

# Tecnologías para la monitorización de biofilm a tiempo real en redes de distribución de agua potable

Los biofilms son ecosistemas complejos de (micro)organismos organizados que se desarrollan adheridos a la superficie. Su proliferación en sistemas de distribución de agua potable puede comprometer la seguridad microbiológica del agua, así como también afectar a sus propiedades organolépticas, tales como color u olor. Además, su crecimiento puede provocar problemas operativos en la red de distribución, como biocorrosión de los materiales o la alteración de la concentración de los desinfectantes adicionados en el agua de consumo. Debido a la dificultad de acceder a los biofilms en los sistemas de distribución de agua, existe la necesidad de desarrollar tecnologías que permitan su monitorización *in situ* y a tiempo real, para prevenir los riesgos asociados a la formación de biofilm. En este estudio se han evaluado dos tecnologías para la monitorización de biofilm a tiempo real. El sensor bioelectroquímico AS01S3 Biofilm Sensor (de la casa comercial Alvim) y un sensor óptico, prototipo desarrollado por el IMB-CNM (CSIC). Los resultados mostraron que la adición de cloro en el agua de red de distribución impidió la formación de biofilm durante un año de monitorización. Los sensores fueron evaluados en relación con aspectos técnicos mostrando su robustez y la capacidad de reportar datos de forma continua. Se necesitarían experimentos adicionales para demostrar el funcionamiento de ambos sensores en condiciones comprobadas de formación de biofilm.

## Palabras clave

Biofilm, sistemas de distribución de agua potable, sensor, monitorización, tiempo real, inserción.

## TECHNOLOGIES FOR REAL-TIME BIOFILM MONITORING IN DRINKING WATER DISTRIBUTION NETWORKS

*Biofilms are communities of (micro)organisms that growth attached to the surface. Its proliferation in drinking water distribution systems may compromise microbiological water safety, but also alter the organoleptic properties of the water such as color or odor. Besides, biofilms growth in drinking water distribution systems can cause operational problems such as materials biocorrosion or alter the disinfectants added to the drinking water. Due to the difficulty to access to biofilms in distribution systems, there is the need to develop technologies allowing its monitoring in situ and at real time in order to prevent the associated risks to their growth. In this study, two technologies for biofilm monitoring at real time were tested. On one hand, the commercial bioelectrochemcial sensor developed by Alvim, on the other hand, a prototype of optical sensor developed by the CNM-CSIC. Results showed that the presence of chlorine in the drinking water avoided the biofilm growth during one year of monitoring. The sensors were evaluated in terms of operational functioning demonstrating a robust operative and the capacity to report results at real time. Further studies would be needed to demonstrate the sensors functioning under proven conditions of biofilm growth.*

## Keywords

*Biofilm, drinking water distribution systems, sensor, monitoring, real time, in line.*

### Albert Serra Compte

project manager en Cetaqua, Centro Tecnológico del Agua

### Clàudia Puigdomènech

project manager en Cetaqua, Centro Tecnológico del Agua

### Susana González Blanco

responsable técnica en Cetaqua, Centro Tecnológico del Agua

### Xavier Muñoz Berbel

investigador senior del Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM, CSIC)

### Tobias Ackermann

investigador postdoctoral del Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM, CSIC)

### Marta Máñez

investigadora predoctoral del Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM, CSIC)

### Pedro Navalón

director de Bioseguridad de Labaqua

### Adela Yáñez Amorós

directora de Innovación de Labaqua



## 1. INTRODUCCIÓN

El consumo de agua potable es una de las necesidades básicas a nivel global. Para garantizar la seguridad del agua de consumo es necesario proporcionar agua sin riesgo microbiológico ni químico. Para evitar el riesgo microbiológico en sistemas de distribución de agua potable, en diferentes países, como el caso de España, se mantiene un mínimo nivel de cloro residual que asegura su desinfección. Sin embargo, el agua de consumo no es estéril, ya que puede contener niveles bajos de microorganismos. Estudios previos han mostrado que la mayoría de los microorganismos presentes en los sistemas de distribución (> 90%) se encuentran en colonias de microorganismos adheridos a la superficie de las tuberías, son los biofilms, mientras que el resto se encuentran en suspensión [1].

Los biofilms son ecosistemas microbianos complejos organizados, que pueden incluir, bacterias, hongos, virus, algas y protozoos. Los biofilms están recubiertos por una matriz de exopolisacáridos que mantiene a los diferentes organismos que forman la comunidad unidos entre ellos, así como adheridos a la superficie. La matriz de exopolisacáridos proporciona a la comunidad estructura y la capacidad de captar nutrientes, así como una mayor resistencia a agentes desinfectantes [2,3].

La proliferación de biofilms en sistemas de distribución de agua potable puede afectar a la calidad del agua servida alterando sus características, así como provocar eventos de color u olor que alteran sus propiedades organolépticas. Además, los biofilms pueden ser reservorio de microorganismos patógenos oportunistas, con potencial riesgo

» La proliferación de biofilms en sistemas de distribución de agua potable puede afectar a la calidad del agua servida alterando sus características, así como provocar eventos de color u olor que alteran sus propiedades organolépticas. También ocasionar daños en la estructura del sistema de distribución e, incluso, ser un potencial riesgo sanitario

sanitario. Así mismo, la presencia de estos ecosistemas microbianos puede ocasionar daños en la estructura del sistema de distribución de agua, y aumentar el consumo de desinfectante, provocando problemas estructurales y funcionales en el sistema de distribución [4,5].

Tradicionalmente, se realiza la caracterización del biofilm a través de análisis de laboratorio. Sin embargo, su estudio en los sistemas de distribución es complejo debido a la dificultad de acceder a los biofilms dentro de la tubería. El desarrollo de tecnologías capaces de medir el crecimiento de biofilm *in situ* y proporcionar información a tiempo real puede proporcionar una nueva herramienta para el control de la proliferación de estos tapetes microbianos, evitando los riesgos asociados y permitiendo adecuar las medidas de tratamiento.

En este estudio se han evaluado a escala piloto dos equipos para la monitorización de biofilm a tiempo real en redes de distribución de agua potable. Por un lado, el sensor bioelectroquímico AS01S3 Biofilm Sensor (de la casa comercial Alvim); y, por otro lado, se ha evaluado un prototipo de sensor óptico desarrollado por el IMB-CNM (CSIC). Como control de la formación del biofilm en la tubería se ha empleado un sistema de testigos desarrollado por Labaqua.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. EQUIPOS UTILIZADOS PARA LA MONITORIZACIÓN DE BIOFILM

Se utilizaron dos equipos diferentes para la monitorización de biofilm, cuyas características principales se resumen a continuación:

- Características del sensor bioelectroquímico AS01S3 Biofilm Sensor (Alvim). El sensor bioelectroquímico Alvim caracteriza la actividad bacteriana que se desarrolla en la superficie del sensor, insertado dentro de la tubería y que, por lo tanto, es representativo de la formación de biofilm en el sistema dónde se encuentra. El sensor reporta un nivel de potencial por cada instante de tiempo (minuto).

- Características del sensor óptico. El sensor de biofilm óptico reporta un nivel de intensidad de luz en cada una de las longitudes de onda de 300 a 800 nm, cada 4 horas (la frecuencia de envío de datos se puede ajustar, y en este estudio fue cada 4 horas). El sensor, insertado dentro de la tubería, compara la intensidad de luz de la zona control (donde no puede depositarse biofilm) con la zona sensora donde se deposita biofilm.

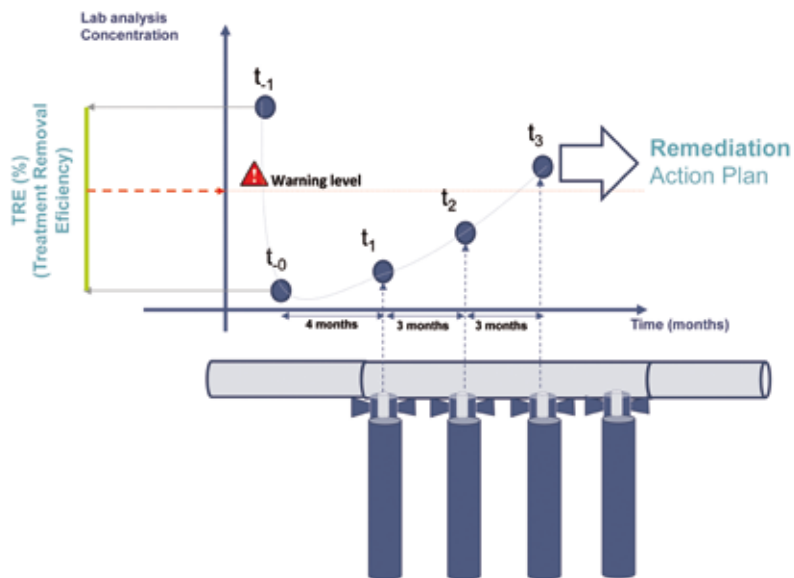
- Sistema de testigos. El sistema de testigos permite el seguimiento de la formación de biofilm en las tuberías de agua (**Figura 1**). Mecánicamente

se corta un pequeño fragmento de la tubería y se coloca un collarín donde se introduce el testigo que se puede ir desmontando para estudiar la evolución del biofilm. Los testigos son similares a los empleados para la toma de carga para atornillar un nuevo fragmento de tubería que es del mismo material y tamaño que el fragmento que se ha cortado. En primer lugar, se introduce la toma de carga en la tubería en la posición adecuada. Una vez transcurrido el tiempo de análisis, se extrae la parte expuesta a la corriente de agua y se traslada al laboratorio para su análisis.

## 2.2. DESCRIPCIÓN DE LA INSTALACIÓN Y ANÁLISIS DE LABORATORIO

Los equipos se instalaron en una plataforma experimental (Plataforma de Sensores propiedad de Aigües de Barcelona y operada por Cetaqua), que estuvieron generando datos durante un año. Esta infraestructura permite la evaluación de tecnologías de monitorización de calidad del agua. Posteriormente al año de experimentación con agua de distribución real, se realizó un período de estancamiento del agua forzado durante 4 semanas. Este período de estancamiento se realizó para eliminar el cloro presente en el agua de distribución (y así fomentar el crecimiento de biofilm), así como también para evaluar los equipos en

FIGURA 1. Esquema del sistema de testigos.



estas condiciones. En paralelo a los sensores, en la misma plataforma experimental, se instaló un sistema de testigos (diseñado por Labaqua) para poder controlar la posible formación y evolución del biofilm dentro de la tubería.

Se realizaron tres muestreos durante el año de experimentación, al cabo de 3, 6 y 12 meses de la instalación del módulo (T3, T6 y T12), así como también un muestreo al final del período de estancamiento. En cada muestreo se analizaron dos testigos diferentes con parámetros de laboratorio tales como densidad bacteriana, peso seco, contenido exopolisacáridos, ATP, actividad respiratoria y microscopía confocal. Finalmente, se caracterizó el agua del

sistema mediante sensores de medida a tiempo real para determinar temperatura, conductividad, pH, potencial redox (ORP) y concentración de cloro libre. La **Figura 2** muestra la instalación de ambos sensores, así como el sistema de testigos.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. CONTROL DE LA FORMACIÓN DEL BIOFILM EN EL SISTEMA DE TESTIGOS – ANÁLISIS DE LABORATORIO

Los resultados obtenidos de los tres muestreos de biofilm que se realizaron en condiciones de red de distribución, caracterizados en relación con la densidad bacteriana (bacterias vivas, dañadas, muertas y totales), se

FIGURA 2. Sensor óptico (A) y sensor bioelectroquímico (B) instalados en el módulo, y sistema de testigos (C).



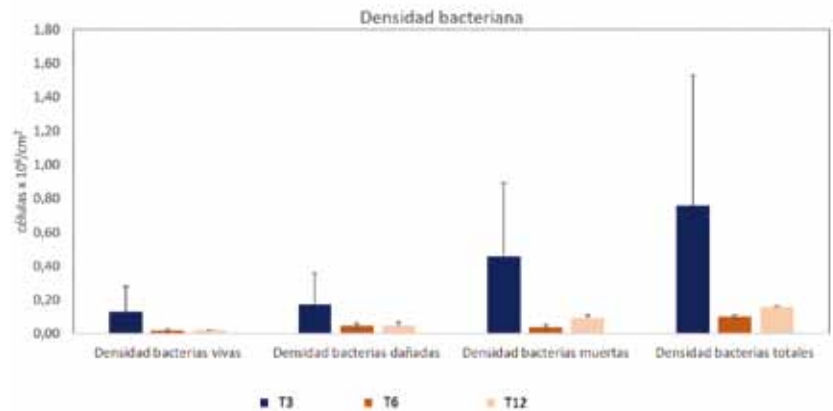


muestran en la **Figura 3**. El resto de los parámetros funcionales y estructurales del biofilm se muestran en la **Tabla 1**. Los valores de densidad bacteriana obtenidos en todos los muestreos fueron bajos. La densidad bacteriana del primer muestreo (T3) presentó una elevada desviación entre las muestras, por lo que los valores de densidad bacteriana no fueron significativamente diferentes a los de los dos muestreos posteriores (T6 y T12). Del mismo modo, los valores reportados por los parámetros funcionales y estructurales de la **Tabla 1** fueron bajos en todos los muestreos. A pesar de que se observó un aumento de algunos parámetros (peso seco y ATP) en el tercer muestreo (T12), los resultados obtenidos indican escasa presencia bacteriana en el sistema.

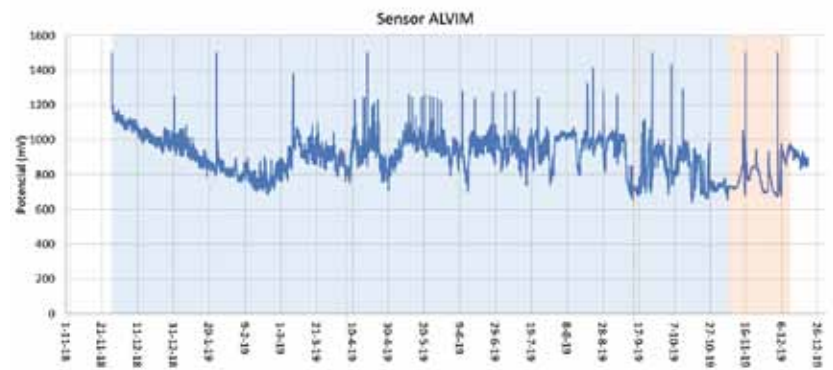
### 3.2. RESULTADOS DEL SENSOR DE BIOFILM BIOELECTROQUÍMICO ALVIM EN CONDICIONES DE RED DE DISTRIBUCIÓN

Los resultados reportados por el sensor Alvim se muestran en la **Figura 4**. El sensor reporta un nivel de potencial por cada instante de tiempo (minuto). Una hipotética formación de biofilm se observaría mediante un crecimiento sostenido de la línea base del potencial reportado por el sensor a lo largo de varios días (o semanas). Se observa que, en los primeros meses, la señal

**FIGURA 3.** Densidad bacteriana del biofilm en cada uno de los muestreos: primer muestreo, T3; segundo muestreo, T6; y tercer muestreo, T12. n = 2.



**FIGURA 4.** Valores de potencial reportados por el sensor Alvim durante el período de medida en condiciones de agua de red (área sombreada en azul) y durante el período de estancamiento (área sombreada en naranja). Las líneas rojas verticales indican los días que se realizaron muestreos en el piloto (T3, T6, T12) para determinar la formación de biofilm con análisis de laboratorio.



del sensor Alvim fue disminuyendo paulatinamente hasta estabilizarse alrededor de 1.000 mV. Por lo tanto, se estableció este valor como la línea base de la señal en las condiciones experimentales. Teniendo en

cuenta 1.000 mV como línea base, no se observó formación de biofilm en ningún momento del período de tiempo analizado. Sin embargo, se observaron algunas variaciones en la señal reportada por el sensor.

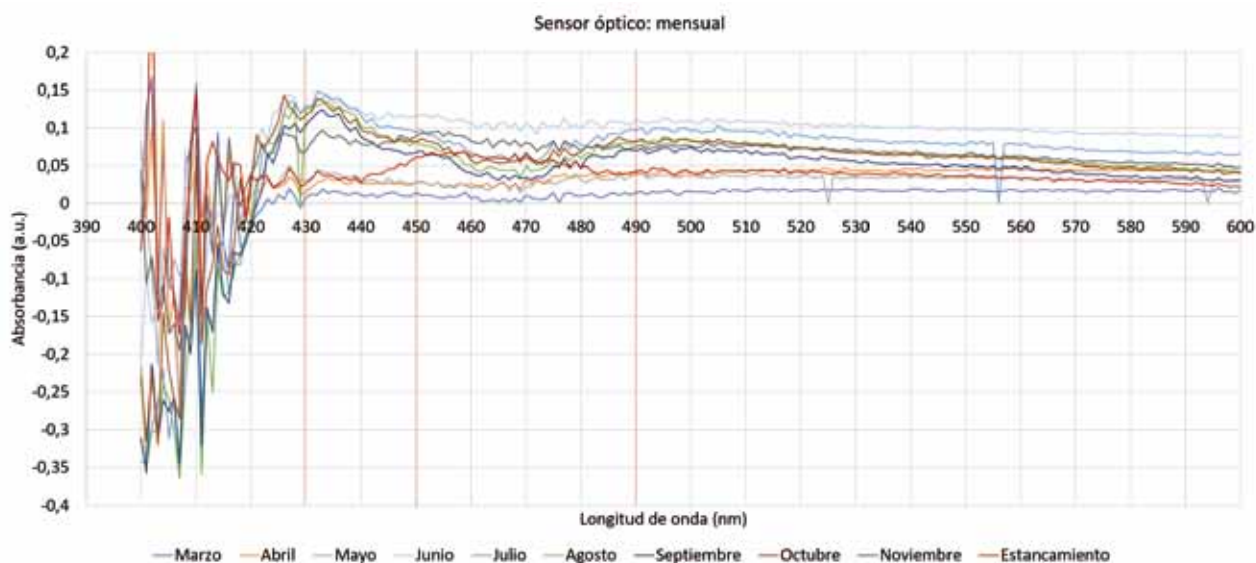
**TABLA 1**

**CARACTERIZACIÓN DEL BIOFILM EN TÉRMINOS DE PESO SECO, EXOPOLISACÁRIDOS, ATP, ACTIVIDAD RESPIRATORIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL EN LOS TRES MUESTREOS REALIZADOS: PRIMER MUESTREO, T3; SEGUNDO MUESTREO, T6; TERCER MUESTREO, T12. N = 2.**  
 Nota: < LD, inferior al límite de detección; \*, solo uno de los replicados pudo analizarse, por lo que no se reporta desviación.

Muestra	Peso seco (mg/cm <sup>2</sup> )	Contenido de exopolisacáridos (µg glucosa equivalentes/cm <sup>2</sup> )	ATP (pg ATP/cm <sup>2</sup> )	Actividad respiratoria resazurín (absorbancia -a.u.-)	Microscopía confocal (imágenes)
T3	0,6 ± 0,7	2,2*	Nulo	< LD	No se observa
T6	0,4 ± 0,3	16,7*	Nulo	< LD	No se observa
T12	1,1*	3,8*	16,0 ± 0,7	< LD	No se observa



**FIGURA 5.** Resultados del sensor óptico. Se presenta una medida de tiempo por cada uno de los meses de análisis (de marzo a noviembre de 2019), así como también durante el período de estancamiento. Las líneas verticales indican las longitudes de onda potencialmente sensibles al cambio en su perfil.



Las variaciones en la señal del sensor correspondieron con variaciones en las concentraciones de cloro libre residual, conductividad y pH en el sistema. Estas variaciones son debidas a cambios espontáneos de origen del agua en la red de distribución del punto de estudio, que implican cambios fisicoquímicos de la matriz del agua. Estos resultados señalan que variaciones en los parámetros fisicoquímicos del agua pueden provocar cambios en la señal reportada por el sensor Alvim. Sin embargo, hay que considerar que las variaciones observadas en Alvim fueron cambios rápidos y bruscos en el tiempo, por lo que no se confundieron con una potencial formación de biofilm, que estaría representada por un crecimiento sostenido de la señal de Alvim a lo largo de varios días/semanas.

### 3.3. RESULTADOS DEL SENSOR DE BIOFILM ÓPTICO, PROTOTIPO CNM-CSIC EN CONDICIONES DE RED DE DISTRIBUCIÓN

Los resultados reportados por el sensor óptico durante el período de

análisis se representan en la **Figura 5**. Para determinar el potencial crecimiento de biofilm en el sistema, se grafica la evolución de la absorbancia por cada longitud de onda de 300 a 800 nm, por cada instante de tiempo de medición (cada 4 horas). Para representar estos datos se escogió una medición (absorbancia por longitud de onda) por cada mes, correspondiente en todos los casos al día 4 de cada mes. Un potencial crecimiento de biofilm se observaría mediante cambios en el perfil de la longitud de onda vs. absorbancia.

La señal de absorbancia correspondiente a los tres primeros meses de medición, marzo, abril y mayo no presentó variaciones a lo largo de las longitudes de onda medidas (**Figura 5**). A partir de junio los valores de absorbancia incrementaron en la longitud de onda de 430 nm. En los datos de julio hasta noviembre se observan tres picos en las longitudes de onda de 430, 450 y 490 nm. Estos cambios en el perfil de longitud de onda vs. absorbancia serían potencialmente indicativos de la pre-

sencia de bacterias en el sistema. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los valores de absorbancia reportados presentan solo pequeñas variaciones por lo que la presencia de bacterias sería baja.

### 3.4. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ESTANCAMIENTO

La caracterización de los dos testigos después del período de estancamiento determinó un incremento en los parámetros relacionados con la densidad bacteriana, en comparación con los muestreos previos. También se observó un incremento significativo de ATP. Además, el peso seco y el contenido en exopolisacáridos se mantuvieron en valores relativamente bajos. Así, el período de estancamiento incrementó la presencia de bacterias en el sistema, aunque la formación de biofilm siguió siendo nula (o muy escasa).

Como era de esperar, el sensor de biofilm Alvim se vio afectado por el estancamiento del agua, ya que según requerimientos del equipo necesita una velocidad mínima de flu-



» La presencia de cloro en el agua de distribución impidió la formación de biofilm, por lo que no se pudo comprobar la respuesta de los sensores. No obstante, el estudio sí permitió evaluar el funcionamiento de estos equipos en condiciones de ausencia de biofilm y su respuesta, no generando falsos positivos

jo, mostrando una disminución en la señal reportada por el sensor por la falta de circularización del agua (**Figura 4**). Una vez retomada la recirculación de agua, no se observó ninguna tendencia relacionada con la formación de biofilm, ya que en todos los casos la señal estuvo por debajo de 1.000 mV, considerada la línea base de las condiciones de estudio.

Unos resultados muy parecidos se obtuvieron con el sensor óptico, observándose una disminución de la señal durante el período de estancamiento en comparación con las señales de los meses previos (**Figura 5**). Estos cambios pueden ser debidos a que las condiciones de estancamiento provocaron cambios en la composición de la población bacteriana, por lo que las bacterias presentes durante el estancamiento no absorben a las mismas longitudes de onda. Estos cambios también pueden ser provocados por el depósito de compuestos en la zona sensora del equipo. De igual modo, no se observó una tendencia en la señal del sensor indicativa de crecimiento de biofilm.

#### 4. CONCLUSIONES

En este estudio se evaluaron dos sensores de inserción en tubería para la determinación de biofilm a tiempo real en redes de distribución de agua potable. Se estima que la presencia de cloro en el agua de distribución impidió la formación

de biofilm (caracterizada a través del sistema de testigos y parámetros de laboratorio) durante un año de análisis. Los tratamientos efectuados en el agua de distribución demostraron su eficacia en la prevención de la formación de biofilm y, por lo tanto, reduciendo los potenciales riesgos derivados.

En consonancia con estos resultados, ambos sensores no determinaron presencia de biofilm durante el año de monitorización. A pesar de que no se pudo comprobar su respuesta frente a una formación de biofilm, el estudio permitió evaluar el funcionamiento de los sensores en condiciones de ausencia de biofilm y su respuesta, no generando falsos positivos.

En este estudio también se ha demostrado la validez de los sistemas testigos que, instalados en paralelo en la tubería, permite de una forma sencilla y rápida ir analizando la formación del biofilm, así como el análisis de la comunidad microbiana, su estructura y metabolismo, en distintos tiempos.

El sensor Alvim reportó una señal cada minuto, por lo que es un sistema de monitorización de biofilm a tiempo real. El sensor fue robusto durante el tiempo de experimentación. Variaciones en condiciones fisicoquímicas del agua provocaron cambios en la señal, pero esos cambios son identificados claramente frente a los potenciales que deben obtenerse cuando existe la

formación de biofilm. Este sensor debe aplicarse en condiciones de agua en movimiento, ya que son requerimientos de instalación, y se comprobó, como era de esperar, que la señal disminuyó durante el estancamiento.

El sensor óptico reportó una medición del potencial crecimiento de biofilm cada 4 horas, por lo que puede ser aplicado también para la monitorización de formación de biofilm a tiempo real. Los resultados reportados por el sensor pueden ser indicativos de presencia bacteriana en el sistema, pero no se pudo determinar una potencial formación de biofilm debido a los bajos valores reportados.

Experimentos adicionales serían necesarios para determinar el funcionamiento de ambos sensores en condiciones comprobadas de formación de biofilm.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a Aigües de Barcelona la infraestructura facilitada para la realización del año de pruebas. Este estudio ha sido cofinanciado por el proyecto RIS3CAT SENIX, COMRDI16-1-0055.

#### Bibliografía

- [1] Flemming, H.; Percival, S.; Walker, J. (2002). Contamination potential of biofilms in water distribution systems. *Water Supply*, núm. 2 (1), págs. 271-280.
- [2] Sabater, S.; Guasch, H.; Ricart, M.; Romani, A.; Vidal, G.; Klünder, C.; Schmitt-Jansen, M. (2007). Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Anal. Bioanal. Chem.*, núm. 387, págs. 1.425-1.434.
- [3] Laurent, P.; Servais, P.; Randon, G. (1993). Bacterial development in distribution networks - study and modelling. *Water Supply*, núm. 11, págs. 387-398.
- [4] Starosvetsky, D.; Armon, R.; Yahalom, J.; Starosvetsky J. (2001). Pitting corrosion of carbon steel caused by iron bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, núm. 47, págs.79-87.
- [5] Norton, C.D.; LeChevallier, M.W.; Falkinham III, J.O. (2004). Survival of mycobacterium avium in a model distribution system. *Water Res.*, núm. 38, págs. 1.457-1.466. 