costs? *American Journal of Agricultural Economics* 82, 427–437.
- Allen, M.J., Edberg, S.C., Reasoner, D.J., 2004. Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology* 92, 265–274.
- Anonymous, 2006. ISO 16266:2006 - Water quality - Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* - Method by membrane filtration. International Organization for Standardization.
- Anonymous, 2009. Directive 2009/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009 on the exploitation and marketing of natural mineral water. Official Journal of the European Union L164, 45–58.
- Beuret, C., Kohler, D., Baumgartner, A., Luthi, T.M., 2002. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1925–1931.
- Bharath, J., Mosodeen, M., Motilal, S., Sandy, S., Sharma, S., Tessaro, T., Thomas, K., Umamaheswaran, M., Simeon, D., Adesiyun, A.A., 2003. Microbial quality of domestic and imported brands of bottled water in Trinidad. *International Journal of Food Microbiology* 81, 53–62.
- 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.
- Bischofberger, T., Cha, S.K., Schmitt, R., König, B., Schmidt-Lorenz, W., 1990. The bacterial flora of non-carbonated, natural mineral water from the springs to reservoir and glass and plastic bottles. *International Journal of Food Microbiology* 11, 51–71.
- Blake, P.A., Rosenberg, M.L., Florenca, J., 1977. Cholera in Portugal, 1974. II. Transmission by bottled mineral water. *American Journal of Epidemiology* 105, 344–348.
- Bohmer, H., Resch, K.L., 2000. Mineral water or tap water? A systematic analysis of the literature concerning the question of microbial safety. *Forschende Komplementärmedizin und Klassische Naturheilkunde = Research in Complementary and Natural Classical Medicine* 7, 5–11.
- Casamayor, E.O., Schafer, H., Baneras, L., Pedros-Alío, C., Muyzer, G., 2000. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 499–508.
- Casanovas-Massana, A., Lucena, F., Blanch, A.R., 2010. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in water-bottling plants on the basis of procedures included in ISO 16266:2006. *Journal of Microbiological Methods* 81, 1–5.
- Croci, L., Di Pasquale, S., Cozzi, L., Toti, L., 2001. Behavior of *Aeromonas hydrophila* in bottled mineral waters. *Journal of Food Protection* 64, 1836–1840.
- De Gussemé, B., Vanhaecke, L., Verstraete, W., Boon, N., 2011. Degradation of acetaminophen by *Deltaia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor. *Water Research* 45, 1829–1837.
- Doria, M.F., 2006. Bottled water versus tap water: understanding consumers' preferences. *Journal of Water and Health* 4, 271–276.
- European Federation of Bottled Water (EFBW), 2010. Bottled water facts from <http://efbw.eu/bwf.php?classement=072010>.
- Evans, M.R., Ribeiro, C.D., Salmon, R.L., 2003. Hazards of healthy living: bottled water and salad vegetables as risk factors for campylobacter infection. *Emerging Infectious Diseases* 9, 1219–1225.
- Fernandes, C., Rainey, F.A., Nobre, M.F., Pinhal, I., Folhas, F., da Costa, M.S., 2005. *Herminiimonas fonticola* gen. nov. sp. nov., a Betaproteobacterium isolated from a source of bottled mineral water. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 596–603.
- Ferreira, A.C., Morais, P.V., Gomes, C., da Costa, M.S., 1996. Computer-aided comparison of protein electrophoretic patterns for grouping and identification of heterotrophic bacteria from mineral water. *The Journal of Applied Bacteriology* 80, 479–486.
- Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., Gantzer, C., 2003. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3965–3969.
- Gauthier, V., Redercher, S., Block, J.C., 1999. Chlorine inactivation of *Sphingomonas* cells attached to goethite particles in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 355–357.
- Geisser, S., 1975. The predictive sample reuse method with applications. *Journal of the American Statistical Association* 70, 320–328.
- Gonzalez, C., Gutierrez, C., Grande, T., 1987. Bacterial flora in bottled uncarbonated mineral drinking water. *Canadian Journal of Microbiology* 33, 1120–1125.
- Cuillot, E., Leclerc, H., 1993. Biological specificity of bottled natural mineral waters: characterization by ribosomal rRNA nucleic acid gene restriction patterns. *Journal of Applied Microbiology* 75, 292–298.
- Guyard, S., Mary, P., Defives, C., Hornez, J.P., 1999. Enumeration and characterization of bacteria in mineral water by improved direct viable count method. *Journal of Applied Microbiology* 86, 841–850.
- Heylen, K., Vanparys, B., Peirsegaale, F., Lebbe, L., De Vos, P., 2007. *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humii* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2056–2061.
- Hrudey, S.E., Hrudey, E.J., Pollard, S.J.T., 2006. Risk management for assuring safe drinking water. *Environment International* 32, 948–957.
- Humrighouse, B.W., Domingo, J.W.S., Revetta, R.P., Lamendella, R., Kely, C.A., Oerther, D.B., 2006. Microbial characterization of drinking water systems receiving groundwater and surface water as the primary sources of water. *Water Distribution Systems Analysis Symposium 2006*. American Society of Civil Engineers, pp. 1–14.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* 26, 2465–2466.
- Jofre, J., Blanch, A.R., 2010. Feasibility of methods based on nucleic acid amplification techniques to fulfil the requirements for microbiological analysis of water quality. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1853–1867.
- Jørgensen, N.O.G., Brandt, K.K., Nybroe, O., Hansen, M., 2009. *Deltaia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Deltaia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 2195–2199.
- Kämpfer, P., Busse, H., Falsen, E., 2006. *Herminiimonas aquatilis* sp. nov., a new species from drinking water. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 287–291.
- Koskinen, R., Ali-Vehmas, T., Kämpfer, P., Laurikkala, M., Tsitko, I., Kostyal, E., Atroshi, F., Salkinoja-Salonen, M., 2000. Characterization of *Sphingomonas* isolates from Finnish and Swedish drinking water distribution systems. *Journal of Applied Microbiology* 89, 687–696.
- Kühn, L., 1985. Biochemical fingerprinting of *Escherichia coli*: a simple method for epidemiological investigations. *Journal of Microbiological Methods* 3, 159–170.
- Kühn, L., Allestam, G., Stenstrom, T.A., Molloy, 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.
- Le Dantec, C., Duguet, J.P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., Vincent, V., 2002. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5318–5325.
- Leclerc, H., Moreau, A., 2002. Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 207–222.
- Lee, J., Lee, C.S., Hugunin, K.M., Maute, C.J., Dysko, R.C., 2010. Bacteria from drinking water supply and their fate in gastrointestinal tracts of germ-free mice: a phylogenetic comparison study. *Water Research* 44, 5050–5058.
- Legnani, P., Leoni, E., Rapuano, S., Turin, D., Valenti, C., 1999. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. *International Journal of Food Microbiology* 53, 153–158.
- Loveland-Curtze, J., Miteva, V.I., Brenchley, J.E., 2009. *Herminiimonas glaciae* sp. nov., a novel ultramicrobacterium from 3042 m deep Greenland glacial ice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1272–1277.
- Loy, A., Beisker, W., Meier, H., 2005. Diversity of bacteria growing in natural mineral water after bottling. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3624–3632.
- Manaiá, C.M., Nunes, O.C., Morais, P.V., da Costa, M.S., 1990. Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria from mineral waters on selective and enrichment media. *The Journal of Applied Bacteriology* 69, 871–876.
- Massa, S., Caruso, M., Trovatielli, F., Tosques, M., 1998. Comparison of plate count agar and R2A medium for enumeration of heterotrophic bacteria in natural mineral water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 727–730.
- Massa, S., Altieri, C., D'Angela, A., 2001. The occurrence of *Aeromonas* spp. in natural mineral water and well water. *International Journal of Food Microbiology* 63, 169–173.
- Mavridou, A., 1992. Study of the bacterial flora of a non-carbonated natural mineral water. *The Journal of Applied Bacteriology* 73, 355–361.
- Mavridou, A., Papapetropoulou, M., Boufa, P., Lambiri, M., Papadakis, J.A., 1994. Microbiological quality of bottled water in Greece. *Letters in Applied Microbiology* 19, 213–216.
- Mayer, J., Denger, K., Smits, T., Hollemeyer, K., Groth, U., Cook, A., 2006. N-Acetyltaurine disimilated via taurine by *Deltaia acidovorans* NAT. *Archives of Microbiology* 186, 61–67.
- Merino, S., Rubires, X., Knochel, S., Tomás, J.M., 1995. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *International Journal of Food Microbiology* 28, 157–168.
- Misund, A., Frengstad, B., Siewers, U., Reimann, C., 1999. Variation of 66 elements in European bottled mineral waters. *Science of the Total Environment* 243–244, 21–41.
- Morais, P.V., Mesquita, C., Andrade, J.L., da Costa, M.S., 1997. Investigation of persistent colonization by *Pseudomonas aeruginosa*-like strains in a spring water bottling plant. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 851–856.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695–700.
- Obiri-Danso, K., Okore-Hanson, A., Jones, K., 2003. The microbiological quality of drinking water sold on the streets in Kumasi, Ghana. *Letters in Applied Microbiology* 37, 334–339.
- Oliver, J.D., 1993. Formation of viable but nonculturable cells. In: Kjelleberg, S. (Ed.), *Starvation in Bacteria*. Plenum Press, New York, pp. 239–272.
- Pantanello, F., Berlutti, F., Passariello, C., Sari, S., Morea, C., Schippa, S., 2007. Viocaine and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *Journal of Applied Microbiology* 102, 992–999.
- Papapetropoulou, M., 1998. Microbiology of bottled waters. *Iatriki* 74, 211–221.
- Papapetropoulou, M., Tsintzou, A., Vantarakis, A., 1997. Environmental mycobacteria in bottled table waters in Greece. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 499–502.
- Payment, P., Siemiatycki, J., Richardson, L., Renaud, C., Franco, E., Prevost, M., 1997. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *International Journal of Environmental Health Research* 7, 5–31.
- Pedros-Alío, C., 2006. Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology* 14, 257–263.

- Primm, T.P., Lucero, C.A., Falkinham, J.O., 2004. Health impacts of environmental myco-bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 98–106.
- Quevedo-Sarmiento, J., Ramos-Cormenzana, A., Gonzalez-Lopez, J., 1986. Isolation and characterization of aerobic heterotrophic bacteria from natural spring waters in the Lanjaron area (Spain). *The Journal of Applied Bacteriology* 61, 365–372.
- Reasoner, D.J., Geldreich, E.E., 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 1–7.
- Rosenberg, F.A., 2003. The microbiology of bottled water. *Clinical Microbiology News-letter* 25, 41–44.
- Salazar, H.C., Moura, H., Ramos, R.T., 1982. Isolation of free-living amoebas from bottled mineral water. *Revista de Saúde Pública* 16, 261–267.
- Schindler, P.R., Vogel, H., Back, W., 1995. Recommendations for changing microbiological examination parameters in filling bottled water to comply with the mineral and drinking water regulation. *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))* 57, 806–811.
- Schmeisser, C., Stockigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K.N., Wenderoth, D.F., Flemming, H.C., Liesegang, H., Schmitz, R.A., Jaeger, K.E., Streit, W.R., 2003. Meta-genome survey of biofilms in drinking-water networks. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7298–7309.
- Shwaller, P., Schmidt-Lorenz, W., 1980. Flore microbienne de quatre eaux minérales non gazéifiées et mises en bouteilles. I. Dénombrement de colonies, composition grossière de la flore, et caractères du groupe des bactéries Gram négatif pigmentées en jaune. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene C1*, 330–347.
- Skirmisdottir, S., Hreggvidsson, G.O., Hjorleifsdottir, S., Marteinsson, V.T., Petursdottir, S.K., Holst, O., Kristjansson, J.K., 2000. Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2835–2841.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M., 1994. Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 846–849.
- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., Schleifer, K., 2000. Microbiological safety of drinking water. *Annual Review of Microbiology* 54, 81–127.
- Tabata, K., Kasuya, K.I., Abe, H., Masuda, K., Doi, Y., 1999. Poly(aspartic acid) degradation by a *Sphingomonas* sp. isolated from freshwater. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4268–4270.
- Takai, K., Sako, Y., 1999. A molecular view of archaeal diversity in marine and terrestrial hot water environments. *FEMS Microbiology Ecology* 28, 177–188.
- Vachee, A., Vincent, P., Struijk, C.B., Mossel, D.A.A., Leclerc, H., 1997. A study of the fate of the autochthonous bacterial flora of still mineral waters by analysis of restriction fragment length polymorphism of genes coding for rRNA. *Systematic and Applied Microbiology* 20, 492–503.
- Venieri, D., Vantarakis, A., Kominou, G., Papapetropoulou, M., 2006. Microbiological evaluation of bottled non-carbonated (“still”) water from domestic brands in Greece. *International Journal of Food Microbiology* 107, 68–72.
- Wang, Y., Hammes, F., Boon, N., Chami, M., Egli, T., 2009. Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria. *The ISME Journal* 3, 889–902.
- Warburton, D.W., 1993. A review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada. Part 2. The need for more stringent standards and regulations. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 158–168.
- Warburton, D.W., 2000. Methodology for screening bottled water for the presence of indicator and pathogenic bacteria. *Food Microbiology* 17, 3–12.
- Warburton, D.W., Peterkin, P.I., Weiss, K.F., Johnston, M.A., 1986. Microbiological quality of bottled water sold in Canada. *Canadian Journal of Microbiology* 32, 891–893.
- Wilkinson, F.H., Kerr, K.G., 1998. Bottled water as a source of multi-resistant *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* species for neutropenic patients. *European Journal of Cancer Care* 7, 12–14.
- Willems, A., Pot, B., Falsen, E., Vandamme, P., Gillis, M., Kersters, K., De Ley, J., 1991. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Comamonas*: relationship to *Aquaspirillum aquaticum*, E. Falsen Group 10, and other clinical isolates. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 427–444.
- Wolf, A., Fritze, A., Hagemann, M., Berg, G., 2002. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1937–1944.
- Yoon, J.H., Kang, S.J., Oh, H.W., Oh, T.K., 2006. *Stenotrophomonas dokdonensis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1363–1367.
- Zhang, S., Yang, G., Wang, Y., Hou, S., 2010. Abundance and community of snow bacteria from three glaciers in the Tibetan Plateau. *Journal of Environmental Sciences* 22, 1418–1424.
- Zheng, M., Kellogg, S.T., 1994. Analysis of bacterial populations in a basalt aquifer. *Canadian Journal of Microbiology* 40, 944–954.

2.3 Article 3

Caracterització de les poblacions microbianes associades a piscines naturalitzades

International Journal of Hygiene and Environmental Health (In Press)

Arnau Casanovas-Massana i Anicet R. Blanch

Les piscines naturalitzades són cossos d'aigua artificials destinats al bany recreatiu humà que, a diferència de les piscines convencionals, no es troben sotmeses a cap tipus de tractament químic de desinfecció. El tractament de l'aigua s'aconsegueix mitjançant mètodes mecànics, filtres biològics i plantes arrelades en diferents punts del sistema. Actualment no existeix cap normativa que inclogui les piscines naturalitzades, i els paràmetres microbiològics de control que s'utilitzen provenen de recomanacions d'altres països. L'increment en la construcció d'aquest tipus de sistemes, concretament les piscines naturalitzades d'ús públic, pot comportar un augment dels riscos, atès que hi ha dubtes que aquestes piscines puguin garantir una qualitat sanitària adequada. Els objectius d'aquest estudi van ser caracteritzar les poblacions microbianes de diferents piscines naturalitzades d'ús privat per tal d'obtenir els seus paràmetres microbiològics habituals, i determinar l'origen de la contaminació fecal en l'aigua. Aquest estudi es plantejava com un pas preliminar alhora de fer hipòtesis que permetessin predir el comportament de sistemes més grans i d'ús públic.

Amb aquest objectiu es van enumerar les poblacions de coliforms fecals, *E. coli*, enterococs fecals, bacteris aerobis heterotròfics i *Pseudomonas aeruginosa* en quatre piscines naturalitzades privades a l'hivern i a l'estiu. En paral·lel es van aïllar poblacions de coliforms fecals i d'enterococs fecals i es van sotmetre a un fenotipatge bioquímic amb les microplaques PhP-RE i PhP-RF, respectivament. Es van calcular els índexs de diversitat i similitud poblacional, i es va procedir a la identificació dels aïllats i a la comparació dels perfils obtinguts amb una base de dades pròpia.

Els resultats obtinguts van revelar que tres de les quatre piscines estudiades superaven els límits microbiològics recomanats per a les piscines naturalitzades, ja fos per un excés d'*E.coli* o d'enterococs fecals. D'altra banda, les concentracions de bacteris heterotròfics aerobis i de *P. aeruginosa* van resultar ser acceptables. Les anàlisis dels índexs de diversitat i de similitud poblacional suggerien que la font principal de contaminació fecal a l'aigua de les piscines estava més relacionada amb la fauna del sistema, que no pas amb les aportacions de material fecal humà. El fet que les piscines

presentaven valors elevats d'indicadors de la contaminació fecal també a l'hivern, període on no hi havia bany humà, reforça aquesta hipòtesi.

Atesa la manca de regulació d'aquest tipus de sistemes, i tenint en compte que els riscos potencials són més grans que no pas en les piscines convencionals, és necessari ampliar la recerca per tal d'establir els paràmetres que assegurin un bany segur en les piscines naturalitzades privades i, especialment, les públiques.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Hygiene and Environmental Health

journal homepage: www.elsevier.de/ijheh

Characterization of microbial populations associated with natural swimming pools

Arnau Casanovas-Massana*, Anicet R. Blanch

Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 November 2011

Received in revised form 22 March 2012

Accepted 10 April 2012

Keywords:

Natural swimming pool
Microbial source tracking
Pseudomonas aeruginosa
Wildlife pollution
Bacterial indicators

ABSTRACT

Natural swimming pools are artificially created bodies of water that are intended for human recreational bathing and have no chemical disinfection treatment. The microbial populations in four private natural swimming pools were analysed to assess the typical microbiological parameters, establish the origin of faecal contamination in the water, and predict the behaviour of larger systems that are open to the public. For this purpose, faecal coliforms, *E. coli*, enterococci, aerobic heterotrophic bacteria and *Pseudomonas aeruginosa* were enumerated in summer and winter. Moreover, faecal coliforms and enterococci populations were biochemically phenotyped with the Phene-Plate System, the diversity and similarity indexes were calculated and the isolates were identified. Three of the four natural pools exceeded the *E. coli* or enterococci limits stated in the recommendations for natural swimming pools. The concentrations of *P. aeruginosa* and aerobic heterotrophic bacteria were acceptable. The results suggest that wildlife was an important source of faecal pollution in the pools. Since there is a lack of regulations on these systems, and the health risks are higher than in conventional swimming pools, further research is needed to establish the parameters for ensuring safe bathing in private and public natural swimming pools.

© 2012 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Natural swimming pools are artificially created bodies of water that are separated from surface water and groundwater and have no chemical disinfection or sterilization system. Water treatment is carried out through mechanical techniques, biological filters and plants growing in the system (The Landscaping and Landscape Development Research Society, 2006). Since the first natural swimming pool was built in Austria in the early 1980s, the market has spread throughout central Europe. By 2010, more than 20,000 swimming pools had been constructed (Littlewood, 2005), a hundred of which are open to the public. The demand for natural swimming pools is increasing all over the continent, particularly in Mediterranean countries. This increase may be due to different factors: concerns about the use of chlorine or other chemicals to disinfect swimming pools, which can cause eye and skin irritation; the formation of toxic by-products; the aesthetic appeal of natural pools that resemble ponds; attractive designs and low construction costs; and low maintenance costs, among others. Despite the growing market, little is known about the capacity of the natural depuration system to maintain an appropriate quality of water.

Considering the lack of regulations on natural swimming pools, there is a need to describe its typical microbial content.

Faecal contamination of the water is the main microbiological risk of bathing in swimming pools, and recreational waters in general. Faecal contamination may be due to faeces directly released by bathers, a contaminated source of water or indirect animal contamination. Non-faecal human shedding (e.g. from vomit, mucus, saliva or skin) is also a potential source of non-faecal pathogenic microorganisms (WHO, 2006). Several studies have reported outbreaks related with *Shigella* spp., *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leptospira* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, adenoviruses, and Norwalk-like viruses, among others, in swimming pools and recreational waters (CDC, 2001b, 2004; Craun et al., 1997; Fiorillo et al., 2001; Galmes et al., 2003; Hildebrand et al., 1996; Kramer et al., 1996; Levy et al., 1998; Schets et al., 2010; Sinclair et al., 2009; Tirodimos et al., 2010; Yoder et al., 2004). In most cases, the outbreak was caused by inadequate disinfection treatments that could not eliminate the pathogens, and would have been prevented if the water had been well managed. Disinfection treatments and their reliability are thus critical to the microbiological quality and safety of bathing waters. The absence of these treatments in natural swimming pools is of great concern in terms of health risk levels.

Although human recreational bathing is the main purpose of both natural and conventional swimming pools, they are totally different systems from a microbiological, sanitary, regulatory, chemical and management point of view. Conventional swimming

* Corresponding author at: Departament de Microbiologia, Avinguda Diagonal, 643, E-08028 Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: +34 934039044; fax: +34 934039047. E-mail address: arnaucasanovas@ub.edu (A. Casanovas-Massana).

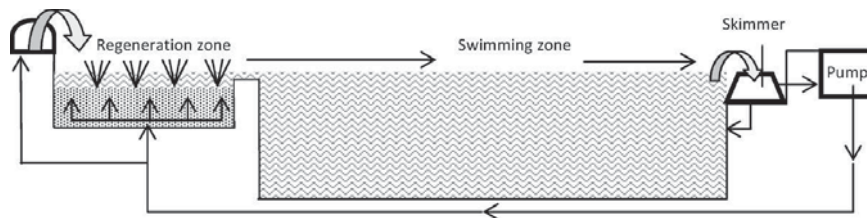


Fig. 1. Scheme of a natural swimming pool, its zones and water recirculation system.

pools are governed under national regulations, which generally state that the water must not contain faecal coliforms, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* or other pathogens (Anon., 2000). The use of potable water to fill the vessel, proper disinfection treatments and good management procedures does not always ensure the elimination of these microorganisms (Kamihama et al., 1997; Lutz and Lee, 2011). Because of frequent faecal and non-faecal contamination and the inability of chlorine disinfection to rapidly inactivate several microorganisms, the transmission of pathogens can occur even in well-maintained pools (CDC, 2001a).

There is still no European directive regulating the construction, management and sanitation of natural swimming pools. Directive 2006/7/EC on the management of coastal and inland bathing water quality has been used as a reference for natural swimming pools, which are more similar to these waters than to conventional swimming pools. Therefore, the microbiological parameters of inland recreational waters and natural swimming pools might be related (Marion et al., 2010). Notwithstanding, the Directive explicitly excludes artificially created confined waters that are separated from surface water and groundwater, and thus, it does not cover natural swimming pools. Due to the lack of regulation in this field, the countries in which natural pools are most common (Germany, Switzerland, Austria and France) have published construction and maintenance recommendations, which adapt the parameters of the European Directive to closed systems (French Agency for Environmental and Occupational Health Safety, 2009; Office Fédéral de la Santé Publique, 2004; The Landscaping and Landscape Development Research Society, 2006). According to these documents, the guideline values for adequate water quality are less than 100 CFU of *E. coli* per 100 ml, less than 40–50 CFU of enterococci per 100 ml, and less than 10 CFU of *Pseudomonas aeruginosa* per 100 ml.

Most natural swimming pools are small private systems for family use, with low number of bathers. To the best of our knowledge, no outbreaks have been reported so far in these systems. However, the increase in the construction of public natural swimming pools may change the situation, as there are concerns about the safety of these systems and their capacity to maintain sanitary quality for the public. The aims of the present study were to characterize the microbial populations in several private natural swimming pools in north-eastern Spain, assess the typical microbiological parameters and establish the origin of faecal contamination in the water. The study was planned as a preliminary step in order to form hypotheses to predict the behaviour of larger public systems.

Materials and methods

Description of the natural swimming pools

Four natural private swimming pools (A–D) were selected for this study. Pools A and D were in residential urban areas, while pools B and C were near woodlands. The capacity of the pools was

75 m³, 200 m³, 120 m³ and 170 m³, respectively and they were all supplied with tap drinking water. The average number of bathers of pools A, B and D was 2 bathers per day in the summer. Pool C was occupied by 6 bathers (specifically children) per day in the summer. There was no bathing activity in the winter in any pool. The systems were divided into two different areas: the swimming zone (80% of the volume), where the bathing activity was carried out, and the regeneration zone (20% of the volume) where the water treatment process took place. The regeneration zone consisted of a pool filled with gravel (2–4 mm) and plants rooted in it (*Phragmites australis*, *Sparganium erectum*, *Iris pseudacorus*, *Schoenoplectus lacustris*, *Carex acutiformis* and *Stratiotes aloides*). Briefly, water flowed by gravity from the swimming zone to a skimmer that physically removed organic compounds from the water. Then part of the water (1–1.5 m³/h) was pumped to the regeneration zone where the plants and the microorganisms inhabiting the substrate biofilm consumed the nutrients and substances dissolved in the water. Finally, water returned to the swimming zone (Fig. 1). Water temperatures ranged from 24 °C and 28 °C in summer, and 8 °C and 10 °C in winter.

Sampling

Water samples were collected with aseptic techniques from each swimming pool at 30 cm depth and at about 40 cm from the pool edge between 10 am and 12 pm. Samples were transferred to sterile bottles and immediately refrigerated at 4 °C for up to 6 h before being processed. All samplings were performed following standardized procedures (Anon. 1998; ISO, 1994). Pools A and D were sampled twice in summer and twice in winter. Pools B and C were sampled twice in the summer only, since they were emptied during the winter period.

Enumeration of bacterial populations

Faecal coliforms, *E. coli*, and enterococci were measured by membrane filtration technique using standardized protocols (ISO, 1984, 2000). Briefly, water samples were filtered through 0.45 µm membranes (Millipore, Molsheim, France). Filters were then incubated on mFC agar plates (Difco, Sparks, MD, USA) at 44.5 °C for 24 h to enumerate faecal coliforms; on Chromocult® agar (Merck, Darmstadt, Germany) at 44.5 °C for 24 h to enumerate *E. coli* or on m-Enterococcus agar plates (Difco, Sparks, MD, USA) at 37 °C for 48 h followed by Bile Esculin Agar (Scharlau, Barcelona, Spain) for 3 h at 44 °C to confirm the enterococci colonies, based on the hydrolysis of esculin.

Aerobic heterotrophic bacteria were enumerated by inoculating 0.1 ml of the water samples and 0.1 ml of 10⁻¹ and 10⁻² dilutions prepared in sterile phosphate buffered saline on R2A agar (Pronadisa, Barcelona, Spain), spread with a sterile glass rod. Plates were incubated at 22 °C for 72 h.

The presence of *Pseudomonas aeruginosa* was analysed following the standardized protocols (ISO, 2006). Samples of 100 ml were filtrated through 0.45 µm membranes (Millipore, Molsheim, France) and filters were incubated on Cetrimide agar (Sharlau, Spain) supplemented with nalidixic acid (Sigma, Germany). Presumably positive samples were then confirmed with Acetamide broth (Sharlau, Spain), King B agar (Sharlau, Spain) and the oxidase test.

Biochemical fingerprinting

Faecal coliforms and enterococci were biochemically phenotyped with the Phene-Plate System (Bactus AB, Sweden). A maximum of 25 representative colonies from each sample and bacterial group (faecal coliforms and enterococci) were randomly isolated from the enumeration media. Each set of colonies was presumed to be representative of the whole population associated with each sample, as previously described (Bianchi and Bianchi, 1982; Kühn et al., 1997). Overnight cultures of faecal coliform and enterococci isolates were prepared on nutrient agar (Oxoid, England) at 37 °C. Cell suspensions were prepared by harvesting these cultures in a suspending medium (w/v): 0.1% proteose peptone and 0.011% bromothymol blue for faecal coliforms and 0.2% proteose peptone (Difco), 0.05% yeast extract (Pronadisa, Spain), 0.5% NaCl and 0.011% bromothymol blue (Panreac, Spain) for enterococci. These suspensions were used to inoculate the first well of each row of the PhP-RF and PhP-RE microplates (Bactus AB, Sweden), respectively, by picking up and resuspending a loopful of culture in 300 µl of the suspending medium. Aliquots (25 µl) of the bacterial suspension of this well were then transferred to the other wells in the same row after half an hour of incubation, following the manufacturer's instructions and as described previously (Kühn and Möllby, 1993).

The PhP-RF and PhP-RE plates consist of 96-well plates containing dehydrated reagents selected to provide a high level of discrimination of populations within enterococci or faecal coliforms, respectively (Kühn et al., 1991). The inoculated plates were incubated at 37 °C for both bacterial groups. Growth in the different wells was measured at 620 nm with the iEMS Reader MF (Labsystems, Finland). Readings were performed at 7 h, 24 h and 48 h for faecal coliforms, and 16 h, 40 h and 64 h for enterococci. The biochemical profile of each isolate was calculated as the average of the absorbance values for each well over all three readings (Kühn et al., 1991).

Isolates of each population were pooled to determine the main biochemical PhP phenotypes (main clusters) of bacterial populations. Clusters were defined by isolates with a similarity index equal to or higher than 0.975. Isolates with the highest minimum and the highest mean similarity to all other isolates belonging to the same PhP phenotype were selected as representative strains (Kühn et al., 1991).

Diversity and similarity indexes

Simpson's diversity index (Di) was used to calculate the diversity of the bacterial populations in each group (Hunter and Gaston, 1988; Kühn et al., 1991). This index measures the probability of two random isolates being assigned different phenotypes. The structure and composition of the populations was analysed for each sample by cluster analysis on the basis of the PhP-profiles of the isolates, using the unweighted pair group method (UPGMA). The population similarity indexes (Sp), a similarity coefficient that measures the proportion of isolates that are identical in two compared samples (Kühn et al., 1991), were calculated between summer and winter populations and between swimming pools. The UPGMA using average linkages was used to cluster Sp coefficients. The optical readings

and statistical analyses were performed using PhPWin[®] software (Bactus AB, Sweden).

Identification of isolates

Faecal coliforms were identified by comparing the biochemical PhP-profiles obtained in the present study with those of 110 representatives of the 595 faecal coliform isolates identified previously (Vilanova et al., 2004), with a correlation coefficient higher than 0.975. To identify enterococcal isolates, we compared the biochemical PhP-profiles with those of 178 representatives of around 20,000 enterococcal isolates identified in an international research project (Kühn et al., 2000) with a correlation coefficient higher than 0.975. The percentage of enterococci species for each sample was obtained by counting the isolates included in the clusters belonging to a species, *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans* (H–D group) and *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens* (C–G–F group) were treated as a single group (Behr et al., 2000; Vilanova et al., 2004).

Clusters representing more than 5% of the total population that could not be identified by the above procedure were genotypically identified. DNA extraction, amplification and 16S rRNA sequencing of the representative strain of these clusters was performed as previously described (Casanovas-Massana et al., 2010). Then, the sequences were submitted for homology searches to the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>).

Database comparison

Finally, the populations of faecal coliforms and enterococci were compared to a database of populations associated with slaughterhouse wastewater (faecal contamination of animal origin), artificial naturalized ponds (influenced by the surrounding wildlife) and others associated with human sewage (where the contamination was mostly of human origin), which were available from previous studies (Blanch et al., 2003; Kühn et al., 2005; Manero et al., 2006; Vilanova et al., 2004). Overall, the database consisted of 1381 faecal coliform isolates and 1277 enterococci. Similarity indexes were calculated and clustering analyses were performed between the database populations and those isolated from the swimming pools.

Results and discussion

Enumeration of bacterial populations

The concentrations of *E. coli* and enterococci in the natural swimming pools in summer, when number of bathers was the highest, were found to meet the microbiological criteria for excellence, in line with European inland recreational water quality standards (Table 1). Enterococci were below 200 CFU/100 ml and *E. coli* below 500 CFU/100 ml in all cases (Anon., 2006), but, as discussed above, these standards are not strictly applicable to natural pool systems. According to different European countries' recommendations for natural swimming pools (French Agency for Environmental and Occupational Health Safety, 2009; Office Fédéral de la Santé Publique, 2004; The Landscaping and Landscape Development Research Society, 2006), they all met the guideline values for *E. coli*, except for Pool C in the second sample. However, all pools exceeded the enterococci limit in at least one of the two samples, with the exception of Pool A. Therefore, none of the systems apart from Pool A were suitable for safe bathing, as the concentrations of faecal indicators were higher than the recommended values.

Tap drinking water was used to fill the pools. It was assumed that it complied with the corresponding national regulations (Anon.,

Table 1Concentrations of faecal coliforms, *E. coli* and enterococci in the natural swimming pools in the summer and winter in CFU/100 ml.

	Faecal coliforms		<i>E. coli</i>		Enterococci	
	Sampling 1	Sampling 2	Sampling 1	Sampling 2	Sampling 1	Sampling 2
Summer						
Pool A	8.50E+01	2.25E+01	2.60E+01	1.70E+01	1.30E+01	8.00E+00
Pool B	1.95E+02	1.13E+02	1.75E+01	8.50E+00	5.00E+01	3.26E+01
Pool C	2.10E+02	6.25E+02	6.90E+01	2.05E+02	7.30E+01	1.68E+02
Pool D	3.65E+02	8.00E+01	5.50E+00	<0.5	2.50E+01	8.30E+01
Winter						
Pool A	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	4.00E–01	6.55E+01
Pool D	1.90E+00	4.00E–01	<0.1	<0.1	1.48E+01	<0.1

Table 2Concentrations of aerobic heterotrophic bacteria and *P. aeruginosa* in the natural swimming pools in the summer and winter in CFU/100 ml.

	Aerobic heterotrophic bacteria		<i>P. aeruginosa</i>	
	Sampling 1	Sampling 2	Sampling 1	Sampling 2
Summer				
Pool A	1.08E+05	n.d.	1.00E+00	2.00E+00
Pool B	1.69E+05	2.40E+05	1.00E+00	3.00E+00
Pool C	6.65E+04	4.00E+05	3.00E+00	2.00E+00
Pool D	6.65E+04	2.70E+05	1.00E+00	1.00E+00
Winter				
Pool A	2.25E+05	1.50E+05	1.00E+00	2.00E+00
Pool D	2.38E+05	6.30E+04	2.00E+00	1.00E+00

2003) and, accordingly, presented no *E. coli* per 100 ml and no enterococci per 100 ml. Therefore, the faecal bacterial indicators that were detected must have originated in the dynamics of the pools. Consequently, these microorganisms must be related to contributions of faecal matter introduced into the water when a bather accidentally releases faecal matter or when residual faecal material on the swimmer is washed into the pool. Faecal material may also enter the pools as a result of diffuse faecal pollution from wildlife or pets in the surrounding area. In the winter samples, the concentrations of enterococci were at the recommended limit (Pool A) or over this limit (Pool D). Given that the swimming pools were not used for human bathing in winter and sanitary sewers were located away from the pool area, all the faecal indicators detected during this season must be related mainly to wildlife or pets. This underlines the importance of this kind of contribution to the faecal contamination of pools. As these pools are not treated with chemicals and try to imitate natural environments, it is likely that animals inhabiting surrounding areas use them for drinking and bathing. Therefore, the hypothesis of a significant contribution of faecal material from animals seems consistent.

The concentrations of aerobic heterotrophic bacteria were around 10^4 to 10^5 CFU/100 ml and stable during all samplings, both in summer and winter (Table 2). These bacteria are not used as an indicator of disease, but are an important indicator of disinfection performance and are useful for measuring changes during water treatment and distribution. Aerobic heterotrophic bacteria are not considered a compulsory control parameter in natural swimming pool recommendations. Nevertheless, some conventional swimming pool standards (BSI, 2003; DIN, 1984; GHR, 1973) include threshold limits of around 10^4 CFU/100 ml for aerobic heterotrophic bacteria incubated at 22 °C. Water from natural swimming pools is not disinfected, so the concentrations that were found, which were slightly higher than the limits intended for chemically treated pools, were expectable.

Pseudomonas aeruginosa was present in all the samples, although the concentrations reported were within the limits specified in the recommendations for natural swimming pools (<10 CFU/100 ml) (Table 2). However, conventional swimming pool standards state that no *P. aeruginosa* isolates must be detected in

Table 3

Percentage of faecal coliforms in the pools based on a comparison of the PhP-profiles obtained and the 16S rRNA gene sequencing.

	<i>E. coli</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	Unidentified
Pool A	33%	16%	18%	33%
Pool B	38%	38%	0%	24%
Pool C	66%	8%	0%	26%
Pool D	5%	72%	0%	23%

250 ml water sample. Shedding from infected humans is the predominant source of *P. aeruginosa* in conventional swimming pools. It tends to accumulate in biofilms, in filters that are poorly maintained or in areas where the circulation of water is poor: i.e. under movable floors, benches, decks and drains, where bathers are likely to pick up the microorganism on their hands or feet and transfer them to the water (WHO, 2006). Nevertheless, *P. aeruginosa* is a ubiquitous microorganism that is present in water, vegetation and soil (Allen et al., 2004). Remarkably, it was present throughout the year in all the studied natural pools, even though number of bathers was low in the summer and even inexistent in winter. This reinforces the idea that it is a natural occurring microorganism in these systems and thus, its presence might not be related to human shedding. The behaviour of this opportunistic pathogen must be further investigated in larger natural swimming pools, as concentrations may be higher when there is more bathing activity (Martins et al., 1995).

Biochemical fingerprinting and identification of isolates

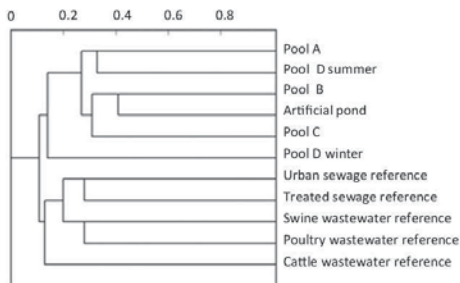
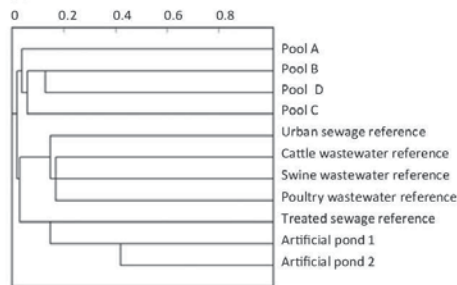
A total of 249 enterococci (199 in the summer and 50 in the winter) and 184 faecal coliforms (all in the summer) were isolated and biochemically phenotyped using the PhP-RF and PhP-RE plates, respectively. Pools A, B and D had high diversity values for both indicators in the summer, while the diversity was more moderate in pool C. Since pool C had more bathing activity in the summer, with child users in particular, a higher input of human faecal material was expected. In fact, the concentration of *E. coli* was the highest among the pools. Therefore, it is reasonable to assume that a decrease in the diversity of faecal indicators is related to the discrete entrance of faecal pollution, as other authors have suggested (Kühn et al., 1997). In the winter, pool D, which was the only pool that could be phenotyped in that season, had high enterococci diversity, as in the summer.

The analysis of the similarity indexes showed that faecal coliforms and enterococci populations were more similar between the natural swimming pools than with populations from slaughterhouses (swine, poultry and cattle) or human sewage. This reinforces the idea that there was a source of pollution in the pools not related to human faeces or at least not related exclusively to it. Moreover, enterococci populations from an artificial naturalized pond influenced by the surrounding wildlife (mostly migrating birds) were found to be close to those from the swimming pools (Fig. 2).

Table 4

Percentage of enterococci in the pools based on a comparison of the PhP-profiles obtained and the 16S rRNA gene sequencing.

	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ent. mundtii</i>	H-D ^a group	C-G-F ^b group	Unidentified
Pool A	8%	28%	12%	4%	36%	12%
Pool B	34%	12%	18%	0%	26%	10%
Pool C	50%	8%	12%	4%	10%	16%
Pool D summer	0%	14%	33%	0%	43%	10%
Pool D winter	0%	60%	0%	12%	8%	20%

^a H-D group: *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans* group; C-G-F group: *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus flavescens* group.**(a) Enterococci****(b) Faecal coliforms****Fig. 2.** Clustering of the similarity indexes (S_p) of the faecal coliforms and enterococci populations isolated at the pools and other populations associated with slaughterhouse wastewater, human sewage and naturalized ponds, using the UPGMA method. (a) Enterococci and (b) faecal coliforms.

The taxonomic classification of faecal coliforms was not robust enough to differentiate the structure and composition between the pools (Table 3). Furthermore, almost a quarter of the isolates could not be identified. Nevertheless, the compositions of enterococci in the pools showed that A, B and D presented a significant proportion of the *Ent. casseliflavus*, *Ent. gallinarum* and *Ent. flavescens* group, which has been related to animal faeces (Kühn et al., 2003). Pool C presented a lower proportion of this group, and *Ent. faecalis* was predominant (Table 4). This reinforces the idea that the animal contribution was considerable in the pools.

Conclusions

To sum up, this study showed that three of the four natural pools did not meet the recommended criteria for natural swimming pools as they had higher concentrations of faecal indicators than advisable (French Agency for Environmental and Occupational Health Safety, 2009; Office Fédéral de la Santé Publique, 2004; The

Landscaping and Landscape Development Research Society, 2006). Some studies on inland recreational waters have shown significant trends between increased gastrointestinal illnesses and *E. coli* or enterococci (Marion et al., 2010; Wade et al., 2006). In contrast, other authors have reported correlations between gastrointestinal illnesses and the number of swimmers, and no correlations between illnesses and faecal bacterial indicators, highlighting the importance of swimmer-to-swimmer transmission (Calderon et al., 1991; Colford et al., 2007). Therefore, the relationship between health risks and faecal indicator concentrations is still under discussion. Furthermore, we gained sufficient evidence that the microorganisms are not exclusively from human faecal material. The results indicate that wildlife might be an important contributor of faecal pollution in the private natural swimming pools under study in agreement with other studies in recreational waters (Edge and Hill, 2007; Grant et al., 2001; Wither et al., 2005; Wright et al., 2009). Birds and other wildlife are a source of emerging and reemerging waterborne zoonotic pathogens such as *Salmonella* and *Campylobacter* (Craven et al., 2000), although the epidemiological risks of faecal contamination from wildlife remain uncertain (Field and Samadpour, 2007). Therefore, all of these factors should be considered in the new regulations for natural swimming pools, particularly in relation to the microbiological control parameters.

The obtained results may be useful to estimate the microbiological sanitary risks in public natural swimming pools. In this scenario, bather density would presumably be higher and, thus, the contribution of faecal pollution and other pathogens by the bathers would also be higher (Martins et al., 1995). In addition, the sanitary condition of the bathers would be more difficult to control. Consequently, the natural filtration and inactivation system could be insufficient to reduce pathogens and faecal contamination. The fact that elderly people, children, pregnant women and immunocompromised individuals could use the pool represents an additional challenge for the natural water treatment system.

In conclusion, our study highlights the importance of the faecal contribution of wildlife in natural swimming pools. As the sanitary risks are higher than in conventional swimming pools, or at least less controlled, further research on natural swimming pools is recommended to assess the optimal parameters for safe bathing.

Acknowledgements

This study was supported by the *Xarxa de Referència en Biotecnologia* (XRB) and the Government of Catalonia's research program 2009SGR1043. Arnau Casanovas-Massana was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education.

References

- Allen, M.J., Edberg, S.C., Reasoner, D.J., 2004. Heterotrophic plate count bacteria – what is their significance in drinking water? *Int. J. Food Microbiol.* 92, 265–274.
- Anonymous, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, DC.
- Anonymous, 2000. Decret 95/2000, de 22 de febrer, pel qual s'estableixen les normes sanitàries aplicables a les piscines d'ús públic. 3092.
- Anonymous, 2003. Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. 45, 7228–7245.

- Anonymous, 2006. Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. L64, 37–51.
- Behr, T., Koob, C., Schedl, M., Mehlen, A., Meier, H., Knopp, D., Frahm, E., Obst, U., Schleifer, K., Niessner, R., Ludwig, W., 2000. A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 563–572.
- Bianchi, M.A.G., Bianchi, A.J.M., 1982. Statistical sampling of bacterial strains and its use in bacterial diversity measurement. *Microb. Ecol.* 8, 61–69.
- 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. *J. Appl. Microbiol.* 94, 994–1002.
- BSI, 2003. Management of public swimming-pools – water treatment systems, water treatment plant and heating and ventilation systems – code of practice. British Standards Institute, Publicly Available Specification (PAS) 39.
- Calderon, R.L., Mood, E.W., Dufour, A.P., 1991. Health effects of swimmers and non-point sources of contaminated water. *Int. J. Environ. Health Res.* 1, 21–31.
- Casanovas-Massana, A., Lucena, F., Blanch, A.R., 2010. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in water-bottling plants on the basis of procedures included in ISO 16266:2006. *J. Microbiol. Methods* 81, 1–5.
- CDC, 2001a. Prevalence of parasites in fecal material from chlorinated swimming pools – United States, 1999. *MMWR* 50, 410–412.
- CDC, 2001b. Shigellosis outbreak associated with an unchlorinated fill-and-drain wading pool – Iowa. *MMWR* 50, 797–800.
- CDC, 2004. An outbreak of norovirus gastroenteritis at a swimming club – Vermont, 2004. *MMWR* 53, 793–795.
- Craun, G.F., Berger, P.S., Calderon, R.L., 1997. Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. *J. Am. Water Works Assoc.* 99, 96–104.
- Craven, S.E., Stern, N.J., Line, E., Bailey, J.S., Cox, N.A., Fedorka-Cray, P., 2000. Determination of the incidence of *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings. *Avian Dis.* 44, 715–720.
- Colford Jr., J.M., Wade, T.J., Schiff, K.C., Wright, C.C., Griffith, J.F., Sandhu, S.K., Burns, S., Sobsey, M., Lovelace, G., Weisberg, S.B., 2007. Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. *Epidemiology* 18, 27–35.
- DIN, 1984. Treatment and Disinfection of Swimming Pool and Bathing Pool Water. DIN, p. 19643.
- Edge, T.A., Hill, S., 2007. Multiple lines of evidence to identify the sources of fecal pollution at a freshwater beach in Hamilton Harbour, Lake Ontario. *Water Res.* 41, 3585–3594.
- Field, K.G., Samadpour, M., 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res.* 41, 3517–3538.
- Fiorillo, L., Zucker, M., Sawyer, D., Lin, A.N., 2001. The *Pseudomonas* hot-foot syndrome. *N. Engl. J. Med.* 345, 335–338.
- French Agency for Environmental and Occupational Health Safety, 2009. Opinion: Concerning the assessment of health risks from artificial bathing waters. 2006/SA/011.
- Galmes, A., Nicolau, A., Arbona, G., Gomis, E., Guma, M., Smith-Palmer, A., Hernandez-Pezzi, G., Soler, P., 2003. Cryptosporidiosis outbreak in British tourists who stayed at a hotel in Majorca, Spain. *Eurosurv.* Weekly, 7.
- GHR, 1973. Greek Hygienic Regulations. Instructions for the Construction and Operation of Swimming Pools. Department of Health. Official Journal of the Greek Government Γ1/443/ΦΕΚ87/Β/1973.
- Grant, S.B., Sanders, B.F., Boehm, A.B., Redman, J.A., Kim, J.H., Mrse, R.D., Chu, A.K., Gouldin, M., McGee, C.D., Gardiner, N.A., Jones, B.H., Svejtkovsky, J., Leipzig, G.V., Brown, A., 2001. Generation of enterococci bacteria in a coastal saltwater marsh and its impact on surf zone water quality. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2407–2416.
- Hildebrand, J.M., Maguire, H.C., Holliman, R.E., Kangesu, E., 1996. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to padding pools. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* 6 (2), R33–R36.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–2466.
- International Organization for Standardization, 1984. Detection and enumeration of fecal streptococci in water. Part 2. Method by membrane filtration. ISO 7899/1.
- International Organization for Standardization, 1994. Guidance on the Preservation and Handling of Samples. ISO 5667/3:1994.
- International Organization for Standardization, 2000. Detection and Enumeration of *E. coli* and Coliform Bacteria. Part 1. Membrane Filtration Method. ISO 9308-1.
- International Organization for Standardization, 2006. Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. Method by Membrane Filtration. ISO 16266.
- Kamihama, T., Kimura, T., Hosokawa, J., Ueji, M., Takase, T., Tagami, K., 1997. *Tinea pedis* outbreak in swimming pools in Japan. *Public Health* 111, 249–253.
- Kramer, M.H., Herwaldt, B.L., Craun, G.F., Calderon, R.L., Juraneck, D.D., 1996. Surveillance for waterborne-disease outbreaks – United States, 1993–1994. *MMWR* 45, 1–33.
- Kühn, I., Allestam, G., Stenstrom, T.A., Möllby, R., 1991. Biochemical fingerprinting of water coliform bacteria, a new method for measuring phenotypic diversity and for comparing different bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3171–3177.
- Kühn, I., Möllby, R., 1993. The PhP RS system. A simple microplate method for studying coliform bacterial populations. *J. Microbiol. Methods* 17, 255–259.
- Kühn, I., Allestam, G., Engdahl, M., Stenström, T., 1997. Biochemical fingerprinting of coliform bacterial populations – comparisons between polluted river water and factory effluents. *Water Sci. Technol.* 35, 343–350.
- Kühn, I., Iversen, A., Burman, L.G., Olsson-Liljequist, B., Franklin, A., Finn, M., Aarestrup, F., Seyfarth, A., Blanch, A.R., Taylor, H., Caplin, J., Moreno, M.A., Dominguez, L., Möllby, R., 2000. Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strains, in animals, humans and the environment: example of an ongoing project within the European research programme. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14, 337–342.
- Kühn, I., Iversen, A., Burman, L.G., Olsson-Liljequist, B., Franklin, A., Finn, M., Aarestrup, F., Seyfarth, A.M., Blanch, A.R., Vilanova, X., 2003. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment – a European study. *Int. J. Food Microbiol. Agents* 88, 133–143.
- Kühn, I., Iversen, A., Finn, M., Greko, C., Burman, L.G., Blanch, A.R., Vilanova, X., Manero, A., Taylor, H., Caplin, J., Dominguez, L., Herrero, I.A., Moreno, M.A., Möllby, R., 2005. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5383–5390.
- Levy, D.A., Bens, M.S., Craun, G.F., Calderon, R.L., Herwaldt, B.L., 1998. Surveillance for waterborne-disease outbreaks – United States, 1995–1996. *MMWR* 47, 1–34.
- Littlewood, M., 2005. *Natural Swimming Pools: An Inspirational Guide for Construction and Maintenance*. Schiffer Publishing, Pennsylvania.
- Lutz, J.K., Lee, J., 2011. Prevalence and antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 554–564.
- Manero, A., Vilanova, X., Cerdà-Cuellar, M., Blanch, A.R., 2006. Vancomycin- and erythromycin-resistant enterococci in a pig farm and its environment. *Environ. Microbiol.* 8, 667–674.
- Marion, J.W., Lee, J., Lemeshow, S., Buckley, T.J., 2010. Association of gastrointestinal illness and recreational water exposure at an inland U.S. beach. *Water Res.* 44, 4796–4804.
- Martins, M.T., Sato, M.I.Z., Alves, M.N., Stoppe, N.C., Prado, V.M., Sanchez, P.S., 1995. Assessment of microbiological quality for swimming pools in South America. *Water Res.* 29, 2417–2420.
- Ofice Fédéral de la Santé Publique, 2004. *Recommandations pour l'évaluation hygiénique des étangs de baignade publique aménagés artificiellement*. Bulletin 19/2004.
- Schets, F.M., De Roda Husman, A.M., Havelaar, A.H., 2010. Disease outbreaks associated with untreated recreational water use. *Epidemiol. Infect.*, 1–12.
- Sinclair, R.G., Jones, E.L., Gerba, C.P., 2009. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1769–1780.
- The Landscaping and Landscape Development Research Society, 2006. *Recommendations for the Planning, Construction and Maintenance of Private Swimming and Natural Pools*.
- Tirodimos, I., Arvanitidou, M., Dardavessis, L., Bisiklis, A., Alexiou-Daniil, S., 2010. Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from swimming pools in northern Greece. *East. Mediterr. Health J.* 16, 783–787.
- Vilanova, X., Manero, A., Cerdà-Cuellar, M., Blanch, A.R., 2004. The composition and persistence of faecal coliforms and enterococcal populations in sewage treatment plants. *J. Appl. Microbiol.* 96, 279–288.
- Wade, T.J., Calderon, R.L., Sams, E., Beach, M., Brenner, K.P., Williams, A.H., Dufour, A.P., 2006. Rapidly measured indicators of recreational water quality are predictive of swimming-associated gastrointestinal illness. *Environ. Health Perspect.* 114, 24–28.
- Wither, A., Rehlfisch, M., Austin, G., 2005. The impact of bird populations on the microbiological quality of bathing waters. *Water. Sci. Technol.* 51, 199–207.
- WHO, 2006. *Swimming pools and similar recreational-water environments. Guidelines for Safe Recreational Water Environments*, vol. 2. WHO Press, Geneva, Switzerland.
- Wright, M.E., Solo-Gabriele, H.M., Elmira, S., Fleming, L.E., 2009. Microbial load from animal feces at a recreational beach. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1649–1656.
- Yoder, J.S., Blackburn, B.G., Craun, G.F., Hill, V., Levy, D.A., Chen, N., Lee, S.H., Calderon, R.L., Beach, M.J., 2004. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water – United States, 2001–2002. *MMWR* 53, 1–22.

2.4 Article 4

Determination of the fecal contamination origin in reclaimed water open-air reservoirs using biochemical fingerprinting of enterococci and fecal coliforms

Sotmès a: **Environmental Science and Pollution Research**

Arnau Casanovas-Massana i Anicet R. Blanch

La irrigació de camps de golf és un dels sectors en què la demanda d'aigua regenerada ha augmentat més en els darrers anys a causa sobretot de l'impuls legislatiu i la disponibilitat d'aquest recurs inclús en èpoques de sequera. La construcció de basses a mode de reservori per l'aigua regenerada és una pràctica habitual entre els gestors dels camps de golf. Tanmateix, la possibilitat d'un recreixement de les poblacions microbianes fecals presents a l'aigua després de la desinfecció i/o de la recontaminació de l'aigua amb l'entrada de nou material fecal, posa en dubte la seguretat d'aquests reservoris. Per tant, disposar d'eines que permetin determinar l'origen de la contaminació fecal en aquest tipus d'ambients és clau per garantir la qualitat de l'aigua regenerada.

Recentment, es van detectar baixes concentracions d'indicadors bacterians de contaminació fecal en l'aigua de dues basses utilitzades com a reservori per a l'irrigació d'un camp de golf, malgrat que la qualitat de l'aigua regenerada utilitzada per omplir les basses complia els criteris especificats a la normativa d'aigües regenerades. El primer objectiu d'aquest estudi va ser avaluar si el Phene-Plate System era una eina adequada per traçar l'origen de la contaminació fecal en aigües amb baixes concentracions d'indicadors, com ara la de les basses. El segon objectiu va ser determinar si els indicadors detectats provenien d'un recreixement de les poblacions microbianes presents a l'aigua regenerada o bé, tenien un altre origen (humà o animal) relacionat amb les activitats del propi camp de golf.

Per això, es va procedir a enumerar i aïllar un nombre representatiu de coliforms fecals i d'enterococs fecals de les dues basses i de l'efluent secundari de la planta de tractament i se'ls va sotmetre a un fenotipatge bioquímic amb les microplaques PhP-RE i PhP-RF, respectivament. Posteriorment, es van calcular els índexs de diversitat i similitud poblacional. Paral·lelament, per tal de descartar un recreixement de les poblacions microbianes, es va estudiar la inactivació de diversos microorganismes (coliforms fecals, bifidobacteris totals, bifidobacteris fermentadors del sorbitol, bacteriòfags somàtics i bacteriòfags de *Bacteroides thetaiotaomicron*) a les basses utilitzant un mesocosmos *in situ*.

Els resultats de la caracterització de les poblacions de coliforms fecals i enterococs fecals amb el Phene-Plate System van indicar que l'origen de la contaminació fecal a les basses no estava relacionat amb aportacions fecals humanes. D'altra banda, els assajos d'innactivació demostraven que cap dels microorganismes era capaç de créixer a les basses. Per tant, es descartava que la contaminació fecal detectada a les basses tingués relació amb l'aigua regenerada. De fet, tot apuntava que les aportacions de material fecal de les aus podien ser l'origen de la contaminació detectada.

En conclusió, el Phene-Plate System es confirmava com una eina interessant per determinar l'origen de la contaminació fecal en aigües amb baixes concentracions d'indicadors. D'altra banda, es feia palès que cal monitoritzar l'aigua regenerada durant tota la seva utilització, atès que els processos de deteriorament poden incrementar els riscos associats a la seva utilització.

Determination of the fecal contamination origin in reclaimed water open-air reservoirs using biochemical fingerprinting of enterococci and fecal coliforms

Arnau Casanovas-Massana* and Anicet R. Blanch

Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain

ABSTRACT

Low concentrations of fecal bacterial indicators were recently detected in two reclaimed-water open-air ponds used to irrigate a golf course. The aim of this study was to evaluate the feasibility of a biochemical fingerprinting method to track the origin of the fecal contamination in waters with low levels of fecal bacterial indicators, such as those in the ponds. Moreover, it was also pursued to determine if the presence of these fecal bacterial indicators was due to a regrowth of the reclaimed-water populations or to a contribution of fecal matter originated in the golf facility. Three-hundred and fifty enterococcal strains and 308 fecal coliform strains were isolated from the ponds and reclamation plant, and were biochemically phenotyped. Additionally, the inactivation of several microbial fecal pollution indicators (fecal coliforms, total bifidobacteria, sorbitol-fermenting bifidobacteria, somatic bacteriophages and bacteriophages infecting *Bacteroides thetaiotaomicron*) was studied using a mesocosm *in situ* in order to analyse the decay or regrowth of these microbial indicators. Although the concentration of fecal bacterial indicators was low, the biochemical fingerprinting provided evidence that the origin of the fecal contamination in the ponds was not related to the reclaimed water. Therefore, biochemical fingerprinting showed to be a successful approach considering that other microbial source tracking methods perform poorly when dealing with low fecal load matrices. Furthermore, the mesocosms assays indicated that none of the microbial fecal indicators were able to regrow in the ponds. Finally, the study highlighted that reclaimed water may be recontaminated in open-air reservoirs and thus, the microbial quality should be monitored throughout its use.

Keywords: biochemical fingerprinting, enterococci, fecal coliforms, reclaimed water reservoir, microbial source tracking, recontamination

*Corresponding author.

Mailing address: Departament de Microbiologia, Avinguda Diagonal, 643, E-08028 Barcelona, Catalonia, Spain

Phone: (+34) 934039044

Fax: (+34) 934039047

Email: arnaucasanovas@ub.edu

INTRODUCTION

The optimization and proper management of water resources is a growing concern for most societies due to the generalized shortage of water suitable for human uses (UNO-Water 2007). In this context, water reclamation may be a beneficial activity, since reclaimed water is a sound alternative to drinking water in numerous areas: agricultural irrigation, some industrial activities, aquifer recharge, cleaning of urban streets, watering gardens and ecological purposes (Levine and Asano 2004). As a result, the use of reclaimed water is expected to rise in many areas of the world, and more prominently in coastal areas (Angelakis and Durham 2008). Golf-course irrigation is one of the sectors where the demand for reclaimed water is expected to increase the most considering the regulatory requirements to replace the conventional water sources with reclaimed water. The need for a consistent water supply even during drought periods, the affordable costs of this resource and the additional benefits related to the nutrient content of the water are other relevant factors which may explain this increase (Mujeriego 2007).

In general, the reclamation technologies available ensure reclaimed water effluents whose microbial quality is in line with the regulations for golf-course irrigation. However, several studies have reported the occurrence of microbial pathogens such as *Cryptosporidium*, *Giardia*, enteroviruses, enteropathogenic *E. coli*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Aeromonas* and *Pseudomonas* and the potential regrowth of some of them in reclaimed-water distribution and storage systems (Costán-Longares et al. 2008; Gennaccaro et al. 2003; Jjemba et al. 2010; Ryu et al. 2005). These situations raise certain concern on the common strategy of constructing ornamental open-air ponds as a mid or long term reclaimed water reservoirs, since the regrowth of the fecal bacteria still present in the reclaimed water after the disinfection treatment cannot be discarded. Moreover, recontamination with fecal bacteria from wildlife and/or domestic animal defecation (Nemec and Massengale 2010; Vogel et al. 2007), urban runoff (Sauer et al. 2011) or septic system failure (Ahmed et al. 2005a) must not be discarded. Thus, the original microbial quality of the reclaimed water cannot be guaranteed during the storage.

Hence, the determination of the origin of the fecal microbial populations in these reservoirs would enhance the maintenance operations and help to guarantee their sanitary quality. In recent years, many fecal source tracking approaches have been proposed to distinguish the sources of animal and human fecal pollution in the environment including ribotyping, repetitive DNA sequences, amplified fragment length polymorphism, denaturing-gradient gel electrophoresis, pulsed-field electrophoresis, host-specific 16S rDNA genetic markers and antibiotic resistance analysis. The advantages and disadvantages of each method have been widely discussed (Meays et al. 2004; Scott et al. 2002). Particularly, one of the critical issues is the generalized poor

performance of these techniques when dealing with low fecal load matrices (Hadegorn et al. 2011).

The Phene-Plate System™ (Bactus AB, Sweden) is a rapid biochemical fingerprinting method which has been used to type enterococci and fecal coliforms in several epidemiological and ecological studies, showing high discrimination and reproducibility degrees (Ahmed et al. 2005a; Ahmed et al. 2005b; Kühn et al. 2003; Kühn et al. 2005; Manero et al. 2006; Vilanova et al. 2004). This system is suitable in studies involving large numbers of isolates, and potentially, in waters with low levels of fecal bacterial indicators.

Recently, low concentrations of fecal bacterial indicators were detected in two reclaimed-water ponds used as a reservoir for the irrigation of a golf facility. The first aim of this study was to evaluate the feasibility of the Phene-Plate System™ biochemical fingerprinting method to track the origin of the fecal contamination in waters with low levels of fecal bacterial indicators, such as those in the ponds. The second aim was to discern if the presence of fecal bacterial indicators in these ponds was due to a regrowth of the bacteria still present in the reclaimed water after the disinfection treatment or had another origin (e.g. human or animal) related to the activities of the golf facility. For this purpose, the Phene-Plate System™ was used to characterize the enterococci and fecal coliforms populations associated with the water of the ponds to provide evidence of the origin of such low concentration of fecal contamination. Furthermore, several inactivation assays were performed using a mesocosm *in situ* to discard the regrowth of the fecal bacterial indicators in the ponds.

MATERIALS AND METHODS

Description of the system

The system studied consisted of a water reclamation plant which treated an average flow of 800,000 m³ per year, mostly produced in summer. The reclamation process involved sand filtration followed by disinfection with a combination of chlorination and ultraviolet light. The average dose of ultraviolet light was 25-30 mJ cm⁻² and the chlorine concentration-time was 55 min at 2 mg Cl L⁻¹. These treatments ensured that the concentration of *E. coli* remained below 200 CFU/100 ml, which is the limit stated in the Spanish reclamation water. The historical series available showed that the concentrations at the end of the treatment were around 20 CFU/100ml as a 90th percentile of the annual set of data.

A portion of the reclaimed water was pumped to two outdoor artificial storage ponds connected in series (pond A and pond B) which were used to irrigate a golf course. The capacity of pond A was 21,000 m³ and that of pond B was 13,000 m³. The water stored in both ponds was regularly used in the golf-course irrigation sprinklers. The volume of

reclaimed water used for irrigation varied depending on the climatic conditions and the needs of the golf course in the different seasons. In summer, irrigation was quite intensive, which resulted in a pond-water residence time of around two weeks. In contrast, the pond water was scarcely used in winter.

Sampling

Six water samples were taken at three points of the system: the inflow of the reclamation plant, pond A and pond B. Three of the samples were taken in summer and another three in winter. All samples were collected with aseptic techniques and were refrigerated at 4 °C for up to 6 h before being processed in accordance to standardized protocols (APHA 1998; ISO 1994).

Enumeration of bacterial populations

Different volumes of water samples were filtrated through 0.45 µm pore-size membranes (Millipore, Molsheim, France). Filters were cultured on mFC agar plates (Difco, USA) at 44.5 °C for 24 h to enumerate fecal coliforms by counting the blue colonies (Grabow 1990). In addition, to enumerate the enterococci, another set of filters was incubated on m-Enterococcus agar plates at 37 °C for 48 h. They were then transferred to Bile Esculin Agar (Difco, Detroit, MI, USA) for 3 h at 44 °C to confirm the enterococci colonies on the basis of the hydrolysis of esculine (Figueras et al. 1998; Manero and Blanch 1999).

Biochemical fingerprinting

Fecal coliforms and enterococci populations were biochemically phenotyped using the PhP-RE and PhP-RF plates of the Phene-Plate System™ (Bactus AB, Sweden), respectively. Biochemical fingerprinting is based on the kinetics of several discriminating biochemical reactions, performed in 96-well microplates with dehydrated reagents (Kühn et al. 1991). Each isolate to be phenotyped is submitted to eleven tests. Tests used in the PhP-RE microplates for fecal coliforms are acidification/alkalization of cellobiose, lactose, rhamnose, desoxyribose, sucrose, sorbose, tagatose, D-arabitol, melbionate, D-galacturonic acid γ-lactone and ornithine. Tests used in the PhP-RF microplates for enterococci are acidification/alkalization of L-arabinose, lactose, melibiose, melezitose, raffinose, inositol, sorbitol, mannose, D-galacturonic acid γ-lactone, amygdaline and gluconate.

A maximum of 25 well isolated colonies were randomly selected from the enumeration plates for each sample and bacterial indicator (fecal coliform and enterococci). Each set of colonies was assumed to be representative of the whole population associated with each sample (Bianchi and Bianchi 1982; Kühn et al. 1997). Overnight cultures of fecal coliform isolates and enterococci were prepared on Trypticasein Soy Agar (Pronadisa, Spain) at 37 °C. Cell suspensions were prepared by harvesting these cultures in a suspending medium (w/v): 0.1% proteose peptone (Difco, USA) and 0.011%

bromothymol blue (Panreac, Spain) for fecal coliforms, and 0.2% proteose peptone, 0.05% yeast extract (Pronadisa, Spain), 0.5% NaCl and 0.011% bromothymol blue for enterococci. These suspensions were used to inoculate the first well of each row of the PhP-RE and PhP-RF microplates respectively, by picking up and resuspending a loopful of culture in 300 μ l of the suspending medium. Aliquots (25 μ l) of the bacterial suspension of this well were then transferred to the other wells of the same row after half an hour of incubation, following the manufacturer's instructions and as described previously (Kühn and Möllby 1993). The inoculated microplates were incubated at 37 °C for both bacterial groups in a humid chamber to prevent dehydration. To obtain the biochemical fingerprint for each isolate, acidification/alkalization in the different wells is measured by the absorbance reading at 620 nm with the iEMS Reader MF (Labsystems, Finland). Several readings during the incubation period are used to evaluate the kinetics for the fermentation of each substrate. Absorbance is measured at and 7 h, 24 h and 48 h after inoculation for fecal coliforms, and at 16 h, 40 h and 64 h for enterococci. After the final reading, the average value of the three readings is calculated providing eleven different numbers for each strain (its biochemical PhP phenotype) (Kühn et al. 1991). Similarities between strains are calculated as correlation coefficients (r) as described before (Kühn 1985) and clustered according to unweighted-pair group method with arithmetic averages (UPGMA).

E. coli ATCC 700609 and *E. coli* ATCC 23724 were used as internal controls in PhP-RE plates to confirm reproducibility. Strains GL-17, FSM4 and FS1 isolated previously (Kühn et al. 2003; Kühn et al. 2005) were used similarly in PhP-RF plates.

Diversity indexes, similarity coefficients and clustering analysis

The diversity of biochemical profiles in each sample was calculated from Simpson's diversity index (D_i) (Hunter and Gaston 1988; Kühn et al. 1991). D_i measures the distribution of isolates in different phenotypic groups. The S_p , a similarity coefficient that measures the proportion of isolates that are identical in two compared samples (Kühn et al. 1991) was calculated between all the populations. Then, similarity coefficients were clustered using the unweighted pair group method analysis (UPGMA). Furthermore, on the basis of the results of the biochemical tests, isolates for each sampling site were pooled to determine the main biochemical PhP phenotypes (main clusters) of bacterial populations. Clusters were defined by isolates showing a similarity index equal to or higher than 0.975. Isolates showing the highest minimum and the highest mean similarity to all other isolates belonging to the same PhP phenotype were selected as representative strains (Kühn et al. 1991).

Comparison to other populations

The populations of both fecal indicators at the three sampling points were compared to a database of populations associated with slaughterhouse wastewater (fecal contamination of animal origin) and others associated with human sewage (where the

contamination was mostly of human origin) available from previous studies (Blanch et al. 2003; Kühn et al. 2005; Manero et al. 2006; Vilanova et al. 2004). In total, the database consisted of 3556 fecal coliform isolates and 1127 enterococci. The similarity coefficients obtained between all the populations were clustered using the unweighted pair group method analysis (UPGMA). All statistical analyses described above were performed using the software PhP-Win® (Bactus AB, Sweden).

Inactivation of fecal microbial indicators in the ponds

A water sample from pond B was spiked with a 1:50 dilution of sewage water from the treatment plant. This matrix was used to fill dialysis tubes with a porosity cut-off of 14 Kd (Medicell Dialysis Tubing Visking, London, UK). Dialysis tubes were desalted following the manufacturer's instructions. Several dialysis tubes were prepared for the matrix to allow for sampling at various time intervals. The sampling period was two weeks in winter and one week in summer, due to the degradation of dialysis membranes at higher temperatures. The dialysis tubes filled with 50 ml of the water matrix were placed at a depth of 20-25 cm from the surface of pond B. Independent assays were performed three times during the summer and four times during the winter in which five parameters were enumerated: fecal coliforms (FC), total bifidobacteria (TBIF), sorbitol-fermenting bifidobacteria (SBIF), somatic bacteriophages (SOM) and bacteriophages infecting *Bacteroides thetaiotaomicron* (BACT). FC were enumerated as described above. TBIF were counted on HBSA (Human Bifido Sorbitol Agar) as described previously (Mara and Oragui 1983). Yellow colonies on HBSA were counted as SBIF (Bonjoch et al. 2005). SOM were counted by the double-agar-layer technique using *Escherichia coli* strain WG5 following the standardized procedure (ISO 2000). BACT were enumerated as described elsewhere previously (Payan et al. 2005) according to ISO standard 10705-4 (ISO 2001). Moreover, the physical and chemical characteristics of pond-water (temperature, pH, electrical conductivity, dissolved oxygen concentration and oxidation-reduction potential (ORP)) were recorded during the assays and seasonal differences were also measured.

Enumeration results were used to calculate the inactivation kinetics of the culturable populations. Individual measurements of the concentrations at day 0 (t_0) and then daily until the end of the assay were \log_{10} transformed. The daily reduction was used to perform regression studies (Bonjoch et al. 2009; Balleste and Blanch 2010). The regression lines of the inactivation value were calculated for the different populations and the different assays (summer and winter). The following equations were used to calculate the decay rates (K_s) and the time required for 90 percent of the initial population to decay (T_{90} values (h)):

$$\log_{10}(N_t/N_0) = -K_s \cdot t$$
$$T_{90} = -1/(-K_s)$$

where the N_t value is the cell concentration per ml at time t , and the N_0 value is the initial cell concentration per ml (at time t_0) (Balleste and Blanch 2010).

Analysis of variance tests (ANOVA) and the F-test were performed using the software Statgraphics Plus (version 5.1; Rockville, MD, USA) to make comparisons between (i) all the indicators, and (ii) the seasonal differences. Regression analyses were carried out to determine the possible effects of physical and of physical and chemical pond-water characteristics, such as temperature, pH, electrical conductivity, dissolved oxygen concentration, oxidation-reduction potential (ORP), and inactivation kinetics.

RESULTS AND DISCUSSION

The water reclamation treatment achieved the microbiological standards for golf course irrigation, reducing up to 4.5 \log_{10} the fecal coliforms concentrations in the secondary-treated sewage. The seasonal variation of the fecal load in the secondary-treated sewage did not affect the performance of the reclamation treatment. As a result, the concentrations of fecal indicator bacteria that entered the ponds through the reclaimed water did not present significant variations throughout the year. Regarding the ponds, in winter they presented very low concentrations of both fecal indicator bacteria ($<0.10 \log_{10}$ CFU/100 ml), even lower than those in the reclaimed water. In contrast, in summer the concentrations reported were much higher than in winter or in the reclaimed water (Tab. 1). Hence, the reclaimed water used to fill the ponds was confirmed to meet the standards established in Spanish regulations for golf-course irrigation (Anonymous 2007). However, in summer, the concentrations of fecal indicator bacteria in the ponds were higher than in the reclaimed water, indicating that during the storage in the ponds, the microbial quality of the water gets somehow deteriorated. The increased concentrations reported in summer may be related to either a regrowth of the fecal indicator bacteria that entered the ponds through the reclaimed water, or to a contribution of fecal matter originated in the golf facility (diffuse pollution, birds or other wildlife, etc.). In contrast, the low concentrations detected in the ponds in winter suggested that the regrowth effect or the alternative source of fecal contamination might be insignificant or non-existent in this season.

A total of 308 enterococci (225 in summer and 83 in winter) and 315 fecal coliforms (225 in summer and 90 in winter) were isolated and biochemically phenotyped using the PhP-RF and PhP-RE plates, respectively. High diversity values were found for both populations at the secondary-treated sewage in summer and in winter ($D_i > 0.94$) in line with previous studies (Blanch et al. 2003; Vilanova et al. 2004). The diversity index was more moderate in the ponds in summer and was especially low for the enterococci in pond A. In general, low fecal bacterial indicator diversities have been related to inputs of fecal pollution associated with few individuals (Kühn et al. 1997). In winter, the

diversity indices in the ponds could not be compared to those in summer because of the low number of enterococci and fecal coliforms isolated (Tab. 1).

The analysis of the similarity coefficients in summer indicated that enterococci populations in pond A and pond B were strongly similar ($Sp > 0.2$), and thus, they shared the same biochemical profiles structure for this bacterial population. The similarity coefficients obtained for fecal coliforms supported this strong similarity between ponds ($Sp > 0.2$). On the other hand, the populations of fecal indicator bacteria in the secondary-treated sewage were different from those isolated in ponds A and B ($Sp < 0.2$). The analysis performed in winter showed that there was no similarity between the fecal coliform or enterococci populations of the secondary-treated sewage, pond A and pond B. However, the coefficients in winter were not as consistent as those in summer, since the number of isolates was low (Tab. 2).

The results of the comparison between the populations of both fecal indicators at the three sampling points against a previously developed database of populations (Blanch et al. 2003; Kühn et al. 2005; Manero et al. 2006; Vilanova et al. 2004) showed that the enterococci and fecal coliforms from the secondary-treated sewage were significantly associated with those from the human sewage isolated in other wastewater-treatment plants. In contrast, the enterococci and fecal coliforms from both ponds were not correlated with those from human sewages or animal (swine, poultry and cattle) wastewaters (Fig. 1). As a result, the biochemical fingerprinting suggested that the source of fecal pollution in the ponds in summer was not related to contributions associated to the reclaimed water treatment plant.

Considering the inactivation experiments in mesocosms, none of the fecal microbial indicators analyzed was able to regrow or even persist into the pond for a long time. On the contrary, they all presented a clear inactivation kinetic, which was significantly different between microorganisms ($p < 0.0086$ in summer and $p < 0.0032$ in winter). The inactivation rate of the fecal microbial indicators ranged from SBIF > TBIF > FC > BACT > SOM both in summer and in winter, with the lowest and highest T_{90} by bifidobacteria and somatic coliphages, respectively (Tab. 2). This results are consistent with results reported previously (Chung and Sobsey 1993; Durán et al. 2002; Moce-Llivina et al. 2005; Sinton et al. 1999), in which somatic bacteriophages and bacteriophages infecting *B. thetaiotaomicron* were more persistent than fecal coliforms and other indicators in sewage, seawater and freshwater. Additionally, the low persistence regarding bifidobacteria confirmed the results previously obtained in river water (Bonjoch et al. 2009). Several parameters are involved in the inactivation of fecal microbial indicators in aquatic environments; these include temperature, solar radiation, predation, pH, salinity, organic matter and dissolved oxygen (Pote et al. 2009). In this study, only water temperature was found to be significantly higher in summer ($24.3 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1.6$) than winter ($7.1 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.9$) and thus, it may be an important factor to explain the faster inactivation of

the fecal microbial indicators in that season (Tab.2). The higher persistence of microbial populations in winter has been reported in other studies on *in situ* microbial inactivation (Durán et al. 2002; Schaper et al. 2002; Yukselen et al. 2003; Whitman et al. 2004). Overall, these results provided evidence that the fecal microbial indicators that entered the ponds through the reclaimed water could not regrow in that natural environment and consequently, the reclaimed water could not be the source of the increased levels of fecal indicator bacteria.

Another issue to consider is the low fecal coliform/enterococci ratio (FC/E) reported in the ponds in summer. As several authors have previously observed (Feachem 1975; Geldreich and Kenner 1969;), low FC/E ratios are often related to fecal contamination of animal origin. Although the validity of this ratio has been questioned (Jagals and Grabow 1996; Sinton et al. 1998), it may serve as a preliminary indicator. The reclamation plant processed exclusively human sewages and presented higher FC/E ratios. Therefore, it is unlikely to be the source of the pollution in the ponds.

Overall, all data suggested that there was a source of fecal matter in the ponds other than the reclaimed water. Furthermore, large numbers of birds, particularly *Anas platyrhynchos* and *Anser anser*, were observed in and around the ponds in summer. In winter, these birds were hardly ever seen, a finding which suggested that the high pollution levels detected in summer might be related to their droppings. Though the relation to such wildlife fecal contribution was not the scope of this study, this fecal origin should not be discarded, since other authors have recently indicated that bird feces may be a significant source of fecal indicator bacteria in recreational waters (Edge and Hill 2007; Grant et al. 2001; Wither et al. 2005; Wright et al. 2009).

CONCLUSIONS

To sum up, the biochemical fingerprinting and the inactivation assay provided evidence that the source of fecal pollution in the ponds was not related to the reclaimed water. An input from animal fecal matter generated by the ponds' own dynamics was hypothesized as the main contributor. Therefore, although the reclaimed water complied with sanitary regulations, the microbial quality of the water deteriorated during the residence time in the ponds, probably due to wildlife activity. From a general point of view, these results point out an important limitation in the current reclaimed-water regulation which does not foresee the potential recontamination of properly disinfected waters and its consequences (Anonymous 2007). As a result, the legal interpretation of recontaminations is complex and therefore its health implications should be studied to achieve a better understanding of the associated risks. Nevertheless, the results suggest that a disinfection treatment achieving concentrations of *E. coli* around 1 log unit at a percentile 90 ensures that the ponds do not exceed the regulatory limit of 200 CFU/100 ml considering the input of fecal matter by diffuse pollution, birds or other wildlife, etc.

The biochemical fingerprinting of both enterococci and fecal coliforms was useful to discard the human origin of the fecal pollution in the ponds, although the concentration of fecal indicator bacteria was low (around 10^2 CFU fecal coliforms/100 ml). This application may be relevant considering that other culture-dependent and culture-independent microbial source tracking methods proposed over the last years have shown great limitations when implemented in waters with low concentrations of fecal indicator bacteria (Hagedorn et al. 2011).

Finally, the study highlights that the microbial quality of reclaimed water should be monitored after leaving the treatment plant to ensure the safety of the water throughout the duration of its use.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Consorci de la Costa Brava for its help with the sampling and Dr. Javier Méndez from the University of Barcelona for his help with the statistical analysis. This study was supported by the *Xarxa de Referència en Biotecnologia* (XRB). Arnau Casanovas-Massana was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education.

TABLES

Table 1. Average of concentration in \log_{10} units (CFU/100 ml) and population diversity of the bacterial groups analyzed in the secondary-treated sewage (TS), reclaimed water (RW), pond A (PA) and pond B (PB) in summer and winter. Values of standard deviation for colony counts and number of isolates analyzed for diversity are indicated in brackets.

		Fecal coliforms		Enterococci	
		Concentration	Di	Concentration	Di
Summer	TS	5.94 (± 0.08)	0.96 (75)	4.44 (± 0.15)	0.98 (75)
	RW	1.36 (± 0.51)	-	-	-
	PA	2.73 (± 0.31)	0.89 (75)	3.27 (± 0.67)	0.41 (75)
	PB	2.78 (± 0.16)	0.89 (75)	2.27 (± 0.62)	0.91 (75)
Winter	TS	4.07 (± 0.01)	0.99 (45)	3.39 (± 0.58)	0.94 (32)
	RW	1.17 (± 0.40)	-	-	-
	PA	0	0.94 (9)	0	0.95 (11)
	PB	0.06 (± 0.10)	0.50 (36)	0.10 (± 0.17)	0.84 (42)

Table 2. Similarity coefficients between the fecal coliforms or enterococci populations in the secondary-treated sewage (TS), reclaimed water (RW), pond A (PA) and pond B (PB) in summer and winter

	Enterococci				Fecal coliforms			
	Summer		Winter		Summer		Winter	
	TS	PA	TS	PA	TS	PA	TS	PA
PA	0.094	-	0	-	0.102	-	0.026	-
PB	0.194	0.204	0	0.013	0.189	0.420	0.053	0

Table 3. Average T_{90} values (h) obtained from the regression lines of the inactivation models of culturable fecal coliforms (FC), total bifidobacteria (TBIF), sorbitol-fermenting bifidobacteria (SBIF), somatic bacteriophages (SOM) and Human-*Bacteroides* bacteriophages (BACT). *P*-values were calculated using the ANOVA test. Values of standard deviation are indicated in brackets.

	Summer	Winter	<i>P</i> -value between seasons
FC	73.7 (± 1.7)	198.8 (± 62.8)	0.020
TBIF	67.9 (± 1.2)	158.9 (± 6.5)	0.000
SBIF	46.8 (± 11.3)	144.6 (± 43.9)	0.020
SOM	102.3 (± 28.5)	387.1 (± 126.9)	0.019
BACT	75.2	351.6 (± 98.6)	0.083

FIGURES

Figure 1. Clustering of the similarity indexes (S_p) of the enterococci and fecal coliform populations isolated in the treated sewage, pond A, pond B and other populations associated with slaughterhouse wastewater and human sewage by the UPGMA method.

Fig. 1A Enterococci

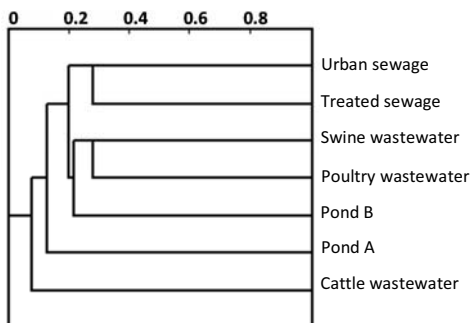
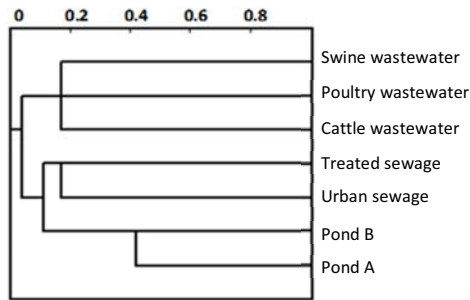


Fig. 1B Fecal coliforms



REFERENCES

- Ahmed W, Neller R, Katouli M (2005a) Evidence of septic system failure determined by a bacterial biochemical fingerprinting method. *J Appl Microbiol* 98:910-920.
- Ahmed W, Neller R, Katouli M (2005b) Host species-specific metabolic fingerprint database for enterococci and *Escherichia coli* and its application to identify sources of fecal contamination in surface waters. *Appl Environ Microbiol* 71:4461-4468.
- American Public Health Association (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC.
- Angelakis AN and Durham B (2008) Water recycling and reuse in EUREAU countries: Trends and challenges. *Desalination* 218:3-12.
- Anonymous (2007) Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. 281:50639-50661.
- Balleste E and Blanch AR (2010) Persistence of *Bacteroides* species populations in a river as measured by molecular and culture techniques. *Appl Environ Microbiol* 76:7608-7616.
- Bianchi, MAG and Bianchi, AJM (1982) Statistical sampling of bacterial strains and its use in bacterial diversity measurement. *Microb Ecol* 8:61-69.
- Blanch AR, Caplin JL, Iversen A, Kühn I, Manero A, Taylor HD, Vilanova X (2003) Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *J Appl Microbiol* 94:994-1002.
- Bonjoch X, Ballesté E, Blanch AR (2005) Enumeration of bifidobacterial populations with selective media to determine the source of waterborne fecal pollution. *Water Res* 39:1621-1627.
- Bonjoch X, Lucena F, Blanch A (2009) The persistence of bifidobacteria populations in a river measured by molecular and culture techniques. *J Appl Microbiol* 107:1178-1185.
- Chung H and Sobsey MD (1993) Comparative Survival of indicator viruses and enteric viruses in seawater and sediment. *Water Sci Technol* 27:425-429.
- Costán-Longares A, Montemayor M, Payán A, Méndez J, Jofre J, Mujeriego R, Lucena F (2008) Microbial indicators and pathogens: Removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. *Water Res* 42:4439-4448.
- Durán AE, Muniesa M, Méndez X, Valero F, Lucena F, Jofre J (2002) Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J Appl Microbiol* 92:338-347.
- Edge TA and Hill S (2007) Multiple lines of evidence to identify the sources of fecal pollution at a freshwater beach in Hamilton Harbour, Lake Ontario. *Water Res* 41:3585-3594.
- Feachem R (1975) An improved role for faecal coliform to faecal streptococci ratios in the differentiation between human and non-human pollution sources. *Water Res* 9:689-690.

- Figueras MJ, Inza I, Polo F, Guarro J (1998) Evaluation of the oxolinic acid-esculin-azide medium for the isolation and enumeration of faecal streptococci in a routine monitoring programme for bathing waters. *Can J Microbiol* 44:998-1002.
- Geldreich EE and Kenner BA (1969) Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *J Water Pollut Control Fed* 41: R336-R352.
- Gennaccaro AL, McLaughlin MR, Quintero-Betancourt W, Huffman DE, Rose JB (2003) Infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in final reclaimed effluent. *Appl Environ Microbiol* 69:4983-4984.
- Grabow, WOK (1990) Microbiology of drinking water treatment: Reclaimed wastewater. In *Drinking water microbiology: Progress and recent developments*. G. A. McFeters (ed). Springer Verlag, New York.
- Grant SB, Sanders BF, Boehm AB, Redman JA, Kim JH, Mrse RD, Chu AK, Gouldin M, McGee CD, Gardiner NA, Jones BH, Svejkský J, Leipzig GV, Brown A (2001) Generation of enterococci bacteria in a coastal saltwater marsh and its impact on surf zone water quality. *Environ Sci Technol* 35:2407-2416.
- Hadegorn, C, Blanch, AR, Harwood, VJ (2011) Microbial source tracking: methods, applications and case studies. Springer-Verlag, New York,
- Hunter PR and Gaston MA (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26:2465-2466.
- International Organization for Standardization (1994) Guidance on the Preservation and Handling of Samples. ISO 5667/3:1994.
- International Organization for Standardization (2000) Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2. Enumeration of somatic coliphages. ISO 10705-2.
- International Organization for Standardization (2001) Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 4. Enumeration of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*. ISO 10705-4.
- Jagals P and Grabow WOK (1996) An evaluation of sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human fecal pollution of environmental water. *Water SA* 22:235-238.
- Jjemba PK, Weinrich LA, Cheng W, Giraldo E, Lechevallier MW (2010) Regrowth of potential opportunistic pathogens and algae in reclaimed-water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 76:4169-4178.
- Kühn I, Allestam G, Engdahl M, Stenström T (1997) Biochemical fingerprinting of coliform bacterial populations - comparisons between polluted river water and factory effluents. *Water Sci Technol* 35:343-350.
- Kühn I, Allestam G, Stenström TA, Möllby R (1991) Biochemical fingerprinting of water coliform bacteria, a new method for measuring phenotypic diversity and for comparing different bacterial populations. *Appl Environ Microbiol* 57:3171-3177.
- Kühn I (1985) Biochemical fingerprinting of *Escherichia coli*: a simple method for epidemiological investigations. *J Microbiol Methods* 3:159-170.
- Kühn I and Möllby R (1993) The PhP RS system. A simple microplate method for studying coliform bacterial populations. *J Microbiol Methods* 17:255-259.
- Kühn I, Iversen A, Burman LG, Olsson-Liljequist B, Franklin A, Finn M, Aarestrup F, Seyfarth AM, Blanch AR, Vilanova X, Taylor H, Caplin J, Moreno MA, Dominguez L, Herrero IA, Möllby R (2003) Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment - a European study. *Int J Food Microbiol* 88: 133-145.
- Kühn I, Iversen A, Finn M, Greko C, Burman LG, Blanch AR, Vilanova X, Manero A, Taylor H, Caplin J, Dominguez L, Herrero IA, Moreno MA, Mollby R (2005) Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. *Appl Environ Microbiol* 71:5383-5390.
- Levine AD and Asano T (2004) Recovering sustainable water from wastewater. *Environ Sci Technol* 38:201A-208A.
- Manero A and Blanch AR (1999) Identification of *Enterococcus spp.* with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol* 65:4425-4430.
- Manero A, Vilanova X, Cerdà-Cuellar M, Blanch AR (2006) Vancomycin- and erythromycin-resistant enterococci in a pig farm and its environment. *Environ Microbiol* 8:667-674.
- Mara DD and Oragui JI (1983) Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. *J Appl Bacteriol* 55:349-357.

- Meays CL, Broersma K, Nordin R, Mazumder A (2004) Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *J Environ Manage* 73:71-79.
- Moce-Llivina L, Lucena F, Jofre J (2005) Enteroviruses and bacteriophages in bathing waters. *Appl Environ Microbiol* 71:6838-6844.
- Mujeriego, R. (2007) Golf course irrigation with reclaimed water. Water reuse case studies in Spain, 2. Politechnic University of Catalonia Publications.
- Nemec MD and Massengale RD (2010) The use of carbon-utilization profiling to determine sources of fecal contamination in a central Texas watershed. *Lake Reserv Manage* 26:104-113.
- Payan A, Ebdon J, Taylor H, Gantzer C, Ottoson J, Papageorgiou GT, Blanch AR, Lucena F, Jofre J, Muniesa M (2005) Method for isolation of *Bacteroides* bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. *Appl Environ Microbiol* 71:5659-5662.
- Pote J, Haller L, Kottelat R, Sastre V, Arpagaus P, Wildi W (2009) Persistence and growth of faecal culturable bacterial indicators in water column and sediments of Vidy Bay, Lake Geneva, Switzerland. *J Environ Sci (China)* 21:62-69.
- Ryu H, Alum A, Abbaszadegan M (2005) Microbial characterization and population changes in nonpotable reclaimed water distribution systems. *Environ Sci Technol* 39:8600-8605.
- Sauer EP, VandeWalle JL, Bootsma MJ, McLellan SL (2011) Detection of the human specific *Bacteroides* genetic marker provides evidence of widespread sewage contamination of stormwater in the urban environment. *Water Res* 45:4081-4091.
- Schaper M, Duran AE, Jofre J (2002) Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA Bacteriophages to various inactivation processes. *Appl Environ Microbiol* 68:3702-3707.
- Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, Farrah SR, Lukasik J (2002) Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl Environ Microbiol* 68:5796-5803.
- Sinton LW, Finlay RK, Hannah DJ (1998) Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review. *N Z J Mar Freshwat Res* 32:323-348.
- Sinton LW, Finlay RK, Lynch PA (1999) Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Appl Environ Microbiol* 65:3605-3613.
- United Nations Organization for Water (2007) Coping with water scarcity. Challenge of the 21st century. UN-Water, Hamilton, Canada.
- Vilanova X, Manero A, Cerda-Cuellar M, Blanch AR (2004) The composition and persistence of faecal coliforms and enterococcal populations in sewage treatment plants. *J Appl Microbiol* 96:279-288.
- Vogel JR, Stoeckel DM, Lamendella R, Zelt RB, Santo Domingo JW, Walker SR, Oerther DB (2007) Identifying fecal sources in a selected catchment reach using multiple source-tracking tools. *J Environ Qual* 36:718-729.
- Whitman RL, Nevers MB, Korinek GC, Byappanahalli MN (2004) Solar and temporal effects on *Escherichia coli* concentration at a lake michigan swimming beach. *Appl Environ Microbiol* 70:4276-4285.
- Wither A, Rehfishch M, Austin G (2005) The impact of bird populations on the microbiological quality of bathing waters. *Water Sci Technol* 51:199-207.
- Wright ME, Solo-Gabriele HM, Elmir S, Fleming LE (2009) Microbial load from animal feces at a recreational beach. *Mar Pollut Bull* 58:1649-1656.
- Yukselen MA, Calli B, Gokyay O, Saatci A (2003) Inactivation of coliform bacteria in Black Sea waters due to solar radiation. *Environ Int* 29:45-50.

3. Discussió i conclusions

3. Discussió i conclusions

3.1 Article 1: Identificació de *Pseudomonas aeruginosa* en plantes embotelladores d'aigua en base als procediments inclosos a la ISO 16266:2006

Durant el període d'estudi, els laboratoris de les plantes embotelladores col·laboradores van prendre regularment mostres d'aigua en diferents punts del sistema d'envasat i van aïllar un total de 41 soques, que van identificar de manera presumptiva com a *Pseudomonas aeruginosa*. Aquesta primera identificació es basava a la pigmentació que produïen les colònies que creixien en el medi d'aïllament (agar de cetrimida suplementat amb àcid nalidíxic). Totes aquelles colònies que presentaven una coloració verdosa, blavosa o que eren fluorescents quan se les il·luminava amb llum ultraviolada, eren seleccionades com a presumptes *P. aeruginosa*.

Després de comprovar la puresa dels cultius i que la seva morfologia cel·lular fos de bacil gram negatiu, totes les soques aïllades van ser sotmeses a les proves incloses a la ISO 16266:2006 (capacitat de creixement i pigmentació en agar de cetrimida suplementat amb àcid nalidíxic, creixement en brou d'acetamida, pigmentació en agar King B i test de la oxidasa). La combinació dels resultats d'aquestes proves determinava si una soca s'identificava o no com a *P. aeruginosa*. Addicionalment, es van assajar altres proves que s'han utilitzat àmpliament per a la identificació de *P. aeruginosa*, però que no estan incloses a la ISO 16266:2006. Aquestes proves van ser: el creixement en brou d'asparagina, la pigmentació en agar King A i la capacitat de creixement a 4°C i a 42°C. Aquesta darrera prova apareix en la definició de *P. aeruginosa* en el text de la ISO 16266:2006, de manera que es pot considerar un assaig complementari. Finalment, es van utilitzar dos sistemes de fenotipatge bioquímic disponibles comercialment: API 20[®]NE (Biomérieux, França) i PhP-48 de Phene-Plate System[™] (Bactus AB, Suècia), per caracteritzar totes les soques aïllades; i es va seqüenciar el gen del 16S ARNr de les soques més representatives de cadascun dels grups fenotípics definits.

Els assajos inclosos a la ISO 16266:2006 van permetre identificar 27 de les 41 soques aïllades com a *P. aeruginosa*. De fet, els resultats de totes les proves eren coincidents: totes produïen piocianina, pioverdina o piorubina en agar de cetrimida suplementat amb àcid nalidíxic, podien créixer produint amoni en el brou d'acetamida, produïen pioverdina en agar King B i presentaven l'enzim citocrom C oxidasa. A banda de les proves bàsiques, també totes produïen piocianina en agar King A i podien créixer a 42°C en agar nutritiu, però no a 4°C. La restants soques aïllades no complien els criteris establerts a la norma i, per tant, quedaven descartades com a *P. aeruginosa*. De fet, cap d'aquestes soques descartades produïa piocianina, piorubina o pioverdina en agar de cetrimida suplementat amb àcid nalidíxic, que és el primer assaig a què s'han de

sotmetre les soques segons el procediment estandarditzat. Això indicaria que els laboratoris de les plantes envasadores no realitzaven correctament la identificació presumptiva de les soques. En aquest sentit seria recomanable proveir els laboratoris de les plantes envasadores de material de referència, especialment controls positius i negatius, per tal que apliquessin correctament la norma ISO 16266:2006, i minimitzessin les soques mal identificades.

En un altre ordre de coses, les galeries API®20NE identificaven 29 de les soques aïllades com a *P. aeruginosa*. Aquestes 29 soques presentaven 7 perfils bioquímics diferents (Taula 6), la variabilitat dels quals es deu a una variabilitat en els resultats d'algunes de les proves de la galeria i, per tant, a un fenotip diferent entre les soques. Les proves amb resultats variables van ser: l'arginina dihidrolasa (90% de soques positives), la ureasa (24% de positives), la β -glucosidasa (17% de positives), la β -galactosidasa (14% de positives), l'assimilació de l'N-acetil-glucosamina (93% de positives), l'assimilació de l'àcid adípic (97% de positives) i l'assimilació de l'àcid fenilacètic (3% de positives). Els 7 perfils bioquímics tenien percentatges d'identificació entre el 67,9% i el 99,9%, tot i que la gran majoria de soques tenien percentatges d'identificació superiors al 98%.

Taula 7. Perfils API®20 NE obtinguts per a les soques identificades com a *P. aeruginosa* i percentatge d'identificació

Perfil API®20NE	Nombre de soques	% identificació
1154575	17	99,50%
1354575	5	99,90%
1354577	1	98,10%
1474575	3	67,90%
1554475	1	99,90%
1574475	1	99,90%
1354555	1	99,90%

De les 29 soques identificades amb aquest sistema, 27 coincidien amb els resultats de la ISO 16266:2006. Hi havia, tanmateix, dues soques (soca 30 i soca 31) que no es consideraven *P. aeruginosa* segons la ISO 16266:2006, però que sí que s'identificaven com a tal amb el sistema API®20NE.

El fenotipatge bioquímic en base a les microplaques PhP-48 va permetre discriminar quatre grups fenotípics (A, B, C i D) i 11 soques no agrupades (Figura 2). Els grups A i B contenien 25 soques en total, totes elles identificades com a *P. aeruginosa* tant pel procediment estandarditzat com per les galeries API® 20NE. També s'identificaven com a *P. aeruginosa* amb tots dos mètodes, dues soques sense agrupar (3 i 27) properes als grups A i D. Finalment, el grup B, molt proper al grup A, estava format per les dues soques identificades com a *P. aeruginosa* amb el sistema API® 20NE, però no segons la ISO 16266:2006.

La seqüenciació del gen que codifica el 16S ARNr de les soques més representatives de cada grup fenotípic i de les soques sense agrupar, va confirmar que els grups fenotípics A, B i D eren *P. aeruginosa*. Per tant, 29 soques quedaven definitivament confirmades com a *P. aeruginosa*, incloent les soques 30 i 31 (grup B) que presentaven resultats contradictoris entre el procediment de la ISO 16266:2006 i l'API®20NE. Per tant, la norma ISO 16266:2006 identificava correctament 27 de les 29 soques finalment confirmades com a *P. aeruginosa*, però hi havia dos falsos negatius (soques 30 i 31). Aquestes dues soques no produïen pigments en l'agar de cetrimida suplementat amb àcid nalidíxic ni en l'agar King B, de manera que el procediment de la ISO 16266:2006, basat fonamentalment en la capacitat de *P. aeruginosa* de produir pigments característics, no les podia detectar. De fet, no totes les soques de *P. aeruginosa* són productores d'aquests pigments, com demostren estudis previs que han aïllat soques ambientals no pigmentades (55). En conseqüència, es fa palès que la ISO 16266:2006 presenta limitacions a l'hora d'identificar aquest tipus de soques, fet que cal tenir en compte en futures revisions de la norma. En tot cas, caldria aprofundir en l'estudi de la prevalença i distribució de les soques no pigmentades, per tal d'establir quina és la seva significació des d'un punt de vista sanitari.

La resta de grups i soques sense agrupar es classificaven com a altres espècies de *Pseudomonas sp.* (*P. putida*, *P. stutzeri*, i d'altres sense identificar) o d'altres gèneres (*Delftia*, *Acinetobacter*, *Rhizobium* i *Pseudoxanthomonas*).

A la llum dels resultats obtinguts amb la seqüència del 16S ARNr, el sistema API®20NE es confirmava com una eina capaç de proveir una identificació correcta a totes les soques de *P. aeruginosa*, sense presentar ni falsos positius ni falsos negatius. Així doncs, aquest sistema pot ser d'interès en aquelles situacions on es treballi amb soques amb identificacions dubtoses.

Pel que fa a les proves addicionals assajades, el creixement en brou d'asparagina no va resultar ser un assaig fiable. Les soques 2 i 4 presentaven creixement en aquest medi, malgrat que es van identificar posteriorment com a *P. putida* i, per tant, la capacitat de créixer en brou d'asparagina no seria exclusiva de *P. aeruginosa*. A més, la soca 24 confirmada com a *P. aeruginosa* no era capaç de créixer-hi, essent un fals negatiu.

En canvi, el creixement en agar King A i a 4°C i 42°C sí que eren capaços de discriminar correctament totes les soques, incloent les soques 30 i 31, falsos negatius de la ISO 16266:2006. Atès que són proves barates, senzilles, ràpides el seu ús pot ser recomanable en la confirmació de *P. aeruginosa*, seguint els procediments de la ISO 16266:2006.

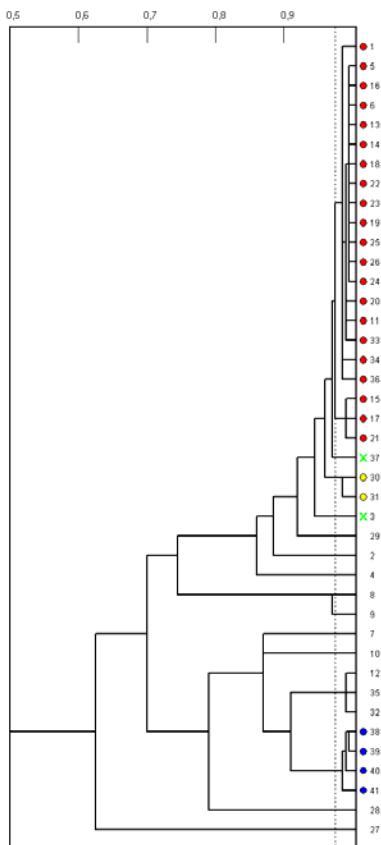


Figura 2. Dendograma dels perfils bioquímics obtinguts per a les 41 soques estudiades amb el sistema PhP-48. Tres grups fenotípics s’identifiquen com a *P. aeruginosa*: grup A (cercles vermells), grup B (cercles grocs) i grup D (cercles blaus). Les soques 3 i 37 sense agrupar (creus verdes) també es van identificar com a *P. aeruginosa*.

CONCLUSIONS:

- El procediment descrit a la ISO 16266:2006 identifica adequadament la major part dels aïllats de *P. aeruginosa*, llevat dels casos de soques no pigmentades.
- Cal disposar de soques tipus a mode de control positius i negatiu per a cadascun dels assaigs inclosos a la ISO 16266:2006, per tal de minimitzar els errors d’identificació als laboratoris de les plantes envasadores.
- Es recomana la incorporació dels assaigs de creixement en agar King A i a 4°C i 42°C en les anàlisis rutinàries d’aigües envasades.
- Les galeries API®20NE poden ser d’ajuda en la confirmació d’aquells aïllats que generin dubtes en base als criteris de la ISO 16266:2006.

3.2 Article 2: Diversitat de les poblacions microbianes heteròtrofes per a la diferenciació d'aigües minerals naturals

Es van seleccionar tres fonts d'aigua mineral natural destinades a l'embotellament situades en diferents zones climàtiques i geogràfiques de l'estat espanyol (fonts A, B, i C). Durant un any es van prendre vuit mostres d'aigua en cadascuna de les fonts, la meitat de les quals a l'estiu i l'altra meitat a l'hivern, seguint els procediments estandarditzats per evitar qualsevol contaminació o alteració de la mostra (59). Un cop recollides les mostres, es procedia a l'enumeració dels microorganismes heteròtrofs aerobis, filtrant diferents volums de mostra a través de membranes de nitrocel·lulosa amb un diàmetre de porus de 0,44 µm. La meitat dels filtres s'incubaven a 22°C i l'altra meitat a 37°C, ambdós durant sis dies en R2A. Passat aquest temps, es va realitzar el recompte de les colònies i es va procedir a aïllar un màxim de 50 soques per a cadascuna de les temperatures d'incubació i cadascuna de les estacions a les tres fonts. Després de comprovar la puresa dels cultius, tots els aïllats es van fenotipar mitjançant les microplaques Php-48 (Bactus AB, Suècia). Amb els perfils bioquímics obtinguts per a cada soca, es van calcular els índex de diversitat de cada població i subpoblació, així com els índexs de similitud entre poblacions i entre subpoblacions. També es va calcular la matriu de correlacions entre tots els perfils bioquímics de cada font, i es van definir els seus grups fenotípics majoritaris. La soca més representativa de cadascun d'aquests grups es va identificar seqüenciant el seu 16S ARNr. Finalment, es va assajar un model "ten-fold cross-validation" en base als perfils bioquímics de sets de 25 soques seleccionades a l'atzar de cada font, per tal de comprovar si el fenotipatge bioquímico de les poblacions microbianes permetia identificar l'origen de l'aigua mineral natural.

3.2.1 Recomptes i diversitat poblacional

El recompte de bacteris heteròtrofs aerobis en R2A va resultar ser menor de 100 UFC/ml a 22°C i menor de 20 UFC/ml a 37°C en les tres aigües minerals naturals, per tant, totes les fonts complien la Directiva 54/2009/CE en aquest sentit. D'altra banda, les aigües A i B també complien la resta de paràmetres microbiològics establerts a la Directiva (absència d'*E. coli* i altres coliforms fecals, absència de paràsits, absència d'espores de clostridis reductors del sulfit i absència de *P. aeruginosa*). Es confirmava, doncs, que aquestes dues aigües eren aptes per a l'embotellament i el consum humà. Tanmateix, l'aigua de la font C va presentar fins a 90 aïllats de *P. aeruginosa* en els diversos mostrejos efectuats, tots ells confirmats pel procediment descrit a la ISO 16266:2006, i comentat abastament en el punt anterior. Així doncs, aquesta aigua no es podia considerar una aigua mineral natural, ni ser apta per al consum humà. En conseqüència, es va procedir a alertar l'empresa envasadora per tal que detectés i eliminés el focus d'aquesta contaminació i desinfectés apropiadament tot el sistema d'embotellament, per evitar els riscos sanitaris derivats.

A partir de les plaques d'R2A utilitzades per a l'enumeració de bacteris heteròtrofs aerobis, es van aïllar un total de 517 soques, les quals van ser sotmeses al fenotipatge bioquímic. D'aquests 517 aïllats, 161 provenien de la font A, 159 de la font B i 197 de la font C, distribuïts entre temperatures (Taula 7).

Taula 8. Nombre de soques aïllades a cada font per cada estació i temperatura.

	Estació	Nombre d'aïllats	Temperatura	Nombre d'aïllats
Font A	Hivern	72	22°C	91
	Estiu	89	37°C	70
Font B	Hivern	64	22°C	94
	Estiu	95	37°C	65
Font C	Hivern	99	22°C	98
	Estiu	98	37°C	98

Les fonts A i B van obtenir valors de diversitat poblacional elevats ($D_i > 0,970$) fet que indicava que no hi havia cap fenotip majoritari en aquestes aigües, sinó que hi havia una gran varietat de perfils bioquímics diferents. En canvi, la font C presentava una diversitat menor ($D_i = 0,879$), cosa que suggeria que existia un o uns pocs fenotips dominants sobre el conjunt de la població. En el cas de les subpoblacions, els resultats eren força similars. Les subpoblacions de les fonts A i B, tan les aïllades diferencialment a l'hivern i a l'estiu, com les de 22°C i 37°C, eren altament diverses ($D_i > 0,920$), mentre que les de la font C tenien diversitats força inferiors, especialment a l'hivern ($D_i = 0,867$) i a 37°C ($D_i = 0,732$). Aquest és un resultat coherent tenint en compte que gairebé la meitat dels aïllats de la font C es van identificar posteriorment com a *P. aeruginosa*. Tots aquests aïllats s'agrupaven en només tres grups fenotípics (Taula 7), de manera que la presumible diversitat original de l'aigua de la font C, quedava molt disminuïda a causa de la proliferació de *P. aeruginosa*.

3.2.2 Similituds poblacionals

A a les fonts A i B, es va poder observar que entre les subpoblacions aïllades a 22°C i a 37°C, i entre les aïllades a l'hivern i a l'estiu hi havia índexs de similitud molt baixos ($S_p < 0,007$). Per tant, la composició i l'estructura dels diferents perfils bioquímics i, consegüentment, de les subpoblacions bacterianes eren diferents. La diferència detectada entre diferents temperatures d'aïllament era esperable, atès que es coneix que les temperatures d'aïllament són un factor de selecció molt important dels microorganismes. Tanmateix, les diferències detectades entre les estacions de mostreig van ser sorprenents. Les aigües minerals naturals per definició no han de presentar variacions significatives en les seves propietats fisicoquímiques, de manera que els ecosistemes microbians associats a una aigua en particular haurien de ser força constants. Una hipòtesi que podria explicar el fenomen observat seria que les diferents forces de succió per extreure l'aigua mineral estaven mobilitzant diferents

microambients dins el mateix l'aqüífer. Una altra hipòtesi a considerar seria que les petites variacions en la temperatura de l'aigua entre les diferents estacions estiguessin seleccionant favorablement algunes poblacions de l'aqüífer, modificant així la composició de la microbiota de l'aigua extreta. En tot cas, no tenim constància de cap altre estudi que hagi fet el seguiment temporal de la microbiota d'una mateixa aigua mineral natural abans de ser embotellada, i per tant, cal més recerca en aquest sentit per poder confirmar les diferències observades entre estacions.

D'altra banda, les subpoblacions de la font C, mostraven similituds superiors a 0,2 i, per tant, es podia considerar que eren homogènies i no sofrien variacions entre estacions ni temperatures d'aïllament. Aquest era un resultat esperable atesa la contaminació detectada per *P. aeruginosa*, present de manera tant en els aïllats de 22°C i de 37°C, com els d'hivern i d'estiu.

Els valors de similitud poblacional calculats per a les poblacions globals de les tres fonts van ser molt baixos ($S_p < 0,016$), posant de manifest que les poblacions bacterianes i la seva estructura eren totalment diferents entre les fonts. Aquest suggereix que l'estudi de les poblacions bacterianes de les aigües minerals naturals pot ser aplicable per a la discriminació de les fonts i els seus aqüífers.

3.2.2 Model «ten-fold cross-validation»

Pel que fa al model assajat, es va determinar que els sets de 25 soques tenien índexs de similituds mitjans respecte a la població global superiors a 0,2 en totes les aigües minerals naturals cosa que significa que aquests sets de soques equivalien en termes d'estructura i composició a la població global (Figura 3). Així, el fenotipatge de 25 soques representatives del total de la població era suficient per representar tota la seva variabilitat i diversitat. Això demostra la potència d'aquest sistema, capaç d'identificar l'origen d'una aigua mineral natural a partir del fenotipatge de 25 soques representatives.

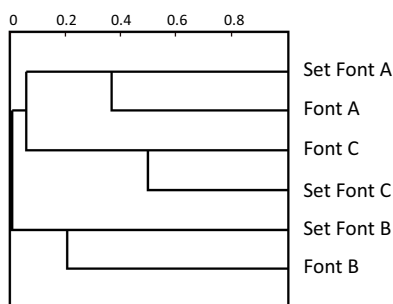


Figura 3. Dendrograma de les mitjanes aritmètiques dels índexs de similitud calculats per al model «ten-fold cross-validation» segons el mètode UPGMA.

3.2.3. Identificació

A partir de la matriu de correlacions entre els perfils bioquímics de les soques aïllades a cadascuna de les aigües minerals naturals, es van poder definir un total de 27 grups fenotípics formats per 4 o més soques. En cadascun d'aquests grups, la soca que tenia la correlació mínima més alta i la correlació mitjana més alta respecte la resta de soques, es va seleccionar com la representant del grup i es va procedir a la seqüenciació del seu gen del 16S ARNr per tal d'identificar-la. Així, es van seqüenciar els gens del 16S ARNr de 10 soques de la font A, 8 soques de la font B, i 9 soques de la font C, que representaven el 62%, el 36% i el 82% del total de la població, respectivament. La taula 8 mostra la identificació de cada soca seqüenciada en base a la màxima similitud trobada a la base de dades del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

El gènere *Pseudomonas* conformava una quarta part de la població a les fonts A, un 17% de la font B i un 56% de la població de la font C. Aquests resultats concorden amb altres estudis de diversitat de poblacions microbianes en aigües minerals naturals que apunten que aquest és un gènere àmpliament distribuït en aigües minerals naturals, i que acostuma a suposar proporcions importants de les poblacions aïllades (16, 54, 94, 111). Tanmateix, encara que aquest sigui un gènere propi d'aquests ambients, la presència de 90 aïllats identificats com a *P. aeruginosa* a la font C posava de manifest que aquesta aigua en concret estava contaminada ja que d'acord amb la Directiva 54/2009/CE aquest patògen oportunista humà no ha de ser present en l'aigua de beguda.

A banda del gènere *Pseudomonas*, a la font A s'hi van aïllar 19 soques d'*Acidovorax spp.* i 15 soques d'*Sphingomonas spp.* que han estat descrits en diferents estudis com un gènere habitual en les aigües minerals naturals (16, 78, 111, 116). També s'hi van trobar 10 aïllats de *Delftia spp.* que ha estat descrit en sòls i altres ambients aquàtics (32, 65, 124). Per tant, sembla que *Delftia spp.* és un gènere adaptat als ambients aquàtics, i és raonable pensar que algunes espècies puguin ser pròpies d'aigües minerals naturals. A més, es van identificar 7 aïllats d'*Herminiimonas glacei*, una espècie recentment proposada (83), tot i que gènere inclou altres espècies, algunes aïllades d'aigües minerals naturals (67). Finalment, 10 aïllats van identificar-se com a *Rhizobium spp.*, gènere que no ha estat mai aïllat en aigües prèviament, però sí en sòls. Cal, doncs, seguir aprofundint en l'ecologia i distribució de *Delftia spp.*, *Herminiimonas spp.* i *Rhizobium spp.* per tal d'assegurar que són autòctones de l'aigua mineral natural.

Pel que fa a la font B, és interessant la identificació de *Mycobacterium spp.*, que suposava un 25% del total de la població. De fet, moltes espècies pertanyents a aquest gènere s'han vingut aïllant de diferents tipus d'aigües, incloses les embotellades (76, 98). En general aquestes espècies es consideren d'origen ambiental i, per tant, són part de la microbiota autòctona de les aigües minerals naturals. També es van trobar tres

soques de *Janthinobacterium lividum*, un oxalobacteri pigmentat que s'aïlla sovint en diferents tipus d'aigües (97).

Taula 9. Identificació de la soca representativa de cada grup fenotípic.

Soca	Soca més propera	Nombre de soques al grup
A11	<i>Acidovorax facilis</i> 99%	19
A13	<i>Herminiimonas glaciei</i> 100%	7
A66	<i>Pseudomonas sp.</i> 100%	10
A80	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> 100%	16
A115	<i>Pseudomonas mandelii</i> 100%	7
A119	<i>Pseudomonas sp.</i> 100%	6
A134	<i>Delftia sp.</i> 100%	10
A159	<i>Sphingomonas sp.</i> 100%	8
A163	<i>Sphingomonas sp.</i> 100%	7
A182	<i>Rhizobium sp.</i> 99%	10
B22	<i>Mycobacterium sp.</i> 99%	18
B87	<i>Pseudomonas sp.</i> 100%	4
B104	<i>Mycobacterium sacrum</i> 99%	3
B133	<i>Mycobacterium sp.</i> 99%	3
B144	<i>Mycobacterium sp.</i> 99%	2
B148	<i>Mycobacterium sp.</i> 99%	2
B186	<i>Janthinobacterium lividum</i> 100%	3
B198	<i>Pseudomonas sp.</i> 99%	23
C3	<i>Pseudomonas putida</i> 99%	10
C11	<i>Aeromonas hydrophila</i> 99%	5
C18	<i>Ochrobactrum intermedium</i> 93%	5
C30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 99%	23
C69	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 99%	62
C111	<i>Pseudomonas sp.</i> 100%	11
C129	<i>Delftia sp.</i> 100%	25
C175	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 99%	5
C198	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 100%	16

Finalment, a la font C s'hi van trobar 25 soques de *Delftia spp.*, que com ja s'ha discutit per a la font A, és potencialment pròpia de les aigües minerals naturals. D'altra banda, es van aïllar soques de *Stenotrophomonas spp.*, gènere que inclou espècies prèviament aïllades en sòls (56, 123), cosa que fa pensar que pugui ser també autòctona d'ambients aquàtics. Finalment, també es van trobar aïllats d'*Aeromonas hydrophila*, que es considera un indicador de qualitat higiènica (91), però que altres autors proposen com a pròpia d'aigües minerals naturals (31, 102). En tot cas, com que es tracta d'una font clarament contaminada, cal dubtar de l'origen natural d'aquests bacteris i, per tant, cal seguir investigant per confirmar que siguin realment autòctons.

CONCLUSIONS:

- Les aigües minerals naturals són ecosistemes molt diversos. L'elevat nombre de gèneres poc descrits en aquests ambients que es van trobar, i els canvis de composició observats entre estacions confirma que es tracta d'ambients complexos, i que encara hi ha un gran desconeixement sobre la seva composició i dinàmica.
- Cada aigua mineral natural conté una microbiota autòctona pròpia, l'estructura i composició de la qual és prou diferent com per poder diferenciar-la amb mètodes de caracterització fenotípica de la de d'altres aigües minerals naturals. Les variacions en aquestes poblacions poden indicar canvis en les poblacions autòctones, però també la presència de bacteris al·lòctons (patogènics o no).
- Cal seguir caracteritzant les poblacions autòctones de diferents aigües minerals naturals, per tal de comprovar si l'avaluació de la diversitat pot ser aplicable per identificar les fonts i com a base per al monitoratge de les aigües minerals naturals durant la seva vida.

3.3 Article 3: Caracterització de les poblacions microbianes associades a piscines naturalitzades

Es van estudiar les poblacions microbianes de quatre piscines naturalitzades d'ús privat (A, B, C i D) amb volums d'entre 75 m³ i 200 m³. Es van prendre mostres de cadascuna de les piscines seguint els protocols estandarditzats (59), dues vegades a l'estiu en totes les piscines, i dues vegades a l'hivern (piscines A i D).

Posteriorment, es va procedir a l'enumeració dels coliforms fecals, l'*E. coli* i els enterococs mitjançant la filtració per membrana i el cultiu en medis selectius i diferencials (58, 60). Els bacteris heterotròfics totals es van enumerar per sembra en extensió en agar R2A i incubació a 22°C durant 72h. Finament, la presència de *P. aeruginosa* es va analitzar seguint els mètodes estandarditzats (61). Posteriorment, es va procedir a realitzar un fenotipatge bioquímic de les poblacions de coliforms fecals i enterococs prèviament aïllades, amb les microplaques PhP-RE i PhP-RF del Phene-Plate System™ (Bactus AB, Suècia). A partir dels perfils bioquímics obtinguts es van calcular els índexs de diversitat i els coeficients de similitud entre poblacions i es va procedir a identificar els aïllats per comparació amb una base de dades de perfils bioquímics. Finalment, es van comparar les poblacions de coliforms fecals i enterococs amb d'altres poblacions aïllades en estudis anteriors en diferents tipus d'aigües residuals (humanes i animals) (19, 74, 89, 117).

Els recomptes de les poblacions de bacteris heterotròfics aerobis se situaven entre 10⁴-10⁵ UFC/100mL en totes les piscines i mostres, tant a l'hivern com a l'estiu (Taula 9). Tot i que aquest paràmetre no apareix en les recomanacions per a les piscines naturalitzades, sí que ho fa en algunes normatives nacionals de piscines convencionals (23, 34, 50) amb límits que se situen al voltant de 10⁴ UFC/100mL. Tenint en compte que les piscines naturalitzades no tenen tractaments de desinfecció, sembla raonable pensar que els recomptes de bacteris heterotròfics aerobis puguin ser superiors a els de les piscines convencionals. Per tant, les concentracions trobades, entre 0,8 i 1,4 logaritmes superiors al límit establert per a piscines convencionals, eren esperables.

Es va poder aïllar *P. aeruginosa* en totes les mostres de totes les piscines naturalitzades, tant a l'hivern, com a l'estiu, encara que en concentracions per sota dels límits de les recomanacions per a piscines naturalitzades. *P. aeruginosa*, és un microorganisme de distribució ubiqua que s'aïlla de manera habitual en sòls, aigües i vegetals (2) i, per tant, no sembla estrany que sigui present de forma natural a les piscines, i no associada amb les aportacions per part banyistes. El fet que en temporada d'hivern, quan no hi havia bany a les piscines, es detectessin concentracions similars que a les de l'estiu, reforçaria aquesta hipòtesi. Malgrat tot, cal estudiar amb més profunditat la presència de *P. aeruginosa* en aquests sistemes, perquè la seva entrada per via humana no es pot descartar (120), especialment en sistemes amb densitats de bany més elevades. En

aquests casos la seva concentració podria superar els límits recomanables per a garantir la seguretat de l'aigua de bany.

Taula 10. Concentracions de bacteris heterotròfics aerobis i de *P. aeruginosa* a les quatre piscines naturalitzades en UFC/100 ml.

		Bacteris heterotròfics aerobis		<i>P. aeruginosa</i>	
		Mostra 1	Mostra 2	Mostra 1	Mostra 2
Estiu	Piscina A	$1,08 \cdot 10^5$	n.d.	$1,00 \cdot 10^0$	$2,00 \cdot 10^0$
	Piscina B	$1,69 \cdot 10^5$	$2,40 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^0$	$3,00 \cdot 10^0$
	Piscina C	$6,65 \cdot 10^4$	$4,00 \cdot 10^5$	$3,00 \cdot 10^0$	$2,00 \cdot 10^0$
	Piscina D	$6,65 \cdot 10^4$	$2,70 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^0$	$1,00 \cdot 10^0$
Hivern	Piscina A	$2,25 \cdot 10^5$	$1,50 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^0$	$2,00 \cdot 10^0$
	Piscina D	$2,38 \cdot 10^5$	$6,30 \cdot 10^4$	$2,00 \cdot 10^0$	$1,00 \cdot 10^0$

D'altra banda, tal com es pot veure a la taula 10 les concentracions d'*E. coli* eren adequades segons les recomanacions per a les piscines naturalitzades en totes les piscines tant a l'hivern com a l'estiu, amb l'excepció d'una de les mostres preses a la piscina C. En aquest cas concret, la piscina presentava 205 UFC/100 ml d'*E.coli*, quan la recomanació n'estableix 100 com a límit. A més, totes les piscines, excepte la A, superaven els límits establerts per als enterococs (40-50 UFC/100 ml) en almenys un dels dos mostrejos efectuats a l'estiu. Així doncs, les piscines B, C, i D no presentaven una qualitat microbiològica suficient per a ser considerades aptes per al bany.

Taula 11. Enumeració d'*E.coli* i enterococs a les piscines a l'estiu i a l'hivern en UFC/100 ml.

		<i>E. coli</i>		Enterococs	
		Mostra 1	Mostra 2	Mostra 1	Mostra 2
Estiu	Piscina A	$2,60 \cdot 10^1$	$1,70 \cdot 10^1$	$1,30 \cdot 10^1$	$8,00 \cdot 10^0$
	Piscina B	$1,75 \cdot 10^1$	$8,50 \cdot 10^0$	$5,00 \cdot 10^1$	$3,26 \cdot 10^1$
	Piscina C	$6,90 \cdot 10^1$	$2,05 \cdot 10^2$	$7,30 \cdot 10^1$	$1,68 \cdot 10^2$
	Piscina D	$5,50 \cdot 10^0$	<0.5	$2,50 \cdot 10^1$	$8,30 \cdot 10^1$
Hivern	Piscina A	<0.1	<0.1	$4,00 \cdot 10^{-1}$	$6,55 \cdot 10^1$
	Piscina D	<0.1	<0.1	$1,48 \cdot 10^1$	<0.1

A l'hivern, les concentracions d'enterococs seguien essent elevades (propres o superant el límit establert a les recomanacions). Aquest fet és interessant de cara a poder establir l'origen de la contaminació fecal a l'aigua de les piscines. D'una banda, tenint en compte que en aquesta època, no hi havia activitat de bany, es descartava l'aportació humana directa a les piscines. Aquesta contaminació tampoc podia provenir de l'aigua d'entrada a les piscines, ja que en tots els casos era aigua potable convenientment tractada (7). Així doncs, els indicadors detectats a l'hivern havien d'estar relacionats amb una entrada de material fecal per part de la fauna salvatge (ocells, rosegadors, etc.).

Pel que fa al fenotipatge bioquímic, es van poder fenotipar 249 enterococs (199 a l'estiu i 50 a l'hivern) i 184 coliforms fecals (tots ells a l'estiu). En general, els índex de

diversitat obtinguts van ser elevats tant per als coliforms fecals com per als enterococs. La piscina C era la que mostrava una diversitat menor a l'estiu. Aquesta piscina tenia una major activitat durant l'estiu que la resta, i de fet les concentracions d'*E. coli* també eren les més grans de totes les piscines. Per tant, aquesta baixada de la diversitat podria estar relacionada amb una entrada de material fecal puntual (70).

Els coeficients de similitud indicaven que les poblacions de coliforms fecals i d'enterococs fecals de les quatre piscines s'assemblaven més entre si, que no pas a les poblacions relacionades amb aigües residuals animals o humanes. Aquest fet reforçava la idea que els indicadors trobats a les piscines no estaven relacionats amb contaminació fecal d'origen humà, o si més no, no exclusivament. A més, les poblacions d'enterococs d'una bassa naturalitzada fortament influenciada per aus migradores (*Anas platyrhynchos* i *Anser anser*), van resultar ser molt properes a les que es van trobar a les piscines naturalitzades, cosa que apuntaria a un possible origen animal de la contaminació (Figura 4).

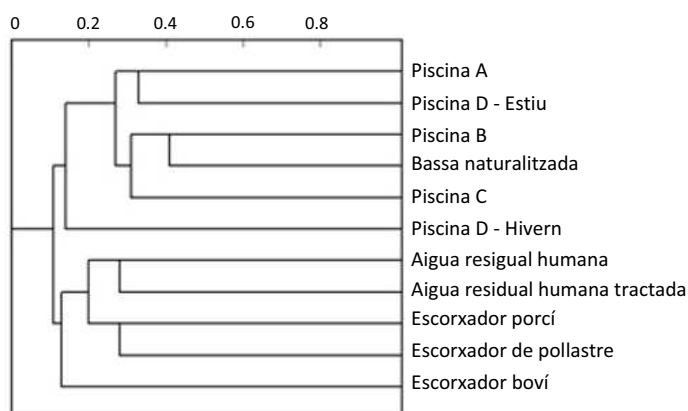


Figura 4. Dendrograma dels coeficients de similitud entre les poblacions d'enterococs aïllades a les piscines i d'altres poblacions associades a aigua amb contaminació fecal d'origen humà o animal.

La classificació taxonòmica dels coliforms fecals no va aportar gaire informació que ajudés a diferenciar les poblacions de les piscines. Tanmateix, pel que fa als enterococs, les piscines A, B i D, presentaven una proporció important del grup format per *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum* i *Enterococcus flavescens*. Aquest grup ha estat relacionat amb material fecal d'origen animal (73), de manera, que la seva presència destacada suggeriria una entrada de material fecal animal a l'estiu.

En resum, aquest estudi posava de manifest que tres de les quatre piscines naturalitzades estudiades no complien els requisits establerts a les recomanacions per aquests tipus de sistemes de bany (46, 96, 114). Encara hi ha força controvèrsia a nivell científic sobre la relació entre els indicadors bacterians de contaminació fecal en aigües

recreatives i les malalties gastrointestinals. De fet, alguns estudis epidemiològics recents en aigües recreatives continentals han trobat relacions significatives entre *E. coli* i l'augment d'aquests trastorns entre els banyistes (90). En canvi, altres estudis exposen que l'increment de les malalties gastrointestinals es correlacionen poc amb les concentracions d'indicadors bacterians, però sí en canvi amb la densitat de banyistes, cosa que subratllaria la importància de la transmissió banyista-banyista. (28). En qualsevol cas, els resultats suggereixen que la fauna que envoltava les piscines estudiades era un element clau per explicar la contaminació fecal a les piscines que, per tant, no estava relacionada exclusivament amb les aportacions fecals humanes per part dels banyistes. Aquesta observació està d'acord amb les descripcions d'altres autors que apunten que els ocells i la fauna salvatge poden ser contribuïdors importants de material fecal en aigües recreatives continentals i costeres (37, 119, 121). Les implicacions sanitàries derivades d'aquest tipus de contaminació encara estan poc estudiades, però cal no menystenir-les (42), atès que pot ser una font important de patògens zoonòtics com ara *Salmonella* i *Campylobacter* (30).

Taula 12. Percentatge d'enterococs a les piscines en base a la comparació dels perfils de PhP amb a base de dades i de les seqüències del 16S ARNr.

	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ent. mundtii</i>	Grup H-D*	Grup G-C-F*	No identificats
Piscina A	8%	28%	12%	4%	36%	12%
Piscina B	34%	12%	18%	0%	26%	10%
Piscina C	50%	8%	12%	4%	10%	16%
Piscina D	0%	14%	33%	0%	43%	10%
Piscina D hivern	0%	60%	0%	12%	8%	20%

* Grup H-D: *Enterococcus hirae* i *Enterococcus durans*; Grup G-C-F: *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum* i *Enterococcus flavescens*.

Els resultats obtinguts poden ser útils de cara a estimar els riscos microbiològics en piscines naturalitzades públiques amb densitats de banyistes superiors. En aquest escenari, caldria tenir en compte que les condicions higièniques i sanitàries dels banyistes estarien menys controlades i que, per tant, l'entrada de material fecal humà podria ser superior. El risc afegit que suposa que nens petits, gent gran, dones embarassades o persones immunodeprimides utilitzin aquestes piscines, pot posar en dubte que el sistema de tractament natural sigui capaç de garantir una adequada qualitat de l'aigua des d'un punt de vista sanitari.

CONCLUSIONS:

- Les piscines B, C i D presentaven concentracions d'*E.coli* i/o enterococs superiors als límits establerts a les recomanacions per a piscines naturalitzades i, per tant, no serien aptes per al bany des d'aquest punt de vista. En canvi, les concentracions de *P. aeruginosa* eren adequades.
- La contaminació fecal relacionada amb la fauna s'apunta com un contribuïdor significatiu en les piscines naturalitzades privades. Malgrat que els riscos relacionats amb aquest tipus de contaminació estan poc descrits, seria interessant emprendre mesures correctores que reduïssin aquesta font de contaminació fecal, per tal que les piscines poguessin complir les recomanacions microbiològiques.
- El sistema de depuració natural sembla ser força limitat alhora de disminuir la contaminació fecal a les piscines naturalitzades, cosa que posa en dubte la seva aplicabilitat en piscines de major volum i obertes al públic.
- Cal aprofundir en la recerca d'aquests sistemes per determinar quins paràmetres assegurin una qualitat microbiològica suficient des d'un punt de vista sanitari, atès que no existeix encara cap normativa reguladora per a les piscines naturalitzades.

3.4 Article 4: Determinació de l'origen de la contaminació fecal en reservoris a l'aire lliure d'aigua regenerada mitjançant el fenotipatge bioquímic d'enterococs i coliforms fecals

El sistema estudiat consistia en dues basses naturalitzades (A i B) utilitzades per al rec per aspersió d'un camp de golf. Les basses s'emplenaven amb aigua regenerada provinent d'una estació regeneradora d'aigües residuals. Aquesta depuradora tenia un tractament terciari combinat de cloració i llum ultraviolada que s'aplicava a l'aigua de sortida del tractament secundari (llots activats). En les sèries històriques proporcionades pel laboratori de la depuradora no s'observaven canvis significatius en les concentracions d'*E. coli*, que es mantenien en tot moment per sota dels límits establerts pel Reial Decret 1620/2007 (<200 UFC/100 ml).

Es van prendre sis mostres d'aigua residual no tractada a la planta de tractament i sis mostres de l'aigua de cadascuna de les basses. La meitat de les mostres es van prendre a l'estiu i l'altra meitat a l'hivern. Seguidament, es va procedir a a l'enumeració de les poblacions de coliforms fecals i enterococs la tècnica de la filtració per membrana i la sembra en els medis selectius i diferencials descrits prèviament (43, 51, 88). Posteriorment, a partir de les plaques d'enumeració, es van seleccionar un màxim de 25 soques de cadascuna de les mostres i per cadascun dels microorganismes estudiats, i es va procedir al seu fenotipatge bioquímic amb les microplaques PhP-RE i PhP-RF del Phene-Plate System™ (Bactus AB, Suècia) per als coliforms fecals i els enterococs, respectivament. Un cop obtinguts els perfils bioquímics es van calcular els índex de diversitat i els coeficients de similitud entre poblacions. Addicionalment, es van comparar els perfils bioquímics de les poblacions aïllades contra una base de dades pròpia desenvolupada en estudis anteriors a partir de 3556 aïllats de coliforms fecals i 1127 aïllats d'enterococs de diferents tipus d'aigües residuals (19, 74, 89, 117).

Paral·lament, per tal de descartar un recreixement a l'aigua de les basses es va estudiar la inactivació de cinc indicadors microbians de contaminació fecal a partir d'un mesocosmos *in situ*. Els microorganismes seleccionats van ser: coliforms fecals (CF), bifidobacteris totals (TBIF), bifidobacteris fermentadors del sorbitol (SBIF), bacteriòfags somàtics (SOM) i bacteriòfags de *Bacteroides thetaiotaomicron* (BACT). Així, es van preparar bossetes de diàlisi (14 Kd de porositat) i es van emplenar amb una dilució 1:50 d'aigua residual no tractada de l'estació depuradora. Es van dipositar els tubs en una malla i es van submergir a la bassa B durant diverses setmanes, durant les quals es van anar prenent mostres i es van enumerar els paràmetres seleccionats seguint els procediments descrits anteriorment (18). Durant els mostrejos es van determinar les característiques fisicoquímiques de la bassa (temperatura, conductivitat, oxigen dissolt i potencial redox). Les enumeracions van servir per a determinar la cinètica d'inactivació de cadascun dels paràmetres i calcular la seva T_{90} . A la vegada, es va realitzar una anàlisi de la varianza (ANOVA) per tal de comparar les inactivacions de tots els

paràmetres i les diferències estacionals. Finalment, es van utilitzar anàlisis de regressió per a poder determinar l'efecte dels diferents paràmetres fisicoquímics en les cinètiques d'inactivació.

Les concentracions de coliforms fecals i d'enterococs a l'aigua residual eren els esperats atenent a la població equivalent de la planta de tractament. També les concentracions observades a l'aigua després del tractament terciari eren les esperables i complien les regulacions per tal de ser utilitzada per al rec de camps de golf (menys de 200 UFC/100 ml d'*E. coli*). Tanmateix, a l'estiu, les concentracions dels indicadors estudiats eren força superiors que les que es trobaven a l'aigua regenerada (Taula 13). Això indicava que a l'estiu, a les basses s'hi estava donant o bé un fenomen de recreixement important de les poblacions provinents de l'aigua regenerada, o bé una entrada de material fecal relacionat amb la dinàmica i activitats del propi camp de golf. En canvi a l'hivern, les basses presentaven valors molt baixos dels indicadors estudiats, un logaritme per sota dels que entraven per via de l'aigua regenerada, fet que indicava que en aquesta estació el recreixement o l'entrada alternativa de material fecal era inexistent. Amb aquests resultats també es va poder calcular la proporció entre coliforms fecals i enterococs (FC/E), que va donar valors baixos a les basses a l'estiu, contrastant amb els valors alts que es trobaven a l'aigua residual durant tot l'any. Els valors baixos de la relació FC/E s'han relacionat sovint amb la contaminació fecal d'origen animal, mentre que els valors alts es relacionen amb la contaminació fecal humana (41, 49). Tot i que la validesa d'aquesta proporció ha estat qüestionada en molts estudis (49, 62, 112), especialment quan s'utilitza en casos amb contaminació fecal antiga, pot servir com un indicador preliminar. Així doncs, atenent a aquesta relació, la contaminació fecal detectada a les basses semblava no estar relacionada amb una aportació humana.

Taula 13. Mitjana logarítmica i desviació estàndard (\log_{10} UFC/100 ml), i diversitat de les poblacions en l'aigua del tractament secundari (TS), l'aigua regenerada (AR), la bassa A (BA) i la bassa B (BB). El nombre de soques està indicat entre parèntesi.

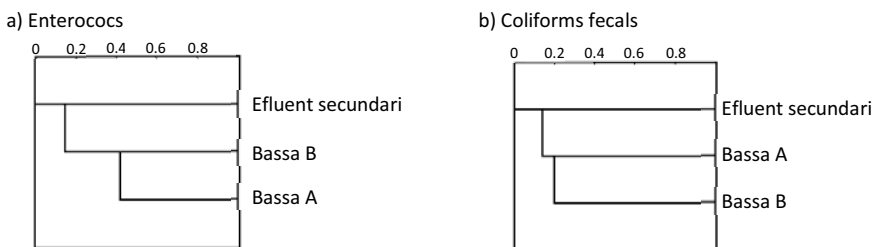
		Coliforms fecals		Enterococs	
		Càrrega	Di	Càrrega	Di
Estiu	TS	5,94 ($\pm 0,08$)	0,96 (75)	4,44 ($\pm 0,15$)	0,98 (75)
	AR	1,36 ($\pm 0,51$)	-	-	-
	BA	2,73 ($\pm 0,31$)	0,89 (75)	3,27 (+0,67)	0,41 (75)
	BB	2,78 ($\pm 0,16$)	0,89 (75)	2,27 ($\pm 0,62$)	0,91 (75)
Hivern	TS	4,07 ($\pm 0,01$)	0,99 (45)	3,39 ($\pm 0,58$)	0,94 (32)
	AR	1,17 ($\pm 0,40$)	-	-	-
	BA	0	0,94 (9)	0	0,95 (11)
	BB	0,06 ($\pm 0,10$)	0,50 (36)	0,10 ($\pm 0,17$)	0,84 (42)

Pel que fa al fenotipatge bioquímic, es van poder aïllar i processar 308 soques d'enterococs (225 provinents dels mostresjos d'estiu i 83 de l'hivern) i 315 coliforms fecals (225 de l'estiu i 90 de l'hivern). Es van obtenir valors de diversitat elevats al tractament secundari per als dos indicadors, mentre que els valors a les basses a l'estiu

eren més moderats. A l'hivern, el nombre de soques que es van poder aïllar a les basses fou petit i per això, les diversitats calculades poden ser esbiaixades i no són, per tant, comparables amb les de l'estiu.

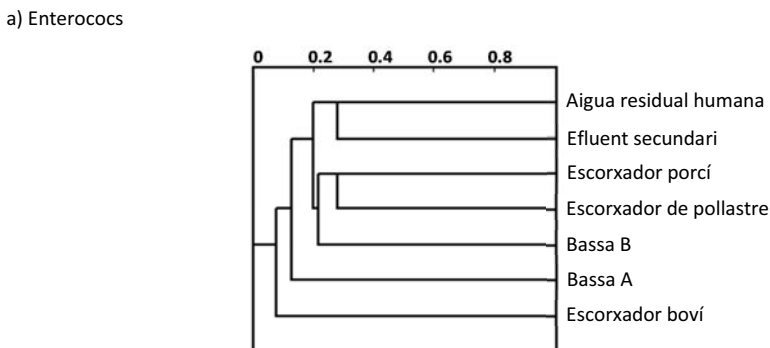
L'anàlisi dels coeficients de similitud indicava que les poblacions d'enterococs i de coliforms fecals a l'estiu eren molt similars entre les dues basses, i a la vegada eren diferents de les poblacions aïllades del tractament secundari (Figura 5). L'anàlisi de les similituds a l'hivern, suggeria que no hi havia similitud entre cap de les poblacions. Tanmateix, atès que el nombre de soques aïllades en aquesta estació és molt baix, els resultats obtinguts no són tan sòlids com els de l'estiu. En qualsevol cas, el fet que les poblacions no presentessin similituds importants amb les poblacions del secundari, estaria indicant que la font de contaminació fecal a l'aigua no estaria relacionada amb l'entrada de contaminació humana via l'aigua regenerada.

Figura 5. Dendrograma dels coeficients de similitud a l'estiu segons el mètode UPGMA de les poblacions d'enterococs i coliforms fecals a les basses i a l'efluent secundari.

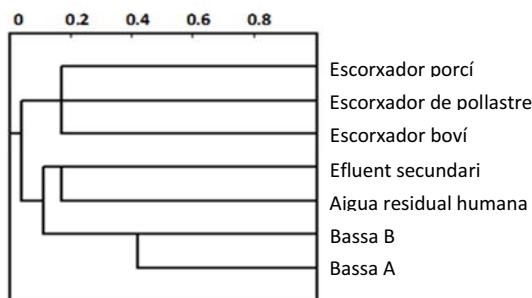


La comparació de les poblacions aïllades contra la base de dades pròpia situava els coliforms fecals i els enterococs de les basses totalment allunyats de les poblacions amb contaminació fecal humana, però també de les poblacions aïllades en aigua residual d'escorxadors (Figura 6).

Figura 6. Dendrograma dels coeficients de similitud a l'estiu segons el mètode UPGMA de les poblacions aïllades a l'efluent secundari, les basses (Ai B) i altres poblacions aïllades en aigües residuals humanes o d'escorxadors.



b) Coliforms fecals



Pel que fa als assajos d'inactivació en mesocosmos, cap dels indicadors microbians estudiats va ser capaç de créixer o de persistir a l'aigua de les basses. De fet, tots presentaven una clara cinètica d'inactivació, que, tanmateix, era significativament diferent per a cadascun dels microorganismes ($p < 0.0086$ a l'estiu i $p < 0.0032$ a l'hivern). A més a més, tots ells s'inactivaven significativament més ràpidament a l'estiu, que no pas a l'hivern (Taula 14). Els bacteriòfags somàtics eren els que presentaven una major persistència, seguits dels bacteriòfags de *B. thetaiotaomicron*. Aquesta major persistència dels bacteriòfags respecte els indicadors bacterians ja ha estat destacada per d'altres autors en estudis amb aigües residuals, superficials i marines (27, 36, 93, 113). D'altra banda, la baixa persistència dels bifidobacteris, tant totals, com fermentadors del sorbitol, també ha estat observada anteriorment, tot i que en ambients d'aigua circulant (20).

Taula 14. Valors de T_{90} (h) obtinguts a partir de les línies de regressió dels models d'inactivació per als diferents paràmetres microbiològics. La desviació estàndard està indicada entre parèntesi.

	Estiu	Hivern	P-valor entre estacions
FC	73,7 ($\pm 1,7$)	198,8 ($\pm 62,8$)	0,020
TBIF	67,9 ($\pm 1,2$)	158,9 ($\pm 6,5$)	0,000
SBIF	46,8 ($\pm 11,3$)	144,6 ($\pm 43,9$)	0,020
SOM	102,3 ($\pm 28,5$)	387,1 ($\pm 126,9$)	0,192
BACT	75,2	351,6 ($\pm 98,6$)	0,083

Aquests resultats posaven de manifest que els microorganismes que entraven a les basses a través de l'aigua regenerada no podien créixer en l'aigua de les basses, i, per tant, l'aigua regenerada no podia ser la font dels indicadors detectats a les basses durant l'estiu.

Així doncs, tot semblava indicar que la contaminació fecal detectada no tenia relació amb l'aigua regenerada que s'utilitzava per emplenar les basses. De fet, durant el període d'estudi es va poder observar que a l'estiu, hi havia una colonització important de les basses i el seu entorn per part d'aus, especialment *Anas platyrhynchos* i *Anser*

anser. A l'hivern, per contra, no es va observar cap d'aquestes aus a la zona de les basses. Per tant, sembla molt raonable pensar que les deposicions d'aquests animals, ja fos per via directa a l'aigua, com per escorrentia i contaminació difusa, podria ser una font important de contaminació fecal. Altres autors han demostrat que les aus són una font de contaminació molt destacable en d'altres tipus de masses d'aigua (37, 52, 63, 121).

CONCLUSIONS:

- La caracterització bioquímica i l'estudi d'inactivació van proporcionar evidències que la contaminació fecal detectada a les piscines a l'estiu no tenia relació amb les poblacions que entraven a través de l'aigua regenerada.
- L'origen de la contaminació fecal a les basses sembla estar relacionat amb una aportació de material fecal animal, probablement ocells, generat al propi sistema.
- Hi ha una limitació important a la normativa de regeneració d'aigües atès que no contempla la possibilitat de recontaminació de l'aigua un cop tractada, cosa complica la interpretació d'aquestes situacions des d'un punt de vista legal.
- El fenotipatge bioquímic d'enterococs i coliforms fecals és una eina útil per a l'estudi de l'origen de la contaminació fecal en aquells casos on la càrrega fecal és baixa ($<10^2$ UFC/100 ml), fet que és rellevant, tenint en compte que molts altres mètodes presenten problemes en ser aplicats per sota d'aquestes concentracions.
- La qualitat microbiològica de les aigües regenerades ha de ser monitoritzada inclús després de finalitzar el seu tractament, per tal de garantir que segueixen essent segures en el moment de la seva utilització.

4. Bibliografia

1. **Abrahams, N. A., B. J. Hubbell, and J. L. Jordan.** 2000. Joint production and averting expenditure measures of willingness to pay: do water expenditures really measure avoidance costs? *Am. J. Agr. Econ.* **82**:427-437.
2. **Allen, M. J., S. C. Edberg, and D. J. Reasoner.** 2004. Heterotrophic plate count bacteria— what is their significance in drinking water? *Int. J. Food Microbiol.* **92**:265-274.
3. **Anonymous.** 1980. Council Directive 80/777/EEC of 15 July 1980 on the approximation of the laws of the Member States relating to the exploitation and marketing of natural mineral waters. **L229**:1-10.
4. **Anonymous.** 1996. Directive 96/70/EC of the European Parliament and of the Council of 28 October 1996 amending Council Directive 80/777/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to the exploitation and marketing of natural mineral waters. **L299**:26-28.
5. **Anonymous.** 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. **L330**:32-54.
6. **Anonymous.** 2000. Decret 95/2000, de 22 de febrer, pel qual s'estableixen les normes sanitàries aplicables a les piscines d'ús públic. **3092**:2338-2341.
7. **Anonymous.** 2003. Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. **45**:7228-7245.
8. **Anonymous.** 2006. Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. **L64**:37-51.
9. **Anonymous.** 2007. Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. **281**:50639-50661.
10. **Anonymous.** 2009. Directive 2009/54/Ec Of The European Parliament And Of The Council of 18 June 2009 on the exploitation and marketing of natural mineral wate. **L164**:45-58
11. **Armijo, M., and J. San Martín.** 1994. Curas balnearias y climáticas, Talasoterapia y Helioterapia. Ed. Complutense, Madrid.
12. **Asociación Nacional de Empresas de Aguas de Bebida Envasada.** 2009. Libro Blanco de las Aguas de Bebida Envasadas. ANEABE.
13. **Austrian Standards Institut.** 2010. Small natural swimming ponds - Requirements for planning, design, operation, rehabilitation and monitoring. **L1126**

14. **Beuret, C., D. Kohler, A. Baumgartner, and T. M. Luthi.** 2002. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1925-1931.
15. **Bharath, J., M. Mosodeen, S. Motilal, S. Sandy, S. Sharma, T. Tessaro, K. Thomas, M. Umamaheswaran, D. Simeon, and A. A. Adesiyun.** 2003. Microbial quality of domestic and imported brands of bottled water in Trinidad. *Int. J. Food Microbiol.* **81**:53-62.
16. **Bischofberger, T., S. K. Cha, R. Schmitt, B. Konig, and W. Schmidt-Lorenz.** 1990. The bacterial flora of non-carbonated, natural mineral water from the springs to reservoir and glass and plastic bottles. *Int. J. Food Microbiol.* **11**:51-71.
17. **Blake, P. A., M. L. Rosenberg, and J. Florencia.** 1977. Cholera in Portugal, 1974. II. Transmission by bottled mineral water. *Am. J. Epidemiol.* **105**:344-348.
18. **Blanch, A. R., L. Belanche-Munoz, X. Bonjoch, J. Ebdon, C. Gantzer, F. Lucena, J. Ottoson, C. Kourtis, A. Iversen, I. Kühn, L. Moce, M. Muniesa, J. Schwartzbrod, S. Skraber, G. T. Papageorgiou, H. Taylor, J. Wallis, and J. Jofre.** 2006. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5915-5926.
19. **Blanch, A. R., J. L. Caplin, A. Iversen, I. Kühn, A. Manero, H. D. Taylor, and X. Vilanova.** 2003. Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *J. Appl. Microbiol.* **94**:994-1002.
20. **Bonjoch, X., F. Lucena, and A. Blanch.** 2009. The persistence of bifidobacteria populations in a river measured by molecular and culture techniques. *J. Appl. Microbiol.* **107**:1178-1185.
21. **Bornstein, N., D. Marmet, M. Surgot, M. Nowicki, A. Arslan, J. Esteve, and J. Fleurette.** 1989. Exposure to Legionellaceae at a hot spring spa: a prospective clinical and serological study. *Epidemiol. Infect.* **102**:31-36.
22. **Brown, V. I., and E. J. Lowbury.** 1965. Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Pathol.* **18**:752-756.
23. **BSI.** 2003. Management of public swimming-pools - water treatment systems, water treatment plant and heating and ventilation systems - code of practice. British Standards Institute, Publicly Available Specification (PAS) 39.
24. **Castilla, M. T., J. M. Sanzo, and S. Fuentes.** 1995. Molluscum contagiosum in children and its relationship to attendance at swimming-pools: an epidemiological study. *Dermatology.* **191**:165-165.
25. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 2001. Shigellosis outbreak associated with an unchlorinated fill-and-drain wading pool-Iowa, 2001. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **50**:797-800.

26. **Červa, L., and K. Novak.** 1968. Amoebic Meningoencephalitis: Sixteen Fatalities. *Science*. **160**:92-92.
27. **Chung, H., and M. D. Sobsey.** 1993. Comparative survival of indicator viruses and enteric viruses in seawater and sediment. *Water Sci. Technol.* **27**:425-429.
28. **Colford, J. M., Jr, T. J. Wade, K. C. Schiff, C. C. Wright, J. F. Griffith, S. K. Sandhu, S. Burns, M. Sobsey, G. Lovelace, and S. B. Weisberg.** 2007. Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. *Epidemiology*. **18**:27-35.
29. **Costán-Longares, A., M. Montemayor, A. Payán, J. Méndez, J. Jofre, R. Mujeriego, and F. Lucena.** 2008. Microbial indicators and pathogens: Removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. *Water Res.* **42**:4439-4448.
30. **Craven, S. E., N. J. Stern, E. Line, J. S. Bailey, N. A. Cox, and P. Fedorka-Cray.** 2000. Determination of the incidence of *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings. *Avian Dis.* **44**:715-720.
31. **Croci, L., S. Di Pasquale, L. Cozzi, and L. Toti.** 2001. Behavior of aeromonas hydrophila in bottled mineral waters. *J. Food Prot.* **64**:1836-1840.
32. **De Gusseme, B., L. Vanhaecke, W. Verstraete, and N. Boon.** 2011. Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor. *Water Res.* **45**:1829-1837.
33. **De la Rosa, M., Mosso, M.** 2004. Historia de las aguas mineromedicinales en España. Observatorio Medioambiental.
34. **DIN.** 1984. Treatment and Disinfection of Swimming Pool and Bathing Pool Water. DIN 19643.
35. **Doria, M. F.** 2006. Bottled water versus tap water: understanding consumers' preferences. *J. Water. Health.* **4**:271-276.
36. **Durán, A. E., M. Muniesa, X. Méndez, F. Valero, F. Lucena, and J. Jofre.** 2002. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J. Appl. Microbiol.* **92**:338-347.
37. **Edge, T. A., and S. Hill.** 2007. Multiple lines of evidence to identify the sources of fecal pollution at a freshwater beach in Hamilton Harbour, Lake Ontario. *Water Res.* **41**:3585-3594.
38. **Elomari, M., L. Coroler, D. Izard, and H. Leclerc.** 1995. A numerical taxonomic study of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters. *J. Appl. Microbiol.* **78**:71-81.
39. **European Federation of Bottled Water (EFBW).** 2010. Bottled water facts.

40. **Evans, M. R., C. D. Ribeiro, and R. L. Salmon.** 2003. Hazards of healthy living: Bottled water and salad vegetables as risk factors for campylobacter infection. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:1219-1225.
41. **Feachem, R.** 1975. An improved role for faecal coliform to faecal streptococci ratios in the differentiation between human and non-human pollution sources. *Water Res.* **9**:689-690.
42. **Field, K. G., and M. Samadpour.** 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res.* **41**:3517-3538.
43. **Figueras, M. J., I. Inza, F. Polo, and J. Guarro.** 1998. Evaluation of the oxolinic acid-esculin-azide medium for the isolation and enumeration of faecal streptococci in a routine monitoring programme for bathing waters. *Can. J. Microbiol.* **44**:998-1002.
44. **Fiorillo, L., M. Zucker, D. Sawyer, and A. N. Lin.** 2001. The *Pseudomonas* hot-foot syndrome. *N. Engl. J. Med.* **345**:335-338.
45. **Francés, C.** 1994. Pedro Gutiérrez Bueno, introductor de la nueva nomenclatura química en España. *Anales de la Real Academia de Farmacia.* **4**:513-527.
46. **French Agency for Environmental and Occupational Health Safety.** 2009. Opinion: Concerning the assessment of health risks from artificial bathing waters. **2006/SA/011.**
47. **Galmes, A., A. Nicolau, G. Arbona, E. Gomis, M. Guma, A. Smith-Palmer, G. Hernandez-Pezzi, and P. Soler.** 2003. Cryptosporidiosis outbreak in British tourists who stayed at a hotel in Majorca, Spain. *Eurosurveillance Weekly.* **7**:33
48. **Gassilloud, B., L. Schwartzbrod, and C. Gantzer.** 2003. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3965-3969.
49. **Geldreich, E. E., and B. A. Kenner.** 1969. Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *J. Water Pollut. Control Fed.* **41**: R336-R352.
50. **GHR.** 1973. Greek Hygienic Regulations. Instructions for the Construction and Operation of Swimming Pools. Department of Health. Official Journal of the Greek Government
51. **Grabow, W. O. K.** 1990. Microbiology of drinking water treatment: reclaimed wastewater. p. 185-203. *In* G. A. McFeters (ed.), *Drinking Water Microbiology: Progress and Recent Developments*, Ed. Springer Verlag, New York.
52. **Grant, S. B., B. F. Sanders, A. B. Boehm, J. A. Redman, J. H. Kim, R. D. Mrse, A. K. Chu, M. Gouldin, C. D. McGee, N. A. Gardiner, B. H. Jones, J. Svejksky, G. V. Leipzig, and A. Brown.** 2001. Generation of enterococci bacteria in a coastal saltwater marsh and its impact on surf zone water quality. *Environ. Sci. Technol.* **35**:2407-2416.

-
53. **Greensmith, C. T., R. S. Stanwick, B. E. Elliot, and M. V. Fast.** 1988. Giardiasis associated with the use of a water slide. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**:91-94.
54. **Guillot, E., and H. Leclerc.** 1993. Biological specificity of bottled natural mineral waters: characterization by ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns. *J. Appl. Microbiol.* **75**:292-298.
55. **Havelaar, A. H., M. During, and E. H. M. D. Asch.** 1985. Comparative study of membrane filtration and enrichment media for the isolation and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* from sewage, surface water, and swimming pools. *Can. J. Microbiol.* **31**:686-692.
56. **Heylen, K., B. Vanparys, F. Peirsegaale, L. Lebbe, and P. De Vos.** 2007. *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:2056-2061.
57. **Hildebrand, J. M., H. C. Maguire, R. E. Holliman, and E. Kangesu.** 1996. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection linked to paddling pools. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* **6**:R33-6.
58. **International Organization for Standardization.** 1984. Detection and enumeration of fecal streptococci in water. Part 2. Method by membrane filtration. ISO 7899/1.
59. **International Organization for Standardization.** 1994. ISO 5667/3:1994 - Guidance on the Preservation and Handling of Samples.
60. **International Organization for Standardization.** 2000. Detection and enumeration of *E. coli* and coliform bacteria. Part 1. Membrane filtration method. ISO 9308-1.
61. **International Organization for Standardization.** 2006. Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. Method by membrane filtration. ISO 16266.
62. **Jagals, P., and W. O. K. Grabow.** 1996. An evaluation of sorbitol-fermenting Bifidobacteria as specific indicators of human fecal pollution of environmental water. *Water SA.* **22**:235-238.
63. **Jjemba, P. K., L. A. Weinrich, W. Cheng, E. Giraldo, and M. W. Lechevallier.** 2010. Regrowth of potential opportunistic pathogens and algae in reclaimed-water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:4169-4178.
64. **Johnson, L. W.** 1995. Communal showers and the risk of plantar warts. *J. Fam. Pract.* **40**:136-138.
65. **Jorgensen, N. O. G., K. K. Brandt, O. Nybroe, and M. Hansen.** 2009. *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:2195-2199.

66. **Kamihama, T., T. Kimura, J. Hosokawa, M. Ueji, T. Takase, and K. Tagami.** 1997. *Tinea pedis* outbreak in swimming pools in Japan. *Public Health.* **111**:249-253.
67. **Kämpfer, P., H. Busse, and E. Falsen.** 2006. *Herminiimonas aquatilis* sp. nov., a new species from drinking water. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**:287-291.
68. **Kee, F., G. McElroy, D. Stewart, P. Coyle, and J. Watson.** 1994. A community outbreak of echovirus infection associated with an outdoor swimming pool. *J. Public Health.* **16**:145-148.
69. **King, E. O., M. K. Ward, and D. E. Raney.** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* **44**:301-307.
70. **Kühn, I., G. Allestam, M. Engdahl, and T. Stenström.** 1997. Biochemical fingerprinting of coliform bacterial populations - comparisons between polluted river water and factory effluents. *Water Sci. Technol.* **35**:343-350.
71. **Kühn, I., G. Allestam, T. A. Stenström, and R. Möllby.** 1991. Biochemical fingerprinting of water coliform bacteria, a new method for measuring phenotypic diversity and for comparing different bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3171-3177.
72. **Kühn, I.** 1985. Biochemical fingerprinting of *Escherichia coli*: a simple method for epidemiological investigations. *J. Microbiol. Methods.* **3**:159-170.
73. **Kühn, I., A. Iversen, L. G. Burman, B. Olsson-Liljequist, A. Franklin, M. Finn, F. Aarestrup, A. M. Seyfarth, A. R. Blanch, X. Vilanova, H. Taylor, J. Caplin, M. A. Moreno, L. Dominguez, I. A. Herrero, and R. Möllby.** 2003. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment - a European study. *Int. J. Food Microbiol.* **88**:133-145.
74. **Kühn, I., A. Iversen, M. Finn, C. Greko, L. G. Burman, A. R. Blanch, X. Vilanova, A. Manero, H. Taylor, J. Caplin, L. Dominguez, I. A. Herrero, M. A. Moreno, and R. Mollby.** 2005. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5383-5390.
75. **Kühn, I., and R. Möllby.** 1993. The PhP-RS system. A simple microplate method for studying coliform bacterial populations. *J. Microbiol. Methods.* **17**:255-259.
76. **Le Dantec, C., J. P. Duguet, A. Montiel, N. Dumoutier, S. Dubrou, and V. Vincent.** 2002. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5318-5325.
77. **Leclerc, H., and A. Moreau.** 2002. Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**:207-222.
78. **Lee, J., C. S. Lee, K. M. Hugunin, C. J. Maute, and R. C. Dysko.** 2010. Bacteria from drinking water supply and their fate in gastrointestinal tracts of germ-free mice: a phylogenetic comparison study. *Water Res.* **44**:5050-5058.

-
79. **Legnani, P., E. Leoni, S. Rapuano, D. Turin, and C. Valenti.** 1999. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. *Int. J. Food Microbiol.* **53**:153-158.
80. **Levine, A. D., and T. Asano.** 2004. Recovering sustainable water from wastewater. *Environ. Sci. Technol.* **38**:201A-208A.
81. **Lilly, H. A., and E. J. L. Lowbury.** 1972. Cetrimide-nalidixic acid agar as a selective medium for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* **5**:151-153.
82. **Littlewood, M.** 2005. *Natural swimming pools: an inspirational guide for construction and maintenance.* Schiffer Publishing, Lancaster, Pennsylvania.
83. **Loveland-Curtze, J., V. I. Miteva, and J. E. Brenchley.** 2009. *Herminiimonas glaciei* sp. nov., a novel ultramicrobacterium from 3042 m deep Greenland glacial ice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:1272-1277.
84. **Lowbury, E. J., and A. G. Collins.** 1955. The use of a new cetrimide product in a selective medium for *Pseudomonas pyocyanea*. *J. Clin. Pathol.* **8**:47-48.
85. **Lumb, R., R. Stapledon, A. Scroop, P. Bond, D. Cunliffe, A. Goodwin, R. Doyle, and I. Bastian.** 2004. Investigation of spa pools associated with lung disorders caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompetent adults. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4906-4910.
86. **Mahoney, F. J., T. A. Farley, K. Y. Kelso, S. A. Wilson, J. M. Horan, and L. M. McFarland.** 1992. An outbreak of hepatitis a associated with swimming in a public pool. *J. Infect. Dis.* **165**:613-618.
87. **Manaia, C. M., O. C. Nunes, P. V. Morais, and M. S. da Costa.** 1990. Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria from mineral waters on selective and enrichment media. *J. Appl. Bacteriol.* **69**:871-876.
88. **Manero, A., and A. R. Blanch.** 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4425-4430.
89. **Manero, A., X. Vilanova, M. Cerdà-Cuellar, and A. R. Blanch.** 2006. Vancomycin- and erythromycin-resistant enterococci in a pig farm and its environment. *Environ. Microbiol.* **8**:667-674.
90. **Marion, J. W., J. Lee, S. Lemeshow, and T. J. Buckley.** 2010. Association of gastrointestinal illness and recreational water exposure at an inland U.S. beach. *Water Res.* **44**:4796-4804.
91. **Massa, S., C. Altieri, and A. D'Angela.** 2001. The occurrence of *Aeromonas* spp. in natural mineral water and well water. *Int. J. Food Microbiol.* **63**:169-173.

92. **Mavridou, A., M. Papapetropoulou, P. Boufa, M. Lambiri, and J. A. Papadakis.** 1994. Microbiological quality of bottled water in Greece. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**:213-216.
93. **Moce-Llivina, L., F. Lucena, and J. Jofre.** 2005. Enteroviruses and bacteriophages in bathing waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6838-6844.
94. **Morais, P. V., C. Mesquita, J. L. Andrade, and M. S. da Costa.** 1997. Investigation of persistent colonization by *Pseudomonas aeruginosa*-like strains in a spring water bottling plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:851-856.
95. **Mujeriego, R.** 2007. Golf course irrigation with reclaimed water. Water reuse case studies in Spain, 2. Universitat Politècnica de Catalunya.
96. **Office Fédéral de la Santé Publique.** 2004. Recommandations pour l'évaluation hygiénique des étangs de baignade publique aménagés artificiellement. **Bulletin 19/2004**
97. **Pantarella, F., F. Berlutti, C. Passariello, S. Sarli, C. Morea, and S. Schippa.** 2007. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *J. Appl. Microbiol.* **102**:992-999.
98. **Papapetropoulou, M., A. Tsintzou, and A. Vantarakis.** 1997. Environmental mycobacteria in bottled table waters in Greece. *Can. J. Microbiol.* **43**:499-502.
99. **Papapetropoulou, M., and A. C. Vantarakis.** 1998. Detection of adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested PCR amplification. *J. Infect.* **36**:101-103.
100. **Payment, P., J. Siemiatycki, L. Richardson, G. Renaud, E. Franco, and M. Prevost.** 1997. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *Int. J. Environ. Health Res.* **7**:5-31.
101. **Peña y Gallegos, C.** Establecimiento balneario de Arbieta, Orduña (Vizcaya). Guía ilustrada del bañista. Madrid.
102. **Quevedo-Sarmiento, J., A. Ramos-Cormenzana, and J. Gonzalez-Lopez.** 1986. Isolation and characterization of aerobic heterotrophic bacteria from natural spring waters in the Lanjaron area (Spain). *J. Appl. Bacteriol.* **61**:365-372.
103. **Rivera, J. B., and T. Adera.** 1991. Assessing water quality: staphylococci as microbial indicators in swimming pools. *J. Environ. Health.* **53**:29-32.
104. **Rodríguez, L.** 1995. Estudio histórico bibliográfico del termalismo. Ed. Diputación Provincial de Pontevedra, Orense.
105. **Rosenberg, F. A.** 2003. The microbiology of bottled water. *Clin. Microbiol. Newsl.* **25**:41-44.

-
106. **Ryu, H., A. Alum, and M. Abbaszadegan.** 2005. Microbial characterization and population changes in nonpotable reclaimed water distribution systems. *Environ. Sci. Technol.* **39**:8600-8605.
107. **Salazar, H. C., H. Moura, and R. T. Ramos.** 1982. Isolation of free-living amoebas from bottled mineral water. *Rev. Saude Publica.* **16**:261-267.
108. **Samples, J. R., P. S. Binder, F. J. Luibel, R. L. Font, G. S. Visvesvara, and C. R. Peter.** 1984. Acanthamoeba Keratitis Possibly Acquired From a Hot Tub. *Arch. Ophthalmol.* **102**:707-710.
109. **Sánchez Granjel, L. S.** 1981. La medina española antigua y medieval. Ed. Universidad de Salamanca, Salamanca.
110. **Schindler, P. R., H. Vogel, and W. Back.** 1995. Recommendations for changing microbiological examination parameters in filling bottled water to comply with the mineral and drinking water regulation. *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))*. **57**:806-811.
111. **Shwaller, P., and W. Schmidt-Lorenz.** 1980. Flore microbienne de quatre eaux minérales non gazéifiées et mises en bouteilles. I. Dénombrement de colonies, composition grossière de la flore, et caractères du groupe des bactéries Gram négatif pigmentées en jaune. *Zent. Bl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig.* **C1**:330-347.
112. **Sinton, L. W., R. K. Finlay, and D. J. Hannah.** 1998. Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review. *N. Z. J. Mar. Freshwat. Res.* **32**:323-348.
113. **Sinton, L. W., R. K. Finlay, and P. A. Lynch.** 1999. Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3605-3613.
114. **The Landscaping and Landscape Development Research Society.** 2006. Recommendations for the planning, construction and maintenance of private swimming and natural pools.
115. **United Nations Organization for Water.** 2007. Coping with water scarcity. Challenge of the twenty-first century. UN-Water, Hamilton, Canada.
116. **Vachee, A., P. Vincent, C. B. Struijk, D. A. A. Mossel, and H. Leclerc.** 1997. A study of the fate of the autochthonous bacterial flora of still mineral waters by analysis of restriction fragment length polymorphism of genes coding for rRNA. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**:492-503.
117. **Vilanova, X., A. Manero, M. Cerda-Cuellar, and A. R. Blanch.** 2004. The composition and persistence of faecal coliforms and enterococcal populations in sewage treatment plants. *J. Appl. Microbiol.* **96**:279-288.

118. **Warburton, D. W., K. L. Dodds, R. Burke, M. A. Johnston, and P. J. Laffey.** 1992. A review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada between 1981 and 1989. *Can. J. Microbiol.* **38**:12-19.
119. **Wither, A., M. Rehfish, and G. Austin.** 2005. The impact of bird populations on the microbiological quality of bathing waters. *Water Sci. Technol.* **51**:199-207.
120. **World Health Organization.** 2006. Swimming pools and similar recreational-waters environments. In: *Guidelines for safe recreational water environments*, vol 2. WHO Press. Geneva, Switzerland
121. **Wright, M. E., H. M. Solo-Gabriele, S. Elmir, and L. E. Fleming.** 2009. Microbial load from animal feces at a recreational beach. *Mar. Pollut. Bull.* **58**:1649-1656.
122. **Yoder, J. S., B. G. Blackburn, G. F. Craun, V. Hill, D. A. Levy, N. Chen, S. H. Lee, R. L. Calderon, and M. J. Beach.** 2004. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water-United States, 2001-2002. *MMWR Surveill. Summ.* **53**:1-22.
123. **Yoon, J. H., S. J. Kang, H. W. Oh, and T. K. Oh.** 2006. *Stenotrophomonas dokdonensis* *sp. nov.*, isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:1363-1367.
124. **Zhang, S., G. Yang, Y. Wang, and S. Hou.** 2010. Abundance and community of snow bacteria from three glaciers in the Tibetan Plateau. *J. Environ. Sci.* **22**:1418-1424.

5.Informes

5. Informes

5.1 Informe del factor d'impacte

Els articles que formen part de la Memòria de la Tesi Doctoral presentada per Arnau Casanovas i Massana han estat publicats o sotmesos per a la seva publicació en revistes internacionals indexades al Journal Citation Reports® tal i com es detalla a continuació:

Casanovas-Massana, A., Lucena, F. and Blanch, A.R. 2010. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in water-bottling plants on the basis of procedures included in ISO 16266:2006. *Journal of Microbiological Methods* **81**, 1-5.

Aquesta revista es troba inclosa en el tercer quartil de l'àrea temàtica de Microbiologia (63/107) amb un factor d'impacte per a l'any 2010 de 2,018.

Casanovas-Massana, A. and Blanch, A.R. 2012. Diversity of the heterotrophic microbial populations for distinguishing natural mineral waters. *International Journal of Food Microbiology* **153**, 38-44.

Aquesta revista es troba inclosa en el primer quartil de l'àrea temàtica de Ciència i Tecnologia dels Aliments (7/128) amb un factor d'impacte per a l'any 2010 de 3,143.

Casanovas-Massana, A. and Blanch, A.R. Characterization of microbial populations associated with natural swimming pools. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* (In press)

Aquesta revista es troba inclosa en el primer quartil de l'àrea temàtica de Salut Pública, Ambiental i Ocupacional (28/142) amb un factor d'impacte per a l'any 2010 de 2,886.

Casanovas-Massana, A. and Blanch, A.R. Determination of the fecal contamination origin in reclaimed water open-air reservoirs using biochemical fingerprinting of enterococci and fecal coliforms. (Sotmesa a *Environmental Science and Pollution Research*)

Aquesta revista es troba inclosa en el segon quartil de l'àrea temàtica de Ciències Ambientals (39/193) amb un factor d'impacte per a l'any 2010 de 2,870.

Dr. Anicet R. Blanch i Gisbert
Barcelona, 14 d'abril de 2012.

5.2 Informe de coautoria

El doctorand Arnau Casanovas i Massana ha participat en els articles que formen part de la seva Tesi Doctoral de la manera que es detalla a continuació:

Casanovas-Massana, A., Lucena, F. and Blanch, A.R. 2010. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in water-bottling plants on the basis of procedures included in ISO 16266:2006. *Journal of Microbiological Methods* **81**, 1-5.

El doctorand va dur a terme la major part de les tasques experimentals, incloent la caracterització bioquímica, fenotípica i genotípica de les soques estudiades. D'altra banda, va participar activament en la redacció del manuscrit i en l'elaboració de les taules i figures.

Casanovas-Massana, A. and Blanch, A.R. 2012. Diversity of the heterotrophic microbial populations for distinguishing natural mineral waters. *International Journal of Food Microbiology* **153**, 38-44.

El doctorand va dur a terme la major part de les tasques experimentals, incloent el mostreig, caracterització fenotípica i genotípica de les soques i els càlculs estadístics. També va participar activament en la redacció del manuscrit i en l'elaboració de les taules i figures.

Casanovas-Massana, A. and Blanch, A.R. Characterization of microbial populations associated with natural swimming pools. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* (In press).

El doctorand va dur a terme la major part de les tasques experimentals, incloent el mostreig, processament de les mostres, enumeració i caracterització de les poblacions bacterianes i els càlculs estadístics. També va participar activament en la redacció del manuscrit i en l'elaboració de les taules i figures.

Casanovas-Massana, A. and Blanch, A.R. Determination of the fecal contamination origin in reclaimed water open-air reservoirs using biochemical fingerprinting of enterococci and fecal coliforms. (Sotmesa a *Environmental Science and Pollution Research*).

El doctorand va dur a terme la major part de les tasques experimentals, incloent el mostreig, processament de les mostres, enumeració i caracterització de les poblacions bacterianes, l'estudi d'inactivació en mesocosmos i els càlculs estadístics; i va participar activament en la redacció del manuscrit i en l'elaboració de les taules i figures.

Dr. Anicet R. Blanch i Gisbert
Barcelona, 14 d'abril de 2012.

